(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 674 439**

(51) Int. CI.:

A61K 39/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2012 PCT/US2012/039254**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12166493**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2012 E 12726290 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2714077**

(54) Título: **Administración sin aguja de vacunas contra el VSRRP**

(30) Prioridad:

01.06.2011 US 201161491955 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.06.2018

(73) Titular/es:

MERIAL, INC. (50.0%)
3239 Satellite Blvd.
Duluth, GA 30096, US y
CHULALONGKORN UNIVERSITY (50.0%)

(72) Inventor/es:

SURADHAT, SANIPA;
AUDONNET, JEAN-CHRISTOPHE y
CHARREYRE, CATHERINE

(74) Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

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

Administración sin aguja de vacunas contra el VSRRP

[**0001**] El virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (VSRRP) pertenece a una familia de virus de ARN de cadena positiva con envoltura llamados virus arteri. Otros virus de esta familia son el virus prototipo, el virus de la arteritis equina (VAE), virus que eleva la lactato deshidrogenasa (VLD) y el virus de la fiebre hemorrágica de los simios (VFHS) (de Vries et al., 1997 para una revisión). Las características llamativas comunes a los Coronaviridae y Arteriviridae han dado lugar recientemente a su colocación en un orden de nueva creación, los Nidovirales (Pringle, 1996; Cavanagh, 1997; de Vries et al., 1997). Los cuatro miembros del grupo Arterivirus, aunque son similares en la organización del genoma, la estrategia de replicación y la secuencia de aminoácidos de las proteínas también son similares en su preferencia por la infección de macrófagos, tanto in vivo como in vitro (Conzelmann et al, 1993; Meulenberg et al, 1993a).

[**0002**] La organización del genoma de arterivirus está revisado en de Vries et al. (1997). El ARN del genoma es de cadena sencilla, infeccioso, poliadenilado y bloqueado en 5'. El genoma de VSRRP es pequeño, de 15.088 bases. Tanto los genomas de VAE como de VLD son ligeramente más pequeños de 12.700 bases y 14.200 bases, respectivamente. Las secuencias completas de los genomas de VAE, VLD y VSRRP están disponibles (Den Boon et al, 1991; Godeny et al, 1993; Meulenberg et al 1993a.).

[0003] El genoma contiene ocho marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican, en el siguiente orden, los genes de la replicasa (ORF 1a y 1b), las proteínas de la envoltura (ORF 2 a 6) y la proteína de la nucleocápside (ORF 7) (Meulenberg et al. 1993a). Los ORFs 2 a 7 se expresan a partir de seis ARN subgenómicos, que se sintetizan durante la replicación (Meng et al., 1994, 1996). Estos ARN subgenómicos forman un conjunto anidado 3' coterminal y se componen de un líder común, derivado del extremo 5' del genoma viral (Meulenberg et al. 1993b). Aunque los ARN son estructuralmente policistrónicos, la traducción se limita a las únicas secuencias 5' que no están presentes en el siguiente ARN más pequeño del conjunto. Dos grandes marcos de lectura abiertos (ORFs) solapantes, designados ORF 1a y ORF 1b ocupan más de dos tercios del genoma. El segundo ORF, ORF 1b sólo se expresa después de una lectura de la traducción a través de un cambio de marco -1 medida por una estructura pseudoknot (Brierley 1995). Los polipéptidos codificados por estos ORFs se escinden proteolíticamente por proteasas codificadas por virus para producir las proteínas implicadas en la síntesis de ARN.

[0004] ORF 2 codifica una proteína estructural N-glicosilada de 29-30 kDa (GP2 o GS) que muestra las características de glicoproteínas de mebrana integral de clase 1 (Meulenberg y Petersen-den Besten, 1996 usando la cepa Ter Huurne del virus Lelystad). La proteína ORF2 muestra un 63% de homología de aminoácidos cuando el aislado VR-2332 americano se compara con el virus de Lelystad (Murtaugh et al., 1995). ORF 3 codifica una proteína menor estructural N-glicosilada de 45-50 kDa denominada GP3 (van Nieuwstadt et al., 1996). ORF 4 codifica un proteína de membrana menor N-glicosilada de 31-35 kDa denominada GP4 (van Nieuwstadt et al., 1996). ORF 5 codifica GP5 o GL, que es una glicoproteína de la envoltura mayor de 25 kDa (Meulenberg et al., 1995). ORF 6 codifica una proteína de membrana (M) integral no glicosilada de clase III de 18 kDa (Meulenberg et al, 1995). ORF 7 codifica una proteína básica no glicosilada de 15 kDa. El ORF del genoma del virus de la arteritis equina (EAV) se denominó 2a y codifica una proteína estructural de 8kDa esencial llamada "E" (Snijder et al, 1999). En VSRRP, el ORF homólogo ha sido designado como 2b, el ORF 2 que codifica GP2 (ver arriba) se ha renombrado como ORF 2a (Snijder et al., 1999).

[**0005**] Dos grupos principales de signos clínicos están asociados con la aparición de PRRS aunque ahora se ha reconocido que los efectos clínicos varían mucho entre los rebaños infectados y en muchos casos, la infección es subclínica y la productividad está dentro de parámetros aceptables. Los dos grupos son: (1) los signos reproductivos que incluyen nacimientos prematuros, abortos tardíos, lechones nacidos débiles y un aumento de mortinatos y momificaciones (Dado y Paton, 1995). (2) Los signos de enfermedad respiratoria también son importantes en cerdos neonatales, siendo la dificultad para respirar y tos las características más dominantes. Los síntomas generalmente se presentan en cerdos de tres semanas de edad, a pesar de que todas las edades son susceptibles. En contraste con los fracasos reproductivos, las enfermedades respiratorias clínicamente evidentes son más difíciles de reproducir experimentalmente (Zimmermann et al. 1997). Estos signos clínicos varían considerablemente y pueden estar influidos por la cepa del virus (Halbur et al., 1995), la edad de la infección y las diferencias en la susceptibilidad genética (Halbur et al., 1992), infecciones concurrentes (Galina et al., 1994), densidad de cerdos, los movimientos de cerdo y los sistemas de alojamiento (Listo et al., 1996) y el estado inmunitario, incluyendo la presencia de niveles bajos de anticuerpos específicos del virus de PRRS que puede mejorar (Yoon et al., 1994).

[**0006**] Parece que hay tres vías de transmisión: (1) de nariz a nariz o contacto cercano (Done et al, 1996), (2) los aerosoles (Le Potier et al, 1995), y (3) extendido a través de la orina, heces y semen. La transmisión a través de la inseminación con semen contaminado está bien documentado (Yeager et al, 1993; Albina, 1997). En cuanto a la patogénesis, el cambio más significativo inducido por VSRRP es el daño severo a los macrófagos alveolares, que se destruyen en gran número (revisado en Done y Paton, 1995; Rossow, 1998). La inducción de la apoptosis en un gran número de células mononucleares en los pulmones y ganglios linfáticos podría ser una explicación de una reducción dramática en el número de macrófagos alveolares y los linfocitos y monocitos circulantes en cerdos

infectados con VSRRP (Sirinarumitr et al, 1998; Sur et al., 1998). Junto con la destrucción de linfocitos circulantes y la destrucción del sistema de aclaramiento mucociliar, esto puede suprimir la inmunidad y hacer que los cerdos sean más susceptibles a una infección secundaria. Una mayor tasa de infecciones secundarias bacterianas se ha documentado después de la infección por VSRRP (Galina et al, 1994; Dado y Paton, 1995; Nakamine et al 1998). La severidad de la infección por VSRRP también puede aumentar por infección bacteriana o micoplasma (Thacker et al. 1999). Además, se ha encontrado un número de infecciones virales asociado con PRRS (Carlson, 1992; Brun et al, 1992; Halbur et al, 1993; Done et al, 1996; Heinen et al, 1998).

[**0007]** La infección con VSRRP suele inducir respuestas inmunitarias anti-virales lentas y débiles, lo que lleva a la infección persistente y la inmunosupresión en los pulmones de cerdos infectados. Las estrategias de evasión inmunitaria por VSRRP descritas incluyen la inhibición de las respuestas inmunitarias innatas, la inducción de citoquinas inmunosupresoras sistémicas; IL-10 y Tregs porcinos (linfocitos $CD4^+CD25^+Foxp3^+$) que dieron como resultado inmunosupresión generalizada durante una fase temprana de la infección. La inmunidad adaptativa contra VSRRP es a menudo lenta e ineficiente, con evidencia de la activación de células B policlonales y la inducción de ADE en la siguiente exposición. Los solicitantes han generado recientemente una evidencia experimental que sugiere que las propiedades inmunomoduladoras del virus pueden depender de la interacción de la proteína estructural y las células inmunitarias (S. Suradhat, observación no publicada). En general, la infección por VSRRP no mata a los cerdos infectados, sino que más bien provoca varias complicaciones de salud relacionadas con la función inmunitaria subóptima. Varios informes demuestran que las actividades inmunomoduladoras inducidas por VSRRP podrían resultar en inmunodeficiencia secundaria causando infección persistente, complicaciones secundarias y el fracaso de la vacuna en los cerdos infectados.

[0008] Aunque hay varias vacunas comerciales están disponibles en el mercado, el beneficio de la inmunidad inducida por la vacuna en los cerdos vacunados no ha sido satisfactoria. La vacuna de virus vivo modificado (MLV) ha demostrado ser más eficaz que la vacuna inactivada debido a su capacidad para inducir una inmunidad relativamente más amplia. La evidencia también sugiere un papel para la inmunidad mediada por células en la limitación de la infección por VSRRP y la difusión dentro de cerdos infectados. Sin embargo, la inducción de la inmunidad específica por MLV ha demostrado ser retardada e ineficiente Además, la inmunidad inducida por MLV proporciona sólo una protección parcial contra la infección por VSRRP heterólogo. En algunos casos, el uso de MLV ha planteado preocupaciones respecto a la seguridad y la inducción de inmunotolerancia.

[0009] En general, el desarrollo de la vacuna contra la infección viral se basa en la inducción de la inmunidad mediada humoral y celular protectora específica viral. El desarrollo de una vacuna eficaz contra SRRP ha sido costosamente desafiante con la alta variabilidad antigénica del virus (cuasiespecies) y su capacidad para controlar el sistema inmunitario a través de varias actividades inmunomoduladoras. Por lo tanto, a pesar de estar adecuadamente preparado antes de la infección, las células efectoras/de memoria específicas de VSRRP inducidas por la vacuna podrían no ser capaces de funcionar bien durante una fase temprana de la infección. Dado que VSRRP solo no mata a los cerdos infectados, se postuló que si se eliminan/reducen los efectos inmunomoduladores inducidos por VSRRP, el sistema inmunitario del huésped infectado debe ser capaz de limitar/aclarar la infección viral por sí mismo. Esto también ayudará a minimizar la infección persistente y complicaciones secundarias en la etapa tardía de la infección.

[0010] Una vacuna que podría inducir una fuerte inmunidad celular con reactividad cruzada anti-VSRRP debe tener un beneficio en la reducción de la viremia, los signos clínicos inducidos por VSRRP y mejora de la condición general de salud mediante la reducción de las complicaciones secundarias relacionadas con la inmunodeficiencia inducida por VSRRP. Además, evitar la activación innecesaria de células B por el antígeno de la vacuna sería ideal para la aplicación de estrategias de la diferenciación de los animales infectados y vacunados (DIVA) en las granjas. Se ha propuesto el uso de inyectores sin aguja en el campo veterinario (WO-A-98/03659, WO-A-92/15330, WO-A-98/03658; Van Rooij et al, Vet Immunol Immunopathol., 1998, 66 (2), 113-126;US-A-6.451.770; Schrijver et al, Vaccine, 1998, 16 (2-3), 130-134), pero la técnica anterior contiene resultados inconsistentes y contradictorios (McKercher PD et al, Can J. Comp Med, 1976, 40, 67-74; Epstein, Hum gene Ther, 2002, 13 (13), 275-280; Haensler, Vaccine, 1999, 17 (7-8), 628-638). Por lo tanto, una persona experta no puede predecir si la administración sin aguja será eficaz para una combinación huésped/vacuna no probada.

[0011] El documento US 2008/299141 A1 describe un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de VSRRP truncada, una vacuna en la que dicho vector expresa una proteína antigénica codificada por un marco de lectura abierto, preferiblemente y una composición inmunológica que comprende dicho vector, un adyuvante y un portador farmacéutica o veterinariamente adecuado.

[0012] El documento US 5998601 A describe la SEQ ID NO: 4 de la presente solicitud y un vector que comprende ORF7 utilizado en una vacuna.

[0013] El documento WO 2007/040876 A2 decribe un kit de vacunación que comprende un inyector sin aguja de líquido y un vial de vacuna que contiene un VSRRP, operativamente ensamblado para llevar a cabo la administración de la vacuna a un animal de la familia de los suidos y para provocar una respuesta inmunitaria segura y protectora contra VSRRP.

[0014] La cita o identificación de cualquier documento en esta solicitud no es una admisión de que dicho documento está disponible como técnica anterior a la presente invención.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

[0015] La presente invención proporciona:
una composición inmunológica que comprende un vector, en el que dicho vector comprende una secuencia de ácido nucleico, que codifica una proteína ORF7 truncada del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (VSRRP) que consiste en SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos un 85% de homología a la misma, para usar en un procedimiento para provocar en un animal una respuesta inmunitaria segura y protectora contra VSRRP, comprendiendo el procedimiento administrar por vía transdérmica una cantidad eficaz de la composición usando un inyector sin aguja a chorro de líquido.
una composición para usar de acuerdo con la invención en la que la proteína ORF7 está codificada por una secuencia que tiene al menos un 70% de homología con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3.
una composición para usar de acuerdo con la invención que además comprende un adyuvante y un portador farmacéutica o veterinariamente adecuado.
una composición para usar de acuerdo con la invención en el que el inyector sin aguja a chorro de líquido se selecciona entre el dispositivo DERMAVAC® y otros inyectores sin aguja.
una composición para usar de acuerdo con la invención, en la que el vector es un plásmido.
una composición para usar de acuerdo con la invención, en la que el plásmido es un plásmido de ADN, en particular, el plásmido de la SEQ ID NO: 8.
una composición para usar de acuerdo con la invención, en al que el animal es de la familia de los suidos.
una composición para usar de acuerdo con la invención, en la que dicha composición se formula para la administración como una sola dosis a porcinos.
una composición para usar de acuerdo con la invención que comprende además un adyuvante, que es TS6.
una composición para usar de acuerdo con la invención, en la que el porcino es un lechón destetado de aproximadamente 11 a aproximadamente 24 días de edad.

[0016] El objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo procedimiento de vacunación de un animal de la familia de los suidos, que sea eficiente, fácil y menos costosa de usar, y que conduzca a una mayor seguridad.

[0017] Este objetivo se cumple mediante la administración de una vacuna con ADN del virus del síndrome reproductor y respiratorio (VSRRP) porcino con la ayuda de un inyector sin aguja a chorro de líquido, asegurando una distribución de la vacuna esencialmente en la dermis y la hipodermis del animal.

[0018] Se describe en este documento un procedimiento de vacunación contra el VSRRP, que puede comprender la etapa administrar esencialmente en la dermis y la hipodermis de un animal de la familia de los suidos una cantidad eficaz de una vacuna con ADN de VSRRP utilizando un inyector sin aguja a chorro de líquido, cuya administración provoca una respuesta inmunitaria segura y protectora contra VSRRP.

[0019] También se describe en el presente documento un kit o conjunto de vacunación que puede comprender dicho inyector sin aguja a chorro de líquido y al menos un vial de vacuna que contiene una vacuna con ADN de VSRRP, operativamente ensamblados para llevar a cabo la administración de la vacuna esencialmente en la dermis y la hipodermis de un animal de la familia de los suidos y para provocar una respuesta inmunitaria segura y protectora contra VSRRP.

[0020] También se describe en el presente documento el uso de un vector de ADN que puede codificar y expresar al menos un inmunógeno de VSRRP y de un vehículo o diluyente aceptable, para la preparación de una vacuna líquida diseñada para ser administrada esencialmente en la dermis y la hipodermis de animales de la familia de los suidos utilizando un inyector sin aguja a chorro de líquido, y que provoca una respuesta inmunitaria segura y protectora contra VSRRP.

[0021] Se observa que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones y/o párrafos, los términos, tales como "comprende" "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de Patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y que términos tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no citados de manera explícita, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

[0022] A menos que se indique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Los términos singulares "un", "una", y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0023] Estas y otras realizaciones se describen o son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y son abarcadas por la misma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0024] La siguiente descripción detallada, proporcionada a modo de ejemplo, y que no pretende limitar la invención a realizaciones específicas descritas, puede entenderse junto con las figuras adjuntas incorporadas en este documento por referencia, en las que:

La figura 1 ilustra el esquema de clonación para la producción de pORF7 (SEQ ID NO: 10) y pORF7t (SEQ ID NO: 11); se incluye un mapa de pBAD-ORF7 (SEQ ID NO: 13) y pMASIA (SEQ ID NO: 9);

la figura 2 presenta alineamientos de secuencias de aminoácidos de proteínas de la nucleocápside 1) US pMA C2 (SEQ ID NO: 15), pBAD (SEQ ID NO: 16), 01NP1.2 (SEQ ID NO: 17); y 2) 01NP1 (SEQ ID NO: 18) y ORF7t (SEQ ID NO: 4);

la figura 3 es una imagen en gel de agarosa que muestra la presencia o ausencia de productos de amplificación por PCR de genes de la nucleocápside de VSRRP (ORF7) para el gen de la nucleocápside de VSRRP (ORF7) en PBMC porcinas transfectadas con cualquiera de los plásmidos pORF7, pORF7t o pMASIA;

la figura 4 presenta un análisis de transferencia Western de las proteínas recombinantes producidas a partir del vector de expresión que contiene un fragmento de gen de ORF7 u ORF7t;

la figura 5 es una imagen en gel de agarosa que representa el análisis de restricción con NcoI de pMASIA, pORF7, y pORF7t;

la figura 6 presenta el plan de estudio de la vacunación con VSRRP, incluyendo la cronología de los eventos y la recogida de datos;

la figura 22A es una imagen que representa la técnica de inmunización de ADN intradérmica;

la figura 22B es una imagen que representa los sitios inyectados después de la inyección intradérmica;

la figura 23A es una imagen de gel que indica la presencia de VSRRP en las muestras de suero agrupadas durante el experimento de los cerdos experimentales inmunizados con PBSA (P), el plásmido nulo (N), pORF7 (F), y pORF7t (T);

la figura 23B es una imagen de gel indica la presencia de VSRRP en las muestras de tejido pulmonar agrupadas a los 10 días después de la infección de los cerdos experimentales inmunizados con PBSA (P), plásmido nulo (N), pORF7 (F), y pORF7t (T);

la figura 9A es un gráfico del número de IFNγ+ específicos de VSSRP en las PBMC;

la figura 9B es un gráfico del números de células IL-10+ en las PBMC;

la figura 10A es un gráfico del número de CD4+CD25+ específicas de VSSRP en las PBMC;

la figura 10B es un gráfico del número de células CD4+CD25+Foxp3+ (B) en las PBMC;

la figura 11A presenta una visión general del plan experimental descrito en el Ejemplo 3;

la figura 11B presenta pruebas clínicas realizadas durante el estudio;

la figura 12A es un gráfico del número de células IL-10+ específicas de VSRRP en las PBMC;

la figura 12B es un gráfico del número de células IL-10+ específicas de VSRRP en la población de linfocitos;

la figura 12C es un gráfico del número de células IFNγ+ específicas de VSRRP en las PBMC;

la figura 12D es un gráfico del número de células IFNγ+ específicas de VSRRP en la población de linfocitos; los datos de la figura 12 representa un porcentaje promedio (± SEM) de las células productoras de citoquinas, obtenido mediante el porcentaje de las células productoras de citoquinas de las células cultivadas con VSRRP - el porcentaje de células productoras de citoquinas de las células cultivadas con lisado simulado. "a" indica la diferencia estadística de otros grupos, a $p < 0,05$. "b" indica la diferencia estadística entre el plásmido pORF7t y el plásmido null, a $p < 0,05$. "c" indica la diferencia estadística entre pORF7t y PBSA, a $p < 0,05$. "d" indica la diferencia estadística entre nulo y PBSA, a $p < 0,05$.

la figura 13A es un gráfico del número de células Foxp3+ específicas de VSRRP en las PBMC de los cerdos experimentales;

la figura 13B es un gráfico del número de células Foxp3+ específicas de VSRRP en la subpoblación de linfocitos CD4+CD25+ de las PBMC de los cerdos experimentales; los datos de las figuras 13 representan un porcentaje promedio (± SEM) de las células Foxp3+, obtenido mediante el porcentaje de las células Foxp3+ de las células cultivadas con VSRRP - el porcentaje de células Foxp3+ de las células cultivadas con lisado simulado. ("a" indica la diferencia estadística de otros grupos, a $p < 0,05$. "b" indica la diferencia estadística entre el pORF7t y el plásmido nulo, a $p < 0,05$.)

la figura 14A es un gráfico del número de células IL-10+ específicas de VSRRP en las PBMC;

la figura 14B es un gráfico del número de células IL-10+ específicas de VSRRP en la población de linfocitos (B);

la figura 14C es un gráfico del número de células IFNγ+ específicas de VSRRP en las PBMC;

la figura 14D es un gráfico del número de células IFNγ+ específicas de VSRRP en la población de linfocitos; los cerdos fueron vacunados con pORF7t, plásmido nulo o PBSA en d35, y se trasladaron a la unidad de acabado. Las muestras de PBMC porcinas recién aisladas se cultivaron con 0,1 m.o.i. de US-VSRRP (cepa 01NP1), lisado MARC-145 infectado de forma simulada durante 48 horas antes de la tinción fluorescente y el análisis de citometría de flujo. Los datos representan el porcentaje promedio (± SEM) de las células productoras de citoquinas, obtenido mediante el porcentaje de las células productoras de citoquinas de las células cultivadas con VSRRP - el porcentaje de células productoras de citoquinas de las células cultivadas con lisado simulado. ("a" indica la diferencia estadística de otros grupos, a $p < 0,05$. "b" indica la diferencia estadística entre el pORF7t y el plásmido nulo, a $p < 0,05$. "c" indica la

diferencia estadística entre el pORF7t y PBSA, a p <0,05. d indica la diferencia estadística entre el nulo y PBSA, a p <0,05);
la figura 15A es un gráfico del número de células Foxp3+ específicas de VSRRP en las PBMC de los cerdos experimentales;
la figura 15B es un gráfico del número de células Foxp3+ específicas de VSRRP en la subpoblación de linfocitos CD4+CD25+ de las PBMC de los cerdos experimentales; los datos son el porcentaje promedio (± SEM) de las células Foxp3+, obtenido mediante el porcentaje de las células Foxp3+ de las células cultivadas con VSRRP - el porcentaje de células Foxp3+ de las células cultivadas con lisado simulado. (a indica la diferencia estadística de otros grupos, a p <0,05. b indica la diferencia estadística entre el pORF7t y el plásmido nulo, a p <0,05.)
la figura 16 es un gráfico de respuestas de anticuerpos específicos de VSRRP, medidas por IDEXX ELISA
la figura 17 es un gráfico de la carga viral de VSRRP en el suero de los cerdos experimentales en d43
la figura 18 son imágenes de los inyectores sin aguja que se utiliza en los cerdos;
la figura 19 son gráficos que representan el número de células Treg y IL-10+ de subpoblaciones de linfocitos en PBMC, aisladas de cerdos inmunizados con ORF7t-500 μg, ORF7t-200 μg, o Nulo-500 μg vía intradérmica, Pulse50, o Dermavac;
la figura 20 son gráficos que representan el número de células IFNγ+ y CD8+IFNγ+ de subpoblaciones de linfocitos en PBMC, aisladas de cerdos inmunizados con ORF7t-500 μg, ORF7t-200 μg, o Nulo-500 μg vía intradérmica, Pulse50, o Dermavac;
la figura 21 es una tabla resumen de la lista de identificación de secuencia;
la figura 22 Número de células CD4+CD25+FoxP3+ específicas de VSRRP (A), células IL-10+ (B), células CD4+CD25+ (C) y células IFNγ+ (D) en una ventana de linfocitos, el números de IL-10+ específicos de VSRRP (E), IFNγ+ (F) células de la subpoblación de linfocitos CD4+CD8+ de cerdos criados en el sistema de producción de VSRRP positivo. Los cerdos se inmunizaron con PBSA, plásmido nulo o pORF7t en d0 (VI) y d21 (V2), y a continuación se trasladaron al sitio de engorde en d35 (Movimiento). Las PBMC se cultivaron con VSRRP (01NP1) o lisado simulado durante 48 h antes del análisis citométrico de flujo. Los datos son el promedio ± SEM del % de las subpoblaciones de linfocitos activados con VSRRP, restado con el fondo obtenido a partir de las células cultivadas con lisado MARC-145. * Indica la diferencia estadística entre el grupo de vacunados con ADN y los grupos de control (p <0,05, ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey);
la figura 23 es un gráfico que muestra la relación S/P entre el control y cerdos vacunados con pORF7t;
la figura 24 es un gráfico de las puntuaciones de pulmón obtenidas de los cerdos experimentales;
la figura 25 son gráficos que indican el número de células CD4+CD25+FoxP3+ espcíficas de VSRRP (A), células CD4+CD25+FoxP3+IL-10+ (B), células CD4+CD25+ (C) y célelas IFNγ+ (D) en una ventana de linfocitos, el número de células IFNγ+ específicas de VSRRP en las células CD4+CD8+ (E) subpoblaciónde CD8+ de cerdos criados en un sistema de producción de VSRRP negativo - ** indica la diferencia estadística entre el grupo de vacunados con ADN y los grupos de control (p <0,05 , ANOVA de una vía seguido de comparación múltiple de Tukey);
la figura 26A es un gráfico que muestra el número de células $FoxP3^+$ de los cerdos expuestos; los cerdos fueron vacunados con PBSA, el plásmido nulo, o pORF7t en d0 (V1) y d21 (V2), y estimulados (estim.) a d35. Los datos son la media ± SEM del % de las subpoblaciones de linfocitos activados con VSRRP, restados con el fondo obtenido a partir de las células cultivadas con lisado MARC-145. La media de las diferencias se consideraron significativas si p <0.05, utilizando ANOVA de una vía seguido por prueba de comparación múltiple de Tukey (para la figura 22A, las medias de pORF7t y PBSA fueron significativamente diferentes).
la figura 26B es un gráfico que muestra el número de células $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ de los cerdos expuestos (pORF7t difería significativamente de cualquiera de los grupos inmunizados con plásmido nulo (pMASIA) o PBSA);
la figura 26C es un gráfico que muestra el número de células $CD4+CD25^+FoxP3^+IL\text{-}10^+$ de cerdos expuestos (pORF7t y el plásmido nulo diferían significativamente);
la figura 26D es un gráfico que muestra células IL-10+ en una ventana de linfocitos de cerdos expuestos;
la figura 27A es un gráfico que muestra el % de células $CD4+CD25^+$ en una ventana de linfocitos; Los cerdos fueron vacunados con PBSA, el plásmido nulo o pORF7t en d0 (VI) y d21 (V2), y estimulados (estim.) En d35 los datos son la media ± SEM del % de subpoblaciones de linfocitos activados por VSRRP, restados con el fondo obtenido a partir de las células cultivadas con lisado MARC-145;
la figura 27B es un gráfico que muestra el % de células productoras de IFNγ en una ventana de linfocitos;
la figura 27C es un gráfico que muestra el % de células productoras de IFNγ en una población de $CD4^+CD8^+$;
la figura 27D es un gráfico que muestra el % de células productoras de IFNγ en una población de $CD8^+$;
la figura 28A es un gráfico que muestra los niveles de carga viral en las muestras de suero; los cerdos fueron vacunados con PBSA, plásmido nulo, pORF7 o pORF7t en d0 y d21 y se estimularon con US-VSRRP (cepa 01NP1) en d35 (0 dpi). Se recogieron muestras de suero, pulmón y ganglios linfáticos traqueobronquiales en los días indicados y se sometieron a la determinación de la cantidad de genoma de VSRRP mediante RT-PCR cuantitativa (como se describe por Egli et al, 2001. J. Virol Methods 98: 63-75);
la figura 28B es un gráfico que muestra los niveles de carga viral en los pulmones;
la figura 28C es un gráfico que muestra el nivel de virus en los ganglios linfáticos traqueobronquiales;
la figura 29A es un gráfico de la carga viral después de la vacunación;
la figura 29B es un gráfico de la carga viral en el pulmón a las 10 y 21 ppp;
la figura 29C es un gráfico de la carga viral en los ganglios linfáticos a las 10 y 21 ppp.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0025] Se describe en el presente documento un procedimiento de vacunación contra el VSRRP, que comprende la etapa de administración, esencialmente en la dermis y la hipodermis de un animal de la familia de los suidos, de una cantidad eficaz de una vacuna de ADN de VSRRP utilizando un inyector sin aguja a chorro de líquido, cuya administración provoca una respuesta inmunitaria segura y protectora contra VSRRP. "Esencialmente" significa que una parte de la vacuna también se puede encontrar en la epidermis o en los músculos.

[0026] Una respuesta inmunitaria protectora se caracteriza por una reducción significativa de la antigenemia después de la estimulación o por títulos significativos de anticuerpos neutralizantes. Una respuesta inmunitaria seguro se caracteriza por la limitación de los efectos secundarios relacionados con la administración de la vacuna, en particular por una reducción significativa o por la ausencia de reacción en el sitio de inyección local y por una reducción significativa o por la ausencia de síntomas, como la anorexia y la depresión después de la administración de la vacuna.

[0027] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cerdo" se refiere a un animal de origen porcino, en otras palabras, un animal de la familia de los suidos. El término "verraco" se refiere a un cerdo macho entero de unos seis meses de edad destinado como semental. El término "cerda joven" se refiere a una cerda hembra joven que no ha producido primera camada hasta el primer parto. El término "puerco" se refiere a un cerdo macho castrado. El término "lechones" se refiere a un cerdo joven. El término "cerdito" se refiere a una raza de raza de cerdos para buenos cortes de carne de cerdo. El término "stores" se refiere a un cerdo que puede ser de aproximadamente 10-12 semanas de edad. El término "cerda" se refiere a una hembra en edad reproductiva y la capacidad o una cerda después de que ha tenido su primera camada. El término "lechones destetados" o "destete" se refiere a un cerdo joven que puede ser alrededor de 11 a alrededor de 24 días de edad, alrededor de dos a tres semanas de edad, de tres a cinco semanas de edad o alrededor de cinco a ocho semanas de edad.

[0028] Tal como se utiliza en este documento, el término "virulenta" significa un aislado que mantiene su capacidad de ser infeccioso en un animal huésped.

[0029] Tal como se utiliza en este documento, el término "vacuna inactivada" significa una composición de vacuna que contiene un organismo infeccioso o patógeno que ya no es capaz de replicación o crecimiento. El patógeno puede ser bacteriano, viral, de protozoo o fúngico en origen. La inactivación se puede realizar mediante una variedad de procedimientos, incluyendo congelación-descongelación, tratamiento químico (por ejemplo, tratamiento con timerosal o formalina), sonicación, radiación, calor o cualquier otro medio de convención suficiente para evitar la replicación o crecimiento del organismo mientras se mantiene su inmunogenicidad.

[0030] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "respuesta inmunitaria" se refiere a una respuesta provocada en un animal. Una respuesta inmunitaria se puede referir a inmunidad celular (CMI); inmunidad humoral o puede implicar a ambos. La presente invención también contempla una respuesta limitada a una parte del sistema inmunológico. Por ejemplo, una composición de vacuna de la presente invención puede inducir específicamente una mayor respuesta de interferón gamma.

[0031] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "antígeno" o "inmunógeno" significa una sustancia que induce una respuesta inmunitaria específica en un animal huésped. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o parte de un organismo; un vector recombinante que contiene un polinucleótido que codifica un inmunógeno, capaz de inducir una respuesta inmunitaria tras la presentación a un animal huésped; una proteína, un polipéptido, un péptido, un epítopo, un hapteno, o cualquier combinación de los mismos.

[0032] Tal como se utiliza en este documento, el término "multivalente" significa una vacuna que contiene más de un antígeno de diferentes géneros o especies de microorganismos (por ejemplo, una vacuna que comprende antígenos de *Pasteurella multocida, Salmonella, Escherichia coli, Haemophilus somnus* y *Clostridium*).

[0033] Tal como se utiliza en este documento, el término "adyuvante" significa una sustancia añadida a una vacuna para aumentar la inmunogenicidad de una vacuna. El mecanismo de cómo opera un adyuvante no se conoce por completo. Algunos adyuvantes se cree que aumentan la respuesta inmunitaria mediante la liberación lenta del antígeno, mientras que otros adyuvantes presentan el inmunógeno al sistema inmunitario del huésped de manera más eficiente o efectiva o estimulan la producción de citoquinas específicas.

[0034] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "portador farmacéuticamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" son intercambiables y se refieren a un vehículo fluido para contener antígenos de vacuna que se pueden inyectar en un huésped sin efectos adversos. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, agua estéril, solución salina, glucosa, dextrosa o soluciones tamponadas. Los portadores pueden incluir agentes auxiliares que incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, estabilizantes (es decir, azúcares y aminoácidos), conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes tamponantes del pH, aditivos potenciadores de la viscosidad, colores y similares.

[0035] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "composición de vacuna" incluye al menos un antígeno o inmunógeno en un vehículo farmacéuticamente aceptable útil para inducir una respuesta inmunitaria en un huésped. Las composiciones de vacuna se pueden administrar en dosis y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en las técnicas médica o veterinaria, teniendo en cuenta factores, tales como edad, sexo, peso, especie y condición del animal receptor, y la vía de administración. La vía de administración puede ser percutánea por ejemplo, intradérmica, intramuscular, subcutánea. Las composiciones de vacuna se pueden administrar solas, o se pueden administrar conjuntamente o se puedne administrar secuencialmente con otros tratamientos o terapias. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, adyuvantes o aditivos potenciadores de la viscosidad, conservantes, colores y similares, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseada. Pueden consultarse textos farmacéuticos estándar, tales como "Remingtons Pharmaceutical Sciences", 1990 para preparar preparaciones adecuadas, sin gran experimentación.

[0036] La presente invención abarca además una proteína ORF7 de VSRRP truncada que consiste en la SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos un 85% de homología de la misma contenida en una molécula de vector o un vector de expresión y unida operativamente a un elemento promotor y opcionalmente a un promotor para usar en un procedimiento para provocar en un animal una respuesta inmunitaria segura y protectora contra VSRRP, comprendiendo el procedimiento administrar por vía transdérmica una cantidad eficaz de la composición que comprende el vector utilizando un inyector sin aguja a chorro de líquido. En una realización, el vector es pMASIA.

[**0037]** En una realización, el promotor es el promotor del gen temprano inmediato de citomegalovirus (CMV). En otra realización ventajosa, los elementos promotores y/o potenciadores son inducibles con oxígeno. Ejemplos de promotores y/o potenciadores inducibles con oxígeno que se pueden utilizar en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, promotor de respuesta de crecimiento temprano 1 (Egrl) (véase, por ejemplo, Park et al., J Clin Invest 2002 Aug; 110 (3): 403-1), potenciadores inducibles por el factor inducible por hipoxia (HIF) (véase, por ejemplo, Cuevas et al, Cancer Res 2003 Oct 15; 63 (20): 6877-84) y promotores de Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) (véase, por ejemplo, Gao et al, Gene 17 Oct 1996; 176 (1-2): 269-70).

[**0038]** En otra realización, los potenciadores y/o promotores incluyen diversos promotores específicos de células o tejidos (por ejemplo, músculo, células endoteliales, hígado, células somáticas o células madre), diversos promotores y potenciadores virales y diversas secuencias de inmunógeno de VSRRP isogénicamente específico para cada especie animal. Los ejemplos de promotores y potenciadores específicos de músculo que han sido descritos son conocidos para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Li et al, Gene Ther 1999 Dec; 6 (12): 2005-11; Li et al, Nat Biotechnol 1999 Mar; 17 (3): 241-5 y Loirat et al, Virology 1999 Jul 20; 260 (1): 74-83).

[0039] Los promotores y potenciadores que se pueden emplear en la presente invención incluyen, pero no se limitan a LTR o el virus del sarcoma de Rous, TK de HSV-1, promotor temprano o tardío de SV40, promotor mayor tardío de adenovirus (MLP), fosfoglicerato quinasa, metalotioneína, α-1 antitripsina, albúmina, colagenasa, elastasa I, β-actina, β-globina, γ-globina, α-fetoproteína, creatina quinasa muscular.

[0040] Un "vector" se refiere a un plásmido o virus de ADN o ARN recombinante que comprende un polinucleótido heterólogo a liberar en una célula diana, ya sea in vitro o in vivo. El polinucleótido heterólogo puede comprender una secuencia de interés para los propósitos de terapia, y opcionalmente puede estar en forma de un casete de expresión. Tal como se utiliza en este documento, un vector no tiene que ser capaz de replicación en la célula o sujeto diana final. El término incluye vectores de clonación. También se incluyen vectores virales.

[0041] El término "recombinante" significa un polinucleótido de origen semisintético o sintético que, o bien no se produce en la naturaleza o está ligado a otro polinucleótido en una disposición no encontrada en la naturaleza.

[0042] "Heterólogo" significa derivado de una entidad genéticamente distinta del resto de la entidad a la que se está comparando. Por ejemplo, un polinucleótido, se puede colocar mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una fuente diferente, y es un polinucleótido heterólogo. Un promotor eliminado de su secuencia codificante nativa y unido operativamente a una secuencia codificante distinta de la secuencia nativa es un promotor heterólogo.

[0043] Los polinucleótidos de la invención pueden comprender secuencias adicionales, tales como secuencias de codificación adicionales dentro de la misma unidad de transcripción, elementos de control, tales como promotores, sitios de unión a ribosomas, sitios de poliadenilación, unidades de transcripción adicionales bajo el control del mismo promotor o un promotor diferente, secuencias que permiten la clonación, expresión, recombinación homóloga y transformación de una célula huésped, y cualquier constructo que pueda ser deseable para proporcionar realizaciones de esta invención.

[0044] La presente invención abarca un vector que expresa una proteína ORF7 de VSRRP truncada que consiste en la SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos 85% de homología a la misma para su uso en un procedimiento para provocar en un animal una respuesta inmunitaria segura y protectora contra VSRRP,

comprendiendo el procedimiento administrar por vía transdérmica una cantidad eficaz de la composición que comprende el vector utilizando un inyector sin aguja a chorro de líquido. Elementos para la expresión de un inmunógeno de VSRRP están ventajosamente presentes en un vector de la invención. De una manera mínima, comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un codón de iniciación (ATG), un codón de parada y un promotor, y opcionalmente también una secuencia de poliadenilación para ciertos vectores, tales como plásmidos, y ciertos vectores virales, por ejemplo, vectores virales distintos de los virus de la viruela. Cuando el polinucleótido codifica un fragmento de poliproteína, por ejemplo, un inmunógeno de VSRRP, ventajosamente, en el vector, un ATG se coloca en 5' del marco de lectura y un codón de parada se coloca en 3'. Otros elementos de control de la expresión pueden estar presentes, tales como secuencias potenciadoras, secuencias estabilizantes, tales como secuencias de intrones y señal que permiten la secreción de la proteína.

