

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 649**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2016 PCT/US2016/049709**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17040672**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2016 E 16763176 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020 EP 3344289**

54 Título: **Vacunas pestivirales para temblores congénitos**

30 Prioridad:

**31.08.2015 US 201562212124 P**

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

**11.08.2020**

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH  
(50.0%)  
Binger Strasse 173  
55216 Ingelheim am Rhein, DE y  
IOWA STATE UNIVERSITY RESEARCH  
FOUNDATION, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VICTORIA, JOSEPH GILBERT;  
PATTERSON, ABBY RAE;  
VISEK, CALLIE ANN;  
IYER, ARUN V.;  
HOBBS, LEA ANN;  
ARRUDA, BAILEY LAUREN;  
ARRUDA, PAULO HENRIQUE ELIAS;  
MAGSTADT, DREW ROBERT y  
SCHWARTZ, KENT JAY**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 778 649 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

Vacunas pestivirales para temblores congénitos

### ANTECEDENTES

#### A. Campo Técnico

5 La presente invención se refiere a una vacuna pestiviral, que es capaz de reducir signos clínicos de temblor congénito (CT) o mioclonía congénita. La afección se conoce informalmente como lechones agitados, lechones trémulos o lechones temblorosos.

El *pestivirus* es un género de virus, de la familia *Flaviviridae*. Los virus del género *Pestivirus* infectan a mamíferos, incluyendo miembros de la familia *Suidae* (que incluye diversas especies de cerdos).

10 El CT es una enfermedad esporádica observada en cerdos neonatos. Habitualmente, más de un cerdo se ve afectado en una camada. Si los temblores son demasiado grandes para que los lechones encuentren un pezón y mamen, entonces la mortalidad puede ser alta. La mortalidad en una camada afectada o en un brote en una piara podría incrementarse por encima de la norma en 3-10%. La afección disminuye a medida que los lechones afectados crecen.

15 El CT se clasifica en cinco tipos. Los tipos AI, AIII, AIV y AV están relacionados con la exposición al virus de la fiebre porcina clásico, rasgos genéticos o exposición a triclorfón. Como estas causas son conocidas y por lo tanto se evitan, se establece como hipótesis que el tipo All es la causa más común. Se cree que el tipo All está asociado con una infección viral. El virus causal en el grupo 2 está extendido entre la mayoría si no todas las poblaciones de cerdos, sin embargo, se observa poca enfermedad en la mayoría de las piaras, presumiblemente debido a que se establece una inmunidad en la piara. Sin embargo, en piaras de cerdas jóvenes, puede haber brotes importantes que impliquen a hasta 80% de todas las camadas durante el primer parto. Este es un riesgo no cuantificable en cualquier piara de cerdas jóvenes.

20 La razón de que los cerdos nazcan temblorosos es secundaria a la lesión primaria de hipomielinización o desmielinización del cerebro y la médula espinal. No existe un tratamiento específico para esta afección. Sin embargo, la lactancia asistida y el aporte de un entorno en el que se puedan evitar el frío y la superposición permitirá que se recuperen más cerdos con el tiempo, aunque los pesos al destete se pueden reducir en 1 kg o más.

#### B. Descripción de la Especialidad Relacionada

25 Hause, BM y cols. describen en *Journal of General Virology*, vol. 96, nº 10, 24 de julio de 2015, en las páginas 2994-2998, el descubrimiento de un nuevo pestivirus porcino atípico putativo en cerdos en los EE. UU. de A. Aunque existen informes anteriores de que las infecciones por circovirus porcinos tipo 1 y tipo 2 (Véase Burnborg y cols., "Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study." *J Vet Diagn Invest.* 19(4):368-375, 2007) o astrovirus (Véase Blomstrom y cols., "Astrovirus as a possible cause of congenital tremor type All in piglets?" *Acta Vet Scand.* 56(1):82, 2014) eran la causa del CT, esto ya ha sido desmentido (Véase Ha y cols., "Lack of evidence of porcine circovirus type 1 and type 2 infection in piglets with congenital tremors in Korea", *Vet Rec.* (2005) 156:383-384; Kennedy y cols., "Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors" *J Vet Diagn Invest.* Mar 2003; 15(2):151-156). Así, no existe una fuente patógena clara de CT tipo All en lechones y, por lo tanto, tampoco un tratamiento eficaz de esta afección.

### SUMARIO

40 La solución al problema técnico anterior se consigue mediante la descripción y las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Así, la invención en sus diferentes aspectos se pone en práctica según las reivindicaciones.

Las reivindicaciones independientes definen la invención. Las reivindicaciones dependientes representan otras realizaciones de la invención.

45 La presente invención proporciona composiciones inmunogénicas, vacunas y métodos relacionados que vencen deficiencias de la especialidad. Las composiciones y los métodos proporcionan un tratamiento para los temblores congénitos en lechones.

50 En un aspecto, las presentes composiciones pueden incluir un pestivirus inactivado que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, p. ej., al menos aproximadamente 96%, 97%, 98% o al menos aproximadamente 99%, p. ej., 100% de identidad. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones que incluyen un pestivirus inactivado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad con SEQ ID NO:2, p. ej., al menos aproximadamente 96%, 97%, 98% o al menos aproximadamente 99%, p. ej., 100% de identidad.

En algunas realizaciones de las presentes composiciones, el pestivirus es un pestivirus químicamente inactivado, p. ej., un pestivirus inactivado mediante el tratamiento con un agente inactivante tal como etilenimina binaria, etilenimina, acetiletilenimina, beta-etilenimina, beta-propiolactona, glutaraldehído, ozono y/o formaldehído.

En algunas realizaciones, el pestivirus es un pestivirus físicamente inactivado, p. ej., un pestivirus inactivado mediante tratamiento con radiación UV, radiación de rayos X, radiación gamma, congelación-descongelación y/o calentamiento.

5 En otro aspecto, las composiciones proporcionadas en la presente pueden incluir un pestivirus atenuado que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad con SEQ ID NO:1, p. ej., al menos aproximadamente 96%, 97%, 98% o al menos aproximadamente 99%, p. ej., 100% de identidad. En otro aspecto, las composiciones pueden incluir composiciones que incluyen un pestivirus atenuado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad con SEQ ID NO:2, p. ej., al menos aproximadamente 96%, 97%, 98% o al menos aproximadamente 99%, p. ej., 100% de identidad.

10 En algunas realizaciones, un pestivirus descrito en la presente puede estar en forma criosecada. En una realización, una composición tiene al menos aproximadamente  $10^4$  partículas virales, p. ej., al menos aproximadamente  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  o al menos aproximadamente  $10^{10}$  partículas virales.

En algunas realizaciones, las composiciones divulgadas en la presente pueden incluir un portador y/o excipiente, p. ej., un adyuvante, farmacéuticamente aceptable, p. ej., un adyuvante basado en una emulsión de aceite en agua.

15 En algunas realizaciones, una composición puede incluir una mezcla de pestivirus inactivados y atenuados descritos en la presente. La presente divulgación también presenta composiciones que incluyen una mezcla de pestivirus inactivados, pestivirus atenuados y vectores descritos en la presente.

20 En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona composiciones que incluyen un vector, p. ej., vector de expresión baculoviral o un vector adenoviral canino, que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente 95% (p. ej., al menos aproximadamente 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad con SEQ ID NO:3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o 21, p. ej., al menos una secuencia de ácido nucleico que tiene 100% de identidad con SEQ ID NO:3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o 21. En otro aspecto, la presente divulgación presenta composiciones que incluyen un vector que comprende al menos una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 95% (p. ej., al menos aproximadamente 96%, 97%, 98% o 99%) de identidad con SEQ ID NO:4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 22, p. ej., al menos una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene 100% de identidad con SEQ ID NO:4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 22. En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir una mezcla de los vectores descritos anteriormente.

30 También se proporcionan métodos para proteger a un lechón contra una enfermedad asociada con pestivirus, p. ej., temblores congénitos. Los métodos pueden incluir administrar a una cerda adulta o cerda joven preñada o a una cerda adulta o cerda joven antes de la reproducción o a un lechón neonato cualquiera de las composiciones descritas en la presente en una cantidad suficiente para proteger al lechón.

35 En algunas realizaciones, los métodos incluyen administrar la composición a la cerda adulta o cerda joven intramuscularmente, subcutáneamente, intravenosamente, oralmente, intraarterialmente, intranasalmente (p. ej., con o sin inhalación), intracardiácamente, intraespalmente, intratorácicamente, intraperitonealmente, intraventricularmente, sublingualmente, transdérmicamente y/o a través de inhalación. En una realización, la administración es una primera administración y los métodos incluyen una segunda administración de una a tres semanas después de la primera administración.

40 En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona cualquiera de las composiciones descritas en la presente, p. ej., composiciones que incluyen pestivirus inactivado, pestivirus atenuado y/o vectores, para el uso como un medicamento o para el uso en la fabricación de un medicamento. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente son para proteger a un lechón contra una enfermedad asociada con pestivirus, p. ej., temblores congénitos.

45 La presente invención se relaciona con vacunas de pestivirus inactivados o vivos modificados de la presente invención que son filogenéticamente los más cercanos al pestivirus del murciélago chino. La FIG. 1 y la FIG. 2 identifican el árbol filogenético del pestivirus de la presente invención. El árbol de mínima evolución de aminoácidos se basa en los 212 aminoácidos de NS3 que se solapaban entre las secuencias genómicas parcial y completa entre los pestivirus. El nivel de diversidad es coherente con una nueva especie de pestivirus. Los pestivirus a nivel nucleotídico están conservados entre 83-98 por ciento entre los aislados identificados, según se muestra en la FIG. 3.

50 Los pestivirus de la presente invención se pueden usar para la fabricación de estas vacunas. En particular, la invención proporciona aislados pestivirales mejorados que se han identificado posteriormente o cualquier descendiente o prole de uno de los susodichos aislados.

Los pestivirus de la presente invención se pueden caracterizar por que el virus se puede atenuar al someterse al menos cuatro veces a pases en cultivo celular de modo que cuando el virus modificado se administre a un cerdo u otro mamífero propenso a CT no provoque signos clínicos de enfermedad CT pero sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria que inmunice al mamífero contra formas patógenas del pestivirus.

55 Los aislados pestivirales de la presente invención se pueden someter a pases más de 10, preferiblemente al menos 20, aún más preferiblemente al menos 30, incluso más preferiblemente al menos 40, aún más preferiblemente, al menos 50, incluso más preferiblemente al menos 55, aún más preferiblemente al menos 60, incluso más preferiblemente al menos 70, aún más preferiblemente, al menos 80, incluso más preferiblemente al menos 90, aún más preferiblemente al menos 95, y lo más preferiblemente al menos 100 veces in vitro en cultivo celular.

- Se contempla que la vacuna pueda comprender un portador que sea adecuado para la aplicación intradérmica o intramuscular. En algunas realizaciones, la vacuna es una forma criosecada. En realizaciones específicas, la vacuna comprende al menos aproximadamente  $10^4$  partículas virales. La presente invención proporciona composiciones inmunogénicas, vacunas y métodos relacionados que vencen deficiencias de la especialidad. La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas que incluyen un pestivirus inactivado o atenuado vivo modificado. Composiciones inmunogénicas adicionales incluyen una vacuna comprendida por antígeno subgenómico bien expresado recombinantemente o bien aportado como parte de una plataforma vectorial. En particular, la solicitud proporciona una vacuna para proteger a los cerdos y especialmente los lechones contra enfermedades asociadas con aislados del pestivirus de la presente invención.
- Otro aspecto de la invención se refiere a un pestivirus que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad, p. ej., al menos 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con una secuencia indicada en SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o 21.
- Otro aspecto de la invención se refiere a un pestivirus que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad, p. ej., al menos 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con una secuencia indicada en SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 22.
- Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la preparación de una vacuna inactivada o atenuada viva para combatir los temblores congénitos, que comprende mezclar un pestivirus inactivado o atenuado vivo con un portador farmacéuticamente aceptable.
- Las composiciones inmunogénicas y las vacunas de la invención comprenden pestivirus vivos inactivados o modificados y también pueden incluir un adyuvante. La vacuna también puede incluir otros componentes, tales como un conservante o conservantes, un estabilizante o estabilizantes y antígenos contra otros patógenos del cerdo. Los expertos en la especialidad entenderán que las composiciones usadas en la presente pueden incorporar soluciones estériles fisiológicamente aceptables inyectables conocidas. Para preparar soluciones listas para usar para inyección o infusión parenteral, están disponibles fácilmente soluciones acuosas isotónicas, p. ej., soluciones salinas o de proteínas plasmáticas. Además, las composiciones inmunogénicas y vacunales de la presente invención pueden incluir portadores, diluyentes, agentes isotónicos, estabilizantes o adyuvantes farmacéutica o veterinariamente aceptables.
- Los métodos de la invención también pueden comprender mezclar una composición de la invención con un portador, adyuvante o una de sus combinaciones veterinariamente aceptables. Los expertos en la especialidad identificarán que la elección del portador, el adyuvante o la combinación estará determinada por la vía de aporte, la preferencia personal y la especie de animal, entre otros.
- Otro aspecto de la invención contempla una vacuna para la protección de cerdos contra una infección pestiviral, que comprende un pestivirus inactivado o atenuado vivo de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.
- Esta vacuna puede comprender además ventajosamente uno o más apestivirus que difieren del pestivirus de la presente invención, sus patógenos atenuados o inactivados o material antigénico. Por ejemplo, los patógenos apestivales se pueden seleccionar de virus de pseudorrabia, virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, virus de gastroenteritis trasmisible, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, circovirus porcino, incluyendo pero no limitados a circovirus porcino tipo 2 (PCV2), síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
- También se divulgan composiciones para el uso en métodos para el tratamiento o la profilaxis de infecciones provocadas por un pestivirus. El método comprende administrar una cantidad eficaz de la composición inmunogénica de la presente invención a un animal, específicamente una cerda adulta o cerda joven preñada, en donde dicho tratamiento o profilaxis es proporcionado de ese modo a los lechones. El tratamiento o la profilaxis se selecciona del grupo que consiste en reducir signos de infección con CT, reducir la gravedad de o la incidencia de signos clínicos de infección con CT, reducir la mortalidad de animales por infección con CT, y sus combinaciones.
- En la presente, sujetos adecuados y sujetos con necesidad a los que se pueden administrar composiciones de la invención incluyen animales que necesiten bien de profilaxis o bien de tratamiento de una infección, enfermedad o afección viral, microbiana, parasitaria, protozoaria, bacteriana o fúngica. Animales en los que se estimula la respuesta inmunitaria mediante el uso de composiciones o métodos de la invención incluyen ganado, tal como cerdos, bóvidos, cabras y ovejas. Animales preferidos incluyen porcinos, múridos, équidos, lagomorfos y bóvidos. Lo más preferiblemente, se estimula una respuesta inmunitaria en cerdos y especialmente cerdas adultas, cerdas jóvenes y lechones.
- La invención proporciona un método para reducir la incidencia de o la gravedad de uno o más signos clínicos asociados con o provocados por una infección pestiviral, que comprende la etapa de administrar una composición inmunogénica de la invención según se proporciona en la presente, de modo que la incidencia de o la gravedad de un signo clínico de la infección pestiviral se reduzca en al menos 10%, preferiblemente al menos 20%, incluso más preferiblemente al menos 30%, incluso más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 70%, lo más preferiblemente al menos 100% con relación a un sujeto que no ha recibido la composición inmunogénica según se proporciona con la presente. Estos signos clínicos incluyen temblor y agitación de todo el cuerpo hasta un grado

