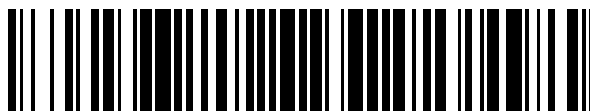


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 515**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/015** (2006.01)

**A61K 39/23** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**C07K 16/08** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2014 PCT/US2013/075059**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14099669**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2014 E 13814791 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2931741**

54 Título: **Parvovirus porcino 5A, métodos de uso y vacuna**

30 Prioridad:

**12.03.2013 US 201313796621**

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

**14.11.2018**

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.  
(100.0%)  
2621 North Belth Highway  
St Joseph, MO 64506, US**

72 Inventor/es:

**IYER, ARUN V.;  
JORDAN, DIANNA M. MURPHY;  
PATTERSON, ABBY RAE;  
ROOF, MICHAEL B.;  
VAUGHN, ERIC MARTIN;  
VICTORIA, JOSEPH GILBERT y  
VISEK, CALLIE ANN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 689 515 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Parvovirus porcino 5A, métodos de uso y vacuna

5 Antecedentes de la invención

A. Campo de la invención

10 La presente invención pertenece al campo de salud animal y se refiere a novedosas cepas de parvovirus porcino, incluyendo cepas atenuadas para vacunación, métodos de fabricación y métodos de tratamiento usando vacunas obtenidas de dichas novedosas cepas de parvovirus.

B. Descripción de la técnica relacionada

15 Los parvovirus infectan una amplia diversidad de especies animales, y algunos de ellos son responsables de varias enfermedades clínicas, pero la mayoría de estos virus causan únicamente infecciones leves o subclínicas. Pertenecen a la familia *Parvoviridae* y forman dos subfamilias: *Densovirinae*, cuyos miembros infectan a insectos, y *Parvovirinae*, cuyos miembros infectan vertebrados. La última subfamilia actualmente incluye cinco géneros: *Dependovirus*, *Erythrovirus*, *Amdovirus*, *Bocavirus* y *Parvovirus* (1).

20 Los viriones de parvovirus no tienen envuelta y contienen genomas de ADN lineal monocatenario de aproximadamente 5-6 kilobases (kb). El genoma consiste en dos fases de lectura abierta (ORF) principales que codifican proteínas no estructurales y de la cápside. Los bocavirus recién descritos portan una tercera ORF, entre las dos ORF principales (1).

25 Las cepas de parvovirus porcino clásico (PPV1) del género *Parvovirus* están ampliamente distribuidas por todo el mundo y son responsables de trastornos reproductores de los cerdos, especialmente en piaras donde no se han seguido protocolos de vacunación correctamente o está disminuida la eficacia de la vacuna debido a factores inmunosupresores. Durante la última década, se han detectado varios parvovirus nuevos en cerdos. Estos incluyen el parvovirus porcino 2 (PPV2) (2) y virus relacionados (3). Un nuevo grupo de parvovirus porcinos y bovinos, concretamente los hokovirus (PHoV, BHoV), se identificaron en Hong Kong (4), y se encontró que estos virus eran genéticamente similares a PARV4 y 5. Aunque se llamaron originalmente hokovirus después de Hong Kong, se propuso una nueva clasificación de PHoV como PPV3 (5). PPV4 muestra la máxima similitud con parvovirus bovino 2, pero la capacidad codificante y la organización del genoma son similares a los bocavirus, ya que PPV4 codifica una ORF3 adicional como los bocavirus, ubicada entre ORF1 y ORF2. La proteína ORF3 putativa codificada por PPV4, sin embargo, es bastante diferente de la de bocavirus (5).

La técnica anterior adicional es la siguiente:

40 J Gorodkin, secuencia de ARNm, GenBank EV966948  
 J Gorodkin, secuencia de ARNm, GenBank EV964070.2  
 documento WO 02/068698 A2  
 A. Jozwik et al., J Gen Virol 2009, 90(10): 2437-2441  
 C.-T. Xiao et al., Genome Announcements 2013, 1(11): e00021-12  
 45 C.-T. Xiao et al., PLOS ONE, 2013, 8(6): página e65312  
 Rui Wu et al., Archives of Virology 2013

50 Existe una necesidad actual de controlar los cerdos para la aparición de nuevos virus, y de desarrollar vacunas, tratamientos y métodos de detección de nuevos virus.

Sumario de la invención

En el sentido más amplio, la invención es como se define en las reivindicaciones.

55 La presente invención proporciona secuencias de nucleótidos novedosas, secuencias de proteínas, composiciones inmunógenas, vacunas y métodos que se refieren a la generación y el uso de nuevas cepas de parvovirus que infectan, entre otros, a cerdos domésticos. Estas cepas se refieren al parvovirus porcino novedoso identificado en muestras tisulares de cerdos domésticos con enfermedad clínica; basándose en la homología de secuencia con especies y cepas de parvovirus porcino conocidas, el virus novedoso se denominó parvovirus porcino 5A o PPV5A.

60 Las composiciones y métodos de la invención proporcionan la detección de infecciones por dicho nuevo virus, el control de cambios genéticos en las secuencias víricas en animales y piaras silvestres y domésticas y la generación y uso de vacunas novedosas para proteger a los animales de infección por el virus.

Las composiciones inmunógenas y vacunas de la invención comprenden secuencias polipeptídicas codificadas por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:1, incluyendo opcionalmente adyuvantes para inducir una respuesta inmunógena más robusta.

5 Las composiciones ejemplares comprenden una cualquiera de las secuencias polipeptídicas de la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ NO:4, que son inmunorreactivas para anticuerpos específicos para PPV5A. Los polipéptidos preferidos incluyen las secuencias de la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, en particular la SEQ ID NO:4. Preferiblemente, esos polipéptidos son inmunorreactivos para anticuerpos específicos para PPV5A.

10 En otro aspecto, la invención proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más polipéptidos, construcciones de anticuerpo o conjugados de anticuerpo. Las secuencias génicas que codifican los polipéptidos comprenden una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 95 %, 90 %, 85 % o incluso un 80 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO:1, en particular, las secuencias de nucleótidos 2845-5547 de la SEQ ID NO:1 (la proteína de la cápside), que codifica un polipéptido que es inmunorreactivo con anticuerpos específicos para PPV5A.  
15 Las secuencias de ácido nucleico ejemplares de la invención incluyen una cualquiera de las secuencias de nucleótidos 1975-2844 de la SEQ ID NO:1, y los nucleótidos 2845-5547 de la SEQ ID NO:1 que codifican un polipéptido que es inmunorreactivo con un anticuerpo específico para PPV5A. Preferiblemente, las secuencias de ácido nucleico, o genes, son aquellas que codifican un polipéptido o péptido que es inmunorreactivo con un anticuerpo específico para PPV5A.

20 Además, un polipéptido de la invención como se usa en este documento incluye, aunque sin limitación, un polipéptido que comprende:

- 25 i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3;
- ii) un polipéptido que es al menos un 80 % idéntico al polipéptido de i);
- iii) un polipéptido de ORF3 que está codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos 1975-2844 de la SEQ ID NO:1, o el polipéptido de la cápside codificado por un polinucleótido que comprende los nucleótidos 2845-5547 de la SEQ ID NO:1;
- 30 iv) un polipéptido que está codificado por un polinucleótido que es al menos un 80 % idéntico al polinucleótido de iii);

Las composiciones inmunógenas de la invención que comprenden al menos uno o más polipéptidos de PPV5A como se define en este documento, pueden comprender además un vehículo fisiológicamente aceptable tal como un vehículo, adyuvante o combinación de los mismos farmacéutica o veterinariamente aceptable.

35 Cualquiera de los polipéptidos de PPV5A proporcionado en la presente o cualquier composición inmunógena que comprenda uno más de estos polipéptidos de PPV5A proporcionados con la presente pueden usarse como medicamento, preferiblemente como una vacuna o composición inmunógena, mucho más preferiblemente para la profilaxis o tratamiento de un sujeto contra una infección por PPV5A.

40 Los polipéptidos de PPV5A particularmente preferidos incluyen aquellos con epítomos inmunógenos que inducen una respuesta inmunológica que es específica para PPV5A. Los polipéptidos de PPVA preferidos incluyen aquellos que tienen una secuencia de aminoácidos predicha en PPV1 relacionada como antígenos de superficie (Simpson et al., JMB 315, 2002) e incluyen, aunque sin limitación, los restos 141-156, 272-278 y 329-339 de la SEQ ID NO:4.

45 Los expertos en la materia entenderán que las composiciones usadas en este documento pueden incorporar soluciones estériles fisiológicamente aceptables inyectables conocidas. Para preparar una solución lista para su uso para inyección parenteral o infusión, están fácilmente disponibles soluciones isotónicas acuosas, por ejemplo, solución salina o soluciones de proteína plasmática. Además, las composiciones inmunógenas y de vacuna de la presente invención pueden incluir vehículos, diluyentes, agentes isotónicos, estabilizantes o adyuvantes veterinariamente aceptables.

50 La invención incluye las composiciones de la invención para su uso en un método de provocación de una respuesta inmunitaria contra una infección por PPV5A en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición inmunógena que comprende uno o más polipéptidos de PPV5A como se define en este documento. Preferiblemente, la respuesta inmunitaria se provoca contra más de un serotipo o cepa de PPV5A. Las composiciones de la invención pueden usarse para tratar o como alternativa para prevenir una infección por PPV5A. Preferiblemente, dicha respuesta inmunitaria reduce la incidencia o la gravedad de uno o más signos clínicos asociados con o causados por la infección con uno o más serotipos de PPV5A.

55 En este documento, los sujetos adecuados y los sujetos que lo necesitan a los que se les puede administrar las composiciones de la invención incluyen animales que necesitan profilaxis o tratamiento para una infección, enfermedad o afección asociada a virus, microbios, parásitos, protozoos, bacterias u hongos. Los animales en que se estimula la respuesta inmunitaria por el uso de composiciones de la invención incluyen ganadería, tal como porcina, bovina, aviar (por ejemplo, pollos, patos, gansos o pavos) caprina y ovina, y animales domésticos, tales

como ratones, conejos, perros, gatos y caballos. Los animales preferidos incluyen cerdos, múridos, equinos, lagomorfos y bóvidos. Mucho más preferiblemente, se estimula una respuesta inmunitaria en cerdos.

La invención también proporciona las composiciones de la invención para su uso en un método de reducción de la incidencia o la gravedad de uno o más signos clínicos asociados con o causados por infección por PPV5A, que comprenden la etapa de administrar una composición inmunógena de la invención que comprende uno o más péptidos de PPV5A proporcionados en la presente y preferiblemente una molécula de vehículo, de modo que se reduce la incidencia o la gravedad de un signo clínico de la infección por PPV5A en al menos un 10 %, preferiblemente al menos un 20 %, incluso más preferiblemente al menos un 30 %, incluso más preferiblemente al menos un 50 %, incluso más preferiblemente al menos un 70 %, mucho más preferiblemente al menos un 100 % respecto a un sujeto que no ha recibido la composición inmunógena proporcionada en la presente. Dichos signos clínicos incluyen viremia e inmunosupresión como resultado de una infección con PPV5A en solitario. Dichos signos clínicos pueden incluir signos neurológicos (depresión, ataxia, letargia), diarrea, disnea, pérdida de estado físico, inflamación de las articulaciones (que provoca cojera y postración), disminución en el promedio diario de ganancia de peso, mortalidad y poliserositis como resultado de una coinfección con otro organismo, por ejemplo, *Mycoplasma hyorhinis*.

De acuerdo con aspecto adicional, la presente invención también se refiere a las composiciones de la invención para su uso en un método para la profilaxis de una infección por PPV5A, en el que dicha infección por PPV5A puede estar causada por PPV5A que tiene un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO 1, 2, 3 y/o 4, que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO 1, 2, 3 y/o 4, que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO 1, 2, 3 y/o 4, o que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO 1, 2, 3 y/o 4, que comprenden la etapa de administrar una composición inmunógena de la invención que comprende uno o más péptidos de PPV5A proporcionados en la presente.

También se proporciona un método de preparación de cualquiera de las composiciones inmunógenas proporcionadas en la presente, comprendiendo ese método mezclar uno o más péptidos de PPV5A proporcionados en la presente con una molécula de vehículo, preferiblemente de modo que el uno o más péptidos de PPV5A y la molécula de vehículo se acoplen covalentemente o conjuguen entre sí. Dichos conjugados pueden ser multivalentes o univalentes. Las composiciones y vacunas multivalentes incluyen inmunoconjugación de múltiples péptidos de PPV5A con una molécula de vehículo. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método de producción de uno o más péptidos de PPV5A, comprendiendo ese método transformar una célula hospedadora, preferiblemente una célula procariota tal como *E. coli* con una molécula de ácido nucleico que codifica cualquiera de los péptidos de PPV5A proporcionados en la presente. Como alternativa, la célula hospedadora puede ser una célula eucariota tal como una célula de animal, una célula de insecto, una célula de protista, una célula de planta o una célula fúngica. Preferiblemente, la célula eucariota es una célula de mamífero tal como CHO, BHK o COS, o una célula fúngica tal como *Saccharomyces cerevisiae*, o una célula de insecto tal como Sf9. También se prefiere la expresión de baculovirus de los ácidos nucleicos de la presente invención.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un método de producción de uno o más péptidos de PPV5A que inducen una respuesta inmunitaria contra al menos una variante genética de PPV5A y más preferiblemente dos o más variantes genéticas de PPV5A. Esto comprende cultivar un vector de expresión transformado que codifica y que expresa uno o más péptidos de PPV5A divulgados en este documento. Las proteínas expresadas se retienen por el organismo de expresión o se secretan en el medio de cultivo. La expresión se realiza en condiciones suficientes para producir un péptido de PPV5A que pueda inducir una respuesta inmunitaria contra PPV5A. Los serotipos de PPV5A para los que los péptidos de PPV5A inducen una respuesta inmunitaria incluyen, aunque sin limitación, secuencias que tienen al menos un 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91 o 90 % de identidad.

Los métodos de generación de composiciones de la invención pueden comprender además mezclar el conjugado de uno o más péptidos de PPV5A y una molécula de vehículo con un vehículo fisiológicamente aceptable tal como un vehículo, adyuvante o combinación de los mismos farmacéutica o veterinariamente aceptable. Los expertos en la materia reconocerán que la elección del vehículo, adyuvante o combinación se determinará por la vía de suministro, la preferencia personal y la especie animal entre otras cosas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de diagnóstico de una infección por PPV5A en un sujeto. Ese método comprende proporcionar uno o más péptidos de PPV5A; poner en contacto el uno o más péptidos de PPV5A con una muestra obtenida del sujeto; e identificar al sujeto con una infección de PPV5A si se detecta un anticuerpo que puede unirse al uno o más péptidos de PPV5A en la muestra.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de comprobación de que un sujeto se ha expuesto previamente a una infección por PPV5A y puede expresar una respuesta inmunitaria contra PPV5A. Ese método comprende proporcionar uno o más péptidos de PPV5A; poner en contacto el uno o más péptidos de PPV5A con una muestra obtenida del sujeto; e identificar al sujeto con una infección de PPV5A si se detecta un anticuerpo que puede unirse al uno o más péptidos de PPV5A en la muestra.

5 La invención también proporciona kits que comprenden una composición inmunógena que comprende uno o más péptidos de PPV5A como se define en las reivindicaciones, preferiblemente junto con una molécula de vehículo; un recipiente para envasar la composición inmunógena; un conjunto de instrucciones impresas; y un dispensador que puede administrar la composición inmunógena a un animal. Opcionalmente, el uno o más péptidos de PPV5A y la molécula de vehículo pueden envasarse como un conjugado o como compuestos diferentes. Cuando se suministran por separado, también se suministra un medio de conjugación del uno o más péptidos de PPV5A y la molécula de vehículo, así como instrucciones impresas apropiadas.

10 La invención también proporciona kits para la vacunación de un animal, que comprende un conjunto de instrucciones impresas; un dispensador que puede administrar la composición inmunógena proporcionada en la presente, que comprende uno o más péptidos de PPV5A a un animal; y en los que al menos de uno de los péptidos de PPV5A inmuniza de forma eficaz al animal contra al menos una enfermedad asociada con infección por PPV5A. EL uno o más péptidos de PPV5A se seleccionan de los definidos en las reivindicaciones. Los kits de la invención pueden comprender además un vehículo, adyuvante o combinación de los mismos veterinariamente aceptable.

15 El dispensador en un kit de la invención puede dispensar sus contenidos como gotas; y la composición inmunógena que comprende los péptidos de PPV5A proporcionados en la presente incluida en el kit puede reducir la gravedad de al menos un signo clínico de una infección por PPV5A cuando se administra por vía intranasal, oral, intradérmica o intramuscular a un animal. Preferiblemente, la gravedad de un signo clínico se reduce en al menos un 10 %, preferiblemente en al menos un 20 %, incluso más preferiblemente en al menos un 30 %, incluso más preferiblemente en al menos un 50 %, incluso más preferiblemente en al menos un 70 %, mucho más preferiblemente en al menos un 100 % en comparación con un animal infectado no tratado.

20 También se divulgan métodos para el tratamiento o la profilaxis de infecciones causadas por PPV5A. El método comprende administrar una cantidad eficaz de la composición inmunógena de la presente divulgación a un sujeto, en el que dicho tratamiento o profilaxis se seleccionadas del grupo que consiste en reducir los signos de infección por PPV5A, reducir la gravedad o la incidencia de los signos clínicos de infección por PPV5A, reducir la mortalidad de los sujetos por infección por PPV5A y combinaciones de los mismos.

25 Las composiciones de la invención comprenden además un vehículo, adyuvante o combinación de los mismos veterinariamente aceptable. Dichas composiciones pueden usarse como una vacuna y comprenden una o más vacunas atenuadas adicionales, vacunas inactivadas o combinaciones de las mismas. Dichas vacunas provocan una respuesta inmunológica protectora contra al menos una enfermedad asociada con virus seleccionados del grupo que consiste en parvovirus porcino 1, 2, 3, 4, 5A, 5B, otras especies de parvovirus porcino, otros virus patógenos porcinos y bacterias, y combinaciones de los mismos. Otros tipos de vacunas que podrían administrarse en combinación con una vacuna contra PPV5A incluyen, aunque sin limitación, circovirus porcino de tipo 2 (por ejemplo, Ingelvac® CircoFLEX, Ingelvac® CircoFLEX-MycofLEX), virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (por ejemplo, Ingelvac® PRRS ATP, Ingelvac® PRRSV MLV), parvovirus porcino (por ejemplo, ReproCyc® PRRSV-PLE), *Mycoplasma* (por ejemplo, Ingelvac® MycoFLEX), etc.

30 Los expertos en la materia entenderán que las composiciones usadas en este documento pueden incorporar soluciones estériles fisiológicamente aceptables inyectables conocidas. Para preparar una solución lista para su uso para inyección parenteral o infusión, están fácilmente disponibles soluciones isotónicas acuosas, por ejemplo, solución salina o soluciones de proteína plasmática. Además, las composiciones inmunógenas y de vacuna de la presente invención pueden incluir vehículos, diluyentes, agentes isotónicos, estabilizantes o adyuvantes veterinariamente aceptables.

35 Los métodos de la divulgación también pueden comprender la mezcla de una composición de la invención con un vehículo, adyuvante o combinación de los mismos veterinariamente aceptable. Los expertos en la materia reconocerán que la elección del vehículo, adyuvante o combinación se determinará por la vía de suministro, la preferencia personal y la especie animal entre otras cosas.

40 La invención también proporciona las composiciones de la invención para su uso en un método de reducción de la gravedad de una infección por PPV5A en curso en un animal mediante la administración de una composición al animal. La composición puede incluir un cultivo de virus atenuado o uno o más péptidos de PPV5A en combinación con un vehículo veterinariamente aceptable.