[0045] Los procedimientos para fabricar y/o administrar un vector o recombinantes o plásmido para la expresión de productos génicos de genes, ya sea in vivo o in vitro, pueden ser cualquier procedimiento deseado, por ejemplo, un procedimiento que es por o análogo a los procedimientos descritos o dados a conocer en los documentos citados en: patentes de Estados Unidos Nos. 4.603.112; 4.769.330; 4.394.448; 4.722.848; 4.745.051; 4.769.331; 4.945.050; 5.494.807; 5.514.375; 5.744.140; 5.744.141; 5.756.103; 5.762.938; 5.766.599; 5.990.091; 5.174.993; 5.505.941; 5.338.683; 5.494.807; 5.591.639; 5.589.466; 5.677.178; 5.591.439; 5.552.143; 5.580.859; 6.130.066; 6.004.777; 6.130.066; 6.497.883; 6.464.984; 6.451.770; 6.391.314; 6.387.376; 6.376.473; 6.368.603; 6.348.196; 6.306.400; 6.228.846; 6.221.362; 6.217.883; 6.207.166; 6.207.165; 6.159.477; 6.153.199; 6.090.393; 6.074.649; 6.045.803; 6.033.670; 6.485.729; 6.103.526; 6.224.882; 6.312.682; 6.348.450 y 6.312.683; la solicitud de patente US No. de serie 920.197, presentada el 16 de octubre de 1986; WO 90/01543; WO91/11525; WO 94/16716; WO 96/39491; WO 98/33510; EP 265785; EP 0370573; Andreansky et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93: 11313-11.318; Ballay et al, EMBO J. 1993; 4: 3861-65; Felgner et al., J. Biol. Chem. 1994; 269: 2550-2561; Frolov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93: 11371-11377; Graham, Tibtech 1990; 8: 85-87; Grunhaus et al., Sem. Virol. 1992; 3: 237-52; Ju et al, Diabetologia 1998; 41: 736-739; Kitson et al., J. Virol. 1991; 65: 3068-3075; McClements et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93: 11414-11420; Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93: 11341-11348; Paoletti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93: 11.349-11.353; Pennock et al., Mol. Cell. Biol. 1984; 4: 399-406; Richardson (Ed), Methods in molecular biology 1995; 39, "Baculovirus Expression Protocols", Humana Press Inc.; Smith et al. (1983) Mol. Cell. Biol. 1983; 3: 2156-2165; Robertson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93: 11334-11340; Robinson et al., Sem. Immunol. 1997; 9: 271; y Roizman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93: 11307-11312. Por lo tanto, el vector de la invención puede ser cualquier virus recombinante o vector de virus adecuado, tal como un virus de la viruela (por ejemplo, virus vaccinia, virus de la viruela ave de corral, virus de la viruela del canario, virus de la viruela aviar, virus de la viruela del mapache, virus de la viruela porcina, etc.), adenovirus (por ejemplo, adenovirus humano, adenovirus canino), virus herpes (por ejemplo, virus herpes canino), baculovirus, retrovirus, etc.; o el vector puede ser un plásmido. Los documentos citados en este documento, además de proporcionar ejemplos de vectores útiles en la práctica de la invención, pueden también proporcionar fuentes de inmunógenos no de VSRRP, por ejemplo, inmunógenos no VSRRP, péptidos no inmunógenos de VSRRP o fragmentos de los mismas, citoquinas, etc. a expresar por el vector o vectores en, o incluidos en, las composiciones de la invención.

[0046] Se describen en el presente documento preparaciones que comprenden vectores, tales como vectores de expresión, por ejemplo, composiciones terapéuticas. Las preparaciones pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en uno o más vectores, por ejemplo, vectores de expresión, tales como vectores de expresión in vivo, que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en (y que expresan ventajosamente) uno o más de los inmunógenos de VSRRP. Ventajosamente, el vector contiene y expresa un polinucleótido que incluye, consiste esencialmente en, o consiste en una región codificante que codifica una o más inmunógenos de VSRRP, un portador, excipiente o vehículo farmacéuticamente o veterinariamente aceptable. Por lo tanto, el otro vector o vectores en la preparación comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polinucleótido que codifica, y bajo circunstancias apropiadas, el vector expresa una o más de otras proteínas de un inmunógeno de VSRRP o un fragmento del mismo.

[0047] El vector o vectores en la preparación comprenden, o consisten esencialmente en, o consisten en un polinucleótido o polinucleótidos que codifican una o más proteínas o fragmento o fragmentos de las mismas de un inmunógeno de VSRRP, el vector o vectores tienen la expresión del polinucleótido o polinucleótidos. La preparación ventajosamente comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, al menos dos vectores que comprenden, consisten esencialmente en, o consiste en, y ventajosamente también expresan, ventajosamente in vivo bajo condiciones apropiadas o condiciones adecuadas o en una célula huésped adecuada, los polinucleótidos de diferentes aislados de VSRRP que codifican las mismas proteínas y/o proteínas diferentes, pero ventajosamente las mismas proteínas. Las preparaciones contienen uno o más vectores que contienen, consisten esencialmente en o consiste en los polinucleótidos que codifican, y ventajosamente expresan, ventajosamente in vivo, el péptido de VSRRP, proteína de fusión o un epítopo del mismo.

[0048] De acuerdo con una realización de la invención, el vector de expresión es un vector de ADN, en particular un vector de expresión in vivo.

[0049] En una realización particular, el vector viral es un virus de la viruela, por ejemplo, un virus vaccinia o un virus de vaccinia atenuado, (por ejemplo, MVA, una cepa de Ankara modificada obtenida después de más de 570 pasajes

de la cepa de la vacuna de Ankara sobre fibroblastos de embrión de pollo; ver Stickl y Hochstein-Mintzel, Munch Med Wschr, 1971, 113, 1149-1153; Sutter et al, Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89, 10847-10851; disponible como ATCC VR-1508; o NYVAC, véase la patente de Estados Unidos No. 5.494.807, por ejemplo, los Ejemplos 1 a 6 y la secuencia de la patente de Estados Unidos No. 5.494.807 que discuten la construcción de NYVAC, así como las variaciones de NYVAC con ORFs adicionales eliminados del genoma del virus vaccinia de cepa de Copenhagen, así como la inserción de moléculas de ácidos nucleicos codificantes heterólogas en los sitios de este recombinante, y también, el uso de promotores emparejados; véase también el documento WO96/40241), un virus de la viruela aviar o un virus de la viruela aviar atenuado (por ejemplo, viruela del canario, viruela de ave de corral, viruela de tórtola, viruela de la paloma, viruela de codorniz, ALVAC o TROVAC; véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5505941, 5494807), viruela porcina, viruela de mapache, viruela del camello o virus de mixomatosis.

[0050] De acuerdo con otra realización de la invención, el vector de virus de la viruela es un vector de virus de viruela del canario o un vector de virus de la viruela de ave de corral, ventajosamente un virus de la viruela del canario o virus de la viruela de ave de corral atenuados. En este respecto, se hace referencia a la viruela del canario disponible en la ATCC bajo el número de acceso VR-111. El virus de canario atenuado se describe en la patente de Estados Unidos Nº 5.756.103 (ALVAC) y el documento WO01/05934. Las numerosas cepas de vacunación del virus de la viruela de aves de corral también están disponibles, por ejemplo, la cepa DIFTOSEC CT comercializada por MERIAL y la vacuna NOBILIS VARIOLE comercializadas por INTERVET; y, también se hace referencia a la patente de Estados Unidos Nº 5.766.599 que se refiere a la cepa de la viruela de ave de corral atenuada TROVAC.

[**0051**] Para obtener información sobre el procedimiento para generar recombinantes del mismo y cómo administrar recombinantes del mismo, el experto puede referirse a los documentos citados en el presente documento y a WO90/12882, por ejemplo, en cuanto al virus vaccinia se hace mención de las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.769.330, 4.722.848, 4.603.112, 5.110.587, 5.494.807, y 5.762.938, entre otras; en cuanto a la viruela de ave de corral, se hace mención de las patentes de Estados Unidos Nos. 5.174.993, 5.505.941 y US-5.766.599, entre otras; en cuanto a la viruela del canario se hace mención de la patente de Estados Unidos No. 5.756.103, entre otras; en cuanto a la viruela porcina se hace mención de la patente de Estados Unidos No. 5.382.425, entre otras; y, en cuanto al mapache, se hace mención del documento WO00/03030, entre otros.

[0052] Cuando el vector de expresión es un virus vaccinia, los sitio o sitios de inserción para el polinucleótido o polinucleótidos a expresar están ventajosamente en el gen o sitio de inserción de la timidina quinasa (TK), el gen o sitio de inserción de la hemaglutinina (HA), la región que codifica el cuerpo de inclusión de tipo A (ATI); véanse también los documentos citados en este documento, especialmente los relacionados con el virus vaccinia. En el caso de la viruela del canario, ventajosamente el sitio o sitios de inserción son el ORF u ORFs C3, C5 y/o C6; véanse también los documentos citados en el presente documento, especialmente aquellos relativos al virus de la viruela del canario. En el caso de la viruela de ave de corral, ventajosamente el sitio o sitios de inserción son los ORF F7 y/o F8; véanse también los documentos citados en el presente documento, especialmente aquellos relativos al virus de la viruela de ave de corral. El sitio o sitios de inserción para el virus MVA son ventajosamente como en varias publicaciones, incluyendo Carroll MW et al, Vaccine, 1997, 15 (4), 387-394.; Stittelaar KJ et al, J. Virol, 2000, 74 (9), 4.236-4.243; Sutter G. et al, 1994, Vaccine, 12 (11), 1032-1040.; y, en este sentido también se observó que el genoma de MVA completo se describe en Antoine G., Virology, 1998, 244, 365-396, que permite al experto en la técnica usar otros sitios de inserción u otros promotores.

[0053] Ventajosamente, el polinucleótido que se expresa se inserta bajo el control de un promotor de virus de la viruela específico, por ejemplo, el promotor de vaccinia de 7,5 kDa (Cochran et al., J. Virology, 1985, 54, 30-35), el promotor de vaccinia I3L (Riviere et al., J. Virology, 1992, 66, 3424-3434), el promotor de vaccinia HA (Shida, Virology, 1986, 150, 451-457), el promotor de la viruela de vaca ATI (Funahashi et al., J. Gen. Virol, 1988, 69, 35-47), el promotor de vaccinia H6 (Taylor J. et al, Vaccine, 1988, 6, 504-508; Guo P. et al J. Virol, 1989, 63 , 4189-4198; Perkus M. et al, J. Virol, 1989, 63, 3829-3836), entre otros.

[0054] En una realización, el vector viral es un adenovirus, tal como un adenovirus humano (HAV) o un adenovirus canino (CAV).

[**0055**] En una realización, el vector viral es un adenovirus humano, en particular un adenovirus de serotipo 5, que resultó incompetente para la replicación por una deleción en la región E1 del genoma viral, en particular desde aproximadamente el nucleótido 459 hasta aproximadamente el nucleótido 3510 por referencia a la secuencia de hAd5 descrita en Genbank con el número de acceso M73260 y en la publicación de referencia J. Chroboczek et al Virol. 1992, 186, 280-285. El adenovirus suprimido se propaga en 293 que expresa E1 (F. Graham et al J. Gen. Virol. 1977, 36, 59-72) o células PER, en particular PER.C6 (F. Falloux et al Human Gene Teraphy 1998, 9, 1909-1917). El adenovirus humano puede ser suprimido en la región E3, en particular desde aproximadamente el nucleótido 28592 hasta aproximadamente el nucleótido 30470. La deleción en la región E1 se puede realizar en combinación con una deleción en la región E3 (véase, por ejemplo J. Shriver et al. Nature, 2002, 415, 331-335, F. Graham et al Methods in Molecular Biology Vol: 7 Gene transfer y expression protocols, editado por E. Murray, The Human Press Inc, 1991, pág. 109-128; Y. Ilan et al Proc Natl Acad Sci 1997, 94, 2587-2592; US 6133028; US 6692956; S. Tripathy et al Proc Natl Acad Sci 1994, 91, 11.557-11561; B. Tapnell Adv. Drug Deliv Rev.1993, 12, 185-199; X Danthinne et al Gen Therapy 2000, 7, 1707-1714; K. Berkner Bio Techniques 1988, 6, 616-629; K.

Berkner et al Nucl Acid Res. 1983, 11, 6003-6020; C. Chavier et al J. Virol 1996, 70, 4805-4810). Los sitios de inserción pueden ser los locus (región) E1 y/o E3 opcionalmente después de una supresión parcial o completa de las regiones E1 y/o E3. Ventajosamente, cuando el vector de expresión es un adenovirus, el polinucleótido que va a expresarse se introduce bajo el control de un promotor funcional en células eucariotas, tal como un promotor fuerte, preferentemente un promotor del gen inmediato temprano de citomegalovirus (promotor CMV-IE), en particular la región potenciadora/promotora desde aproximadamente el nucleótido -734 hasta aproximadamente el nucleótido +7 en M. Boshart et al Cell 1985, 41, 521-530 o la región potenciadora/promotora del vector pCI de Promega Corp. El promotor CMV-IE es ventajosamente de origen murino o humano. También se puede utilizar el promotor del factor 1α de elongación. En una realización particular, se puede utilizar un promotor regulado por la hipoxia, por ejemplo, el promotor HRE se describe en K. Boast et al Human Gene Therapy 1999, 13, 2197-2208). También se puede utilizar un promotor específico de músculo (X. Li et al Nat. Biotechnol. 1999, 17, 241-245). También se discuten en este documento promotores fuertes en relación con vectores plasmídicos. En una realización, una secuencia de empalme puede estar situada en dirección 3' de la región potenciadora/promotora. Por ejemplo, el intrón 1 aislado del gen de CMV-IE (R. Stenberg et al J. Virol. 1984, 49, 190), el intrón aislado del gen de β-globina humana o de conejo, en particular, el intrón 2 del gen β-globina, el intrón aislado del gen de inmunoglobulina, una secuencia de corte y empalme del gen temprano de SV40 o la secuencia de intrón quimérica aislada del vector pCI de Promega Corp. que comprende la secuencia donante de β-globina humana fusionada a la secuencia aceptora de inmunoglobulina de ratón (desde aproximadamente el nucleótido 890 hasta aproximadamente el nucleótido 1022 en el Genbank con el número de acceso CVU47120). Se pueden insertar una secuencia de poli (A) y secuencia terminadora en dirección 3' del polinucleótido a expresar, por ejemplo, una señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento bovina, en particular desde aproximadamente el nucleótido 2339 hasta aproximadamente el nucleótido 2550 en el Genbank bajo el número de acceso BOVGHRH, del gen de β-globina de conejo o de genes tardíos de SV40.

[0056] En otra realización, el vector viral es un adenovirus canino, en particular un CAV-2 (véase, por ejemplo, L. Fischer et al Vaccine, 2002, 20, 3.485-3.497; Patente de Estados Unidos Nº 5.529.780; Patente de Estados Unidos No. 5.688.920; solicitud PCT No. WO95/14102). Para CAV, los sitios de inserción pueden ser en la región E3 y/o en la región situada entre la región E4 y la región ITR derecha (véase la patente de Estados Unidos No. 6.090.393; patente de Estados Unidos No. 6.156.567). En una realización, el inserto está bajo el control de un promotor, tal como un promotor del gen temprano inmediato de citomegalovirus (promotor CMV-IE) o un promotor ya descrito para un vector de adenovirus humano. Se pueden insertar una secuencia de poli(A) y terminadora en dirección 3' del polinucleótido que se expresa, por ejemplo, una señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento bovino o del gen de -globina de conejo.

[**0057]** En otra realización particular, el vector viral es un virus del herpes, tal como un virus del herpes canino (CHV) o un virus del herpes porcino (FHV). Para CHV, los sitios de inserción pueden ser en particular en el gen de timidina quinasa, en el ORF3, o en el ORF UL43 (véase la patente de Estados Unidos No. 6.159.477). En una realización, el polinucleótido que va a expresarse se introduce bajo el control de un promotor funcional en células eucariotas, ventajosamente un promotor CMV-IE (murino o humano). En una realización particular, se puede utilizar un promotor regulado por hipoxia, por ejemplo, el promotor HRE se describe en K. Boast et al Human Gene Therapy 1999, 13, 2197-2208). Se pueden insertar una secuencia de poli(A) y terminadora en dirección 3' del polinucleótido que se expresa, por ejemplo, una señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento bovino o del gen de -globina de conejo.

[**0058**] Según una realización adicional de la invención, el vector de expresión es un vector plásmido o un vector plásmido de ADN, en particular un vector de expresión in vivo. En un ejemplo no limitativo específico, se puede utilizar el plásmido pVR1020 o 1012 (VICAL Inc.; Lucas C. et al, Journal of Infectious Diseases, 1997, 175, 91-97; Hartikka J. et al, Human Gene Therapy, 1996, 7, 1205-1217, véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.846.946 y 6.451.769) como vector para la inserción de una secuencia de polinucleótidos. El plásmido pVR1020 deriva de pVR1012 y contiene la secuencia de señal tPA humana. En una realización, la señal tPA humana comprende desde el aminoácido M(1) al aminoácido S(23) en el Genbank bajo el número de acceso HUMTPA14. En otro ejemplo no limitativo específico, el plásmido utilizado como vector para la inserción de una secuencia de polinucleótidos puede contener la secuencia de péptido señal de IGF1 equino desde el aminoácido M(24) al aminoácido A(48) en el Genbank con el número de acceso U28070. Información adicional sobre plásmidos de ADN que pueden ser consultados o empleados en la práctica se encuentran, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nº 6.852.705; 6.818.628; 6.586.412; 6.576.243; 6.558.674; 6.464.984; 6.451.770; 6.376.473 y 6.221.362.

[0059] El término plásmido cubre cualquier unidad de transcripción de ADN que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención y los elementos necesarios para su expresión in vivo en una célula o células del huésped o diana deseada; y, en este sentido, se observa que un plásmido circular, superenrollado o no superenrollado, así como una forma lineal, se pretende que estén dentro del alcance de la invención.

[0060] Cada plásmido comprende o contiene o consiste esencialmente en, además del polinucleótido que codifica el inmunógeno de VSRRP o una variante, análogo o fragmento del mismo, unido operativamente a un promotor o bajo

el control de un promotor o dependiente de un promotor. En general, es ventajoso emplear un promotor fuerte funcional en células eucariotas. El promotor fuerte preferido es el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV-IE) de origen humano o murino, o que tiene opcionalmente otro origen, tal como rata o cobaya. El promotor CMV-IE puede comprender la parte del promotor real, que puede o no estar asociada con la parte potenciadora. Se puede hacer referencia a EP-A-260 148, EP-A-323 597, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.168.062, 5.385.839, y 4.968.615, así como a la solicitud PCT No WO87/03905. El promotor CMV-IE es ventajosamente un CMV-IE humano (Boshart M. et al., Cell., 1985, 41, 521-530) o CMV-IE murino.

[0061] En términos más generales, el promotor tiene un origen viral o un origen celular. Un promotor fuerte viral distinto del CMV-IE que puede emplearse útilmente en la práctica de la invención es el promotor temprano/tardío del virus SV40 o el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous. Un promotor fuerte celular que puede emplearse útilmente en la práctica de la invención es el promotor de un gen del citoesqueleto, tal como, por ejemplo, el promotor de desmina (Kwissa M. et al., Vaccine, 2000, 18, 2337-2344), o el promotor de actina (Miyazaki J. et al., gene, 1989, 79, 269-277).

[0062] Los fragmentos subfuncionales de estos promotores, es decir, porciones de estos promotores que mantienen una actividad promotora adecuada, se incluyen dentro de la presente invención, por ejemplo promotores CMV-IE truncados, según la solicitud de PCT No. WO98/00166 o la patente de Estados Unidos Nº 6.156.567, se pueden utilizar en la práctica de la invención. Un promotor en la práctica de la invención incluye, por consiguiente, derivados y subfragmentos de un promotor de longitud completa que mantienen una actividad promotora adecuada y por lo tanto funcionan como un promotor, promoviendo preferentemente una actividad sustancialmente similar a la del promotor real o de longitud completa del que deriva el derivado o subfragmento, por ejemplo, similar a la actividad de los promotores CMV-IE truncados de la patente de Estados Unidos Nº 6.156.567 o la actividad de promotores de CMV-IE longitud completa. Por lo tanto, un promotor CMV-IE en la práctica de la invención puede comprender o consistir esencialmente en o consistir en la porción de promotor del promotor de longitud completa y/o la porción potenciadora del promotor de longitud completa, así como los derivados y subfragmentos.

[0063] Preferiblemente, los plásmidos comprenden o consisten esencialmente en otros elementos de control de expresión. Es particularmente ventajoso incorporar una secuencia o secuencias de estabilización, por ejemplo, una secuencia o secuencias intrón, preferiblemente el primer intrón del hCMV-IE (Solicitud PCT N. WO89/01036), el intrón II del gen de la b-globina de conejo (van Ooyen et al., Science, 1979, 206, 337-344).

[**0064]** En cuanto a la señal de poliadenilación (poliA) para los plásmidos y vectores virales distintos de los virus de la viruela, se pueden utilizar más la señal de poli (A) del gen de la hormona de crecimiento bovino (bGH) (ver patente de Estados Unidos No. 5.122.458) o la señal de poli (A) del gen de b-globina de conejo o la señal de poli (A) del virus SV40.

[0065] De acuerdo con otra realización de la invención, los vectores de expresión son vectores de expresión usados para la expresión in vitro de proteínas en un sistema celular apropiado. Las proteínas expresadas pueden recogerse en o del sobrenadante de cultivo después, o no después, de la secreción (si no hay secreción, normalmente se produce o se lleva a cabo una lisis celular), opcionalmente se concentran mediante procedimientos de concentración, tales como ultrafiltración, y/o se purifican mediante medios de purificación, tales como procedimientos de cromatografía de tipo afinidad, intercambio iónico o filtración en gel.

[0066] Las células huésped que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células musculares, queratinocitos, mioblastos, células de ovario de hámster chino (CHO), células vero, BHK21, células Sf9, y similares. Se entiende por un experto en la técnica que las condiciones para cultivar una célula huésped varían según el gen particular y que la experimentación de rutina es necesaria a veces para determinar las condiciones óptimas para el cultivo de un VSRRP dependiendo de la célula huésped. Por ejemplo, el vector que codifica un inmunógeno de VSRRP puede ser transformado en mioblastos (que pueden obtenerse a partir de tejido muscular del animal en necesidad de tratamiento) y los mioblastos transformados puede ser trasplantados al animal. En otro ejemplo, los queratinocitos también pueden transformarse con un vector que codifica un inmunógeno de VSRRP y se trasplantan en el animal, lo que resulta en la secreción de un inmunógeno de VSRRP en circulación.

[0067] Una "célula huésped" se refiere a una célula procariota o eucariota que ha sido alterada genéticamente, o es capaz de ser alterada genéticamente mediante la administración de un polinucleótido exógeno, tal como un plásmido o vector recombinante. Cuando se hace referencia a células genéticamente modificadas, el término se refiere tanto a la célula alterada originalmente como a la progenie de la misma.

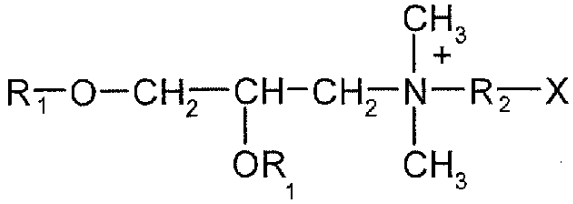
[**0068]** Los polinucleótidos que comprenden una secuencia deseada pueden ser insertados en un vector de clonación o expresión adecuado, y el vector a su vez se puede introducir en una célula huésped adecuada para la replicación y amplificación. Los polinucleótidos pueden introducirse en células huésped mediante cualquier medio conocido en la técnica. Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped mediante cualquiera de una serie de medios adecuados, incluyendo captación directa, endocitosis, transfección, f-apareamiento, electroporación, transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE dextrano, u otras sustancias; bombardeo con microproyectiles; lipofección; e infección (cuando el

vector es infeccioso, por ejemplo, un vector retroviral). La elección de introducir vectores o polinucleótidos dependerá a menudo de las características de la célula huésped.

[0069] En el presente documento se describe la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación para el suministro y expresión de un inmunógeno de VSRRP en una célula diana. La determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz es experimentación rutinaria para un experto ordinario en la técnica. La composición para usar según la presente invención puede comprender un vector de expresión que comprende un polinucleótido que expresa un inmunógeno de VSRRP y un vehículo farmacéuticamente o veterinariamente aceptable y un adyuvante. En una realización ventajosa, el portador, vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable facilita la transfección y/o mejora la conservación del vector o proteína.

[0070] Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una solución de NaCl al 0,9% (por ejemplo, solución salina) o un tampón fosfato. Otros portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables que se pueden utilizar para los procedimientos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, poli-(L-glutamato) o polivinilpirrolidona. El portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser cualquier compuesto o combinación de compuestos que facilitan la administración del vector (o proteína expresada a partir de un vector de la invención in vitro); ventajosamente, el portador, vehículo o excipiente puede facilitar la transfección y/o mejorar la conservación del vector (o proteína). Las dosis y volúmenes de dosis se describen en el presente documento en la descripción general y también pueden ser determinadas por el experto en la materia a partir de esta descripción en relación con el conocimiento en la técnica, sin gran experimentación.

[0071] Los lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario que son ventajosamente, pero no exclusivamente, adecuados para plásmidos, son ventajosamente aquellos que tienen la siguiente fórmula:



en la que R1 es una radical alifático de cadena lineal saturado o insaturado que tiene de 12 a 18 átomos de carbono, R2 es otro radical alifático que contiene 2 o 3 átomos de carbono y X es un grupo amina o hidroxilo, por ejemplo, DMRIE. En otra realización, el lípido catiónico puede estar asociado con un lípido neutro, por ejemplo, DOPE.

[0072] Entre estos lípidos catiónicos, se da preferencia a DMRIE (N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-propano amonio; WO96/34109), ventajosamente asociado con un lípido neutro, ventajosamente DOPE (dioleoil-fosfatidil-etanol amina; Behr JP, 1994, Bioconjugate Chemistry, 5, 382-389), para formar DMRIE-DOPE.

[0073] Ventajosamente, la mezcla de plásmido con el adyuvante se forma de manera extemporánea y ventajosamente simultáneamente con la administración de la preparación o poco antes de la administración de la preparación; por ejemplo, poco antes o antes de la administración, se forma la mezcla de plásmido-adyuvante, de manera ventajosa a fin de dar tiempo suficiente antes de la administración de la mezcla para formar un complejo, por ejemplo, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60 minutos antes de la administración, tal como aproximadamente 30 minutos antes de la administración.

[0074] Cuando DOPE está presente, la relación molar DMRIE:DOPE es ventajosamente de aproximadamente 95:aproximadamente 5 a aproximadamente 5:aproximadamente 95, más ventajosamente de aproximadamente 1:aproximadamente 1, por ejemplo, 1:1.

[0075] La proporción en peso de adyuvante:plásmido DMRIE o DMRIE-DOPE puede ser de entre aproximadamente 50:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 10, tal como aproximadamente 10:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 5, y ventajosamente aproximadamente 1:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 2, por ejemplo, 1:1 y 1:2.

[0076] Los polímeros de ácido acrílico o metacrílico son preferiblemente reticulados, en particular con éteres de polialquenilo de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos bajo el término carbómero (Pharmeuropa vol. 8, No. 2, junio de 1996). Los expertos en la técnica también pueden hacer referencia a US-A-2.909.462 que describe dichos polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxilado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferiblemente no más de 8, siendo los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos reemplazados por radicales alifáticos insaturados que tiene al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son aquellos que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos

vendidos bajo el nombre Carbopol® (BF Goodrich, Ohio, EE.UU.) son particularmente apropiados. Están reticulados con una alil sacarosa o con alilpentaeritritol. Entre ellos, pueden mencionarse el CARBOPOL® 974P, 934P y 971P.

[0077] Entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivado alquenilo, se prefieren los copolímeros EMA® (Monsanto) que son copolímeros de anhídrido maleico y de etileno, que son lineales o reticulados, por ejemplo, reticulados con divinil éter. Se hace referencia a J. Fields et al, Nature, 186: 778-780, 4 Jun 4 1960.

[0078] Las proporciones de adyuvante que son útiles son bien conocidas y están fácilmente disponibles para el experto en la técnica. A modo de ejemplo, la concentración de los polímeros de ácido acrílico o metacrílico o de copolímeros de ácido maleico y alquenilo en la composición de vacuna final será de 0,01% a 1,5% p/v, más particularmente de 0,05 a 1% p/v, preferiblemente de 0,1 a 0,4% p/v.

[0079] Opcionalmente, la vacuna utilizada de acuerdo con el procedimiento de la invención puede contener una citoquina. La citoquina puede estar presente como una proteína o como un gen que codifica esta citoquina insertado en un vector viral recombinante. Las citoquinas pueden seleccionarse entre las citoquinas porcinas, por ejemplo, interleucina 18 porcina (fIL-18) (Taylor S. et al., DNA Seq., 2000, 10 (6), 387-394), fIL-16 (Leutenegger CM et al, DNA Seq, 1998, 9 (1), 59-63), fIL-12 (Fehr D. et al, DNA Seq, 1997, 8 (1-2), 77-82; Imamura T. et al., J. Vet. Med. Sci., 2000, 62 (10), 1079-1087) y GM-CSF porcino (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) (GenBank AF053007).

[0080] En una realización específica, la composición farmacéutica se administra directamente in vivo, y el producto codificado se expresa por el vector en el huésped. Los procedimientos de liberación in vivo de un vector que codifica un inmunógeno de VSRRP pueden modificarse para liberar el inmunógeno de VSRRP de la presente invención a un animal porcino. La liberación in vivo de un vector que codifica el inmunógeno de VSRRP descrito en este documento puede llevarse a cabo por un experto en la técnica según las enseñanzas de las referencias mencionadas anteriormente.

[**0081]** Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas y/o terapéuticas y/o formulaciones según la invención comprenden o consisten esencialmente en o consisten en una cantidad eficaz para provocar una respuesta terapéutica de uno o más vectores de expresión y/o polipéptidos descritos en el presente documento; y, puede determinarse una cantidad eficaz a partir de esta descripción y el conocimiento en la técnica, sin gran experimentación.

[**0082]** En el caso de composiciones terapéuticas y/o farmacéuticas a base de un vector de plásmido, una dosis puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en, en términos generales, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2000 mg, ventajosamente de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 1000 mg y más ventajosamente de aproximadamente 100 μg a aproximadamente 800 μg de plásmido que expresa un inmunógeno de VSRRP. Cuando las composiciones terapéuticas y/o farmacéuticas a base de un vector de plásmido se administran con la electroporación, la dosis de plásmido es generalmente entre aproximadamente 0,1 μg y 1 mg, ventajosamente entre aproximadamente 1 μg y 100 μg, ventajosamente entre aproximadamente 2 μg y 50 μg. Los volúmenes de dosis pueden estar entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 2 ml, ventajosamente entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 1 ml. Estas dosis y los volúmenes de dosis son adecuados para el tratamiento de felinos y otras especies de mamíferos diana, tales como equinos y caninos.

[0083] La composición terapéutica y/o farmacéutica contiene por dosis de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{11}, ventajosamente de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{10} y más ventajosamente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^9 partículas virales del adenovirus recombinante que expresa un inmunógeno de VSRRP. En el caso de composiciones terapéuticas y/o farmacéuticas a base de un virus de la viruela, una dosis puede estar entre aproximadamente 10^2 pfu y aproximadamente 10^9 pfu. La composición farmacéutica contiene por dosis de aproximadamente 10^5 a 10^9, ventajosamente de aproximadamente 10^6 a 10^8 pfu de virus de la viruela o recombinante herpesvirus que expresa un inmunógeno de VSRRP.

[**0084**] El volumen de dosis de composiciones de las especies diana que son mamíferos, por ejemplo, el volumen de dosis de composiciones de porcino, basadas en vectores virales, por ejemplo, composiciones basadas en vectores virales no virus de la viruela, es generalmente de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 2,0 ml, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1,0 ml, y más preferiblemente entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 1,0 ml.

[0085] Se debe entender por un experto en la técnica que la presente descripción se proporciona a modo de ejemplo y la presente invención no se limita a ésta. A partir de la descripción de este documento y el conocimiento en la técnica, el experto puede determinar el número de administraciones, la vía de administración, y las dosis a utilizar para cada protocolo de inyección, sin gran experimentación.

[0086] La presente invención contempla al menos una administración a un animal de una cantidad eficaz de la composición terapéutica fabricada de acuerdo con la invención. El animal puede ser macho, hembra, hembra embarazada y recién nacido. Esta administración puede ser a través de diversas rutas incluyendo, pero no limitado

a, intramuscular (IM), intradérmica (ID) o subcutánea (SC) o mediante administración intranasal o por vía oral. La composición terapéutica de acuerdo con la invención también se puede administrar mediante un aparato sin aguja (como, por ejemplo, con un aparato Pigjet, Biojector o Vitajet (Bioject, Oregon, EE.UU.)). Otro enfoque para administrar composiciones de plásmido es usar electroporación (véase, por ejemplo S. Tollefsen et al. Vaccine, 2002, 20, 3370-3378; S. Tollefsen et al. Scand J. Immunol, 2003, 57, 229-238; S. Babiuk et al., Vaccine, 2002, 20, 3.399-3.408; Solicitud PCT No. WO99/01158). Tal como se describe en el presente documento el plásmido puede administrarse al animal mediante pistola de genes o bombardeo de partículas de oro. En una realización ventajosa, el animal es un vertebrado. En una realización más ventajosa, el vertebrado es un gato.

[0087] Los inyectores sin aguja a chorro de líquido son dispositivos que realizan inyecciones de una cierta cantidad de líquido a alta presión a través de un orificio diminuto. Las especificaciones mecánicas del inyector pueden ajustarse o seleccionarse a fin de controlar la profundidad de penetración en los tejidos. Las administraciones de un líquido usando una jeringa o un inyector sin aguja terminan en una distribución diferente del líquido en los tejidos. Usando una jeringa terminan en un bolo o área localizada. Usando un inyector terminan en una distribución difusa en las capas de los tejidos diana, tal como se ilustra en el documento WO-A-01/13975.

[0088] La profundidad de penetración está controlada principalmente por la presión del líquido. Esta presión del líquido depende de las especificaciones mecánicas del inyector, tales como la fuerza de resorte o cualquier otro medio de propulsión y el diámetro del pistón y el orificio de la boquilla. Esto está fácilmente disponible para el experto en la técnica.

[0089] La profundidad de la inyección se puede determinar fácilmente mediante la disección del tejido en el sitio de inyección (que corresponde preferiblemente a la ubicación donde va a administrarse la vacuna y la prueba se lleva a cabo ventajosamente en un animal de la misma especie y edad de la población a vacunar) después de la administración de un líquido coloreado que tiene preferiblemente la misma viscosidad que la vacuna pretendida. Esta prueba puede llevarse a cabo directamente con la vacuna pretendida que contiene adicionalmente un colorante. Esta prueba permite al experto en la técnica ajustar las especificaciones mecánicas de un inyector.

[0090] El inyector sin aguja puede estar equipado con un cabezal que comprende una o varias boquillas. El uso de varias boquillas permite aumentar el patrón de dispersión de la vacuna sobre un área mayor. Puede haber de 1 a 10 boquillas, preferiblemente de 1 a 6.

[0091] Existen varios inyectores disponibles en el mercado. El Vitajet® 3 (Bioject Inc.) está particularmente adaptado para el procedimiento según la invención.

[0092] Es ventajoso utilizar un inyector equipado con medios que permiten ajustar en el inyector directamente un vial o ampolla estándar. Además, el vial de la vacuna puede comprender varias dosis de vacuna que permiten varias inyecciones de la vacuna y/o la vacunación de varios animales utilizando el inyector y el mismo vial. Por lo tanto, el inyector es preferiblemente capaz de realizar inyecciones sucesivas desde un mismo vial.

[**0093**] Se describe en el presente documento un procedimiento para estimular la respuesta inmunitaria de un vertebrado. En una realización, el vertebrado es un pájaro, gato, vaca, perro, pez, cabra, caballo, humano, ratón, mono, cerdo, rata u oveja. En una realización más ventajosa, el vertebrado es un gato.

[0094] En un aspecto de la invención, la vacunación contra VSRRP se puede asociar con una vacunación contra otra enfermedad porcina. La vacuna comprende el vector de ADN de acuerdo con la invención y un componente de la vacuna capaz de proteger contra otros patógenos porcinos incluyendo, pero no exclusivamente, Mycoplasma hyopneumoniae y PCV2.

[0095] El volumen de la dosis inyectada puede ser de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 1,0 ml, preferiblemente de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 0,8 ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 0,5 ml, y en un uso preferido, el volumen de dosis inyectado puede ser de 0,25 ml. Por definición, el volumen de una dosis significa el volumen total de vacuna administrada a la vez a un animal.

[0096] La vacuna puede contener de aproximadamente $10^{4,5}$ a aproximadamente $10^{8,0}$ $TCID_{50}$/dosis (50% de la dosis infectiva de cultivo de tejidos por dosis de vacuna) y preferiblemente de aproximadamente $10^{5,5}$ a aproximadamente $10^{6,5}$ $TCID_{50}$/dosis.

[0097] Opcionalmente, la administración se puede repetir, como administración de refuerzo, a intervalos adecuados si es necesario o deseable, por ejemplo de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 semanas después de la primera administración, y preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 semanas después de la primera administración. Una administración de refuerzo también se puede repetir cada año.

[0098] Se describe en el presente documento es el uso de una cantidad eficaz de un vector de ADN que codifica y expresa al menos un inmunógeno de VSRRP como se describió anteriormente y de un vehículo o diluyente aceptable, para la preparación de una vacuna de vector de ADN líquida diseñado para ser administrada

esencialmente en la dermis y la hipodermis de un animal de la familia de los suidos utilizando un inyector sin aguja a chorro de líquido como se describió anteriormente, y que da lugar a la obtención de una respuesta inmunitaria segura y protectora contra VSRRP.

[0099] También se describe en el presente documento un kit o conjunto de vacunación, que comprende dicho inyector sin aguja a chorro de líquido y al menos un vial de vacuna que contiene una vacuna contra VSRRP basada en un vector de ADN como se describió anteriormente, operativamente montado para realizar la administración de la vacuna a un animal de la familia de los suidos. La distribución de la vacuna se realiza esencialmente en la dermis y la hipodermis.