variable. Habitualmente, los lechones nacen agitándose, temblando y cabeceando, y a menudo la estimulación activa exagerará la agitación. La agitación tiende a detenerse cuando el lechón se duerme. Además, puede haber temblores musculares cuando los lechones están andando, síntomas nerviosos, falta de coordinación, "sentada a lo perro" e incremento de mortalidad. En algunos casos, el temblor puede no hacerse evidente hasta las 24-48 horas de edad. El efecto sobre el lechón incluye afectación a la lactancia, donde, en casos graves, se requiere el apoyo físico del lechón sobre el pezón. Dependiendo de la gravedad del brote, los niveles de mortalidad pueden ser 15-20% y hasta 30-40% en los brotes más graves. Otras medidas de la gravedad clínica incluyen una reducción en el aumento de peso diario y daño neurológico.

Vías de administración preferidas incluyen intranasal, oral, intradérmica e intramuscular. Se prefiere la administración intramuscularmente o intravaginalmente, lo más preferiblemente en una sola dosis. Los operarios expertos identificarán que las composiciones de la invención también se pueden administrar en múltiples (p. ej., dos o más) dosis, así como mediante otras o múltiples vías de administración. Por ejemplo, estas otras vías incluyen subcutáneamente, intracutáneamente, intravenosamente, intravascularmente, intraarterialmente, intraperitonealmente, intratecalmente, intratraquealmente, intracutáneamente, intracardiácamamente, intralobularmente, intramedularmente o intrapulmonarmente. Dependiendo de la duración y la eficacia deseadas del tratamiento, las composiciones según la invención se pueden administrar una o varias veces, también intermitentemente, a modo de ejemplo diariamente durante varios días, semanas o meses y en diferentes dosificaciones.

También se contempla un método para la preparación de los pestivirus atenuados vivos para células que no son de mamífero.

Las nuevas vacunas de esta invención no se restringen a ningún tipo o método particular de preparación. Estas vacunas se preparan mediante métodos estándar conocidos en la especialidad. El aporte más preferido de la vacuna pestiviral es inocular a las cerdas jóvenes o las cerdas adultas preñadas el pestivirus virulento, con transferencia de inmunidad materna a los lechones.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, se debe entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indiquen realizaciones preferidas de la invención, se dan solamente a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la especialidad a partir de esta descripción detallada.

#### **DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor mediante referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas aquí.

Las FIGs. 1 y 2 ilustran los árboles filogenéticos que identifican los nuevos pestivirus de la invención.

La FIG. 3 es una comparación de la identidad de aminoácidos (porcentaje de identidad) de las secuencias pestivirales de la invención.

La FIG. 4 muestra el ciclo de viremia en los lechones probados en el Ejemplo 1.

Las FIGs. 5A y 5B muestran la asociación filogenética de pestivirus. Árboles filogenéticos de mínima evolución generados con 1.000 muestreos de arranque (MEGA 6.0) para aminoácidos de NS3 (5A) y Npro (5B) pestivirales alineados mediante la alineación múltiple ClustalW. Los números de registro del GenBank para cada muestra se indican por el nombre. Los círculos indican secuencias descritas a partir de este estudio y el triángulo indica la secuencia del virus descrito en este estudio usado para la inoculación.

La FIG. 6 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de Cq por RT-qPCR positivo y medio por tipo de muestra. El ARN pestiviral detectado al elegir como diana por RT-qPCR el gen NS3. El ARN viral no se detectaba en lechones inoculados con PBS.

La FIG. 7 es una gráfica que muestra que el pestivirus inactivado inducía una respuesta serológica específica del pestivirus en lechones vacunados.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

La invención proporciona un pestivirus inactivado, un pestivirus atenuado y vacunas subunitarias o composiciones inmunogénicas que se pueden administrar a cerdas adultas o cerdas jóvenes para reducir los efectos clínicos de temblores congénitos en sus lechones. Además, se describen métodos de administración, métodos para elaborar la vacuna, ensayos y otros aspectos de esta invención.

Preferiblemente, el pestivirus según la invención es un pestivirus inactivado y/o un pestivirus vivo modificado y/o un pestivirus atenuado que tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente 95% de identidad con SEQ ID NO:1, p. ej., al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:1 o que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO:2, p. ej., al menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEQ ID NO:2.

# ES 2 778 649 T3

CATAATGCTTTAATTGGCCGCATTATGTGTGGGACATCCTAAATATTTATGAGCCCTGCGGTGAGTGGGGGAAAG  
AGGTTAACCAGGCTCTAGTACCACAGGCACCAATGGACAGGGCAACTCAAACCTGAGAGAGAGGTACCGAACTC  
TTAAGCCCCGAGTACGGGGCAGACGTACCGAGTAGTACACCCAAAGACCACCCTTCTAGGTGTAGGGTCTACT  
GAGGCTCGGGTGGACGTGGGCGCGCCCAAAGAGAAATCGGTGGTGGACCTGGGGGTGCGGGCCACCATGCCCTT  
TACGGGGTAGACCTTACTGCTTGATAGAGTGCCGGCGGATGCCCTCAGGTAAGAGTATAAAATCCGTTGTTTATTA  
ACATGGAAAAACAGATTGCATATTACTTAAAAAAGAAAAACAAGAAATGGGTGGACGGAACCTGGTGGTAGGAG  
AAAGTCATACAAAATAACCACGCTTTCTGGAAAGACCTATCGAGGCACCTGGGAAATGGAGAAACGGCCAAATC  
CTTATGGAACTATCTCCCAGACCTAGTCCCCAACAGCTTACAGCCCTACACCCCAACCCAGTGGTGAATTGTA  
AGGTGGTTGAGTACAAGGAGATGGACCCTAATTATGGTGTATGCCCAAATACGAACGGGGTGTGTTGTTGACGAAA  
AGGGTAGAAGGCTGAGCAGCCCTCCATTAGGCATTTGGAAGATAAGATTGGACTATAGTACTTGGTAAACATAA  
GCAGACCAACCCCGCTAGTGGGAAAACTCTTACCAAGTTGAGACCTGCAGTGGGGAGCTGGCTACAGTGACAC  
TGGTACACAATAGGGTGTCTCGTGGAAAGATTGCAGGGGGCTATACCAATGGAAACCCAACTGTGAAGGAATTGTGC  
TCTATGTGAAAACCTGTTCTGACTGGGCAGATCAGGTAGAAAAACAGGAGAAAGAAAGCCCCCAAACACACG  
GGCCACCAAGGCGAGACCCACGAAAAGGGTTACAACCACAAGTCCCCAAAGAGACTGAGGTACAGAAAAGAAGA  
GACAACCTAGTGTACCTTAGTATCGGGGGGCAGAAGGCCAAGTCATCTACAAAGGCAGGACCAAAAAACAAAA  
AGACCCGGATGGAGTCTATAGATACCCAGGAGCTAAAGAAGGGGACGTAGTAAAGGTGAGGAAGATGCTGAAGA  
ATTGGCATATAGCCTTAGTGATGTACCTGATACATATCATAACTCCAGGCCTTGCCAAGGTCCAGTGGTCTTAA  
AAGATGAAAACCTGACGGGGATCAACCAGATACTGTGGCAAAGACAGATCAACAGATCCTTACATGGAGAATGGC  
CTAACCCAGATCTGCCACGGTATGCCCAATGAAACTATCACGGATGAGGAATTACGCAGTCTGGGAAATGGTAGATA

ES 2 778 649 T3

CAAGCCCTAGAACAAACTACACCTGTTGCCAGTTGCAATATCATGAGTGGGAAGAAACATGGTTGGTGCAACTATC  
CACAAAAACAGGCGTGGATCACGAGGATAACGGCCCTACAAGCTAACCTTACCGGGCCTTATGAGGGACCTGAGT  
GCGCCGTCTATCTGCCGATTTAACGGCAGCTACAACATCGTAAAACAGGCCAGAGATGAGGTGAGTCCACTGACAG  
GGTGCAAGGAAGGGCATCCTTTCTATTTCTCTGGTGAAGATCCGACACCTCATGCCTAAGGCCCCCTTCCACTA  
GTTGGGTAAGACCAGTGAATAATGGACGAGGCATCAATGGCCGATGGCTTTGCCCATGGGGTTGATAAGGCGATAA  
TACTAATCAGGAAGGGGCATCAGGAATAATCAATTTCCCTAGACACTATTGGGAGGTGGCTACCGGTAGCTGAAG  
CAACTATAGTACCATATTGTGATACTTACACTGTGACAGGGATGTATGTCCATGTAAAGAAATTGCCCTCCCTAGAG  
GGTTACCTAAGCATTCAAAAAATAATCTCCCCGACAATGATATATCTGGGAGAAGGAGACCCGGCCATAATATCC  
AGCACTTATTTGGCTCAGGTATAGCAAAGTGGGTCTTAGTCTACTCGGGATTCTGGGTGAGTGGTATGGAGAAT  
TGGCTTCCACAATATACTTACTACTAGAAACGGGTCTGAGTGGTTGGAACATGAAAGCCTGGTCACGGAAGGGT  
TGATTCCTGGCATTAATATTACAATAGAACTCCCAGCTAGTCATACAGTGCCTGGTTGGGTGTGGGTGCGCAGGCC  
AGTGGGTATGCGTGAAGCCAGACTGGTGGCTACACAGATTTGGATTGAAACCGTGGTGGCAGAGACCTGGCATA  
TACTAAAAATATTGGCGTCAGCCCTGGTGAACAATAGTTGCAGCGTTCGTAACCTGGAATTGGTTTATCTGGTCA  
TAATACTAGTCAAAATATCAAAAGGGAACTGATAGGTGCCATATATGGTGTCTTGTACTGTGACGGCTGAAG  
GCTCGTGCTACAAAAGACAAGACTATTACAACACCCAACTAGTCGTGGAAGAAAAAACAGGCGTAGAAAAACGAT  
CTATAATGGGCAAGTGGACCGTGATAACCAGGGAAGGTGCGGAGCCAAGATTAATGGAGCAATAAATATGGTAT  
TGAATGATAGCCTGTCAGAAACCTACTGCTATAATAGGCTAAACACCAGCACTTGGGGGCGCAACCGGCAAGAC  
AAAGAGGGTGTGGTCAAAACCGTGCCCTATTGGCTGGTGAACATGTTCTAGAAGAAACAATACTACAGCACAGGTT  
ACTGGGTGAATGTAACAGGCGGTGGCCAGCTGAGAGAAGGCGTATGGCTATCAAGAAAGGGTAACGTACAGTGTC  
AGCGTAACGGCTCATCCTTGATGCTGCAATTGGCGATAAAAGAAGAGAATGACACTATGGAATAACCATGTGACC  
CAGTGGAAACTGAAAGTATGGGTCCAGTTGCACAGGGCACTTGTGTGTACAGCTGGGCATTCGCCCAAGAGGGT  
GGTACTATAACAGGAAGGATGGTTATTGGCTCCAGTACATAAAGAAAAACGACTACCAGTATTGGACAAAAATGC  
CTACTGCCCTCGTCCGCCCAACCATGTACCGCCACTTGCTCCCTTACTGGTGGCTGCCTCATGGGCGGTAGGA  
TATCGGTGTGGTTTGTGGCAATGCTCCTGTCTTACAGGTGGAAGCTAGTGAAGTAGGCACTAAACAACCTGGCTG  
TCACGCTAACCTGTGGAAAATGGACTGGACAGAACTACTTTTCTATATTGTCTTGATGCTAGCCGTTAAGGAAAG  
AACTTATAAAAAAATTTGTGACCGCTAGCCTTGTTGGCTTAAAAAATAGTCCAGTAGCCTTGAGTTTTCTTATTG  
TACTCAGACTTGTGGGGGCGAGTGAAGCACTCCCAGTAGGTTTTATTATTAGAAAAATGTGCATAGACCAACCGG  
AGTTTGGAACTCCTTTCTGTACTACCATATGGGACAACGGAAGTGGACTGTGTTAGTCAGCTTCTCCGCACTGA  
ACCATGAAAAAATATAAACTGGCAAGAAAATGTTGTTGGCAACACATATAACAGCGCTCACATTGACTGGCT  
TGAGTGATTCATCTTCTATATGATGCTTATAACAACAAATTTGTTAATAAAGACATTCATATACTTGCTGGGGG  
CTAGTATGAATTGGGTCGAGAGAGAAAAAAGAAATGCTAGTGAAGAGGAGACTAATATAACAAGAAAGCCGTTA  
CTTGCAAGTCAAGATGAGAATGTATTGGAGAATAAATTCACAAGATAACTGTAAACGCGGATTTACCCCATGCA  
AGCTTGAACCTTCTACAATTACTTAGGGCTTTTTTAGTCTCTTTGTGTTTTCTACTACAAACCTCTCCTGTATG  
CAGAGACTACCTTAACGTAAATAGTAATTGGCGTACAAGAGTACAACGTAGCCATGGCCCCGGGGCAAGTGTGG  
TCCACAGGCTACTAGCCATGGCCTATTACATATACGGCCGATACAGGGTGACATGTTCCAGCTCGCCACTATCC  
AGTGCCTGCTGTCGAGTCCGAGGAAAATATGAAACACATGGTAGAGAATCCAACCTCTCAAGAAGCTCTGGCAAG  
GCGAAACAGAACTCTTCAACCAGGGTGTAGTCAATCCAAGATAGTGAATCCAAGAAAATTTGGGCTGGAAGAA  
TACACAAGGGCATGTGTGGCTCCCAACAGTAGTGCAAAATTTGGTCATATGCAAAGAAGAATGACTCTCTTA  
TTTTAGGAGAGCTGGGTTACCCCTGGGGATCTCACCAGTGTGGGTGGGAAATTTAGGTCTGGCAGAAATCC  
CAAAGATCACTAACGTGAGTCTGCTAAGATGGACTTACTCTCCAACTTATGACCTTTCTGGGGATTGAAAGCT  
CGAGGGTCCCCAGGACCCAGTCCACTCAACAAGGAAATTTATTGAAGATAGTAAGGGCTTGGAAACAGGATGGG