45 Las vías preferidas de administración incluyen intranasal, oral (por ejemplo, en el agua para beber), intradérmica e intramuscular. Se prefiere la administración intramuscular, muy preferiblemente en una única dosis. Los expertos en la materia reconocerán que las composiciones de la invención también pueden administrarse en dos o más dosis, así como por otras vías de administración. Por ejemplo, dichas otras vías incluyen vía subcutánea, intracutánea, intravenosa, intravascular, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intratraqueal, intracutánea, intracardiaca, intralobular, intramedular, intrapulmonar o intravaginal. Dependiendo de la duración deseada y de la eficacia del tratamiento, las composiciones de acuerdo con la invención pueden administrarse una o varias veces, también de forma intermitente, por ejemplo, en una base diaria durante varios días, semanas o meses y en diferentes dosificaciones.

5 La divulgación también proporciona kits para la vacunación de un animal, que comprende un conjunto de instrucciones impresas; un dispensador que puede administrar una vacuna a un animal; y al menos un aislado de un cultivo celular, incluyendo, aunque sin limitación, un cultivo celular bacteriano, fúngico, de insecto o de mamífero que inmunice de forma eficaz al animal contra al menos una enfermedad asociada con PPV5A, otras cepas de parvovirus, otros patógenos y/o una combinación de los mismos. Los kits de la divulgación pueden comprender además un vehículo, adyuvante o combinación de los mismos veterinariamente aceptable.

10 El dispensador en un kit de la divulgación puede dispensar sus contenidos como gotas; y el aislado incluido en el kit puede reducir la gravedad de al menos un signo clínico de una infección por PPV5A cuando se administra por vía intranasal, oral, intradérmica o intramuscular a un animal. En algunos kits, el aislado también puede reducir la gravedad de al menos un signo clínico de una infección por PPV5A. Preferiblemente, la gravedad de un signo clínico se reduce en al menos un 10 % en comparación con un animal infectado no tratado.

15 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan a modo de ilustración únicamente, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención llegarán a ser evidentes para los expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

20 Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en este documento. La solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Las copias de esta publicación de solicitud de patente con uno o más dibujos en color se proporcionarán por la oficina a petición y tras pago de la tasa necesaria.

25 La FIG. 1 muestra la secuencia de ácido nucleico de PPV5A (SEQ ID NO:1).  
 La FIG. 2 muestra la secuencia proteínica de la replicasa de PPV5A (SEQ ID NO:2).  
 30 La FIG. 3 muestra la secuencia proteínica de la fase abierta de lectura (ORF) de la proteína de PPV5A (SEQ ID NO:3).  
 La FIG. 4 muestra la secuencia proteínica de la proteína de la cápside de PPV5A (SEQ ID NO:4).  
 La FIG. 5 muestra comparaciones por parejas de identidad de aminoácidos de las secuencias proteínicas de la proteína de la cápside de PPV5A y otras numerosas secuencias víricas. Se enumeran referencias para las  
 35 secuencias víricas en la tabla 1:

TABLA 1

Secuencia	ID de GenBank	Información de la revista	Autores
[1] Bovino	DQ_335247	J. Virol. 81 (21), 12080-12085 (2007)	Qiu,J., Cheng,F., Johnson,F.B. y Pintel,D
[2] Canino Diminuto	NP_758521	Virology 302 (2), 219-223 (2002)	Schwartz,D., Green,B., Carmichael,L.E. y Parrish, C.R.
[3] GboV	NC_014358	PLoS ONE 5 (7), E11948 (2010)	Kapoor,A., Mehta,N., Esper,F., Poljsak-Prijatelj,M., Quan,P.L., Qaisar,N., Delwart,E. y Lipkin,W.I
[4] PBoV1a	HM_053693	PLoS ONE 5 (10), E13583 (2010)	Cheng,W.X., Li,J.S., Huang,C.P., Yao,D.P., Liu,N., Cui,S.X., Jin,Y. y Duan,Z.J.
[5] PBoV1b	HM_053694	PLoS ONE 5 (10), E13583 (2010)	Cheng,W.X., Li,J.S., Huang,C.P., Yao,D.P., Liu,N., Cui,S.X., Jin,Y. y Duan,Z.J.
[6] HuBoca	NC_007455	Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 102 (36), 12891-12896 (2005)	Allander,T., Tammi,M.T., Eriksson,M., Bjerkner,A., Tiveljung-Lindell,A. y Andersson,B.
[7] HuBoca2	NC_012042	J. Infect. Dis. 199 (2), 196-200 (2009)	Kapoor,A., Slikas,E., Simmonds,P., Chieochansin, T., Naeem,A., Shaukat,S., Alam,M.M., Sharif,S., Angez,M., Zaidi,S. y Delwart,E.
[8] HuBoca3	NC_012564	PLoS Pathog. 5 (4), E1000391 (2009)	Arthur,J.L., Higgins,G.D., Davidson,G.P., Givney, R.C. y Ratcliff,R.M.
[9] HuBoca4	NC_012729	J. Infect. Dis. 201 (11), 1633-1643 (2010)	Kapoor,A., Simmonds,P., Slikas,E., Li,L., Bodhidatta, L., Sethabutr,O., Triki,H., Bahri,O., Oderinde,B.S., Baba,M.M., Bukbuk,D.N., Besser,J., Bartkus,J. y Delwart,E.
[10] Densovirus	NC_004287	PRESENTACIÓN DIRECTA A GENBANK	Nonaka,K., Chiba,T., Nakahara,S., Kajjura,Z. y Nakagaki,M.

Secuencia	ID de GenBank	Información de la revista	Autores
[11] Hokovirus_a	GQ_869543	Viol. J. 7, 171 (2010)	Adlhoch,C., Kaiser,M., Ellerbrok,H. y Pauli,G.
[12] Hokovirus_b	EU_200677	J. Gen. Virol. 89 (PT 8), 1840-1848 (2008)	Lau,S.K., Woo,P.C., Tse,H., Fu,C.T., Au,W.K., Chen, X.C., Tsoi,H.W., Tsang,T.H., Chan,J.S., Tsang,D.N., Li,K.S., Tse,C.W., Ng,T.K., Tsang,O.T., Zheng,B.J., Tam,S., Chan,K.H., Zhou,B. y Yuen,K.Y.
[13] PPV4a	HM_031135	Viol. J. 7 (1), 333 (2010)	Huang,L., Zhai,S.L., Cheung,A.K., Zhang,H.B., Long,J.X. y Yuan,S.S
[14] PPV4b	GQ_387499	Arch. Virol. 155 (5), 801-806 (2010)	Cheung,A.K., Wu,G., Wang,D., Bayles,D.O., Lager, K.M. y Vincent,A.L.
[15] PPV5A			
[16] PPV1	NC_001718	Virology 197 (1), 86-98 (1993)	Bergeron, J., Menezes, J. y Tijssen,P.

La FIG. 6 muestra un análisis filogenético de la región VP1/CAP de PPV5A en comparación con otras proteínas VP1 y de la cápside víricas enumeradas en la tabla 1.

La FIG. 7 muestra identidades de la proteína de la cápside de PPV5A (restos 55-792 de la SEQ ID NO:4) con la proteína más estrechamente relacionada de PPV4 (n.º de acceso a GenBank AFM73871 (SEQ ID NO: 5)), que muestra una identidad de secuencia de un 40 % (310/774).

La FIG. 8 muestra identidades de la proteína replicasa de PPV5A (restos 15-516 de la SEQ ID NO:2) con la proteína más estrechamente relacionada de PPV4 (n.º de acceso a GenBank ADB20210 (SEQ ID NO: 11)), que muestra una identidad de secuencia de un 58 % (292/504).

#### Descripción detallada

La invención proporciona ácidos nucleicos, polipéptidos, vacunas, preparaciones inmunológicamente eficaces, anticuerpos, ensayos de diagnóstico y kits, y métodos de generación y uso de dichas composiciones y preparaciones, relacionados con el novedoso parvovirus porcino 5A divulgado en este documento y variantes del mismo, como se define en las reivindicaciones.

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante, química de proteínas e inmunología, que están dentro de las habilidades en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. I, II y III, Segunda Edición (1989); DNA Cloning, Vol. I y II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Animal Cell Culture (R. K. Freshney ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL press, 1986); Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); la serie, Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Protein purification methods - a practical approach (E.L.V. Harris and S. Angal, eds., IRL Press at Oxford University Press); and Handbook of Experimental Immunology, Vol. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no está limitada a un ADN, secuencias polipeptídicas o parámetros del proceso particulares ya que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en este documento es con el fin de describir realizaciones particulares de la invención únicamente, y no pretende ser limitante. Debe apreciarse que, como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "uno", "una" y "el", "la" incluyen referencias plurales salvo que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, una referencia a "un antígeno" incluye una mezcla de dos o más antígenos, una referencia a "un excipiente" incluye mezclas de dos o más excipientes, y similares.

#### A. Definiciones

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la cual pertenece esta invención en el momento de la presentación. El significado y el alcance de los términos debe ser claro; sin embargo, en el caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en este documento adoptarán precedente sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca. Además, salvo que se requiera de otro modo por el contexto, las formas singulares incluirán pluralidades y términos plurales incluirán el singular. En el presente documento, el uso de "o" significa "y/o" salvo que se indique de otro modo. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas tales como "incluye" e "incluido" no es limitante.

- "Protección contra enfermedad", "inmunidad protectora", "inmunidad funcional" y expresiones similares, significan una respuesta contra una enfermedad o afección generada por la administración de una o más composiciones terapéuticas de la invención, o una combinación de las mismas, que provoca menos efectos perjudiciales de lo que se esperaría en un sujeto no inmunizado que se ha expuesto a la enfermedad o infección. Es decir, la gravedad de los efectos perjudiciales de la invención se reducen en un sujeto vacunado. La infección puede reducirse, ralentizarse o posiblemente prevenirse completamente en un sujeto vacunado. En este documento, cuando se entiende prevención completa de la infección, se indica específicamente. Si no se indica prevención completa entonces el término incluye prevención parcial.
- En este documento, "reducción de la incidencia y/o de la gravedad de los signos clínicos" o "reducción de los síntomas clínicos" significa, aunque sin limitación, reducir la cantidad de sujetos infectados en un grupo, reducir o eliminar la cantidad de sujetos que muestran signos clínicos de infección o reducir la gravedad de cualquier signo clínico que esté presente en uno o más sujetos, en comparación con infección de tipo silvestre. Por ejemplo, debe hacer referencia a cualquier reducción de la carga del patógeno, desprendimiento del patógeno, reducción en la transmisión del patógeno o reducción de cualquier signo clínico sintomático de infección con PPV5A. Preferiblemente, estos signos clínicos se reducen en uno o más sujetos que reciben la composición terapéutica de la presente invención en al menos un 10 % en comparación con sujetos que no reciben la composición y que quedan infectados. Más preferiblemente, se reducen signos clínicos en sujetos que reciben una composición de la presente invención en al menos un 20 %, preferiblemente en al menos un 30 %, más preferiblemente en al menos un 40 %, e incluso más preferiblemente en al menos un 50 %.
- La expresión "protección aumentada" en este documento significa, aunque sin limitación, una reducción significativa de uno o más síntomas clínicos que están asociados con infección por un agente infeccioso, preferiblemente PPV5A, en un grupo vacunado de sujetos frente a un grupo de control no vacunado de sujetos. La expresión "reducción significativa de síntomas clínicos" significa, aunque sin limitación, que la frecuencia en la incidencia de al menos un síntoma clínico en el grupo vacunado de sujetos es de al menos un 10 %, preferiblemente un 20 %, más preferiblemente un 30 %, incluso más preferiblemente un 50 %, e incluso más preferiblemente un 70 % inferior que en el grupo de control no vacunado después de la exposición al agente infeccioso.
- "Protección de larga duración" se referirá a "eficacia mejorada" que persiste durante al menos 3 semanas, pero más preferiblemente al menos 3 meses, aún más preferiblemente al menos 6 meses. En el caso de ganado, es más preferido que la protección de larga duración persista hasta la edad promedio en que los animales se comercializan por su carne.
- Una "composición inmunógena o inmunológica" se refiere a una composición de materia que comprende al menos una proteína o polipéptido de PPV5A, o parte inmunógena del mismo, que provoca una respuesta inmunológica en el hospedador de una respuesta inmunitaria celular o mediada por anticuerpos a la composición. En una realización preferida de la presente invención, una composición inmunógena induce una respuesta inmunitaria y, más preferiblemente, confiere inmunidad protectora contra uno o más de los signos clínicos de una infección por PPV5A.
- Un polipéptido de PPV5A "inmunógeno" o "antígeno" como se usa en este documento se refiere a un polipéptido o proteína que provoca una respuesta inmunológica como se describe en este documento. Una proteína o polipéptido de PPV5A "inmunógeno" incluye la secuencia de longitud completa de cualquiera de las secuencias codificantes identificadas en este documento o análogos o fragmentos inmunógenos de los mismos, como se define en las reivindicaciones. El término "epítipo" significa un segmento o fragmento de la composición de materia, por ejemplo, una proteína o polipéptido, que se reconoce por el sistema inmunitario, específicamente por anticuerpos, linfocitos B o linfocitos T. El epítipo generalmente es un fragmento o fragmentos de una secuencia polipeptídica de una proteína vírica.
- Dichos fragmentos pueden identificarse usando innumerables técnicas de cartografiado de epítipos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, pueden determinarse epítipos lineales sintetizando simultáneamente grandes cantidades de péptidos en soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a partes de la molécula proteínica, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras que los péptidos aún están adheridos a los soportes. Dichas técnicas son conocidas y se describen en la técnica, véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.708.871; Geysen et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; y Geysen et al., (1986) Molec. Immunol. 23:709-715. Asimismo, los epítipos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de aminoácidos tal como, por ejemplo, por cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase Epitope Mapping Protocols, supra. También se incluyen antígenos sintéticos dentro de la definición, por ejemplo, poliepítipos, epítipos flanqueantes y otros antígenos recombinantes o derivados sintéticamente. Véase, por ejemplo, Bergmann et al., (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann et al., (1996), J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75:402-408; y Gardner et al., (1998) 12.ª Conferencia Mundial sobre el SIDA, Ginebra, Suiza, 28 de junio-3 de julio, 1998)
- Una "respuesta inmunitaria" o "respuesta inmunológica" significa, aunque sin limitación, el desarrollo de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos contra la composición o la vacuna de interés.



Habitualmente, una respuesta inmunitaria o inmunológica incluye, aunque sin limitación, uno o más de los siguientes efectos: la producción o la activación de anticuerpos, linfocitos B, linfocitos T auxiliares, linfocitos T supresores y/o linfocitos T citotóxicos, dirigidos específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el hospedador presentará una respuesta terapéutica o inmunológica (de memoria) protectora de modo que se potencie la resistencia contra una nueva infección y/o se reduzca la gravedad clínica de la enfermedad. Dicha protección se demostrará por una reducción en la cantidad de síntomas, la gravedad de los síntomas o la ausencia de uno o más de los síntomas asociados con la infección del patógeno, un retardo en la aparición de viremia, persistencia vírica reducida, una reducción en la carga vírica global y/o una reducción de la excreción vírica.

En este documento, "específicamente inmunorreactivo" se refiere a una proteína o polipéptido inmunorreactivo que reconoce un antígeno característico de infección por PPV5A, pero que no reacciona con un antígeno característico de un control de exposición estricto. Para determinar la especificidad de una proteína inmunorreactiva de PPV5A potencial u otro polipéptido, se usarían diversos inmunoensayos (ELISA, IFA, transferencia de Western) para ensayar la proteína contra suero animal que contiene virus genéticamente similares. La proteína también se ensayaría en diversos inmunoensayos contra material que contiene proteínas relacionadas con el método de expresión (baculovirus, células Sf9, etc.).

Como se usa en este documento, "un vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable" o "excipiente" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardadores de la adsorción y similares. En algunos aspectos preferidos, y especialmente que incluyen composiciones inmunógenas liofilizadas, los agentes estabilizantes incluyen estabilizantes para liofilización o secado por congelación.

En algunos aspectos, la composición inmunógena contiene un adyuvante. "Adyuvantes" como se usa en este documento, puede incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, por ejemplo, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua, emulsión de agua en aceite en agua. La emulsión puede basarse en particular en aceite de parafina líquida ligera (del tipo de la farmacopea europea); aceite isoprenoide tal como escualano o escualeno; aceite resultante de la oligomerización de alquenos, en particular de isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, más particularmente aceites vegetales, oleato de etilo, di-(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri-(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos ramificados o alcoholes, en particular ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se usa en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son preferiblemente tensioactivos no iónicos, en particular ésteres de sorbitán, de manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol o de ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico o hidroxisteárico, que están opcionalmente etoxilados, y copolímero de bloque de polioxipropileno-polioxietileno, en particular los productos Pluronic, especialmente L121. Véase, Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), John Wiley and Sons, NY, pág. 51-94 (1995) y Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997). Los adyuvantes ejemplares son la emulsión SPT descrita en la página 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" editado por M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de este mismo libro.

Un caso adicional de un adyuvante es un compuesto elegido de los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueno. Los compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con éteres de polialqueno de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos por el término carbómero (Phameuropa Vol. 8, N.º 2, junio de 1996). Los expertos en la materia también pueden remitirse a la patente de Estados Unidos n.º 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, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos reemplazados por radicales alifáticos insaturados que tienen 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 por sí mismos contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos vendidos con el nombre Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EE. UU.) son particularmente apropiados. Están reticulados con una alil sacarosa o con una alil pentaeritritol. Entre ellos, pueden mencionarse Carbopol 974P, 934P y 971P. Es mucho más preferido el uso de Carbopol 971P. Entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueno, están los copolímeros EMA (Monsanto), que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno. La disolución de estos polímeros en agua da lugar a una solución ácida que se neutralizará, preferiblemente a pH fisiológico, para dar la solución adyuvante en que se incorporará la propia composición inmunógena, inmunológica o de vacuna.

Los adyuvantes adecuados adicionales incluyen, aunque sin limitación, el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), copolímero Block (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monofosforil lípido A, adyuvante de lípido-amina Avridine, enterotoxina termoinestable de *E. coli* (recombinante o de otro modo), toxina colérica, IMS 1314 o muramil dipéptido, o citocinas de origen natural o recombinantes o análogos de las mismas o estimulantes de la liberación de citocinas endógenas, entre muchos otros.