[0100] Dicho kit o conjunto de vacunación es capaz de provocar una respuesta inmunitaria segura y protectora contra VSRRP.

[**0101**] La eficacia a largo plazo y la seguridad de una nueva formulación específicamente diseñado para ser administrada por vía transdérmica usando el sistema vacunador transdérmico Derma-Vac® se presenta en el Ejemplo 4. La administración sin aguja tiene el potencial para hacer frente a los aspectos de seguridad y calidad de estos objetivos, así como para proporcionar una presentación optimizada de la vacuna al sistema inmunitario (véase, por ejemplo, Charreyre C., F. Milward, R. Nordgren y G. Royer, 2005, Demonstration of efficacy in pigs of Mycoplasma hyopneumoniae experimental vaccines by an innovative needle-free route, Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians).

Referencias adicionales:

[0102]

Albina, E. 1997. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview. Veterinary Microbiology 55: 309-316.

Bautista, E.M., Morrison, R.B., Goyal, S.M., Collins, J.E. and Annelli, J.F. 1993. Seroprevalence of PRRS virus in the United States. Swine Health Prod. 1(6): 4-7.

Bautista, E.M., Suarez P., Molitor T.W. 1999. T cell response to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch. Virol. 144:117-134.

Benfield, D.A., Nelson, E.A., Collins, J.E., Harris, L., Goyal, S.M., Robinson, D., Christianson, W.T., Morrison, R.B., Gorcyca, D. and Chladek, D. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). J. Vet. Diagn. Invest. 4: 127-133.

Brierley, I. 1995. Ribosomal frameshifting on viral RNAs. J. Gen. Virol. 76: 1885-1892.

Brun A., Vaganay, A., Tardy, M.C., Noe, T., Vandeputte, J., Schirvel, C. and Lacoste, F. 1992. Evaluation of etiological elements in the "P.R.R.S." in pigs. In Proceedings of the 12*" Congress of the International Pig Veterinary Society, The Hague, Netherlands, 17-20 August, p. 108.

Carlson, J. 1992. Encephalomyocarditis virus (EMCV) as a cause of reproductive and respiratory disease in swine. American Association of Swine Practitioners Newsletter. 4: 23.

Cavanagh, D. 1997. Nidovirales: a new order comprisong Coronaviridae and Arteriviridae. Arch Virol. 142 (3): 629-633.

Cho, S.H., Freese, W.R., Yoon, I.J., Trigo, A.V. and Joo, H.S. 1993. Seroprevalence of indirect fluorescent antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in selected swine herds. J. Vet. Diagn. Invest. 5: 259-260.

Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCulloygh, S., Morrisson, R.B., Joo, H.S., Gorcyca, D. and Chladek, D.W. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 4: 117-126.

Conzelmann, K.K., Visser, N., van Woensel, P. and Tiel, H.J. 1993. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the Arterivirus group. Virology 193: 329-339.

Den Boon, J.A., Snijder, E.J., Chirnside, E.D., de Vries, A.A.F., Horzinek, M.C. and Spaan, W. 1991. Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronavirus superfamily. J. Virol. 65: 2910-2920.

De Vries, A.A.F., Horzinek, M.C, Rottier, P.J.M. and de Groot, R.J. 1997. The genome organization of the Nidovirales: Similiarities and differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses. Seminars in Virology 8: 33-47.

Dewey CE, Wilson S, Buck P, Leyenaar JK. 1999. The reproductive performance of sows after PRRS vaccination depends on stage of gestation. Prev Vet Med 40:233-241.

Done, S.H. and Paton, D.J. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. Veterinary Record 136: 32-35.

Done, S.H., Paton, D.J. and White, M.E.C. 1996. Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome (PRRS): A review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects. British Veterinary Journal 152 (2): 153- 174.

Drew, T.W., Meulenberg, J.J.M., Sands, J.J. and Paton, D.J. 1995. Production, characterization and reactivity of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Gen. Virol. 76: 1361-1369.

Edbauer, C, R. Weinberg, J. Taylor, A. Rey-Senelonge, J.F. Bouquet, P. Desmettre and E. Paoletti, Virology 179, 901-904 (1990).

Faaberg, K.S. and Plagemann, P.G.W. 1995. The envelope proteins of lactate dehydrogenase-elevating virus and their membrane topography. Virology 212: 512-525.

Faaberg, K.S., Even, C, Palmer, G.A. and Plagemann, P.G.W. 1995. Disulfide bonds between two envelope proteins of lactate dehydrogenase-elevating virus are essential for viral infectivity. J. Virol. 69: 613-617. 1. Galina, L., Pijoan, C, Sitjar, M., Christianson, W.T., Rossow, K. and Collins, J.E. 1994. Interaction between Streptococcus suis serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. Vet. Record. 134: 60-64.

Godeny, E.K., Chen, L., Kumar, S.N., Methven, S.L., Koonin, E.V., and Brinton, M.A. 1993. Complete genomic sequence and phylogenetic analysis of the lactate dehydrogenase elevating virus (LDV). Virology 192: 585-596.

Goebel, S.J., G.P. Johnson, M.E. Perkus, S.W. Davis, J.P. Winslow, E. Paoletti, Virology 179,247-266, 517-563 (1990).

Gonin P, Mardassi H., Gagnon CA, Massie B., Dea S. 1999. A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch. Virol. 143:1927- 1940.

Gonin P, Pirzadeh B, Gagnon CA, Dea S. 1999. Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. J Vet Diagn Invest 11 :20-26.

Gorcyca, D., Schlesinger, K., Chladek, D. and Behan, W. 1995. RespPRRS: a new tool for the prevention and control of PRRS in pigs. In Proceedings of the American Association of Swine Practitioners, ppl-22

Guo, P., S. Goebel, S. Davis, M.E. Perkus, B. Languet, P. Desmettre, G. Allen, and E. Paoletti, J. Virol. 63, 4189-4198 (1989).

Halbur, P.G., Paul, P.S., Meng, X. and Andrews, J.J. 1992. Comparative pathology of porcine reproductive and respiratory syndrome in SPF pigs. Iowa State University Swine Research Reports, p137. Cooperative Extension Service, Iowa State University, Ames, IA, 50011.

Halbur, P.G., Paul, P.S. and Janke, B.H. 1993. Viral contributors to the porcine respiratory disease complex. In Proceedings of the 24tn Annual meeting of the American Association of Swine Practitioners, Kansas City, Missouri, USA, pp343-350.

Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L.,Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.-J., Lum, M.A., Andrews, J.J. and Rathje, J.A. 1995. Comparison of the pathology of two U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with the Lelystad virus. Vet. Pathol. 32:648-660.

Heinen E, Herbst W, Schmeer N. 1998. Isolation of a cytopathogenic virus from a case of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and its characterization as parainfluenza virus type 2. Arch Virol 143:2233-2239

Hill, H. 1990. Overview and history of mystery swine disease (swine infertility and respiratory syndrome). In. Proceedings of the Mystery Swine Disease Committee Meeting, Denver, CO, 1990. Livestock Conservation Institute, Madison, WI, pp 29-30.

Kwang J, Zuckermann F, Ross G, Yang S, Osorio F, Liu W, Low S. 1999. Antibody and cellular immune responses of swine following immunisation with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORF's 4, 5, 6 and 7. Res Vet Sci 67:199-201.

Lager KM, Mengeling WL, Brockmeier SL. 1999. Evaluation of protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge-exposed with an antigenically distinct PRRSV isolate. Am J Vet Res 60:1022-1027.

Le Potier, M.F., Blanquefort, P., Morvan, E. and Albina, E. 1995. Results of a control program for PRRS in the French area 'Pays de Loire'. Proc. of the 2nc^ Int. Symposium on PRRS, Copenhagen, Denmark, 9-10 August, p34.

Mardassi, H., Mounir, S. and Dea, S. 1995. Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus , Quebec reference strain. Arch. Virol. 140: 1405-1418.

Mardassi, H., Massie, B. and Dea, S. 1996. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome. Virology 221: 98-112.

Meng, X.-J., Paul, P.S., Halbur, P.G. and Lunn, M.A. 1995a. Phylogenetic analysis of the putative M (ORF6) and N(ORF7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implications for the existence of two genotypes of PRRSV in the USA and Europe. Arch. Virol. 140: 745-755. 39. Meng, X.-J., Paul, P.S., Halbur, P.G. and Morozov, I. 1995b. Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Gen. Virol. 76: 3181-3188.

Meng, X.-J., Paul, P.S. , Morozov, I. And Halbur, P.G. 1996. A nested set of six or seven subgenomic mRNAs is formed in cells infected with different isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J. Gen. Virol. 77; 1265-1270.

Mengeling WL, Vorwald AC, Lager KM, Clouser DF, Wesley PJD. 1999a. Identification and clinical assessment of suspected vaccine-related field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Am J Vet Res 60:334-340.

Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. 1999b. Safety and efficacy of vaccination of pregnant gilts against porcine reproductive and respiratory syndrome. Am J Vet Res 60:796-801.

Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. 1998. Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of "atypical" PRRS. Am J Vet Res 59:1540-1544.

Meulenberg, J.J.M., Hulst, M.M., de Meijer, E.J., Moonen, P.J.L.M., den Besten, A., de Kluyver, E.P., Wensvoort, G. and Moormann, RJ.M. 1993a. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. Virology 192: 62-72.

Meulenberg, J.J.M., de Meijer, E.J. and Moormann, RJ.M. 1993b. Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved junction sequence. J. Gen. Virol. 74: 1697-1701.

Meulenberg, J.J.M., den Besten, A.P.., De Kluyver, E.P., Moormann, R.J.M., Schaaper, W.M.M. and Wensvoort, G. 1995. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. Virology 206: 155-163.

Meulenberg, J.J.M. and Petersen-Den Besten, P.-D. 1996. Identification and characterization of a sixth structural protein of Lelystad virus: The glycoprotein GP2 encoded by ORF 2 is incorporated in virus particles. Virology 225: 44-51.

Murtaugh, M.P., Elam, M. and Kakach, L.T. 1995 Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of PRRS virus. Arch. Virol. 140: 1451-1460.

Nakamine M, Kono Y, Abe S, Hoshino C, Shirai J, Ezaki T. 1998. Dual infection with enterotoxigenic Escherichia coli and porcine reproductive and respiratory syndrome virus observed in weaning pigs that died suddenly. J Vet Med Sci 60:555-561.

Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. J Virol 73:270-280.

Nelson, E.A., Christopher-Hennings, Drew, T., Wensvoort, G., Collins, G. and Benfield, D.A. 1993. Differentiation of US and European isolates of porcine reproductive nad respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. J. Clin. Micro. 31 : 3184-3189.

Ohlinger, V., Haas, B., Saalmuller, A., Beyer, J., Teuffert, J., Visser, N. and Weiland, F. 1992. In vivo and in vitro studies on the immunobiology of PRRS. Proc. of American Assoc. Swine Practitioners - 1st Int. PRRS Symp., 4(4): 24.

Ohlinger VF. 1995. The respiratory syndrome: studies on PRRSV-replication and immune response. Int. Symp. PRRS 2:12.

Panicali, D. and E. Paoletti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4927-4931 (1982).

Pirzadeh B, Dea S. 1998a. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol 79:989-999.

Pirzadeh B, Gagnon CA, Dea S. 1998b. Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein. Can J Vet Res 62:170-177

Paoletti, E., B.R. Lipinskaks, C. Samsonoff, S. Mercer, and D. Panicali, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 193-197 (1984). 58. Paton, D.J., Brown, I.H., Edwards, S. and Wensvoort, G. 1991. Blue ear disease of pigs. Vet. Rec. 128: 617.

Perkus, M.E., K. Limbach, and E. Paoletti, J. Virol. 63, 3829-3836 (1989).

Piccini, A., M.E. Perkus, and E. Paoletti, In Methods in Enzymology, Vol. 153, eds. Wu, R, and Grossman, L., (Academic Press) pp. 545-563 (1987).

Pirzadeh, B. and Dea, S. 1997. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. J. Gen. Virol. 78: 1867-1873.

Plagemann, P.G.W. 1996. Lactate dehydrogenase-elevating virus and related viruses. In "Virology" (B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley, Eds.) 3rd ed., ppl 105-1120. Raven Press, New York.

Plana-Duran J, Bastons M, Urniza A, Vayreda M, Vila X, Mane H. 1997. Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Microbiol 55:361-370.

Plana Duran, J., Climent, I., Sarraseca, J., Urniza, A., Cortes, E., Vela, C. and Casal, I. 1997. Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. Virus Genes 14: 19-29.

Rossow K.D. 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome (review article). Vet Pathol. 35:1-20.

Sirinarumitr T, Zhang Y, Kluge JP, Halbur PG, Paul PS. 1998. A pneumo- virulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and in vivo. J Gen Virol 79:2989-2995.

Snijder E., van Tol H., Pedersen K.W., Raamsman M.J.B., and de Vries A.A.F. 1999. Identification of a novel structural protein of arteri viruses. J. Virol. 73, 6335-6345.

Suarez, P., Diaz-Guerra, M., Prieto, C, Esteban, M., Castro, J.M., Nieto, A. and Ortin, J. 1996. Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. J. Virol. 70: 2876-2882. 69. Sur JH, Doster AR, Osorio FA. 1998. Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Pathol 35:506-514.

Thacker EL, Halbur PG, Ross RF, Thanawongnuwech R, Thacker B J. 1999. Mycoplasma hyopneumoniae potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus- induced pneumonia. J Clin Microbiol 37:620-627.

Van Nieuwstadt, A.P., Meulenberg, J.J.M., van Essen-Zandbergen, A., Petersen-den Besten, A., Bende, R.J., Moorman, RJ.M. and Wensvoort, G. 1996. Proteins encoded by open reading frames 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion. J. Virol. 70: 4767-4772.

van Woensel PA, Liefkens K, Demaret S . 1998a. Effect on viraemia of an American and a European serotype PRRSV vaccine after challenge with European wild-type strains of the virus. Vet Rec 142:510-512. 81. van Woensel PA, Liefkens K, Demaret S. 1998b. European serotype PRRSV vaccine protects against European serotype challenge whereas an American serotype vaccine does not. Adv Exp Med Biol 440:713-718.

Weiland E, Wieczorek-Krohmer M, Kohl D, Conzelmann KK, Weiland F. 1999. Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. Vet Microbiol 66:171-186

Wensvoort, G.C., Terpstra, J.M.A., Pol, E.A., ter Laak, M., Bloemraad, E.P., de Kluyver, C, Kragten, C, van Buiten, A., den Besten, F., Wagenaar, J.M., Broekhuysen, P.L.J.M., Moonen, T., Zetstra, E.A., de Boer, H J., TibbenM.F., de Jong, P., van't Veld, G.J.R., Greenland, .A.., van Gennep, M.T., Voets, J.H.M., Verheyden, J.H.M. and Braamskamp, J. 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet Q. 13: 121-130.

Wensvoort, G., de Kluyver, E.P., Luijtze, E.A., den Besten, A., Harris, L., Collins, J.E., Christianson, J.E. and Chladek, D. 1992. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. J. Vet. Diagn. Invest. 4: 134-138.

Yeager, M.J., Prieve, T., Collins, J., Christopher-Hennings, J., Nelson, E. and Benfield, D. 1993. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. Swine Health Prod. 1(5): 7- 9.

Yoon, K.-J., Zimmermann, J.J., Swenson, S.L., Wills, R.W., Hill, H.T. and Platt, K.B. 1994. Assessment of the biological significance of antibody dependent enhancement (ADE) of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus infection in passively immunized pigs. Proc. 13^ Int. Pig Vet. Soc. Congress, p69.

Yoon, K.-J., Zimmerman, J.J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Eernisse, K.A., Brevik, A., Rhinehart, L.L., Frey, M.L., Hill, H.T. and Platt, K.B. 1995. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 305- 312. Zimmermann, J.J., Yoon, K.-J., Wills, R.W. and Swenson, S.L. 1997. General Overview of PRRSV: A perspective from the United States. Veterinary Microbiology 55: 187-196.

[0103] La invención se describirá ahora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLO 1: Construcción y caracterización de los plásmidos que codifican el gen de nucleocápside (ORF7)

[0104] El gen ORF7 de VSRRP (SEQ ID NO: 1) y el gen de ORF7 truncado modificado genéticamente (ORF7t) (SEQ ID NO: 3), con un codón de terminación después del aminoácido 112, se amplificaron por PCR a partir del vector pBAD-ORF7 (SEQ ID NO: 13) que contenía el gen de la nucleocápside (ORF7) del aislado de VSRRP tailandés del genotipo de EE.UU (01NP1), usando los conjuntos de cebadores indicados en la tabla 1.

Tabla 1. Cebadores de clonación de los genes deORF7 de VSRRP y ORF7 truncado (ORF7t)

Nombre	Secuencia	Diana	Longitud de amplicón (pb)	SEQ ID NO
ORF7 US-F	5'-AAAAAA*GAATTC*ATGCCAAATAACAACGGCAAG-3'	1-21	384	5
ORF7 US-R	5' AAAAAA*GAATTC*TCATGCTGAGGGTGATGCTGTG 3'	372-351		6
ORF7 US-F	5' AAAAAA*GAATTCA*TGCCAAATAACAACGGCAAG 3'	1-21	351	5
US-11R	5' AAAAAA*GAATTC***TCA**CACAGTATGATGCGTAGGC 3' ***codón de parada***	336-318		7
Nota: las letras en cursiva indican los sitios de restricción EcoRI				

[**0105**] Los fragmentos de ORF7 y ORF7t se cortaron a continuación con EcoRI y se clonaron en el vector pMASIA cortado por EcoRI (SEQ ID NO: 8). Los plásmidos clonados se transformaron en las células competentes, *E. coli* cepa JM109. Los constructos obtenidos fueron referidos como pORF7 (SEQ ID NO: 9) y pORF7t (SEQ ID NO: 10), respectivamente (figura 1). La orientación de los genes de ORF insertados se confirmó inicialmente por análisis de PCR, usando los conjuntos de cebadores indicados en la Tabla 2. Los plásmidos seleccionados se sometieron adicionalmente a análisis de secuencias del gen de ORF7. Todos los análisis de secuencias confirmaron la inserción correcta del gen de ORF7, con secuencias idénticas a las secuencias de ORF7 originales del vector original (pBAD-RF7) y 01NP1-VSRRP (Genbank, Q056373, SEQ ID NO: 13), (Figura 2).

Tabla 2. Los cebadores utilizados para el análisis de la orientación de los genes de ORF7 insertados

Nombre	Secuencia	Diana	Longitud de amplicón (pb)	SEQ ID NO:
pMASIA F	5'-CAGTGTAGTCTGAGCAGTACT-3 '	4100-4120	564	11
ORF7 US-F	5'-AAAAAAGAATTCATGCCAAATAACAACGGCAAG-3'	1-21		5
pMASIA F	5 'CAGTGTAGTCTGAGCAGTACT-3'	4100-4120	564	11
ORF7 US-R	5'-AAAAAAGAATTCTCATGCTGAGGGTGATGCTGTG-3'	372-351		6
pMASIA F	5'-CAGTGTAGTCTGAGCAGTACT-3'	4100-4120	531	11
US-11R	5'-AAAAAAGAATTCTCACACAGTATGATGCGTAGGC-3'	336-318		7

[0106] La expresión de los genes de ORF7 por los constructos de plásmidos, se verificó mediante la transfección in vitro de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) porcinas recién aisladas con pORF7 o pORF7t. Brevemente, las PBMC fueron transfectadas con pORF7 o pORF7t, utilizando el reactivo Effectene Transfection (Qiagen, Alemania), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se incubaron adicionalmente durante 48 horas, en una incubadora de CO2 al 5%. Después de la incubación, se recogieron las muestras de PBMC y se sometieron al aislamiento del ARN total usando el kit de extracción de ARN comercial (Macherey-Nagel, Alemania). El ADN contaminado se estrajo mediante la adición de ADNasa I suministrada con el kit. La expresión del gen de

ORF7 en las PBMC transfectadas se determinó mediante la síntesis de ADNc usando hexámeros aleatorios, seguido de la reacción de PCR, utilizando los conjuntos de cebadores descritos anteriormente (Tabla 1). El resultado confirmó la expresión del ARNm de ORF7 a partir de pORF7 y pORF7t, tal como se muestra en la figura 3.

[0107] Además, cuando se subclonó en un vector de expresión (pQE31, SEQ ID NO: 18), los genes de ORF7 y ORF7t pudieron producir correctamente las proteínas recombinantes con un peso molecular correcto (aproximadamente 15 kDa.) y pudieron ser detectados usando suero hiperinmune anti-VSRRP porcino (Figura 4). Las proteínas recombinantes se sometieron a SDS-PAGE al 15% y se transfirieron a la membrana de PVDF. La presencia de proteína VSRRP se determinó utilizando suero hiperinmune anti-VSRRP porcino. (U; proteína sin purificar, P; proteína purificada, +; con IPTG, -; sin IPTG; M; marcador de peso molecular).

[0108] Para la preparación de la vacuna de ADN, los transformantes de E. coli se propagaron y se sometieron a purificación del plásmido utilizando la columna de purificación de plásmido comercial (NucleoBond endotoxinfree plasmid purification, Macherey-Nagel). La confirmación de los plásmidos purificados se realizó mediante análisis de restricción utilizando la enzima de restricción NcoI (Figura 5). La concentración del plásmido se determinó por espectrofotómetro. Las proporciones DO260/DO280 obtenidas a partir de cada preparación osciló entre 1,625 y 1,69.

EJEMPLO 2: Los efectos inmunomoduladores de la vacuna de ADN contra VSRRP en el modelo estimulado

[0109] Diseño experimental (Figura 6). Para determinar los efectos inmunomoduladores de la vacuna de ADN de VSRRP, se inmunizaron cerdos cruzados de cuatro semanas de edad, seronegativos de VSRRP (4-6 cerdos/grupo) con 500 μg de pORF7t o pORF7 diluido en 200 μl de PBS libre de Ca^{2+}, Mg^{2+} (referido como PBSA), de los plásmidos dos veces en un intervalo de 4 semanas (d0, d28). El plásmido se inyectó por vía intradérmica en la piel de los dos oídos (2x50 μl/lado), utilizando una jeringa de tuberculina (Figura 7). También se incluyeron los grupos de control que recibieron la misma cantidad de PBS o plásmido nulo (pMASIA) en el estudio. Cuatro semanas después de la segunda vacunación (d56), los cerdos fueron estimulados intranasalmente con 5 ml (2,5 ml/ventana de la nariz) del VSRRP virulento (01NP1) a la concentración de $10^{5,5}$ $TCID_{50}$/ml. Los parámetros inmunológicos y signos clínicos fueron controlados cada 2 semanas y a los 0, 5 y 10 días después de la infección (dpi). Los cerdos fueron sacrificados a los 10 dpi y se sometieron a examen patológico y estudios virológicos.

[0110] Estudios virológicos y patológicos. No hubo signos clínicos, ni reacciones adversas observadas después del proceso de inmunización con ADN. Tras la estimulación, se determinó inicialmente la presencia de VSRRP en las muestras combinadas mediante RT-PCR usando el conjunto de cebadores específicos de ORF1. El VSRRP se detectó en las muestras de los grupos inmunizados con pORF7, el plásmido Nulo y PBSA, a 5 dpi (suero), y 10 dpi (tejidos pulmonares). Sin embargo, el VSRRP no se detectó en el grupo inmunizado con pORF7t en cualquier momento de este estudio (Figura 8). Además, la presencia de VSRRP en los tejidos pulmonares de los cerdos individuales se evaluó mediante RT-PCR. La presencia de genoma de VSRRP se determinó mediante RT-PCR utilizando los conjuntos de cebadores específicos de ORF1, lo que daría el producto de PCR de 107 pb en la muestra positiva (Gilbert et al, J Clin Microbiol 1997 35: 264-7). + ve; control positivo (genotipo US-VSRRP), -ve; control negativo (ddH20), L; escalera de 100 pb. Consistente con los resultados de muestras combinadas, el VSRRP podría ser detectado en todos los grupos excepto el grupo inmunizado con pORF7t (Tabla 3).

Tabla 3. Grupos de vacunación y resultados que indican la presencia de VSRRP en las muestras de tejido pulmonar de los cerdos a 10 dpi

Grupo	ID muestra	Resultados	% de muestras positivas
pORF7t	H4811	-	0
	H4831	-	
	H4841	-	
	H4853	-	
	H4849	-	
	H4809	-	
pORF7	H4843	+	33
	H4875	+	
	H4871	-	
	H4827	-	
	H4823	-	
	H4813	-	
Plásmido nulo	H4867	-	50
	H4923	+	
	H4893	-	
	H4859	+	
	H4897	+	
	H4861	-	

PBSA	H4863	+	50
	H4865	-	
	H4895	-	
	H4869	+	

Tabla 4: Porcentaje de cerdos en cada grupo que presentan cambios patológicos en el tracto respiratorio a 10 dpi.

Lesiones patológicas	**Grupo experimental**			
	PBSA[a]	**Nulo[b]**	**pORF7[b]**	**pORF7tl[b]**
Pneumonia	75,0	33,2	33,2	50,0
Linfadenopatía (Ln. Traqueobronquial)	50,0	16,6	0	16,6
Pleuritis fibrinosa	0	16,6	16,6	0
[a]n=4; [b]n=6				

Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el número de cerdos experimentales con cambios patológicos en el tracto respiratorio a 10 dpi (Tabla 4). Los datos sugirieron que la inmunización con pORF7t podría mejorar la eliminación del virus en los cerdos estimulados experimentalmente.

[0111] Estudio de las respuestas inmunitarias humorales. La respuesta de anticuerpos específicos de VSRRP fue determinada por el kit de prueba ELISA comercial (HerdChek PRRS, IDEXX, Alemania). Debe señalarse que la proteína de la nucleocápside es el principal epítopo reconocido por el anticuerpo anti-VSRRP determinado por el ensayo ELISA IDEXX HerdChek (Plagemann, 2006. J Virol Methods 134: 99-118). Los cerdos eran seronegativos de VSRRP al inicio del experimento. La seroconversión sólo se observó en el grupo que recibió pORF7 en el día de la estimulación (1 cerdo), y a 10 dpi (3 cerdos), lo que sugiere el cebado de la respuesta de anticuerpos anti-VSRRP mediante la inmunización con pORF7. Sin embargo, no se observó seroconversión en los cerdos inmunizados con pORF7t o los controles durante todo el experimento (Tabla 5).

Tabla 5. Respuestas de anticuerpos anti-VSRRP en los cerdos experimentales durante el experimento

	Relación S/P promedio (% de seroconversión[a])			
Grupo	**d0**	**d56 (0 dpi)**	**d61 (5 dpi)**	**d66 (10 dpi)**
ORF7t	0,08 (0)	0,02 (0)	0,02 (0)	0,03 (0)
ORF7	0,07 (0)	**0,15 (16,6)**	**0,04 (0)**	**0,46 (50)**
Nulo	0,11 (0)	0,04 (0)	0,01 (0)	0,02 (0)
PBSA	0,06 (0)	0,03 (0)	0,02 (0)	0,01 (0)
[a]relación S/P ≥ 0,4 = positiva				

[0112] **Estudio de la producción de citoquinas específicas virales en PBMC**. No hubo diferencias significativas en las células productoras de IFNγ IL-10 específicas de VSRRP entre los grupos antes de la estimulación. Tras la estimulación, se observó un mayor número de células productoras de IFNγ e IL-10 específicas de VSRRP en todos los grupos (Figura 9). Los cerdos se inmunizaron con la vacuna indicada en la leyenda dos veces en d0 y d28, y recibieron inoculación de VSRRP en d56. Las PBMC porcinos recién aisladas se cultivaron in vitro con 0,08 m.o.i. del US-VSRRP (cepa 01NP1) o lisado de MARC-145 infectado simulado durante 48 horas antes de la recogida para la tinción fluorescente y análisis de citometría de flujo. Los datos representan el porcentaje promedio (± SEM) de las células productoras de citoquinas de los cerdos en el mismo grupo, que se calculó a partir del % de células productoras de citoquinas obtenidos a partir de las PBMC cultivadas con VSRRP -% de células productoras de citoquinas obtenidas de las PBMC cultivadas de forma simulada.

[0113] **Estudio de las células CD4+CD25+ y CD4+CD25+Foxp3+ específicas virales en las PBMC**. Después de la primera inmunización, los cerdos inmunizados con pORF7t exhibieron un número significativamente mayor de las células CD4+C25+ específicas de VRRSP (linfocitos Th activados) que los otros grupos ($p < 0,05$, ANOVA seguido de el test de Newman Keuls), (figura 10 A). También se observó un mayor número de CD4+CD25+ en el grupo inmunizado pORF7t después de la estimulación (d66). Curiosamente, el número de células CD4+CD25+Foxp3+ específicas de VSRRP (células T reguladoras; Treg) en el grupo que recibió pORF7t y pORF7 fue significativamente menor que los grupos de control ($p < 0,05$, ANOVA seguido de Newman Keuls) en d28. Tras la estimulación viral, todos los grupos mostraron mayores cantidades de células CD4+CD25+Foxp3+ en las PBMC (Figura 10B). Los datos representan el porcentaje promedio (± SEM) de la subpoblación de linfocitos de los cerdos en el mismo grupo, que se calculó a partir del % de la subpoblación de linfocitos obtenida a partir del PBMC cultivadas con VSRRP - % de la subpoblación de linfocitos obtenida a partir de las PBMC cultivadas de forma simulada. "a" indica la diferencia significativa con los otros tratamientos. "b" indica una diferencia significativa entre los grupos que recibieron la vacuna de ADN (pORF7t o pORF7) y los controles (nulos o PBSA). Además, los datos indicaron que los 2 plásmidos podrían modular las respuestas inmunitarias contra VSRRP, mediante reducción de Treg específicas virales, y que pORF7t podría mejorar las cantidades de células Th respondedoras específicas virales en los cerdos después de la inmunización y la estimulación.

[0114] Conclusión. Los datos de este experimento de estimulación indica que la inmunización con ADN con el plásmido que codifica ORF7 (pORF7t o pORF7) podría modular significativamente la inmunidad anti-VSRRP. El pORF7t, pero no pORF7, indujo por un mayor número de células Th respondedoras específicas virales y la eliminación del virus después de la estimulación, sin la evidencia de cebado de la respuesta de anticuerpos anti-VSRRP. Aunque pORF7 podría cebar los cerdos de la respuesta de anticuerpos anti-VSRRP, el plásmido no mejoró la inmunidad anti-viral o eliminación viral en los cerdos inmunizados (Tabla 6). El resultado puso de relieve la importancia del papel de la inmunidad mediada por células anti-VSRRP sobre la inmunidad anti-VSRRP. Además, los datos de este experimento sugieren los efectos inmunomoduladores superiores del pORF7t en comparación con el pORF7, por lo tanto, se seleccionó el plásmido pORF7t para el experimento posterior.

Tabla 6. Resumen de los efectos de la inmunización del plásmido en inmunidad anti-VSRRP

	IFN-gamma	**IL-10**	**linfocitos CD4+CD25+**	**células CD4+CD25+FoxP3+**	**Seroconversión**	**Eliminación viral mejorada**
Preestimulación						
Nulo	-	-	-	-	-	na[c]
pORF7t	-	-	↑a	↓b	-	na
pORF7	-	-	-	↓b	-	na
Postestimulación						
Nulo	-	-	-	-	-	-
pORF7t	-	-	↑a	-	-	sí
pORF7	-	-	-	-	sí	-

[a] diferencia significativa con los otros tratamientos ($p < 0,05$)
[b] diferencia significativa entre los grupos que recibieron la vacuna con ADN (pORF7t o pORF7) y los controles (nulo o PBSA), ($p < 0,05$)
[c] no aplicable

EJEMPLO 3: Los efectos inmunomoduladores de pORF7t en los cerdos de la granja comercial (estudio a largo plazo)

[0115] El objetivo fue estudiar los efectos inmunomoduladores de pORF7t en la granja comercial con VSRRP positivo. Objetivos específicos: 1. Investigar el efecto inmunomodulador de la vacuna con ADN en la inmunidad anti-VSRRP, cuando se inmunizó antes de la infección; (cebado exp.) 2. Investigar los efectos inmunomoduladores de la vacuna con ADN en la inmunidad anti-VSRRP, cuando se inmunizó en el momento de la infección (tratamiento exp.); 3. Investigar el efecto de la inmunización con ADN en el crecimiento y el rendimiento de los cerdos inmunizados

[**0116] Diseño experimental** - La granja seleccionada para el estudio a largo plazo fue una granja con VSRRP positivo con el estado serológico del VSRRP conocido durante los últimos 2 años. La granja se encontraba a unos 160 km de Bangkok. Tenía aproximadamente 3.000 cerdas y empleaba un sistema de cría de flujo continuo. Generalmente, los lechones se destetaron a las 4 semanas de edad, y se mantuvieron en el vivero en el mismo sitio (unidad 1) hasta las 11 semanas de edad y, posteriormente, se trasladaron a la unidad de acabado (unidad 2), situado aproximadamente a 20 km del vivero. Es durante este tiempo (es decir, 4-11 semanas) que la mayoría de los cerdos se infectaron con VSRRP. Los cerdos se mantuvieron en el acabador (unidad 2) hasta 26-28 semanas de edad.

[**0117] Cerdo experimental**: Se agruparon al azar cerdos destetados macho de seis semanas de edad en 5 grupos (30 cerdos/grupo) según el esquema presentado en la Tabla 7. Los detalles adicionales del experimento se ilustran en la figura 11A.

Tabla 7. Los detalles de los grupos experimentales

Grupo	**Edad de vacunación**	**No. al inicio**	**Sacrificados a 8 dpm**	**No esperado en el matadero**
1. Control (PBSA)	6,11 semanas	30	6	24
2. Cebado con pORF7t	6 semanas	30	6	24
3. Cebado con nulo	6 semanas	30	6	24
4. pRF7t-Tx	11 semanas	30		30
5. Nulo-Tx	11 semanas	30		30

[0118] Cebado de ADN (ADN-P): los cerdos fueron inmunizados por vía intradérmica con 500 ug de pORF7t a las 6 semanas de edad (d0). Los cerdos que recibieron la misma cantidad de plásmido nulo (pMASIA) o PBSA se

incluyeron como los controles. A los 8 días después de movimiento (8 dpm, d43), los cerdos (6/grupo) se sacrificaron y se sometieron a estudios patológicos y virológicos - El tratamiento con ADN (ADN-T): Los cerdos se inmunizaron con 500 ug de pORF7t en el momento de movimiento (semana 11, d35). Los grupos de control incluyeron el grupo inmunizado con el plásmido nulo o PBSA. - Las muestras de sangre se recogieron cada 2 semanas. El número de células productoras de Treg, IL-10 e IFNγ específicas de VSRRP en las PBMC se determinó por citometría de flujo. Se recogieron muestras de suero para la determinación del anticuerpo anti-VSRRP y la presencia de VSRRP. Los signos clínicos y los índices de rendimiento fueron controlados hasta el final de un período de acabado (Figura 11B).

[0119] Efectos inmunomoduladores de la vacuna con ADN cuando se inmunizaron antes de la exposición a VSRRP (experimento de cebado) Todos los grupos tenían niveles comparables de células productoras de citoquinas en el comienzo del experimento. Después de mover a la unidad de acabado (d43), todos los grupos mostraron cantidades de células de IL-10+ específicas de VSRRP aumentardas significativamente, posiblemente debido a la exposición natural a VSRRP en el acabador. Los niveles de las cantidades de células productoras de IL-10+ disminuyeron gradualmente después de d56. Curiosamente, los grupos que recibieron pORF7t o el plásmido nulo tenían significativamente un menor número de células de IL-10+ específicas de VSRRP que el PBSA de control en d70 ($p < 0,05$, ANOVA seguido por pruebas de comparación múltiple de Tukey). Sin embargo, sólo el grupo inmunizado con pORF7t exhibió una gradual disminución de las células IL-10+ específicas de VSRRP hasta el final del período de observación. Antes de d112, los cerdos vacunados con pORF7t tenían significativamente un menor número de linfocitos IL-10+ que los otros grupos ($p < 0,05$, ANOVA seguido de pruebas de comparación múltiple de Tukey), (Figuras 12A, B). Después de la vacunación con ADN (d14), los cerdos que recibieron pORF7t mostraron un aumento significativo en el número de linfocitos IFNγ+ específicos de VSRRP. El número de las células de IFNγ+ específicas de VSRRP se mantuvo mayor que otros grupos hasta d70 (Figuras 12C, D). Los cerdos fueron vacunados con pORF7t, plásmido nulo o PBSA en d0, y se movieron a la unidad de acabado en d35. Las muestras de PBMC recién aisladas porcinas habían sido cultivadas con 0,1 m.o.i. de US-VSRRP (cepa 01NP1) o lisado de MARC-145 infectado de forma simulada durante 48 horas antes de la tinción fluorescente y el análisis de citometría de flujo. Todos los grupos tenían números comparables de células CD4+CD25+Foxp3+ (Treg) específicas de VSRRP al comienzo del experimento. Después de la vacunación, los cerdos que recibieron pORF7t exhibieron números significativamente más bajos de la Treg específicas de VSRRP que los otros grupos de control ($p < 0,05$, ANOVA seguido de pruebas de comparación múltiple de Tukey). Después del movimiento (d43), el número de Treg específica de VSRRP aumentó en todos los grupos, posiblemente debido a la exposición a VSRRP. Sin embargo, el número de las Treg específicas de VSRRP en el grupo vacunado con pORF7t se mantuvo por debajo de los otros grupos durante todo el experimento (Figuras 13A, B). El resultado de este experimento indicó que la vacuna con ADN podría modular las respuestas inmunitarias de anti-VSRRP en los cerdos mediante la mejora de la producción de IFNγ específica viral y la reducción de la producción de IL-10 y Treg específica viral en los cerdos vacunados después de la exposición viral.

[0120] Efecto inmunomodulador de la vacuna con ADN cuando se inmuniza en el momento de la exposición a VSRRP (experimento de tratamiento). Todos los cerdos mostraron un aumento de células IL-10+ específicas de VSRRP en las PBMC después del movimiento en la unidad de acabado (d43). Sin embargo, los cerdos que recibieron pORF7t exhibieron una reducción más rápida de las células IL-10+ específicas de VSRRP y tenían niveles más bajos de células IL-10+ específicas de VSRRP que los otros grupos de control hasta el final del período de observación (Figuras 14A, B). La inmunización con pORF7t dio lugar a una inducción mejorada de células IFNγ+ específicas de VSRRP. Además, el número de las células IFNγ específicas de VSRRP en el grupo pORF7t se mantuvo más alto que los otros grupos hasta el final de los experimentos (Figuras 14C, D). Además, los cerdos que recibieron pORF7t exhibieron números significativamente más bajos de células CD4+CD25+Foxp3+ específicas de VSRRP que los grupos de control durante todo el experimento (Figuras 15A-B). Los resultados sugirieron que pORF7t podría modular la respuesta inmunitaria específica de VSRRP que debe ser beneficioso para la inmunidad anti-VSRRP.