# ES 2 778 649 T3

GGTACACTCACGCAGGGGGATAAGTAGCGCAAAACACGTTACAGGTGAAAAGAACTTAATGACCCACATGGAGG  
GTAGGAAGGGAAAAATATATCCTACAATCTCAAGAACATGGTGTGACGAGGTAGAGTACGGAGTAAAAACTGATC  
AAAAAGCTCCCGACAATGCCTTATGCTACTGTTTTAACCTGAAGCTACAAACATAAAAGGAGAGACGGGAGCCA  
TGGTGTTCATGAAGAAGATAGGAAAAAGTGGACTCTCGTAACATCAGACGGCAATAAAGCCTATTATAATGTAA  
ACAATTTGAAAGGGTGGTCTGGACTACCAATAATGCTGCACTCCACCGGGCCATAGTGGGGAGGATTAATCAG  
CGTATTAGATGAAAACGACCTGGTGGAGGAACTTATTGACTCTAGAATATTAGTAAGAGCAATGAGACAAACC  
TGGACCACCTTATCAAGGAATTGGCAGACATGCGGAGGGGGAGTTCGCTCAATTACCTTTGGAACGGGAGCCG  
GGAAAACCACAGAACTGCCTAGGCAATACCTCACAACAGTAGGTGCCATAAATCCGTGCTGGTCTTAGTCCCCT  
TAAAAGCACCTGCTGAAAGTGTGTCGCTTTATGAGGTCTAAATACCTTACCATCAACTTTTCTTAAGAGTGG  
GGGAACGGAAAGAGGGAGATGTGAGCAGCGGCATCACCTACGCTACTTACGGATTTTGTGCCAGCTAAACCTAG  
TCCAACTTAAAGAAATGGATATCCAGGTACTCAATGGTTTTTTTTGATGAATATCACACAGCACTCCAGAACAAA  
TAGCCATAATAAGCAAGATTTCATGCACTGAAAGTTAAGACCAGGATAGTGGCTATGTCAGCAACCCCCCGGGTA  
CCGTGACGACTGAAGGCAGGAAGTTTGACATTGAAGAGGTAGGGGTTGCTACCATAGAGAAAGGAGAGGAACCAA  
AAAGGGGGCGCATAGCGGTGCTGGTATGCAAGTCCATTAGAAGACTTAACAGGAAAGAACTGCCTGGTGTTCG  
TGGCAACCAAAGAAGCCGCGGAGACGGAGGCTAAAAGAACTGCGCACCAGAGGAATTAACGCCACCTACTACTATT  
CAGGTATAGACCCTAAGACTCTGGAACATGGGATGACCAATCAGCCACTGTATGTAGTACTAACATGCCATTG  
AATCAGGTATAACCTGTCTGACTTGGATGTGGTCATAGACACCATGCAGAAGTACGAAAAAGTAGTGAATTTCT  
CGGCAAGATGCCCTTGATTGTCACTTCATTAGTAAAGAAAAAATCACCAGGGGAAGAACAGGGCCAGAGGAAAG  
GTCGAGTGGGCAGGCAAAAAGAAAGGAAAAATACTACTACCCCTCGGGGGTGGTACCGAATGGGTCAAAGACCTAA  
GCTATTTAATCCTACAGGCCCAAGAATAATGGTGTCTTGAACAAGTCAATATAACAGAGTACTTCATCATAATGA  
ATGAGGACTGGGGTCTCTATGACGTAGATGAAGTAGAAGTGAGAACTTGTAGAGAATGAACAAGGAAATCTTGC  
TACCCTAGGTATTGTGGAGAAGCAATCTTGGAAAAGTACTCACCCGAAAAAGTGGCACTGTGTGATAACA  
AATTAGTGCAGAAAAATCCTATAGTATACCTAGAGTACAGGAAGGTGAGGTGAGCAAGGAATACAATACCTATA  
ATCTGGCCGTATATGACAAGCTAAAAGATGTCAACCCACAAGCCATTTATGTTCTAGCAGAAGAGGAGAGGCCA  
CAGAAATGATGGGTCTCGAGTTTGAACAAGACCCATCTGACTTACAGGATTCGGTAGTTACGCTTTGTGAAGATA  
TCAAGAGGTATACAAAACCTCTCTGGGATCACTGAGAACTGCTAGTAGGTACGATGGTGGGGTATATTGGATACA  
AAGCCTTAACCAGAAACCACGTGCCCTGGGTGAGCAAGAGTATTGTTATGAGCTGACCGATTACCCGGATACTT  
ACGAAAACCTCATTCGCACCTTTGGACGTGACGTCACAAAACCTCCGGTGAAGGAAAAACCCAGAGCAACTGGCAG  
ACCATCAATTGAGGCAACTACTGGAGACTGGGAGAGACAAGGCAATTGATTTCTTAAAAGGAATCCCGAGTTCA  
CTAGTGGGGCCATAAACAGTCCAAAGGCACTAAGTATATGGGAGAAAATATATCAGTATTTGAAGAAGCATCAGG  
GCGAGATCATCTCATCAGCAGCGTGGGGCAGTGGCAGGCCCTTCACGACAGTATTAATCTAGACTAGGAGATG  
AGGTGCTACTGCAGTAAATCCTCAAGTATTTAGCATTTGGTGAAGAGAACTGTCTGGGCTAACTAGGCAAG  
TTCTAATTGACATCATAGTATATATATAGTTAACAAGCCCCGGTTCGAAGGAGACGACTACGCAAGAGAAAAAG  
GAAGAAGGCTAGTCATCGAAGTCTGATGGGGGCACTGGCGACTTATGCGGTGTCCAATTTTTGGGGTGTGTCCA  
TTAATAAGATACTGCAACCAATTTCTGATTATCTACCCATGCCACCGCACTTTGGCTTTTCTTCGCCAACCT  
TCATGGAATCAGCAGTGGTGGTCTCTCTATCTATAGAGCTTTTCTCTCCATTAAGCATGCGGAAAAACAGGA  
GTCCTTGTACGCAGGTGCTTCTGCCGCCCTCGAAGTCAATGGCCCTGACCCAGTATCGGCTGGCTAGGCGTCT  
TGCTGGGGCTTGGGTTGTGTGCTCCATATGAACATTGACAAGAATGAGGAGAAAAGGACACTTATACTGAAAA  
TGTTTTGCAAAAACCTTTATAGACCAGGCGGCCTAGACGAGTTGGATAAACTGGAGCCAGAAAAAATAATCCTCT  
CATTGTTGGAGGGTATCCAAACCTGCACAAAACCCGATTAGAGCAATCATGATTTTGTACAGGGTGTACTACAAGG  
GAGAACTTTACAGAAAGCTTTGTCTAAGATGGCCGGCAAGTCTCTCATTGTGATGGTCATAGTCGAGTTCCTGG

ES 2 778 649 T3

AATTGACAGGCCAAACCCAAGGAGGGTATATAGATCTTAGTGCTAATTTGCTGACCTTTCTCCTCGAGAACTAA  
AAAAATGACTAACCTCGCCATCGGGGAAGCTAGAAAGGCTTTGCTCCCATCCCATACTTGTACTGTGAAACCT  
GGCAGTCTGACGCCAGAATCAAGGCCCTGAATCCTACGACCAAGTGGTAGTGGAAATGCAAAATGTGGCGCTTCAG  
CGAGGTATTCCTTCGCGATGGAGTTCATGAGATATTGGAAGAAAAAGGACTAATTTGGTGAAGAACTTCTTCT  
TATGGGGACCCAACTTCCACAATCCGGATCCAAAAAGGATGACATTTCTATGAATACGGCCAAGCAAAAAAGTGT  
CTGTTATCATAATTGGTGAAGACATAACCTTCGGCAAAATATGGCATATATATCAAATTTGGCCATAGGCCCTGATG  
GAGGGAGGTTAATAAGGGTACCACCCACGCTACTATCAGTAGGGAGGAATTCGTTGAAATCCTAACAGCCCCAA  
GCCAAGTGGCCATAGGCAAGGTCAAGCTAACCATTACTGTAATCAAAAAGGAATAATAGACAGGAAATGGCCG  
TACTTGAAGGTGACAAAATACATTTTTGGAAAGCACACCGTGGATCCAAAATCACAGACCAACTCACTATTGAGA  
ATCTGACAGATGATTTGGGGTCAGAAATCAGGGACATCACATGGGAGCTGTACACAGGTGGAACGTGCACCGTAA  
AAGGGGTGTCCTTAGATCATGCGCACCAGGTATAGAACTAAGGCTATGGTCTTGTGTGATTGCACTGATGTGC  
TTAGCCCCGTGTACCTAATAAACGGCAGGAGACCATCCCCATTTGACGTGCGGGAAGGTTATGAATGTCAACACC  
GGAAGCCCCGAGCGACGTATGAAGACCTAGAAAATGGAGGAAATACTAAAGAGACGAGTCCCTGTCTACGATCCTC  
TGTGTTTGTGTTGACACTGATAGTAAACTGCTACCTCCCGACACCTACTACTTGGAAGAAGATCAAGAGGACTTTG  
AGTACGCATTGAGATGTGGGGCTCGGGGTTTATGTAGCAGACGGGCTGTCACTTCCCCCGGACATAAGAA  
TACACCATAGTTCGGTATTACTACTGCTGACACCTGGAGTAAACTCAGAGTTGCCCTTACAGTACATACGTTGTT  
ACCCATCAGGCAGAGGTGGACATCTACATTTAGGAGTCAGCTTTTGGAGGAGGAAGACTGTACGGAGGTGG  
AAGGCTCCCAGGAAGATGGTGAAGGGATGGGCGATGCGGTAATAGAGGATGAGGATACATCGTCCACAACAG  
AATCAATACCCCACTAGAAGAGGAGGAAGGGGGCAAGAGCCAATCACCTATGTGGTCAAGAGGGGATTACAAG  
AAGAAAGATACGCCAGCCATCTTAAACTAAATGACTGGATCAGTGAACAATTTTCAGAGCCACACAGAGTCCAAA  
TTATGCTAGATGGGACAGTGAAGTACAATAAAAGAGGGCAAAAGTGAACAATTTGTTGGGGTCTATAGAATAG  
AAAATCCCTGGAAGCAATGTTTAAAGAGACCATAGCTGACCTCCCCGTAGCTACCCAACCGCCCCAGGGGCCAG  
TCTATACGGCTAAAGAGCTGGCCCAAGGGAACATCGCCCCGGTCCAACCTGCAGCGAATTATTACGGAATGATAG  
AGGGGAGAGGGACCCAAATGACGGCATTGAAGCCTTATCAGTCTTGGCGTCACAAAAAGTCTTAGCCAAGGACG  
TGAAGGTGAACACCCGAGGGCGCAGGTTTTTTTTAAATAAAGTCAAGGAGAAATGCTGAGGTCAGAGCGTCGGAAC  
TGACATTAATAATGCTTACCATACTTGGCAAAGTAAATGGGAGGAAATGATTAGAGAGGAAACCAACATCCCCA  
ACCAAAGGTTGGCATCAATAATGACCTCAATAGGAATTAGACTAGAAAAACTGCCAGTGGTTAGAGCAAACACTT  
CCGGCTCTAAGTTCAGACAGTCAATCTTAGAAAAATGGATAAGTATGAAAATGAACAAGTCCCAGGGTTACATG  
AAAAGATGTGGGCAGCGTTCCTGGCAACTGCCAGGCAAGATTTAAGAAATACCTATGAGGAAGTAACCTATCTTG  
AATTAGAGGCCGAATCAATCGGAAAGGAGCCCCAGGTTTCTTTGAAAAAGAAAGCTCAATAGGAGAAAGTGTGG  
AAAAAAAGAAAAAATGACGTCACAATCCAAGAGATTGAAAAAGGCAACCCTTATACATGAAACAGCCATGC  
CAAAAAATGAGAAAAGAGATGTGCTTGATGATTGGTTGTCAGAGGATTTGCTCACTTATAAGAAACCAGTGTGA  
TACAGTACCTGAGGCAGTCAACCGGTTGGCCATCACCAAAAATAATGTATAAGTGGGTGAAGCAAAAGCCTATAG  
TGATTCGGGTTATGAGGGAAAAACCCGATCTTTGAAATATTTGAAAAAGTCAAGTGCAGATTGGGCTCAGTTCA  
AAAATCCGGTAGCCGTGAGCTTCGACACCAGAGCCTGGGACACTCAAGTAAACAAGAGAAGCCTCAGGCTGGTAG  
GGCGGATACAGAAATACTATTACAAAAAAAATATTGGAAGTTCATTGACAATTTGACAGCCATGATGGAGGAAG  
TGCCTGTAATCACTGTAGAAGGAGATATGTTCCCTCAGAGTTGGACAGCGGGATCCGGACAGCCTGATACCTCAG  
CAGGCAATCCATGCTAAATGTGCTGACTATGTTGGTAGCTTTCTCTGAATCCACAAAATCGCCATAGCGGCTG  
CCTGGAAGGCCGTGTCGGATCCACGTCTGTGGTACGACGGTTTCTTAATCACAGAAATCGGAATTAGGGAGGAAGT  
TTGCTGAAAAAGGTGTTCCCTGTTAGCTGCATTTGGCAACCCCAAAAAATACAGAGGGAGCGACCTAAAGG  
TAACCAGCAACTTTGACGGAATAGAGTTTTGTAGTCATACCCCTATCAGAGTCCAACACCAACATCAGGTGGA

