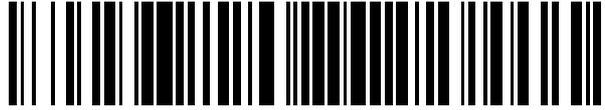


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 535**

51 Int. Cl.:

A61P 31/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2014 PCT/CN2014/076691**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14190838**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2014 E 14804814 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 2985288**

54 Título: **Virus de la pseudorrabia de los porcinos, composición de vacuna y método de preparación y uso de la misma**

30 Prioridad:

31.05.2013 CN 201310216881
18.09.2013 CN 201310428605

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

25.05.2020

73 Titular/es:

PULIKE BIOLOGICAL ENGINEERING, INC.
(100.0%)
No.5 Lingbo Road High-Tech zone
Luoyang, Henan 471000, CN

72 Inventor/es:

ZHANG, XUKE;
SUN, JINZHONG;
WU, RUI;
TAN, FEIFEI;
BAI, CHAOYONG y
TIAN, KEGONG

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 762 535 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

Virus de la pseudorrabia de los porcinos, composición de vacuna y método de preparación y uso de la misma

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a una composición de vacuna como se define adicionalmente en las reivindicaciones, perteneciente al campo de la virología animal.

Antecedentes

La pseudorrabia, llamada también enfermedad de Aujeszky, es una enfermedad infecciosa aguda causada por el *Herpesvirus 1 de los suidos* (SuHV1) perteneciente a la subfamilia *Alphaherpesviridae* para muchas clases de ganado tales como porcino, bovino y ovino, así como aves de corral y animales salvajes, cuyos signos principales son fiebre, picor intenso (excepto en los porcinos) y encefalomielititis. La pseudorrabia en los porcinos está causando daños graves en toda China, y es una de las principales enfermedades que limitan la producción en gran escala de granjas porcinas. La intención puede dar como resultado aborto, partos muertos o fetos momificados en las cerdas preñadas, y signos neurológicos, parálisis y un grado de muerte elevada en los lechones. El virus de la pseudorrabia (PRV) con fuertes propiedades pantrópicas, propiedades neurotrópicas e infectividad latente, puede establecer infección latente de larga duración en el sistema nervioso periférico, y más tarde el hospedador con infección latente comienza a enfermar cuando el virus latente se activa convirtiéndose en el virus infeccioso.

Ha sido indicado por muchos investigadores que puede proporcionarse a los animales vacunados una protección correspondiente por una vacuna subunitaria, que es una vacuna preparada por clonación de los genes antigénicos protectores del patógeno en sistemas de expresión de procariotas y eucariotas con métodos de ingeniería genética a fin de expresar fuertemente tales genes. Hasta ahora, se ha encontrado que cualquiera de las glicoproteínas B, C y D (gB, gC y gD) en las glicoproteínas de PRV puede hacer que el cuerpo genere anticuerpos neutralizantes, que tienen la capacidad de neutralizar el PRV, tanto in-vivo como in-vitro, o indistintamente en presencia o ausencia de complementos. El artículo, *Progress in Subunit Vaccine against Pseudorabies Virus Development* (Chenghui Yang, Gaoming Lou, Nanhui Chen, *Jiangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine* 2004 Número 3) ha descrito que cualquiera de gB, gC y gD entre las 11 glicoproteínas de PRV que se han encontrado hasta ahora, puede inducir al cuerpo a generar anticuerpos neutralizantes. En ausencia de complementos, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra gB, gC y gD pueden neutralizar el PRV. Los cerdos y ratones inyectados con anticuerpos monoclonales dirigidos contra gB, gC y gD pueden resistir los ataques por las células virulentas de PRV. Por tanto, gB, gC y gD son las proteínas más preferidas para el desarrollo de la vacuna subunitaria de PRV. La glicoproteína gD es un antígeno neutralizante importante, así como la diana principal para anticuerpos protectores, y puede inducir una mejor respuesta protectora. Como ha sido descrito por Marchioli et al. (*Journal of Virology* 61(12): 3977-3982 (1987)), KR 2003/0045139, US6172186, US6858385 and US6521231, puede prepararse una vacuna para prevención de la pseudorrabia por el uso de gD del virus de la pseudorrabia porcina. Más específicamente, se ha comunicado que una proteína gD de PRV que es 98,8% idéntica a SEQ ID NO:1 (denominada también gp50) protege los ratones y los cerdos contra la exposición letal a PRV (US6172786). Adicionalmente, una vacuna subunitaria que comprende gD de PRV producida en células CHO protege los cerdos contra la infección letal con PRV (Marchioli et al. *Journal of Virology* 61(12): 3977-3982 (1987)). Además, se ha demostrado que una vacuna de DNA plasmídico que codifica la secuencia gD de PRV, y que es 99,5% idéntica a SEQ ID NO:1, induce la formación de anticuerpos neutralizantes anti-PRV y también una respuesta inmune celular específica de PRV (KR 2003/0045139). El PRV porcino tiene solamente un serotipo, por lo que usualmente la inmunidad de protección cruzada entre cepas de PRV porcino está considerada como muy fuerte. Sin embargo, los lechones pueden sufrir todavía de la pseudorrabia porcina típica después de su inyección con vacunas comerciales, con signos tales como fiebre alta de larga duración, depresión, pérdida de apetito, y signos respiratorios y/o neurológicos. Las manifestaciones más importantes incluyen dicha infección entre los cerdos a cualesquiera edades, transmisión horizontal entre las piaras de cerdos, periodo de incubación corto (1 ~ 2 días), grados de morbilidad entre 10% ~ 100%, grado de mortalidad en los cerdos entre 10% ~ 100% (la grado de mortalidad en los lechones puede alcanzar hasta 100%), fiebre alta en los cerdos después de infectarse (40°C ~ 42°C, con duración hasta más de 3 días), disnea, diarrea, respiración sibilante, tos, estornudos, parálisis de los miembros posteriores, posición de perro sentado, caída repentina, convulsiones, posición tumbada de lado, opistótonos, golpeo con los brazos, y finalmente muerte por agotamiento, pudiendo causar también la infección signos de trastorno reproductivo tales como menor calidad del semen de los cerdos macho, así como aborto de las cerdas preñadas (la grado de abortos puede alcanzar hasta 35%), parto prematuro, parto muerto, lechones debilitados (los lechones debilitados mueren hacia los 14 días de edad), etc. Por medio de la técnica anterior, los cerdos vacunados no pueden resistir completamente los ataques del virus salvaje, y sufren además signos como fiebre alta, depresión, pérdida de apetito parcial o completa, con un grado de infección mayor que 30% y un grado de mortalidad entre 10% y 20%. No existen vacunas en la técnica anterior capaces de resolver la pseudorrabia causada por cepas variantes del virus de la pseudorrabia porcina.

Compendio de la invención

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

A fin de resolver la deficiencia de la técnica anterior, la presente invención está orientada a proporcionar una cepa del virus de la pseudorrabia porcina como se define en las reivindicaciones para preparación de vacunas como se definen en las reivindicaciones que, por ensayos en animales, se ha demostrado proporcionan una función inmune satisfactoria para la pseudorrabia porcina.

5 La presente invención proporciona una cepa del virus de la pseudorrabia porcina que comprende la glicoproteína gD codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO. 4; en donde dicha cepa del virus de la pseudorrabia comprende la glicoproteína gB codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO. 5; y en donde dicha cepa del virus de la pseudorrabia es la cepa HN1201, cuyo número de acceso es CCTCC NO. V 201311; dicha cepa HN1201 fue depositada en el China Center for Type Culture Collection (CCTCC) en fecha 20 de
10 mayo, 2013.

En la presente invención, la "secuencia de nucleótidos" se refiere a una secuencia de ácido desoxirribonucleico (DNA), que puede transcribirse en una secuencia de RNA correspondiente.

En la presente invención, el término "glicoproteína gD" se refiere a una proteína estructural requerida para la infección de PRV, que es una de las glicoproteínas principales en la superficie de la envoltura de las partículas maduras de virus, llamada también proteína gp50.
15

En la presente invención, el término "homología" se refiere al nivel de semejanza entre dos secuencias de aminoácidos o dos secuencias de nucleótidos. La homología entre secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos puede calcularse por cualesquiera métodos apropiados bien conocidos en la técnica, por ejemplo, la secuencia diana de aminoácidos (o nucleótidos) y la secuencia de referencia de aminoácidos (o nucleótidos) se alinean, pudiendo inducirse lagunas en caso necesario para optimizar el número de los aminoácidos (o nucleótidos) idénticos entre dos secuencias alineadas, y el porcentaje de los aminoácidos (o nucleótidos) idénticos entre dos secuencias alineadas puede calcularse de acuerdo con ello. La alineación de secuencias de aminoácidos (o nucleótidos) y el cálculo de la homología pueden realizarse utilizando software bien conocido en la técnica. Ejemplos de dicho software incluyen, pero no se limitan a, BLAST (al que puede accederse a través del sitio de Internet National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> o puede encontrarse en Altschul S. F. et al, J. Mol. Biol, 215:403-410 (1990); Stephen F. et al, Nucleic Acids Res. , 25:3389-3402(1997)), ClustalW2 (al que puede accederse a través del sitio de Internet del European Bioinformatics Institute, EBI, <http://www.eji.ac.uk/Toolsa/clustalw2/>, o puede encontrarse en Higgins D. G. et al, Methods in Enzymology, 266:383-402(1996); Larkin M. A. et al, Bioinformatics (Oxford, England), 23(21):2947-8(2007)), and Tcoffee (al que puede accederse a través de un sitio en Internet del Swiss Institute of Bioinformatics, SIB, <http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>, o puede encontrarse en, Poirot O. et al, Nucleic Acids Res., 31(13):3503-6(2003); Notredame C. et al, J. Mol. Biol, 302(1):205-17(2000)) etc. Está plenamente dentro del alcance de los conocimientos de una persona experta en la técnica que cuando se utiliza el software para realizar el alineamiento de secuencias, pueden utilizarse los parámetros por defecto proporcionados por el software o ajustar los parámetros proporcionados por el software conforme a la condición actual.
20
25
30

35 Dicha cepa de PRV comprende la glicoproteína gB codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO. 5 del listado de secuencias.