[0121] El efecto de la inmunización con ADN en las respuestas de anticuerpos. Algunos de los cerdos contenían anticuerpo específico de VSRRP derivado maternal en su suero al inicio del experimento. El nivel de MDA se redujo gradualmente hasta 8 semanas de edad (d14). Sin embargo, el 80-100% de los cerdos en cada grupo mostró una seroconversión en el momento de movimiento (d35), lo que sugiere que la infección natural en realidad se produjo al final del período de vivero. No hubo diferencia significativa en el patrón de respuestas de anticuerpos, medidas por ELISA, entre los grupos experimentales (Tabla 8, Figura 16).

Tabla 8. Anticuerpo específico de VSRRP determinado por IDEXX ELISA

Grupo	Relación S/P promedio (% de cerdos seropositivos[b])							
	d0	d14	d35	d43	d56	d70	d82	d112
PBSA	0,25 (33,3)	0,21 (33,3)	1,31 (100)	2,28 (100)	1,99 (80)	2,29 (100)	1,42 (100)	1,36 (100)
pORF7t-P	0,17 (16,7)	0,09 (0)	1,24 (100)	1,35 (100)	1,15 (100)	1,26 (80)	1,02 (100)	1,26 (100)
Nulo-P	0,30	0,24 (0)	1,22 (100)	0,93 (100)	2,16 (100)	1,36 (100)	1,01 (80)	1,00 (60)

	(33,3)							
pORF7t-T	nd	nd	1,19 (80)	1,29 (100)	1,16 (100)	1,09 (100)	1,65 (100)	1,29 (100)
Nulo-T	nd	nd	0,96 (80)	1,07 (80)	0,98 (80)	1,72 (80)	0,83 (100)	1,21 (100)
[a]valores DO promedio de 5 cerdos/grupo [b] relación S/P ≥ 0,4 = seropositivo								

[0122] Los estudios virológicos. Los estudios virológicos por RT-PCR y RT-PCR cuantitativa confirmaron la presencia del genotipo US de VSRRP en las muestras de pulmón de los cerdos experimentales que fueron sacrificados a los 8 dpm (d43), la Tabla 9. Sin embargo, no hubo diferencias en el número de carga viral en el suero a d43 (Figura 17). Los estudios patológicos de las vías respiratorias en d43 revelaron infección viral con complicación secundaria en los pulmones de los cerdos.

Tabla 9. El número de cerdos experimentales con VSRRP positivo en el pulmón a d43

Tratamiento	Animal positivo/totales examinados (%[a])
1) Control (PBSA)	3/6 (50)
2) pORF7t-cebador	3/6 (50)
3) Plásmido nulo	5/6 (83,33)
[a]% de muestras positivas de 6 cerdos/grupo	

EJEMPLO 4: Los efectos inmunomoduladores de la vacuna con ADN de VSRRP suministrada utilizando tecnología transdérmica

[0123] Los inventores han observado el resultado inesperado y sorprendente que se logró una eficacia mejorada significativamente cuando los plásmidos de la invención fueron administrados utilizando tecnologías transdérmicos, específicamente el dispositivo DERMAVAC®. En los ejemplos anteriores, la nueva vacuna VSRRP-ADN fue desarrollada y probada por su inmunoprofilaxis y propiedades inmunoterapéuticas contra VSRRP. Los resultados indicaron que la vacuna de ADN prototipo, cuando se inmuniza por vía intradérmica en los cerdos experimentales, era capaz de modular respuestas inmunitarias anti-VSRRP y la mayor eliminación viral en los cerdos estimulados vacunados. Dado que la técnica de inyección intradérmica no se practicó de forma rutinaria en las granjas de cerdos, los inventores exploraron el uso potencial de un dispositivo sin aguja para el suministro de la vacuna con ADN de la invención en cerdos. Se contempla por los inventores que las vacunas de la invención deberían demostrar adicionalmente la eficacia en, por ejemplo, pero no exclusivamente, cerdos de engorde y cerdas jóvenes de reemplazo.

[0124] Materiales y Procedimientos. *Inmunización de plásmido*. La vacuna VSRRP-ADN (pORF7t) que contenía el gen de ORF7 modificado genéticamente, que codificaba la proteína N linealizada, derivado del genotipo US, el aislado de VSRRP tailandés (01 NP1) y el plásmido nulo (pMASIA) se utilizaron para la inmunización de ADN. Los inyectores sin aguja; Pulse50 (Sistema sin aguja Pulse, EE.UU.), y Dermavac (Merial, Francia) fueron probados y optimizados para la inoculación intradérmica antes del experimento con animales (Figura 18). Experimento con animales. Se inmunizaron xerdos cruzados de cuatro semanas de edad (8 cerdos/grupo) con 200 ug o 500 ug del plásmido indicado en el día 0 (DO) mediante inyección intradérmica convencional, inyector sin aguja Dermavac o Pulse50. Los parámetros inmunológicos se monitorizaron cada 2 semanas, en el día 0, 14, 28, 42 y 56 después de la inmunización. Los cerdos se mantuvieron en la granja comercial en todo el experimento. Activación in vitro con VSRRP. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) porcinas recién aisladas se cultivaron in vitro en presencia del aislado tailándés, genotipo US de VSRRP (cepa 01 NP1) o el control, lisado de células infectadas MARC-145 durante 48 horas antes de la recogida y marcajes fluorescentes. El número de células productoras de Treg, IL-10 e IFNγ específicas de VSRRP en diferentes subpoblaciones de linfocitos se determinó mediante citometría de flujo.

[0125] *Resultados*. Ambos inyectores sin aguja proporcionaron una inmunización con ADN eficaz en cerdos de 4 semanas de edad. Después de una sola inmunización plásmido (d0), el cerdo inmunizado con Dermavac exhibió significativamente mejores patrones de parámetros inmunoinhibidores específicos de VSRRP controlados (Treg y IL-10), y parámetros inmunoestimulantes específicos de VSRRP mejorados (producción de IFNγ), (Figura 19). Curiosamente, la inmunización con los dos inyectores, a la dosis de 500 ug podía aumentar el número de células CDS+IFN-y+ específicas de VSRRP, en comparación con la inyección intradérmica convencional (Figura 20).

EJEMPLO 5: Estudio de la estimulación de vacuna VSRRP-ADN (granja positiva de VSRRP)

[0126] *Objetivo*. Este estudio fue diseñado para evaluar la eficacia de la vacuna de ADN prototipo en los cerdos de engorde criados en granja positivas de VSRRP

[0127] *Procedimientos*. Se agruparon al azar cerdos de cuatro semanas de edad de una granja comercial con VSRRP positivo (30 cerdos/grupo) y se inmunizaron dos veces, a las 4 (d0) y 7 semanas (d21) de edad con el sistema DERMAVAC. Los cerdos fueron trasladados al sitio de engorde con VSRRP positivo a las 9 semanas de

edad (d35). El grupo 1 recibió PBSA (500 ul/dosis); el grupo 2 recibió plásmido Nulo (pMASIA) a 500 ug/500 ul/dosis); y el grupo 3 recibió la vacuna con ADN (pORF7t) a 500 ug/500 ul/dosis. Se recogieron muestras de sangre heparinizada (6 cerdos/grupo) para el aislamiento de las PBMC y el análisis de células productoras de IL-10 e IFNγ específicas de VSRRP y el número de linfocitos CD4+CD25+Foxp3+ (Treg) específicas de VSRRP en d0, 21, 35, 49, 84, 112 y 147. Se recogieron muestras de suero para la determinación de anticuerpo específico de VSRRP (IDEXX ELISA) al mismo tiempo de la recogida de la sangre entera. La monitorización de los signos clínicos y la evaluación de la puntuación de pulmón se realizaron en el matadero.

[0128] *Resultados*. No se observó ninguna reacción adversa a la vacuna después de la inmunización con ADN. Los cerdos que recibieron la vacuna con ADN tendían a tener un menor número de Treg CD4+CD25+Foxp3+ específicas de VSRRP que los grupos de control, particularmente después de trasladarse al sitio de engorde. Se observaron aumentos en el número de Treg en ambos grupos de control después del traslado (movimiento) (d49), pero no en el grupo vacunado con ADN (Figura 22A). No hubo diferencias estadísticas en el número de células productoras de IL-10 en todo el experimento.

[**0129]** Se produjo un aumento en el número de de linfocitos CD4+CD25+ específicos de VSRRP (células T efectoras activadas) en el grupo vacunado con ADN después del movimiento, (Figura 22C), en consonancia con un aumento en el número de células que producen IFNγ específicas de VSSRP. El número de células productoras de IFNγ específicas de VSRRP en el grupo vacunado con ADN fue significativamente mayor que los grupos de control en d84 (Figura 22D). El número de células T de memoria productoras de IFNγ (células CD4+CD8+IFN-y +) del grupo vacunado con ADN se mantuvo en un nivel más alto, en comparación con los controles, hasta el final del período observatorio (Figura 22F). Cabe señalar que la variación de datos dentro de los grupos de estudio fue bastante alta en este experimento. Además, también se observaron efectos inmunomoduladores del plásmido nulo.

[**0130**] En el día 84, todos los grupos mostraron seroconversión de VSRRP después del movimiento en el sitio de engorde VSRRP positivo. En d112, todos los cerdos se seroconvirtieron con el patrón similar de relaciones S/P (figura 23). No hubo diferencia significativa en el signo clínico entre los grupos durante el período de engorde. Curiosamente, el grupo que recibió la vacuna con ADN mostró puntuaciones pulmonares inferiores que el grupo de control ($p < 0,05$, prueba t de Student), (Figura 24).

[0131] *Resumen*. La vacuna con ADN moduló las respuestas inmunitarias específicas de VSRRP, tal como se muestra por los parámetros inmunoestimulantes mejorados y la reducción de los parámetros inmunoinhibidores durante el periodo de engorde (Tabla 10). No hubo diferencias significativas en los patrones de respuestas humorales anti-VSRRP entre los grupos experimentales. Además, los cerdos de vacunación con ADN mostraron significativamente menores cambios patológicos pulmonares que los cerdos de control.

Tabla 10. Resumen para el % de animales seropositivos

Grupo	% de seropositivos* (No. de positivos/animales probados)				
	d0	d 21	d49	d84	d112
PBSA	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	57,14 (4/7)	100 (8/8)
Nulo	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	100 (6/6)	100 (7/7)
pORF7t	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	100 (6/6)	100 (8/8)

*Proporción S/P > 0,4

EJEMPLO 6: Estudio de estimulación con vacuna de VSRRP-ADN (granja negativa de VSRRP)

[0132] Procedimientos. Se agruparon al azar cerdos de cuatro semanas de edad de una granja comercial seronegativos en VSRRP (30 cerdos/grupo) y se vacunaron a las 4 semanas (d0) y 7 semanas de edad (d21), utilizando el sistema de Dermavac. Los cerdos fueron todos trasladados al sitio de engorde con VSRRP negativo aproximadamente a las 9 semanas de edad. Los grupos de tratamiento fueron los siguientes: Grupo 1 (PBSA, 500 ul/dosis); grupo 2 (plásmido nulo, 500 ug/500 ul/dosis); y grupo 3 (vacuna de ADN 500 ug/500 ul/dosis). Se recogieron muestras de sangre heparinizada (6 cerdos/grupo) para el aislamiento de las PBMC y el análisis de las células productoras de IL-10 y IFNγ específicas de VSRRP y el número de linfocitos CD4+CD25+Foxp3+ (Treg) específicos de VSRRP en d0, 21, 35, 49, y 63. Se recogieron muestras de suero para la determinación de anticuerpos específicos de VSRRP (IDEXX ELISA) al mismo tiempo de la recogida de la sangre entera.

[0133] *Resultados*. No se observó ninguna reacción adversa de la vacuna durante todo el experimento. Los efectos inmunomoduladores de la vacuna de ADN prototipo fueron representados en la Figura 25. Después de la segunda vacunación, el grupo vacunado con pORF7t mostró significativamente parámetros inmunoinhibidores más bajos que los grupos de control, y la cantidad de linfocitos CD4+CD25+Foxp3+ y CD4+CD25+Foxp3+IL-10+ específicos de VSRRP era más baja que los grupos de control durante todo el experimento, especialmente en el día 35 (Figuras 25A y 25B). Además, el grupo inmunizado con ADN tendía a tener un mayor número de parámetros inmunoestimulantes que los grupos de control. Hubo variaciones de datos bastante altos dentro de los grupos experimentales. Sin embargo, el grupo que recibió la vacuna con ADN tenía un número significativamente mayor de

linfocitos (CTL) $CD8^+IFN\gamma^+$ que los grupos de control en d35 (Figura 25F). Además, los efectos inmunomoduladores del plásmido nulo también se observaron en este estudio. No se observó seroconversión en los cerdos durante todo el experimento y no hubo ninguna diferencia obvia en los signos clínicos entre los grupos. En resumen, los cerdos inmunizados mostraron significativamente mejores respuestas inmunitarias mediadas por células específicas de VSRRP y parámetros inmunoinhibidores más bajos, sin evidencia de mejorar la respuesta de anticuerpos anti-VSRRP.

Ejemplo 7. Estudio de estimulación (granja seronegativa de VSRRP)

[0134] *Procedimientos*. Se agruparon al azar cerdos de cuatro semanas de edad en una granja seronegativa en VSRRP (10-12 cerdos/grupo) y se vacunaron a las 4 semanas (d0) y 7 semanas de edad (d21) utilizando Dermavac: Grupo 1 (PBSA, 500 µl/dosis); Grupo 2 (plásmido nulo, 500 µg/500 µl/dosis); Grupo 3 (pORF7t, 500 µg/500 µl/dosis); y grupo 4 (pORF7, 500 µg/ 500 µl/dosis). Antes de las 9 semanas de edad, los cerdos fueron trasladados a la unidad de aislamiento, y después de la aclimatación, los cerdos fueron estimulados intranasalmente con 5 ml (2,5 ml/ventana de la nariz) de $10^{5,5}$ $TCID_{50}$/ml del genotipo US virulento de VSRRP (cepa 01NP1). Los signos clínicos se monitorizaron tras la estimulación hasta el final del experimento. Los cerdos (5-6 cerdos/grupo) se sometieron a eutanasia a los 10 días después de la infección (dpi) y 21 dpi, y se sometieron a estudios virológicos y patológicos. Se recogieron muestras de sangre heparinizada (5 cerdos/grupo) para el aislamiento de las PBMC y el análisis de las células productoras de IL-10 e IFNγ específicas de VSRRP y el número de linfocitos $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Treg) específicos de VSRRP en los días de vacunación (d0, d21) y a los 0, 7, 14, y 21 dpi.

[0135] *Resultados*. El grupo pORF7t vacunado exhibió significativamente un menor número de la Treg específicas de VSRRP, mientras que hubo aumentos en el número de células $Foxp3^+$ en los grupos de control durante todo el período observatorio (Figura 26). En el día de la estimulación (0 dpi), el número de linfocitos $Foxp3^+$ del grupo vacunado con ADN fue inferior al de los controles (Figuras 26B-C). Tras la estimulación, el número de células $Foxp3^+$ en el grupo vacunado con pORF7t permaneció más bajo que el de los grupos de control durante todo el experimento. Al final del período observatorio (21 dpi), el grupo vacunado con pORF7t tenía un número significativamente menor de Treg que los grupos de control (Figuras 26A-C). Tras la estimulación, hubo aumentos en el número de células productoras de IL-10 en cada grupo experimental. Sin embargo, el grupo vacunado con pORF7t exhibió un aumento más lento y una reducción más rápida en el número de células productoras de IL-10 (figuras 26D). El grupo vacunado con pORF7t tendía a tener parámetros inmunoestimulantes más altos que los grupos de control. Todos los cerdos de la estimulación mostraron signos clínicos de infección por VSRRP incluyendo la disminución en el apetito, fiebre, inflamación de los ojos, tos. Los animales del grupo pORF7t exhibieron un menor número de signos clínicos y respondieron a estímulos externos mejor que los otros grupos.

[0136] Tras la estimulación, VSRRP se detectó a partir 3dpi, alcanzó el máximo a 7-10 dpi y disminuyó gradualmente hasta el final del experimento (Figura 29). El grupo vacunado pORF7t era menos virémico y se recuperó más rápido que los grupos de control (Figura 29A). Hubo una tendencia de niveles más bajos de genoma viral en los pulmones y ganglios linfáticos traqueobronquiales de los cerdos vacunados con ADN (Figura 29B). Sin embargo, debido a la gran variación de datos dentro del grupo, no hubo diferencia estadística entre los grupos experimentales. La seroconversión de VSRRP se pudo detectar 2 semanas después de la estimulación. Hubo más animales seroconvertidos en el grupo vacunado pORF7t a los 21 dpi, sin embargo, no se observó diferencia significativa en los niveles de proporción S/P entre el grupo. Además, no se detectó ningún anticuerpo neutralizante específico de VSRRP en ningún grupo, a 21 dpi.

[0137] Los estudios patológicos a 10 dpi revelaron que VSRRP indujo cambios patológicos en los pulmones de todos los grupos (Tabla 12). Hubo un mayor grado de cambios patológicos macroscópicos en los pulmones y ganglios linfáticos de los grupos de control. A 21 dpi, los cambios patológicos observados fueron comparables entre los grupos (Tabla 13).

[**0138**] *Resumen*. Este estudio demostró que la vacuna prototipo de VSRRP-ADN podría modular las respuestas inmunitarias específicas de VSRRP en los cerdos estimuladaso vacunados como se esperaba. Se observaron un número reducido de Treg y un aumento de los parámetros inmunoestimulantes en el grupo vacunado con ADN, en particular, tras la estimulación. A 10 dpi, los cerdos vacunados pORF7t eran menos virémicos, mostraron mejores signos clínicos y menos cambios patológicos que los grupos de control.

Tabla 11. Porcentaje de seropositivos

Grupo	% de seropositivos* (No. de positivos/animales probados)			
	0 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi
PBSA	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/5)	40 (2/5)
Nulo	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/5)
pORF7t	0 (0/5)	0 (0/5)	20 (1/5)	60 (3/5)

*positivo: Proporción S/P > 0,4

Tabla 12. **Hallazgos** patológicos hallazgos en cerdos estimulados vacunados a 10 dpi

Hallazgos macroscópicos					
No. de cerdo	**Grupo de tratamiento**	**Fecha de la necropsia (DPI)**	**Puntuación del pulmón**	**Pleuritis**	**Notas**
A1	Nulo	10	0	Neg.	-
A6	Nulo	10	1%	Neg.	pneumonía cranioventral
A20	Nulo	10	0	Neg.	ampliación de 1,5 veces de los ganglios linfáticos inguinales superficiales
A29	Nulo	10	3%	Neg.	pneumonía cranioventral
A30	Nulo	10	0	Neg.	-
A40	Nulo	10	0	Neg.	-
B17	PBSA	10	0	Neg.	pneumonía intersticial y hemorragia subcapsular en ganglios infáticos mediastinales
B30	PBSA	10	0	Neg.	pneumonía intersticial y ampliación de 1,5 veces de los ganglios linfáticos inguinales superficiales
B35	PBSA	10	0	Neg.	-
B37	PBSA	10	0	Neg.	pneumonía intersticial leve y ampliación de los ganglios linfáticos inguinales superficiales y edema
B39	PBSA	10	14%	Neg.	pneumonía cranioventral y ampliación de 1,5 veces de los ganglios linfáticos inguinales superficiales
D8	pORF7t	10	0	Neg.	-
D17	pORF7t	10	0	Neg.	ampliación de 2 veces de los ganglios linfáticos inguinales superficiales
D21	pORF7t	10	0	Neg.	-
D24	pORF7t	10	0	Neg.	-
D34	pORF7t	10	0	Neg.	-
No. de cerdo	**Grupo de tratamiento**	**Fecha de la necropsia (DPI)**	**Lesión *M. hyo***	**Lesión VSSRP**	**Dx patológica**
A1	Nulo	10	1	1	pneumonía broncointersticial multifocal leve
A6	Nulo	10	1	1	pneumonía broncointersticial multifocal leve
A20	Nulo	10	1	1	pneumonía broncointersticial multifocal leve
A29	Nulo	10	0	2	pneumonía intersticial multifocal leve
A30	Nulo	10	1	1	pneumonía intersticial leve con congestión leve
A40	Nulo	10	1	1	pneumonía broncointersticial multifocal leve
B17	PBSA	10	1	1	pneumonía broncointersticial multifocal leve
B35	PBSA	10	1	1	pneumonía intersticial leve
B37	PBSA	10	1	1	pneumonía broncointersticial

					multifocal leve
B39	PBSA	10	2	2	pneumonía broncointersticial multifocal moderada
D8	pORF7t	10	1	2	pneumonía intersticial difusa moderada
D17	pORF7t	10	1	2	pneumonía broncointersticial multifocal moderada
D21	pORF7t	10	0	1	pneumonía intersticial multifocal leve
D24	pORF7t	10	1	2	pneumonía intersticial difusa moderada
D34	pORF7t	10	1	2	pneumonía broncointersticial multifocal moderada
Puntuación de la lesión SRRP 0: sin lesión 1: pneumonía intersticial leve 2: pneumonía intersticial multifocal moderada 3: pneumonía intersticial multifocal severa **Puntuación de la lesión *M hyo*** 0: sin lesión 1: grado leve 2: grado moderado 3: grado severo					

Tabla 13. Hallazgos patológicos en los cerdos estimulados vacunados a 21 dpi

Hallazgos microscópicos (no signos macroscópics indicados)					
Cerdo No.	**Grupo de tratamiento**	**Fecha de necropsia (DPI)**	**Lesión *M hyo***	**Lesión VSSRP**	**Dx patológica**
A9	Nulo	21	1	2	pneumonía broncointersticial multifocal moderada
A18	Nulo	21	1	2	pneumonía broncointersticial multifocal leve
A19	Nulo	21	1	2	pneumonía broncointersticial multifocal moderada
A22	Nulo	21	3	2	pneumonía broncointersticial multifocal severa
A36	Nulo	21	1	2	pneumonía broncointersticial multifocal moderada
B1	PBSA	21	1	2	pneumonía broncointersticial multifocal moderada
B6	PBSA	21	1	2	pneumonía broncointersticial multifocal leve
B13	PBSA	21	1	2	pneumonía broncointersticial multifocal moderada
B15	PBSA	21	1	1	pneumonía broncointersticial multifocal leve
B23	PBSA	21	1	2	pneumonía broncointersticial multifocal moderada
D4	pORF7t	21	2	2	pneumonía broncointersticial multifocal moderada
D16	pORF7t	21	2	1	pneumonía broncointersticial multifocal moderada
D28	pORF7t	21	1	1	pneumonía broncointersticial multifocal leve
D36	pORF7t	21	2	2	pneumonía broncointersticial multifocal moderada
D37	pORF7t	21	1	2	pneumonía broncointersticial multifocal moderada
Puntuación de la lesión SRRP 0: sin lesión					

1: pneumonía intersticial leve
2: pneumonía intersticial multifocal moderada
3: pneumonía intersticial multifocal severa
Puntuación de la lesión *M hyo*
0: sin lesión
1: grado leve
2: grado moderado
3: grado severo

Ejemplo 8. Eficacia de la vacuna en cerdas jóvenes de sustitución en la granja positiva en VSRRP

[0139] *Procedimientos*. Se agruparon al azar cerdas de reemplazo de diecinueve semanas de edad de una granja comercial con VSRRP negativo (30 cerdos/grupo) y se inmunizaron dos veces, a las 20 (d0) y 23 semanas (d21) de edad con el sistema Dermavac. Los cerdos fueron trasladados al centro de fabricación con VSRRP positivo a las 9 semanas de edad (d35). Los grupos de inmunización fueron los siguientes; Grupo 1 PBSA (500 ul/dosis); Grupo 2 plásmido Nulo (pMASIA, 500 ug/500 ul/dosis); Grupo 3. vacuna de ADN (pORF7t, 500 ug/500 ul/dosis. A las 25 semanas de edad, las cerdas jóvenes se trasladaron a la granja con VSRRP positivo en la que estarían expuestas a la cepa VSRRP local durante la aclimatación en la granja de recepción. La granja de recepción tiene un bajo nivel de pérdidas de PRDC y VSRRP. Se recogieron muestras de sangre heparinizada (6 cerdos/grupo) para el aislamiento de las PBMC y el análisis de las células productoras de IL-10 e IFNγ específicas de VSRRP y el número de linfocitos CD4+CD25+Foxp3+ (Treg) específicos de VSRRP en d0, 21, 35, 42, 49, 56, 70, y 98. Los procedimientos se llevaron a cabo en general como en el ejemplo anterior.

[0140] *Resultados*. No se observaron evidenciaa de reacción adversa a la vacuna en las cerdas jóvenes vacunadas. Después de la vacunación, las cerdas jóvenes vacunadas mostraron una tendencia de reducción de células productoras Treg CD4+CD25+Foxp3+ y productoras de IL-10 específicas de VSRRP y un aumento de células T efectoras de memoria y células productoras de IFNγ específicas de VSRRP en comparación con los controles a lo largo del experimento. Las cerdas jóvenes vacunadas con ADN contenían cantidades significativamente más bajas de linfocitos CD4+CD25+Foxp3+ (Treg) y un mayor número de células productoras de IFNγ específicas de VSRRP que los cerdos que recibieron PBSA en el día que se trasladaron (movieron) a la planta de producción positiva. Cabe señalar que hubo una variación bastante alta de datos dentro de los grupos experimentales.

[0141] Antes de moverse, los niveles basales de genoma de VSRRP en todos los grupos eran comparables, pero después del movimiento, la infección por VSRRP se hizo evidente en todos los grupos, tal como se indica por el aumento de cargas virales de VSRRP en el suero. Se observaron las etapas virémicas a partir de 3 días después de movimiento (dpm), alcanzó su punto máximo alrededor de 10-14 dpm y duró aproximadamente 2 semanas. Las cerdas jóvenes vacunadas con pORF7t tendían a tener un aumento más lento en las cargas virales y un número de copias inferior de genoma de VSRRP detectado en sus muestras de suero.

[0142] *Resumen*. La vacuna de ADN pORF7t exhibió actividades inmunomoduladoras como en estudios previos. Después de la exposición a VSRRP en la granja, hubo una tendencia de menor nivel de viremia de VSRRP y menos sacrificio en las cerdas jóvenes vacunadas con ADN, en comparación con los controles.

Tabla 14. Resultados reproductivos de cerdas jóvenes de recambio experimentales

Grupo	**Cerda joven**	**Apareamiento**	**Número de lechones**						
	No.	**Lote**	**Nacidos**	**Muertos**	**Momificados**	**Anomalia congénita**	**Semana**	**Aplastado por la cerda**	**Vivo**
PBSA									**78**
1	5056	M 16	13						13
2	5363	M 21	20						20
3	5312	M 15	14		1				13
4	5220	M 17	13	1					12
5	4951	M 16	10						10
6	5273	**Sacrificado**	**10/4**						
7	5245	M 17	10						10
Nulo									**38**
1	5071	**Sacrificado**	**20/8**						
2	5293	M 26	**en gestación***						
3	5054	M 17	15	1				2	12
4	5248	M 12	9						9
5	5083	**Sacrificado**	**3/7**						

6	5131	M 18	5	5
7	4987	M 12	12	12
pORF7t				**64**
1	5077	M 18		9
2	5159	M 18		7
3	4978	M 22		11
4	5152	M 18		14
5	5062	M 18		12
6	4952	M 12		11
7	5368	**Muerto 7/1**	**(durante aclimatación)**	

* al final del período de observación. Esta cerda joven requiere más de dos ciclos de apareamiento para ser productiva.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0143]

<110> Merial Limited
Chulalongkorn University
Audonnet, Jean-Christophe
Charreyre, Catherine
Suradhat , Sanipa

<120> Vacuna de PRRS con ADN transdérmico

<130> MER 10-164P

<150> USSN 61/491,955
<151> 2011-06-01

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ORF7 de PRRSV

<400> 1
atgccaaata acaacggcaa gcagcagaag agaaagaagg gggatggcca gccagtcaat 60

cagctgtgcc agatgctggg taagatcatc gctcagcaaa accagtccag aggcaaggga 120

ccgggaaaga aaaataagaa gaaaaacccg gagaagcccc attttcctct agcgactgaa 180

gatgatgtca gacatcactt tacccctagt gagcggcaat tgtgtctgtc gtcaatccag 240

accgccttta atcaaggcgc tgggacttgc accctgtcag attcagggag gataagttac 300

actgtggagt ttagtttgcc tacgcatcat actgtgcgcc tgatccgcgt cacagcatca 360

ccctcagcat ga 372

<210> 2
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> tradución de ORF7 de PRRSV

<400> 2

Met Pro Asn Asn Asn Gly Lys Gln Gln Lys Arg Lys Lys Gly Asp Gly
1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu Gly Lys Ile Ile Ala Gln
20 25 30

Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys
35 40 45

Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg
50 55 60

His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln
65 70 75 80

Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly
85 90 95

Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val
100 105 110

Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Ser Pro Ser Ala
115 120

<210> 3
<211> 339
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ORF7 truncado modificado de PRRSV (ORF7t)

<400> 3
atgccaaata acaacggcaa gcagcagaag agaaagaagg gggatggcca gccagtcaat 60

cagctgtgcc agatgctggg taagatcatc gctcagcaaa accagtccag aggcaaggga 120

ccgggaaaga aaaataagaa gaaaaacccg gagaagcccc attttcctct agcgactgaa 180

gatgatgtca gacatcactt tacccctagt gagcggcaat tgtgtctgtc gtcaatccag 240

accgccttta atcaaggcgc tgggacttgc accctgtcag attcagggag gataagttac 300

actgtggagt ttagtttgcc tacgcatcat actgtgtga 339

<210> 4
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> traducción de ORF7t de PRRSV

<400> 4

Met Pro Asn Asn Asn Gly Lys Gln Gln Lys Arg Lys Lys Gly Asp Gly
1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu Gly Lys Ile Ile Ala Gln
20 25 30

Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys
35 40 45

Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg
50 55 60

His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln
65 70 75 80

Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly
85 90 95

Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val
100 105 110

<210> 5
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador US-F de ORF7

<400> 5
aaaaaagaat tcatgccaaa taacaacggc aag 33

<210> 6
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador US-R de ORF7

<400> 6
aaaaaagaat tctcatgctg agggtgatgc tgtg 34

<210> 7
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador US-11R

<400> 7
aaaaaagaat tctcacacag tatgatgcgt aggc 34

<210> 8
<211> 4283
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> plásmido pMASIA

<400> 8

gaattcgagc tcccgggtac catggcatgc atcgatagat ctcgagtcta gactagagct 60

cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg cccctccccc 120

gtgccttcct tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa 180

attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggt ggggcaggac 240

agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcatgctg gggaaggcct cggactagtg 300

gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac 360

aacatacgag ccgcggaagc ataaagtgta aagcctgggg tgcctaatga gtgagctaac 420

tcacattaat tgcgttgcgc tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc 480

tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg 540

cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc 600

actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt 660

gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc 720

ataggctccg ccccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa 780

acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttcccccctgg aagctccctc gtgcgctctc 840

ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg 900

cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggt gtaggtcgtt cgctccaagc 960

tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 1020

gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca 1080

ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 1140

acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg 1200

gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt 1260

ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct 1320

tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga 1380

gctgtcgttg tgtcgtcaag tcagcgtaat gctctgccag tgttacaacc aattaaccaa 1440

ttctgattag aaaaactcat cgagcatcaa atgaaactgc aatttattca tatcaggatt 1500

atcaatacca tatttttgaa aaagtcgttt ctgtaatgaa ggagaaaact caccaaggca 1560

gttccatagg atggcaagat cctggtatcg atctgcgatt ccaactcgtc caacatcaat 1620

acaacctatt aatttccccct cgtcaaaaat aaggttatca agtgagaaat caccatgagt 1680

gacgactgaa tctggtgaga atggcaaaag tttatgcatt tctttccaga cttgttcaac 1740

aggccagcca ttacgctcgt catcaaaatc actcgcatca accaaaccat tattcattcg 1800

tgattgcgcc tgagcgagac gaaatacgcg atcgctgtta aaaggacaat tacaaacagg 1860

aatcgaatgc aaacgtctca ggaacactgc cagcgcatca acaatatttt cacctgaatc 1920

aggatattct tctaatacct ggaatgctgt ttttccaggg atcgcagtgg tgagtaacca 1980

tgcatcatca ggagtacgta taaaatgctt gatggtggga agaggcataa attctgtcag 2040

ccagtttagt ctgaccatct catctgtaac atcattggca acgctacctt tgccatgttt 2100

cagaaacaac tctggcgcat ctggcttccc atacaagcga tagattgtcg cacctgattg 2160

ccctacatta tcgcgagccc atttataccc atataaatca gcatccatgt tggaatttaa 2220

tcgtggcctc gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca ccccttgtat tactgtttat 2280

gtaagcagac agttttattg ttcatgatga tatattttta tcttgtgcaa tgtaacatca 2340

gagattttga gacacaacgt ggctttcccc ccccccccca tgacattaac ctataaaaat 2400

aggcgtatca cgaggcccta ttttaaattc gaaagtactg gacctgttaa cacgccattc 2460

gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg 2520

ccagctggcg aaaggggat gtgctgcaag gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc 2580

ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag tgaattgtaa tacgactcac tatagggcga 2640

attggggatc gatccactag ttctagatcc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat 2700

tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat 2760

atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac 2820

ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc 2880

cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg 2940

tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat 3000

tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 3060

atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt 3120

gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 3180

caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaatgggc 3240

ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc 3300

actgcttact ggcttatcga attgcggcc gggaacggtg cattggaacg cggattcccc 3360

gtgccaagag tgacgtaagt accgcctata gactctatag gcacacccct ttggctctta 3420

tgcatgctat actgtttttg gcttggggcc tatacacccc cgctccttat gctataggtg 3480

atggtatagc ttagcctata ggtgtgggtt attgaccatt attgaccact cccctattgg 3540

tgacgatact ttccattact aatccataac atggctcttt gccacaacta tctctattgg 3600

ctatatgcca atactctgtc cttcagagac tgacacggac tctgtatttt tacaggatgg 3660

ggtcccattt attatttaca aattcacata tacaacaacg ccgtcccccg tgcccgcagt 3720

ttttattaaa catagcgtgg gatctccacg cgaatctcgg gtacgtgttc cggacatggg 3780

ctcttctccg gtagcggcgg agcttccaca tccgagccct ggscccatgc ctccagcggc 3840

tcatggtcgc tcggcagctc cttgctccta acagtggagg ccagacttag gcacagcaca 3900

atgcccacca ccaccagtgt gccgcacaag gccgtggcgg tagggtatgt gtctgaaaat 3960

gagctcggag attgggctcg caccgtgacg cagatggaag acttaaggca gcggcagaag 4020

aagatgcagg cagctgagtt gttgtattct gataagagtc agaggtaact cccgttgcgg 4080

ttctgttaac ggtggagggc agtgtagtct gagcagtact cgttgctgcc gcgcgcgcca 4140

ccagacataa tagctgacag actaacagac tgttcctttc catgggtctt ttctgcagtc 4200

accgtcgtcg acacgtgtga tcagatgact ctctagacca ggcgcctgga tccatatgac 4260

gtcgacgcgt ctgcagaagc ttc 4283

<210> 9
<211> 4655
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> plásmido pORF7

<400> 9
gaattcatgc caaataacaa cggcaagcag cagaagagaa agaaggggga tggccagcca 60

gtcaatcagc tgtgccagat gctgggtaag atcatcgctc agcaaaacca gtccagaggc 120

aagggaccgg gaaagaaaaa taagaagaaa aacccggaga agccccattt tcctctagcg 180

actgaagatg atgtcagaca tcactttacc cctagtgagc ggcaattgtg tctgtcgtca 240

atccagaccg cctttaatca aggcgctggg acttgcaccc tgtcagattc agggaggata 300

agttacactg tggagtttag tttgcctacg catcatactg tgcgcctgat ccgcgtcaca 360

gcatcaccct cagcgtgaga gctcccgggt accatggcat gcatcgatag atctcgagtc 420

tagactagag ctcgctgatc agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt 480

tgcccctccc ccgtgccttc cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa 540

taaaatgagg aaattgcatc gcattgtctg agtaggtgtc attctattct gggggggtggg 600

gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggaaggc 660

ctcggactag tggcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc 720

acaattccac acaacatacg agccgcggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaat 780

gagtgagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc 840

tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggt ttgcgtattg 900

ggcgctcttc cgcttcctcg ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag 960

cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag 1020

gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc 1080

tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc 1140

agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc 1200

tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt 1260

cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg 1320

ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat 1380

ccggtaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag 1440

ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt 1500

ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc 1560

cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaaacc accgctggta 1620

gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag 1680

atcctttgat cttttctacg gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga 1740

ttttggtcat gagctgtcgt tgtgtcgtca agtcagcgta atgctctgcc agtgttacaa 1800

ccaattaacc aattctgatt agaaaaactc atcgagcatc aaatgaaact gcaatttatt 1860

catatcagga ttatcaatac catatttttg aaaaagtcgt ttctgtaatg aaggagaaaa 1920

ctcaccaagg cagttccata ggatggcaag atcctggtat cgatctgcga ttccaactcg 1980

tccaacatca atacaaccta ttaatttccc ctcgtcaaaa ataaggttat caagtgagaa 2040

atcaccatga gtgacgactg aatctggtga gaatggcaaa agtttatgca tttctttcca 2100

gacttgttca acaggccagc cattacgctc gtcatcaaaa tcactcgcat caaccaaacc 2160

attattcatt cgtgattgcg cctgagcgag acgaaatacg cgatcgctgt taaaaggaca 2220

attacaaaca ggaatcgaat gcaaacgtct caggaacact gccagcgcat caacaatatt 2280

ttcacctgaa tcaggatatt cttctaatac ctggaatgct gtttttccag ggatcgcagt 2340

ggtgagtaac catgcatcat caggagtacg tataaaatgc ttgatggtgg gaagaggcat 2400

aaattctgtc agccagttta gtctgaccat ctcatctgta acatcattgg caacgctacc 2460

tttgccatgt ttcagaaaca actctggcgc atctggcttc ccatacaagc gatagattgt 2520

cgcacctgat tgccctacat tatcgcgagc ccatttatac ccatataaat cagcatccat 2580

gttggaattt aatcgtggcc tcgacgtttc ccgttgaata tggctcataa caccccttgt 2640

attactgttt atgtaagcag acagttttat tgttcatgat gatatatttt tatcttgtgc 2700

aatgtaacat cagagatttt gagacacaac gtggctttcc ccccccccc catgacatta 2760

acctataaaa ataggcgtat cacgaggccc tattttaaat tcgaaagtac tggacctgtt 2820

aacacgccat tcgccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc 2880

ttcgctatta cgccagctgg cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac 2940

gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc agtgaattgt aatacgactc 3000

actatagggc gaattgggga tcgatccact agttctagat ccgatgtacg ggccagatat 3060

acgcgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg gtcattagtt 3120

catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga 3180

ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca 3240

atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccacttggca 3300

gtacatcaag tgtatcatat gccaagtacg ccccctattg acgtcaatga cggtaaatgg 3360

cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg gcagtacatc 3420

tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacat caatgggcgt 3480

ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt 3540

ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc cgccccattg 3600

acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc tctctggcta 3660

actagagaac ccactgctta ctggcttatc gaaattgcgg ccgggaacgg tgcattggaa 3720

cgcggattcc ccgtgccaag agtgacgtaa gtaccgccta tagactctat aggcacaccc 3780

ctttggctct tatgcatgct atactgtttt tggcttgggg cctatacacc cccgctcctt 3840

atgctatagg tgatggtata gcttagccta taggtgtggg ttattgacca ttattgacca 3900

ctcccctatt ggtgacgata ctttccatta ctaatccata acatggctct ttgccacaac 3960

tatctctatt ggctatatgc caatactctg tccttcagag actgacacgg actctgtatt 4020

tttacaggat ggggtcccat ttattattta caaattcaca tatacaacaa cgccgtcccc 4080

cgtgcccgca gtttttatta aacatagcgt gggatctcca cgcgaatctc gggtacgtgt 4140

tccggacatg ggctcttctc cggtagcggc ggagcttcca catccgagcc ctggscccat 4200

gcctccagcg gctcatggtc gctcggcagc tccttgctcc taacagtgga ggccagactt 4260

aggcacagca caatgcccac caccaccagt gtgccgcaca aggccgtggc ggtagggtat 4320

gtgtctgaaa atgagctcgg agattgggct cgcaccgtga cgcagatgga agacttaagg 4380

cagcggcaga agaagatgca ggcagctgag ttgttgtatt ctgataagag tcagaggtaa 4440

ctcccgttgc ggttctgtta acggtggagg gcagtgtagt ctgagcagta ctcgttgctg 4500

ccgcgcgcgc caccagacat aatagctgac agactaacag actgttcctt tccatgggtc 4560

ttttctgcag tcaccgtcgt cgacacgtgt gatcagatga ctctctagac caggcgcctg 4620

gatccatatg acgtcgacgc gtctgcagaa gcttc 4655

<210> 10
<211> 4622
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> plásmido pORF7t