- Se espera que un adyuvante pueda añadirse en una cantidad de 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis, más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2,5 mg por dosis, y mucho más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis. Como alternativa, el adyuvante puede estar a una concentración de aproximadamente un 0,01 a un 50 %, preferiblemente a una concentración de aproximadamente un 2 % a un 30 %, más preferiblemente a una concentración de aproximadamente un 5 % a un 25 %, aún más preferiblemente a una concentración de aproximadamente un 7 % a un 22 %, y mucho más preferiblemente a una concentración de un 10 % a un 20 % en volumen del producto final.
- Los "diluyentes" pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina y sales alcalinas de ácido etilendiaminatetraacético, entre otros.
- "Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" de su estado natural, es decir, si se produce en la naturaleza, se ha cambiado o retirado de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido presente de forma natural en un organismo vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistente de su estado natural está "aislado", según se emplea el término en este documento.
- "Seguridad" se refiere a la ausencia de consecuencias adversas en un animal vacunado después de vacunación, incluyendo, aunque sin limitación: reversión potencial de una vacuna basada en virus vivo a virulencia, efectos secundarios clínicamente significativos tales como enfermedad persistente, sistémica o inflamación inaceptable en el sitio de la administración de la vacuna.
- Los términos "vacunación" o "vacunar" o variantes de los mismos, como se usan en este documento significan, aunque sin limitación, un proceso que incluye la administración de una composición inmunógena de la divulgación que, cuando se administra a un animal, provoca, o puede provocar - directa o indirectamente - una respuesta inmunitaria en el animal contra PPV5A.
- "Mortalidad", en el contexto de la presente divulgación, se refiere a muerte causada por infección por PPV5A, y/o coinfecciones con otros organismos que se potencian por infecciones de PPV5A, e incluye la situación en que la infección de esta manera es tan grave que se sacrifica a un animal para evitar que sufra y proporcionar un final humano a su vida.
- "Atenuación" significa reducir la virulencia de un patógeno. En la presente divulgación "atenuación" es sinónimo de "avirulento". Un virus atenuado es uno en que la virulencia se ha reducido de modo que no causa signos clínicos de infección por PPV5A, pero puede inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero diana, pero también significa que los signos clínicos se reducen en incidencia y en gravedad en animales infectados con el PPV5A atenuado en comparación con un "grupo de control" de animales infectados con PPV5A no atenuado y que no reciben el virus atenuado. En este contexto, el término "reducir/reducido" significa una reducción de al menos un 10 %, preferiblemente un 25 %, incluso más preferiblemente un 50 %, aún más preferiblemente un 60 %, incluso más preferiblemente un 70 %, aún más preferiblemente un 80 %, incluso más preferiblemente un 90 % y mucho más preferiblemente un 100 % en comparación con el grupo de control como se define anteriormente. Por tanto, un cepa PPV5A avirulenta atenuada es una que es adecuada para la incorporación en una composición inmunógena que comprende un virus PPV5A vivo modificado.
- "Muerto" o "inactivado" significa tratado con un agente físico o químico que hace que el virus PPV5A muera y/o no tenga capacidad de otro modo de reproducción. El PPV5A puede inactivarse por medios convencionales, tales como, por ejemplo, calor, radiación o psoraleno en presencia de luz ultravioleta. El PPV5A puede inactivarse por medios convencionales tales como, por ejemplo, mediante inactivación química usando uno o más agentes inactivadores químicos incluyendo, aunque sin limitación, uno o más de etileneimina binaria (BEI), beta-propiolactona, formolina, glutaraldehído y/o dodecilsulfato de sodio. Los métodos de atenuación de cepas virulentas de estos virus y métodos de generación de una preparación vírica inactivada son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, los documentos 4.567.042 y 4.567.043. Los antígenos de PPV5A para su uso en las composiciones de vacuna, por tanto, pueden estar en forma de un virus completo que es una preparación vírica viva modificada y/o atenuada o una preparación vírica muerta o inactivada, entre otras cosas.
- "Anticuerpos", como se usa en este documento incluye anticuerpos anti-PPV5A, por ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos, porcinos y con CDR injertadas, incluyendo compuestos que incluyen secuencias CDR que reconocen específicamente un polipéptido de PPV5A de la invención. La expresión "específico para" indica que las regiones variables de los anticuerpos de la invención reconocen y se unen a un polipéptido de PPV5A exclusivamente (es decir, pueden distinguir un único polipéptido de PPV5A de polipéptidos relacionados a pesar de la identidad de secuencia, la homología o la similitud encontrada en la familia de polipéptidos) y que se permiten (opcionalmente) interactuar con otras proteínas (por ejemplo, proteína A de *S. aureus* u otros anticuerpos en técnicas ELISA) mediante interacciones con secuencias fuera de la región variable de los anticuerpos y, en particular, en la región constante de la molécula de anticuerpo. Los ensayos de cribado para determinar la especificidad de unión de un

anticuerpo de la invención son bien conocidos y practicados de forma rutinaria en la técnica. Para un análisis exhaustivo de dichos ensayos, véase Harlow et al., (Eds), *Antibodies A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Capítulo 6*. Los anticuerpos que reconocen y se unen a fragmentos de los polipéptidos de PPV5A de la invención también se contemplan, con la condición que los anticuerpos sean principalmente y ante todo específicos para, como se define anteriormente, un polipéptido de PPV5A de la invención del cual se obtuvo el fragmento. Con fines de claridad, "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que puede unirse a un antígeno específico como resultado de una respuesta inmunitaria contra ese antígeno. Las inmunoglobulinas son proteínas séricas compuestas de cadenas polipeptídicas "ligeras" y "pesadas" que tienen regiones "constantes" y "variables" y se dividen en clases (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG y IgM) basándose en la composición de las regiones constantes. Los anticuerpos pueden existir en una diversidad de formas incluyendo, por ejemplo, como, Fv, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, así como en cadenas sencillas, e incluyen polipéptidos sintéticos que contienen todo o parte de una o más secuencias polipeptídicas de una cadena del anticuerpo.

En este documento, "dosis eficaz" significa, aunque sin limitación, una cantidad de antígeno que provoca, o puede provocar, una respuesta inmunitaria que produce una reducción de los síntomas clínicos en un animal al que se administra el antígeno.

Como se usa en este documento, la expresión "cantidad eficaz" significa, en el contexto de una composición, una cantidad de una composición inmunógena que puede inducir una respuesta inmunitaria que reduce la incidencia o disminuye la gravedad de la infección o episodio de la enfermedad en un animal. En particular, una cantidad eficaz de una preparación de virus vivo atenuado, medida por la cantidad de unidades formadoras de placas (UFP) por dosis o medida equivalente, se controla por la mediana de la dosis infecciosa de cultivo tisular (DICT50), es decir, la cantidad de un agente patógeno que producirá un cambio patológico en un 50 % de los cultivos celulares inoculados y susceptibles. Para una vacuna inactivada o subunidad antigénica, la cantidad eficaz se refiere al contenido relativo de antígeno (RAC), es decir, el nivel de inclusión de antígeno por dosis eficaz. Como alternativa, en el contexto de un tratamiento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un tratamiento que es suficiente para reducir o mejorar la gravedad o la duración de una enfermedad o trastorno, o uno o más síntomas del mismo, prevenir el avance de una enfermedad o trastorno, causar la regresión de una enfermedad o trastorno, prevenir la recidiva, el desarrollo, la aparición o la progresión de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o trastorno, o potenciar o mejorar la profilaxis o el tratamiento de otro tratamiento o agente terapéutico.

"Identidad de secuencia" como se conoce en la técnica se refiere a una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, concretamente una secuencia de referencia y una secuencia dada a comparar con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia se determina comparando la secuencia dada con la secuencia de referencia después de que las secuencias se hallan alineado de forma óptima para producir el máximo grado de similitud de secuencia, determinada por el emparejamiento entre hebras de dichas secuencias, con huecos introducidos si fuera necesario. Tras dicha alineación, la identidad de secuencia se averigua en una base posición a posición, por ejemplo, las secuencias son "idénticas" en una posición particular si en esa posición los nucleótidos o los restos aminoacídicos son idénticos. La cantidad total de dichas identidades de posición entonces se divide por la cantidad total de nucleótidos o de restos en la secuencia de referencia para dar el % de identidad de secuencia. La identidad de secuencia puede calcularse fácilmente por métodos conocidos, incluyendo, aunque sin limitación, los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Parte I*, Griffin, A.M. y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York (1991); y Carillo, H. y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad de secuencia se diseñan para dar el máximo emparejamiento entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad de secuencia están codificados en programas informáticos disponibles al público que determinan la identidad de secuencia entre secuencias dadas. Los ejemplos de dichos programas incluyen, aunque sin limitación, el paquete del programa GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN y BLASTX (Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible al público en el NCBI y en otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). Estos programas alinean de forma óptimas secuencias usando ponderaciones de hueco por defecto para producir el máximo nivel de identidad de secuencia entre las secuencias dada y de referencia. Como una ilustración, por un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos, por ejemplo, un 85 %, preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de "identidad de secuencia" con una secuencia de nucleótidos de referencia, se entiende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido dado es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia polinucleotídica dada puede incluir hasta 15, preferiblemente hasta 10, incluso más preferiblemente hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, en un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 85 %, preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad respecto a la secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 15 %, preferiblemente un 10 %, incluso más preferiblemente un 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede estar eliminada o sustituida con otro nucleótido, o varios nucleótidos hasta un 15 %, preferiblemente un 10 %, incluso más preferiblemente un 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia pueden estar insertados en la secuencia de referencia. Estas

mutaciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones 5' y 3' terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Asimismo, por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos dada que tiene al menos, por ejemplo, un 85 %, preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, se entiende que la secuencia de aminoácidos dada del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia polipeptídica dada puede incluir hasta 15, preferiblemente hasta 10, incluso más preferiblemente hasta 5 alteraciones de aminoácido por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia polipeptídica dada que tenga al menos un 85 %, preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta un 15 %, preferiblemente hasta un 10 %, incluso más preferiblemente hasta un 5 % de los restos aminoacídicos en la secuencia de referencia pueden estar eliminados o sustituidos con otro aminoácido, o varios aminoácidos hasta un 15 %, preferiblemente hasta un 10 %, incluso más preferiblemente hasta un 5 % de la cantidad total de restos aminoacídicos en la secuencia de referencia pueden estar insertados en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier otra parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los restos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferiblemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren por sustituciones conservativas de aminoácido. Sin embargo, las sustituciones conservativas no se incluyen como un emparejamiento cuando se determina la identidad de secuencia.

"Homología de secuencia" como se usa en este documento se refiere a un método de determinación de la relación de dos secuencias. Para determinar la homología de secuencia, dos o más secuencias se alinean de forma óptima, y se introducen huecos si fuera necesario. Sin embargo, en contraste con la "identidad de secuencia", las sustituciones conservativas de aminoácidos también se cuentan como emparejamiento cuando se determina la homología de secuencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga un 95 % de homología de secuencia con una secuencia de referencia, un 85 %, preferiblemente un 90 %, incluso más preferiblemente un 95 % de los restos aminoacídicos en la secuencia de referencia deben emparejar o comprender una sustitución conservativa con otro aminoácido, o varios aminoácidos hasta un 15 %, preferiblemente hasta un 10 %, incluso más preferiblemente hasta un 5 % de los restos aminoacídicos totales, sin incluir sustituciones conservativas, en la secuencia de referencia pueden estar insertados en la secuencia de referencia. Preferiblemente, la secuencia homóloga comprende al menos un tramo de 50, incluso más preferiblemente de 100, incluso más preferiblemente de 250, incluso más preferiblemente de 500 nucleótidos que codifican aminoácidos homólogos.

Una "sustitución conservativa" se refiere a la sustitución de un resto aminoacídico con otro resto aminoacídico que tiene características o propiedades similares incluyendo el tamaño, la hidrofobicidad, etc., de modo que la funcionalidad global no cambie significativamente. Esto puede significar una sustitución de nucleótido que provoque una sustitución conservativas de aminoácido.

## 40 B. Moléculas de vehículo

Las moléculas de vehículo con las que pueden conjugarse o unirse covalentemente las proteínas de PPV5A de la invención son preferiblemente aquellas descritas anteriormente. Los vehículos para uso animal son seroalbúmina bovina y hemocianina de lapa californiana. Preferiblemente, la propia proteína de vehículo es un inmunógeno.

Las proteínas de PPV5A de la invención pueden acoplarse covalentemente al vehículo por cualquier método conveniente conocido en la técnica. Aunque el uso de un conector simétrico tal como dihidracida de ácido adípico, como se describe por Schneerson et al., J. Experimental Medicine, 152, 361-376 (1980), o un conector heterobifuncional tal como 3-(2-piridilditio) propionato de N-succinimidilo como se describe por Fattom et al., Infection and Immunity, 56, 2292-2298 (1988) están dentro del alcance de la invención, se prefiere evitar el uso de cualquier conector, sino que en su lugar se acopla un péptido de PPV5A de la invención directamente a la molécula de vehículo. Dicho acoplamiento puede conseguirse mediante aminación reductora como se describe por Landi et al., J. Immunology, 127, 1011-1019 (1981).

El tamaño de la composición inmunógena, como se define por la masa molecular promedio, es variable y depende la proteína o proteínas de PPV5A elegidas y el método de acoplamiento de la proteína o proteínas de PPV5A al vehículo. Por lo tanto, puede ser tan pequeña como de 1000 dalton ( $10^3$ ) o de más de  $10^6$  dalton. Con el método de acoplamiento de aminación reductora, la masa molecular de la proteína o proteínas de PPV5A habitualmente está dentro del intervalo de 5000 a 500 000 o más; por ejemplo, para la proteína de la cápside, se predice que la masa molecular será de aproximadamente 80 000 dalton, que se predice que formará partículas de tipo virus (VLP) compuestas de 60 proteínas monoméricas.

Las moléculas de vehículo, es decir, péptidos, derivados y análogos de los mismos, y miméticos peptídicos que se unen específicamente a una proteína de PPV5A de la invención pueden producirse por diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, síntesis en fase sólida o por solución (Nakanishi et al., 1993, Gene

137:51-56; Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc. 15:2149-2154; Neurath, H. et al., Eds., The Proteins, Vol II, 3.<sup>a</sup> Ed., pág. 105-237, Academic Press, Nueva York, N.Y. (1976).

5 Las proteínas de PPV5A de la invención o los anticuerpos o partes de unión de los mismos de la presente invención pueden administrarse en dosificaciones inyectables por solución o suspensión en un diluyente con un vehículo farmacéutico o veterinario.

10 La seguridad y la eficacia de dichas moléculas se determinan por procedimientos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales como se describe y regula por el Center for Veterinary Biologics (CVB). La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichas moléculas pueden terminarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL<sub>50</sub> (la dosis letal al 50 % de la población).

15 Las vacunas de la invención pueden ser multivalentes o univalentes. Las vacunas multivalentes se preparan a partir de inmuconjugación de múltiples proteínas de PPV5A con una molécula de vehículo.

20 En un aspecto, las composiciones de proteína de PPV5A comprenden una cantidad inmunizante eficaz del conjugado inmunoégeno, preferiblemente en combinación con un inmunoestimulante; y un vehículo fisiológicamente aceptable. Como se usa en el presente contexto, "inmunoestimulante" pretende abarcar cualquier compuesto o composición que tenga la capacidad de potenciar la actividad del sistema inmunitario, ya sea un efecto potenciador específico en combinación con un antígeno específico, o simplemente un efecto independiente sobre la actividad de uno o más elementos de la respuesta inmunitaria. Los compuestos inmunoestimulantes incluyen, aunque sin limitación, geles minerales, por ejemplo, hidróxido de aluminio; sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluronic; polianiones; péptidos; emulsiones oleosas; alumbre y MDP. Los métodos de utilización de estos materiales son conocidos en la técnica, y pertenece a las capacidades de los expertos en la materia determinar una cantidad óptima de estimulante para una vacuna dada. Puede usarse más de un inmunoestimulante en una formulación dada. El inmunógeno también puede incorporarse en liposomas, o conjugarse con polisacáridos y/u otros polímeros para su uso en una formulación de vacuna.

30 Las composiciones pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dosificador que puede contener una o más formas monodosis que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, lámina metálica o de plástico, tal como un envase tipo blíster. El envase o el dispositivo dosificador puede estar acompañado de instrucciones para su administración preferiblemente para su administración a un mamífero, especialmente un cerdo.

### 35 C. Adyuvantes

Para aumentar adicionalmente la inmunogenicidad de las composiciones inmunógenas proporcionadas en la presente, y que contienen una o más proteínas de PPV5A, también pueden comprender uno o más adyuvantes.

40 El adyuvante puede purificarse por cualquiera de las técnicas descritas previamente o conocidas en la técnica. La técnica de purificación preferida es cromatografía en gel de sílice, en particular la técnica cromatográfica "ultrarrápida" (rápida), que se describe por W. Clark Still et al., J. Organic Chemistry, 43, 2923-2925 (1978). Sin embargo, pueden usarse otros métodos cromatográficos, incluyendo HPLC, para la purificación del adyuvante. También puede usarse cristalización para purificar el adyuvante. En algunos casos, no se requiere purificación ya que se obtiene un producto de pureza analítica directamente de la síntesis.

50 Las composiciones de vacuna se preparan por mezcla fisiológica del adyuvante con la proteína o proteínas de PPV5A en condiciones estériles apropiadas de acuerdo con técnicas conocidas para producir la composición con adyuvante. La formación de complejos de la proteína o proteínas de PPV5A y el adyuvante se facilita por la existencia de una carga negativa neta en el conjugado que se ve atraída electrostáticamente a la carga positiva presente en el adyuvante de compuesto de alquilo de cadena larga.

### 55 D. Vehículos fisiológicamente aceptables

Las composiciones de vacuna pueden formularse usando técnicas similares a las usadas para otras composiciones polipeptídicas farmacéuticas. Por tanto, el adyuvante y la proteína o proteínas de PPV5A, preferiblemente conjugadas con la molécula de vehículo y/o mezcladas con un adyuvante pueden almacenarse en forma liofilizada y reconstituirse en un vehículo fisiológicamente aceptable para formar una suspensión antes de la administración. Como alternativa, el adyuvante y el conjugado pueden almacenarse en el vehículo. Los vehículos preferidos son soluciones estériles, en particular, soluciones tamponantes estériles, tales como solución salina tamponada con fosfato. Cualquier método de combinación del adyuvante y el conjugado en el vehículo de modo que se mejore la eficacia inmunológica de la composición inmunógena es apropiado.

65 El volumen de una única dosis de la vacuna de la invención puede variar, pero generalmente estará dentro de los intervalos habitualmente empleados en vacunas convencionales. El volumen de una única dosis es preferiblemente

entre aproximadamente 0,1 ml y aproximadamente 3 ml, preferiblemente entre aproximadamente 0,2 ml y aproximadamente 1,5 ml, más preferiblemente de aproximadamente 1,0 ml a las concentraciones de conjugado y adyuvante indicadas anteriormente.

- 5 Las composiciones de vacuna pueden administrarse por cualquier medio conveniente.

#### E. Formulación

10 Los conjugados inmunógenos que comprenden una o más proteínas de PPV5A acopladas a una molécula de vehículo pueden usarse como vacunas para inmunización contra uno o más serotipos de PPV5A. Las vacunas, que comprenden el conjugado inmunógeno en un vehículo fisiológicamente aceptable, son útiles en un método de inmunización de animales, preferiblemente cerdos, para el tratamiento o la prevención de infecciones por PPV5A.

15 Los anticuerpos generados contra conjugados inmunógenos de la presente divulgación por inmunización con un conjugado inmunógeno pueden usarse en inmunoterapia pasiva y generación de anticuerpos antiidiotipo para tratar o prevenir infecciones de PPV5A.

20 El sujeto al que se administra la composición es preferiblemente un animal, incluyendo, aunque sin limitación, vacas, caballos, ovejas, cerdos, aves de corral (por ejemplo, pollos), cabras, gatos, perros, hámsteres, ratones y ratas; mucho más preferiblemente cerdos.

25 Las formulaciones de la divulgación comprenden una cantidad inmunizante eficaz de una o más composiciones inmunógenas o anticuerpos contra las mismas y un vehículo fisiológicamente aceptable. Las vacunas comprenden una cantidad inmunizante eficaz de una o más composiciones inmunógenas y un vehículo fisiológicamente aceptable. La formulación deber ser adecuada para el modo de administración.

30 La composición inmunógena, si se desea, también puede contener cantidades mínimas de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. La composición inmunógena puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o un polvo. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

#### F. Dosis eficaz

35 Los compuestos descritos en este documento pueden administrarse a un sujeto a dosis terapéuticamente eficaces para tratar enfermedades asociadas con PPV5A. La dosificación dependerá del hospedador que recibe la vacuna, así como de factores tales como el tamaño, el peso y la edad del hospedador.

40 La cantidad precisa de conjugado inmunógeno o anticuerpo a emplear en una formulación dependerá de la vía de administración y de la naturaleza del sujeto (por ejemplo, la especie, edad, tamaño, fase/nivel de la enfermedad) y debe decidirse de acuerdo con el criterio del facultativo y las circunstancias de cada sujeto de acuerdo con las técnicas clínicas convencionales. Una cantidad inmunizante eficaz es esa cantidad suficiente para tratar o prevenir una enfermedad por PPV5A infecciosa en un sujeto. Las dosis eficaces también pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a dosis obtenidas de sistemas de ensayo en modelo animal y pueden variar de 0,1 mg/kg a 45 20 mg/kg, preferiblemente de 1 mg/kg a 10 mg/kg.

50 La inmunogenicidad de una composición puede determinarse controlando la respuesta inmunitaria de sujetos de ensayo después de inmunización con la composición mediante el uso de cualquier inmunoensayo conocido en la técnica. La generación de una respuesta humoral (de anticuerpo) y/o inmunidad mediada por células, puede adoptarse como indicación de una respuesta inmunitaria. Los sujetos de ensayo pueden incluir animales tales como cerdos, ratones, hámsteres, perros, gatos, conejos, vacas, caballos, ovejas y aves de corral por ejemplo, pollos, patos, gansos y pavos).