Preferiblemente, dicho PRV conforme a la invención comprende la glicoproteína gC codificada por la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO. 3 del listado de secuencias.

40 Preferiblemente, dicha cepa de PRV es la cepa HN1201 (virus de la pseudorrabia, cepa HN1201), cuyo número de acceso es CCTCC NO. V 201311; la cepa HN1201 fue depositada en el China Center for Type Culture Collection (CCTCC) en fecha 20 de mayo 2013, cuya dirección es Wuhan University, Wuhan City, Hubei Province.

El término "cultivo" se refiere a cultivos de diferentes pasos del virus, conocidos por los expertos en la técnica, que pueden tener sólo variaciones minúsculas de un paso a otro. Preferiblemente, dicho cultivo es un cultivo dentro de 5 ~ 35 pasos.

45 Otra finalidad de la invención es proporcionar una composición de vacuna que comprende una cantidad inmune de vacuna desactivada de dicha cepa del virus de la pseudorrabia porcina HN1201, o de una vacuna subunitaria que comprende el antígeno de la proteína G de la cepa PRV HN1201 codificado por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO. 4, y un adyuvante oleoso, como se define en las reivindicaciones.

50 Preferiblemente, la composición de vacuna conforme a la presente invención comprende dicho PRV o antígeno del mismo como componente activo.

Opcionalmente, el antígeno puede comprender proteína gB con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2 o uno cuyo fragmento comparte al menos 95% de homología con la secuencia de SEQ ID NO. 2.

Opcionalmente, el antígeno puede comprender proteína gC con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 3 o uno cuyo fragmento comparte al menos 95% de homología con la secuencia de SEQ ID NO. 3.

5 Como se utiliza en esta memoria, la expresión "vacunas vivas" se refiere a vacunas preparadas por virus que pueden reproducirse todavía en el hospedador o en las células y mientras tanto se ha debilitado su virulencia. Como se utiliza en esta memoria, el término "atenuado" se refiere a una reducción artificial de la virulencia de los patógenos por mutación de genes mediante preparación de patógenos que están privados de patogenicidad, pero mantienen inmunogenicidad. Generalmente, la atenuación puede conseguirse por irradiación UV, procesamiento químico o subcultivo continuo de orden alto *in vitro*. La alteración artificial de los genes atenúa la virulencia por, v.g., la delección de algunos nucleótidos específicos en la secuencia dada.

10 Como se utiliza en esta memoria, la expresión "vacuna desactivada", denominada también vacuna no viva, se refiere a una suspensión de virus desactivado utilizada como antígeno para producir inmunidad. Ejemplos de vacunas desactivadas incluyen vacunas de virus enteros y vacunas de virus divididos. Por empleo de métodos conocidos es fácil producir vacunas desactivadas. Por ejemplo, pueden obtenerse vacunas de virus enteros desactivadas por tratamiento con solución de formaldehído. Vacunas de virus divididos pueden prepararse con envolturas de virus después de tratamiento con éter.

15 La expresión "vacuna subunitaria" se refiere a una vacuna preparada por expresión sumamente eficaz del gen antigénico protector de un patógeno mediante clonación del mismo en un sistema de expresión procariota o eucariota. Una vacuna subunitaria tiene menos riesgo de reacciones adversas que una vacuna de virus entero. Por ejemplo, la proteína gD o proteína gC de PRV expresada puede utilizarse para preparar vacunas subunitarias.

20 La expresión "vacuna peptídica sintética" se refiere a un pequeño péptido que comprende solamente el componente de determinantes inmunógenos, es decir una vacuna preparada por síntesis de un péptido protector corto conforme a la secuencia de aminoácidos de proteínas naturales, y adición de un adyuvante después de unión de las mismas a un vehículo.

Preferiblemente, dicha composición de vacuna de la invención comprende una vacuna desactivada de la cepa PRV HN1201 o cultivo de la misma, cuyo contenido no es menor que $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml.

25 Preferiblemente, dicha composición de vacuna de la presente invención puede comprender $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml PRV por cerdo. La vacuna no puede desencadenar eficazmente la generación de anticuerpos cuando la cantidad de dicho PRV utilizada es menor que $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml. Por otra parte, la cantidad excesiva puede no ser económica.

Preferiblemente, dicha composición de vacuna comprende 25-100 µg/dosis de antígeno de la proteína gD de la cepa PRV HN1201 o cultivo de la misma.

30 Adicionalmente, dicha vacuna de la pseudorrabia de la presente invención puede utilizarse junto con otros patógenos o antígeno desactivados para preparar vacunas combinadas o vacunas complejas contra diversas enfermedades, con inclusión de la pseudorrabia. Como se utiliza en esta memoria, la expresión "vacuna combinada" se refiere a una vacuna preparada con la mezcla de virus por mezcladura del virus de la pseudorrabia de la presente invención con al menos un virus diferente. La expresión "vacuna compleja" se refiere a una vacuna preparada a partir de virus y bacterias. Por ejemplo, el virus de la pseudorrabia de la presente invención puede mezclarse o combinarse con el virus de la fiebre clásica de los porcinos, el virus del síndrome reproductivo y respiratorio de los porcinos, el circovirus en los porcinos y/o Haemophilus parasuis y micoplasma.

Dicha composición de vacuna comprende adicionalmente adyuvante 206 (SEPPIC, Francia).

40 Un objetivo más de la presente invención es proporcionar un método para preparar dicha composición de vacuna que comprende los pasos siguientes: amplificación y cultivo de la cepa PRV HN1201, desactivación, y mezcla subsiguiente con adyuvante 206 (SEPPIC, Francia), y mezcladura concienzuda, como se define en las reivindicaciones.

Específicamente, el método comprende los pasos: (1) inoculación de las cepas de la vacuna PRV en células sensibles respectivas, y cultivo de las células sensibles inoculadas; y recolección posterior del cultivo de células; y (2) tratamiento de los virus obtenidos en el paso (1) con solución de formaldehído, BPL (β-beta-propiolactona) o BEI (etilenimina binaria).

45 Las células sensibles pueden ser líneas de células continuas o líneas de células primarias. Las células sensibles adaptadas al cultivo de PRV incluyen, pero no se limitan a, líneas de células continuas tales como la línea de células ST (ATCC CRL-1746), la línea de células PK-15 (ATCC CCL-33), la línea de células Marc-145 de riñón del mono verde africano (ATCC CRL-12219), la línea de células MDBK Madin-Darby de riñón de bovino (ATCC CCL-22), la línea de células de cornete de bovino BT (ATCC CRL-1390), la línea de células Vero (ATCC CCL-81), la línea de células BHK-21 (ATCC CCL-10), la línea de células continua de riñón de cerdo (tales como IBRS-2, véase p. ej. DECASTRO, M. P. 1964. Behavior of foot and mouth disease virus in cell culture: susceptibility of the IB-RS-2 swine cell line. Archivos Instituto Biologica 31:63-78), la línea de células continua de riñón de conejo (RK, p. ej. ATCC CCL-106) etc., y líneas de células primarias tales como fibroblastos de embrión de pollo y células de riñón de porcino, etc. Las células primarias pueden aislarse y prepararse a partir de tejidos de animales por métodos bien conocidos en la técnica.

La composición de vacuna conforme a la presente invención puede prepararse en formas de dosificación orales o formas de dosificación no orales. Se prefieren las formas de dosificación no orales que pueden administrarse por ruta intradérmica, ruta intramuscular, ruta intraperitoneal, ruta intravenosa, ruta subcutánea, ruta intranasal o ruta epidural.

5 Otra finalidad de la invención es proporcionar un método para preparación de la composición de vacuna, que comprende los pasos: (1) clonación de dicho gen gD recombinante de PRV; (2) expresión de dicha proteína gD recombinante de PRV; y (3) mezcla de dicho antígeno de la proteína gD de PRV con adyuvante 206 (SEPPIC, Francia) y emulsión de la mezcla resultante.

Una afinidad adicional de la invención es proporcionar dicha composición de vacuna para su uso en el tratamiento de la infección de PRV.