<400> 10
gaattcatgc caaataacaa cggcaagcag cagaagagaa agaaggggga tggccagcca 60

gtcaatcagc tgtgccagat gctgggtaag atcatcgctc agcaaaacca gtccagaggc 120

aagggaccgg gaaagaaaaa taagaagaaa aacccggaga agccccattt tcctctagcg 180

actgaagatg atgtcagaca tcactttacc cctagtgagc ggcaattgtg tctgtcgtca 240

atccagaccg cctttaatca aggcgctggg acttgcaccc tgtcagattc agggaggata 300

agttacactg tggagtttag tttgcctacg catcatactg tgtgagagct cccgggtacc 360

atggcatgca tcgatagatc tcgagtctag actagagctc gctgatcagc ctcgactgtg 420

ccttctagtt gccagccatc tgttgtttgc ccctcccccg tgccttcctt gaccctggaa 480

ggtgccactc ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt 540

aggtgtcatt ctattctggg gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa 600
gacaatagca ggcatgctgg ggaaggcctc ggactagtgg cgtaatcatg gtcatagctg 660
tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc cgcggaagca 720
taaagtgtaa agcctggggt gcctaatgag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct 780
cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac 840
gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc 900
tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt 960
tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg 1020
ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg 1080
agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat 1140
accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta 1200
ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct 1260
gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc 1320
ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa 1380
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg 1440
taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggt ggcctaacta cggctacact agaagaacag 1500
tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt 1560
gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta 1620
cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc 1680
agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggtcatgag ctgtcgttgt gtcgtcaagt 1740
cagcgtaatg ctctgccagt gttacaacca attaaccaat tctgattaga aaaactcatc 1800
gagcatcaaa tgaaactgca atttattcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa 1860
aagtcgtttc tgtaatgaag gagaaaactc accaaggcag ttccatagga tggcaagatc 1920
ctggtatcga tctgcgattc caactcgtcc aacatcaata caacctatta atttcccctc 1980
gtcaaaaata aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ctggtgagaa 2040
tggcaaaagt ttatgcattt ctttccagac ttgttcaaca ggccagccat tacgctcgtc 2100
atcaaaatca ctcgcatcaa ccaaaccatt attcattcgt gattgcgcct gagcgagacg 2160
aaatacgcga tcgctgttaa aaggacaatt acaaacagga atcgaatgca aacgtctcag 2220
gaacactgcc agcgcatcaa caatattttc acctgaatca ggatattctt ctaatacctg 2280
gaatgctgtt tttccaggga tcgcagtggt gagtaaccat gcatcatcag gagtacgtat 2340
aaaatgcttg atggtgggaa gaggcataaa ttctgtcagc cagtttagtc tgaccatctc 2400
atctgtaaca tcattggcaa cgctaccttt gccatgtttc agaaacaact ctggcgcatc 2460
tggcttccca tacaagcgat agattgtcgc acctgattgc cctacattat cgcgagccca 2520
tttataccca tataaatcag catccatgtt ggaatttaat cgtggcctcg acgtttcccg 2580

ttgaatatgg ctcataacac cccttgtatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt 2640
tcatgatgat atatttttat cttgtgcaat gtaacatcag agattttgag acacaacgtg 2700
gctttccccc ccccccccat gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac gaggccctat 2760
tttaaattcg aaagtactgg acctgttaac acgccattcg ccattcaggc tgcgcaactg 2820
ttgggaaggg cgatcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga aaggggatg 2880
tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac gttgtaaaac 2940
gacggccagt gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttggggatcg atccactagt 3000
tctagatccg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt gattattgac tagttattaa 3060
tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa 3120
cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata 3180
atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag 3240
tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc 3300
cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta 3360
tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg 3420
cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt 3480
ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca 3540
aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag 3600
gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca ctgcttactg gcttatcgaa 3660
attgcggccg ggaacggtgc attggaacgc ggattccccg tgccaagagt gacgtaagta 3720
ccgcctatag actctatagg cacacccctt tggctcttat gcatgctata ctgttttgg 3780
cttggggcct atacaccccc gctccttatg ctataggtga tggtatagct tagcctatag 3840
gtgtgggtta ttgaccatta ttgaccactc ccctattggt gacgatactt tccattacta 3900
atccataaca tggctctttg ccacaactat ctctattggc tatatgccaa tactctgtcc 3960
ttcagagact gacacggact ctgtattttt acaggatggg gtcccattta ttatttacaa 4020
attcacatat acaacaacgc cgtcccccgt gcccgcagtt tttattaaac atagcgtggg 4080
atctccacgc gaatctcggg tacgtgttcc ggacatgggc tcttctccgg tagcggcgga 4140
gcttccacat ccgagccctg gscccatgcc tccagcggct catggtcgct cggcagctcc 4200
ttgctcctaa cagtggaggc cagacttagg cacagcacaa tgcccaccac caccagtgtg 4260
ccgcacaagg ccgtggcggt agggtatgtg tctgaaaatg agctcggaga ttgggctcgc 4320
accgtgacgc agatggaaga cttaaggcag cggcagaaga agatgcaggc agctgagttg 4380
ttgtattctg ataagagtca gaggtaactc ccgttgcggt tctgttaacg gtggagggca 4440
gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac cagacataat agctgacaga 4500
ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt tctgcagtca ccgtcgtcga cacgtgtgat 4560
cagatgactc tctagaccag gcgcctggat ccatatgacg tcgacgcgtc tgcagaagct 4620

tc 4622

<210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador F de pMASIA

<400> 11
cagtgtagtc tgagcagtac t 21

<210> 12
<211> 4840
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> plásmido pBAD-ORF7

<400> 12
aagaaaccaa ttgtccatat tgcatcagac attgccgtca ctgcgtcttt tactggctct 60

tctcgctaac caaaccggta accccgctta ttaaaagcat tctgtaacaa agcgggacca 120

aagccatgac aaaaacgcgt aacaaaagtg tctataatca cggcagaaaa gtccacattg 180

attatttgca cggcgtcaca ctttgctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg 240

atcctacctg acgcttttta tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg ttttttgggg 300

ctagaaataa ttttgtttaa ctttaagaag gagatataca tacccatggg atctgataaa 360

attattcatc tgactgatga ttcttttgat actgatgtac ttaaggcaga tggtgcaatc 420

ctggttgatt tctgggcaca ctggtgcggt ccgtgcaaaa tgatcgctcc gattctggat 480

gaaatcgctg acgaatatca gggcaaactg accgttgcaa aactgaacat cgatcacaac 540

ccgggcactg cgccgaaata tggcatccgt ggtatcccga ctctgctgct gttcaaaaac 600

ggtgaagtgg cggcaaccaa agtgggtgca ctgtctaaag gtcagttgaa agagttcctc 660

gacgctaacc tggccggctc tggatccggt gatgacgatg acaagctggg aattgatccc 720

ttcaccatgc caaataacaa cggcaagcag cagaagagaa agaaggggga tggccagcca 780

gtcaatcagc tgtgccagat gctgggtaag atcatcgctc agcaaaacca gtccagaggc 840

aagggaccgg gaaagaaaaa taagaagaaa aacccggaga agccccattt tcctctagcg 900

actgaagatg atgtcagaca tcactttacc cctagtgagc ggcaattgtg tctgtcgtca 960

atccagaccg cctttaatca aggcgctggg acttgcaccc tgtcagattc agggaggata 1020

agttacactg tggagtttag tttgcctacg catcatactg tgcgcctgat ccgcgtcaca 1080

gcatcaccct cagcgaaggg cgagctcaag cttgaaggta agcctatccc taaccctctc 1140

ctcggtctcg attctacgcg taccggtcat catcaccatc accattgagt ttaaacggtc 1200

tccagcttgg ctgttttggc ggatgagaga agattttcag cctgatacag attaaatcag 1260

aacgcagaag cggtctgata aaacagaatt tgcctggcgg cagtagcgcg gtggtcccac 1320

ctgaccccat gccgaactca gaagtgaaac gccgtagcgc cgatggtagt gtggggtctc 1380

cccatgcgag agtagggaac tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac 1440

tgggcctttc gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag gacaaatccg 1500

ccgggagcgg atttgaacgt tgcgaagcaa cggcccggag ggtggcgggc aggacgcccg 1560

ccataaactg ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg ccttttgcg 1620

tttctacaaa ctcttttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag 1680

acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca 1740

tttccgtgtc gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcaccc 1800

agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat 1860

cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc 1920

aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtg ttgacgccgg 1980

gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc 2040

agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat 2100

aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga 2160

gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc 2220

ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc 2280

aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt 2340

aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc 2400

tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggtctcgcg gtatcattgc 2460

agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca 2520

ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca 2580

ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt 2640

ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta 2700

acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg 2760

agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc 2820

ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag 2880

cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa 2940

gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaatc ctgttaccag tggctgctgc 3000

cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc 3060

gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta 3120

caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag 3180

aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct 3240

tccagggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga 3300

gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc 3360

ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gcctttgct cacatgttct ttcctgcgtt 3420

atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg 3480

cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcctgatgcg 3540

gtattttctc cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca ctctcagtac 3600

aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gtatacactc cgctatcgct acgtgactgg 3660

gtcatggctg cgccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg 3720

ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg 3780

ttttcaccgt catcaccgaa acgcgcgagg cagcagatca attcgcgcgc gaaggcgaag 3840

cggcatgcat aatgtgcctg tcaaatggac gaagcaggga ttctgcaaac cctatgctac 3900

tccgtcaagc cgtcaattgt ctgattcgtt accaattatg acaacttgac ggctacatca 3960

ttcacttttt cttcacaacc ggcacggaac tcgctcgggc tggccccggt gcattttta 4020

aatacccgcg agaaatagag ttgatcgtca aaaccaacat tgcgaccgac ggtggcgata 4080

ggcatccggg tggtgctcaa aagcagcttc gcctggctga tacgttggtc ctcgcgccag 4140

cttaagacgc taatccctaa ctgctggcgg aaaagatgtg acagacgcga cggcgacaag 4200

caaacatgct gtgcgacgct ggcgatatca aaattgctgt ctgccaggtg atcgctgatg 4260

tactgacaag cctcgcgtac ccgattatcc atcggtggat ggagcgactc gttaatcgct 4320

tccatgcgcc gcagtaacaa ttgctcaagc agatttatcg ccagcagctc cgaatagcgc 4380

ccttcccctt gcccggcgtt aatgatttgc ccaaacaggt cgctgaaatg cggctggtgc 4440

gcttcatccg ggcgaaagaa ccccgtattg gcaaatattg acggccagtt aagccattca 4500

tgccagtagg cgcgcggacg aaagtaaacc cactggtgat accattcgcg agcctccgga 4560

tgacgaccgt agtgatgaat ctctcctggc gggaacagca aaatatcacc cggtcggcaa 4620

acaaattctc gtccctgatt tttcaccacc ccctgaccgc gaatggtgag attgagaata 4680

taacctttca ttcccagcgg tcggtcgata aaaaaatcga gataaccgtt ggcctcaatc 4740

ggcgttaaac ccgccaccag atgggcatta aacgagtatc ccggcagcag gggatcattt 4800

tgcgcttcag ccatactttt catactcccg ccattcagag 4840

<210> 13
<211> 15412
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> O1NP1-PRRSV – Número de acceso de Genbank Q056373 – ilustrado en FIG. 2

<400> 13
atgacgtata ggtgttggct ctatgccttg gcatttgtat tgtcgggagc tgtgaccatt 60

ggcacagccc aaaacttgct gcacagaaac acccttctgt gatagcctcc ttcaggggag 120

cttagggttt gtccctagca ccttgcttcc ggagttgcac tgctttacgg tctctccacc 180

cctttaacca tgtctgggat acttgatcgg tgcacgtgta cccccaatgc cagggtgttt 240

atggcggagg gccaagtcta ctgcacacga tgcctcagtg cacggtctct ccttcccctg 300

aacctccaag tttctgagct cggggtgcta ggcctattct acaggcccga agagccactc 360

cggtggacgt tgccacgtgc attccccact gttgagtgct ccccgccgg ggcctgctgg 420

ctttctgcaa tctttccaat cgcacgaatg accagtggaa acctgaactt ccaacaaaga 480

atggtacggg tcgcagctga gctttacaga gccggccagc tcacccctgc agtcttgaag 540

gctctacaag tttatgaacg gggttgccgc tggtacccca ttgttggacc tgtccctgga 600

gtggccgttt tcgccaattc cctacatgtg agtgataaac ctttcccggg agcaactcac 660

gtgttgacca acctgccgct cccgcagaga cccaagcctg aagacttttg ccccttgag 720

tgtgctatgg ctactgtcta tgacattggt catgacgccg tcatgtatgt ggccgaaagg 780

aaaatctcct gggcccctcg tggcggggat gaagtgaaat ttgaagctgt ccccggggag 840

ttgaagttga ttgcgaaccg gctccgcacc tccttcccgc cccaccacac agtggacatg 900

tctaagttcg ccttcacagc ccctgggtgt ggtgtttcta tgcgggtcga acgccaacac 960

ggctgccttc ccgctgacac tgtccctgaa ggcaactgct ggtggagctt gtttgacttg 1020

cttccactgg aagttcagaa caaagaaatt cgccatgcta accaatttgg ctaccagacc 1080

aagcatggtg tctctggcaa gtacctacag cggaggctgc aagttaatgg tctccgagca 1140

gtaactgacc taaacggacc tatcgtcgta cagtacttct tcgttaagga gagttggatc 1200

cgccatttga aactggcggg agaacccagc tactctgggt ttgaggacct cctcagaata 1260

agggttgagc ctaacacgtc gccattggct gacaaggaag aaaaaatttt ccggtttggc 1320

agtcacaagt ggtacggcgc tggaaagaga gcaagaaaag cacgctcttg tgcgactgct 1380

acagtcgctg gccgcgcttt gtccgttcgt gaaacccggc aggccaagga gcacgaggtt 1440

gccggcgcca acaaggctga gcacctcaaa cactactccc cgcctgccga agggaattgt 1500

ggttggcact gcatttccgc catcgccaac cggatggtga attccaaatt tgaaaccacc 1560

cttcccgaaa gagtgagacc tccagatgac tgggctactg acgaggatct tgtgaatgcc 1620

atccaaatcc tcagactccc tgcggcctta gacaggaacg gtgcttgtac tagcgccaag 1680

tacgtactta agctggaagg tgagcattgg actgtcactg tgacccctgg gatgtcccct 1740

tctttgctcc ctcttgaatg tgttcagggc tgttgtgggc acaagggcgg tcttggttcc 1800

ccagatgcag tcgaggtctc cggatttgac cctgcctgcc ttgaccggct ggctgaggtg 1860

atgcacctgc ctagcagtgc tatcccagcc gctctggccg aaatgtctgg cgattccgat 1920

cgttcggctt ctccggtcac caccgtgtgg actgtttcgc agttctttgc ccgtcacagc 1980

ggagggaatc accctgacca agtgcgctta gggaaaatta tcagcctttg tcaggtgatt 2040

gaggactgct gctgttccca gaacaaaacc aaccgggtca ccccggagga ggtcgcagca 2100

aagattgacc tgtacctccg tggtgcaaca aatcttgaag aatgcttggc caggcttgag 2160

aaagcgcgcc cgccacgcgt aatcgacacc ttctttgatt gggatgttgt gctccctggg 2220

gttgaggcgg caacccagac gatcaagctg ccccaggtca accagtgtcg tgctctggtc 2280

cctgttgtga ctcaaaagtc cttggacaac aactcggtcc ccctgaccgc cttttcactg 2340

gctaactact actaccgtgc gcaaggtgac gaagttcgtc accgtgaaag actaaccgcc 2400

gtgctctcca agttggaaaa ggttgttcga gaagaatatg ggctcatgcc aaccgagcct 2460

ggtccacggc ccacactgcc acgcgggctc gacgaactca aagcccagat ggaggaggac 2520

ttgctgaaac tggctaacgc ccagacgact tcggacatga tggcctgggc agtcgagcag 2580

gttgacctaa aaacttgggt caagaactac ccgcggtgga caccaccacc ccctccgcca 2640

aaagttcagc ctcgaaaaac gaagcctgtc aagagcttgc cggagagaaa gcctgtcccc 2700

gccccgcgca ggaaggttgg gtccgattgt ggcagcccgg tttcattagg cggcgatgtc 2760

cctaacagtt gggaagattt ggctgttagt agccccttg atctcccgac cccacctgag 2820

ccggcaacac cttcaagtga gctggtgatt gtgtcctcac cgcaatgcat cttcaggccg 2880

gcgacaccct tgagtgagcc ggctccaatt cccgcacctc gcggaactgt gtctcgaccg 2940

gtgacaccct tgagtgagcc gatccctgtg cccgcaccgc ggcgtaagtt tcagcaggtg 3000

aaaagattga gttcggcggc ggcaatccca ccgtaccaga acgagcccct ggatttgtct 3060

gcttcctcac agactgaata tgaggcctct cccccagcac cgccgcagag cgggggcgtt 3120

ctgggagtag aggggcatga agctgaggaa accctgagtg aaatctcgga catgtcgggt 3180

aacattaaac ctgcgtccgt gtcatcaagc agctccttgt ccagcgtgag aatcacacgc 3240

ccaaaatact cagctcaagc catcatcgac tcgggcgggc cctgcagtgg gcatctccaa 3300

gaggtaaagg aaacatgcct tagtgtcatg cgcgaggcat gtgatgcgac taagcttgat 3360

gaccctgcta cgcaggaatg gctttctcgc atgtgggatc gggtggacat gctgacttgg 3420

cgcaacacgt ctgtttacca ggcgatttgc accttagatg gcaggttaaa gttcctccca 3480

aaaatgatac tcgagacacc gccgccctat ccgtgtgagt ttgtgatgat gcctcacacg 3540

cctgcacctt ccgtaggtgc ggagagcgac cttaccattg gctcagttgc tactgaagat 3600

gttccacgca tcctcgagaa aatagaaaat gtcggcgaga tggccaacca gggacccttg 3660

gccttctccg aggataaacc ggtagatgac caacttgtca acgacccccg gatatcgtcg 3720

cggaggcctg acgagagcac atcagctccg tccgcaggca caggtggcgc cggctctttt 3780

accgatttgc cgccttcaga tggcgcggat gcggacgggg gggggccgtt tcggacggta 3840

aaaagaaaag ctgaaaggct ctttgaccaa ctgagccgtc aggtttttga cctcgtctcc 3900

catctccctg ttttcttctc acgccttttc taccctggcg gtggttattc tccgggtgat 3960

tggggttttg cagcttttac tctattgtgc ctctttttat gttacagtta cccagccttt 4020

ggtattgctc ccctcttggg tgtgttttct gggtcttctc ggcgcgttcg aatgggggtt 4080

tttggctgct ggttggcttt tgctgttggt ctgttcaagc ctgtgtccga cccagtcggc 4140

gctgcttgtg agtttgactc gccagagtgt agaaacatcc ttcattcttt tgagcttctc 4200

aaaccttggg accctgttcg cagccttgtt gtgggccccg tcggtctcgg tcttgccatt 4260

cttggcaggt tactgggcgg ggcacgctgc atctggcact ttttgcttag gcttggcatt 4320

gttgcagact gtatcttggc tggagcttac gtgctttctc aaggtaggtg taaaaagtgc 4380

tggggatctt gtataagaac tgctcctaat gaggtcgctt ttaacgtgtt tcctttcaca 4440

cgtgcgacca ggtcgtcact tatcgacctg tgcgatcggt tttgtgcgcc aaaaggaatg 4500

gaccccattt ttctcgccac tgggtggcgc gggtgctggg ccggccgaag ccccattgag 4560

caaccctctg aaaaacccat cgcgtttgcc caattggatg aaaagaagat tacggctagg 4620

actgtggtcg cccagcctta tgaccccaac caagccgtaa agtgcttgcg ggtattgcag 4680

gcgggtgggg cgatggtggc taaggcggtc ccaaaagtgg tcaaggtttc cgctgttcca 4740

ttccgagccc ccttctttcc cactggagtg aaagttgacc ctgattgcag ggtcgtggtt 4800

gaccctgaca ctttcactgc agctctccgg tctggctact ccaccacaaa cctcgtcctt 4860

ggtgtagggg actttgccca gctgaatgga ttaaaaatca ggcaaatttc caagccttca 4920

gggggaggcc cacatctcat ggctgccctg catgttgcct gctcgatggc tctgcacatg 4980

cttgctggga tttatgtgac tgcggtgggt tcttgcggca ccggcaccaa cgacccgtgg 5040

tgcgctaacc cgtttgccgt ccctggctac ggacctggct ctctctgcac gtccagattg 5100

tgcatttacc aacacggcct taccctgccc ttgacagcac ttgtggcggg attcggtatt 5160

caagaaattg ccttggtcgt tttgattttt gtttccatcg gaggcatggc tcataggttg 5220

agctgtaagg ctgacatgct gtgtgttttg cttgcaattg ccagctatgt ttgggtacct 5280

cttacctggt tgctttgtgt gtttccttgc tggttgcgct gtttttcttt gcacccctc 5340

accatcctat ggttggtgtt tttcttgatt tctgtgaata tgccttcagg aatcttggcc 5400

atggtgttgt tggtttctct ttggcttctt ggtcgttata ctaatgttgc tggccttgtc 5460

acccctacg acattcatca ttacaccagt ggcccccgcg gtgttgccgc cttggctacc 5520

gcaccagatg ggacctactt ggccgctgtc cgccgcgctg cgttgactgg ccgcaccatg 5580

ctgtttaccc cgtcccagct tgggtctctt cttgagggtg ctttcagaac tcgaaagccc 5640

tcactgaaca ccgtcaatgt gatcgggtcc tccatgggct ctggcggggt gtttaccatc 5700

gacgggaaag tcaagtgcgt aactgccgca catgtcctta cgggcaattc agctcgggtt 5760

tccggggtcg gcttcaatca aatgcttgac tttgacgtaa agggagattt cgctatagct 5820

gattgcccga attggcaagg ggctgccccc aagacccaat tctgcacgga tggatggact 5880

ggccgtgcct attggctaac atcctctggc gtcgaacccg gcgtcattgg aaaaggattc 5940

gccttctgct tcaccgcatg tggcgattcc gggtccccag tgatcaccga ggccggtgag 6000

cttgtcggcg ttcacacggg atcgaataaa caaggggggg gcattgttac gcgcccctca 6060

ggccagtttt gtaatgtggc acccatcaag ctaagcgaat taagtgaatt ctttgctggg 6120

cctaaggtcc cgctcggtga tgtgaaggtc ggcagccaca taattaaaga cataagcgag 6180

gtgccttcag atctttgtgc cttgcttgct gccaaacctg aactggaagg aggcctctcc 6240

accgtccaac ttctttgtgt gtttttttctc ctgtggagaa tgatgggaca tgcctggacg 6300

cccttggttg ctgtgagttt ctttattttg aatgaggttc tcccagccgt cctggtccgg 6360

agtgttttct cctttggaat gtttgtgctc tcctggctca cgccatggtc tgcgcaagtt 6420
ctgatgatca ggcttctaac agcagctctt aacaggaaca gatggtcact tgccttttc 6480
agcctcggtg cagtgaccgg ttttgtcgca gatcttgcgg ccactcaggg gcatccgttg 6540
caggcagtga tgaatttgag cacctatgca ttcctgcctc ggatgatggt tgtgacctca 6600
ccagtcccag tgatcacgtg tggtgtcgtg cacctacttg ccatcatttt gtacttgttt 6660
aagtaccgtg gcctgcacca tatccttgtt ggcgatggag tgttctctgc ggctttcttc 6720
ttgagatact ttgccgaggg aaagttgagg gaaggggtgt cgcaatcctg cggaatgaat 6780
catgagtctc tgactggtgc cctcgctatg agactcaatg acgaggactt ggatttcctt 6840
atgaaatgga ctgattttaa gtgctttgtt tctgcgtcca acatgaggaa tgcagcgggt 6900
caatttatcg aggctgccta tgctaaagca cttagagtag aactggccca gttggtgcag 6960
gttgataaag ttcgaggtac tttggccaaa cttgaagctt ttgctgatac cgtggcacct 7020
caactctcgc ccggtgacat tgttgtcgct ctccgccaca cgcctgtggg cagtatcttc 7080
gacctaaagg ttggtatcac caagcatacc ctccaagcca ttgagaccag agtccttgct 7140
gggtccaaaa tgaccgtggc gcgcgtcgtc gacccgaccc ccacgccccc acccgcaccc 7200
gtgcccatcc ccctcccacc gaaagttctg gagaatggcc ccaacgcttg gggggatgag 7260
gaccgtttga ataagaagaa gaggcgcagg atggaagccc tcggcatcta tgttatgggc 7320
gggaaaaagt accagaaatt ttgggacaag aattccggtg atgtgtttta tgaggaggtc 7380
cataataaca cagatgagtg ggagtgtctc agagttggcg accctgccga ctttgaccct 7440
gagaagggaa ctctgtgtgg acatgtcacc attgaaaaca aggcttacca tgtttacacc 7500
tccccatctg gtaagaagtt cttggtcccc gtcaacccag agaatggaag agttcaatgg 7560
gaagctgcaa agctttccgt ggagcaggcc ctaggtatga tgaatgtcga cggcgaactg 7620
actgccaaag aactggagaa actgaaaaga ataattgaca aactccaggg cctgactaag 7680
gagcagtgtt taaactgcta gccgccagcg acttgacccg ctgtggtcgc ggcggcttgg 7740
ttgttactga aacagcggta aaaatagtca aatttcacaa ccggaccttc accctgggac 7800
ctgtgaattt aaaagtggcc agtgaggttg agctaaaaga cgcggttgag cacaaccaac 7860
acccggttgc gagaccgatc gatggtggag ttgtgctcct gcgttccgcg gttccttcgc 7920
ttatagacgt cttgatctcc ggtgctgatg catctcccaa gttacttgcc catcacgggc 7980
cgggaaacac tgggatcgat ggcacgctct gggattttga gtccgaagcc actaaagagg 8040
aagtcgcact cagtgcgcaa ataatacagg cttgtgacat taggcgcggc gacgctcctg 8100
aaattggtct cccttacaag ctgcaccctg ttaggggtaa ccctgagcgg gtgaaaggag 8160
ttctgcagaa tacaaggttt ggagacatac cttacaaaac ccccagtgac actggaagcc 8220
cagtgcacgc ggctgcctgc cttacgccca acgccactcc ggtgactgat gggcgctccg 8280
tcttggccac gaccatgccc cccgggtttg agttatatgt accgaccata ccagcgtctg 8340
tccttgatta ccttgactct aggcctgact gccctaaact gctgacagag cacggctgca 8400

aagatgccgc actgaaagac ctctctaaat atgacttgtc cacccaaggc tttgttttac 8460

ctggagttct tcgccttgtg cggaaatacc tgtttgccca tgtaggtaag tgcccacccg 8520

ttcatcggcc ttctacttac cctgctaaga attctatggc tggaataaat gggaacaggt 8580

tcccaaccaa ggacattcag agcgtccctg aaatcgacgt tctgtgcgca caggctgtgc 8640

gagaaaactg gcaaactgtc acccccttgta ctcttaagaa acagtattgc gggaagaaga 8700

agactaggac catactcggc accaataact tcatcgcact agcccaccga gcagtgttga 8760

gtggtgttac ccagggcttc atgaaaaagg cgtttaactc gcccatcgcc ctcggaaaga 8820

acaagtttaa ggagctacag actccggtcc tgggcaggtg ccttgaagct gatctcgcat 8880

cctgcgatcg atccacgcct gcaattgtcc gctggtttgc cgccaacctt ctttatgaac 8940

ttgcctgtgc tgaagagcat ctaccgtcgt acgtgctgaa ctgctgccac gacttactgg 9000

tcacgcagtc cggcgcagtg actaagagag gtggcctgtc gtctggcgac ccgatcacct 9060

ctgtgtctaa caccatttat agtttggtga tctatgcaca gcatatggtg cttagttact 9120

tcaaaagtgg tcacccccat ggccttctgt tcttacaaga ccagctaaag tttgaggaca 9180

tgctcaaggt tcaacccctg atcgtctatt cggacgacct cgtgctgtat gccgagtctc 9240

ccaccatgcc aaactatcac tggtgggttg aacatctgaa tttgatgctg gggtttcaga 9300

cggacccaaa gaagacagca ataacagact cgccatcatt tctaggctgt agaataataa 9360

atgggcgcca gctagtcccc aaccgtgaca ggatcctcgc ggccctcgcc tatcacatga 9420

aggcgagtaa tgtttctgaa tactatgcct cagcggctgc aatactcatg gacagctgtg 9480

cttgtttgga gtatgatcct gaatggtttg aagaacttgt agttggaata gcgcagtgcg 9540

cccgcaagga cggctacagc tttcccggca cgccgttctt catgtccatg tgggaaaaac 9600

tcaggtccaa ttatgagggg aagaagtcga gagtgtgcgg gtactgcggg gccccggccc 9660

cgtacgctac tgcctgtggc ctcgacgtct gcatttacca cacccacttc caccagcatt 9720

gtccagtcac aatctggtgt ggccatccag cgggttctgg ttcttgtagt gagtgcaaat 9780

cccctgtagg gaaaggcaca agccctttag acgaggtgct ggaacaagtc ccgtataagc 9840

ccccacggac cgttatcatg catgtggagc agggtctcac ccccccttgat ccaggtagat 9900

accaaactcg ccgcggatta gtctctgtca ggcgtggaat taggggaaat gaagttgaac 9960

taccagacgg tgattatgct agcaccgcct tgctccctac ctgcaaagag atcaacatgg 10020

tcgctgtcgc ttccaatgta ttgcgcagca ggttcatcat cggcccaccc ggtgctggga 10080

aaacatactg gctccttcaa caggtccagg atggtgatgt tatttacaca ccaactcacc 10140

agaccatgct tgacatgatt agggctttgg ggacgtgccg gttcaacgtc ccggcaggca 10200

caacgctgca attccccgtc ccctcccgca ccggtccgtg ggttcgcatc ctagccggcg 10260

gttggtgtcc tggcaagaat tccttcctag atgaagcagc gtattgcaat caccttgatg 10320

ttttgaggct tcttagtaaa actaccctca cctgtctagg agacttcaag caactccacc 10380

cagtgggttt tgattctcat tgctatgttt ttgacatcat gcctcaaact caactgaaga 10440

ccatctggag gtttggacag aatatctgtg atgccattca gccagattac agggacaaac 10500
tcatgtccat ggtcaacaca acccgtgtga cccacgtgga aaaacctgtc aggtatgggc 10560
aggtcctcac cccctaccac agggaccgag aggacgacgc catcactatt gactccagtc 10620
aaggcgccac attcgatgtg gttacattgc atttgcccac taaagattca ctcaacaggc 10680
aaagagccct tgttgccatc accagggcaa gacacgctat ctttgtgtat gacccacaca 10740
ggcagctgca gggcttgttt gatcttcctg caaaaggcac acccgtcaac ctcgcagtgc 10800
accgcgacgg gcagctgatc gtgctggata gaaataacaa agaatgcacg gttgctcagg 10860
ctctaggcaa cggggataaa tttagggcca cagataagcg tgttgtagat tctctccgcg 10920
ccatttgtgc tgatctagaa gggtcgagct ctccgctccc caaggtcgca cacaacttgg 10980
gattttattt ctcacctgat ttaacacagt ttgctaaact cccagtagaa cttgcacctc 11040
actggcccgt ggtgacaacc cagaacaatg aaaagtggcc agatcggctg gttgccagcc 11100
ttcgccctat ccataaatac agccgcgcgt gcatcggtgc cggctatatg gtgggccctt 11160
cggtgtttct aggcactcct ggggtcgtgt catactatct cacaaaattt gttaagggcg 11220
aggctcaatt gcttccggag acggttttca gcaccggccg aattgaggta gactgccggg 11280
aatatcttga tgatcgggag cgagaagttg ctgcgtccct cccacacgct ttcattggcg 11340
acgtcaaagg cactaccgtt ggaggatgtc atcatgtcac ctccagatac ctcccgcgcg 11400
tccttcccaa ggaatcagtt gcggtagtcg gggtttcaag ccccggaaaa gccgcgaaag 11460
cattgtgcac actgacagat gtgtacctcc cagatcttga agcctatctc cacccggaga 11520
cccagtccaa gtgctggaaa atgatgttgg acttcaaaga agttcgacta atggtctgga 11580
aagacaaaac agcctatttc caacttgaag gtcgctattt cacctggtat cagcttgcca 11640
gctatgcctc gtacatccgt gttcctgtca actctacggt gtacttggac ccctgcatgg 11700
gccccgccct ttgcaacagg agagtcgtcg ggtccaccca ctgggggct gacctcgcgg 11760
tcacccctta tgattacggc gctaaaatta tcctgtctag cgcgtaccat ggtgaaatgc 11820
cccccggata caaaattctg gcgtgcgcgg agttctcgtt ggatgaccca gttaagtaca 11880
aacatacctg ggggtttgaa tcggatacag cgtatctgta tgagttcacc gggaacggtg 11940
aggactggga ggattacaat gatgcgtttc gtgcgcgcca ggaagggaaa atttacaagg 12000
ccactgccac cagcttgaag ttttattttc ccccgggccc tgtcattgaa ccaactttag 12060
gcctgaattg aaatgaaatg gggtccatgc aaagcctttt ttacaaaatt ggccaacttt 12120
ttgtggatgc tttcacggag ttcttggtgt ccattgttga tatcattata tttttggcca 12180
ttttgtttgg cttcaccatc gccggttggc tggtggtctt ttgcatcaga ttggtttgct 12240
ccgcgatact ccgtacgcgc tctgccattc actctgagca attacagaag atcttatgag 12300
gcctttcttt cccagtgcca agtggacatt cccacctggg gaactaaaca tcctttgggg 12360
atgctttggc accataaggt gtcaaccctg attgatgaaa tggtgtcgcg tcgaatgtac 12420
cgcatcatgg aaaaagcagg gcaggctgcc tggaaacagg tggtgagcga ggctacgctg 12480

tctcgcatta gtagtttgga tgtggtggct cattttcagc atctagccgc cattgaagcc 12540
gagacctgta aatatttggc ctcccggctg cccatgctac acaacctgcg catgacaggt 12600
tcaaatgtaa ccatagtgta taatagcact ttgaatcagg tgtttgctat ttttccaacc 12660
cctggttccc ggccaaagct tcatgatttt cagcaatggt taatagctgt acattcctcc 12720
atattttcct ctgttgcagc ttcttgtact ctttttgttg tgctgtggtt gcgggttcca 12780
atactacgta ctgtttttgg tttccgctgg ttaggggcaa tttttctttc gaactcacag 12840
tgaattacac ggtgtgtcca ccttgcctca cccggcaagc agccacagag atctacgaac 12900
ccggtaggtc tctttggtgc aggatagggt atgaccgatg tgaggaggat gatcatgacg 12960
agctagggtt tatggtaccg cctggcctct ccagcgaagg ccacttgact agtgtttacg 13020
cctggttggc gttcttgtcc ttcagctaca cggcccagtt ccatcccgag atattcggga 13080
tagggaatgt gagtcgagtt tatgttgaca tcaaacatca actcatctgc gccgaacatg 13140
acgggcagaa caccaccttg cctcgtcatg acaacatttc agccgtgttt cagacctatt 13200
accaacatca agtcgacggc ggcaattggt ttcacctaga atggcttcgt cccttctttt 13260
cctcgtggtt ggttttaaat gtctcttggt ttctcaggcg ttcgcctgca aaccatgttt 13320
cagttcgagt cttgcagata ttaagaccaa caccaccgca gcggcaggct ttgctgtcct 13380
ccaagacatc agttgcctta ggcatcgcga ctcggcctct gaggcgattc gcaaaatccc 13440
tcagtgccgt acggcgatag ggacacccgt gtatgttacc atcacagcca atgtgacaga 13500
tgagaattat ttacattctt ctgatctcct catgctttct tcttgccttt tctatgcttc 13560
tgagatgagt gaaaagggat ttaaggtggt atttggcaat gtgtcaggca tcgtggctgt 13620
gtgtgtcaat tttaccagct acgtccaaca tgtcaaggag tttacccaac gctccctggt 13680
ggtcgaccat gtgcggttgc tccatttcat gacacctgag accatgaggt gggcaactgt 13740
tttagcctgt ctttttgcca ttctgttggc aatttgaatg tttaagtatg ttggagaaat 13800
gcttgaccgc gggctgttgc tcgcaattgc tttctttgtg gtgtatcgtg ccgttctgtt 13860
ttgctgtgct cgccaacgcc agcaacgaca gcagctccca tctacagctg atttacaact 13920
tgacgctatg tgagctgaat ggcacagact ggctagctaa caaatttgat tgggcagtgg 13980
agagttttgt catctttccc gttttgactc acattgtctc ctatggtgcc ctcactacca 14040
gccatttcct tgacacagtc gctttagtca ctgtgtctac cgccgggttt gttcacgggc 14100
ggtatgtcct aagtagcatc tacgcggtct gtgccctggc tgcgttgact tgcttcgtca 14160
ttaggtttgc aaagaattgc atgtcctggc gctacgcgtg taccagatat accaactttc 14220
ttctggacac taagggcgga ctctatcgtt ggcggtcgcc tgtcatcata gagaaaaggg 14280
gcaaagttga ggtcgaaggt catctgatcg acctcaaaag agttgtgctt gatggttccg 14340
tggcaacccc tataaccaga gtttcagcgg aacaatgggg tcgtccttag atgacttctg 14400
tcatgatagc acggctccag aaaaggtgct tttggcgttt tctattacct acacgccagt 14460
gatgatatat gccctaaagg tgagtcgcgg ccgactgcta gggcttctgc acctttgat 14520

cttcctgaat tgtgcttkca ccttcgggta catgactttc gcgcactttc agagtacaaa 14580

taaggtcgcg ctcactatgg gagcagtagt tgcactcctt tggkgggtgt actcagccat 14640

agaaacctgg aaattcatca cctccagatg ccgtttgtgc ttgctaggcc gcaagtacat 14700

tctggcccct gcccaccacg ttgaaagtgc cgcagggttt catccgattg cggcaaatga 14760

taaccacgca tttgtcgtcc ggcgtcccgg ctccactacg gtcaacggca cattggtgcc 14820

cgggttaaaa agcctcgtgt tgggtggcag aaaagctgtt aaacagggag tggtaaacct 14880

tgtcaaatat gccaaataac aacggcaagc agcagaagag aaagaagggg gatggccagc 14940

cagtcaatca gctgtgccag atgctgggta agatcatcgc tcagcaaaac cagtccagag 15000

gcaagggacc gggaaagaaa aataagaaga aaaacccgga gaagccccat tttcctctag 15060

cgactgaaga tgatgtcaga catcacttta cccctagtga gcggcaattg tgtctgtcgt 15120

caatccagac cgcctttaat caaggcgctg ggacttgcac cctgtcagat tcagggagga 15180

taagttacac tgtggagttt agtttgccta cgcatcatac tgtgcgcctg atccgcgtca 15240

cagcatcacc ctcagcatga tgggctggca ttcttgaggc atctcagtgt atgaattgga 15300

agaatgtatg gtgaatggca ctgattgaca ttgtgcctct aagtcaccta ttcaattagg 15360

gcgaccgtgt gggggtgaga tttaattggc gagaaccatg cggccgaaat ta 15412

<210> 14
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> US pMA C2

<400> 14

Met Pro Asn Asn Asn Gly Lys Gln Gln Lys Arg Lys Lys Gly Asp Gly
1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu Gly Lys Ile Ile Ala Gln
20 25 30

Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys
35 40 45

Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg
50 55 60

His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln
65 70 75 80

Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly
85 90 95

Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val
100 105 110

Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Ser Pro Ser Ala
115 120

<210> 15
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ORF7-pBAD

<400> 15

Met Pro Asn Asn Asn Gly Lys Gln Gln Lys Arg Lys Lys Gly Asp Gly
1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu Gly Lys Ile Ile Ala Gln
20 25 30

Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys
35 40 45

Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg
50 55 60

His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln
65 70 75 80

Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly
85 90 95

Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val
100 105 110

Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Ser Pro Ser Ala
115 120

<210> 16
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 01NP1.2

<400> 16

Met Pro Asn Asn Asn Gly Lys Gln Gln Lys Arg Lys Lys Gly Asp Gly
1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu Gly Lys Ile Ile Ala Gln
20 25 30

Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys
35 40 45

Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg
50 55 60

His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln
65 70 75 80

Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly
85 90 95

Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val
100 105 110

Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Ser Pro Ser Ala
115 120

<210> 17
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 01NP1

<400> 17

Met Pro Asn Asn Asn Gly Lys Gln Gln Lys Arg Lys Lys Gly Asp Gly
1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu Gly Lys Ile Ile Ala Gln
20 25 30

Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys
35 40 45

Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg
50 55 60

His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln
65 70 75 80

Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly
85 90 95

Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val
100 105 110

Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Ser Pro Ser Ala
115 120

<210> 18
<211> 3463
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pQE31

<400> 18
ctcgagaaat cataaaaaat ttatttgctt tgtgagcgga taacaattat aatagattca 60

attgtgagcg gataacaatt tcacacagaa ttcattaaag aggagaaatt aactatgaga 120

ggatctcacc atcaccatca ccatacggat ccgcatgcga gctcggtacc ccgggtcgac 180

ctgcagccaa gcttaattag ctgagcttgg actcctgttg atagatccag taatgacctc 240

agaactccat ctggatttgt tcagaacgct cggttgccgc cgggcgtttt ttattggtga 300

gaatccaagc tagcttggcg agattttcag gagctaagga agctaaaatg gagaaaaaaa 360

tcactggata taccaccgtt gatatatccc aatggcatcg taaagaacat tttgaggcat 420

ttcagtcagt tgctcaatgt acctataacc agaccgttca gctggatatt acggcctttt 480

taaagaccgt aaagaaaaat aagcacaagt tttatccggc ctttattcac attcttgccc 540

gcctgatgaa tgctcatccg gaatttcgta tggcaatgaa agacggtgag ctggtgatat 600

gggatagtgt tcacccttgt tacaccgttt tccatgagca aactgaaacg ttttcatcgc 660

tctggagtga ataccacgac gatttccggc agtttctaca catatattcg caagatgtgg 720

cgtgttacgg tgaaaacctg gcctatttcc ctaaagggtt tattgagaat atgtttttcg 780

tctcagccaa tccctgggtg agtttcacca gttttgattt aaacgtggcc aatatggaca 840

acttcttcgc ccccgttttc accatgggca aatattatac gcaaggcgac aaggtgctga 900

tgccgctggc gattcaggtt catcatgccg tttgtgatgg cttccatgtc ggcagaatgc 960

ttaatgaatt acaacagtac tgcgatgagt ggcagggcgg ggcgtaattt ttttaaggca 1020

gttattggtg cccttaaacg cctggggtaa tgactctcta gcttgaggca tcaaataaaa 1080

cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt cgttttatct gttgtttgtc ggtgaacgct 1140

ctcctgagta ggacaaatcc gccctctaga gctgcctcgc gcgtttcggt gatgacggtg 1200

aaaacctctg acacatgcag ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg 1260

ggagcagaca agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggcgcagcca 1320

tgacccagtc acgtagcgat agcggagtgt atactggctt aactatgcgg catcagagca 1380

gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa 1440

ataccgcatc aggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg 1500

gctgcggcga gcggtatcag ctcactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg 1560

ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 1620

ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgcccccct gacgagcatc acaaaaatcg 1680

acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc 1740

tggaagctcc ctcgtgcgct ctcctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc 1800

ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc 1860

ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa ccccccgttc agcccgaccg 1920

ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc 1980

actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 2040

gttcttgaag tggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc 2100

tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac 2160

caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg 2220

atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc 2280

acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa 2340

ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtta 2400

ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt 2460

tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 2520

tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca 2580

gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc 2640

tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt 2700

tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag 2760

ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatccccc atgttgtgca aaaaagcggt 2820

tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat 2880

ggttatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt 2940

gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc 3000

ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgctcat 3060

cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 3120

ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 3180

ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg 3240

gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 3300

ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc 3360

gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt 3420

aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctt cac 3463

REIVINDICACIONES

1. Composición inmunológica que comprende un vector, en la que dicho vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína ORF7 truncada del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (VSRRP) que consiste en la SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos un 85% de homología con la misma, para usar en un procedimiento para provocar en un animal una respuesta inmunitaria segura y protectora contra VSRRP, comprendiendo el procedimiento por administrar vía transdérmica una cantidad eficaz de la composición usando un inyector sin aguja a chorro de líquido.

2. Composición para usar, según la reivindicación 1, en la que la proteína ORF7 está codificada por una secuencia que tiene al menos un 70% de homología con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3.

3. Composición para usar, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además un adyuvante y un portador farmacéutica o veterinariamente adecuado.

4. Composición para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el inyector sin aguja a chorro de líquido se selecciona entre el dispositivo DERMAVAC® y otros inyectores sin aguja.

5. Composición para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el vector es un plásmido.

6. Composición para usar, según la reivindicación 5, en la que el plásmido es un plásmido de ADN, en particular, el plásmido de la SEQ ID NO: 8.

7. Composición para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el animal es de la familia de los suidos.

8. Composición para usar, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicha composición se formula para la administración como una sola dosis a animales porcinos.

9. Composición para usar, según la reivindicación 8, que comprende además un adyuvante, que es TS6.

10. Composición para usar, según la reivindicación 8 o 9, en la que el animal porcino es un lechón destetado de aproximadamente 11 a aproximadamente 24 días de edad.

Figura 1 (1/2)

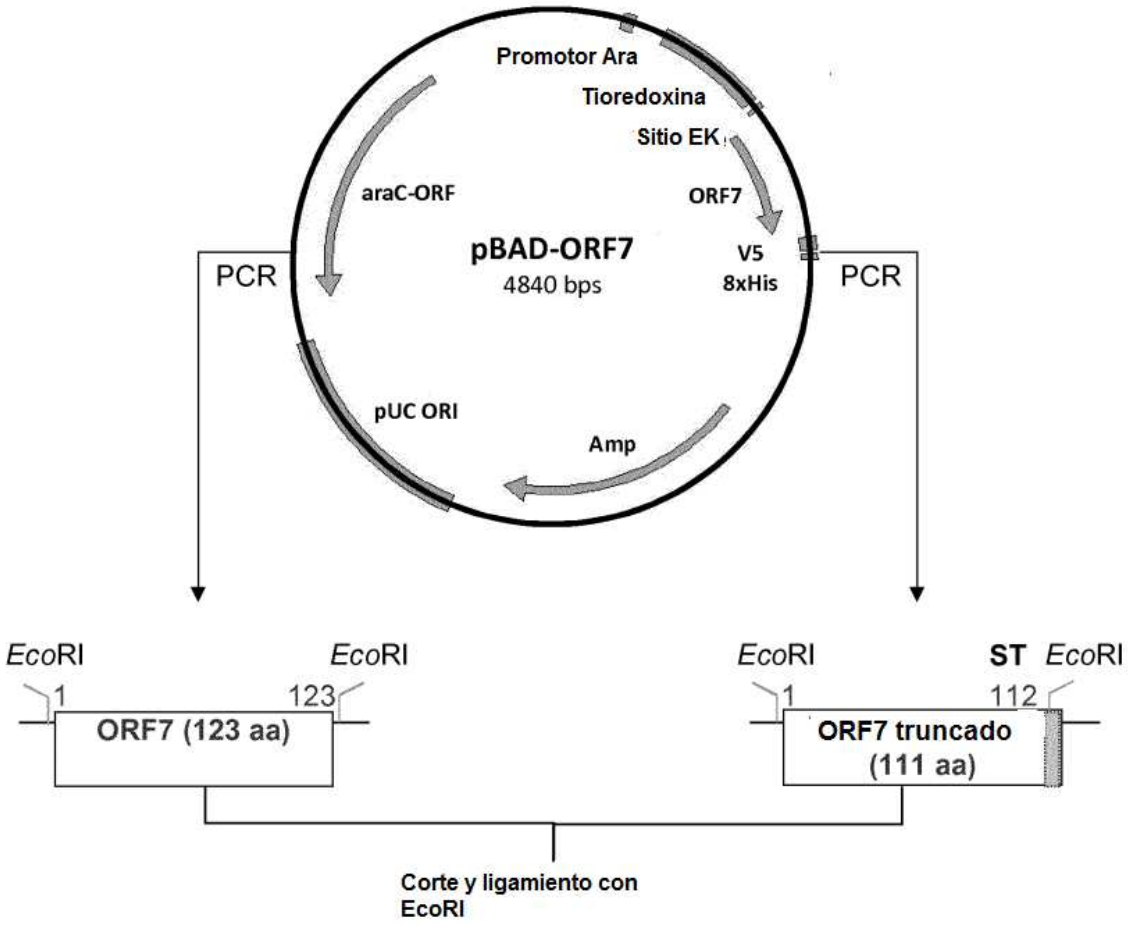

Promotor Ara
Tioredoxina
Sitio EK
ORF7
V5
8xHis
PCR
pBAD-ORF7
4840 bps
PCR
araC-ORF
pUC ORI
Amp
EcoRI
1
123
EcoRI
ORF7 (123 aa)
EcoRI
1
112
ST
EcoRI
ORF7 truncado
(111 aa)
Corte y ligamiento con
EcoRI

Figura 1 (2/2)

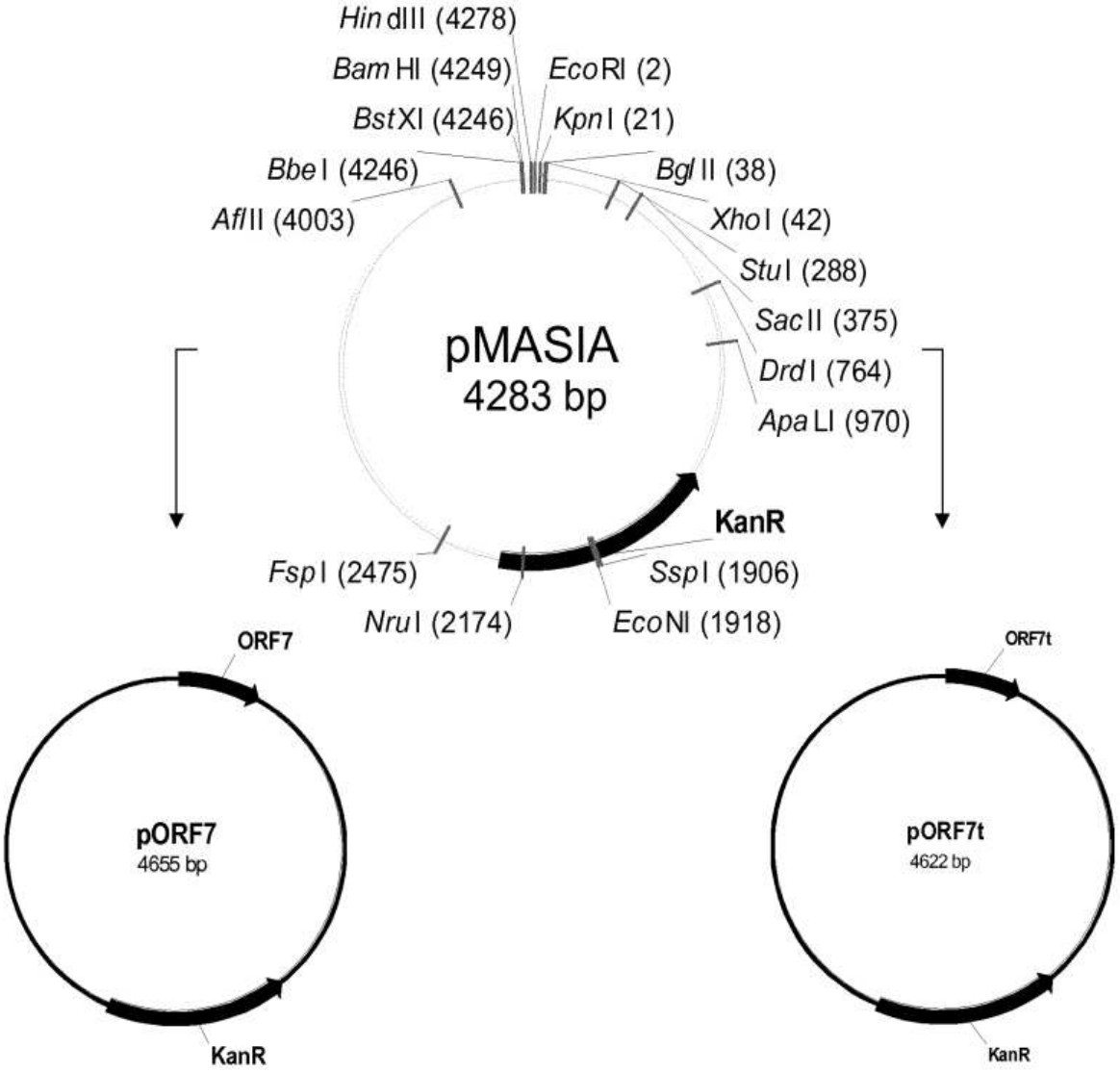

HindIII (4278)
BamHI (4249)
EcoRI (2)
BstXI (4246)
KpnI (21)
BbeI (4246)
BglII (38)
AflII (4003)
XhoI (42)
StuI (288)
SacII (375)
pMASIA
4283 bp
DrdI (764)
ApaLI (970)
KanR
FspI (2475)
SspI (1906)
NruI (2174)
EcoNI (1918)
ORF7
pORF7
4655 bp
KanR
ORF7t
pORF7t
4622 bp
KanR

Figura 2

```
US          MPNNNGKQQKRKKGDGQPVNQLCQMLGKIIAQQNQSRGKGPGKKNKKKNPEKPHFPLATE 60
01NP1.2     MPNNNGKQQKRKKGDGQPVNQLCQMLGKIIAQQNQSRGKGPGKKNKKKNPEKPHFPLATE 60
pBAD        MPNNNGKQQKRKKGDGQPVNQLCQMLGKIIAQQNQSRGKGPGKKNKKKNPEKPHFPLATE 60
            ************************************************************

US          DDVRHHFTPSERQLCLSSIQTAFNQGAGTCTLSDSGRISYTVEFSLPTHHTVRLIRVTAS 120
01NP1.2     DDVRHHFTPSERQLCLSSIQTAFNQGAGTCTLSDSGRISYTVEFSLPTHHTVRLIRVTAS 120
pBAD        DDVRHHFTPSERQLCLSSIQTAFNQGAGTCTLSDSGRISYTVEFSLPTHHTVRLIRVTAS 120
            ************************************************************

US          PSA 123
01NP1.2     PSA 123
pBAD        PSA 123
            ***

01NP1       MPNNNGKQQKRKKGDGQPVNQLCQMLGKIIAQQNQSRGKGPGKKNKKKNPEKPHFPLATE 60
ORF7t       MPNNNGKQQKRKKGDGQPVNQLCQMLGKIIAQQNQSRGKGPGKKNKKKNPEKPHFPLATE 60
            ************************************************************

01NP1       DDVRHHFTPSERQLCLSSIQTAFNQGAGTCTLSDSGRISYTVEFSLPTHHTVRLIRVTAS 120
ORF7t       DDVRHHFTPSERQLCLSSIQTAFNQGAGTCTLSDSGRISYTVEFSLPTHHTV-------- 112
            ************************************************

01NP1       PSA 123
ORF7t       ---
```

Figura 3

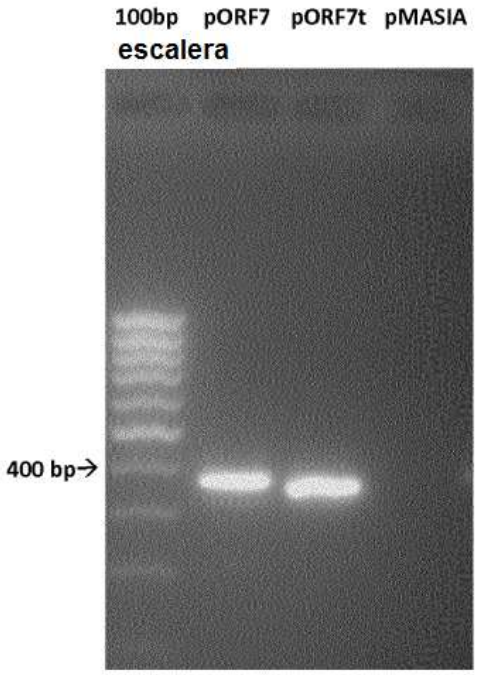


Figura 4

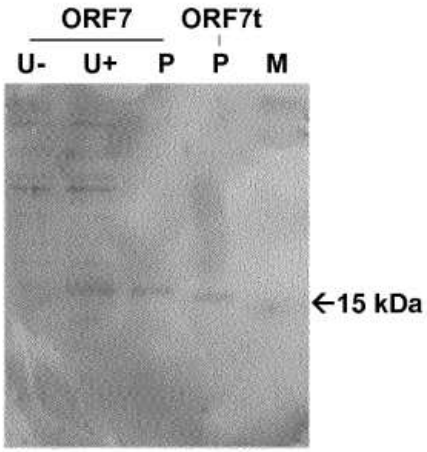


Figura 5

Plásmido	Tamaño (bp)	Sitios de restricción NcoI	Tamaño de los fragmentos (bp)
Nulo	4283	21, 3072, 4181	**123**, 1109, 3051
pORF7	4655	393, 3444, 4553	**495**, 1109, 3051
pORF7t	4622	360, 3411, 4502	**463**, 1109, 3051

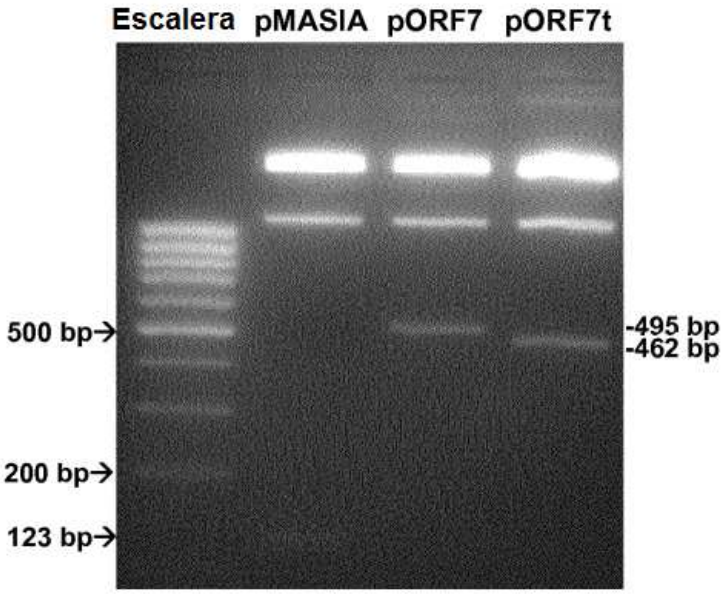


Figura 6

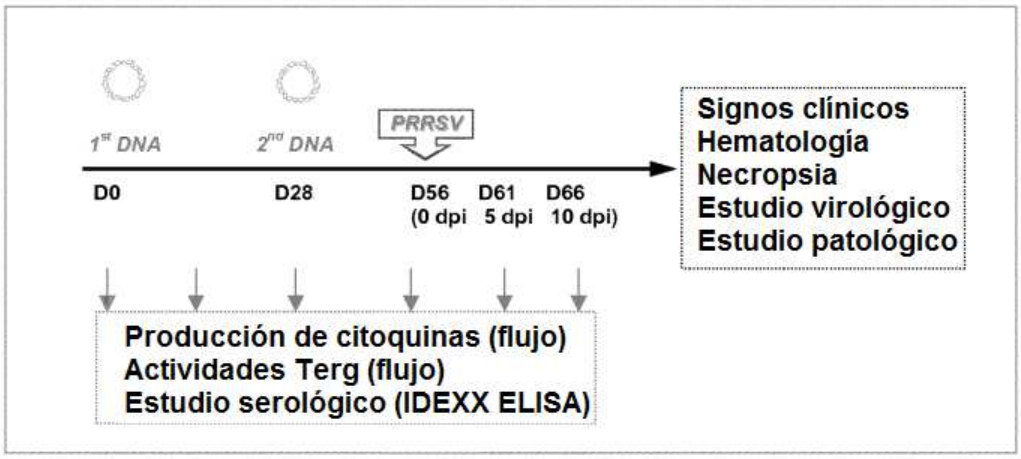


Figura 7

A.

B.

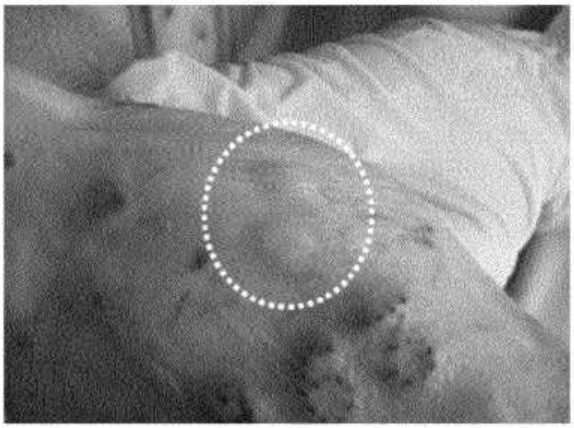


Figura 8

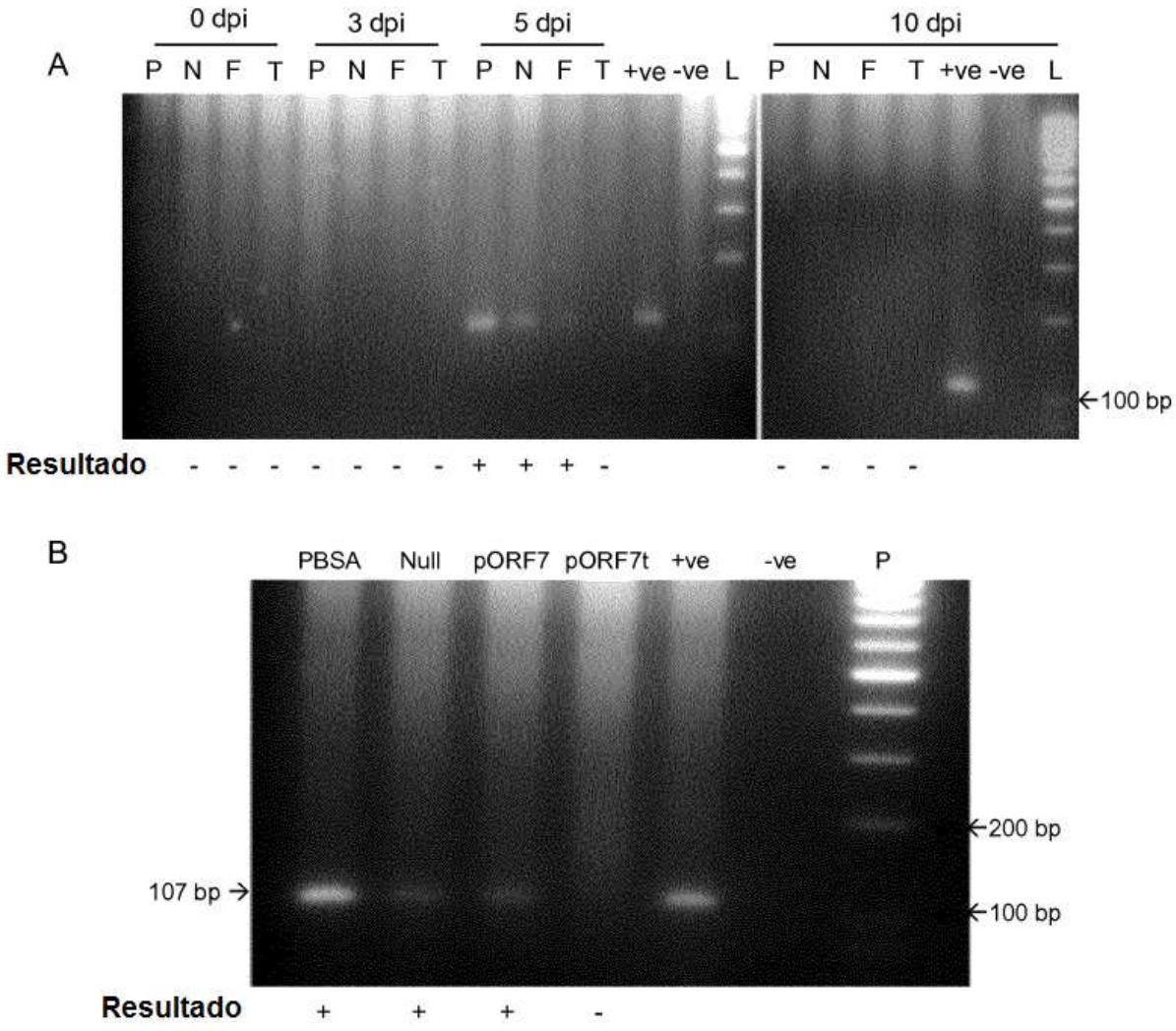

A
0 dpi
3 dpi
5 dpi
10 dpi
P N F T P N F T P N F T +ve -ve L P N F T +ve -ve L
100 bp
Resultado - - - - - - - + + + - - - - -
B
PBSA Null pORF7 pORF7t +ve -ve P
200 bp
107 bp
100 bp
Resultado + + + -

Figura 9

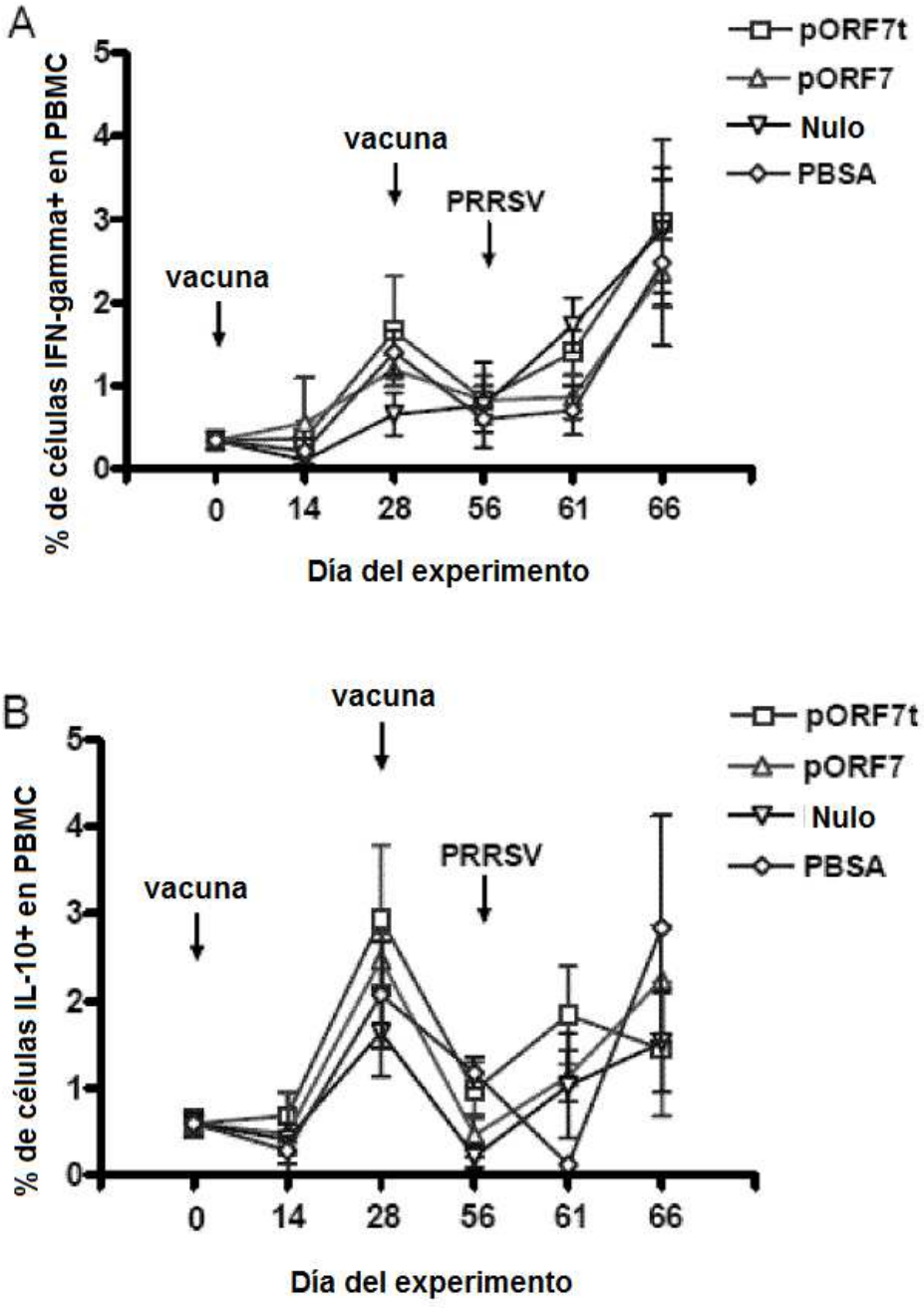

A
% de células IFN-gamma+ en PBMC
vacuna
vacuna
PRRSV
pORF7t
pORF7
Nulo
PBSA
0
1
2
3
4
5
0
14
28
56
61
66
Día del experimento
B
% de células IL-10+ en PBMC
vacuna
vacuna
PRRSV
pORF7t
pORF7
Nulo
PBSA
0
1
2
3
4
5
0
14
28
56
61
66
Día del experimento

Figura 10

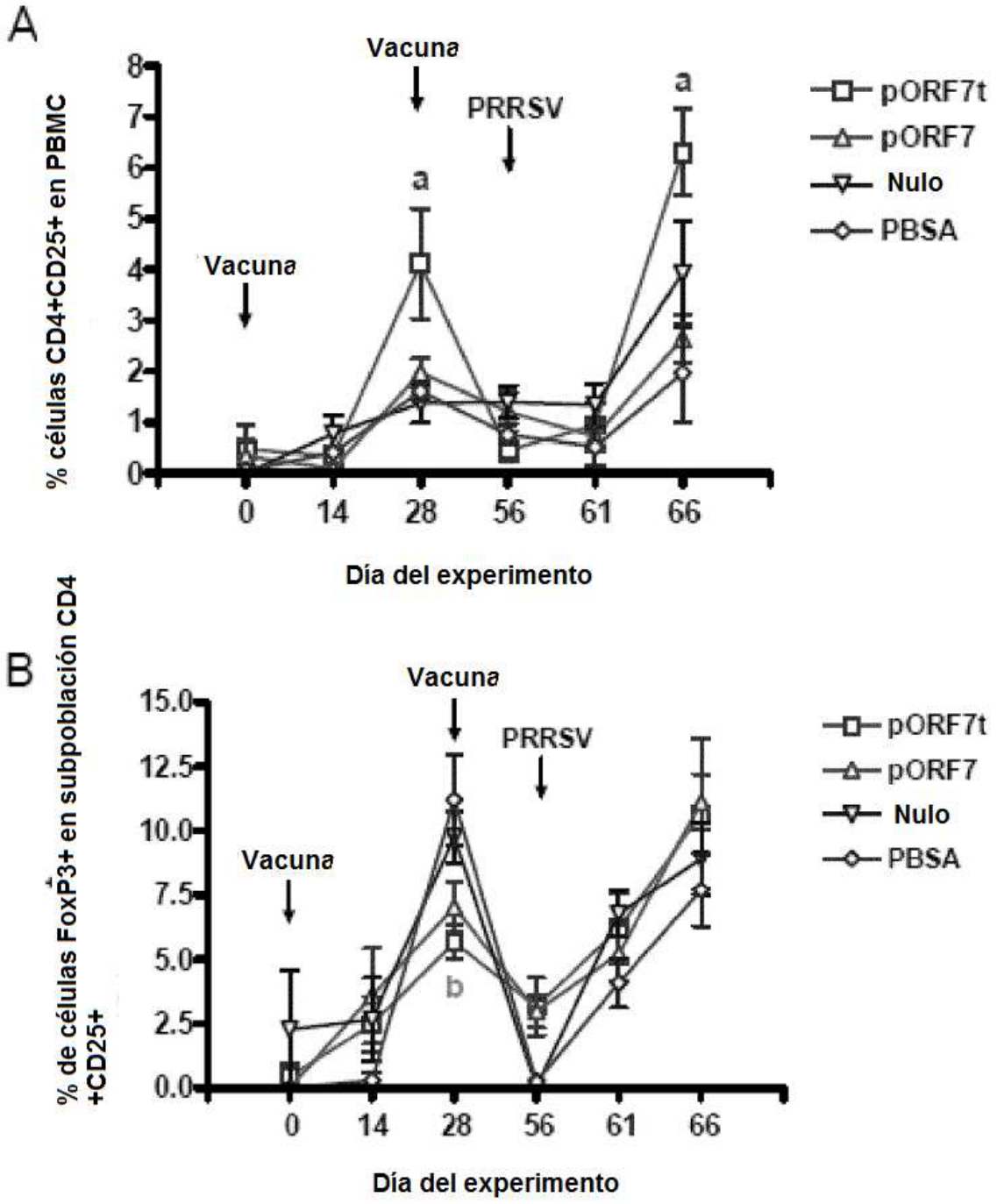
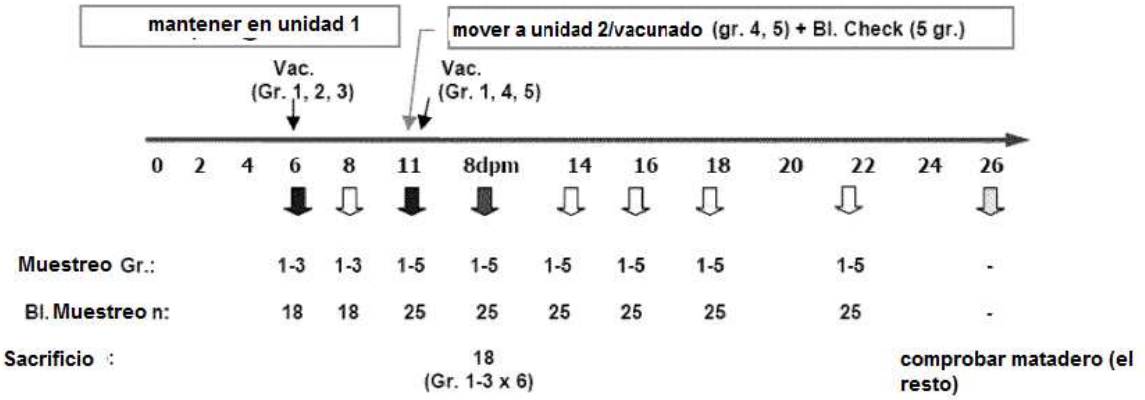

A
% células CD4+CD25+ en PBMC
Vacuna
PRRSV
Vacuna
a
a
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
14
28
56
61
66
Día del experimento
pORF7t
pORF7
Nulo
PBSA
B
% de células FoxP3+ en subpoblación CD4 +CD25+
Vacuna
PRRSV
Vacuna
b
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
0
14
28
56
61
66
Día del experimento
pORF7t
pORF7
Nulo
PBSA

Figura 11

A. **Resumen del plan experimental**

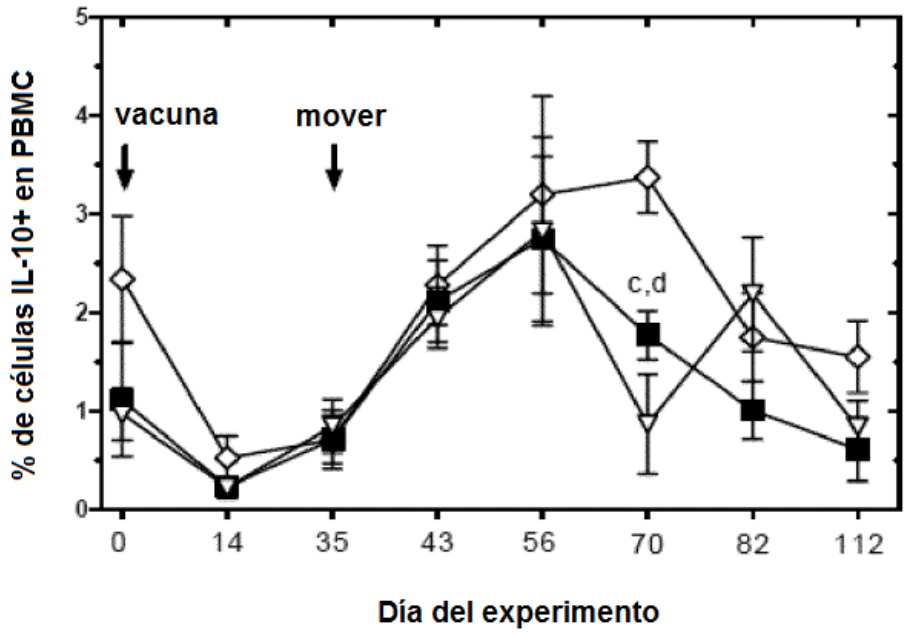


B.