# ES 2 778 649 T3

TGCCAGCGAGACCAACAGCAACAATCCTAGGC AAAATGAGTACCAGGCTGGGTGAGGGTGCCACCAGGTCCGGGAG  
AAGAATACGAAAAACAGGTGGCATTCCGCATATCTACTGATGTACCCCTGGAAACCCGCTGGTCAGGAGAATCAGCC  
TCCTATTGTTATCGACTACTGACCCAATGGGGAAAGAGGAAACCCCATGCTCCGATGAGGGGGTGAAGTATGTTG  
GGGACCCATCGCTGCATACAGGGATGTATGGGGGCACAAAATTAGAGGATGTAGGCCATGTTGATCAACCCGAGT  
TATCCCGGATGAACTATAGCATGACTTACTTAGGGATTTGGAAACCAAAGACAAGTCAGCGGCTAGTCGAACAGT  
GTTGTCTGCTGGCCGAGAAAAGCAATTGTGTGTTACGTGCTGACTCCCTGATAAAGAAAAAGGTCAAGATCACTT  
ATGACCCGGGGATAGGAGTGGCTCAGGTCATTCGTAGGTGGGAAGAGCTTGAGTGGACCAGAAGGAAACCTGAAC  
TCACCAATGTAATTGTAGAAGATGATATCTTCCTAGTCTGTGGAAGAGATTTTCAAAGTACATTTTTTCAGAAAA  
TGAAGTTCATGCAGAGAATGTTGCCCCCTTATTAAGTGGGGGCACTCATTTAAATATAACCAGTATCTGGTAA  
GTATAAGATTTGTGTAATAAAGTATATAACTGAAAGGGCAAGTGGCCGTATAGGCTGGGGTATCGCCGCACC  
CCCCCTTACTAGGCGCCTCAACCCCATGTACCATGGGGTGTGTGTAATACTTGAATGAATGGAGTAATACGG  
GTAACAAACTTATAGGCCAGTATTGCCCCATTTGCTTTTATAGTGGTGACGACCTGTATAGGTCCGATCTGATATC  
(SEQ ID NO:1)

MEKQIAYYLKKEKQRNGWTEL VVGESHK IITLSGKTYRGTWEMEKRPNPYGTYLPRPSPQQLTALHHPVVMCK  
VVEYKEMDPNYGDCPNNGVVFVDEKGRRLSSPPLGIWKIRLDYSDLVNI SRPTPASGKNSYQVETCSGELATVTL  
VHNRVLVEDCRGLYQWKPNCEGIVLYVKTCSDWADQVEKQEKESPPKPQRP RRDRPRKGLQFQVPKETEVEKRR  
QFSVTLVSGGQKAQVIYKGRTKNKKTPDGVYRYPGAKEGDVKVRKMLKNWHIALVMYLIHIITPGLAKVQWFLK  
DENSTGINQILWQRQINRSLHGEWPNQICHGMPNETITDEELRSLGMVDTSPRTNYTCCQLQYHEWKKHGWNY  
QKQAWITRITALQANLTGPYEGPECAVICRFNGSYNIVKQARDEVSPLTGCKEGHPFLFSGERSDTSCLRPPSTS  
WVRPVKMDEASMADGFAHGVDKAIILIRK GASGIINFLDTIGR#L PVAEATIVPYCDTYTVTGMYVHVKNCLPRG  
LFKHSKIISPTMIYLGEGDPAHNIQH LFGSGIAKWLVLVLLGILGEWYGE LASTIYLLLEYGSEWLEHESLVEGL  
IPGINITIELPASHTVPGWVWVAGQWVCVKPDWPTQIWIETVVAETWHILKILASALVNIVA AFVNLELVYLV  
ILVKISKGNLIGAILWCLLLSGAEGSCYKRQDYNTQLVVEEKTGVEKRSIMGKWTVITREGREPRLMEQINMVL  
NDSLSETYCYNRLNTSTWGRQPARQRGCGQTPVYWP GDNVLEEQYYSTGYWVNVTTGGCQLREGVWLSRKG NVQCQ  
RNGSSLMLQLAIKEENDTMEICPDVETESMGPVAOQTCVYSWAFAPRGWY YNRKDGWLOYIKKNDYQYWTMP  
TASSAATMYRHLLPLLVA CLMGGRI SVWFVAML LSLQVEASEVGTQ LAVTLTLWKMDWTELLFYIVLMLAVKEE  
LIKKIIVTASLVALKNSPVALSFLIVLRLVGGSEALPVGLLEKMCIDQPEFGT PFLIYLWDNWKT VLVSFSA LN  
HEKTIKLARKLLLATHITALTTLG LSDSIFYMMLITTNLLIKTFIYLLGASMNWVEREKKLLV KRRLIYKKA VT  
CSQDENVLENKFNKITVNADFTPCKLELLQLLRAFLVSLCFSYYKPLLYAETTLTVIVIGVQEYNVAMARGRSV  
HRLLAMAYYIYGRIQGMFQLATI QCLLSSPRKIMKHMVENPTLKKLWQGETELFNQGV SQSKIVNPKKIGLEEL  
HKGMCGLPTVVQNLVIYAKKND SLILGELGYPPGDLTSDGWEILGPGRIPKITNVESAKMDLLSKLMTFLGIESS  
RVPRTPVHSTRKLLKIVRGLETGWGYTHAGGISSAKHVTGEKNLMTHMEGRKGYILQSQEHGADEVEYGVKTDQ  
KAPDNALCYCFNPEATNIKGETGAMVFMKIGKKTWLVTS DGNKAYYNNVNLK GWSGLPIMLHSTGAI VGRKSA  
YSDENDLVEELIDSRTISKSNETNLDHLIKELADMRRGEFRSITLGTGAGKTELPRQYLT TVGAHKSVLV L VPL  
KAPAESVCRFMRSKYPTINFSLRVGERKEREGDVSSGITYATYGFCCLNLVQLKEWISRYSMVFFDEYHTATPEQI  
AII SKIHALKVKTRIVAMSATPPGTVTTEGRKFDIEEVGVATIEKGE EPKRGRIAVAGMQVPLEDLTGKNCLV FV  
ATKEAAETEAKELRTRGINATYYYSGIDPKTLEHGMTNQPYCIVATNAIESGITCPDL DVVIDTMQKYEKVVNFS  
AKMPLIVTSLVKKKITREEQQRKGRVGRQKKGKYYYPSGVVPNGSKDLSYLI LQAQYEGVLEQVNI TEYFIIMN  
EDWGLYDVDEVEVRILERMNKEILLPLGIVEKQILERS THPEKVALLYNKLVQKNP I VYPRVQEGEVSKEYNTYN  
LAVYDKLKDVPQA IYVLAEEERATEMMGLEFEQDPSDLQDSVVQLCEDIKRYTKLSGITEKLLVGTVMVGYIGYK

# ES 2 778 649 T3

ALTRNHVPWVSKEYCYELTDSPTDYENSFAPLDVDVQNSGEGKHPEQLADHQLRQLLETGRDKAIDFLKGIREFT  
SGAINSPKALSWEKIYQYLKHKQGEIISAAWGSATALHDSIKSRLGDEVATAVIILKYLAFTERELSGLTRQV  
LIDIIVVYIVNKPRFEGDDYAKRKRRLVIEVLMGALATYAVSNFWGVSINKILQPIISDYLPYATATLAFLRPTF  
MESAVVASSIYRAFLSIKHAENRSLVTQVASAALEVMLT PVSAGLVLLGLGLCVLHMNIDKNEEKRTLILKM  
FVKNFIDQAAALDELKLEPEKIIILSLEGIQTCTNPIRAMILYRVYKGETFTEALSKMAGKSLIVMVI VEFLE  
LTGQTQGGYIDL SANLTFLEKLKMTNLAIGEARKVLLPIPYLYCETWQSDARIKAPESYDQVVVECKCGASA  
RYSFRDGVHEILEEKRTNWCKNFWGPNFHNPDPKRMTFYEYQAKKCPV IIGEDITFGKYGIYIKFGRPDG  
GRLIRGTTTHATISREELLEILTAPSQVAIGKVKLTDYCNQKGIIDRKLAVLEGDKIHFWKAHRGSKITDQLTIEN  
LTDDLGESEIRDITWELTYGGTCTVKGVS LRSCAPGHRTKAMVLCDCD TDVLSPCYLINGRRPSPFDVAEGYECRR  
KPRATYEDLEMEEILKRRVPVYDPLCLFDTDSKLLPPDTYYLEEDQEDFEYALRCWGLGVVADGPVTSPPDIRI  
HHSVLLLLLTPGVNSELPLQYIRCYPHQAEVDIYIRSQLEEEEDTATEVEGSQEDGDEGMGDAVIEDEDTSSSTE  
SIPPLEEEEGGEEPITYVIRGLQEERYASHLKLNDWISENISEPHRVQIMLDGTVRVTTIKEGKVKHLFGVYRIE  
NSLEAMFKETIADLPVATQPPQGPVYTAKELAQGNIAVPQPAANYGMIEGRGDPMTAFEALSVLRSQKVLAKDV  
KVNTRRAQVFLNKVRRIAEVRASELTLKCLPILGKVNKRKLIREETNIPNQRASIMTSIGIRLEKLPVVRANTS  
GSKFRQSILEKMDKYENEQVPLHEKMWAAFLATARQDLRNTYEEVTYLEEAGINRKGAPGFFEKESSIGEVL  
KKEKIDVTIQEIEKGNHLYETAMPKNEKRDVLDWLSDFVYKPRVIOYPEAVTRLAITKIMYKWKQKPIV  
IPGYEGKTPIFEIFEKVSADWAQFKNPVAVSFDTRAWDTQVTREDLRLVGRIQKYYKWKYKFDNLTAMMEEV  
PVIITVEGDMFLRVGQRGSGQPDTSAGNSMLNVLTMLVAFSESTNLPIAAAWKACRIHVCDDGFLITESELGRKF  
AEKGVPLLAAFGKPKITEGASLKVTSNFDGIEFCSHTPIRVQTPNIRWMPARPTATILGKMSTRLEGATRSGE  
EYEKQVAFAYLLMPWNPLVRRISLLLLSTTDPMGKEETPCSDEGVKYVGDPIAAYRDVWGHKLEDVGHVDQPQL  
SRMNYSMTYLGIWKPKTSQRLVEQCCRLAEXSNCVVRADSLIKKVKITYDPGIGVAQVIRRWELEWTRRKP  
EL  
TNVIVEDDIFLVLWKRFSKYIFQKMKFMQRMFAPY (SEQ ID NO:2)

La presente divulgación también proporciona vectores y clones moleculares infecciosos que codifican proteínas Npro, de la cápside, Erns, E1, E2, NS2-3, helicasa, NS4B, NS5A o ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) del pestivirus.

- 5 Npro: El gen que codifica la proteína de proteasa N-terminal (Npro) que consiste en 180 aminoácidos se encuentra en las posiciones 378 a 917 de SEQ ID NO:1.

ATGGAAAAACAGATTGCATATTACTTAAAAAAGAAAAACAAAGAAATGGGTGGACGGAACGGTGGTAGGAGAA  
AGTCATACAAAAATAACCACGCTTTCTGGAAAGACCTATCGAGGCACCTGGGAAATGGAGAAAACGCCAAATCCT  
TATGGAACCTATCTCCCAGACCTAGTCCCCAACAGCTTACAGCCCTACACCCCCACCCAGTGGTGAATTGTAAG  
GTGGTTGAGTACAAGGAGATGGACCTAATTATGGTGATGCCCCAAATACGAACGGGGTGTGGTTGACGAAAAG  
GGTAGAAGGCTGAGCAGCCCTCCATTAGGCATTGGAAGATAAGATTGGACTATAGTGACTGGTAAAACATAAGC  
AGACCAACCCCGCTAGTGGGAAAACTCTTACCAAGTTGAGACCTGCAGTGGGGAGCTGGCTACAGTGACACTG  
GTACACAATAGGGTGCCTCGTGAAGATTGCAGGGGGCTATACCAATGGAACCCAACTGTGAAGGAATTGTGCTC  
TATGTGAAAACCTGT (SEQ ID NO:3)

MEKQIAYYLLKKEKQRNGWTELTVGESHTKITTLGKTYRGTWEMEKRPNPYGTYLPRPSPQQLTALHHPVNVCK  
VVEYKEMDPNYGDCPNNGVVFVDEKGRRLSSPPLGIWKIRLDYSDLVNISRPTPASGKNSYQVETCSGELATVTL  
VHNRLVLEDRCGLYQWKPNCPEGIVLYVKTC (SEQ ID NO:4)

- 10 Cápside: El gen que codifica la proteína de la cápside que consiste en 111 aminoácidos se encuentra en las posiciones 918 a 1250 de SEQ ID NO:1.