10 Como se utiliza en esta memoria, la expresión "enfermedades relacionadas con PRV" puede referirse adicionalmente a enfermedades causadas por infección de PRV. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, signos neurológicos obvios, estado letárgico, gritos, diarrea con vómito, y fiebre en los lechones infectados, y aborto, fetos momificados o nacidos muertos o trastorno reproductivo en las cerdas preñadas infectadas.

15 Como se utiliza en esta memoria, la expresión "enfermedades relacionadas con PRV" puede referirse adicionalmente a enfermedades con manifestaciones importantes que incluyen, pero no se limitan a, infección entre los cerdos a cualesquiera edades, transmisión horizontal entre las piaras de cerdos, periodo de incubación corto (1 ~ 2 días), grados de morbilidad entre 10% ~ 100%, grado de mortalidad en los cerdos entre 10% ~ 100% (la grado de mortalidad en los lechones puede alcanzar hasta 100%), fiebre alta en los cerdos después de infectarse (40°C ~ 42°C, con duración hasta más de 3 días), disnea, diarrea, respiración sibilante, tos, estornudos, parálisis de los miembros posteriores, posición de perro sentado, caída repentina, convulsiones, posición tumbada de lado, opistótonos, golpeo con los brazos, y finalmente muerte por agotamiento, y signos de trastorno reproductivo causados por la infección tales como menor calidad del semen de los cerdos macho, así como aborto de las cerdas preñadas (la grado de abortos puede alcanzar hasta 35%), parto prematuro, parto muerto, lechones debilitados (los lechones debilitados mueren hacia los 14 días de edad), etc. Las diferencias entre los signos descritos anteriormente y los signos causados por la infección del virus de la pseudorrabia regular en la técnica anterior son: en los cerdos adultos (cuyo peso es superior a 50 kg), fiebre alta de los cerdos infectados (40°C ~ 42°C, que puede durar hasta más de 3 días), disnea, diarrea, respiración sibilante, tos, estornudos, parálisis de los miembros posteriores, posición de perro sentado, caída repentina, convulsiones, posición tumbada de lado, opistótonos, golpeo con los brazos, y finalmente muerte por agotamiento; incidencia repentina de pseudorrabia en lechones recién nacidos y lechones de edad inferior a 4 semanas, que da como resultado ulterior la muerte masiva con una mortalidad mayor que 90%; manifestaciones principales en los lechones infectados que incluyen temperatura corporal elevada superior a 41°C, pérdida completa del apetito, signos neurológicos obvios y diarrea; y en los lechones inmediatamente antes o después del destete, principalmente signos respiratorios, tales como disnea, tos y narices moqueantes, etc.

35 Como se utiliza en esta memoria, el término "prevención" se refiere todas las conductas orientadas a inhibir la infección del virus de la pseudorrabia o retardar la aparición de la enfermedad por administración de la composición de vacuna. El término "tratamiento" se refiere a todas medidas orientadas a aliviar o curar los signos causados por la infección de PRV mediante la administración de la composición de vacuna conforme a la presente invención.

Breve Descripción de los Dibujos

40 Figura 1. Resultado del análisis de homología entre las secuencias de aminoácidos de gC en la cepa HN1201 y la cepa SA215.

Figura 2. Resultado del análisis de homología entre las secuencias de aminoácidos de gD en la cepa HN1201 y la cepa SA215.

Listado de secuencias

SEQ ID NO. 1 es la secuencia de aminoácidos de gD en la cepa PRV HN1201.

45 SEQ ID NO. 2 es la secuencia de aminoácidos de gB en la cepa PRV HN1201.

SEQ ID NO. 3 es la secuencia de aminoácidos de gC en la cepa PRV HN1201.

SEQ ID NO. 4 es la secuencia de nucleótidos de gD en la cepa PRV HN1201.

SEQ ID NO. 5 es la secuencia de nucleótidos de gB en la cepa PRV HN1201.

SEQ ID NO. 6 es la secuencia de nucleótidos de gC en la cepa PRV HN1201.

50 Descripción detallada

La descripción de la presente invención se proporciona adicionalmente como sigue con referencia a las realizaciones específicas, y las características y ventajas de la presente invención se harán más evidentes a partir de la descripción

siguiente. Sin embargo, estas realizaciones son sólo ilustrativas, pero no constituyen limitación alguna del alcance de la presente invención, que está definido únicamente por las reivindicaciones.

La expresión "por cerdo" se refiere a la cantidad de vacuna inyectada a cada cerdo.

5 En la invención, el término "TCID₅₀" se refiere a la dosis infectiva de cultivo de tejido del 50%, una forma de representar la infectividad viral.

El medio líquido Medio Esencial Mínimo (MEM) se prepara con medio MEM seco pulverizado adquirido de Life Technologies, Corp. conforme a las instrucciones.

El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) en la presente invención se prepara con referencia al método de preparación del Apéndice A de GB/T18641-2002 *Diagnostic Techniques for Aujeszki's Disease*.

10 El término "PBS" es la abreviatura para Solución Salina Tamponada con Fosfato, y PBS 0,01 mM de pH 7,4 se prepara como se describe en *Molecular cloning: Laboratory manuals, 3ª edición*.

Ejemplo 1

Recogida y aislamiento de los virus

15 Se recogió tejido cerebral de porcino en condiciones asépticas a partir de muestras aisladas de muestras de la provincia de Henan sospechosas de padecer infección de pseudorrabia, añadidas en medio líquido MEM en una ratio de 1:10 (V:V), y se trituró para preparar una suspensión de tejido. Después de 3 veces de congelación-descongelación repetidas, la suspensión de tejido se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos. Se recogió luego el sobrenadante, se filtró a través de un filtro de 0,2 µm se subcultivó en células PK-15 y se incubó a 37°C durante 1h, después de lo cual se cambió el medio por adición de medio líquido MEM suplementado con suero de bovino fetal al 2%, y se incubó a 20 37°C durante 5 días. El PRV se detectó con el kit de detección de PRV PCR (Beijing Anheal Laboratories Co., Ltd), y el resultado fue positivo; el kit PCR se empleó para detectar la contaminación con virus exótico (kit de detección RT-PCR del virus reproductivo porcino y el virus del síndrome respiratorio, kit de detección del parvovirus porcino y kit de detección del virus de la fiebre clásica del cerdo RT-PCR, adquiridos todos ellos de Beijing Anheal Laboratories Co., Ltd) para el virus aislado y el resultado de la detección PCR fue negativo, indicando una especie viral pura.

25 La cepa PRV aislada se depositó en la China Type Culture Collection el 20 de mayo de 2013 y se designó cepa HN1201 (virus de la pseudorrabia, cepa HN1201) cuyo número de acceso es CCTCC NO. V 201311 y la dirección de conservación es Wuhan University, Wuhan City, Hubei Province.

Ejemplo 2

Características genéticas del virus aislado

30 Las características genéticas del virus aislado en el Ejemplo 1 se determinaron por medio de análisis de genes. Se utilizó como molde DNA genómico preparado a partir del virus de la pseudorrabia aislado de células PK-15, con los cebadores que se muestran en la Tabla 1 para reacciones de amplificación PCR. Se utilizó el Cebador 5.0 para designar la secuencia cebadora para amplificación de los genes gB, gC y gD, respectivamente.

35 El DNA genómico extraído se utilizó como molde para preparar el sistema de amplificación PCR siguiente: 100 µg DNA molde, 0,5 µl DNA-polimerasa PrimerSTAR HS (2,5 U/µl), 25 µL tampón 2 x PrimerSTAR GC, 1 µL de cada cebador aguas arriba y aguas abajo (10 pmol/µl), 4 µl de mezcla dNTP (2,5 mM cada uno), ajustado a un volumen final de 50 µl con agua destilada. Se llevó a cabo una reacción PCR en dos pasos por una desnaturalización inicial durante 10 segundos a 98°C, seguida por reasociación y extensión a 68°C (todo el tiempo se calcula por 1 kb/minuto) y se realizaron 30 ciclos en total. Las reacciones PCR se finalizaron a 4°C. El análisis de los productos de amplificación se condujo por electroforesis en gel de agarosa al 1% que contenía bromuro de etidio. Se determinaron las secuencias de los productos PCR. Los datos de las secuencias se analizaron por Lasergene.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores PCR

Gen diana	Secuencia cebadora (5' → 3')	Tamaño del producto PCR
gB	aagcgcacatcttattgtttcccg	2957pb
	ggcttctaccgctccagacgg	
gC	accgtcgccatgtgcgccacta	1603pb
	cgggtcggactcgtgtcgtttatt	
gD	ttccatacactcacctgccagc	1250pb
	tcgacgccggtactgcggag	

Ejemplo 3

Test de patogenicidad del virus

3.1 Patogenicidad del virus en lechones de diferentes días de edad

5 6 lechones de 34 ~ 35 días de edad que eran negativos para anticuerpos de pseudorrabia se dividieron aleatoriamente en 2 grupos, uno con 4 lechones (grupo experimental) y el otro con 2 lechones (grupo de control), en donde el grupo experimental se inoculó con la cepa PRV HN1201 por instilación intranasal (la dosis de exposición es $2 \times 10^{8.0} \text{TCID}_{50}/\text{lechón}$) y el grupo de control se inoculó con medio DMEM. Mientras tanto, se inocularon 4 lechones de 49 días de edad con el tercer paso de la cepa virulenta HN1201 después de la preservación (la dosis de exposición fue $2 \times 10^{8.0} \text{TCID}_{50}/\text{lechón}$), y el control son todavía lechones de 35 días de edad. Después de la inoculación del virus, se determinó diariamente la temperatura de los lechones, y se observaron los signos clínicos y el estado de la muerte. 10 Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Patogenicidad de la cepa PRV HN1201 en lechones de diferentes días de edad