Programación	Edad (semanas)	Tratamiento	Pruebas inmunopatológicas: Bl. completo	Suero (S)		Estudios patol.	Parámetros de producción
Destete	4						
d0	6	DNA-P	Flujo	IDEXX	SN		
	8		Flujo	IDEXX			
Mover al acabador →	10		Flujo	IDEXX	SN		
d35	11	DNA-T					
d43	8 dpm	sacrificado (g. 1-3)	Flujo	IDEXX	Virus	Puntuación PM/pulmón	
d56	14		Flujo	IDEXX	SN	Puntuación clínica	
d70	16		Flujo	IDEXX			
d82	18		Flujo	IDEXX	SN		
	20						
d112	22		Flujo	IDEXX	SN		
	24						
Sacrificio	26					Puntuación de pulmón	

Figura 12 (1/2)

A



B

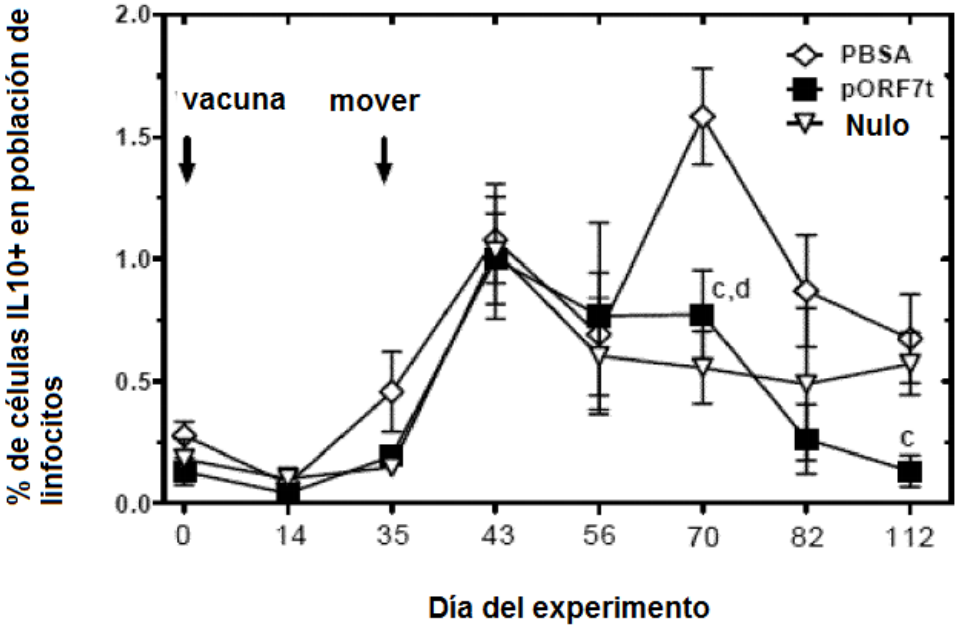
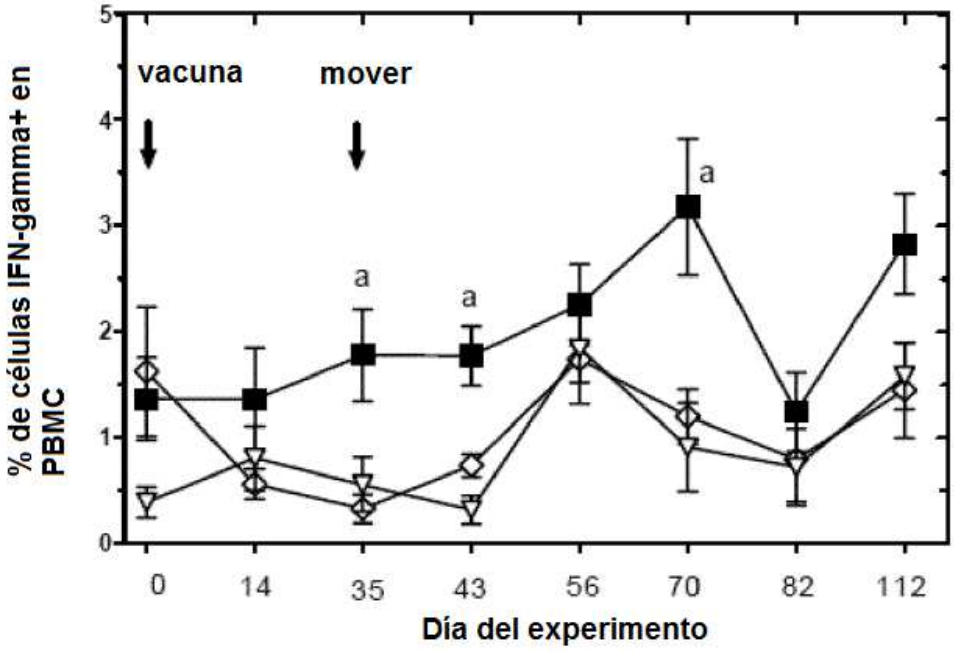


Figura 12 (2/2)

C



D

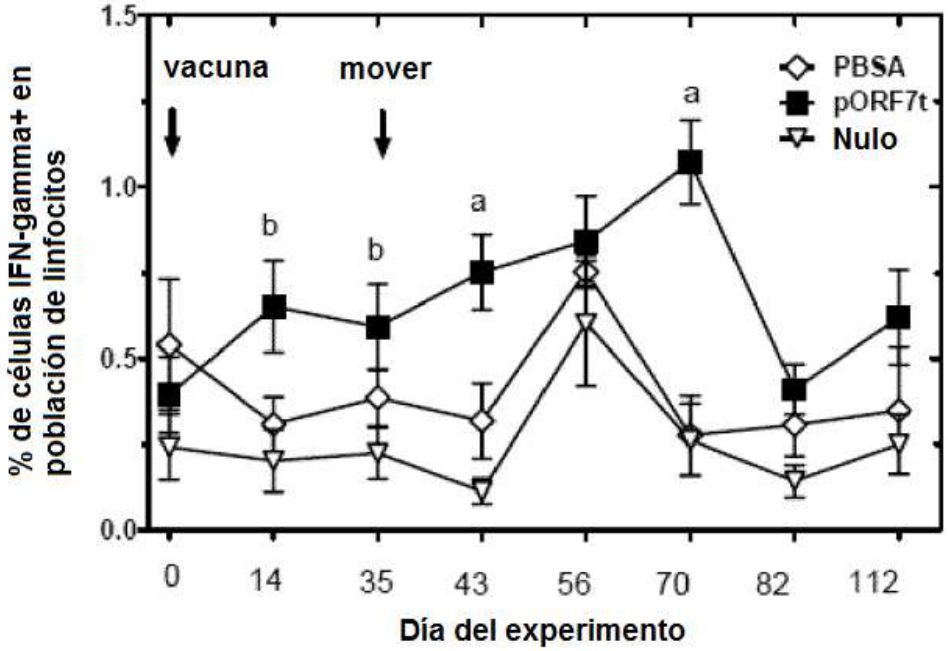
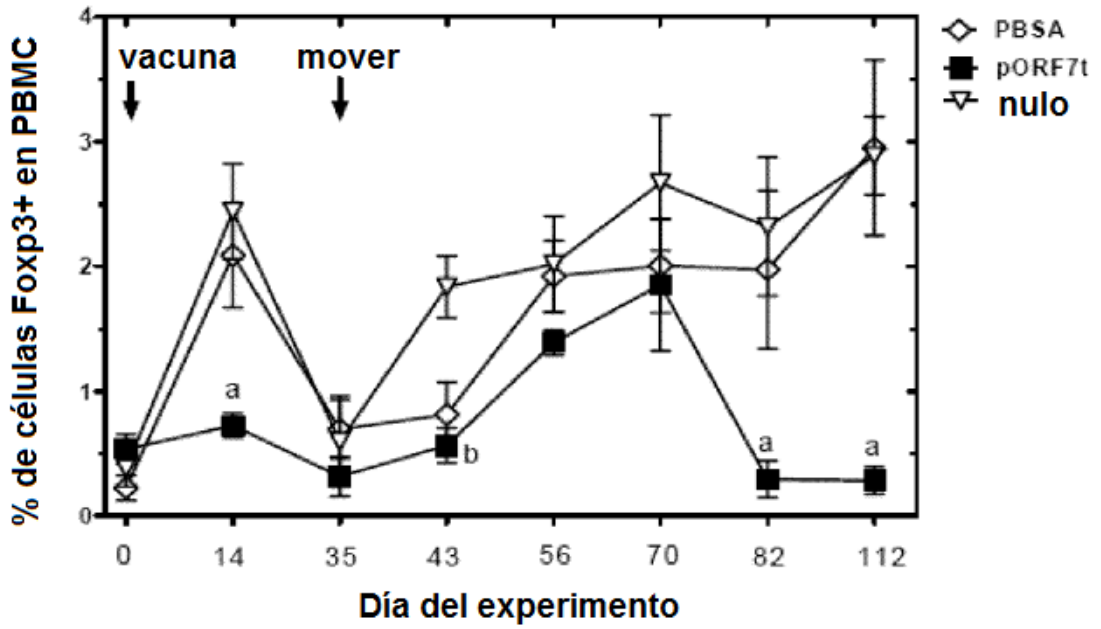


Figura 13

A.


vacuna
mover
PBSA
pORF7t
nulo
% de células Foxp3+ en PBMC
0
1
2
3
4
a
b
a
a
0
14
35
43
56
70
82
112
Día del experimento

B.

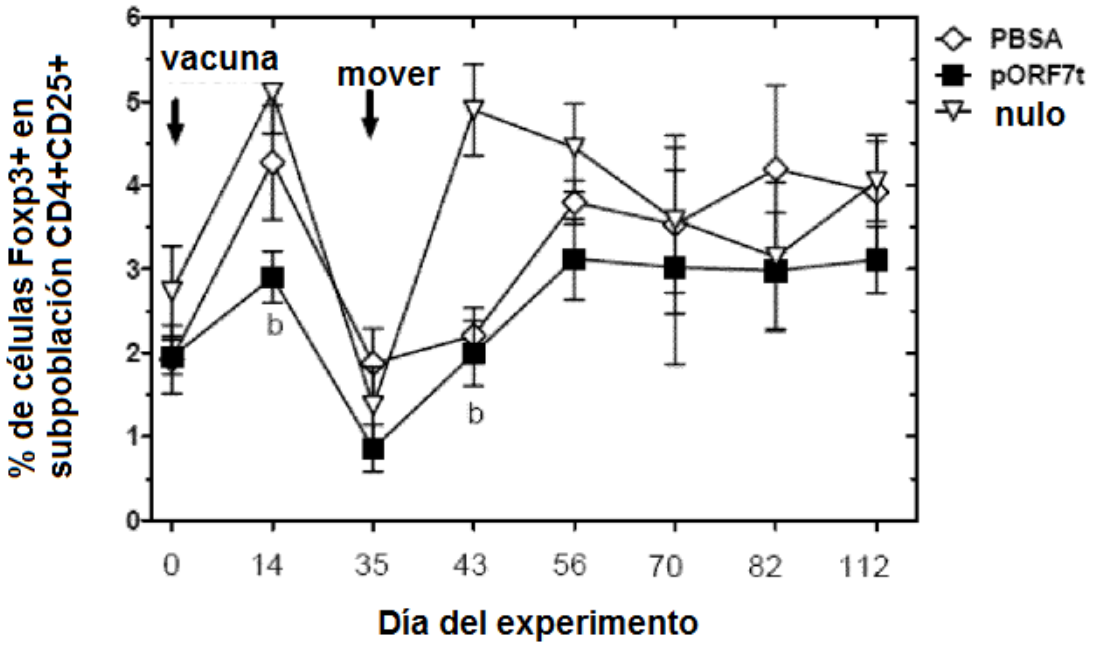
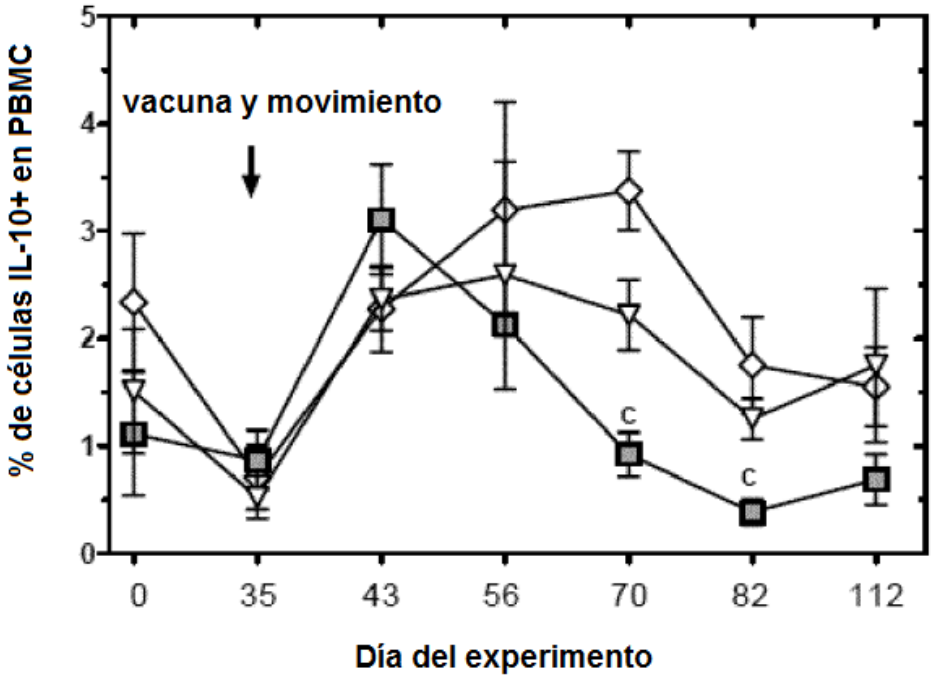

vacuna
mover
PBSA
pORF7t
nulo
% de células Foxp3+ en subpoblación CD4+CD25+
0
1
2
3
4
5
6
b
b
0
14
35
43
56
70
82
112
Día del experimento

Figura 14 (1/2)

A



B

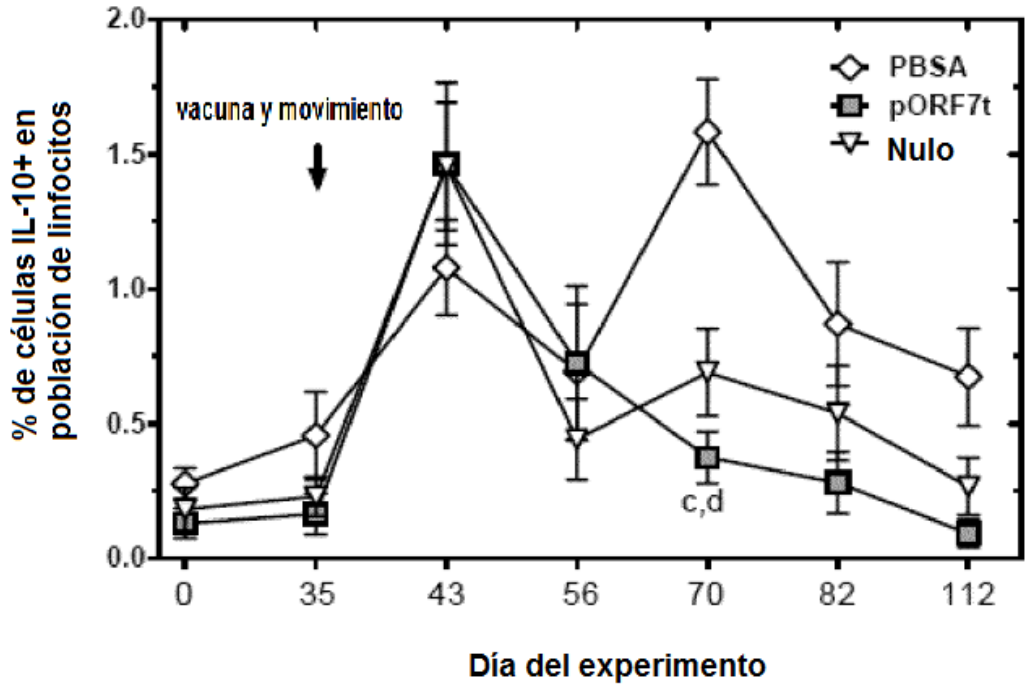
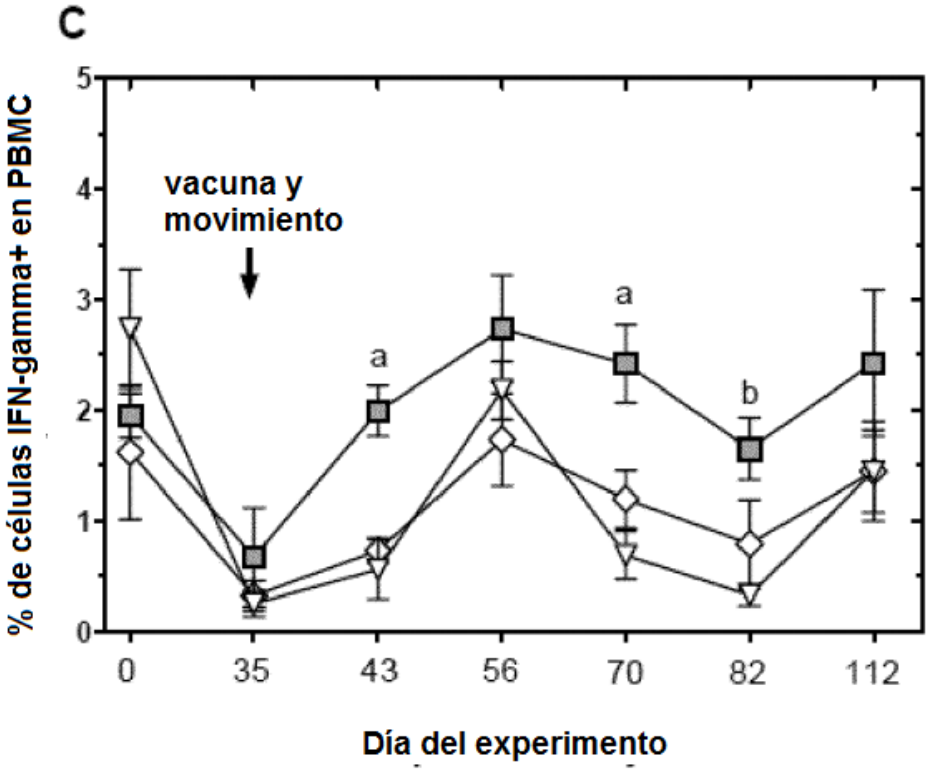


Figura 14 (2/2)


C
% de células IFN-gamma+ en PBMC
vacuna y movimiento
a
a
b
0
1
2
3
4
5
0
35
43
56
70
82
112
Día del experimento

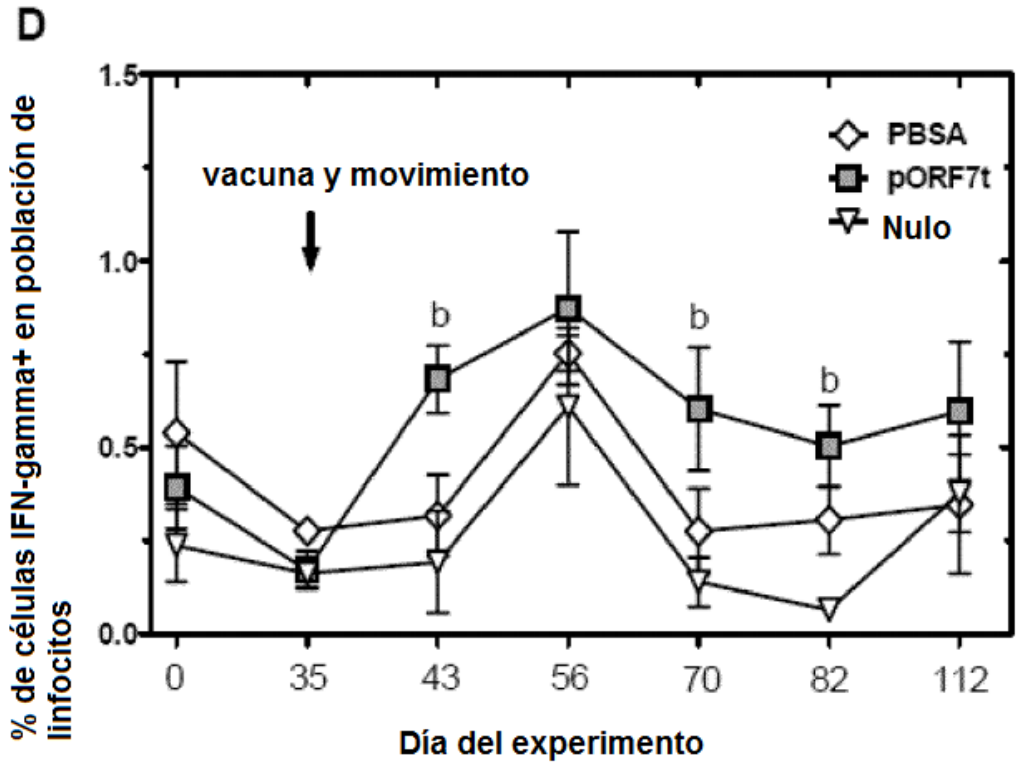
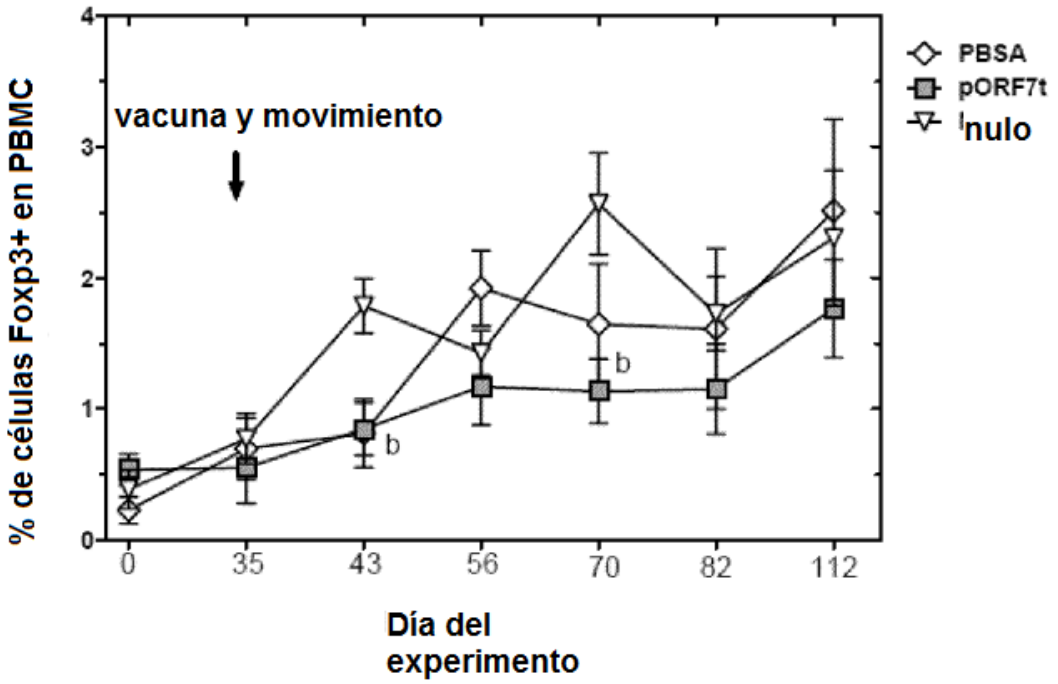

D
% de células IFN-gamma+ en población de linfocitos
vacuna y movimiento
PBSA
pORF7t
Nulo
b
b
b
0.0
0.5
1.0
1.5
0
35
43
56
70
82
112
Día del experimento

Figura 15

A.


% de células Foxp3+ en PBMC
vacuna y movimiento
PBSA
pORF7t
nulo
0
1
2
3
4
0
35
43
56
70
82
112
b
b
Día del experimento

B.

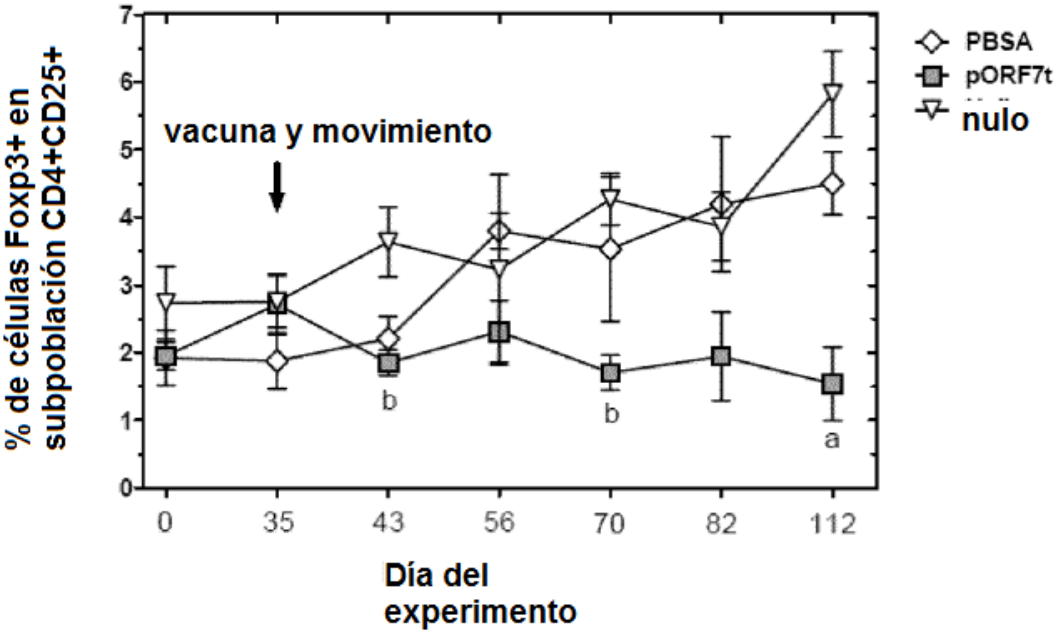

% de células Foxp3+ en subpoblación CD4+CD25+
vacuna y movimiento
PBSA
pORF7t
nulo
0
1
2
3
4
5
6
7
0
35
43
56
70
82
112
b
b
a
Día del experimento

Figura 16

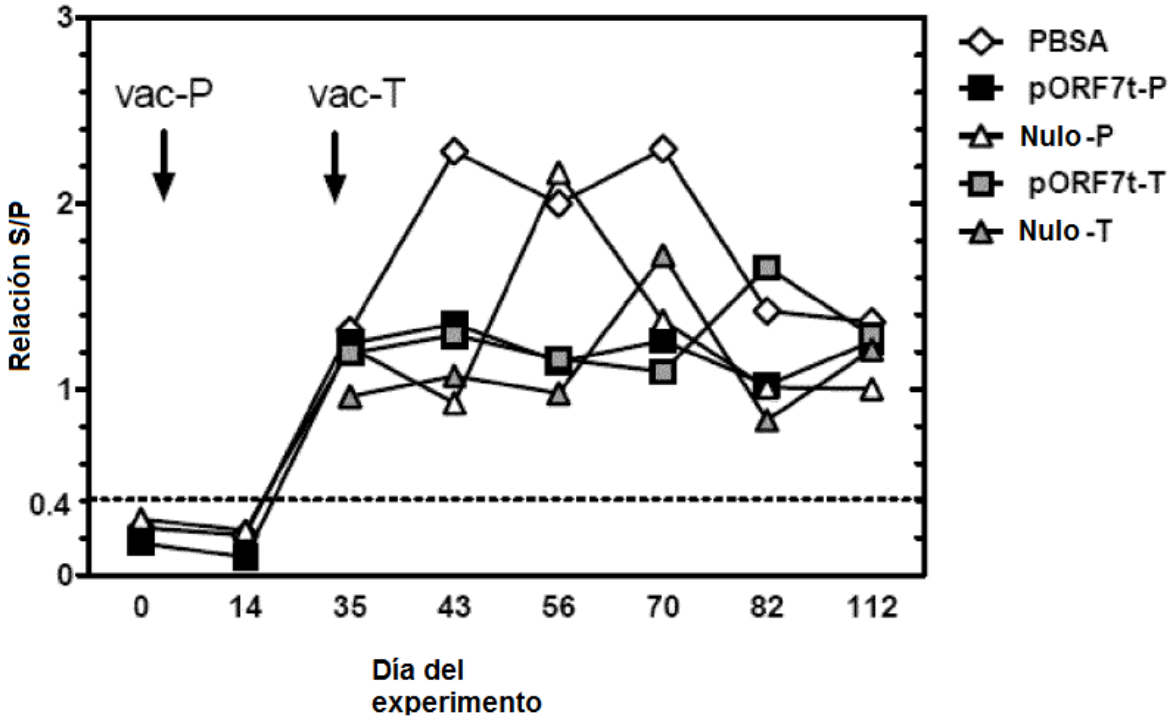

vac-P
vac-T
Relación S/P
3
2
1
0.4
0
0
14
35
43
56
70
82
112
Día del experimento
PBSA
pORF7t-P
Nulo -P
pORF7t-T
Nulo -T

Figura 17

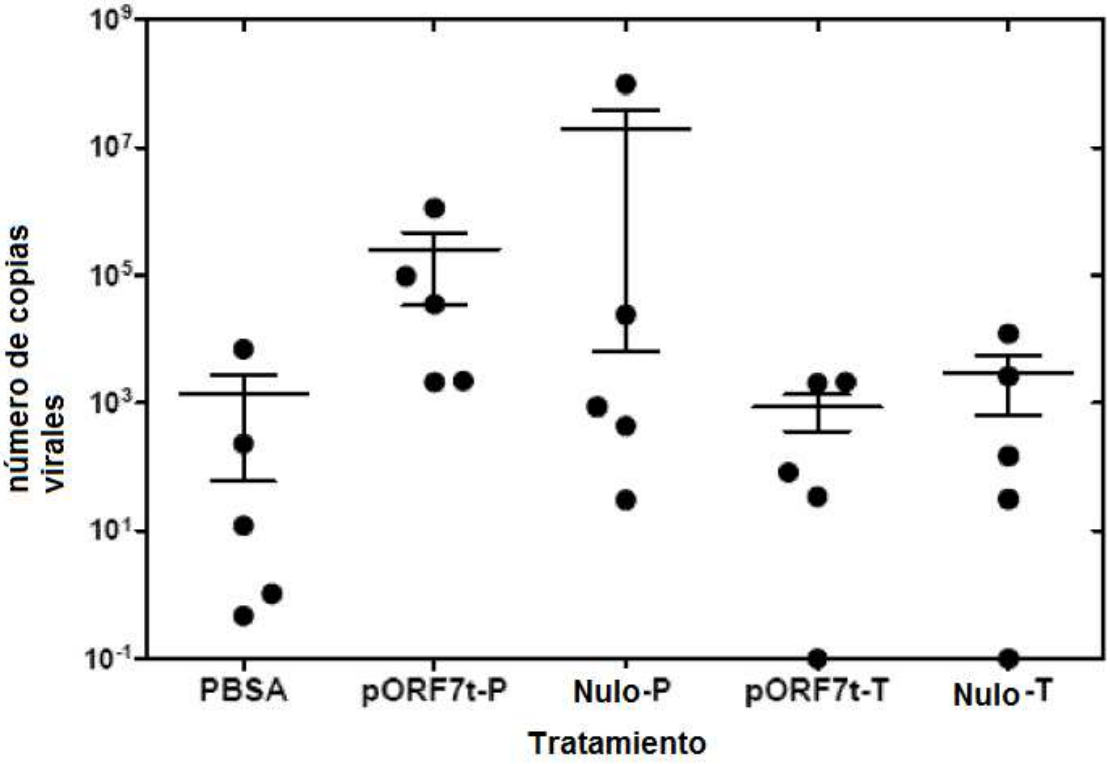


Figura 18

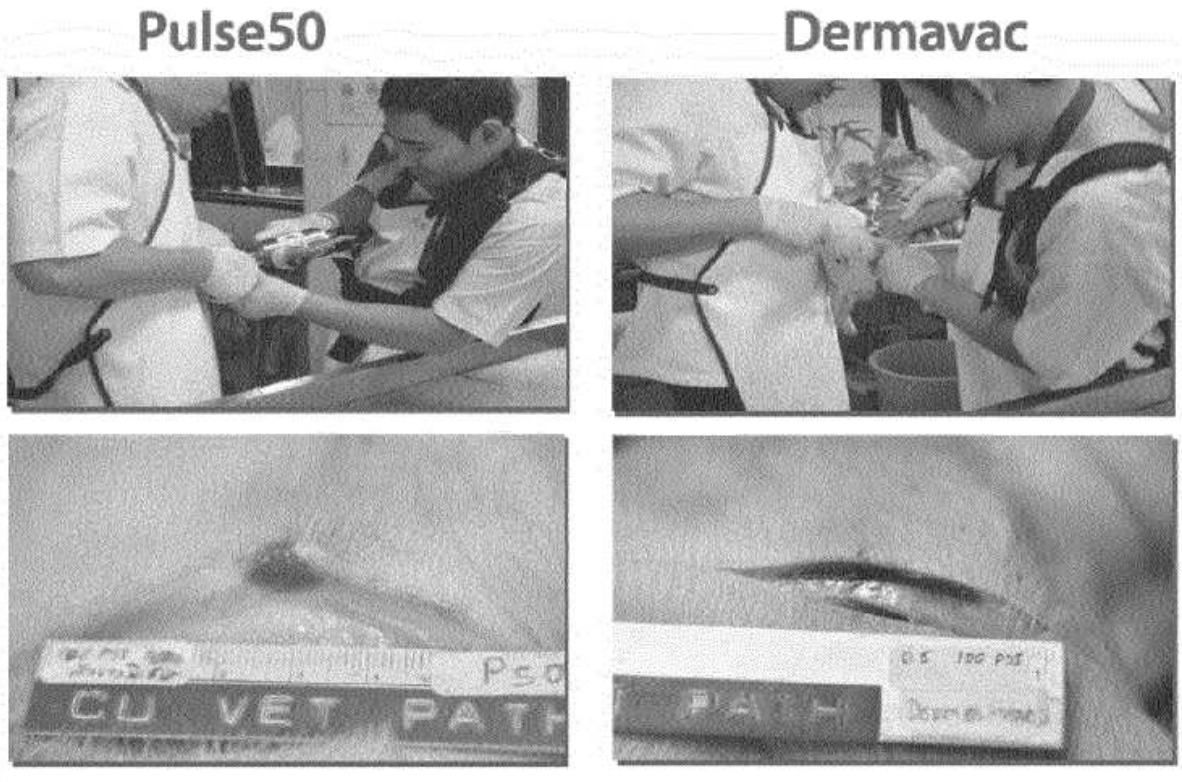


Figura 19

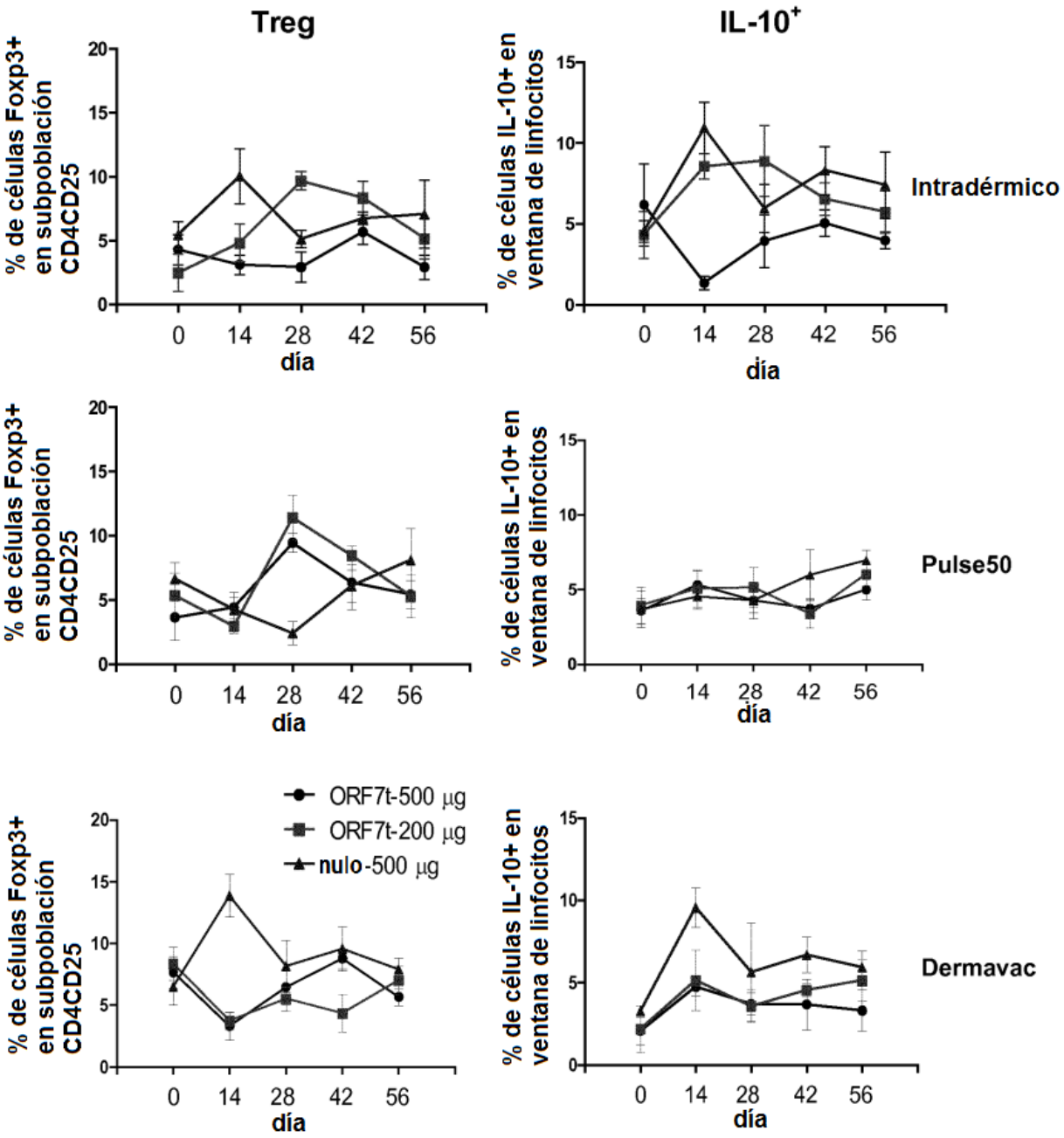

Treg
IL-10+
% de células Foxp3+ en subpoblación CD4CD25
% de células IL-10+ en ventana de linfocitos
día
0
14
28
42
56
Intradérmico
Pulse50
Dermavac
ORF7t-500 µg
ORF7t-200 µg
nulo-500 µg