55 La respuesta inmunitaria de los sujetos de ensayo puede analizarse por diversas estrategias tales como: la reactividad del suero inmunitario resultante el conjugado inmunógeno, ensayada por técnicas conocidas, por ejemplo, ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), inmunotransferencias, inmunoprecipitaciones, etc.; o, por protección de los hospedadores inmunizados de una infección por el patógeno y/o atenuación de los síntomas debido a infección por el patógeno en hospedadores inmunizados determinada por cualquier método conocido en la técnica, para evaluar los niveles de un agente de enfermedad infecciosa, por ejemplo, PCR cuantitativa, aislamiento de virus u otra técnica conocida en la técnica. Los niveles de agente de enfermedad infecciosa también pueden 60 determinarse midiendo los niveles del antígeno contra el que estaba dirigida la inmunoglobulina. Una disminución en los niveles del agente de enfermedad infecciosa o una mejora de los síntomas de la enfermedad infecciosa indica que la composición es eficaz.

65 Los agentes terapéuticos de la divulgación pueden ensayarse *in vitro* para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su uso *in vivo* en animales. Por ejemplo, los ensayos *in vitro* que pueden usarse para determinar

si la administración de un agente terapéutico específico está indicada incluye ensayos de cultivo celular *in vitro* en que células apropiadas de una línea celular o células cultivadas de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno particular se exponen a o se administran de otro modo a un agente terapéutico, y se observa el efecto del agente terapéutico sobre las células.

5 Como alternativa, el agente terapéutico puede ensayarse poniendo en contacto el agente terapéutico con las células (cultivadas de un sujeto o de una línea celular cultivada) que son susceptibles a infección por el agente de enfermedad infecciosa, pero que no están infectadas con el agente de enfermedad infecciosa, exponiendo las células al agente de enfermedad infecciosa y después determinando si la tasa de infección de las células en  
10 contacto con el agente terapéutico era inferior a la tasa de infección de las células que no están en contacto con el agente terapéutico. La infección de las células con un agente de enfermedad infecciosa puede ensayarse por cualquier método conocido en la técnica.

15 Además, el agente terapéutico puede evaluarse midiendo el nivel de la molécula contra la que está dirigido el anticuerpo en el sujeto de modelo animal a intervalos de tiempo adecuados antes, durante o después del tratamiento. Cualquier cambio o ausencia de cambio en la cantidad de la molécula puede identificarse y correlacionarse con el efecto del tratamiento sobre el sujeto. El nivel de la molécula puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica.

20 Después de la vacunación de un animal contra PPV5A usando las composiciones de la presente divulgación, puede usarse cualquier ensayo de unión conocido en la técnica para evaluar la unión entre el anticuerpo resultante y la molécula particular. Estos ensayos también pueden realizarse para seleccionar anticuerpos que muestren mayor afinidad o especificidad por el antígeno particular.

25 G. Detección y métodos de diagnóstico

Los anticuerpos, o partes de unión de los mismos, resultantes del uso de PPV5A nativo, virus atenuado o proteínas de la presente invención son útiles para detectar en una muestra la presencia de PPV5A. Este método de detección comprende las etapas de proporcionar un anticuerpo aislado o parte de unión del mismo generado contra un PPV5A  
30 nativo, virus atenuado o proteína de la invención, añadir al anticuerpo aislado o parte de unión del mismo una muestra sospechosa de contener una cantidad de virus PPV5A y detectar la presencia de un complejo que comprende el anticuerpo aislado o parte de unión del mismo unido al virus PPV5A.

Los anticuerpos o partes de unión de los mismos de la presente invención también son útiles para detectar en una muestra la presencia de una proteína o péptido de PPV5A. Este método de detección comprende las etapas de proporcionar un anticuerpo aislado o parte de unión del mismo generado contra PPV5A nativo, virus atenuado, proteína o péptido, añadir al anticuerpo aislado o parte de unión del mismo una muestra sospechosa de contener una cantidad de la proteína o péptido de PPV5A y detectar la presencia de un complejo que comprende el anticuerpo aislado o parte de unión del mismo unido a la proteína o péptido de PPV5A.

Las inmunoglobulinas, particularmente los anticuerpos, (y fragmentos funcionalmente activos de los mismos) que se unen a una molécula específica que es un miembro de una pareja de unión pueden usarse como agentes de diagnóstico y agentes de pronóstico, como se describe en este documento. La presente divulgación proporciona la medición de un miembro de la pareja de unión, y los usos de dichas mediciones en aplicaciones clínicas. Las  
45 inmunoglobulinas de la presente invención pueden usarse, por ejemplo, en la detección de un antígeno en una muestra biológica, mediante lo que los sujetos pueden ensayarse para niveles aberrantes de la molécula a la que se une la inmunoglobulina, y/o para la presencia de formas anómalas de dichas moléculas. Por "niveles aberrantes" se entienden aumentados o disminuidos respecto al nivel presente o convencional, que representa el presente, en una muestra análoga de una parte del organismo o de un sujeto que no tiene la enfermedad. Los anticuerpos de esta invención también pueden incluirse como reactivo en un kit para su uso en una técnica de diagnóstico o de pronóstico.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención que se une inmunoespecíficamente a un virus nativo o atenuado PPV5A, proteína o péptido puede usarse para diagnosticar, pronosticar o cribar una infección por PPV5A.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de diagnóstico o cribado de la presencia de una infección por PPV5A o inmunidad contra la misma, que comprende medir en un sujeto el nivel de unión inmunoespecífica de un anticuerpo a una muestra obtenida del sujeto, en que el anticuerpo se une inmunoespecíficamente a una proteína o péptido de PPV5A en que un aumento en el nivel de dicha unión inmunoespecífica, respecto al nivel de dicha unión inmunoespecífica en una muestra análoga de un sujeto que no tiene el agente de enfermedad infecciosa, indica la presencia de PPV5A.

Los ejemplos de ensayos adecuados para detectar la presencia de péptidos de PPV5A o antagonistas de los mismos incluyen, aunque sin limitación, ELISA, radioinmunoensayo, ensayo de reacción de precipitación de difusión en gel, ensayo de inmunodifusión, ensayo de aglutinación, inmunoensayo fluorescente, inmunoensayo de proteína A o ensayo de inmunoelectroforesis.

Los inmunoensayos para la molécula particular típicamente comprenderán incubar una muestra, tal como un fluido biológico, un extracto tisular, células recién recogidas o lisados de células cultivadas, en presencia de un anticuerpo marcado de forma detectable y detectar el anticuerpo unido por cualquiera de varias técnicas bien conocidas en la técnica.

5 La actividad de unión de un anticuerpo dado puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos. Los expertos en la materia serán capaces de determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación rutinaria.

10 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a kits de diagnóstico para la detección o la medición de PPV5A. Se proporcionan kits para uso diagnóstico, que comprenden en uno o más recipientes un anticuerpo anti-PPV5A y, opcionalmente, un compañero de unión marcado para el anticuerpo. Como alternativa, el anticuerpo anti-PPV5A puede marcarse (con un marcador detectable, por ejemplo, un resto quimioluminiscente, enzimático, fluorescente o radiactivo). Por consiguiente, la presente invención proporciona un kit de diagnóstico que comprende, 15 un anticuerpo anti-PPV5A y una inmunoglobulina de control. En un aspecto específico, uno de los compuestos anteriores del recipiente puede marcarse de forma detectable. Un kit puede comprender opcionalmente además, en un recipiente, una cantidad predeterminada de un virus PPV5A, proteína o péptido reconocido por el anticuerpo del kit, para su uso como patrón o control.

#### 20 H. Administración a un sujeto

Las vías de administración incluyen, aunque sin limitación, intranasal, oral (por ejemplo, en el agua para beber), intradérmica e intramuscular. La administración intramuscular es particularmente preferida. Los expertos en la materia reconocerán que las composiciones de la divulgación también pueden administrarse en una, dos o más 25 dosis, así como, por otras vías de administración. Por ejemplo, dichas otras vías incluyen vía subcutánea, intracutánea, intravenosa, intravascular, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intratraqueal, intracardiaca, intralobular, intramedular, intrapulmonar e intravaginal. Dependiendo de la duración deseada y de la eficacia del tratamiento, las composiciones de acuerdo con la invención pueden administrarse una o varias veces, también de forma intermitente, por ejemplo, en una base diaria durante varios días, semanas o meses y en diferentes 30 dosificaciones.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas divulgadas en los siguientes ejemplos representan técnicas que los autores de la invención han descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención y, por tanto, puede considerarse 35 que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deben apreciar, a la luz de la presente divulgación, que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y aún obtener un resultado parecido o similar sin alejarse del alcance de la invención, que en el sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones.

#### 40 **Ejemplos**

##### Materiales y métodos

**Fuente de materiales:** Se recibieron homogeneizados tisulares de tres cerdos de una investigación de brote inusual. 45 La historia clínica de la granja de cerdos de 90,71 kg (200 libras) con temblores musculares en todo el cuerpo que estaban presentes tras reposo, pero exagerados durante el movimiento. Después de un ensayo extensivo en un laboratorio de diagnóstico veterinario que sugería un agente vírico (basándose en lesiones microscópicas), pero que únicamente produjo la identificación de un agente X (un pestivirus asociado a virus de la fiebre porcina no clásica), se proporcionaron muestras a los autores de la invención para ayudar a determinar la causa subyacente de los 50 signos del SNC en estos animales.

**Análisis de ADN y proteína:** Se realizó análisis de ADN de muestras de cerdos afectados usando secuenciación de alto rendimiento de 454 Life Sciences (Branford CT) ("tecnología 454"), realizado por Operon (Huntsville AL). Las muestras se enriquecieron para secuencias víricas a través de tratamiento con nucleasa de ácidos nucleicos 55 protectores de partículas víricas seguido por extracción, amplificación aleatoria y secuenciación de alto rendimiento; realizado generalmente como se describe en Victoria et al., PLoS pathogen 26 de septiembre de 2008;4(9):e1000163.

Las secuencias resultantes se caracterizaron inicialmente por análisis BLASTx como miembros divergentes de la 60 familia *Parvoviridae*. Las secuencias se ensamblaron usando el programa informático Sequencher y los resultados de estos análisis de ADN acoplados con secuenciación diana produjo la secuencia de ADN de la SEQ ID NO:1, que es la secuencia codificante completa putativa del virus indicado como PPV5A. El análisis adicional de la secuencia de ADN usando el programa informático Sequencher produjo la identificación de tres regiones codificantes putativas correspondientes a las encontradas en otras especies de parvovirus, que comprenden la replicasa vírica (SEQ ID NO:2), una fase de lectura abierta "ORF3" (SEQ ID NO:3) y la proteína de la cápside vírica (SEQ ID NO:4). 65



## Ejemplo 1: Identificación de un virus novedoso

Se identificaron secuencias de ADN por tecnología 454 (metagenómica vírica) en muestras de homogeneizados pulmonares de dos cerdos no relacionados de diferentes estados. El análisis BLASTn y BLASTx reveló la identidad más cercana al parvovirus porcino 4, con un máximo de un 67 % de identidad de nucleótidos en regiones conservadas del gen de la replicasa (REP), mientras que las regiones codificantes de la cápside (CAP) no mostraban un emparejamiento discernible a nivel de nucleótidos. A nivel de proteína, la proteína replicasa putativa mostraba ~60 % de identidad de aminoácidos y ~50 % de identidad en la proteína de la cápside. El virus se indicó como una nueva especie, el parvovirus porcino 5A (PPV5A). Se desarrollaron cebadores específicos basándose en la secuencia codificante de la cápside y el cribado basado en PCR de homogeneizados que eran similares en características tisulares y patológicas/clínicas reveló la presencia del agente en ~16 % de las muestras. Basándose en los signos clínicos presentados y los datos de virología asociados con los tejidos cribados, se observó una asociación estadísticamente significativa con otros varios agentes víricos y patologías clínicas/histopatología.

## Ejemplo 2: Identificación de PPV5A como parvovirus novedoso y análisis filogenético

Las identidades de aminoácidos por parejas para las proteínas putativas replicasa (REP) y de la cápside (VP1/CAP) de múltiples especies víricas conocidas se muestran en la fig. 5. La identidad de secuencia de PPV5A con PPV4, el pariente más cercano, tanto con REP como con CAP (~60 % / 50 %, respectivamente) apoya la denominación de PPV5A como una nueva especie.

El análisis filogenético (fig. 6) revela el virus como una especie novedosa dentro de la familia *Parvoviridae* y el género parvovirus, basándose en la región conservada de la proteína CAP. Se consiguen resultados similares usando la secuencia de la proteína REP más conservada (no mostrada).

## Ejemplo 3: Confirmación de PPV5A como un agente de enfermedad

Se usaron tres homogeneizados tisulares positivos para PCR de PPV5A de ISU para inocular animales obtenidos por cerásea privados de calostro (CDCD) en un intento por amplificar el virus y determinar si la coinfección con los parvovirus novedosos y PRRSV producía signos respiratorios clínicos aumentados. En este estudio, hubo un imprevisto, una alta cantidad de mortalidad (20-22 %) en grupos inoculados con el homogeneizado tisular que contiene los parvovirus novedosos y se identificaron títulos de PPV5A en suero usando PCR específica de PPV5A dirigida a la región codificante de la cápside. Después se usaron tejidos de un animal en este estudio para exponer a los cerdos CDCD para reproducir los signos clínicos. En este estudio, se indicó una infección sistémica con altos títulos de viremia en la mayoría de los animales infectados. En grupos que recibieron inóculos que contenían PPV5A, hubo una alta incidencia de mortalidad (20 %), cojera, disminución en la media diaria de ganancia, pirexia y lesiones tanto macroscópicas como microscópicas.

## Ejemplo 4: Cultivo, aislamiento y purificación de PPV5A

Se agruparon pequeñas secciones de tejidos positivos a PCR (por ejemplo, bazo, cerebro, pulmón, intestino, etc.) usando un mortero y mano de mortero estériles. El tejido molido se resuspendió en 5-10 ml de EMEM modificado que contenía tampón HEPES y antibióticos y se aclaró para eliminar las masas de tejido más grandes. Los sobrenadantes se recogieron y se pasaron en serie a través de diversos filtros para eliminar la mayoría de las partículas más grandes incluyendo las bacterias. Adicionalmente, también se está procesando una suspensión de muestra fecal y suero de animales positivos a PCR por filtración en serie para aislamiento de virus.

Las diluciones del filtrado se tratan con tripsina o se dejan sin tratar y se adsorben en cultivos celulares establecidos y primarios (enumerados a continuación) en placas de 6 pocillos a temperaturas específicas. El inóculo se aspira y se reemplaza con 2 ml de medio de mantenimiento fresco. Las placas entonces se incuban a 33-37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % y se observan diariamente para los efectos citopáticos tales como redondeo de las células, fusión célula-célula, descamación, agrupación celular, etc., en comparación con controles inoculados simulados (medio sencillo). Se cribaron los pocillos positivos potenciales para el crecimiento/aislamiento de virus por PCR.

Las líneas celulares establecidas útiles en el aislamiento de virus incluían: ST (testículo de cerdo), SK6 (riñón de cerdo), BHK-21 (riñón de cría de hámster), VIDO R1 (retina porcina fetal), PK-15 NADC (riñón porcino), PK/WRL (riñón porcino), HRT-180 (adenocarcinoma colorrectal humano), Hep2 (epitelio humano), Vero (riñón de mono verde africano) y RK-13 (riñón de conejo) entre otros.

Los cultivos celulares primarios útiles en el proceso incluyen: cultivos porcinos embrionarios de pulmón, riñón, testículos, tráquea e intestino, entre otros.

Según aísla el virus, se purifica por múltiples rondas de purificación en placa o diluciones limitantes y se amplifica en cantidades mayores y se generan cultivos de reserva para experimentos en animales.

## Ejemplo 5: Preparación de un virus inactivado y vacuna

La inactivación se realiza entre aproximadamente 35-39 °C y en presencia de 2 a 15 mM de BEI, aún más preferido en presencia de aproximadamente 10 mM de BEI. La inactivación se realiza durante al menos 24 horas, hasta 24 a 72 horas. Después se añade una cantidad equivalente de un agente que neutraliza el agente de inactivación dentro de la solución; por ejemplo, tiosulfato de sodio hasta una cantidad equivalente. Se prepara una preparación de virus inactivado de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se divulga en Preuss, T., et al., Comparison of Two Different Methods for Inactivation of Viruses in Serum, CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, (1997), 504-508 o en Bahnemann, H.G., Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine, VACCINE, (1990), 299-303. Una vez preparado un virus inactivado, el material se combina con una preparación de vehículo para una formulación de vacuna final.

## Ejemplo 6: Preparación de un virus atenuado y vacuna

Se prepara una preparación de virus atenuado de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se divulga en Vaccine Protocols, 2.<sup>a</sup> edición; Robinson, Husdon, Cranage, eds, Humana Press 2003. Por ejemplo, "...los virus de tipo silvestre se pasan extensivamente en cultivo tisular/hospedadores animales hasta que se alcanza un equilibrio aceptable entre la pérdida de virulencia y la retención de inmunogenicidad..."

El virus atenuado se purifica por múltiples rondas de purificación en placa o diluciones limitantes. Se utilizan ensayos de PCR, secuenciación profunda o inmunofluorescencia para determinar la especificidad del material de cultivo.

Se prepara una vacuna de virus atenuado combinando una preparación de virus atenuado purificado con una preparación de vehículo.

## Ejemplo 7: Preparación una vacuna de subunidad que comprende una proteína de la cápside

Se preparó la proteína de la cápside de la SEQ ID NO:4 por expresión de la SEQ ID NO:4 clonado, o fragmentos de la misma, en diversos sistemas de expresión de proteína.

Expresión de baculovirus: Se expresó la proteína de la cápside de PPV5A de la SEQ ID NO:4 en un sistema de expresión de baculovirus, generalmente de acuerdo con los métodos divulgados en Kost et al., (6), 2012. Se encontró la proteína en baja cantidad dentro de la fracción insoluble tras purificación inicial. Los métodos para aumentar el rendimiento y la solubilidad incluyen, aunque sin limitación, el uso de condiciones tamponantes alternativas (por ejemplo, urea o clorhidrato de guanidina), condiciones alternativas de unión y de purificación (por ejemplo, columnas de afinidad de cobalto o níquel, columnas de intercambio aniónico o catiónico), o condiciones alternativas de expresión (por ejemplo, temperatura, tiempo, líneas celulares alternativas).

Expresión bacteriana: Se expresó la proteína de la cápside de PPV5A de la SEQ ID NO:4 en un sistema de expresión bacteriano, generalmente de acuerdo con los métodos divulgados en EMD Chemicals Inc. Novagen User Protocol TB184. Este método incluye la adición de una marca HIS inherente contenida en el vector bacteriano (EMD Chemicals Inc., 2011 (7)) para facilitar la purificación de la proteína producida. La proteína de la cápside marcada con HIS expresada de forma bacteriana se purificó generalmente de acuerdo con los métodos divulgados en GE Healthcare, 2012 (8) y los productos resultantes se usaron para generar anticuerpos específicos para PPV5A como se describe en el ejemplo 8.

Se preparó una vacuna de subunidad atenuada combinando una preparación de proteína de la cápside purificado con una preparación de vehículo.

## Ejemplo 8: Preparación de anticuerpos que se unen específicamente a PPV5A

Se preparan anticuerpos que se unen específicamente a PPV5A inmunizando conejos con preparaciones antigénicas de virus PPV5A, o preparaciones de proteína de subunidad de proteínas de la cápside (SEQ ID NO:4) o fragmentos de las mismas. Se criban muestras de suero de los conejos inoculados para anticuerpos policlonales que se unen a los antígenos de PPV5A. Los bazos de los ratones inoculados que se determinó que producían anticuerpos contra el antígeno se fusionan con células de mieloma para producir hibridomas. Los hibridomas después se criban para la unión a antígeno de PPV5A.