TCTGACTGGGCAGATCAGGTAGAAAAACAGGAGAAAAGAACCCCCAAAACCACAGCGGCCACCAAGGCGAGAC  
CCACGAAAAGGGTTACAACCACAAGTCCCCAAAGAGACTGAGGTACAGAAAAGAGACAACCTAGTGTACC  
TTAGTATCGGGGGGCAGAAGGCCAAGTCATCTACAAAGGCAGGACCAAAAACAAAAGACCCCGGATGGAGTC  
TATAGATACCCAGGAGCTAAAGAAGGGGACGTAGTAAAGGTCAGGAAGATGCTGAAGAATTGGCATATAGCCTTA  
GTGATGTACCTGATACATATCATAACTCCAGGC (SEQ ID NO:5)

SDWADQVEKQEKESPPKPQRPPRRDRPRKGLQPQVPEKETEVEKRRQPSVTLVSGGQKAQVIYKGRTKNKKTPDGV  
YRYPGAKEGDVVKVRKMLKNWHIALVMYLIHIITPG (SEQ ID NO:6)

# ES 2 778 649 T3

Erns: El gen que codifica la proteína de envuelta Erns que consiste en 209 aminoácidos se encuentra en las posiciones 1251 a 1877 de SEQ ID NO:1.

```
CTTGCCAAGGTCAGTGGTTCTTAAAAGATGAAAACCTCGACGGGGATCAACCAGATACTGTGGCAAAGACAGATC
AACAGATCCTTACATGGAGAATGGCCTAACCAGATCTGCCACGGTATGCCCAATGAAACTATCACGGATGAGGAA
TTACGCAGTCTGGGAATGGTAGATACAAGCCCTAGAACAACACTACACCTGTGCCAGTTGCAATATCATGAGTGG
AAGAAACATGGTTGGTGCAACTATCCACAAAAACAGGCGTGATCACGAGGATAACGGCCCTACAAGCTAACCTT
ACCGGGCCTTATGAGGGACCTGAGTGCGCCGTCATCTGCCGATTTAACGGCAGCTACAACATCGTAAAACAGGCC
AGAGATGAGGTGAGTCCACTGACAGGGTGCAAGGAAGGGCATCCTTTTCTATTCTCTGGTGAAAGATCCGACACC
TCATGCCTAAGGCCCCCTTCCACTAGTTGGGTAGACCAGTAAAAATGGACGAGGCATCAATGGCCGATGGCTTT
GCCCATGGGGTTGATAAGGCGATAATACTAATCAGGAAGGGGCATCAGGAATAATCAATTTCTAGACACTATT
GGGAGGTGGCTACCGGTAGCTGAAGCA (SEQ ID NO:7)
```

5

```
LAKVQWFLKDENSTGINQILWQRQINRSLHGEWPNQICHGMPNETITDEELRSLGMVDTSPTNYTCCQLQYHEW
KKHGWNCNYPQKQAWITRITALQANLTGPYEGPECAVICRFNGSYNIVKQARDEVSPLTGCKEHPFLFSGERSDT
SCLRPPSTSWVRPVKMDEASMDGFHGVDKAIIIRKASGIINFLDTIGRWLPVAEA (SEQ ID NO:8)
```

E1: El gen que codifica la proteína de envuelta E1 que consiste en 200 aminoácidos se encuentra en las posiciones 1878 a 2477 de SEQ ID NO:1.

```
ACTATAGTACCATATTGTGATACTTACACTGTGACAGGGATGTATGTCCATGTAAGAATTGCCTCCCTAGAGGG
TTACCTAAGCATTCAAAAATAATCTCCCCGACAATGATATATCTGGGAGAAGGAGACCCGGCCCATAAATATCCAG
CACTTATTTGGCTCAGGTATAGCAAAGTGGGTCTAGTTCTACTCGGGATTCTGGGTGAGTGGTATGGAGAATTG
GCTTCCACAATATACTTACTACTAGAAATACGGGTCTGAGTGGTTGGAACATGAAAGCCTGGTCACGGAAGGGTTG
ATTCTGGCATTAAATATACAATAGAACTCCCAGCTAGTCATACAGTGCCTGGTTGGGTGTGGGTCCGAGGCCAG
TGGGTATGCGTGAAGCCAGACTGGTGGCTACACAGATTGGATTGAAACCGTGGTGGCAGAGACCTGGCATATA
CTAAAAATATTGGCGTCAGCCCTGGTGAACATAGTTGCAGCGTTCGTAACCTGGAATTGGTTTATCTGGTCATA
ATACTAGTCAAAATATCAAAAGGGAACCTGATAGGTGCCATATTATGGTGCTTGTACTGTGAGCGCTGAAGGC
(SEQ ID NO:9)
```

10

```
TIVPYCDTYTVMYVHVKNCLPRGLPKHSKIISPTMIYLGEGDPAHNIQHLFGSGIAKWVLLVLLGILGEWYEL
ASTIYLLLEYGSEWLEHESLVTEGLIPGINITIELPASHTPVPGWVWVAGQWVCVKPDWWPTQIWIETVVAETWHI
LKILASALVNIVAAFNLELVYLVIIIVKISKGNLIGAILWCLLLSAG (SEQ ID NO:10)
```

E2: El gen que codifica la proteína de envuelta E2 que consiste en 372 aminoácidos se encuentra en las posiciones 2478 a 3593 de SEQ ID NO:1.

```
TCGTGCTACAAAAGACAAGACTATTACAACACCCAAC TAGTCGTCGAAGAAAAACAGGCGTAGAAAAACGATCT
ATAATGGGCAAGTGGACCGTGATAACCAGGGAAGGTCCGGAGCCAAGATTAATGGAGCAATAAATATGGTATTG
AATGATAGCCTGTGAGAAACCTACTGTATAATAGGCTAAAACACAGCACTTGGGGGCGGCAACCGGCAAGACAA
AGAGGGTGTGGTCAAACCGTGCCCTATTGGCCTGGTGACAATGTTCTAGAAGAACAATAC TACAGCACAGGTAC
TGGGTGAATGTAACAGGCGGTTGCCAGCTGAGAGAAGGCGTATGGCTATCAAGAAAGGGTAACGTACAGTGTGAG
CGTAACGGCTCATCCTTGATGCTGCAATTGGCGATAAAAAGAAGAGAATGACACTATGGAAATACCATGTGACCCA
GTGGAACCTGAAAGTATGGGTCCAGTTGCACAGGGCACTTGTGTGTACAGCTGGGCATTCGCCCAAGAGGGTGG
TACTATAACAGGAAGGATGGTTATTGGCTCCAGTACATAAAGAAAAACGACTACCAGTATTGGACAAAAATGCCT
ACTGCCTCGTCCGCCGCAACCATGTACCGCCACTTGCTCCCCTTACTGGTGGCCTGCCTCATGGGCGGTAGGATA
TCGGTGTGGTTTGTGGCAATGCTCCTGTCTCTACAGGTGGAAGCTAGTGAAGTAGGCACTAAACAACCTGGCTGTC
ACGCTAACCCGTGGAAATGGACTGGACAGAACTACTTTTCTATATTGTCTTGATGCTAGCCGTTAAGGAAGAA
CTTATAAAAAAATTTGACCGCTAGCCTTTGGCCCTAAAAAATAGTCCAGTAGCCTTGAGTTTCTTATTGTA
CTCAGACTTGTGGGGGCGAGTGAAGCACTCCCAGTAGGTTTATTATTAGAAAAAATGTGCATAGACCAACCGGAG
TTTGGAACTCCTTTCC TGATCTACCTATGGGACAACCTGGAAGTGGACTGTGTTAGTCAGCTTCTCCGCACTGAAC
CATGAAAAAATATAAACTGGCAAGAAAACCTGTTGTTGGCAACACATATAACAGCGCTCACATTG (SEQ ID
NO:11)
```

## ES 2 778 649 T3

SCYKRQDYNTQLVVEEKTGVEKRSIMGKWTVI TREGREPRIMEQINMVLNDSLSEYCYNRLNLTSTWGRQPARQ  
RGCQVTPYWPFDNVLEEQYYSYTYWVNVVTGGCQLREGVWLSRKGNVQCQRNGSSLMLQLAIKEENDTMEIPCDP  
VETESMGPVAQGTVCVYSWAFAPRGWYYNRKDGWLYQYIKKNDYQYWTKMP TASSAATMYRHLLPLLVACL MGGRI  
SVWFVAMLLSLQVEASEVGTKQLAVTTLTWKMDWTELLFYIVLMLAVKEELIKKIVTASLVALKNSPVALSFLIV  
LRLVGGSEALPVGLLLEKMCIDQPEFGTFFLIYLWLDNWKWTVLVVSFSALNHEKTIKLRKLLLATHITALTL  
(SEQ ID NO:12)

NS2-3: El gen que codifica la proteína no estructural NS2-3 que consiste en 934 aminoácidos se encuentra en las posiciones 3594 a 6395 de SEQ ID NO:1.

ACTGGCTT GAGTGATTCAATCTCTATATGATGCTTATAACAACAAATTTGTTAATAAAGACATTCATATACTTG  
CTGGGGCTAGTATGAATTGGGTCGAGAGAGAAAAAGAAATGCTAGTGAAGAGGAGACTAATATACAAGAAA  
GCCGTTACTTG CAGTCAGGATGAGAATGATTGGAGAATAAATTCACAAGATAACTGTAAACGCGGATTTCCACC  
CCATGCAAGCTTGAAC TCTACAATTACTTAGGGCTTTTTTAGTCTCTTTGTGTTTTCTCTACTACAAACCTCTC  
CTGTATGCAGAGACTACCTTAACTGTAATAGTAATTGGCGTACAAGAGTACAACGTAGCCATGGCCCGCGGGCGA  
AGTGTGGTCCACAGGCTACTAGCCATGGCCTATTACATATACGGCCGCATACAGGGTGACATGTTCCAGCTCGCC  
ACTATCCAGTGCCTGTGTCGAGTCCGAGGAAAATTATGAAACACATGGTAGAGAATCCAAC TCTCAAGAAGCTC  
TGGCAAGGCGAAACAGAACTCTTCAACCAGGGTGTAGTCAATCCAAGATAGTGAATCCAAAGAAAATTTGGCTG  
GAAGAATTACACAAGGGCATGTGTGGCTCCCAACAGTAGTGCAAAAATTTGGTCATATATGCAAAGAAGAATGAC  
TCTCTTATTTTAGGAGAGCTGGGTTACCCCTGGGGATCTCACCAGTGTGGGTGGGAAAATTTAGGTCCTGGC  
AGAATCCCAAAGATCACTAACGTCGAGTCTGCTAAGATGGACTTACTCTCAAAC TTAGACCTTTCTGGGGATT  
GAAAGCTCGAGGGTCCCAGGACCCAGTCCACTCAACAAGGAAAATTTATGAAGATAGTAAGGGGCTTGGAACA  
GGATGGGGGTACTACTCACGCAGGGGGATAAGTAGCGCAAAACACGTTACAGGTGAAAAGAACTTAATGACCCAC  
ATGGAGGGTAGGAAGGAAAATATATCTTACAATCTCAAGAACATGGTGTGCTGACGAGGTAGAGTACGGAGTAAAA  
ACTGATCAAAAAGCTCCCAGCAATGCC TTAGTCTACTGTTTTAACCTGAAGCTACAAACATAAAAGGAGAGACG  
GGAGCCATGGTGTTCATGAAGAAGATAGGAAAAAGTGGACTCTCGTAACATCAGACGGCAATAAAGCCTATTAT  
AATGTAAACAATTTGAAAGGGTGGTCTGGACTACCAATAATGCTGCACTCCACCGGGCCATAGTGGGGAGGATT  
AAATCAGCGTATT CAGATGAAAACGACCTGGTGGAGGAACTTATTGACTCTAGAACTATTAGTAAGAGCAATGAG  
ACAAACCTGGACCACCTTATCAAGGAATGGCAGACATCGGAGGGGGAGTCCGCTCAATTACCTTGGAACG  
GGAGCCGGGAAAACACAGAATGCCTAGGCAATACCTCACAACAGTAGGTGCCATAAATCCGTCTGGTCTTA  
GTCCCTTAAAAGCACCTGCTGAAAGTGTTCGCGCTTTATGAGGTCTAAAATACCTACCTCAACTTTTCTTTA  
AGAGTGGGGAAACGAAAGAGGGAGATGTGAGCAGCGGCATCACCTACGCTACTTACGGATTTTGTGTCAGCTA  
AACCTAGTCCAAC TTAAGAATGGATATCCAGGTACTCAATGGTTTTTTTGTGATGAATATCACACGCAACTCCA  
GAACAAATAGCCATAATAAGCAAGATTTCATGCACTGAAAGTAAAGACCAGGATAGTGGCTATGTCAGCAACCCCC  
CCGGTACCCTGACGACTGAAGGCAGGAAGTTTGACATTGAAGAGGTAGGGGTTGCTACCATAGAGAAAGGAGAG  
GAACCAAAAAGGGGCGCATAGCGTCTGTTATGCAGGTCCCATTAGAAGACTTAACAGGAAAGAACTGCCTG  
GTGTTCTGTGGCAACCAAGAAGCCGCGGAGACGGAGGCTAAAGAAGTGCACACCAGAGGAATTAACGCCACCTAC  
TACTATT CAGGTATAGACCCTAAGACTCTGGAACATGGGATGACCAATCAGCCATACTGTATTGTAGCTACCAAT  
GCCATTGAATCAGGTATAACCTGTCTGACTTGGATGTGGTCATAGACCCATGCAGAAGTACGAAAAAGTAGTG  
AATTTCTCGCAAAGATGCCCTTGATTGTCACTTCATTAGTAAAGAAAAAATCACCAGGGAAGAACAGGGCCAG  
AGGAAAGGTCGAGTGGG CAGGCAAAAGAAAGGAAAATACTACTCCCTCGGGGTGGTACCGAATGGGTCAAAA  
GACCTAAGCTATTTAATCTTACAGGCCAAGAATATGGTGTCTTGGAAACAGTCAATATAACAGAGTACTTCATC  
ATAATGAATGAGGACTGGGCTCTTATGACGTAGATGAAGTAGAAGTGAAGTACTTGGAGAGATGAACAAGGAA  
ATCTTGTCTACCACTAGGTATTGTGGAGAAGCAATCTTGGAAAGAACTACTCACCCGAAAAAGTGGCACTGTG  
TATAACAAATTAGTGCAGAAAAATCCTATAGTATACCTTAGAGTACAGGAAGGTGAGGTACAGCAAGGAATACAAT  
ACCTATAATCTGGCCGTATATGACAAGCTAAAAGATGTCAACCCACAAGCCATTTATGTTCTAGCAGAAGAGGAG  
AGAGCCACAGAAATGATGGGCTCGAGTTTGAACAAGACCCATCTGACTTACAGGATTCGGTAGTTTCAGCTTTGT  
GAAGATATCAAGAGGTATACAAAAC T (SEQ ID NO:13)