Figura 20

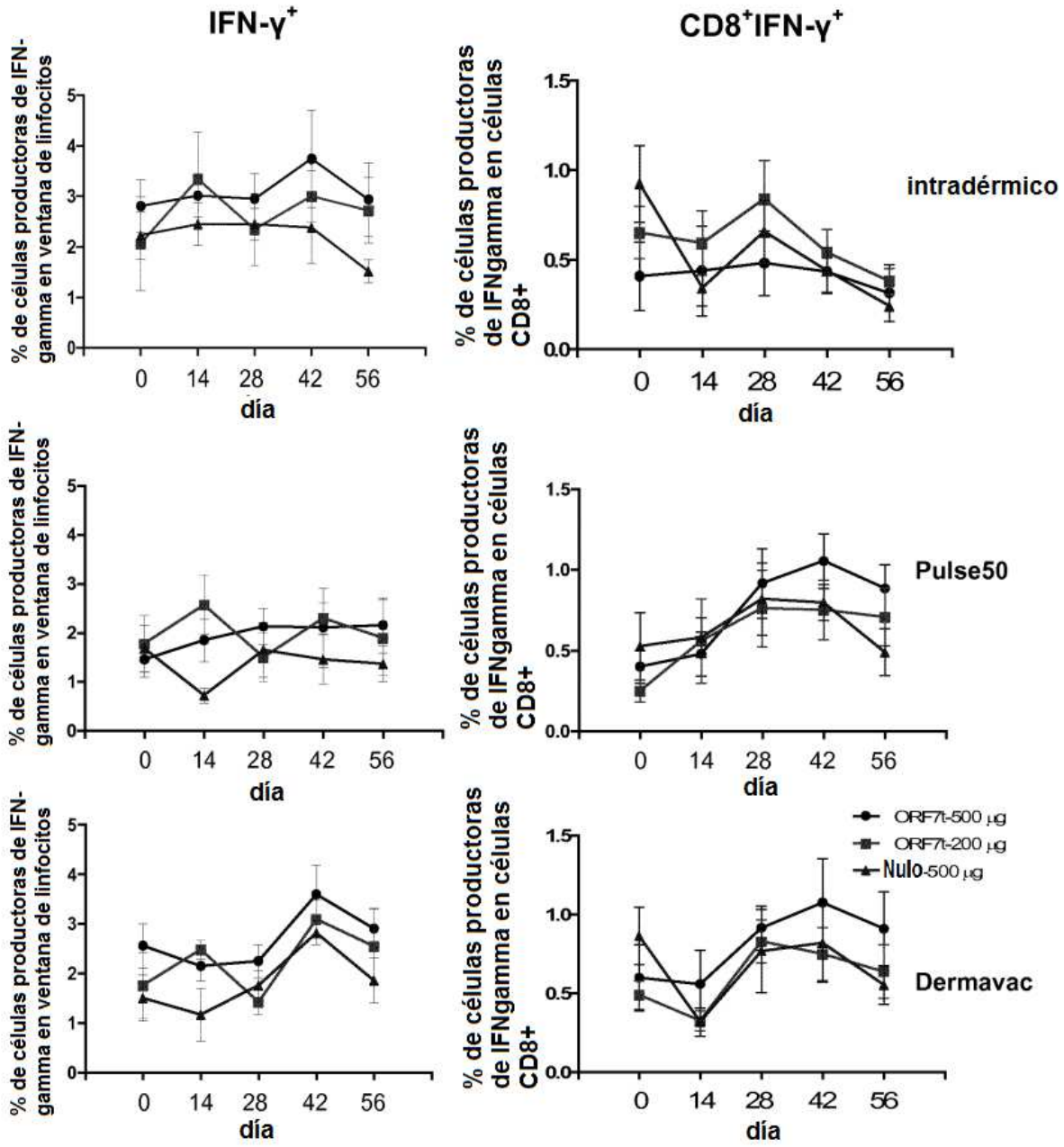

IFN-γ+
CD8+IFN-γ+
% de células productoras de IFN-gamma en ventana de linfocitos
% de células productoras de IFNgamma en células CD8+
día
intradérmico
Pulse50
Dermavac
ORF7t-500 µg
ORF7t-200 µg
Nulo-500 µg

Figura 21

Descripción de los números de identificación de secuencias

Número	Tipo	Descripción
1	ADN	gen de ORf7 de VSRRP
2	PRT	Traducción del gen de ORF7 de VSRRP
3	ADN	Gen de ORF7 truncado (ORF7t) modificado genéticamente de VSRRP
4	PRT	Traducción del gen de ORF7 truncado (ORF7t) modificado genéticamente de VSRRP
5	ADN	Cebador US-F de ORF7
6	ADN	Cebador US-R de ORF7
7	ADN	Cebador US-11R
8	ADN	Plásmido pMASIA
9	ADN	Plásmido pORF7
10	ADN	Plásmido pORf7t
11	ADN	Cebador F de pMASIA
12	ADN	Plásmido pBAD-ORf7
13	ADN	01NP1-VSRRP – número de acceso de GEnBank Q056373
14	PRT	Us pMA C2
15	PRT	pBAD
16	PRT	01NP1.2
17	PRT	01NP1
18	ADN	pQE31

Figura 22

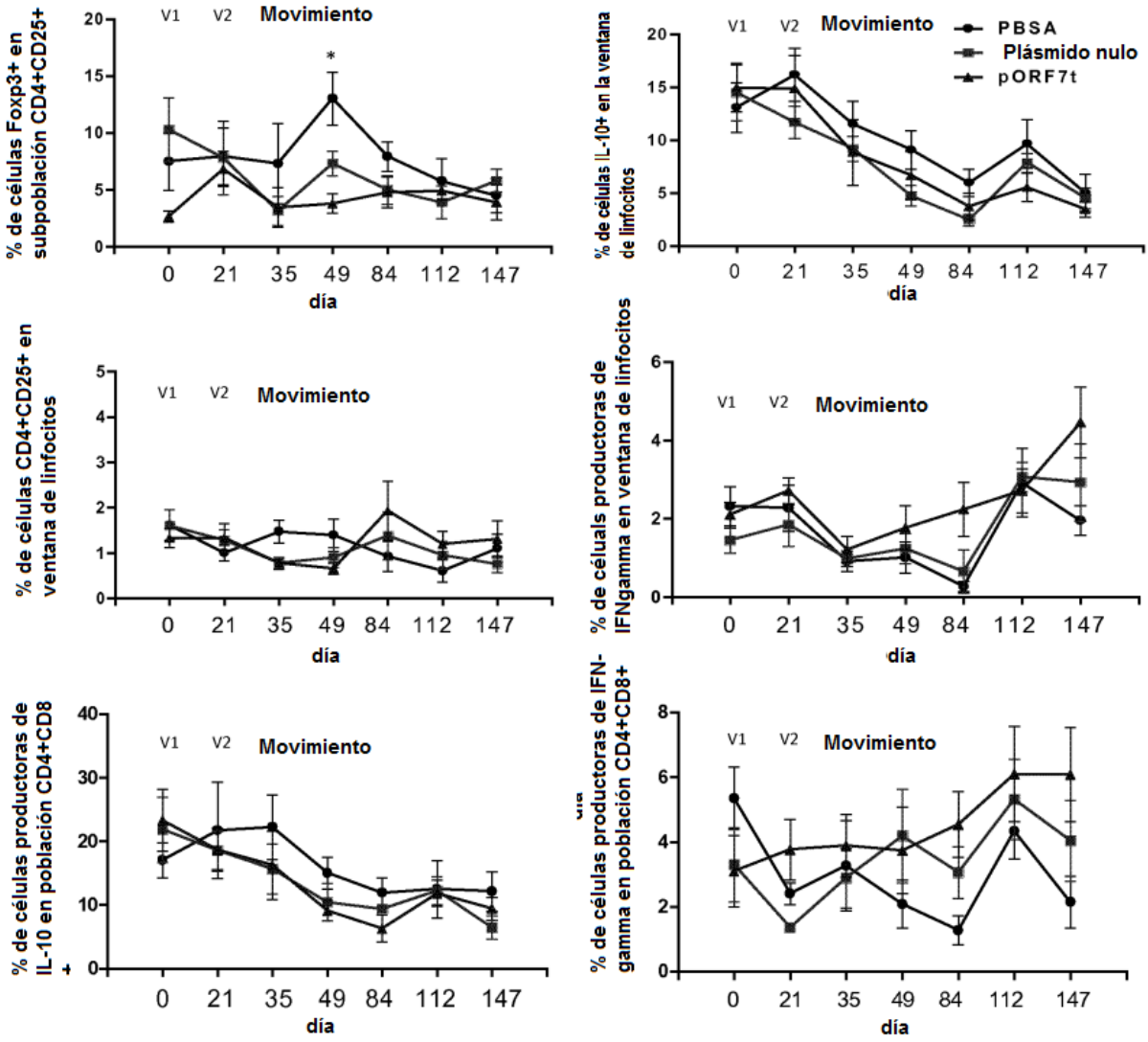

% de células Foxp3+ en subpoblación CD4+CD25+
V1 V2 Movimiento
*
0 21 35 49 84 112 147
día
% de células IL-10+ en la ventana de linfocitos
PBSA
Plásmido nulo
pORF7t
% de células CD4+CD25+ en ventana de linfocitos
% de céluals productoras de IFNgamma en ventana de linfocitos
% de células productoras de IL-10 en población CD4+CD8+
% de células productoras de IFN-gamma en población CD4+CD8+

Figura 23

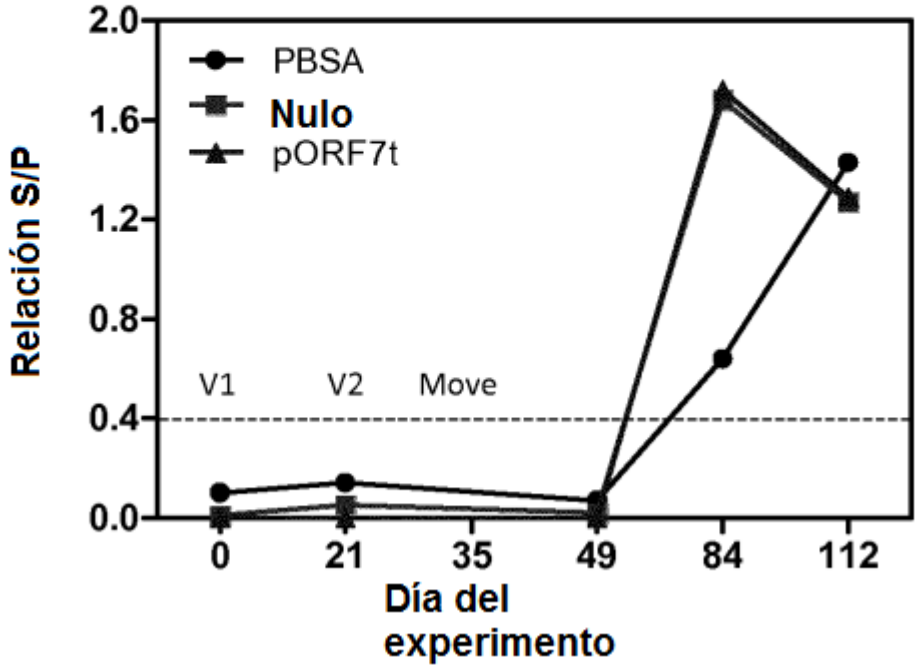


Figura 24

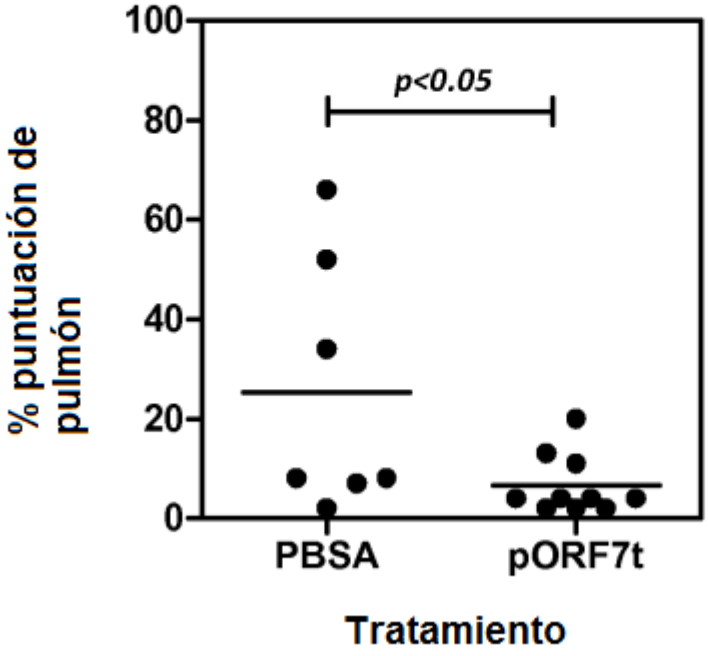
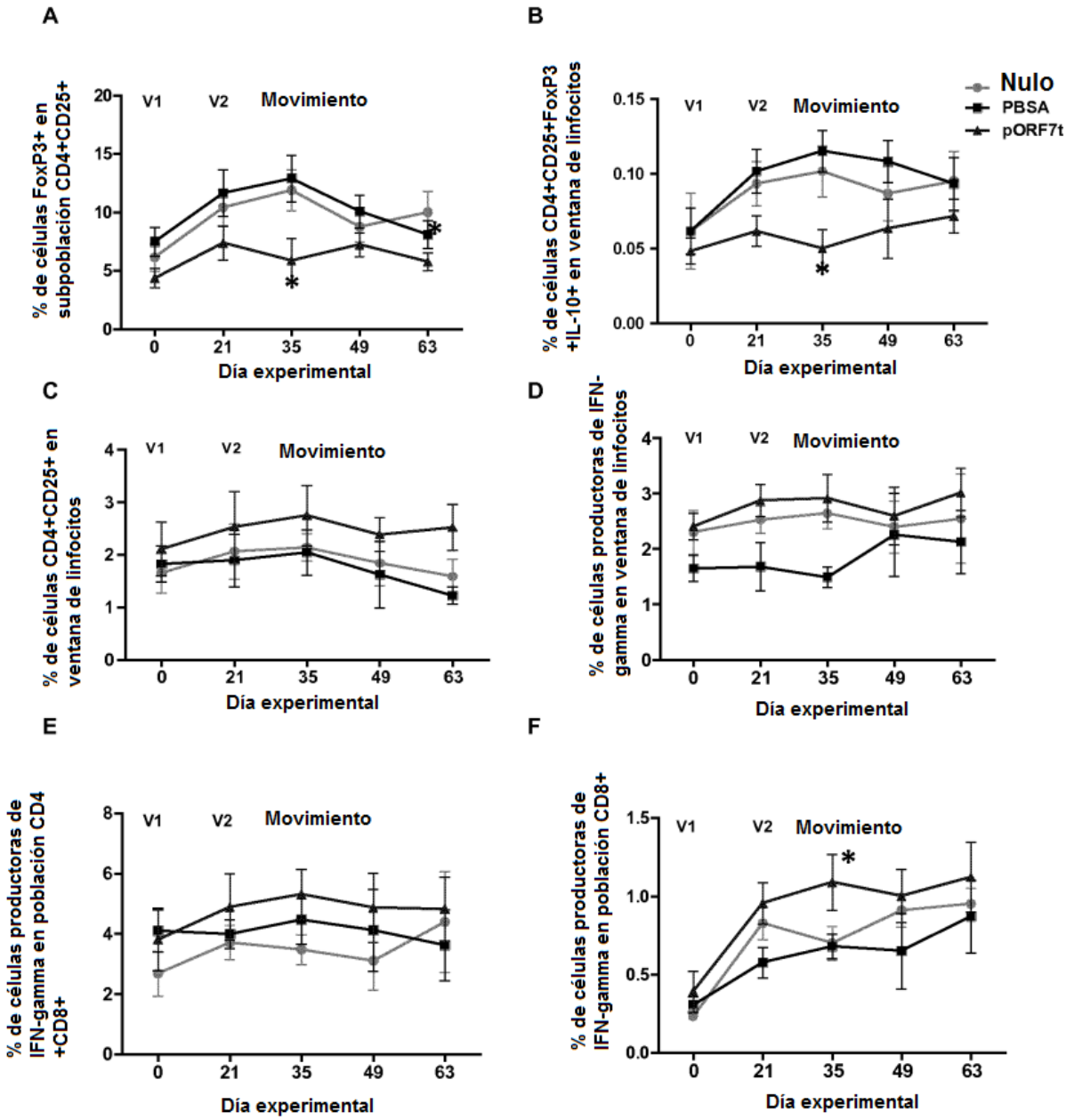


Figura 25


A
% de células FoxP3+ en subpoblación CD4+CD25+
V1
V2
Movimiento
Día experimental
B
% de células CD4+CD25+FoxP3 +IL-10+ en ventana de linfocitos
Nulo
PBSA
pORF7t
C
% de células CD4+CD25+ en ventana de linfocitos
D
% de células productoras de IFN-gamma en ventana de linfocitos
E
% de células productoras de IFN-gamma en población CD4 +CD8+
F
% de células productoras de IFN-gamma en población CD8+

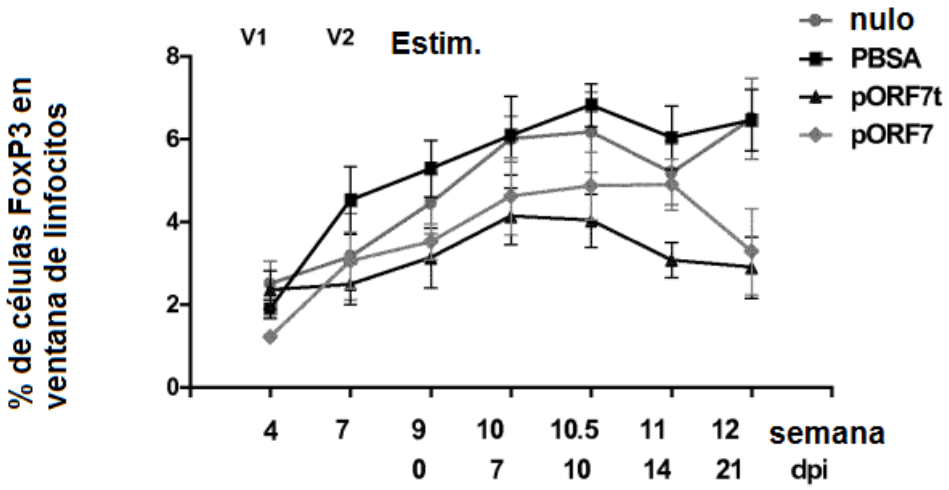


Figura 26A

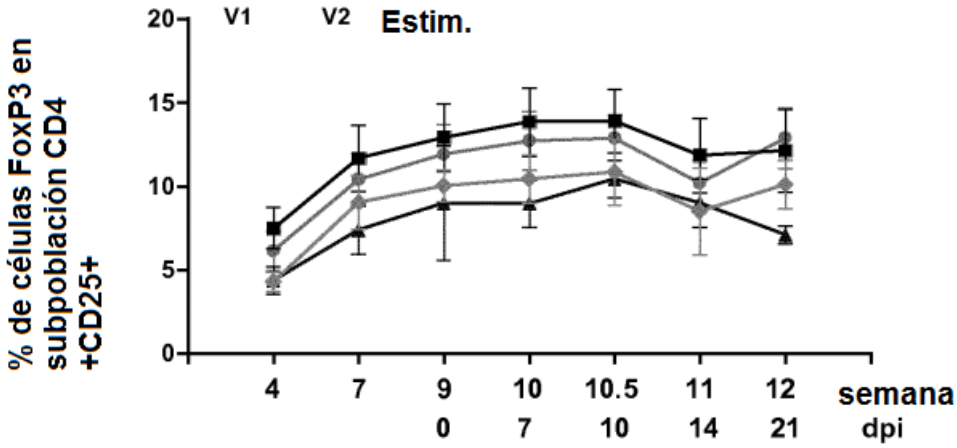


Figura 26B

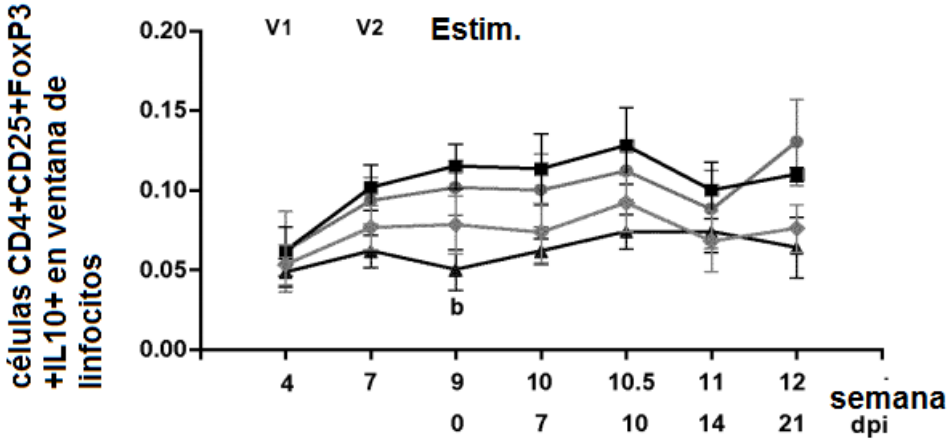


Figura 26C

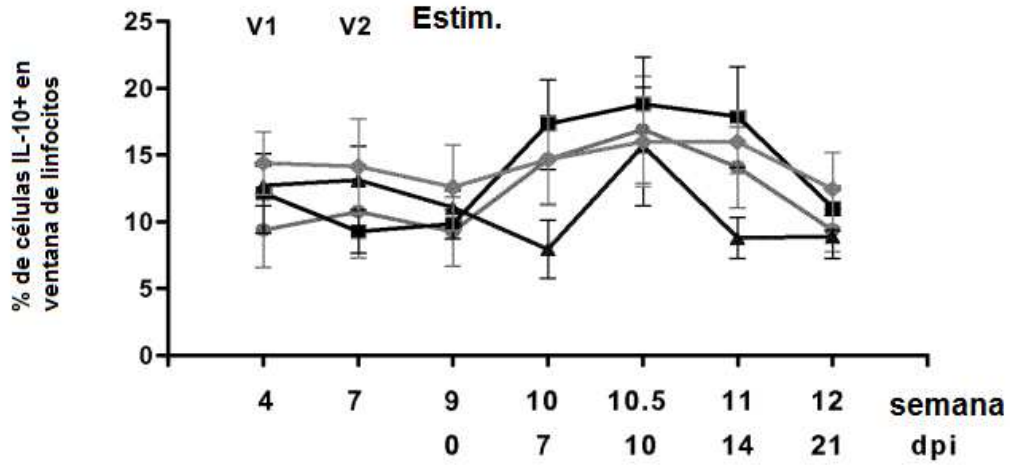


Figura 26D

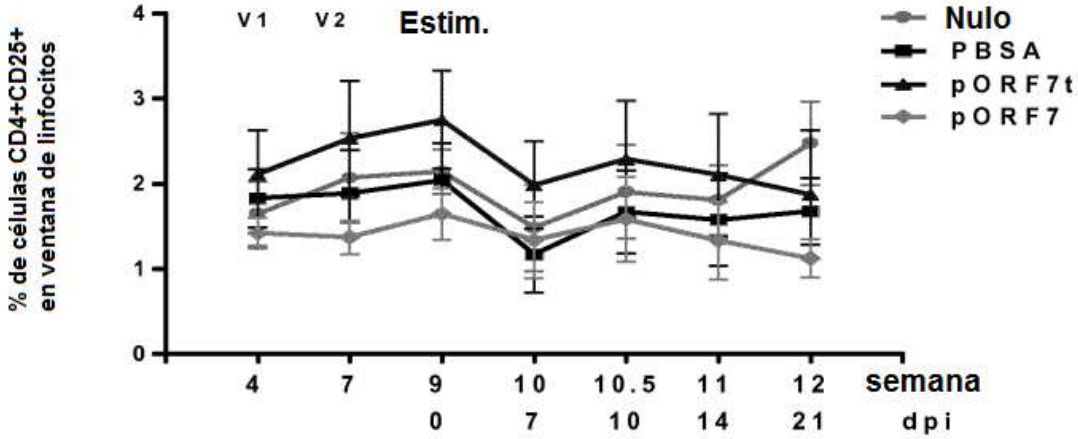


Figura 27A

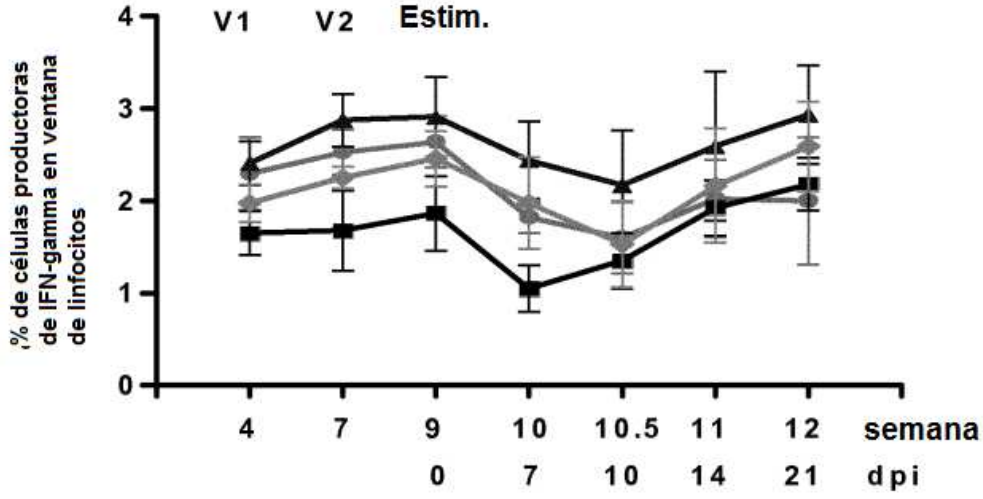


Figura 27B

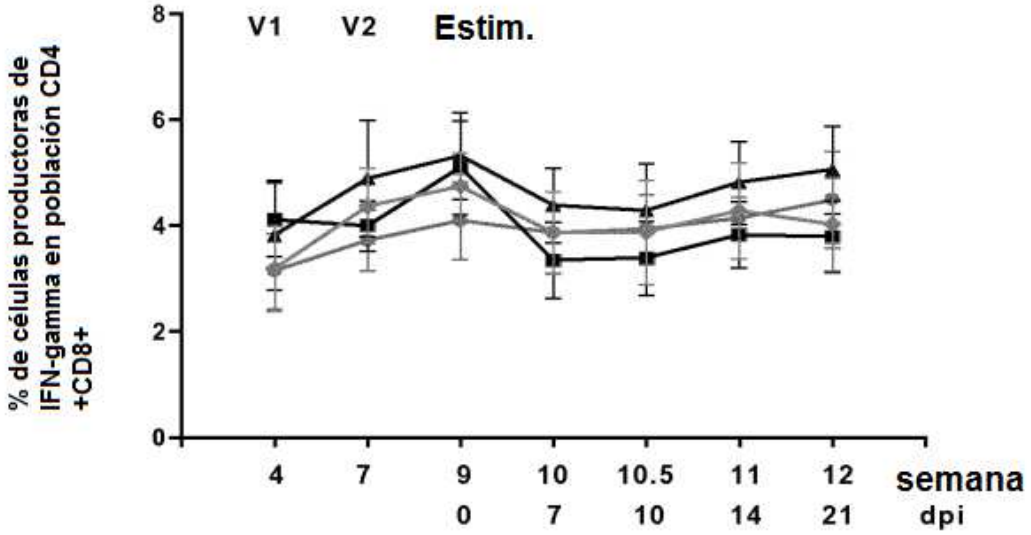


Figura 27C

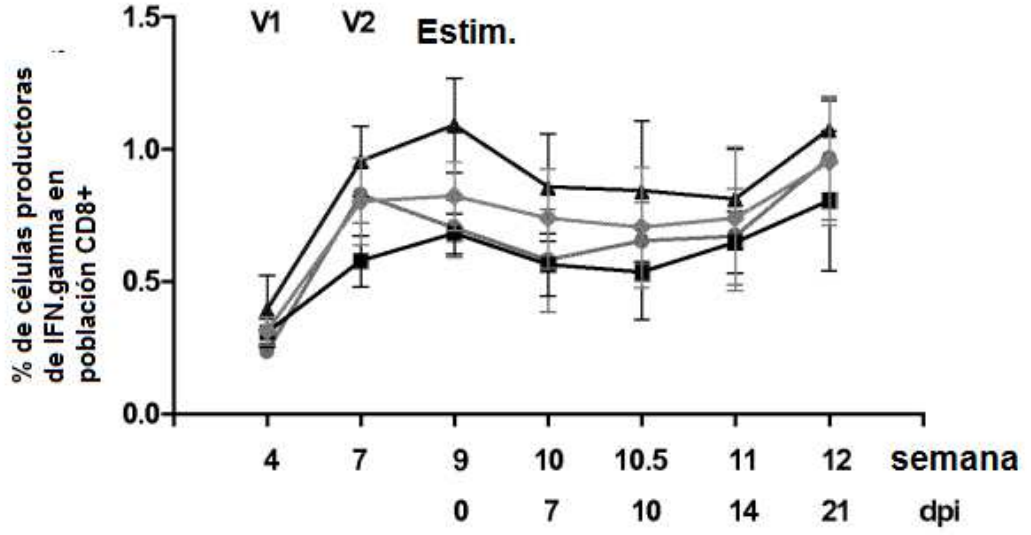


Figura27D

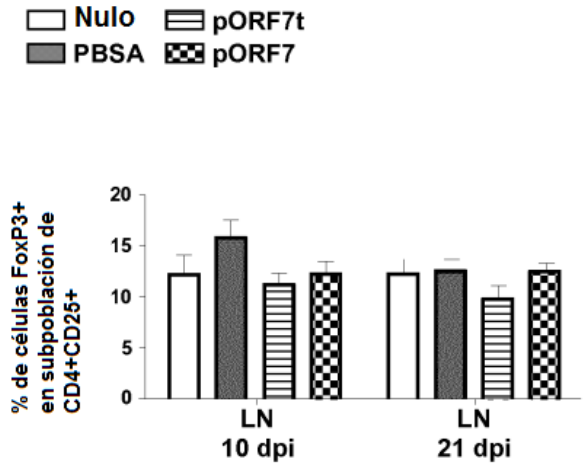


Figura 28A

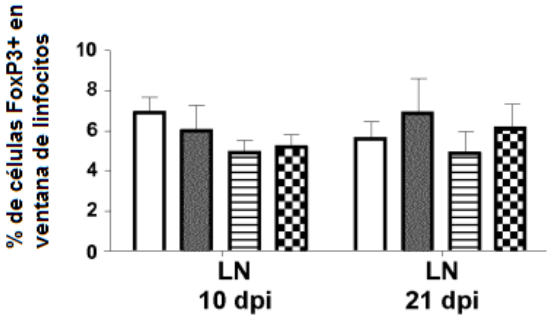


Figura 28B

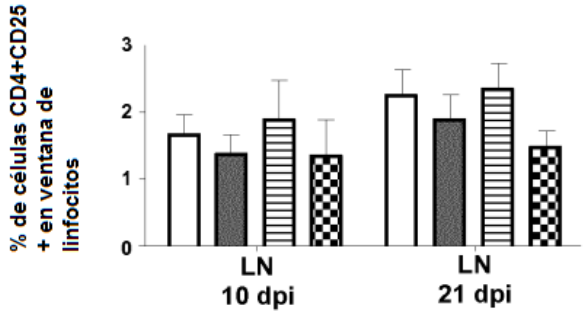


Figura 28C

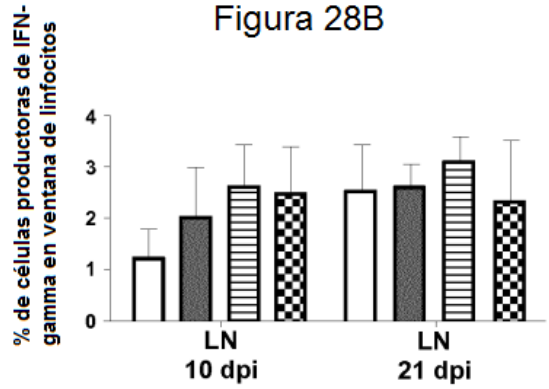


Figura 28D

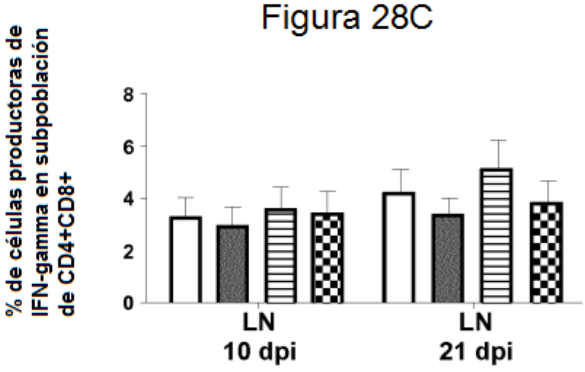


Figura 28E

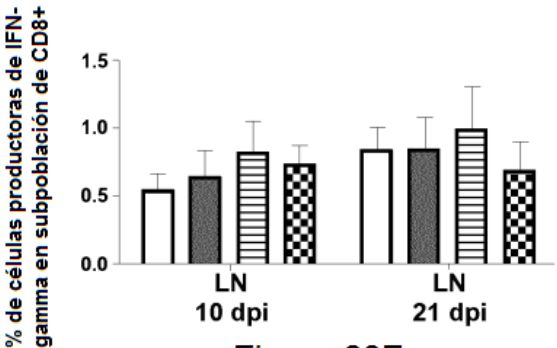


Figura 28F

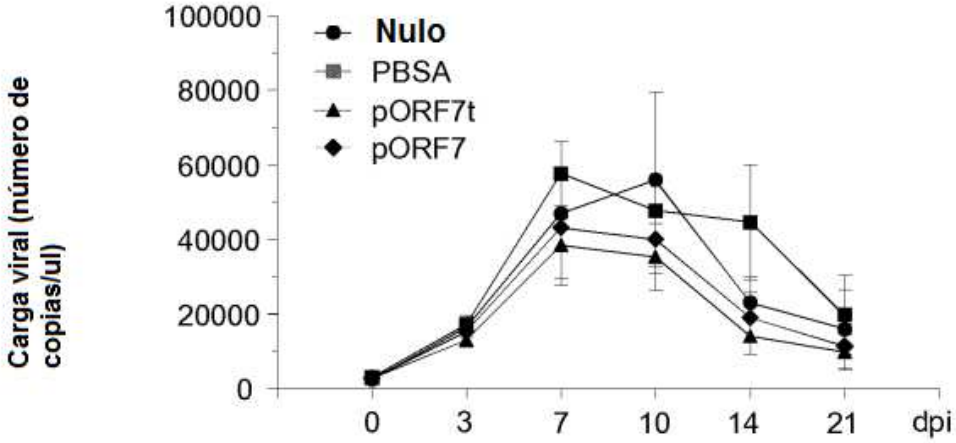


Figura 29A

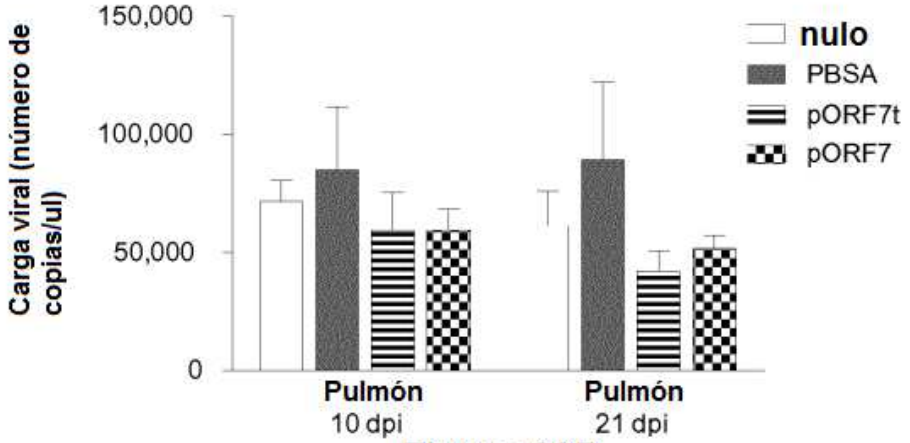


Figura 29B

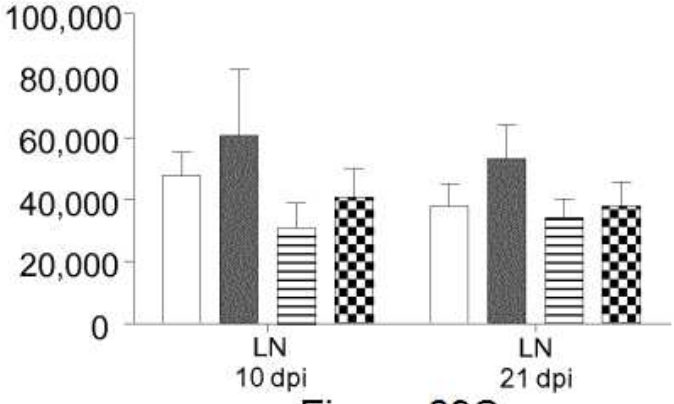


Figura 29C