Anticuerpos policlonales: La proteína de la cápside expresada de forma bacteriana marcada con HIS preparada de acuerdo con el ejemplo 7 se usó para inmunizar dos conejos blancos de Nueva Zelanda en un servicio de producción de anticuerpos personalizado (Rockland Antibodies and Assays; Gilbertsville, PA). Los conejos se inmunizaron con aproximadamente 100 µg de antígeno/conejo en D0, D7, D14 y D28. Para la inoculación D0 y D7, los animales se inocularon por vía intradérmica; las inoculaciones administradas en D14 y 28 se administraron por vía subcutánea. Se usó adyuvante completo de Freund en la primera inoculación; se usó adyuvante incompleto de

Freud en inoculaciones posteriores. Se recogieron muestras de suero de ambos conejos antes de la inmunización y 38 y 45 días después de la inmunización.

Se cribaron preparaciones de anticuerpos policlonales para la especificidad anti-PPV5A por Rockland Antibodies and Assays. Se produjeron anticuerpos que tenían especificidad de unión por la proteína de PPV5A purificada o parcialmente purificada por ensayo inmunofluorescente (IFA), transferencia de western y ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA). Los parámetros para la especificidad de cada ensayo fueron los siguientes: la especificidad de transferencia de western se midió por detección de la proteína de tamaño de 88,8 kDa predicha, la especificidad de IFA se midió por comparación con células no infectadas y la especificidad de ELISA recubriendo la placa con proteína no relevante.

Anticuerpos monoclonales: Se usa la proteína de la cápside expresada de baculovirus marcada con HIS preparada de acuerdo con el ejemplo 7 para generar anticuerpos monoclonales en ratones Balb/c en un servicio de producción de anticuerpos personalizado (Rockland Antibodies and Assays; Gilbertsville, PA). Los ratones se inmunizan con diversas preparaciones antigénicas de PPV5A de acuerdo con protocolos convencionales diseñados por la instalación de producción de anticuerpos personalizada. La respuesta inmunitaria después de la inoculación se controla por la instalación de producción de anticuerpos personalizada y se seleccionan candidatos de anticuerpo para la generación de hibridomas. Los protocolos convencionales para la generación de anticuerpos monoclonales son bien conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo, como se divulga en Gabriele et al., (9), pág. 117-135.

Se generan hibridomas combinando células de tumores de linfocitos B cultivadas en medio de hibridoma hasta la fase de proliferación con células de bazo recogidas de ratones inoculados que se ha determinado que producen anticuerpos contra antígenos de PPV5A de acuerdo con protocolos convencionales, como se divulga en Gabriele et al., (9), pág. 117-135. Después de la fusión y cultivo de los hibridomas, los hibridomas se criban para la unión a antígenos de PPV5A, y se seleccionan hibridomas que producen anti-PPV5A. Los anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas se purifican usando cromatografía de afinidad de acuerdo con protocolos convencionales, como se divulga en Gabriele et al., (9), pág. 209-232.

Se identifican anticuerpos de alta afinidad específicos para PPV5A y se caracterizan adicionalmente, incluyendo la determinación de los epítomos a los que se unen, la especificidad del anticuerpo con respecto a otras especies de virus relacionadas y se seleccionan anticuerpos de alta afinidad adecuados con alta especificidad por el antígeno o antígenos del virus PPV5A, usando técnicas inmunológicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, ELISA, análisis de transferencia de Western y cartografiado de epítomos (Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey).

Ejemplo 9: Ensayos de diagnóstico para PPV5A

Ensayo ELISA: Se usan anticuerpos preparados de acuerdo con el ejemplo 8 para medir PPV5A en una muestra biológica usando procedimientos ELISA. El ensayo se realiza de la siguiente manera:

Se diluye antígeno de recubrimiento seleccionado de la proteína de la cápside de la SEQ ID NO:4 en tampón de recubrimiento (tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M; pH 9,6) para conseguir una concentración final de 8 ng/μl. Las placas (placas ELISA de 96 pocillos de alta unión a proteína Phenix n.º cat MPG-655061) se recubren con 50 μl/pocillo de antígeno de recubrimiento. Las placas se precintan y se incuban durante 1 hora a 37 °C o durante una noche a 4 °C. La solución de recubrimiento se retira y la placa se lava tres veces con 200 μl/pocillo de PBST (PBS 1X + Tween-20 al 0,05 %). La placa se recubre con 300 μl/pocillo de solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 0,5 % p/v en PBS), se precinta y se incuba durante 1 hora a 37 °C. La solución de bloqueo se retira y la placa se lava tres veces con 200 μl/pocillo de PBST. Las muestras se diluyen 1:100 en solución de bloqueo; se añaden 100 μl/pocillo de muestras de suero a la placa. Las placas se precintan y se incuban durante 1 hora a 37 °C. Las muestras de suero se retiran y la placa se lava tres veces con 200 μl/pocillo de PBST. El anticuerpo secundario (de cabra anti-IgG (H+L) porcina conjugado con HRP; Jackson Immuno-Research 114-035-003) se diluye hasta 1:10 000 en solución de bloqueo y se usa para recubrir la placa con 100 μl/pocillo. Las placas se precintan y se incuban durante 1 hora a 37 °C. El anticuerpo secundario se retira y la placa se lava tres veces con 200 μl/pocillo de PBST. Las placas se recubren con 50 μl/pocillo de TMB (3,5,3',5'-tetrametilbencidina; KPL n.º cat 53-00-01). Las placas se incuban a temperatura ambiente en la oscuridad durante aproximadamente diez minutos. Las placas se recubren con 50 μl/pocillo de solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M; KPL n.º cat 50-85-04). La densidad óptica se lee a 450 nm.

Análisis de PCR: Se han optimizado ensayos de PCR basados en gel y de qPCR para PPV5A. Estos ensayos se realizan de la siguiente manera: Para el ensayo de qPCR, cada reacción se prepara añadiendo los siguientes reactivos: 10 μl/reacción de SsoFast probe supermix 2X (BioRad, n.º cat 172-5233), 5 μl/reacción de agua tratada con DEPC, 1 μl/reacción del cebador directo a una concentración 6 μM (AAT GCG TGT GCT TAC GCT TA: SEQ ID NO:6), 1 μl/reacción del cebador inverso a una concentración 6 μM (TGG GTT CGA ATA TGA AGA GG: SEQ ID NO:7), 1 μl/reacción de la sonda a una concentración 4 μM (6-FAM/TC ATC AGG AAC CCT GGA GTG ATC TCA /BHQ\_1: SEQ ID NO:8) y 2 μl/reacción de ADN extraído. La reacción se realiza en un termociclador T100 (Bio-Rad)

para un ciclo a 95 °C durante 2 minutos seguido por cuarenta ciclos a las dos siguientes temperaturas: 95 °C durante 5 segundos seguido por 60 °C durante 5 segundos. Los datos se leen usando un sistema de imágenes ópticas CFX96 (Bio-Rad). Para el ensayo basado en gel, cada reacción se prepara añadiendo los siguientes reactivos: 12,5 µl/reacción de AmpliTaq Gold Mastermix 2X (Applied Biosystems, n.º cat 4302758), 8,0 µl/reacción de agua tratada con DEPC, 1,25 µl/reacción del cebador directo (GTA CTA TGA ATT TCC AAA CGA TCT TCC TTT CG: SEQ ID NO:9) a una concentración 10 µM, 1,25 µl/reacción del cebador inverso (TTA CAC CAA ATC TGG GAC TCT AAA CAG GC: SEQ ID NO:10) a una concentración 10 µM, y 2 µl/reacción de ADN extraído. La reacción se realiza en un termociclador T100 (BioRad) para un ciclo a 95 °C durante 5 minutos seguido por cuarenta ciclos a las siguientes temperaturas: 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 45 segundos seguido por una extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

#### Ejemplo 10: Evaluación de la eficacia de la vacuna contra PPV5A en cerdos

Para evaluar la eficacia de la composición de materia que comprende al menos una proteína o polipéptido de PPV5A (vacuna contra PPV5A prototipo) en cerdos, se realiza un estudio aleatorizado usando animales de cinco semanas de edad obtenidos por cesárea privados de calostro (CDCD) asignados aleatoriamente a tres grupos (véase la tabla 2). Los animales se vacunan con una composición o con un placebo (solución salina tamponada con fosfato; PBS) en el día 0 del estudio (D0) y D14. Los animales se exponen en D28 con material que sabe que contiene PPV5A. Se controlan las observaciones clínicas, las temperaturas rectales, las mediciones del peso y la recogida de sangre. En D56, se hace la necropsia de los animales para evaluar las lesiones macroscópicas. Se determina la eficacia de la vacuna contra PPV5A por comparación estadística del porcentaje de mortalidad, la viremia (títulos y duración), la seroconversión (títulos y duración) y los signos clínicos entre animales vacunados y no vacunados.

Tabla 2.

N.º de grupo	Grupo	N	Sala	Vacunación	Exposición
1	PPV5A-Vx	10	1 y 2	PPV5A prototipo	Sí
2	PBS-Vx	10	1 y 2	PBS	Sí
3	Control estricto	5	3	Ninguna	N.º

Todas las composiciones y métodos divulgados y reivindicados en este documento pueden hacerse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la materia que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y métodos y en las etapas o en la secuencia de las etapas del método descrito en este documento sin alejarse del alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que determinados agentes que están tanto química como fisiológicamente relacionados pueden sustituirse en el lugar de los agentes descritos en este documento mientras se consigan resultados iguales o similares. Todos estos sustitutos similares y modificaciones evidentes para los expertos en la materia se consideran dentro del alcance de la invención definida por las siguientes reivindicaciones.

#### REFERENCIAS

- (1) Csághola A, et al., Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. Arch Virol. Jun; 157(6):1003-10 (2012).
- (2) Hijikata M, et al., Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. Jpn J Infect Dis 54:244-245 (2001).
- (3) Wang F, et al., Novel parvovirus sublineage in the family of Parvoviridae. Virus Genes 41:305-308 (2010).
- (4) Lau SK, et al., Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. J Gen Virol 89:1840-1848 (2008).
- (5) Cheung AK, et al., Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus. Arch Virol 155(5):801-806 (2010).
- (6) Kost et al., Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors, Trends in Biotechnology, 20, 173-180, Abr. 2002. citado por otro.
- (7) EMD Chemicals Inc. 2011. Xa/LIC Kits, User Protocol TB184.
- (8) GE Healthcare. Recombinant Protein Purification Handbook. 18-1142-75.
- (9) Gabriele et al., (eds.), Antibody Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 2012, vol. 901, capítulo 7.

#### LISTA DE SECUENCIAS

- <110> BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
- <120> PARVOVIRUS PORCINO 5A, MÉTODOS DE USO Y VACUNA
- <130> 10-0150-PCT

ES 2 689 515 T3

	<140>	
	<141>	
5	<150> 13/796.621 <151> 12/03/2013	
	<150> 61/738.110 <151> 17/12/2012	
10	<160> 11	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1 <211> 5853 <212> ADN <213> Parvovirus porcino 5A	
20	<400> 1	
	tatttgcagg cttttccctg atattgggaa gattcctggg gtgactcctg agcggtatat	60
	ttatgctgta aacgtgagta cccgtaatgg gcaaaagtgg ccgaaagttg ggaccgaggg	120
	gccattggct gcaggtgtct tacaggggga ggcccttttc cgtgagacc ttaaagaggt	180
	ccggaaggtg tgccggctgc cgcaagacc cccatctttt ctttcaattg gagaaagttg	240
	attccaaagg gggctttcac cttcattttt gtattagtgt tgctgctggc actcctagag	300
	atgtgtcttc gatgtttaaa gccattgagc gtcgagtttc cttttactac tttggtgtag	360
	agggcttgac tttttttact cctcataaaa ataagcatgg ggcttgaag agtaatgatg	420
	agggctttat tgtgaattat cttcttaaaa aattgccttt gtctgagtgt gtgtatgcgt	480
	ggactaatat ggatggggtg attggcgatg cctgtctgaa tgaagataag cgcagggaat	540
	tgttgtctga gcgcaagat cagggagtca ttaaagagct cactgctcct acttttaag	600
	ctgctacggg tgataaaatg ttgagtgtgg tggattggat gtgtgataat gatgtgacta	660
	cggagcgccg atgggaggaa atatcggctg cgtccctgta ctctttcctt gctacccag	720
	ctggcactca tttggctaaa cagtgtctta gagctgcgaa tcagcgtatt gtgagcacta	780
	aaacctcttg gttgagtctc tgtaaatttg ccagtgaaaa ggagcttcgt gcttttcaaa	840
	atggggatcc tgagttgtct tcagacaaca ataggatcta ttacttattt gctatgaata	900
	attactgcc tgatatggcc agtatgattt tcttttggtg gtctatgccc caaacgggta	960
	agagaaacag tatttgctg tttggacctg ctacaaccgg taaaaccaat ttagcaagtg	1020
	ctattgcaca tactgctgcc agttatgggt gtgttaactg gaataacgca aatttccctg	1080

ES 2 689 515 T3

ttcaagacat	tgtgaatgtg	caactggggt	ggtgggagga	aggaaagatg	acagaggatg	1140
tggttgaatg	tgctaaggca	ttgctagggg	gaagtaatgt	aagagttgac	cgcaaagtga	1200
tgcaatctgc	ggaagtgcaa	tctcctcctt	ttattatcac	atccaatacg	gatatgtgcc	1260
ttgtttctca	aggcagttac	atcagttttg	agcaccagca	gcctctccag	gatagaatga	1320
ttaaatttga	gtttaacat	gttcttcctg	gcaatctcgg	cctcatttct	gaagatgaag	1380
ttgtggcctt	cttcagaaat	gggtgcttata	atgtgttgaa	gcatgcgtac	atgagaaagg	1440
cccagctttt	tgctctcggg	ccagcttcct	tgccatataa	gccccctacg	ggtgaattag	1500
tgtgtataga	ccaagctaag	tctccttctc	cctctgcttc	tcgccgcagt	gtgagaaatt	1560
ggatgacgtg	tccccctgat	cctgtccagg	acgatcccgc	tgaactggac	gagtattttc	1620
ctccagatac	tcctccagag	gattgtcctt	gtcctatttc	tcctgtgagg	gagtcttgtc	1680
cctcgccagg	gccttgccct	accctcctc	gcaaaaaaca	acggaagagc	aagcattgct	1740
ccttgtctgt	ctctgcgggg	aaagttcctg	tggtggttgt	gggtgattct	gactcagtcc	1800
ccccgaaga	aaaagaaaa	gaggaagttt	ccgtggggga	atcccaggat	ccacaactgt	1860
actgggacct	aactctcagt	caatccgacg	ttcctgtgcc	tgaagacgag	agtaccagct	1920
ttcctgacga	cgctgtggac	gcttctgatc	tcattgctga	acagtagtta	aggtatgagc	1980
cgttctactc	aaagagatct	ttggtctttg	ttaagggaga	gacttgaaag	gtataaggat	2040
cgagttaaat	attatgggat	tttgggtcca	gaacgtcctt	ctaccttagc	atcttatttt	2100
agtaaagacc	cacctccaga	tcctccaact	gttaaatttg	ataaacctta	tcaggatgta	2160
gatagattct	ggtttccaac	agacgattat	actgactggg	atgtctggca	tggagaggac	2220
agacctccta	gatttaccga	gcattccggg	gttcaggggt	ttaaaactag	gtgtgagggg	2280
gggcttcctt	taatgccag	tgatcccaa	ttttgcccc	tacaaaattt	ttgggatcag	2340
ttcgctaatt	ttgatgaggg	gtctccgtcc	accagatcg	gtgagagtgt	ttcatggagt	2400
gatcattttg	gaagtcccga	tccctctcat	catcaggagg	tgagggatgc	tgatgaagtt	2460
acttccgagc	ggcagcaata	taaaaatagg	attgtcacct	tactaagaaa	agtttattgg	2520
gctaagcagt	ggtctgggaa	attacaaatt	aatgttcctt	ccctcgaaag	cctttatgag	2580
cagatcccct	atatgctagc	ctatatggac	gccgataatt	ggcgtcagaa	tttgtagct	2640
gctaaaactc	tgcgaaaccac	tttggaagca	ttttcctgtg	ttccagatcc	ttccacgtgc	2700
gatgtcacia	tctccacacc	cctatctggg	gaaaacggatc	ccgcctcttt	tgcaaaaatac	2760
ttatgttccc	ttgtatgcaa	caggtctcaa	gaaaaagaac	aggcgcagac	gccttctttg	2820
tctccatcta	agcaaaaagg	gcagatgtca	agtcctgatt	ctgcatcgat	ctcccaacct	2880
ccccctgaaa	gtcacaagga	tagactgctt	cctaaaactg	atccccttca	ggaagcaggg	2940
ccccttcccg	ctccccctac	agctcagaag	cctattatct	ctaaggggtgc	aggcgggtgga	3000

ES 2 689 515 T3

gggtcgtctg gcttcataat ccctccaaaa cctcctagcc ccgatcatac taaagatccc 3060  
 cccccctctc ctccctccctc tccaattcct cctcctacat ctgcgccctga cgagaggag 3120  
 cacgagctag agcgtgctaa gcaggagaaa caagaggaag atgagctcat tgaaagaatc 3180  
 aatcaggag aaggagaagg agaacgagga ggcttcgtct tgccttctca ccactacact 3240  
 ggtcctagaa atcctgtccc agctggcaag cctgctgacc ccgttgatga atcttctgcg 3300  
 agacatgaca tcaggtatgg gcaacgtctt aaacatggag actggccata cctgtggggg 3360  
 aaggacttgg ataatgctca gcgagatgag attatcaaag ctcttcatag tcatgtcaaa 3420  
 gtgggaacct aattggcagg gaatatagtg aggagtatct ggaaggctaa ggagctctta 3480  
 acagaacctg tgtatgagct gttaaagtct attctccctc cttcagattt atctaaagtt 3540  
 cctcttcctc attcccaaca gacagacaga acagaagatc cagaaactcc aggggagact 3600  
 agaggaactg gatcagacag tcctcgatct cctcggcctt ctggatcaac tgaagacggg 3660  
 ggaggtcctt cttccgagtc cagattacct gggagtaaag ttccagtaga cccatctgcc 3720  
 accacgtctg aagcaaagag gcagaggact gaggagggga tggacatatc ttcattgctg 3780  
 ccagggggga tttctgcttc tggggctgct tcaaataact ctggtcttgc ttgtgggggt 3840  
 ggggggggta ctaatttagg gacagaatct cttgtatccg gctgtcagtt tggtaaaaac 3900  
 tctgtgatca cttcatcttt tagacgatgt cttatttcac cctggcctga taaatactgt 3960  
 tgttcttctg ctcacgatct tattcccgga gtggtctacg agacccttg gtgctattat 4020  
 gatctgaacg tcatctcaag ctacattttt tctccttctg cttggcagag gcttttggag 4080  
 gattatgatg cctttcgacc taaatccctt aaagttacca tccagtcttt agttttaaag 4140  
 atgtctgtca aggtgcagaa aaaacaaact acagttcagg attcccagtc agccactatt 4200  
 gctatctttg aggataaaga ctatgactac ccctatgtga tgggaggggg tcaaaaaaca 4260  
 gttccgggtc acttgcccgg tcaaccttat aatcttccca agtattctta cagaaccctt 4320  
 ggttcagtca aagaaagtaa tagggccagt atgggcggtt cagggtacac tttcaaatcc 4380  
 aatcaagata cggaattggt cctgcttgaa acacatgatg cactcttat tccagggcgg 4440  
 ggtacttttg agcagtaacta tgaatttcca aacgatcttc ctttcgaaaa tttgactcag 4500  
 tatccttggg atatccgccg tcaggataac ccctctatc agcagaggat cactgtcatg 4560  
 tcaggttctg acagagatac ggtaggcatt ctagatggag atttttactc tccttttcgg 4620  
 ttcaaaggac atgatagacc cgccatgtgg ctgccaggac agaggttgat tcagggcaaa 4680  
 ttcatagata cgcacccaat acccaataca gggaggagtg gggttcatcc taatgatttt 4740  
 cacacaaggg gcgatggtca tgggtgacacc catagaacac atgaagagag gatctacagt 4800  
 ctagatacag gtcttgctgc tatgccacgt gccgctcata gaccaccctt tcagcccggg 4860