Grupo	Número	Días	Dosis de Inoculación	Signos Clínicos	Estado de Muerte
1	A1	35	$2 \times 10^{8.0} \text{TCID}_{50}/\text{lechón}$	Temperatura corporal aumentada, depresión, pérdida de apetito, aparición de signos respiratorios y/o neurológicos	Murió el día 4 después de exposición al virus
	A2				Murió el día 5 después de exposición al virus
	A3				Murió el día 5 después de exposición al virus
	A4				Murió el día 6 después de exposición al virus
2	B1	49	$2 \times 10^{8.0} \text{TCID}_{50}/\text{lechón}$	Temperatura corporal aumentada, depresión, pérdida de apetito, aparición de signos respiratorios y/o neurológicos	Murió el día 7 después de exposición al virus
	B2				Murió el día 7 después de exposición al virus
	B3				Murió el día 5 después de exposición al virus
	B4				Sobrevivió
3	C1	35	Control DMEM	Normal	Sobrevivió
	C2				Sobrevivió

15 Los resultados demostraron que la inoculación con la cepa PRV HN1201 en los lechones con diferentes días de edad podía conducir a la aparición de la pseudorrabia en los lechones, así como la muerte de más de 3/4 de los lechones inoculados.

3.2 Patogenicidad del virus a diferentes dosis en los lechones

20 8 lechones de 49 días de edad que eran negativos para anticuerpos de la pseudorrabia se dividieron aleatoriamente en 2 grupos, cada uno con 4 lechones, y se utilizaron adicionalmente 2 lechones más como control. Los grupos experimentales se inocularon con $2 \times 10^{7.0} \text{TCID}_{50}/\text{lechón}$ de la cepa PRV HN1201 o $2 \times 10^{8.0} \text{TCID}_{50}/\text{lechón}$ por instilación intranasal, respectivamente, y el grupo de control se inoculó con medio DMEM. Después de la inoculación del virus, se determinó diariamente la temperatura corporal de los lechones, y se observaron los signos clínicos y el estado de la muerte. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Patogenicidad de diferentes dosis de la cepa PRV HN1201 en los lechones

Grupo	Número	Dosis de Inoculación	Signos Clínicos	Estado de Muerte
1	A1	2 x 10 ^{7.0} TCID ₅₀ /lechón	Signos clínicos significativos: temperatura aumentada, depresión, pérdida de apetito	Murió el día 5 después de exposición al virus
	A2			Murió el día 6 después de exposición al virus
	A3			Murió el día 6 después de exposición al virus
	A4			Murió el día 6 después de exposición al virus
2	B1	2 x 10 ^{8.0} TCID ₅₀ /lechón	Signos clínicos significativos: temperatura aumentada, depresión, pérdida de apetito	Murió el día 2 después de exposición al virus
	B2			Murió el día 3 después de exposición al virus
	B3			Murió el día 4 después de exposición al virus
	B4			Murió el día 4 después de exposición al virus
3	C1	Control de DMEM	Normal	Sobrevivió
	C2			Sobrevivió

Los resultados demostraron que la inoculación con diferentes dosis de la cepa PRV HN1201 aislada clínicamente en los lechones de 49 días de edad podía conducir de hecho a la aparición de pseudorrabia en los lechones, de los cuales murieron 4/4.

5 Ejemplo 4

Preparación de la vacuna de PRV desactivada

El cultivo de diferentes pasos de la cepa aislada se inoculó, conforme a la Tabla 4, en un cultivo de células PK-15 para formar un lote de siembra que se inoculó luego en una monocapa de cultivo de células PK al 1% (V/V) de la cantidad del medio de virus de líquido y se puso en una incubadora rotativa a 37°C. El medio celular que contenía virus se cosechó cuando el efecto citopático de las células alcanzó 80%; los virus se cosecharon después de 2 tandas de congelación-descongelación y se evaluó el título de virus. Se añadió solución de formaldehído al 10% (V/V) a diferentes pasos de la solución de virus respectivamente, con una concentración final de 0,2% (V/V). La solución de virus se desactivó a 37°C durante 18 horas, agitando durante 10 minutos cada 4 horas, y se diluyó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7, 4 hasta el contenido de virus que se muestra en la Tabla 4, se mezcló con adyuvante 206 (SEPPIC, Francia) conforme a la ratio volumétrica de 54:46, y se agitó a 120 rpm durante 15 minutos a 30°C.

Tabla 4. Preparación de cada grupo de vacunas de pseudorrabia

Grupo	Número de pasos del cultivo de HN1201	Contenido de virus antes de la desactivación	Ratio de vacunas (solución de virus desactivado:adyuvante 206)
A	5	10 ^{8.43} TCID ₅₀ /ml	54:46
B	35	10 ^{6.0} TCID ₅₀ /ml	54:46

Ejemplo 5

Ensayo de inmunogenicidad de las vacunas desactivadas

20 16 lechones de 21 días de edad que eran negativos para anticuerpos PRV se dividieron aleatoriamente en 4 grupos, cada uno con 4 lechones, y se inyectaron con vacunas conforme a la Tabla 5. Dos grupos inyectados con vacunas desactivadas se inyectaron con 2 ml/lechón de las vacunas contra la pseudorrabia desactivadas preparadas en el Ejemplo 4. Como vacuna de control, se aplicó la cepa SA215 de vacuna viva preparada utilizando el método descrito

en el documento CN101186902 conforme al método para determinación de la inmunogenicidad en la memoria descriptiva de la patente. El grupo de control se inoculó con 2 ml/lechón de medio DMEM.

Tabla 5. Agrupación del ensayo de inmunogenicidad

Grupo	Vacunas inyectadas	Dosis
Grupo A inyectado con vacuna desactivada	Vacuna del grupo A preparada en el Ejemplo 4	2 ml/lechón
Grupo B inyectado con vacuna desactivada	Vacuna del grupo B preparada en el Ejemplo 4	2 ml/lechón
Grupo inyectado con vacuna viva SA 215	Vacuna viva de PRV	10 ^{6,0} TCID ₅₀ /lechón
Grupo de control	Medio DMEM	2 ml/lechón

5 Después de la inmunización con las vacunas, se determinaron semanalmente los títulos de anticuerpos neutralizantes de los grupos de vacunas desactivadas conforme al método del test de neutralización del suero GB/T18641-2002 *Diagnostic Techniques for Aujeszky's Disease*. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Títulos de anticuerpos neutralizantes en diferentes momentos en los lechones después de inmunización con vacunas de PRV desactivadas

Grupo	Valor promedio de títulos de neutralización de anticuerpos en tiempos diferentes (semanas)			
	1	2	3	4
Grupo A inyectado con vacuna desactivada	1:4,8	1:11,2	1:16,0	1:37,7
Grupo B inyectado con vacuna desactivada	1:4,0	1:6,3	1:13,5	1 :22,4
Grupo inyectado con vacuna viva	1:3,7	1:4,0	1:10,0	1:16,0
Grupo de control	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

10 El resultado de la Tabla 6 indicaba que la inmunización con vacunas PRV desactivadas en los lechones puede producir títulos neutralizantes altos que aumentan con el tiempo de inmunización.

Los lechones se expusieron con 2 x 10^{8,0}TCID₅₀/lechón de la cepa PRV HN1201 el día 28 después de la inmunización, se observaron los signos clínicos y el estado de la muerte como se muestra en la Tabla 7. Después de la exposición, se determinó diariamente la temperatura corporal de los lechones como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 7. Exposición viral para los lechones después de la inmunización con vacunas de PRV desactivadas

Grupo	Signos clínicos y estado de la muerte	Grado de protección
Grupo A inyectado con vacuna desactivada	Temperatura corporal aumentada durante 2-3 días, apetito normal, básicamente sin signos neurológicos, sobrevivió	100% (4/4)
Grupo B inyectado con vacuna desactivada	Temperatura corporal aumentada durante 2-3 días, apetito normal, básicamente sin signos neurológicos, sobrevivió	100% (4/4)
Grupo inyectado con vacuna viva	Temperatura corporal aumentada durante 7-10 días, pérdida de apetito, signos neurológicos significativos, sobrevivió	100% (4/4)
Grupo de control	Signos significativos, dos lechones murieron el día 2 después de la exposición, y todos ellos murieron dentro de 3 días después de la exposición	0% (0/4)

15 Tabla 8. Cambio de temperatura corporal después de exposición para los lechones inmunizados con vacunas de PRV

Día	Grupo A inyectado con vacuna desactivada	Grupo B inyectado con vacuna desactivada	Grupo inyectado con vacuna viva

Día 1 después de la exposición	39,5	39,6	39,4
Día 2 después de la exposición	41,2	41,6	41,8
Día 3 después de la exposición	40,5	40,3	41,2
Día 4 después de la exposición	40,2	39,7	41,6
Día 5 después de la exposición	39,7	39,5	41,4
Día 6 después de la Exposición	39,6	39,4	41,3
Día 7 después de la exposición	39,7	39,5	41,4
Día 8 después de la exposición	39,5	39,7	41,2
Día 9 después de la exposición	39,6	39,4	41,5
Día 10 después de la exposición	39,2	39,5	40,6
Día 11 después de la exposición	39,5	39,7	39,7
Día 12 después de la exposición	39,4	39,5	39,8
Día 13 después de la exposición	39,3	39,4	39,7
Día 14 después de la exposición	39,2	39,1	39,4

- Los resultados de las Tablas 7 y 8 indicaban que la inmunización de los lechones con vacunas PRV desactivadas podía proporcionar un grado de protección de 100% (4/4) a los lechones, aun cuando la infección de virus no pudo evitarse (los lechones presentaban signos clínicos), mientras que todos los lechones en el grupo de control habían muerto el día 4 después de la exposición, por lo que las vacunas de PRV desactivadas pueden proporcionar protección excelente. Adicionalmente, la temperatura corporal de los lechones inmunizados con las vacunas desactivadas aumentaba durante menos tiempo comparada con la vacuna viva como vacuna de control, y aquéllos mantenían también un apetito básicamente normal sin signo clínico alguno, lo que indicaba una protección inmune excelente.