# ES 2 778 649 T3

TGLSDSIFYMMLITTNLLIKTFIYLLGASMNWVEREKKLLVKRRLIYKKAVTCSQDENVLENKFNKITVNADFT  
PCKLELLQLLRAFLVSLCFSYKPLLYAETTLTVIVIGVQEYNVAMARGRSVVRLLAMAYIYGRIQGDMFQLA  
TIQCLLSSPRKIMKHMVENPTLKKLWQGETELFNQVSVQSKIVNPKKIGLEELHKGMCGLPVTVQNLVIYAKKND  
SLILGELGYPPGDLTSDGWEILGPGRIPKITNVESAKMDLLSKLMTFLGIESSRVPRTPVHSTRKLLKIVRGLET  
GWGYTHAGGISSAKHVTGEKNLMTHEGRKGYILQSQEHGADEVEYGVKTDQKAPDNALCYCFNPEATNIKGET  
GAMVFMKKIGKKWTLVTS DGNKAYYNVNNLKGWSGLPIMLHSTGAIVGRIKSAYS DENDLVEELIDSRTISKSNE

TNLDHLIKELADMRRGEFRSITLGTGAGKTELPRQYLTVGAHKSVLVPLKAPAESVCRFMR SKYPTINFSL  
RVGERKEGDVSSGITYATYGFCQLNLVQLKEWISRYSMVFFDEYHTATPEQIAIISKIHALKVKTRIVAMSATP  
PGTVTTEGRKFDIEEVGVATIEKGEPEKRGRIAVAGMQVPLEDLTGKNCLVVFVATKEAAETEAKELRTRGINATY  
YYSGIDPKTLEHGMTNQPFCIVATNAIESGITCPDLDDVVIDTMQYKQVNFSAKMP LIVTSLVKKKITREEQGO  
RKGRVGRQKKGKYYPSGVVPNGSKDLSYLILQAQEYGVLEQVNI TEYFIIMNEDWGLYDVDEVEVRILERMNKE  
ILLPLGIVEKQILERS THEPKVALLYNKLVQKNPIVYPRVQEGEVSKEYNTYNLAVYDKLKD VNPQAIYVLAEEE  
RATEMMGLEFEQDPSDLQDSVVQLCEDIKRYTKL (SEQ ID NO:14)

5 Helicasa: El gen que codifica la proteína helicasa que consiste en 687 aminoácidos se encuentra en las posiciones 4335 a 6395 de SEQ ID NO:1.

GGTCCTGGCAGAATCCCAAAGATCACTAACGTCGAGTCTGCTAAGATGGACTTACTCTCCAACTTATGACCTTT  
CTGGGGATTGAAAGCTCGAGGGTCCCCAGGACCCAGTCCACTCAACAAGGAAATTATTGAAGATACTAAGGGGC  
TTGGAACAGGATGGGGGTACTACTCACGCAGGGGGGATAAGTAGCGCAAAACACGTTACAGGTGAAAAGAACCTTA  
ATGACCCACATGGAGGGTAGGAAGGAAAAATATATCCTACAATCTCAAGAACATGGTGCTGACGAGGTAGAGTAC  
GGAGTAAAACTGATCAAAAAGCTCCCGACAATGCCTTATGCTACTGTTTTAACCTGAAGCTACAAACATAAAA  
GGAGAGACGGGAGCCATGGTGTTCATGAAGAAGATAGGAAAAAGTGGACTCTCGTAACATCAGACGGCAATAAA  
GCCTATTATAATGTAACAATTTGAAAGGGTGGTCTGGACTACCAATAATGCTGCACTCCACCGGGGCCATAGTG  
GGGAGGATTAATCAGCGTATTAGATGAAAACGACCTGGTGGAGGAACCTATTGACTCTAGAATATTAGTAAG  
AGCAATGAGACAAACC TGGACCACCTTATCAAGGAATGGCAGACATGCGGAGGGGGGAGTTCCGCTCAATTACC  
CTTGGAACGGGAGCCGGGAAAAACCACAGAACTGCCTAGGCAATACCTCACAAACAGTAGGTGCCATAAATCCGTG  
CTGGTCTTAGTCCCCTTAAAAGCACCTGCTGAAAGTGTTTGCGCTTTATGAGGTCTAAATACCC TACCATCAAC  
TTTTCTTAAGAGTGGGGGAACGGAAAGAGGGAGATGTGAGCAGCGGCATCACCTACGCTACTTACGGATTTTGC  
TGCCAGCTAAACCTAGTCCAAC TAAAGAATGGATATCCAGGTACTCAATGGTTTTTTTTGATGAATATCACACA  
GCAACTCCAGAACAATAAGCCATAATAAGCAAGATTCATGCACTGAAAGTTAAGACCAGGATAGTGCGTATGTCA  
GCAACCCCCCGGTACCGTGACGACTGAAGGCAGGAAGTTTGACATTGAAGAGGTAGGGGTTGCTACCATAGAG  
AAAGGAGAGGAACCAAAAAGGGGGCGCATAGCGGTGCTGGTATGCAGGTCCCATTAGAAGACTTAACAGGAAAG  
AACTGCCTGGTGTTCGTGGCAACCAAAGAAGCCGCGGAGACGGAGGCTAAAAGAACTGCGCACAGAGGAATTAAC  
GCCACCTACTACTATT CAGGTATAGACCCTAAGACTCTGGAACATGGGATGACCAATCAGCCATAC TGTATTGTA  
GCTACCAATGCCATTGAATCAGGTATAACCTGTCTGACTTGGATGTGGTCATAGACACCATGCAGAAGTACGAA  
AAAGTAGTGAATTTCTCGGCAAGATGCCCTTGATGTCACTTCATTAGTAAAGAAAAAATCACCAGGGAAGAA  
CAGGGCCAGAGGAAAGGTGAGTGGGCAGGCAAAAGAAAGGAAAATACTACTACCCCTCGGGGGTGGTACC GAAT  
GGGTCAAAGACCTAAGCTATTTAATCTTACAGGCCAAGAATATGGTGTCTTGGAAACAAGTCAATATAACAGAG  
TACTTCATCATAATGAATGAGGACTGGGGTCTCTATGACGTAGATGAAGTAGAAGTGAATACTTGAGAGAATG  
AACAGGAAATCTTGTCTACCAC TAGGTATTGTGGAGAAGCAAACTTGGAAAGAAGTACTCACCCGAAAAAGTG  
GCACTGTTGTATAACAAATTAGTGCAGAAAAATCCTATAGTATACCTTAGAGTACAGGAAGGTGAGGTGAGCAAG  
GAATACAATACCTATAATCTGGCCGTATATGACAAGCTAAAAGATGTCAACCCACAAGCCATTTATGTCTAGCA  
GAAGAGGAGAGGCCACAGAAATGATGGGTCTCGAGTTTGAACAAGACCCATCTGACTTACAGGATTCGGTAGTT  
CAGCTTTGTGAAGATATCAAGAGGTATACAAAATC (SEQ ID NO:15)

# ES 2 778 649 T3

GFGRIPKITNVESAKMDLLSKLMTFLGIESSRVPRTPVHSTRKLLKIVRGLETGWGYTHAGGISSAKHVTGEKNL  
MTHMEGRKGYIILQSQEHGADEVEYGVKTDQKAPDNALCYCFNPEATNIKGETGAMVFMKKIGKKWTLVTS DGNK  
AYYNNVNLKGSGLPIMLHSTGAI VGRIKSAYS DENDLVEELIDSR TISKSNETNLDHLIKELADMRRGEFRSIT  
LGTGAGKTELPRQYLTTVGAHKSVLVPLKAPAESVCRFMRSKYPTINFSLRVGERKEGDVSSGITYATYGF C  
CQLNLVQLKEWISRYSMVFFDEYHTATPEQIAIISKIHALKVKTRIVAMSATPPGTVTTEGRKFDIEEVGVATIE  
KGEEPKRGR IAVAGMQVPLEDLTGKNCLV FVATKEAAETEAKELRTRGINATYYYSGIDPKTLEHGMTNQPYCIV  
ATNAIESGITCPDLVDVIDTMQKYEKVVNFSAK MPLIVTSLVKKKITREEQQRKGRVGRQKKGKYYYPSGVVFN  
GSKDLSYLILQAQ EYGVLEQVNI TEYFIIMNEDWGLYDVDEVEVRILERMNKEILLPLGIVEKQILERSTHPEKV  
ALLYNKLVQKNPIVYPRVQEGEVSKEYNTYNLAVYDKLKD VNPQAIYVLAEERATEMMGLEFEQDPSDLQDSV  
QLCEDIKRYTKL (SEQ ID NO:16)

NS4B: El gen que codifica la proteína no estructural NS4B que consiste en 67 aminoácidos se encuentra en las posiciones 6396 a 6596 de SEQ ID NO:1.

TCTGGGATCACTGAGAACTGCTAGTAGGTACGATGGTGGGGTATATTGGATACAAAGCCTTAACCAGAAACCAC  
GTGCCCTGGGT CAGCAAAGAGTATTGTTATGAGCTGACCGATTCAACCGGATACTTACGAAAAC TATTGCAACCT  
TTGGACGTCGACGTCCAAAAC TCCGGTGAAGGAAAACACCCAGAGCAACTG (SEQ ID NO:17)

5

SGITEKLLVGMTVMGYIGYKALTRNHVPWVSKEYCYELTSPD TYENSFAPLDVDVQNSGEGKHPEQL (SEQ ID  
NO:18)

NS5A: El gen que codifica la proteína no estructural NS5A que consiste en 811 aminoácidos se encuentra en las posiciones 6597 a 9029 de SEQ ID NO:1.

GCAGACCATCAATTGAGGCAACTACTGGAGACTGGGAGAGACAAGGCAATTGATTTCC TAAAAGGAATCCGCGAG  
TTCAC TAGTGGGGCCATAAACAGTCCAAAGGCACTAAGTATATGGGAGAAAATATATCAGTATTTGAAGAAGCAT  
CAGGGCGAGATCATCTCATCAGCAGCGTGGGGCAGTGGCAGCGGCCCTT CACGACAGTATTTAAATCTAGACTAGGA  
GATGAGGTGCGTACTGCAGTAAATAATCTCAAGTATTTAGCATTGGTGAAAGAGA AACTGTCTGGGCTAACTAGG  
CAAGTTCTAATTGACATCATAGTATATTTATATAGTTAACAAGCCCGGTTT CGAAGGAGACGACTACGCAAAGAGA  
AAAGGAAGAAGGCTAGTCATCGAAGTCTGTATGGGGCACTGGCGACTTATGCGGTGTCCAATTTTGGGGTGTG  
TCCATTAATAAGATACTGCAACCAATTTCTGATTATCTACCCTATGCCACCGCCACTTTGGCTTTTCTTCGCCCA  
ACCTTCATGGAATCAGCAGTGGTGGTCTTCTCTATCTATAGAGCTTTTCTCTCCATTAAGCATGCGGAAAAC  
AGGAGTCTTGTCACGCAGGTCGCTTCTGCCGCCCTCGAAGT CATGGGCC TGACCCAGTATCGGCTGGCC TAGGC  
GTCTTGCTGGGGCTTGGGTGTGTGTGCCATATGAACATTGACAAGAATGAGGAGAAAAGGACACTTATACTG  
AAAATGTTTGTCAAAAAC TTTATAGACCAGGCGGCACTAGACGAGTTGGATAAACTGGAGCCGAAAAAATAATC  
CTCTCATTTGTTGGAGGTATCCAAAC TGCACAAACCCGATTAGAGCAATCATGATTTTGTACAGGGTGTACTAC  
AAGGGAGAAACTTTACAGAAGCTTTGTCTAAGATGGCCGCAAGTCTCTCATTGTGATGGTCATAGTCGAGTTC  
CTGGAATTGACAGGCCAAAACCAAGGAGGTATATAGATCTTAGTGCTAATTTGCTGACCTTTCTCTCGAGAAA  
CTAAAAAATGACTAACCTCGCCATCGGGGAAGCTAGAAAGGTCTTGTCTCCCATCCATACTTGTACTGTGAA  
ACCTGGCAGTCTGACGCCAGAA TCAAGGCCCTGAATCCTACGACCAAGTGGTAGTGGAATGCAAAATGTGGCGCT  
TCAGCGAGGTATTCCTTCCGCGATGGAGTTCATGAGATATTGGAAGAAAAAGGACTAATTTGGTGCAAGAACTTC  
TTCTTATGGGGACCAACTTCCACAATCCGATCCAAAAAGGATGACATTCATGAATACGCCAAGCAAAAAAG