ES 2 689 515 T3

cctaggactc tgtctcatgc cgtacgcaga cccgatggtt ccaccgtggg cacggctaata 4920  
 gcgtgtgctt acgcttacac ccaggagaat cctcatcagg aaccctggag tgatctcaat 4980  
 gtcagacata ccatgtatag gttagcctat caacgtcaaa aagggtttca gcaacccggg 5040  
 gaccctcttc atattcgaac ccatgcttgt tatggggacg gggatgttac cattccaaaa 5100  
 gaagagtcct tatggcctac tgttctgggt agttgcacag aaaagtcccc tgcctgttta 5160  
 gagtcccaga tttgggtgtaa aacaccaaata gtggacatgg tctatggaga acacacaccc 5220  
 cctcttgctt tatgggggat gcatgctccc ccaccccatg tatttctcag gatgcttgct 5280  
 caagagggtc ctccaatgt cagtacttgc agaccggctc aatctgggtca gaccttcac 5340  
 aatcaatatg gtcagtttct cctctgtttt accatgggat ggggaagtaa gcctagaccc 5400  
 aagtccatca agcagtggaa tccacgtccg cccatcagca ttctctgttg tcagtctggg 5460  
 cctgctttca ttctcgatca agatggctac taccgtctcc cagaacatgt ctggctctgcc 5520  
 agggaacgta tccgcagcaa acgctagtgc cccagcaat aacttacta cagtattgat 5580  
 gtgtcaggca ttctggttga ttgttttatt ttggctccgc ctactgtatg gcccatgtaa 5640  
 acgcatctat tatgaaaata aaatacgtca attgctgatg taattcgtgt tgtaattctt 5700  
 gttttgaaaa gcgcatatct tcttgccggg ctgagtaaca ccacctatga catcatataa 5760  
 atttgattac gtaacttcct ctttttactt ccgtcttttt ttgattacgc aatatacaca 5820  
 attctagcag ttaactatta cacaatatca cac 5853

<210> 2  
 <211> 626  
 <212> PRT  
 <213> Parvovirus porcino 5A  
 <400> 2

5



ES 2 689 515 T3

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

Val Ser Tyr Arg Gly Arg Pro Phe Ser Val Arg Pro Leu Lys Arg Ser  
                  20                   25                   30

Gly Arg Cys Ala Gly Cys Arg Lys Thr Pro His Leu Phe Phe Gln Leu  
          35                   40                   45

Glu Lys Val Asp Ser Lys Gly Gly Leu His Leu His Phe Cys Ile Ser  
      50                   55                   60

Val Ala Ala Gly Thr Pro Arg Asp Val Ser Ser Met Phe Lys Ala Ile  
65                   70                   75                   80

Glu Arg Arg Val Ser Phe Tyr Tyr Phe Gly Val Glu Gly Leu Thr Phe  
                  85                   90                   95

ES 2 689 515 T3

Phe Thr Pro His Lys Asn Lys His Gly Ala Trp Lys Ser Asn Asp Glu  
 100 105 110

Gly Phe Ile Val Asn Tyr Leu Leu Lys Lys Leu Pro Leu Ser Glu Cys  
 115 120 125

Val Tyr Ala Trp Thr Asn Met Asp Gly Val Ile Gly Asp Ala Cys Leu  
 130 135 140

Asn Glu Asp Lys Arg Arg Glu Leu Leu Ser Glu Arg Gln Asp Gln Gly  
 145 150 155 160

Val Ile Lys Glu Leu Thr Ala Pro Thr Phe Lys Ala Ala Thr Gly Asp  
 165 170 175

Lys Met Leu Ser Val Val Asp Trp Met Cys Asp Asn Asp Val Thr Thr  
 180 185 190

Glu Arg Arg Trp Glu Glu Ile Ser Ala Ala Ser Leu Tyr Ser Phe Leu  
 195 200 205

Ala Thr Pro Ala Gly Thr His Leu Ala Lys Gln Cys Leu Arg Ala Ala  
 210 215 220

Asn Gln Arg Ile Val Ser Thr Lys Thr Ser Trp Leu Ser Leu Cys Lys  
 225 230 235 240

Phe Ala Ser Glu Lys Glu Leu Arg Ala Phe Gln Asn Gly Asp Pro Glu  
 245 250 255

Leu Ser Ser Asp Asn Asn Arg Ile Tyr Tyr Leu Phe Ala Met Asn Asn  
 260 265 270

Tyr Cys Pro Asp Met Ala Ser Met Ile Phe Phe Trp Trp Ser Met Arg  
 275 280 285

Gln Thr Gly Lys Arg Asn Ser Ile Trp Leu Phe Gly Pro Ala Thr Thr  
 290 295 300

Gly Lys Thr Asn Leu Ala Ser Ala Ile Ala His Thr Ala Ala Ser Tyr  
 305 310 315 320

Gly Cys Val Asn Trp Asn Asn Ala Asn Phe Pro Phe Gln Asp Ile Val  
 325 330 335

Asn Val Gln Leu Gly Trp Trp Glu Glu Gly Lys Met Thr Glu Asp Val

ES 2 689 515 T3

			340						345						350		
Val	Glu	Cys	Ala	Lys	Ala	Leu	Leu	Gly	Gly	Ser	Asn	Val	Arg	Val	Asp		
		355					360					365					
Arg	Lys	Cys	Met	Gln	Ser	Ala	Glu	Val	Gln	Ser	Pro	Pro	Phe	Ile	Ile		
	370					375					380						
Thr	Ser	Asn	Thr	Asp	Met	Cys	Leu	Val	Ser	Gln	Gly	Ser	Tyr	Ile	Ser		
385					390					395					400		
Phe	Glu	His	Gln	Gln	Pro	Leu	Gln	Asp	Arg	Met	Ile	Lys	Phe	Glu	Phe		
			405						410					415			
Asn	His	Val	Leu	Pro	Gly	Asn	Phe	Gly	Leu	Ile	Ser	Glu	Asp	Glu	Val		
			420					425					430				
Val	Ala	Phe	Phe	Arg	Asn	Gly	Ala	Tyr	Asn	Val	Leu	Lys	His	Ala	Tyr		
		435					440					445					
Met	Arg	Lys	Ala	Gln	Leu	Phe	Ala	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Leu	Pro	Tyr		
	450					455					460						
Lys	Pro	Pro	Thr	Gly	Glu	Leu	Val	Cys	Ile	Asp	Gln	Ala	Lys	Ser	Pro		
465					470					475					480		
Ser	Pro	Ser	Ala	Ser	Arg	Arg	Ser	Val	Arg	Asn	Trp	Met	Thr	Cys	Pro		
				485					490					495			
Pro	Asp	Pro	Val	Gln	Asp	Asp	Pro	Ala	Glu	Leu	Asp	Glu	Tyr	Phe	Pro		
			500					505					510				
Pro	Asp	Thr	Pro	Pro	Glu	Asp	Cys	Pro	Cys	Pro	Ile	Ser	Pro	Val	Arg		
		515					520					525					
Glu	Ser	Cys	Pro	Ser	Pro	Gly	Pro	Cys	Pro	Thr	Pro	Pro	Arg	Lys	Lys		
	530					535					540						
Gln	Arg	Lys	Ser	Lys	His	Cys	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Ala	Gly	Lys	Val		
545					550					555					560		
Pro	Val	Val	Val	Val	Gly	Asp	Ser	Asp	Ser	Val	Pro	Pro	Glu	Glu	Lys		
				565					570					575			
Glu	Lys	Glu	Glu	Val	Ser	Val	Gly	Glu	Ser	Gln	Asp	Pro	Gln	Leu	Tyr		
			580					585					590				

ES 2 689 515 T3

Trp Asp Leu Thr Leu Ser Gln Ser Asp Val Pro Val Pro Glu Asp Glu  
595 600 605

Ser Thr Gln Phe Pro Asp Asp Ala Val Asp Ala Ser Asp Leu Ile Ala  
610 615 620

Glu Gln  
625

- <210> 3
- <211> 290
- 5 <212> PRT
- <213> Parvovirus porcino 5A
  
- <400> 3

ES 2 689 515 T3

Met Ser Arg Ser Thr Gln Arg Asp Leu Trp Ser Leu Leu Arg Glu Arg  
1 5 10 15

Leu Glu Arg Tyr Lys Asp Arg Val Lys Tyr Tyr Gly Ile Leu Val Pro  
20 25 30

Glu Arg Pro Ser Thr Leu Ala Ser Tyr Phe Ser Lys Asp Pro Pro Pro  
35 40 45

Asp Pro Pro Thr Val Lys Phe Asp Lys Pro Tyr Gln Asp Val Asp Arg  
50 55 60

Phe Trp Phe Pro Thr Asp Asp Tyr Thr Asp Trp Tyr Val Trp His Gly  
65 70 75 80

Glu Asp Arg Pro Pro Arg Phe Thr Glu His Ser Gly Val Gln Gly Phe  
85 90 95

Lys Thr Arg Cys Glu Gly Gly Leu Pro Leu Met Pro Ser Asp Pro Lys  
100 105 110

Phe Cys Pro Ile Gln Asn Phe Trp Asp Gln Phe Ala Asn Phe Asp Glu  
115 120 125

Gly Ser Pro Ser Thr Gln Ile Gly Glu Ser Val Ser Trp Ser Asp His  
130 135 140

Phe Gly Ser Pro Asp Pro Ser His His Gln Glu Val Arg Asp Ala Asp  
145 150 155 160

Glu Val Thr Ser Glu Arg Gln Gln Tyr Lys Asn Arg Ile Val Thr Leu  
165 170 175

Leu Arg Lys Val Tyr Trp Ala Lys Gln Trp Ser Gly Lys Leu Gln Ile

ES 2 689 515 T3

	180		185		190
Asn Val Pro Ser Leu Glu Ser Leu Tyr Glu Gln Ile Pro Tyr Met Leu	195		200		205
Ala Tyr Met Asp Ala Asp Asn Trp Arg Gln Asn Leu Leu Ala Ala Lys	210		215		220
Thr Leu Arg Thr Thr Leu Glu Ala Phe Ser Cys Val Pro Asp Pro Ser	225		230		235
Thr Cys Asp Val Thr Ile Ser Thr Pro Leu Ser Gly Glu Thr Asp Pro		245		250	255
Ala Ser Phe Ala Lys Tyr Leu Cys Ser Leu Val Cys Asn Arg Ser Gln		260		265	270
Glu Lys Glu Gln Ala Gln Thr Pro Ser Leu Ser Pro Ser Lys Gln Lys		275		280	285
Gly Gln		290			

- 5
- <210> 4
  - <211> 792
  - <212> PRT
  - <213> Parvovirus porcino 5A
  - <400> 4

ES 2 689 515 T3

Met Gln Arg Ile Asn Ser Gly Glu Gly Glu Gly Glu Arg Gly Gly Phe  
 1 5 10 15

Val Leu Pro Ser His His Tyr Thr Gly Pro Arg Asn Pro Val Pro Ala  
 20 25 30

Gly Lys Pro Ala Asp Pro Val Asp Glu Ser Ser Ala Arg His Asp Ile  
 35 40 45

Arg Tyr Gly Gln Arg Leu Lys His Gly Asp Trp Pro Tyr Leu Trp Gly  
 50 55 60

Lys Asp Leu Asp Asn Ala Gln Arg Asp Glu Ile Ile Lys Ala Leu His  
 65 70 75 80

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

Ile Trp Lys Ala Lys Glu Leu Leu Thr Glu Pro Val Tyr Glu Leu Leu  
 100 105 110

ES 2 689 515 T3

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





ES 2 689 515 T3

Met Tyr Arg Leu Ala Tyr Gln Arg Gln Lys Gly Phe Gln Gln Pro Gly  
610 615 620

Asp Pro Leu His Ile Arg Thr His Ala Cys Tyr Gly Asp Gly Asp Val  
625 630 635 640

Thr Ile Pro Lys Glu Glu Ser Leu Trp Pro Thr Val Leu Gly Ser Cys  
645 650 655

Thr Glu Lys Ser Pro Ala Cys Leu Glu Ser Gln Ile Trp Cys Lys Thr  
660 665 670

Pro Asn Val Asp Met Val Tyr Gly Glu His Thr Pro Pro Leu Ala Leu  
675 680 685

Trp Gly Met His Ala Pro Pro Pro His Val Phe Leu Arg Met Leu Ala  
690 695 700

Gln Glu Gly Pro Pro Asn Val Ser Thr Cys Arg Pro Ala Gln Ser Gly  
705 710 715 720

Gln Thr Phe Ile Asn Gln Tyr Gly Gln Phe Leu Leu Cys Phe Thr Met  
725 730 735

Val Trp Glu Val Lys Pro Arg Pro Lys Ser Ile Lys Gln Trp Asn Pro  
740 745 750

Arg Pro Pro Ile Ser Ile Pro Val Gly Gln Ser Gly Pro Ala Phe Ile  
755 760 765

Leu Asp Gln Asp Gly Tyr Tyr Arg Leu Pro Glu His Val Trp Ser Ala  
770 775 780

Arg Glu Arg Ile Arg Ser Lys Arg  
785 790

<210> 5  
<211> 726  
<212> PRT  
<213> Parvovirus porcino 4  
  
<400> 5

5

ES 2 689 515 T3

Lys His Gly His Trp Pro His Leu Trp Ala Pro Phe Val Asp Arg Gln  
1 5 10 15

Met Ser Gln Glu Ile Gln Gln Val Leu Lys Gly Ser Thr Lys Leu Ser  
20 25 30

Gln Lys Leu Leu Ala Asn Phe Ile Ile Ala Leu Trp Arg Ala Lys Glu



ES 2 689 515 T3

Pro Gly Gln Pro Tyr Gln Leu Pro Lys Tyr Ser Tyr Arg Thr Val Gly  
 290 295 300

Lys Pro Asp Pro Asn Ser Gly Phe Val Pro Gly Arg Asn Thr His Pro  
 305 310 315 320

Asp Gln Gly Pro Gly His Pro Lys Ala Ser Lys Thr Ile Trp Tyr Ser  
 325 330 335

Gln Tyr Leu Glu Thr Gln Asp Thr Glu Phe Tyr Ile Leu Glu Asn His  
 340 345 350

Lys Ala Thr Ile Leu His Ser Gly Asn Thr Phe Ser Gln His Tyr Asn  
 355 360 365

Phe Pro Asp Leu Pro Phe Glu Gln Leu Thr Gln Tyr Met Trp Asp Ala  
 370 375 380

Arg Arg Gln Asp Asn Pro Leu Ile Asp Gln Arg Ile Gln Val Met Ser  
 385 390 395 400

Arg Met Tyr Asp Asp Gly Pro Gln Lys Thr Phe Ala Ile Lys Val Asn  
 405 410 415

Pro Tyr Ile Val Pro Phe Thr Val Lys Ser Thr Ser Arg Pro Ala Met  
 420 425 430

Phe Leu Ala Gly Gly Arg Phe Lys Asp Gly Asp Tyr Ser Ile Thr Gly  
 435 440 445

Pro Gly Asp Arg Asp Lys Thr Ser Phe Lys Tyr Tyr Asn Asp Pro Pro  
 450 455 460

Trp Ile Ile Thr Arg Asp Thr Tyr Leu Phe Ser Ser Asp Leu Ala Lys  
 465 470 475 480

Thr Glu Arg Glu Gln Pro Gly Pro Arg Gln Gly Asp Thr Val Val Arg  
 485 490 495

Thr Pro Asp Gly Thr Leu Ile Val Thr Thr Asn Ala Leu Ala Tyr Gly  
 500 505 510

Tyr Thr Thr Glu Tyr Leu Lys Asn Ile Pro Leu Leu Ser Ser Lys Tyr  
 515 520 525

His Gly Val Glu Asn Phe Arg Leu Ala Val Glu Asn Glu Arg Gly Tyr  
 530 535 540

ES 2 689 515 T3

Ser Met Pro Gly His Pro Ser His Ile Arg Glu Thr Leu Phe Arg Gly  
 545 550 555 560

Lys Leu Pro Ser Glu Ile Arg Glu Ser Thr Ile Lys Ser Glu Asp Gln  
 565 570 575

Arg Lys Glu Ile Thr Phe Pro Asp Tyr Met Gly Ser Val Asn Glu Lys  
 580 585 590

Thr Thr Ala Asn Leu Glu Ser Gln Ile Trp Ser Gln Ile Pro Asn Thr  
 595 600 605

Asp Ile Thr Glu Lys Cys Thr Thr Pro Pro Leu Ser Ile Trp Gly Met  
 610 615 620

Lys Asn Pro Pro Pro Met Val Phe Leu Arg Leu Leu Ala Gln Met Gly  
 625 630 635 640

Pro Pro Arg Arg Ser Ala Cys Ser Gly Ser Ile Pro Ser Asn Thr Tyr  
 645 650 655

Leu Asn Gln Tyr Cys Gln Phe Leu Leu Thr Tyr Glu Met Glu Trp Asp  
 660 665 670

Val Ile Lys Arg Thr Arg Lys Thr Val Arg Trp Asn Pro Ile Pro Pro  
 675 680 685

Pro Gln Ile Pro Met Gly Pro Asn Asn Leu Pro Val Tyr Ile Leu Asn  
 690 695 700

Lys Glu Gly Gln Tyr Arg Met Pro Thr Glu Val Trp Thr Ala Lys Gln  
 705 710 715 720

Arg Pro Arg His Arg Arg  
 725

- 5 <210> 6
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <221> fuente
- <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
  
- <400> 6
- aatgcgtgtg cttacgctta 20
  
- 15 <210> 7
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

# ES 2 689 515 T3

<220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

5 <400> 7  
tgggttcgaa tatgaagagg 20

<210> 8  
<211> 26  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> fuente  
15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 8  
tcatcaggaa ccctggagtg atctca 26

20 <210> 9  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

30 <400> 9  
gtactatgaa ttccaaacg atctccttt cg 32

<210> 10  
<211> 29  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> fuente  
40 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 10  
ttacacaaa tctgggactc taaacaggc 29

45 <210> 11  
<211> 495  
<212> PRT  
<213> Parvovirus porcino 4

50 <400> 11  
  
Leu Val Ile Ala Val Arg Gln Ala Glu Ala Leu Phe Arg Glu Leu Gln

ES 2 689 515 T3

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



ES 2 689 515 T3

Ile Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Ile Ala Ser Val Ile Met Tyr Phe Trp  
 260 265 270

Ser Met Lys Gln Thr Gly Lys Arg Asn Cys Val Trp Phe Tyr Gly Pro  
 275 280 285

Ala Thr Thr Gly Lys Thr Asn Met Ala Gln Ala Ile Cys His Ser Ser  
 290 295 300

Ala Asn Tyr Gly Asn Val Asn Trp Asn Asn Ala Asn Phe Pro Phe Gln  
 305 310 315 320

Asp Ile Val Gly Ala Gln Val Gly Trp Trp Glu Glu Gly Lys Met Thr  
 325 330 335

Gly Asp Met Val Glu Ala Ala Lys Ala Leu Leu Gly Gly Thr Ala Leu  
 340 345 350

Arg Ile Asp Arg Lys Cys Met Gln Ser Ile Glu Val Asn Ser Pro Pro  
 355 360 365

Phe Leu Ile Thr Ser Asn Val Asp Met Thr Ile Val Gln Glu Gly Ser  
 370 375 380

Phe Val Ser Phe Glu His Gln Gln Pro Leu Glu Asp Arg Met Ile Lys  
 385 390 395 400

Phe Ser Phe Asn Met Thr Leu Pro Gly Asn Phe Gly Leu Ile Thr Ser  
 405 410 415

Glu Glu Val Lys Ser Phe Phe Arg Met Gly Ala Lys Leu Ala Ala Gln  
 420 425 430

Pro Asp Ile Met Asn Cys Pro Ile Phe Lys Lys Gly Pro Ala Ser Ile  
 435 440 445

Arg His Leu Val Pro Val Gly Glu Ile Pro Pro Pro Lys Glu Met Lys  
 450 455 460

His Lys Arg Gln Pro Leu Tyr Met Arg Ala Glu Pro Asp Glu Ile Gln  
 465 470 475 480

Asp Asn Pro Glu Glu Leu Asp His Trp Phe Glu Glu Glu Ala Pro  
 485 490 495

**REIVINDICACIONES**

1. Un polinucleótido aislado, que comprende un polinucleótido

- 5 a) que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:1;  
b) que tiene una secuenciación de ácido nucleico que codifica

- un polipéptido de la SEQ ID NO:2,  
- un polipéptido de la SEQ ID NO:3, o

- 10 - el polipéptido de la cápside que está codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos 2845-5547 de la SEQ ID NO:1; o

- c) que tiene una secuencia de ácido nucleico al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:1, que codifica un polipéptido que tiene una actividad biológica o inmunológicamente eficaz de un polipéptido de la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3 o del polipéptido de la cápside que está codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos 2845-5547 de la SEQ ID NO:1.