Ejemplo 6

Preparación de la proteína gD de PRV

10 1. Amplificación del gen gD de PRV

- Las células PK-15 perfectamente sanas se inocularon con la cepa PRV HN1201 o cultivo de la misma de diferentes pasos (la cepa de PRV era la cepa HN1201 (virus de la pseudorrabia, cepa HN1201), cuyo número de acceso era CCTCC NO. V 201311; la cepa HN1201 fue depositada en el China Center for Type Culture Collection (CCTCC), cuya dirección era Wuhan University, Wuhan City, Hubei Province) el día 20 de mayo de 2013, y el cultivo de diferentes pasos era el cultivo dentro de 5 ~ 35 pasos. El DNA genómico de PRV se extrajo utilizando el Kit de Extracción de RNA/DNA MiniBEST Viral Ver. 3.0 (TAKARA) después de la recolección de los virus. La amplificación PCR se realizó utilizando 1 µL de DNA genómico como molde y los cebadores específicos de gD siguientes:

gDSF: 5' ATGCTGCTCGCAGCGCTATTGGC 3' y

gDSR: 5' CTACGGACCGGGCTGCGCTTTTAG3'.

- 20 En la reacción PCR se utilizó la polimerasa de alta fidelidad Prime STAR® HS DNA Polymerase con Tampón GC (TAKARA). Las condiciones de amplificación fueron: 94°C 3 min; 94°C 30 s, 68 °C 90 s, 30 ciclos; 72°C 5 min. El producto PCR se designó gD, cuya secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ No. 4, y la secuencia de aminoácidos pueden deducirse como se muestra en SEQ No. 1.

2. Adquisición e identificación del Búcido recombinante

- 25 El producto PCR, gD obtenido de la amplificación con la polimerasa de alta fidelidad se clonó en el vector pFastBac/HBM-TOPO (Invitrogen, A11339). El sistema de clonación era como sigue: 4 µL producto PCR, gD, 1 µl de solución salina, 1 µl vector TOPO; 6 µl en total. La mezcla se mezcló a fondo y se incubó a la temperatura ambiente durante 5 minutos, después de lo cual se utilizó para transformar células competentes One Shot® Mach1™ T1R. La mezcla de transformación se extendió en placas que contenían ampicilina. Se seleccionó una sola colonia para identificar la direccionalidad de inserción del gen gD, y el plásmido con la direccionalidad de inserción correcta se suministró a Invitrogen para su secuenciación, a fin de comprobar la secuencia correcta. El plásmido con la secuencia correcta se designó pFastBac/HBM-TOPO-gD.

- 35 Después de la transformación del plásmido pFastBac/HBM-TOPO-gD en células DH10Bac competentes, se produjo la transposición entre el plásmido pFastBac/HBM-TOPO-gD y el Búcido plasmídico lanzadera en las células competentes, y el plásmido recombinante resultante se extrajo utilizando el Kit Miniprep de DNA Plasmídico Purelink™

HiPure (Invitrogen), y la inserción de gD se identificó con el cebador pUCM13 directo/pUCM13 inverso. El Bámido positivo se designó Bacmid-gD.

3. Transfección para la obtención de baculovirus recombinante

5 Este paso se llevó a cabo basándose en el método proporcionado por las instrucciones del Sistema de Expresión Secretada Bac-to-Bac HBM TOPO (Invitrogen). Se estratificaron 8×10^5 células sf9 en cada pocillo de una placa de 6 pocillos, se realizó la transfección conforme a las instrucciones del agente de transfección Cellfectin® II después de la adherencia de las células: 8 µL de Cellfectin® II y 1 µg de DNA Bacmid-gD se diluyeron respectivamente con 100 µL de medio SF-900 II y se mezcló vorticialmente. El DNA diluido se combinó con el agente diluido Cellfectin® II (volumen total ~ 210 µL), se mezcló concienzudamente y se incubó durante 15-30 minutos a la temperatura ambiente. Se añadió luego gota a gota a las células la mixtura de transfección. El sobrenadante del cultivo de células, marcado como baculovirus P0 recombinante vBac-gD, se recogió 72 horas después de la transfección o hasta que fue visible el efecto citopático. El baculovirus P0 recombinante vBac-gD infectó las células sf9, y después de tres tandas de amplificación el baculovirus P3 recombinante resultante vBac-gD se utilizó para expresión de la proteína recombinante.

4. Infección de células High-five con el baculovirus recombinante para expresión de la proteína recombinante

15 El baculovirus recombinante P3 vBac-gD se inoculó en células High-five (Invitrogen, B85502). Se realizó un cultivo de suspensión de células High-five en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y las células se inocularon con el virus a una MOI de 1 cuando la densidad de células alcanzó $7,0 \times 10^5$ células/ml. El sobrenadante del cultivo de células se recogió 72 horas después de la infección. Se empleó un Sistema de Filtración en Flujo Tangencial (Millipore) para concentrar el volumen hasta 1/10 del original. Se utilizó 1% (V%) de Tritón X-100 (Sigma) para desactivar el baculovirus, y el contenido de proteína determinado por el método de densidad óptica SDS-PAGE era 200 µg/ml.

Ejemplo 7

Preparación de las vacunas subunitarias de PRV

25 Los antígenos subunitarios preparados en el Ejemplo 6 se diluyeron con PBS (pH = 7,4) hasta los contenidos de proteína indicados en la Tabla 9, se mezclaron con adyuvante 206 (SEPPIC, Francia) a una ratio volumétrica de 54:46, y se agitaron a 120 rpm durante 15 minutos a 30°C.

Tabla 9. Preparación de cada grupo de las vacunas subunitarias de la pseudorrabia

Grupo	Contenido de proteína	Ratio de vacunas (solución de virus desactivada: adyuvante 206)
A	25 µg/mL	54:46
B	100 µg/ml	54:46

Ejemplo 8

Ensayo de inmunogenicidad de las vacunas en los cerdos

30 12 lechones de 21 días de edad que eran negativos para anticuerpos PRV se dividieron aleatoriamente en 3 grupos, cada uno con 4 lechones, y se inyectaron con 2 ml/lechón de las vacunas subunitarias contra PRV preparadas en el Ejemplo 7 conforme a la Tabla 10. El grupo de control se inoculó con 2 ml/lechón de medio DMEM.

Tabla 10. Agrupación del ensayo de inmunogenicidad

Grupo	Vacunas inyectadas	Dosis
Grupo A inyectado con vacuna subunitaria	Vacuna del grupo A preparada en el Ejemplo 7	2 ml/lechón
Grupo B inyectado con vacuna subunitaria	Vacuna del grupo B preparada en el Ejemplo 7	2 ml/lechón
Grupo de control	Medio DMEM	2 ml/lechón

35 Los lechones se expusieron con $2 \times 10^{8,0}$ TCID₅₀/lechón de la cepa PRV HN1201 el día 28 después de la inmunización, y se observaron los signos clínicos y el estado de la muerte como se muestra en la Tabla 11. Después de la exposición, se determinó diariamente la temperatura corporal de los lechones como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 11. Exposición viral para los lechones después de inmunización con las vacunas subunitarias de PRV

Grupo	Signos clínicos y estado de la muerte	Grado de protección
-------	---------------------------------------	---------------------

Grupo A inyectado con vacuna subunitaria	Temperatura corporal aumentada durante 2-3 días, apetito normal, básicamente sin signos neurológicos, sobrevivió	100% (4/4)
Grupo B inyectado con vacuna subunitaria	Temperatura corporal aumentada durante 2-3 días, apetito normal, básicamente sin signos neurológicos, sobrevivió	100% (4/4)
Grupo de control	Signos significativos, dos murieron el día 2 después de la exposición, y todos ellos murieron en el plazo de 3 días después de la exposición	0% (0/4)

Tabla 12. Cambio de temperatura corporal de los lechones inmunizados con las vacunas subunitarias de PRV después de la exposición

Día	Grupo A inyectado con vacuna subunitaria	Grupo B inyectado con vacuna subunitaria
Día 1 después de la exposición	39,5	39,5
Día 2 después de la exposición	41,2	41,6
Día 3 después de la exposición	40,3	40,2
Día 4 después de la exposición	40,1	39,7
Día 5 después de la exposición	39,6	39,5
Día 6 después de la exposición	39,6	39,3
Día 7 después de la exposición	39,6	39,5
Día 8 después de la exposición	39,5	39,4
Día 9 después de la exposición	39,5	39,6
Día 10 después de la exposición	39,2	39,3
Día 11 después de la exposición	39,3	39,4
Día 12 después de la exposición	39,4	39,4
Día 13 después de la exposición	39,2	39,4
Día 14 después de la exposición	39,2	39,1

5 Los resultados de las tablas 11 y 12 indicaban que la inmunización con las vacunas subunitarias de PRV para lechones podría proporcionar un grado de protección de 100% (4/4) a los lechones, aun cuando la infección de virus no podía evitarse (los lechones presentaban signos clínicos), en tanto que todos los lechones de control habían muerto el día 4 después de la exposición, por lo que las vacunas subunitarias de PRV pueden proporcionar una protección excelente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PULIKE BIOLOGICAL ENGINEERING,INC.