# ES 2 778 649 T3

TGTCCTGTTATCATAAATTGGTGAAGACATAAACCCTCGGCAAATATGGCATAATATCAAATTTGGCCATAGGCCCT  
GATGGAGGGAGGTTAATAAGGGGTACCACCCACGCTACTATCAGTAGGGAGGAATTGCTGGAAATCCTAACAGCC  
CCAAGCCAAGTGGCCATAGGCAAGGTCAAGCTAACCGATTACTGTAATCAAAAAGGAATAATAGACAGGAAATTG  
GCCGTACTTGAAGGTGACAAAAACATTTTTGGAAAGCACACCGTGGATCCAAAATCACAGACCAACTCACTATT  
GAGAATCTGACAGATGATTTGGGGTCAGAAATCAGGGACATCACATGGGAGCTGTACACAGGTGGAACGTGCACC  
GTAAGGGGGTGTCCCTTAGATCATGCGCACCAGGTCATAGAATAAGGCTATGGTCTTGTGTGATTGCACGTGAT  
GTGCTTAGCCCTGTTACCTAATAAACGGCAGGAGACCATCCCCATTTGACGTCGCGGAAGGTTATGAATGTCAC  
CACCGGAAGCCCGAGCGACGTATGAAGACCTAGAAATGGAGGAAATACTAAAGAGACGAGTCCCTGTCTACGAT  
CCTCTGTGTTTGTGTTGACACTGATAGTAACTGTACTCTCCGACACCTACTACTTGAAGAAGATCAAGAGGAC  
TTTGAGTACGCATTGAGATGCTGGGGCTCGGGGTTTATGTAGCAGACGGGCTGTCACTTCCCCCGGACATA  
AGAATACACCATAGTTCGGTATTACTACTGCTGACACCTGGAGTAAACTCAGAGTTGCCCTTACAGTACATACGT  
TGTTACCCCTCATCAGGCAGAGGTGGACATCTACATTAGGAGTCAGCTTTTGGAGGAGGAAGACACTGCTACGGAG  
GTGAAGGCTCCAGGAAGATGGTGTGATGAAGGATGGGCGATGCGGTAATAGAGGATGAGGATACATCGTCCACA  
ACAGAATCAATACCCCACTAGAAGAGGAGGAAGGGGGCAAGGCCAATCACCTATGTGGTCATAAGGGGATTA  
CAAGAAGAAAGATACGCCAGCCATCTTAAACTA (SEQ ID NO:19)

ADHQLRQLLETGRDKAIDFLKGIREFTSGAINSPKALSWEKIYQYLKKHQGEI ISSAAWGSATALHDSIKSRLG  
DEVATAVILKYLAFGERELSLTRQVLIDIIVYYIVNKPRFEGDDYAKRKRRLVIEVLMGALATYAVSNFVGV  
SINKILQPI SDYLPYATATLAFRLPTFMESAVVASSIYRAFLSIKHAENRSLVTQVASAALVEMGLTFVSAGLG  
VLLGLGLCVLHMNIDKNEEKRTLILKMFVKNFIDQAALDELDKLEPEKIILSLLEGIQTCTNP IRAIMILYRVYY  
KGETFTEALSKMAGKSLIVMVIVEFLELTGQTQGGYIDL SANLLTFLEKLLKMTNLAIGEARVLLPIPYLYCE  
TWQSDARIKAPESYDQVVVECKCGASARYSFRDGVHEILEEKRTNWCKNFFLWGNFHNPDPKRMTFYEYQAKK  
CEVIIIGEDITFGKYGIYIKFHRPDGRLIRGTTTHATISREELEILTAPSQVAIGVKVLTDCYNQKGIIDRKL  
AVLEGDKIHFVKAHRGSKITDQLTIENLTDLDLSEIRDI TWELYTGGTCTVKGVSLRSCAPGHRTKAMVLCDCD  
VLSPLYLINGRRPSPFDVAEGYECHHRKPRATYEDLEMEELKRRVPVYDPLCLFDTD SKLLPDPDYYLEEDQED  
FEYALRCWGLGVYVADGPVTSPPDIRIHHSSVLLLLTPGVNSELPLQYIRCYPHQAEVDIYIRSQLEEDTATE  
VEGSQEDGDEMGDAVIEDEDTSSTTESIPPLEEEEGGEEPITYVVIRGLQEERYASHLKL (SEQ ID  
NO:20)

- 5 RdRp: El gen que codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN que consiste en 751 aminoácidos se encuentra en las posiciones 9030 a 11285 de SEQ ID NO:1.

AATGACTGGATCAGTGAACATTTTCAGAGCCACACAGAGTCCAAATTATGCTAGATGGGACAGTGAAGTGCACA  
ATAAAAGAGGGCAAAGTGAACATTTGTTGGGGTCTATAGAATAGAAAACCTCCCTGGAAGCAATGTTTAAAGAG  
ACCATAGCTGACCTCCCGTAGCTACCCAACCGCCCCAGGGGCCAGTCTATACGGCTAAAGAGCTGGCCCAAGGG  
AACATCGCCCCGGTCCAACCTGCAGCGAATTATTACGGAATGATAGAGGGGAGAGGCGACCCAATGACGGCATT  
GAAGCCTTATCAGTCTTGGCGTCAAAAAAGTCTTAGCCAAGGACGTGAAGGTGAACACCCGAGGGCGCAGGTT  
TTTTTAAATAAAGTCAAGGAAATTGCTGAGGTGAGAGCGTCGGAAGTACATTAATAATGCTTACCGATACTTGGC  
AAAGTAAATGGGAGGAAATTGATTAGAGAGGAAACCAACATCCCCAACCAAGGTTGGCATCAATAATGACCTCA  
ATAGGAATTAGACTAGAAAACCTGCCAGTGGTTAGAGCAACACTCCGGCTCTAAGTTCAGACAGTCAATCTTA  
GAAAAAATGGATAAGTATGAAATGAACAAGTCCAGGGTTACATGAAAAGATGTGGGCAGCGTTCCTGGCAACT

## ES 2 778 649 T3

GCCAGGCAAGATTTAAGAAATACCTATGAGGAAGTAACTTATCTTGAATTAGAGGCCGGAATCAATCGGAAAGGA  
GCCCCAGTTTTCTTTGAAAAAGAAAGCTCAATAGGAGAAGTGC TGGAAAAAAGAAAAAATTGACGTCACAATC  
CAAGAGATTGAAAAAGCAACCCTTATACTATGAAACAGCCATGCCAAAAATGAGAAAAAGAGATGTGCTTGAT  
GATTGGTTGTCAGAGGATTTTCGTCACTTATAAGAAACCACGTGTGATACAGTACCCTGAGGCAGTCACCCGGTTG  
GCCATCACAAAAATAATGTATAAGTGGGTGAAGCAAAAGCCTATAGTGATTCCCGGTTATGAGGGAAAAACCCCG  
ATCTTTGAAATATTTGAAAAAGTCAGTGCAGATTGGGCTCAGTTCAAAAAATCCGGTAGCCGTCAGCTTCGACACC  
AGAGCCTGGGACACTCAAGTAAACAAGAGAAGACCTCAGGCTGGTAGGGCGGATACAGAAATACTATTACAAAAA  
AAATATTGGAAGTTCATTGACAATTTGACAGCCATGATGGAGGAAGTGCCTGTAATCACTGTAGAAGGAGATATG  
TTCCTCAGAGTTGGACAGCGGGATCCGGACAGCCTGATACCTCAGCAGGCAATTCATGCTAAATGTGCTGACT  
ATGTTGGTAGCTTTCTCTGAATCCACAAATCTGCCATAGCGGCTGCCTGGAAGGCCTGTGGATCCACGCTGT  
GGTGACGACGGTTTCTTAATCACAGAATCGGAATTAGGGAGGAAGTTTGCTGAAAAAGGTGTTCTCTGTAGCT  
GCATTTGGCAAACCCCAAAAAATTACAGAGGGAGCGAGCCTAAAGGTAACCAGCAACTTTGACGGAATAGAGTTT  
TGTAGTCATACCCCTATCAGAGTCCAAACACCAACATCAGGTGGATGCCAGCGAGACCAACAGCAACAATCCTA  
GGCAAAATGAGTACCAGGCTGGGTGAGGGTGCCACCAGTCCGGGAGAAGAAATACGAAAAACAGGTGCCATTCGCA  
TATCTACTGATGTACCCTGGAACCCGCTGGTCAGGAGAATCAGCCTCCTATTGTTATCGACTACTGACCCAAATG  
GGGAAAGAGGAAACCCCATGCTCCGATGAGGGGTGAAGTATGTTGGGGACCCATCGCTGCATACAGGGATGTA  
TGGGGGCACAAATTAGAGGATGTAGGCCATGTTGATCAACCGCAGTTATCCCGGATGAAC TATAGCATGACTTAC  
TTAGGGATTTGGAAACCAAGACAAGTCAGCGGCTAGTCGAACAGTGTGTCGCTGGCCGAGAAAAGCAATTGT  
GTGGTACGTGCTGACTCCCTGATAAAGAAAAAGGTCAAGATCACTTATGACCCGGGGATAGGAGTGGCTCAGGTC  
ATTCGTAGGTGGGAAGAGCTTGAGTGGACCAGAAGGAAACCTGAACTCACCAATGTAATTGTAGAAGATGATATC  
TTCCTAGTCTGTGGAAGAGATTTTCAAAGTACATTTTTTCAGAAAAATGAAGTTCATGCAGAGAATGTTCCGCCCT  
TATTAA (SEQ ID NO:21)

NDWISENISEPHRVQIMLDGTVRVTIKEGKVKHLFGVYRIENSLEAMFKETIADLPVATQPQGPVYAKELAQG  
NIAPVQPAANYGMIEGRGDPMTAFEALSVLRSQKVLAKDVKNVTRRAQVFLNKVRRIAEVRASELTLKCLPILG  
KVNGRKLIREETNIPNQLASIMTSIGIRLEKLPVVRANTS GSKFRQSI LEKMDKYENEQVPLHEKMWAAFLAT  
ARQDLRNTYEEVTYLELEAGINRKGAPGFFEKESIGEVELEKKEIDVTIQEIEKGNHLYETAMPKNEKRDVLD  
DWLSEDFVTYKPRVIQYPEAVTRLAITKIMYKWKQKPIVPGYEGKTIPEIFEKVSADWAQFKNPVAVSFDT  
RAWDTQVTREDLRLVGRIQKYYKWKYKFI DNLTAMMEVVPVITVEGDMFLRVGQRGSGQPDTSAGNSMLNVLT  
MLVAFSESTNLP IAAAWKACRIHVCGDDGFLITESELGRKFAEKGVPLLA AFGKPKITEGASLKVTSNFDGIEF  
CSHTPIRVQTPNIRWMPARPTATILGKMSTRLGEGATRS GEEYEKQVAFAYLLMPWNPLVRRIS LLLLSTTDP  
GKEETPCSDGKVKYVGDPIAAYRDVWGHKLEDVGHVDQPLSRMNYSMYLG IWKPKTSQR LVEQCRLAEKSN  
VVRADSLIKKKVKITYPDGIQVIRRWELEWTRRPELTVNIVEDDIFLVLWKRFSKYIFQMKFMQRMFAP  
Y (SEQ ID NO:22)

5 En una realización, el pestivirus según la invención es un mutante pestiviral, que comprende, en particular, en comparación con el genoma de un pestivirus silvestre, una mutación en un gen que codifica una proteína de dicho virus.

10 En una realización preferida, el pestivirus según la invención comprende una mutación en el gen que codifica proteínas Npro, de la cápside, Erns, E1, E2, NS2-3, helicasa, NS4B, NS5A o RdRp de dicho virus. Así, la invención trata preferiblemente de un pestivirus que exhibe una aptitud viral reducida como resultado de una mutación en el gen que codifica la poliproteína pestiviral, en donde dicha mutación es preferiblemente una mutación como la mencionada posteriormente en la presente.

Preferiblemente, la mutación, según se describe en la presente, comprende o consiste en una o más mutaciones puntuales y/o una o más eliminaciones genómicas y/o una o más inserciones.

15 La composición inmunogénica según se usa en la presente se refiere además a una composición que comprende cualquiera de las proteínas pestivirales descritas en la presente. Según una realización adicional, esta composición inmunogénica comprende además al menos una porción de un vector viral que expresa dicha poliproteína pestiviral y específicamente la proteína E2, preferiblemente de un baculovirus recombinante. Por otra parte, la composición inmunogénica puede comprender i) cualquiera de las proteínas pestivirales descritas anteriormente, preferiblemente en concentraciones descritas anteriormente, ii) al menos una porción del vector viral que expresa dicha poliproteína pestiviral de proteínas procesadas dentro de la poliproteína, preferiblemente de un baculovirus recombinante, y iii) una porción del sobrenadante del cultivo celular.

20

Según una realización adicional, la presente invención también se refiere a un vector que comprende cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico según se describen en la presente. En otras palabras, la presente invención se refiere a un vector, que incluye la secuencia codificante de cualquiera de estas poliproteínas pestivirales o parte de las mismas. Preferiblemente, dicho vector es un vector de expresión, que permite la expresión de cualquiera de estas poliproteínas pestivirales o parte de la proteína. Vectores según la invención son aquellos que son adecuados para la transfección o infección de células bacterianas, de levadura o animales, *in vitro* o *in vivo*.

Las presentes vacunas incluyen típicamente pestivirus inactivados o atenuados formulados con un portador farmacéuticamente aceptable. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen comúnmente soluciones (cuando son hidrosolubles) o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Deseablemente, la formulación debe ser estéril y fluida hasta el punto de que exista una fácil inyectabilidad. La forma de dosificación debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y típicamente se conserva frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Un posible portador es una solución salina fisiológica. La fluidez apropiada de la solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede realizar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal (etilmercuritiosalicilato sódico), deomicina, gentamicina y similares. En muchos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables, si se desea, se puede realizar mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

El volumen de una sola dosis de la vacuna de esta invención puede variar, peso generalmente estará dentro de los intervalos comúnmente empleados en vacunas convencionales. El volumen de una sola dosis está preferiblemente entre aproximadamente 0,1 ml y aproximadamente 3 ml, preferiblemente entre aproximadamente 0,2 ml y aproximadamente 1,5 ml, más preferiblemente entre aproximadamente 0,2 ml y aproximadamente 0,5 ml a las concentraciones de conjugado y adyuvante apuntadas anteriormente.

Las composiciones vacunales de la invención se pueden administrar mediante cualquier medio conveniente conocido en la especialidad, p. ej., intramuscularmente, subcutáneamente, intravenosamente, oralmente, intraarterialmente, intranasalmente (p. ej., con o sin inhalación), intracardiácamente, intraespinalmente, intratorácicamente, intraperitonealmente, intraventricularmente, sublingualmente, transdérmicamente y/o a través de inhalación.