2. Un polipéptido aislado, que comprende un polipéptido

- 20 a) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3, o el polipéptido de la cápside que está codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos 2845-5547 de la SEQ ID NO:1;  
o

- 25 b) que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, o a una secuencia del polipéptido de la cápside que está codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos 2845-5547 de la SEQ ID NO:1, y que tiene una actividad biológica o inmunológicamente eficaz de un polipéptido codificado por la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3 o del polipéptido de la cápside que está codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos 2845-5547 de la SEQ ID NO:1.

3. Un parvovirus porcino aislado (PPV5A), que comprende

- 30 a) una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:1, o

- b) una secuencia de ácido nucleico al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO:1, que codifica un polipéptido que tiene una actividad biológica o inmunológicamente eficaz de un polipéptido de la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3 o del polipéptido de la cápside que está codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos 2845-5547 de la SEQ ID NO:1.

4. El PPV5A de la reivindicación 3, en el que dicho PPV5A es una forma no virulenta atenuada de un PPV5A.

- 40 5. Una vacuna para prevenir una infección por un PPV5A virulento, que comprende una forma inactivada o atenuada de un PPV5A de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4.

- 45 6. Una vacuna para prevenir una infección por un PPV5A virulento, que comprende una subunidad de una forma inactivada o atenuada de un PPV5A de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, en la que la subunidad es una proteína de la cápside, en la que dicha proteína de la cápside es un polipéptido que está codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos 2845-5547 de la SEQ ID NO:1.

- 50 7. El PPV5A de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 para su uso en un método de generación de una respuesta inmunitaria profiláctica en un mamífero, en el que dicho método comprende administrar una cantidad inmunológicamente eficaz del PPV5A.

8. El polipéptido de la reivindicación 2 para su uso en un método de generación de una respuesta inmunitaria profiláctica en un mamífero, en el que dicho método comprende administrar una cantidad inmunológicamente eficaz del polipéptido.

- 55 9. La vacuna de la reivindicación 5 para su uso en un método de generación de una respuesta inmunitaria profiláctica en un mamífero, en la que dicho método comprende administrar una cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna.

- 60 10. El polipéptido para el uso de la reivindicación 8, el PPV5A para el uso de la reivindicación 7 o la vacuna para el uso de la reivindicación 9, en el que el mamífero es un cerdo, y la respuesta inmunitaria proporciona inmunidad protectora contra infección por PPV5A.

- 65 11. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un polipéptido de PPV5A codificado por un polinucleótido de PPV5A que tiene una secuencia de la SEQ ID NO:1, teniendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3 o del polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos 2845-5547 de la SEQ ID NO:1, y en el que dicho anticuerpo no se une a un polipéptido codificado por un parvovirus diferente.

- 5
12. Un método de identificación de la presencia de PPV5A en una muestra biológica, que comprende
- a) poner en contacto la muestra biológica con el anticuerpo de la reivindicación 11,
  - b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y un polipéptido de PPV5A,
- en el que la presencia de dicho complejo indica la presencia de PPV5A en la muestra biológica.
- 10
13. Un vector o plásmido que comprende un polinucleótido de la reivindicación 1.
14. Una célula hospedadora que comprende un vector de la reivindicación 13.
- 15
15. Un hibridoma que expresa un anticuerpo de la reivindicación 11.
16. Un kit de diagnóstico para identificar la presencia de PPV5A en una muestra biológica, que comprende
- a) un anticuerpo de la reivindicación 11, y
  - b) reactivos para detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y un polipéptido de PPV5A.
- 20
17. Un kit inmunogénico, que comprende
- a) al menos un péptido de PPV5A inmunógeno como se define en la reivindicación 2 que es eficaz para inmunizar a un animal contra al menos una enfermedad asociada a con infección por PPV5A;
  - b) al menos un vehículo o molécula adyuvante;
  - c) un recipiente para envasar la composición inmunógena;
  - d) un conjunto de instrucciones impresas; y
  - e) un dosificador que puede administrar la composición inmunógena a un animal, y en el que dicho kit inmunogénico opcionalmente comprende además al menos una proteína inmunógena que es eficaz para inmunizar a dicho animal contra al menos otro virus patógeno porcino o bacteria que causa una enfermedad asociada con una infección con dicho o bacteria.
- 25
- 30

FIG.1

Secuencia de ADN de PPV5A

**PPV5A\_Referencia:**

```

gen          87..1967
             /marcador="Replicasa predicha"
gen          1975..2844
             /marcador="Gen predicho de función desconocida/ORF3
ORF3"
gen          2845..5547
             /marcador="Replicasa predicha"
    
```

**Secuencia:**

```

TATTTGCAGGCTTTTCCCTGATATTGGGAAGATTCCTGGGGTGACTCCTGAGCGGTATATTTAT
GCTGTAAACGTGAGTACCCGTAATGGGCAAAAGTGGCCGAAAGTTGGGACCGAGGGGCCATTGG
CTGCAGGTGTCTTACAGGGGGAGGCCCTTTTCCGTGAGACCCTTAAAGAGGTCCGGAAGGTGTG
CCGGCTGCCGCAAGACCCCCCATCTTTTCTTTCAATTGGAGAAAGTTGATTCCAAAGGGGGTCT
TCACCTTCATTTTTGTATTAGTGTGTGCTGCTGGCACTCCTAGAGATGTGTCTTCGATGTTTAAA
GCCATTGAGCGTCGAGTTTCCCTTTTACTACTTTGGTGTAGAGGGCTTGACTTTTTTTACTCCTC
ATAAAAATAAGCATGGGGCTTGGAAAGAGTAATGATGAGGGCTTTATTGTGAATTATCTTCTTAA
AAAATTGCCTTTGTCTGAGTGTGTGTATGCGTGGACTAATATGGATGGGGTGATTGGCGATGCC
TGTCTGAATGAAGATAAGCGCAGGGAATTGTTGTCTGAGCGTCAAGATCAGGGAGTCATTAAAG
AGCTCACTGCTCCTACTTTTAAAGCTGCTACGGGTGATAAAATGTTGAGTGTGGTGGATTGGAT
GTGTGATAATGATGTGACTACGGAGCGCCGATGGGAGGAAATATCGGCTGCGTCCCTGTACTCT
TTCCTTGCTACCCAGCTGGCACTCATTTGGCTAAACAGTGTCTTAGAGCTGCGAATCAGCGTA
TTGTGAGCACTAAAACCTCTTGGTTGAGTCTCTGTAATTTGCCAGTGAAAAGGAGCTTCGTGC
TTTTCAAAATGGGGATCCTGAGTTGTCTTCAGACAACAATAGGATCTATTACTTATTTGCTATG
AATAATTACTGCCCTGATATGGCCAGTATGATTTTCTTTTGGTGGTCTATGCGCCAAACGGGTA
AGAGAAACAGTATTTGGCTGTTTGGACCTGCTACAACCGGTAACCAATTTAGCAAGTGCTAT
TGCACATACTGCTGCCAGTTATGGGTGTGTTAACTGGAATAACGCAAATTTCCCGTTTTCAAGAC
ATTGTGAATGTGCAACTGGGTTGGTGGGAGGAAGGAAAGATGACAGAGGATGTGGTTGAATGTG
CTAAGGCATTGCTAGGGGGAAGTAATGTAAGAGTTGACCGCAAATGTATGCAATCTGCGGAAGT
GCAATCTCCTCCTTTTATTATCACATCCAATACGGATATGTGCCTTGTTTTCTCAAGGCAGTTAC
ATCAGTTTTTGAGCACCAGCAGCCTCTCCAGGATAGAATGATTAATTTGAGTTTAACCATGTTT
TTCCTGGCAATTTCCGGCTCATTTCTGAAGATGAAGTTGTGGCCTTCTTCAGAAATGGTGCTTA
TAATGTGTTGAAGCATGCGTACATGAGAAAGGCCAGCTTTTTGCTCTCGGTCCAGCTTCCTTG
CCATATAAGCCCCCTACGGGTGAATTAGTGTGTATAGACCAAGCTAAGTCTCCTTCTCCCTCTG
CTTCTCGCCGCAGTGTGAGAAATTGGATGACGTGTCCCCCTGATCCTGTCCAGGACGATCCCGC
TGAAGTGGACGAGTATTTTCCCTCCAGATACTCCTCCAGAGGATTGTCCTTGTCTTATTTCTCCT
GTGAGGGAGTCTTGTCCCTCGCCAGGGCCTTGCCCTACCCCTCCTCGCAAAAAACAACGGAAGA
GCAAGCATTGCTCCTTGTCTGTCTCTGCGGGTAAAGTTCCCTGTGGTGGTGTGGGTGATTCTGA
CTCAGTCCCCCCCCGAAGAAAAAGAAAAAGAGGAAGTTTCCGTGGGGGAATCCCAGGATCCACAA
CTGTACTGGGACCTAACTCTCAGTCAATCCGACGTTCCCTGTGCCTGAAGACGAGAGTACCCAGT
TTCTGACGACGCTGTGGACGCTTCTGATCTCATTGCTGAACAGTAGTTAAGGTATGAGCCGTT
CTACTCAAAGAGATCTTTGGTCTTTGTTAAGGGAGAGACTTGAAAGGTATAAGGATCGAGTTAA
ATATTATGGTATTTTTGGTGGCAGAACGTCCTTCTACCTTAGCATCTTATTTTAGTAAAGACCCA
CCTCCAGATCCTCCAAGTAAATTTGATAAACCCCTATCAGGATGTAGATAGATTCTGGTTTC
    
```

FIG.1 (Cont.)

Secuencia de ADN de PPV5A

CAACAGACGATTATACTGACTGGTATGTCTGGCATGGAGAGGACAGACCTCCTAGATTTACCGA  
GCATTCCGGTGTTCAGGGTTTTAAACTAGGTGTGAGGGGGGGCTTCCTTTAAATGCCAGTGAT  
CCCAAATTTTGCCCCATACAAAATTTTGGGATCAGTTCGCTAATTTTGATGAGGGGTCTCCGT  
CCACCCAGATCGGTGAGAGTGTTCATGGAGTGATCATTTTGGAAGTCCCGATCCCTCTCATCA  
TCAGGAGGTGAGGGATGCTGATGAAGTTACTTCCGAGCGGCAGCAATATAAAAATAGGATTGTC  
ACCTTACTAAGAAAAGTTTATTGGGCTAAGCAGTGGTCTGGGAAATTACAAATTAATGTTCCCT  
CCCTCGAAAGCCTTTATGAGCAGATCCCCTATATGCTAGCCTATATGGACGCCGATAATTGGCG  
TCAGAATTTGTTAGCTGCTAAAACCTCTGCGAACCCTTTGGAAGCATTTTCCTGTGTTCCAGAT  
CCTTCCACGTGCGATGTCACAATCTCCACACCCTATCTGGTGAAACGGATCCCGCCTCTTTTG  
CAAAATACTTATGTTCCCTTGTATGCAACAGGTCTCAAGAAAAAGAACAGGCGCAGACGCCTTC  
TTTGTCTCCATCTAAGCAAAAAGGGCAGATGTCAAGTCTGATTCTGCATCGATCTCCCAACCT  
CCCCCTGAAAGTCACAAGGATAGACTGCTTCCCTAAAACCTGATCCCCTTCAGGAAGCAGGGCCCC  
TTCCCCTCCCCTACAGCTCAGAAGCCTATTATCTCTAAGGGTGCAGGCGGTGGAGGGTTCGTC  
TGGCTTCATAATCCCCTCCAAAACCTCCTAGCCCCGATCATACTAAAGATCCCCCCCCCTCCTCCT  
CCTCCCTCTCCAATTCCTCCTCCTACATCTGCGCCTGACGCAGAGGAGCACGAGCTAGAGCGTG  
CTAAGCAGGAGAAACAAGAGGAAGATGAGCTCATTGAAAGAATCAAATCAGGAGAAGGAGAAGG  
AGAACGAGGAGGCTTCGTCTTGCCCTTCTCACCCTACACTGGTCTAGAAATCCTGTCCCAGCT  
GGCAAGCCTGCTGACCCCGTTGATGAATCTTCTGCGAGACATGACATCAGGTATGGGCAACGTC  
TTAAACATGGAGACTGGCCATACCTGTGGGGGAAGGACTTGGATAATGCTCAGCGAGATGAGAT  
TATCAAAGCTCTTCATAGTCATGTCAAAGTGGGAACCCAATTGGCAGGGAATATAGTGAGGAGT  
ATCTGGAAGGCTAAGGAGCTCTTAACAGAACCCTGTGTATGAGCTGTTAAAGTCTATTCTCCCTC  
CTTCAGATTTATCTAAAGTTCCTCTTCCCTCATTCCCAACAGACAGACAGAACAGAAGATCCAGA  
AACTCCAGGGGAGACTAGAGGAACCTGGATCAGACAGTCTCCTCGATCTCCTCGGCCTTCTGGATCA  
ACTGAAGACGGGGGAGGTCCCTTCTTCCGAGTCCAGATTACCTGGGAGTAAAGTTCAGTAGACC  
CATCTGCCACCACGTCTGAAGCAAAGAGGCAGAGGACTGAGGAGGGGATGGACATATCTTCATG  
CGGTCCAGGGGGGATTTCTGCTTCTGGGGCTGCTTCAAATAACTCTGGTCTTGCTTGIGGGGGT  
GGGGGGGTACTAATTTAGGGACAGAATCTCTTGTATCCGGCTGTCAGTTTGGTAAAACTCTG  
TGATCACTTCATCTTTTAGACGATGCTTATTTACCCTGGCCTGATAAATACTGTTGTTCTTC  
TGCTCACGATCTTATTCCCGGAGTGGTCTACGAGACCCCTTGGTGCTATTATGATCTGAACGTC  
ATCTCAAGCTACATTTTTTCTCCTTCTGCTTGGCAGAGGCTTTTGGAGGATTATGATGCCTTTC  
GACCTAAATCCCTTAAAGTTACCATCCAGTCTTTAGTTTTAAAGATGTCTGTCAAGGTGCAGAA  
AAAACAAACTACAGTTCAGGATTCCCAGTCAGCCACTATTGCTATCTTTGAGGATAAAGACTAT  
GACTACCCCTATGTGATGGGAGGGGGTCAAAAAACAGTTCGGGTCACTTGCCCGGTCAACCTT  
ATAATCTTCCCAAGTATTCTTACAGAACCCTTGGTTCAGTCAAAGAAAGTAATAGGGCCAGTAT  
GGGCGGTTTCAGGGTACACTTTCAAATCCAATCAAGATACGGAATTGTTCCCTGCTTGAAACACAT  
GATGCCACTCTTATTCGAGGCGGGGGTACTTTTGAGCAGTACTATGAATTTCCAAACGATCTTC  
CTTTCGAAAATTTGACTCAGTATCCTTGGGATATCCGCCGTGAGGATAACCCCTCTATCAGCA  
GAGGATCACTGTGATGTCAGGTTCTGACAGAGATACGGTAGGCATTCTAGATGGAGATTTTTAC  
TCTCCTTTTTCGGTTCAAAGGACATGATAGACCCGCCATGTGGCTGCCAGGACAGAGGTTGATTC  
AGGGCAAATTCATAGATACGCACCCAATACCCAATACAGGGAGGAGTGGGGTTCATCCTAATGA  
TTTTACACAAGGGGCGATGGTTCATGGTGACCCCATAGAACACATGAAGAGAGGATCTACAGT  
CTAGATACAGGTCTTGCTGCTATGCCACGTGCCGCTCATAGACCCACCCTTCAGCCCGGACCTA

FIG.1 (Cont.)

GGACTCTGTCTCATGCCGTACGCAGACCCGATGGTTCACCGTGGTCACGGCTAATGCGTGTGC  
TTACGCTTACACCCAGGAGAATCCTCATCAGGAACCCTGGAGTGATCTCAATGTCAGACATAACC  
ATGTATAGGTTAGCCTATCAACGTCAAAAAGGTTTTTCAGCAACCCGGGGACCCCTTTCATATTC

GAACCCATGCTTGTTATGGGGACGGGGATGTTACCATTCCAAAAGAAGAGTCCTTATGGCCTAC  
TGTTCTGGGTAGTTGCACAGAAAAGTCCCCTGCCTGTTTAGAGTCCCAGATTTGGTGTAACA  
CCAAATGTGGACATGGTCTATGGAGAACACACACCCCCCTCTTGCTTTATGGGGTATGCATGCTC  
CCCCACCCCATGTATTTCTCAGGATGCTTGCTCAAGAGGGTCCTCCTAATGTCAGTACTTGCAG  
ACCGGCTCAATCTGGTCAGACCTTCATCAATCAATATGGTCAGTTTCTCCTCTGTTTTACCATG  
GTATGGGAAGTTAAGCCTAGACCCAAGTCCATCAAGCAGTGGAATCCACGTCCGCCCATCAGCA  
TTCTGTTGGTCAGTCTGGTCCTGCTTTTCAATCTCGATCAAGATGGCTACTACCGTCTCCCAGA  
ACATGTCTGGTCTGCCAGGGAACGTATCCGCAGCAAACGCTAGTGCCCCAGCAATACACTTAC  
TACAGTATTGATGTGTCAGGCATTCTGGTTGATTGTTTTATTTTGGCTCCGCCTACTGTATGGC  
CCATGTAAACGCATCTATTATGAAAATAAAATACGTCAATTGCTGATGTAATTCGTGTTGTAAT  
TCTTGTTTTGAAAAGCGCATATTTTCTTGCCGGTCTGAGTAAACACCACCTATGACATCATATAA  
ATTTGATTACGTAACCTCCTCTTTTTACTTCCGTCTTTTTTTGATTACGCAATATACACAATTC  
TAGCAGTTAACTATTACACAATATCACAC

FIG. 2

SECUENCIA PROTEÍNICA DE REPLICASA DE PPV5A

MGKSGRKLGPRGHWLQVSYRGRPF SVRPLKRSGRGRCAGCRKTPHLFFQLEKVD SKGGLHLHFCIS  
VAAGTPRDVSSMFKA IERRV SFYYFGVEGLTFFTPHKNKHGAWKSNDEGFIVNYLLKKLPLSEC  
VYAWTNMDGVIGDA CLNEDKRRELLSERQDQGVIKELTAPT FKAATGDKMLS VVDWMCNDVTT  
ERRWEEISAASLYSFLATPAGTHLAKQCLRAANQRIVSTKTSWLSLCKFASEKELRAFQNGDPE  
LSSDNNRIYYLFAMNNYCPDMASMIFFWWSMRQTGKRNSIWLFGPATTGKTNLASAI AHTAASY  
GCVNWNANANFPFQDIVNVQLGWWE EGKMTEDVVECAKALLGGSNVRVDRKCMQSAEVQSPFFII  
TSNTDMCLVSQGSYISFEHQQLQDRMIKFEFNHVLPGNFGLI SEDEVVAFFRNGAYNVLKHAY  
MRKAQLFALGPASLPYKPPTGELVCIDQAKSPSPSASRRSVRNWMTCPDPVQDDPAELDEYFP  
PDTPPEDCPCPI SPVRESCPSPGPCPTPPRKKQRKSKHCSLSVSAGKVPVVVVGDSDSVPPEEK  
EKEEVSVGESQDPQLYWDLTLSQSDVPVPEDESTQFPDDAVDASDLIAEQ