5 <120> Una variante del virus de la pseudorrabia, composiciones de vacunas, métodos de preparación y usos de los mismos

<160> 6

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 402

<212> PRT

15 <213> Virus de la pseudorrabia

<400> 1

Met Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Leu Val Ala Arg Thr Thr Leu
1 5 10 15

Gly Ala Asp Val Asp Ala Val Pro Ala Pro Thr Phe Pro Pro Pro Ala
20 25 30

Tyr Pro Tyr Thr Glu Ser Trp Gln Leu Thr Leu Thr Thr Val Pro Ser
35 40 45

Pro Phe Val Gly Pro Ala Asp Val Tyr His Thr Arg Pro Leu Glu Asp
50 55 60

Pro Cys Gly Val Val Ala Leu Ile Ser Asp Pro Gln Val Asp Arg Leu
65 70 75 80

Leu Asn Glu Ala Val Ala His Arg Arg Pro Thr Tyr Arg Ala His Val
85 90 95

Ala Trp Tyr Arg Ile Ala Asp Gly Cys Ala His Leu Leu Tyr Phe Ile
100 105 110

Glu Tyr Ala Asp Cys Asp Pro Arg Gln Ile Phe Gly Arg Cys Arg Arg
115 120 125

Arg Thr Thr Pro Met Trp Trp Thr Pro Ser Ala Asp Tyr Met Phe Pro
130 135 140

Thr Glu Asp Glu Leu Gly Leu Leu Met Val Ala Pro Gly Arg Phe Asn
145 150 155 160

Glu Gly Gln Tyr Arg Arg Leu Val Ser Val Asp Gly Val Asn Ile Leu
165 170 175

Thr Asp Phe Met Val Ala Leu Pro Glu Gly Gln Glu Cys Pro Phe Ala

ES 2 762 535 T3

180 185 190

Arg Val Asp Gln His Arg Thr Tyr Lys Phe Gly Ala Cys Trp Ser Asp
195 200 205

Asp Ser Phe Lys Arg Gly Val Asp Val Met Arg Phe Leu Thr Pro Phe
210 215 220

Tyr Gln Gln Pro Pro His Arg Glu Val Val Asn Tyr Trp Tyr Arg Lys
225 230 235 240

Asn Gly Arg Thr Leu Pro Arg Ala Tyr Ala Ala Ala Thr Pro Tyr Ala
245 250 255

Ile Asp Pro Ala Arg Pro Ser Ala Gly Ser Pro Arg Pro Arg Pro Arg
260 265 270

Pro Arg Pro Arg Pro Arg Pro Lys Pro Glu Pro Ala Pro Ala Thr Pro
275 280 285

Ala Pro Pro Gly Arg Leu Pro Glu Pro Ala Thr Arg Asp His Ala Ala
290 295 300

Gly Gly Arg Pro Thr Pro Arg Pro Pro Arg Pro Glu Thr Pro His Arg
305 310 315 320

Pro Phe Ala Pro Pro Ala Val Val Pro Ser Gly Trp Pro Gln Pro Ala
325 330 335

Glu Pro Phe Pro Pro Arg Thr Thr Ala Ala Pro Gly Val Ser Arg His
340 345 350

Arg Ser Val Ile Val Gly Thr Gly Thr Ala Met Gly Ala Leu Leu Val
355 360 365

Gly Val Cys Val Tyr Ile Phe Phe Arg Leu Arg Gly Ala Lys Gly Tyr
370 375 380

Arg Leu Leu Gly Gly Pro Ala Asp Ala Asp Glu Leu Lys Ala Gln Pro
385 390 395 400

Gly Pro

<210> 2

<211> 914

5 <212> PRT

<213> Virus de la pseudorrabia

<400> 2

ES 2 762 535 T3

Met Pro Ala Gly Gly Gly Leu Trp Arg Gly Pro Arg Gly His Arg Pro
 1 5 10 15

Gly His His Gly Gly Ala Gly Leu Gly Arg Leu Trp Pro Ala Pro His
 20 25 30

His Ala Ala Ala Ala Arg Gly Ala Val Ala Leu Ala Leu Leu Leu
 35 40 45

Ala Leu Ala Ala Thr Pro Thr Cys Gly Ala Ala Ala Val Thr Arg Ala
 50 55 60

Ala Ser Ala Ser Pro Ala Pro Gly Thr Gly Ala Thr Pro Asp Gly Phe
 65 70 75 80

Ser Ala Glu Glu Ser Leu Glu Glu Ile Asp Gly Ala Val Ser Pro Gly
 85 90 95

Pro Ser Asp Ala Pro Asp Gly Glu Tyr Gly Asp Leu Asp Ala Arg Thr
 100 105 110

Ala Val Arg Ala Ala Ala Thr Glu Arg Asp Arg Phe Tyr Val Cys Pro
 115 120 125

Pro Pro Ser Gly Ser Thr Val Val Arg Leu Glu Pro Glu Gln Ala Cys
 130 135 140

Pro Glu Tyr Ser Gln Gly Arg Asn Phe Thr Glu Gly Ile Ala Val Leu
 145 150 155 160

Phe Lys Glu Asn Ile Ala Pro His Lys Phe Lys Ala His Ile Tyr Tyr
 165 170 175

Lys Asn Val Ile Val Thr Thr Val Trp Ser Gly Ser Thr Tyr Ala Ala
 180 185 190

Ile Thr Asn Arg Phe Thr Asp Arg Val Pro Val Pro Val Gln Glu Ile
 195 200 205

Thr Asp Val Ile Asp Arg Arg Gly Lys Cys Val Ser Lys Ala Glu Tyr
 210 215 220

Val Arg Asn Asn His Lys Val Thr Ala Phe Asp Arg Asp Glu Asn Pro
 225 230 235 240

ES 2 762 535 T3

Val Glu Val Asp Leu Arg Pro Ser Arg Leu Asn Ala Leu Gly Thr Arg
 245 250 255

Gly Trp His Thr Thr Asn Asp Thr Tyr Thr Lys Ile Gly Ala Ala Gly
 260 265 270

Phe Tyr His Thr Gly Thr Ser Val Asn Cys Ile Val Glu Glu Val Glu
 275 280 285

Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Ser Phe Ala Leu Ser Thr Gly Asp
 290 295 300

Ile Val Tyr Met Ser Pro Phe Tyr Gly Leu Arg Glu Gly Ala His Gly
 305 310 315 320

Glu His Ile Gly Tyr Ala Pro Gly Arg Phe Gln Gln Val Glu His Tyr
 325 330 335

Tyr Pro Ile Asp Leu Asp Ser Arg Leu Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr
 340 345 350

Arg Asn Phe Leu Arg Thr Pro His Phe Thr Val Ala Trp Asp Trp Ala
 355 360 365

Pro Lys Thr Arg Arg Val Cys Ser Leu Ala Lys Trp Arg Glu Ala Glu
 370 375 380

Glu Met Ile Arg Asp Glu Thr Arg Asp Gly Ser Phe Arg Phe Thr Ser
 385 390 395 400

Arg Ala Leu Gly Ala Ser Phe Val Ser Asp Val Thr Gln Leu Asp Leu
 405 410 415

Gln Arg Val His Leu Gly Asp Cys Val Leu Arg Glu Ala Ser Glu Ala
 420 425 430

Ile Asp Ala Ile Tyr Arg Arg Arg Tyr Asn Asn Thr His Val Leu Ala
 435 440 445

Gly Asp Lys Pro Glu Val Tyr Leu Ala Arg Gly Gly Phe Val Val Ala
 450 455 460

Phe Arg Pro Leu Ile Ser Asn Glu Leu Ala Gln Leu Tyr Ala Arg Glu
 465 470 475 480

Leu Glu Arg Leu Gly Leu Ala Gly Val Val Gly Pro Ala Ser Pro Ala
 485 490 495

ES 2 762 535 T3

Ala Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ser Pro Gly Pro Ala Gly Thr Pro Glu
500 505 510