FIG.3

ORF3 DE PPV5A

MSRSTQRDLW SLLRERLERYKDRVKYYGILVPERPSTLAS YFSKDPPPDPPTVKFDKPYQDVDR  
FWFPTDDYTDWYVWHGEDRPPRFTEHSGVQGFKTRCEGGLPLMPSPDKFCPIQNFWDQFANFDE  
GSPSTQIGESVSWSDHFGSPDP SHHQEV RDADEV T SERQQYKNRIVTLLRKVYWAKQWSGKLQI  
NVPSLESLEYEQIPYMLAYMDADNWRQNLLAAKTLR TTLEAFSCVPDPSTCDVTISTPLSGETDP  
ASFAKYLC SLVCNRSQEKEQAQTPSLSPSKQKGQ

Fig. 4:

SECUENCIA PROTEÍNICA DE LA CÁPSIDE DE PPV5A

MQRINSGEGERGGFVLP SHHYTGPRNPVPAGKPADPVDESSARHDIRYGQRLKHGDWPYLWG  
KDLDNAQRDEI IKALHSHVKVGTQLAGNIVRSIWKAKELLTEPVYELLK SILPPSDL SKVPLPH  
SQQTDRTEDPETPGETRGTGSDSPRSPRPSGSTEDGGGPSSESRLPGSKVPVDPSATTSEAKRQ  
RTEEGMDISSCGPGGISASGAASNNSGLACGGGGT NLGTESLVSGCQFGKNSVITSSFRRLI  
SPWPKYCCSSAHDLIPGVVYETPWCYYDLNVISSYIFSPSAWQR LLEDYDAFRPKSLKVTIQS  
LVLKMSVKVQKKQTTVQDSQSATIAIFEDKDYDYPYVMGGGQKTVPGHLPGQPYNLPKYSYRTL  
GSVKESNRASMGSGYTFKSNQDTELF LLETHDATLIRGGGTFEQYYEFPNDLPFENLTQYPWD  
IRRQDNPLYQQRITVMSGSDRDTVGILDGDFYSPFRFKGHDRPAMWLPGQR LIQGKFIDTHPIP  
NTGRSGVHPNDFHTRGDGHGDTHR THEERIYSLDTGLAAMPRAAHRPTLQPGPRTL SHAVRRPD  
GSTVVTANACAYAYTQENPHQEPWSDLNVRHTMYRLAYQRQKGFQQPGDPLHIRTHACYGDGDV  
TIPKEESLWPTVLGSCTEKSPACLESQIWCKTPNVDMVYGEHTPPLALWGMHAPPHVFLRMLA  
QEGPPNVSTCRPAQSGQTFINQYGQFLLCFTMVWEVKPRPKSIKQWNPRPPI SIPVGQSGPAFI  
LDQDGYR LPEHVWSARERIRSKR

FIG. 5

Comparaciones de identidad de aminoácidos por parejas																
	[ 1]	[ 2]	[ 3]	[ 4]	[ 5]	[ 6]	[ 7]	[ 8]	[ 9]	[ 10]	[ 11]	[ 12]	[ 13]	[ 14]	[ 15]	[ 16]
[ 1] Bovino		47,2%	52,3%	50,3%	50,5%	52,8%	52,8%	52,8%	52,6%	6,6%	22,7%	22,5%	20,7%	20,7%	21,4%	18,4%
[ 2] Canino diminuto	43,3%		51,0%	60,2%	61,0%	50,5%	51,3%	50,5%	51,8%	7,4%	25,0%	24,7%	21,7%	21,7%	20,9%	18,1%
[ 3] GboV	43,7%	49,8%		50,0%	50,3%	91,3%	83,7%	83,7%	84,2%	6,6%	23,7%	23,7%	21,7%	21,7%	23,0%	17,6%
[ 4] PBoV1a	42,8%	53,5%	49,1%		93,9%	51,8%	50,5%	49,7%	51,5%	7,1%	24,0%	24,0%	20,9%	20,9%	23,2%	19,9%
[ 5] PBoV1b	43,3%	53,7%	49,5%	94,7%		51,8%	51,3%	49,7%	51,8%	7,9%	24,5%	24,5%	20,4%	20,4%	23,0%	20,2%
[ 6] HuBoca	44,2%	50,9%	93,3%	50,0%	50,7%		82,7%	82,7%	83,2%	6,9%	24,2%	24,2%	21,2%	21,2%	22,5%	17,9%
[ 7] HuBoca2	47,0%	50,5%	78,4%	50,0%	50,2%	80,5%		91,8%	91,1%	7,9%	23,5%	23,2%	20,9%	20,9%	22,5%	18,4%
[ 8] HuBoca3	44,7%	51,2%	92,6%	50,2%	50,5%	93,3%	80,0%		92,1%	8,7%	24,0%	23,7%	21,7%	21,7%	23,2%	18,6%
[ 9] HuBoca4	46,5%	50,2%	77,7%	50,0%	50,5%	80,2%	96,5%	79,3%		8,2%	23,5%	23,7%	21,4%	21,4%	23,2%	19,1%
[10] Densovirus	7,9%	7,0%	6,5%	7,7%	8,1%	6,5%	6,1%	6,7%	5,8%		7,7%	7,4%	8,4%	8,2%	6,9%	6,6%
[11] Hokovirus_a	20,5%	20,7%	20,5%	22,6%	22,3%	20,9%	20,2%	20,7%	20,5%	7,9%		99,5%	33,9%	34,2%	33,4%	17,6%
[12] Hokovirus_b	20,9%	20,9%	20,5%	22,6%	22,3%	20,9%	20,2%	20,7%	20,5%	8,1%	98,6%		33,9%	34,2%	33,4%	17,9%
[13] PPV4a	21,4%	21,2%	22,1%	22,1%	21,6%	22,8%	21,2%	22,8%	21,4%	6,3%	29,1%	29,1%		99,5%	51,3%	17,1%
[14] PPV4b	21,4%	21,2%	22,1%	22,1%	21,6%	22,8%	21,4%	22,8%	21,6%	6,3%	29,3%	29,3%	99,3%		51,3%	17,1%
[15] BIVI_PPV5A	22,1%	22,3%	23,3%	23,3%	23,0%	22,8%	23,0%	22,3%	23,3%	5,1%	32,6%	32,3%	60,5%	60,2%		15,8%
[16] PPV1	18,6%	25,4%	23,3%	20,5%	21,2%	22,8%	26,1%	23,5%	25,1%	5,8%	16,5%	16,5%	18,4%	18,4%	19,3%	
Parte superior = identidad de aminoácidos de vp1/cap																
Parte inferior = identidad de aminoácidos de rep																



FIG. 6

Análisis filogenético de la región VP1/CAP de PPV5A

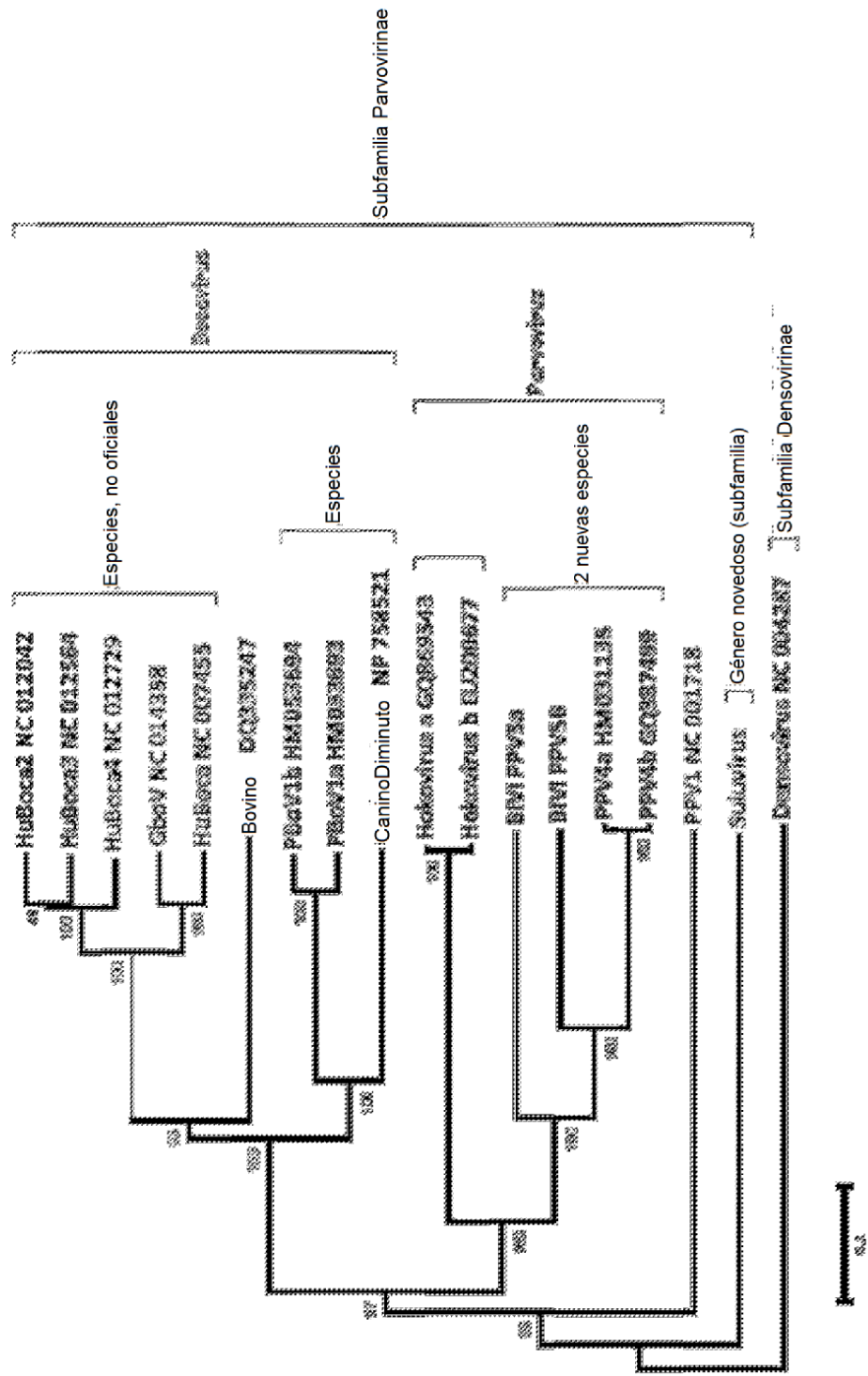


FIG. 7

Resultados de BLASTp de secuencias de PPV5A\_cápside frente a totales de genbank

Coincidencia más cercana: parvovirus porcino 4 PPV4 - Id de acceso a genbank: AFM73871

Identities de secuencia: 40% (310/774)

Homologías de secuencia: 52% (403/774)

PPV5A	163	KHGDWPYLWKGKDLDNAQRDEIIKALHSHVKVGTQLAGNIVRSIWKAKELLTEPVYELLS	222
		KHG WP+LW +D EI + L K+ +L N + ++W+AKE + P+YE++K	
PPV4_	3	KHGHWPHLWAPFVDRQMSQEIQQVLKGSTKLSQKLLANFIIALWRAKEKIGAPIYEIVKG	62
PPV5A	223	ILPPSDLKSVPLPHSQQTDRTEDEPETPGETRGTGSDSPRSPRPSGSTEDGGGPPSSESRLP	282
		+ P D V P +P RG+ SP P+ ED	
PPV4_	63	VFPSVDKKTIVESLLPHPDPPIAPPSSP--QRGSKRASPPQ--SPNAHDED-----	108
PPV5A	283	GSKVPVDPSATTSEAKRQRTEEGMDISSCGPGGISASGAASNNSGLACGGGGGTNLGTES	342
		I S KRQ+T E S C + + A + L CG GGG +	
PPV4_	109	-----TMSGHKRQKTMEVE--SECDKSLLCPTQNAGADFEL-CGTGGGATNEKGT	155
PPV5A	343	LVSGCQFGKNSVITSSFRRLCLISWPDKYCCSSAHDLPVGVYETPWCYYDLNVISSYIF	402
		V G QF S+ T RRC++S +PD YC + D IP +++ TPW YYDLN++S + F	
PPV4_	156	WVGGTQFTDTSIRTFGTRRCVLSAFPDTYCSMMSGDAIPSIIFNTPWYYYDLNIMSCH-F	214
PPV5A	403	SPSAWQRLLLEDYDAFRPKSLKVTIQSLVLKMSVKVQKKQT-TVQDSQSATIAIFEDKDYD	461
		SPSA+Q L+EDYDAFRP+SL V ++ LV+K + Q Q V D+ SAT+ FED +Y+	
PPV4_	215	SPSAFQTLIEDYDAFRPRSLTVHLKELVIKDVCCQQGLQAEQVSDNNSATLLAFEDVNYE	274
PPV5A	462	YPYVMGGGQKIVPGHLPGQPYNLPKYSYRTLGS-----VKESNRASMGGSY-----	508
		PYV+GGGQ +VPGHLPGQPY LPKYSYRT+G V N G G+	
PPV4_	275	LPYVLGGGQVSVPGHLPGQPYQLPKYSYRTVKGKDPNSGFVPGRNTHPDQPGHPKASKT	334
PPV5A	509	----TFKSNQDTELFLETHDATLIRGGGTFEQYYEFPNDLPFENLTQYPWDIRRDQDNPL	564
		+ QDTE ++LE H AT++ G TF Q+Y FP DLPFE LTQY WD RRQDNPL	
PPV4_	335	IWYSQYLETQDTEFYILENHKATILHSGNTFSQHYNFP-DLPFEQLTQYMWDAARRQDNPL	393
PPV5A	565	YQQRITVMSGSDRD----TVGILDGDFYSPFRFKGHRPAMWLPGQRLIQKGFIDTHPIP	620
		QRI VMS D T I + PF K RPAM+L G R G + T P	
PPV4_	394	IDQRIQVMSRMYDDGPQKTFAIKVNPIVPFVTKVTSRPFAMFLAGGRFKDGDYSITGPGD	453
PPV5A	621	NTGRSGVHPND---FHTRGDGHGDTHRTHEERIYSLDTGLAAMPRAAHRPTLQPGPRTLS	677
		S + ND TR DT Y + LA R QPGPR	
PPV4_	454	RDKTSFKKYNDPPWIIIR-----DT-----YLFSSDLAKTERE-----QPGPRQGD	494
PPV5A	678	HAVRRPDGSTVVTANACAYAYTQENPHQEPWSDLNVRHT-MYRLAYQRQKGFQQPGDPLH	736
		VR PDG+ +VT NA AY YT E P +RLA + ++G+ PG P H	
PPV4_	495	TVVRTPDGTLIVTTNALAYGYTTEYLKNIPLLSKYHGVENFRLAVENERGYSMPGHPHSH	554
PPV5A	737	IRTHACYGD-----GDVTIPKE----ESLWPTVLGSCTEKSPACLESQIWCKTPNVDMVY	787
		IR G + TI E E +P +GS EK+ A LESQIW + PN D+	
PPV4_	555	IRETLFRGKLPSEIRESTIKSEDQRKEITFPDYMGSVNEKTTANLESQIWSQIPNTIDITE	614
PPV5A	788	GEHTPPLALWGMHAPPPHVFRLRLAQEGPPNVSTCRPAQSGQTFINQYQGFLLCFTMVWE	847

FIG. 7 (Cont.)

		TPPL++WGM	PPP	VFLR+LAQ	GPP	S	C	+	T++NQY	QFLL	+	M	W+	
PPV4_	615	KCTTPPLSIWGMKNPPPMVFLRLLAQMGPPRRSACSGSIPSNTYLNQYCQFLLTYEMEWD												674
PPV5A	848	VKPRPKSIKQWNPRPPISIPVG-QSGPAFILDQDGYRLPEHVWSARERIRSKR												900
		V	R	+	+WNP	PP	IP+G	+	P	+IL+++G	YR+P	VW+A++R	R	+R
PPV4_	675	VIKTRKTRVWNP	IPPPQ	IPMGPN	NLPVY	ILNKEGQYRMPTEVWTAKQRPRHRR								728

FIG. 8

Resultados de BLASTp de secuencias de PPV5A\_rep frente a totales de genbank

Coincidencia más cercana: parvovirus porcino 4 PPV4 - Id de acceso a genbank: ADB20210

Identities de secuencia: 58% (292/504)

Homologías de secuencia: 73% (369/504)

PPV5A	15	LQVSYRGRPF SVRPLKRSGR CAGCR--KTPHLFFQLEKVD SKGGLHLHFCI SVAAGTPRD	72
		L ++ R R L++ R CR P +F QLE+VDSKGGLHLH+C+SV+AGTPRD	
PPV4_	33	LVI AVRQAEALFRELQKELR-KSCRLGVDPGIFMQLEEVDSKGGLHLHWCVSVSAGTPRD	91
PPV5A	73	VSSMFKA IERRV SFYYFGVEGLTFFTPHKNKHGAWKSND EGFIVNYLLKKLPLSECVYAW	132
		V ++FK E++VS YYFGVEGL+FF PHKNKHGAWKS DEGFI NYLLKKLPL EC+YAW	
PPV4_	92	VTIFKNTEKKVSQYYFGVEGLSFFVPHKNKHGAWKSTDEGFIYNYLLKKLPLKECLYAW	151
PPV5A	133	TNMDGVIGDA CLNEDKRRELLSERQDQGVIKELTAPT FKAATGDKMLSVDWMCNDNDVTT	192
		T + G IGDACLN DKR+ELL RQD VI+EL+AP +K ATG+KML +V W+ DN++ +	
PPV4_	152	TTIGGAIGDA CLNTDKRKELLDNRQDPAVIEELSAPMYKCATGEKMLDIVQWLVDNNICS	211
PPV5A	193	ERRWEEISAASLYSFLATPAGTHLAKQCLRAANQRIVSTKTSWLSLCKF ASEKELRAFQN	252
		E RWE +A SLYSFLAT AG ++AKQCLR A Q+++ K L+L F LR FQ	
PPV4_	212	ESRWENKNALSLYSFLATQAGGYMAKQCLRIAQQKLLKEKPLGLTLMDFKGMNALRRFQQ	271
PPV5A	253	GDPELSSDNNRIYYLFAMNNYCPDMASMIFFWWSMRQTGKRNSIWLF GPATTGKTNLASA	312
		+ E++ DNNR++Y+FA+NNY P +AS+I ++WSM+QTGKRN +W +GPATTGKTN+A A	
PPV4_	272	DEGEMTFDNNRMHYIFAINNYDPKIASVIMYFWSMKQTGKRNCVWFYGPATTGKTNMAQA	331
PPV5A	313	IAHTAASYGCVNWNANFPFQDIVNVQLGWWE EGKMTEDVVECAKALLGGSNVRVDRKCM	372
		I H++A+YG VNWNNANFPFQDIV Q+GWWE EGKMT D+VE AKALLGG+ +R+DRKCM	
PPV4_	332	ICHSSANYGNVNWNNANFPFQDIVGAQVGVWE EGKMTGDMVEAAKALLGGTALRIDRKCM	391
PPV5A	373	QSAEVQSPFFIITSNTDMCLVSQGSYISFEHQ QPLQDRMIKFEFNHVLPGNFGLISEDEV	432
		QS EV SPPF+ITSN DM +V +GS++SFEHQ QPL+DRMIKF FN LPGNFGLI+ +EV	
PPV4_	392	QSIEVNSPPFLITSNVDMTIVQEGSFVSFEHQ QPLEDRMIKFSFNMTLPGNFGLITSEEV	451
PPV5A	433	VAFFRNGAYNVLKHAYMRKAQLFALGPASLPYK PPTGELVCIDQAKSPSPASRRSVRNW	492
		+FFR GA + + +F GPAS+ + P GE+ P + +	
PPV4_	452	KSFFRMGA-KLAAQPDIMNCPIFKKGPASIRHLV PVGEI-----PPPKEMKHKRQPLY	503
PPV5A	493	MTCPPDPVQDDPAELDEYFPPDTP	516
		M PD +QD+P ELD +F + P	
PPV4_	504	MRAEPDEIQDNPEELDHWFE EEEAP	527