Pro Pro Ala Val Asn Gly Thr Gly His Leu Arg Ile Thr Thr Gly Ser
515 520 525

Ala Glu Phe Ala Arg Leu Gln Phe Thr Tyr Asp His Ile Gln Ala His
530 535 540

Val Asn Asp Met Leu Ser Arg Ile Ala Ala Ala Trp Cys Glu Leu Gln
545 550 555 560

Asn Lys Asp Arg Thr Leu Trp Gly Glu Met Ser Arg Leu Asn Pro Ser
565 570 575

Ala Val Ala Thr Ala Ala Leu Gly Gln Arg Val Ser Ala Arg Met Leu
580 585 590

Gly Asp Val Met Ala Ile Ser Arg Cys Val Glu Val Arg Gly Gly Val
595 600 605

Tyr Val Gln Asn Ser Met Arg Val Pro Gly Glu Arg Gly Thr Cys Tyr
610 615 620

Ser Arg Pro Leu Val Thr Phe Glu His Asn Gly Thr Gly Val Ile Glu
625 630 635 640

Gly Gln Leu Gly Asp Asp Asn Glu Leu Leu Ile Ser Arg Asp Leu Ile
645 650 655

Glu Pro Cys Thr Gly Asn His Arg Arg Tyr Phe Lys Leu Gly Gly Gly
660 665 670

Tyr Val Tyr Tyr Glu Asp Tyr Ser Tyr Val Arg Met Val Glu Val Pro
675 680 685

Glu Thr Ile Ser Thr Arg Val Thr Leu Asn Leu Thr Leu Leu Glu Asp
690 695 700

Arg Glu Phe Leu Pro Leu Glu Val Tyr Thr Arg Glu Glu Leu Ala Asp
705 710 715 720

Thr Gly Leu Leu Asp Tyr Ser Glu Ile Gln Arg Arg Asn Gln Leu His
725 730 735

Ala Leu Lys Phe Tyr Asp Ile Asp Arg Val Val Lys Val Asp His Asn
740 745 750

ES 2 762 535 T3

Val Val Leu Leu Arg Gly Ile Ala Asn Phe Phe Gln Gly Leu Gly Asp
755 760 765

Val Gly Ala Ala Val Gly Lys Val Val Leu Gly Ala Thr Gly Ala Val
770 775 780

Ile Ser Ala Val Gly Gly Met Val Ser Phe Leu Ser Asn Pro Phe Gly
785 790 795 800

Ala Leu Ala Ile Gly Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Val Ala Ala Phe
805 810 815

Leu Ala Tyr Arg His Ile Ser Arg Leu Arg Arg Asn Pro Met Lys Ala
820 825 830

Leu Tyr Pro Val Thr Thr Lys Ala Leu Lys Glu Asp Gly Val Glu Glu
835 840 845

Asp Asp Val Asp Glu Ala Lys Leu Asp Gln Ala Arg Asp Met Ile Arg
850 855 860

Tyr Met Ser Ile Val Ser Ala Leu Glu Gln Gln Glu His Lys Ala Arg
865 870 875 880

Lys Lys Asn Ser Gly Pro Ala Leu Leu Ala Ser Arg Val Gly Ala Met
885 890 895

Ala Thr Arg Arg Arg His Tyr Gln Arg Leu Glu Asn Glu Asp Pro Asp
900 905 910

Ala Pro

<210> 3

<211> 487

5 <212> PRT

<213> Virus de la pseudorrabia

<400> 3

Met Ala Ser Leu Ala Arg Ala Met Leu Ala Leu Leu Ala Leu Tyr Thr
1 5 10 15

Ala Ala Ile Ala Ala Ala Pro Ser Ser Thr Thr Ala Leu Gly Thr Thr
20 25 30

Pro Asn Gly Gly Gly Gly Gly Asn Ser Ser Ala Gly Glu Leu Ser Pro
35 40 45

10

ES 2 762 535 T3

Ser Pro Pro Ser Thr Pro Glu Pro Val Ser Gly Thr Thr Gly Ala Ala
50 55 60

Ala Ser Thr Pro Ala Ala Val Ser Thr Pro Arg Val Pro Pro Pro Ser
65 70 75 80

Val Ser Arg Arg Lys Pro Gln Arg Asn Gly Asn Arg Thr Arg Val His
85 90 95

Gly Asp Lys Ala Thr Ser His Gly Arg Lys Arg Ile Val Cys Arg Glu
100 105 110

Arg Leu Phe Ser Ala Arg Val Gly Asp Ala Val Ser Phe Gly Cys Ala
115 120 125

Val Val Pro Arg Ala Gly Glu Thr Phe Glu Val Arg Phe Cys Arg Arg
130 135 140

Gly Arg Phe Arg Ser Pro Asp Ala Asp Pro Glu Tyr Phe Asp Glu Pro
145 150 155 160

Pro Arg Pro Glu Leu Pro Arg Glu Arg Leu Leu Phe Ser Ser Ala Asn
165 170 175

Ala Ser Leu Ala His Ala Asp Ala Leu Ala Ser Ala Val Val Val Glu
180 185 190

Gly Glu Arg Ala Thr Val Ala Asn Val Ser Gly Glu Val Ser Val Arg
195 200 205

Val Ala Ala Ala Asp Ala Glu Thr Glu Gly Val Tyr Thr Trp Arg Val
210 215 220

Leu Ser Ala Asn Gly Thr Glu Val Arg Ser Ala Asn Val Ser Leu Val
225 230 235 240

Leu Tyr Ser Gln Pro Glu Phe Gly Leu Ser Ala Pro Pro Val Leu Phe
245 250 255

Gly Glu Pro Phe Arg Ala Val Cys Val Val Arg Asp Tyr Tyr Pro Arg
260 265 270

Arg Ser Val Arg Leu Arg Trp Phe Ala Asp Glu His Pro Val Asp Ala
275 280 285

Ala Phe Val Thr Asn Ser Thr Val Ala Asp Glu Leu Gly Arg Arg Thr

ES 2 762 535 T3

ccgctggagg acccgtgceg ggtggtggcg ctgatctccg acccgcaggt ggaccggctg 240
ctgaacgagg cggtaggcca ccggcgcccc acgtaccgcg cccacgtggc ctggtaccgc 300
atcgcgacg ggtgcgcgca cctgctgtac tttatogagt acgccgactg cgaccccagg 360
cagatctttg ggcgctgceg gcgcccacac acgcccgatgt ggtggacccc gtcccgggac 420
tacatgttcc ccacggagga cgagctgggg ctgctcatgg tggccccggg gcggttcaac 480
gagggccagt accggcgccct ggtgtccgtc gacggcgtga acatcctcac cgacttcatg 540
gtggcgctcc ccgaggggca agagtgcccg ttcgcccgcg tggaccagca ccgcacgtac 600
aagttcggcg cgtgctggag cgacgacagc ttcaagcggg gcgtggacgt gatgcgattc 660
ctgacgccgt tctaccagca gccccgcac cgggaggtgg tgaactactg gtaccgcaag 720
aacggccgga cgctcccgcg ggcctacgcc gccgccacgc cgtacgccat cgaccccgcg 780
cggccctcgg cgggctcgcc gagggcccagg ccccgccccc ggcccaggcc ccggccgaag 840
cccgagcccc ccccgggcgac gcccgcgccc cccggccgccc tgcccagacc ggcgacggcg 900
gaccacgccg ccggggggcg cccacgcggc cgacccccga ggcccagacc gccgcaccgc 960
cccttcgccc cgccggccgt cgtgccacgc gggtagccgc agcccgcgga gccgttcccg 1020
ccccggacca ccgcccgcgc gggcgtctcg cgccaccgct cggtagatcgt ccggcacgggc 1080
accgcgatgg gcgcgctcct ggtgggctg tgctctaca tcttcttccg cctgaggggg 1140
gcgaaggggt atgcctcct gggcggctcc gcggacgccg acgagctaaa agcgcagccc 1200
ggtccgtag 1209

<210> 5

<211> 2745

5 <212> ADN

<213> Virus de la pseudorrabia

<400> 5

ctagggggcg tcggggtcct cgttctcgag gcgctggtag tgcccggcg gcgtggccat 60
cgccccgacg cggtggcca gcagcgcggg cccgctgttc ttcttgcgcg ccttgtgctc 120
ctgctgctcg agggccgaca cgatggacat gtaccggatc atgtcccggg cctggtccag 180
cttggcctcg tccacgtcgt cctcttcgac gccgtcctcc ttgagcgccct tcgtcgtgac 240
ggggtacagc gccttcatgg ggttgcgcg cgagcgcgag atgtgccggt aggccaggaa 300
ggcccgacc aggccggcca gcaccagcag cccgatggcg agcgcgccga aggggttggg 360
caggaaggac accatgccgc cgacggccga gatcacggcc cccgtggcgc ccaggaccac 420
cttgccgacg gcggcgccca cgtcgccgag gccctggaag aagttggcga tgccgcgacg 480
cagcaccacg ttgtggtcca ccttgaccac gcggtcaatg tcgtagaact tgagcgcgtg 540
cagctggttg cggcgctgga tctcgtgta gtccaggagg cccgtgtcgg cgagctcctc 600

10

ES 2 762 535 T3

gcgcgtgtac acctcgaggg gcaggaactc gcggtcctcg agcagcgtca gggtcagggt 660
caccgcggtg ctgatcgtct cgggacacct caccatgcgc acgtagctgt agtcctcgta 720
gtacacgtac ccgccgccca gcttaaagta gcgccggtgg ttgccggtgc agggctcgat 780
gaggtcgcgc gagatgagga gctcgttgtc gtgcgcgagc tggccctcga tcacgcccgt 840
gccgttgtgc tcgaaggtca ccagcgggcg gctgtagcac gtgccgcgct cgcggggcac 900
gcgcatggag ttctgcacgt acacgccgcc gcgcacctcc acgcaccgcy agatggccat 960
cacgtcgccc agcatgcgcy ccgagacgcy ctggcccagc gcggccgtgg ccacggcgct 1020
ggggttcagg cgcgacatct cgcgccacag ggtgcggtcc ttgttctgca gctcgcacca 1080
ggcggccgcy atgcggtca gcatgtcgtt cacgtgcgcc tggatgtggt cgtaggtgaa 1140
ctgcaggcgc gcaaaactcgy ccgagcccgt ggtgatgcgc aggtgccccg tgcggttgac 1200
ggccggcggc tcgggctgcc ccgccgggcc gggggagcgc cgggcccgac gggcggccgc 1260
gggggacgcy gggcccacga cgcggcgag gccgagcgc tcgagctcgc gcgcgtacag 1320
ctgcgccagc tcgttcgaga tcagcgggcy gaaggccacc acgaagcccc cgcgggcyag 1380
gtacacctcg ggcttgtcgc cggccagcac gtgcgtgttg ttgtagcgc gccggtagat 1440
ggcgtcgatg gcctccgagg cctcgcggag gacgcagtcy cccaggtgca cgcgctgcag 1500
gtcagactgc gtgacgtcgc tgacgaagga ggcgccaggy gcccgcgacy tgaagcggaa 1560
ggaccctgcy cgcgtctcgt cgcggatcat ctctcggcc tcgcgccact tggccaggct 1620
gcacacgcy cgcgtcttg gggcccagtc ccaggccacc gtgaagtgc gcgtgcgcag 1680
aaagtgcgc gtcacgctct cggagcgcgy gaggcgcgag tccaggtcga tgggtagta 1740
gtgctccacc tgctggaagc gcccgggcgc gtagccgatg tgctccccgt gggccccctc 1800
gcgcaggccc tagaaggggg acatgtacac gatgtcccc gtggacaggy cgaaggagtc 1860
gtaggggtac acggagcgc cctccacctc ctcgacgatg cagttgacgy aggtgcccgt 1920
gtgtagaag cccgcggcgc cgatcttggg tagggtgtcy ttgggtggtg gccagccgcy 1980
ggtgcgagc gcgttcaggc gcgaggggcy caggctccacc tcgacggggt tctcgtcgcy 2040
gtcgaaggcy gtcaccttgt ggttgttgcy cacgtactcy gccttgaga cgcacttgcc 2100
gcgycggtcy atcacgtccy tgatctccty cacggggacy ggcacgcggt ccgtgaagcy 2160
gttcgtgatg gccgcgtacy tgctcccgy ccacacggtc gtgacgatga cgttcttgta 2220
gtagatgtgy gccttgaact tgtgcgggcy gatgttctcc ttgaagagca cggcgatccc 2280
ctccgtgaag ttgcgccctc gcgagtactc ggggcaggcc tgctcgggct ccaggcgcac 2340
caccgtggag ccggacggcy gcgggcagac gtagaagcgy tcccgtcgy tcgycggccy 2400
gcgcacggcc gtcgcgcy ccaggtcgc gtactcgcy tcgggggcy ccgagggcc 2460
gggggagacy gccccgtcga tctcctcgy ggactcctcc gcggagaagc cgtctggggt 2520
ggcggccgctc ccgggcygcy gcgaggccga ggcggcccy gtcacggccy ccgcgcgca 2580
cgtcggggtc gcggcgagcy ccagcagcag cagcgtagc gcgacggcy cccgcgcagc 2640
tgcagcgtgy tgtggagcag gccaaagacy tccgaggcca gcaccgcy ggtgcccgy 2700
ccgatcccy cggggcccy gccaaagacc gccaccagcy ggcat 2745

5 <210> 6
<211> 1464

ES 2 762 535 T3

<212> ADN

<213> Virus de la pseudorrabia

<400> 6

```

atggcctcgc tcgcgcggtgc gatgctcgcg ctgctggcgc tctacacggc ggccatcgcc      60
gcgggcgccgt cgtccacgac ggcgctcggc acgacgcca acgggggcgg gggcggaac      120
agcagcgcgg gcgagctctc gccctcgccg ccctcgacgc ccgagcccgt ctcggggacg      180
acgggggccg cggcctccac gcccgccgcc gtctcgacgc cccgggtccc gccgccctcg      240
gtctcgcgcc ggaagcccca gcggaacggc aacaggacgc gcgtccacgg cgacaaggcc      300
acctcgcacg ggcgcaagcg catcgtgtgc cgcgagcggc tgttctcggc gagggtgggg      360
gacgcggtca gcttcgggtg cgccgtcgtc ccgcgcccg gggagacctt cgaggtccgc      420
ttctgccgcc gcgggcgctt ccgctcgccc gacgccgacc ccgagtactt tgacgagccc      480
ccgcgcccgg agtcccgcg ggagcggctc ctctcagct ccgccaacgc ctccctcgcc      540
cacgcggacg cgtcgcctc cgccgtcgtc gtcgagggcg agcgcgcgac cgtcgccaac      600
gtctcggggc aggtgtccgt gcgctggcc gcggcgacg ccgagaccga gggcgtctac      660
acgtggcgcg tgctgtccgc caacggcacc gaggtccgca gcgccaacgt ctcgctcgtc      720
ctgtacagcc agcccagatt cggcctgagc gcgcccggc tcctcttcgg cgagcccttc      780
cgggcggtgt gcgtcgtccg cgactactac ccgcggcgca gcgtgcccct gcgctggttc      840
gcggacgagc acccggtgga cgccgccttc gtgaccaaca gcaccgtggc cgacgagctc      900
gggcgccgca cgcgcgtctc cgtggtgaac gtgacgcgcg cggacgtccc gggcctcgcg      960
gccgcggacg acgcggacgc gctcgcgccg agcctgcgct gcgaggccgt gtggtaccgc     1020
gacagcgtgg cctcgcagcg cttctccgag gccctgcgcc cccacgtcta ccaccggcg     1080
gcggtctcgg tcgcttcgtc cgagggcttc gccgtctcgc acggcctctg cgtgcccccg     1140
gaggcgcgcc tcgcctggtc cgaccacgcc gccgacaccg tctaccacct cggcgcctgc     1200
gccgagcacc ccggcctgct caacgtgcgg agcgcgccgc cgtgtcggga cctcgacggg     1260
cccgtcgact acacctgccg cctcgagggc atgccctcgc agctgcccac cttcgaggac     1320
acgcagcgtc acgacgcctc ccccacgtcc gtgagctggc ccgtcgtgac cagcatgatc     1380
5 accgtcatcg ccggcatcgc catcctagcc atcgtgctgg tcatcatggc gacgtgcgtc     1440

tactaccgcc gggcggggcc gtga      1464

```

REIVINDICACIONES

1. Una cepa del virus de la pseudorrabia porcina (PRV) que comprende la glicoproteína gD codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO. 4;
5 en donde dicha cepa del virus de la pseudorrabia comprende la glicoproteína gB codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO. 5; y en donde dicha cepa del virus de la pseudorrabia es la cepa HN1201, cuyo número de acceso es CCTCC NO. V 201311; dicha cepa HN1201 fue depositada en el *China Center for Type Culture Collection* (CCTCC).
2. Una composición de vacuna, que comprende una cepa del virus de la pseudorrabia porcina desactivada tal como se describe en la reivindicación 1, o una vacuna subunitaria que comprende el antígeno de la proteína gD de la cepa PRV HN1201 tal como se describe en la reivindicación 1, y un adyuvante.
10
3. La composición de vacuna tal como se describe en la reivindicación 2, en donde dicha composición de vacuna comprende una vacuna desactivada de la cepa PRV HN1201, en una concentración no inferior a $10^{6.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$.
4. La composición de vacuna tal como se describe en la reivindicación 2, en donde dicha composición de vacuna comprende 25-100 $\mu\text{g}/\text{dosis}$ de antígeno de la proteína gD de la cepa PRV HN1201.
15
5. Un método para la preparación de una composición tal como se describe en la reivindicación 2, que comprende los pasos: amplificación y cultivo de la cepa PRV HN1201, desactivación, y mezcladura subsiguiente a fondo con un adyuvante.
6. Un método para la preparación de una composición de vacuna tal como se describe en la reivindicación 2 que comprende los pasos: (1) clonación de dicho gen gD recombinante de PRV; (2) expresión de dicha proteína gD recombinante de PRV; y (3) mezcladura de dicho antígeno de la proteína gD de PRV con un adyuvante y emulsión de la mixtura resultante.
20
7. La composición de vacuna tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2-4 para su uso en el tratamiento de infección de PRV.
25