El sujeto al que se administra la composición es preferiblemente un animal, incluyendo pero no limitado a cerdos, vacas, caballos, ovejas, aves de corral (p. ej., pollos), cabras, gatos, perros, hámsteres, ratones y ratas. Lo más preferiblemente, el mamífero es un cerdo, más preferiblemente, una cerda adulta, una cerda joven o un lechón. En algunas realizaciones, la cerda adulta o la cerda joven puede estar preñada.

Las formulaciones de la invención comprende una cantidad inmunizante eficaz de una o más composiciones inmunogénicas y un vehículo fisiológicamente aceptable. Las vacunas comprenden una cantidad inmunizante eficaz de una o más composiciones inmunogénicas y un vehículo fisiológicamente aceptable. La formulación se debe adaptar al modo de administración.

La composición inmunogénica, si se desea, también puede contener pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes o agentes tamponadores del pH. La composición inmunogénica puede ser una solución líquida, una suspensión, una emulsión, un comprimido, una píldora, una cápsula, una formulación de liberación sostenida o un polvo. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como clases farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, etc. Vías preferidas de administración incluyen, pero no se limitan a, intranasal, oral, intradérmica e intramuscular. Es deseable la administración intramuscularmente o intravaginalmente, lo más preferiblemente en una sola dosis. El experto identificará que las composiciones de la invención también se pueden administrar en una, dos o más dosis, así como mediante otras vías de administración. Por ejemplo, estas otras vías incluyen subcutáneamente, intracutáneamente, intravenosamente, intravascularmente, intraarterialmente, intraperitonealmente, intratecalmente, intratraquealmente, intracutáneamente, intracardiácamente, intralobularmente, intramedularmente o intrapulmonarmente. Dependiendo de la duración y la eficacia deseadas del tratamiento, las composiciones según la invención se pueden administrar una o varias veces, también intermitentemente, a modo de ejemplo diariamente durante varios días, semanas o meses y en diferentes dosificaciones.

Las realizaciones de la invención también incluyen un método para proteger a un lechón contra enfermedades asociadas con pestivirus, que comprende administrar a una cerda adulta o una cerda joven preñada cualquiera de las vacunas atenuadas descritas en la presente. Por ejemplo, la vacuna administrada comprende uno o más antígenos de pestivirus.

Así, según un aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir el porcentaje de infecciones pestivirales en una piara de lechones que comprende la etapa de administrar a cerdas adultas o cerdas jóvenes preñadas una cantidad eficaz de antígeno pestiviral inactivado o atenuado o una composición inmunogénica que

comprende antígeno pestiviral, en donde el antígeno pestiviral es un pestivirus inactivado, un pestivirus atenuado o una vacuna subunitaria.

En una realización, el pestivirus de la invención es cualquier pestivirus codificado por o que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o 2; secuencia que es al menos 99% idéntica a la SEQ ID NO:1 o 2; y/o pestivirus que es codificado por una secuencia de ácido nucleico al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 1 o 2.

En otra realización, el método incluye la administración de una vacuna que comprende uno o más componentes inmunogénicos seleccionados del grupo que consiste en un pestivirus que es codificado por o comprende la secuencia de SEQ ID NO:1; secuencia que es al menos 99% idéntica a la SEQ ID NO:2; cuya poliproteína está codificada por las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o 2; y/o poliproteína pestiviral que está codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 1 o 2.

Los compuestos descritos en la presente se pueden administrar a un sujeto en dosis terapéuticamente eficaces para tratar enfermedades asociadas con pestivirus. La dosificación dependerá del hospedador que reciba la vacuna así como de factores tales como el tamaño, el peso y la edad del hospedador.

La inmunogenicidad de una composición se puede determinar al comprobar la respuesta inmunitaria de sujetos de prueba después de la inmunización con la composición mediante el uso de cualquier inmunoensayo conocido en la especialidad. La generación de una respuesta humoral (anticuerpos) y/o la inmunidad mediada celularmente se pueden tomar como una indicación de una respuesta inmunitaria. Sujetos de prueba pueden incluir animales tales como cerdos, ratones, hámsteres, perros, gatos, conejos, vacas, caballos, ovejas y aves de corral (p. ej., pollos, patos, ocas y pavos).

La respuesta inmunitaria de los sujetos de prueba se puede analizar mediante diversos enfoques tales como: la reactividad del suero inmunitario resultante al conjugado inmunogénico, según se ensaya mediante técnicas conocidas, p. ej., ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), inmunotransferencias, inmunoprecipitaciones, etc.; o mediante la protección de hospedadores inmunizados frente a la infección por el patógeno y/o la atenuación de síntomas debidos a infección por el patógeno en hospedadores inmunizados según se determina mediante cualquier método conocido en la especialidad, para ensayar los niveles de un agente patógeno infeccioso, p. ej., los niveles bacterianos (por ejemplo, mediante el cultivo de una muestra procedente de un sujeto) u otra técnica conocida en la especialidad. Los niveles del agente patógeno infeccioso también se pueden determinar al medir los niveles del antígeno contra el que se dirigía la inmunoglobulina. Una disminución en los niveles del agente patógeno infeccioso o una mejora de los síntomas de la enfermedad infecciosa indica que la composición es eficaz.

El agente terapéutico de la invención se puede probar *in vitro* con respecto a la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes del uso *in vivo* en animales o seres humanos. Por ejemplo, ensayos *in vitro* que se pueden usar para determinar si está indicada la administración de un agente terapéutico específico incluyen ensayos de cultivo celular *in vitro* en los que células apropiadas procedentes de una línea celular o células cultivadas a partir de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno particular se exponen a o se les administra de otro modo un agente terapéutico, y se observa el efecto del agente terapéutico sobre las células.

Alternativamente, el agente terapéutico se puede ensayar al poner en contacto el agente terapéutico con células (bien cultivadas a partir de un sujeto o bien a partir de una línea celular cultivada) que sean sensibles a una infección por el agente patógeno infeccioso pero que no estén infectadas con el agente patógeno infeccioso, exponer las células al agente patógeno infeccioso y a continuación determinar si el grado de infección de las células puestas en contacto con el agente terapéutico era inferior que el grado de infección de células no puestas en contacto con el agente terapéutico. La infección de células con un agente patógeno infeccioso se puede ensayar mediante cualquier método conocido en la especialidad.

Además, el agente terapéutico se puede evaluar al medir el nivel de la molécula contra la que se dirige el anticuerpo en el modelo animal o el sujeto humano a intervalos de tiempo adecuados antes, durante o después de la terapia. Cualquier cambio o ausencia de cambio en la cantidad de la molécula se puede identificar y correlacionar con el efecto del tratamiento sobre el sujeto. El nivel de la molécula se puede determinar mediante cualquier método conocido en la especialidad.

Después de la vacunación de un animal con una vacuna o composición inmunogénica de pestivirus usando los métodos y las composiciones de la presente invención, cualquier ensayo de unión conocido en la especialidad se puede usar para evaluar la unión entre el anticuerpo resultante y la molécula particular. Estos ensayos también se pueden realizar para seleccionar anticuerpos que exhiben una afinidad o especificidad superior para el antígeno particular.

En general, la atenuación del virus se puede generar a partir de aislados virales patógenos mediante el pase repetido en células hospedadoras adecuadas que son permisivas al virus hasta que el virus muestre las propiedades deseadas (documentos WO 92/21375, WO 93/06211, WO93/03760, WO 93/07898, WO 96/36356, EP 0 676 467, EP 0 732 340, EP 0 835 930). Alternativamente, se puede generar mediante remanipulación genética a través del uso de un clon infeccioso, normalmente un transcrito de ADN complementario de longitud total del genoma viral (documentos WO 98/18933, EP 1 018 557, WO 03/062407, Nielsen y cols., J Virol 2003, 77:3702-3711). Adicionalmente, el virus se puede someter a pases bajo condiciones fisiológicas no naturales que incluyen, pero no se limitan a, temperatura modificada, células procedentes de especies no hospedadoras o en presencia de mutágenos.

La invención se extiende a cepas pestivirales que se derivan de las cepas a través de propagación o multiplicación en una forma idéntica o divergente, en particular descendientes que poseen las características esenciales de las cepas depositadas. Tras la propagación continuada, las cepas pueden adquirir mutaciones, la mayoría de las cuales no alteran las propiedades de estas cepas significativamente.

5 En otro aspecto, la presente invención contempla la preparación y el aislamiento de una prole o descendencia de una SEQ ID NO:1 o 2 pestiviral. Por lo tanto, la invención se extiende a cepas pestivirales que se derivan de las cepas identificadas a través de propagación o multiplicación en una forma idéntica o divergente, en particular descendientes que poseen las características esenciales de las cepas identificadas. Tras la propagación continuada, las cepas pueden adquirir mutaciones la mayoría de las cuales no alterarán las propiedades de estas cepas significativamente.

10 Los aislados de la invención también se pueden modificar adicionalmente para impartir a los mismos propiedades deseables adicionales. Esto se puede conseguir mediante técnicas de propagación y selección clásicas, como propagación continuada en células hospedadoras adecuadas para extender el fenotipo atenuado. Alternativamente, los aislados se pueden modificar genéticamente mediante mutación dirigida de la secuencia de ácido nucleico del genoma de estas cepas mediante técnicas de manipulación genética adecuadas.

15 Técnicas recombinantes para preparar secuencias modificadas son muy conocidas por los expertos en la especialidad y habitualmente emplean la construcción de copias de ADN complementario de longitud completa (clones infecciosos) del genoma viral que a continuación se pueden modificar mediante métodos de recombinación y manipulación de ADN (p. ej., como mutagénesis dirigida localmente, etc.). De este modo, por ejemplo, se pueden modificar sitios antigénicos o propiedades enzimáticas de proteínas virales.

20 Preferiblemente, la invención abarca secuencias de ácido nucleico pestivirales que comparten al menos 95% de homología de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 ya que estos virus probablemente sean eficaces para conferir inmunidad a animales vacunados con virus atenuados que contienen estas secuencias homólogas. La secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 o 2 es la secuencia de longitud completa del pestivirus atenuado y tiene una secuencia de longitud completa de aproximadamente 11.550 bases.

25 Las cepas pestivirales de la presente invención que son adecuadas para vacunas de la invención se pueden desarrollar y recoger mediante métodos conocidos en la especialidad, p. ej., mediante propagación en células hospedadoras adecuadas.

En particular, la vacuna, según se menciona en la presente, es una vacuna viva y/o una vacuna viva modificada-vacuna atenuada. Las cepas del pestivirus según la invención se pueden desarrollar y recoger mediante métodos conocidos en la especialidad, p. ej., mediante propagación en células adecuadas. Las vacunas vivas modificadas (MLV) se formulan típicamente para permitir la administración de  $10^1$  a  $10^7$  partículas virales por dosis, preferiblemente de  $10^3$  a  $10^6$  partículas por dosis, y más preferiblemente de  $10^4$  a  $10^6$  partículas por dosis ( $4,0-6,0 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>).

30 Una realización de la invención incluye un método para producir una vacuna pestiviral que comprende: (a) inocular células con el pestivirus; (b) incubar las células inoculadas; (c) recoger el pestivirus de las células incubadas. En una realización preferida, el método comprende un pestivirus que comprende una secuencia que es codificada por o comprende la secuencia de SEQ ID NO:1 o 2; una proteína que es codificada por secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO:1; y/o una poliproteína que es codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO:2. El método puede comprender además añadir un adyuvante a la vacunal pestiviral, preferiblemente, el adyuvante es un adyuvante basado en la emulsión de aceite en agua EMULSIGEN®.

35 Otra realización de la invención incluye un método para producir una vacuna recombinante que comprende: expresar el uno o más antígenos de pestivirus en una célula hospedadora; y recoger el uno o más antígenos de células pestivirales. En una de estas realizaciones, el método puede incluir uno o más antígenos que comprenden un ácido nucleico aislado que codifica un antígeno de proteína pestiviral, en donde el polipéptido pestiviral recombinante tiene al menos 90% de homología con SEQ ID NO: 1 o 2; un vector que comprende el ácido nucleico aislado de a); la proteína pestiviral recombinante codificada por el ácido nucleico de a); y cualquiera de sus combinaciones. En una realización ejemplar, uno o más antígenos de pestivirus son expresados por un vector baculoviral recombinante. El método puede incluir uno o más antígenos de pestivirus expresados en células de insecto. Una realización comprende además la adición de un adyuvante a la vacuna pestiviral, preferiblemente en donde el adyuvante es un adyuvante basado en la emulsión de aceite en agua EMULSIGEN®.

40 Anticuerpos o sus porciones de unión, resultantes del uso de péptidos pestivirales de la presente invención, son útiles para detectar en una muestra la presencia de pestivirus. Este método de detección comprende las etapas de proporcionar un anticuerpo aislado o una de sus porciones de unión producidos contra un péptido pestiviral de la invención, añadir al anticuerpo aislado o su porción de unión una muestra que se sospecha que contiene una cantidad de pestivirus y detectar la presencia de un complejo que comprende el anticuerpo aislado o su porción de unión unidos al pestivirus.

45 Los anticuerpos o sus porciones de unión de la presente invención también son útiles para detectar en una muestra la presencia de un péptido pestiviral. Este método de detección comprende las etapas de proporcionar un anticuerpo aislado o su porción de unión producidos contra un péptido pestiviral, añadir al anticuerpo aislado o su porción de

unión una muestra que se sospecha que contiene una cantidad del péptido pestiviral, y detectar la presencia de un complejo que comprende el anticuerpo aislado o su porción de unión unidos al péptido pestiviral.

5 Inmunoglobulinas, particularmente anticuerpos (y sus fragmentos funcionalmente activos) que se unen a una molécula específica que es un miembro de un par de unión se pueden usar como agentes de diagnóstico y agentes de pronóstico, según se describe en la presente. En diversas realizaciones, la presente invención proporciona la medida de un miembro del par de unión, y los usos de estas medidas en aplicaciones clínicas. Las inmunoglobulinas se pueden usar en la presente invención, por ejemplo, en la detección de un antígeno en una muestra biológica, con lo que los sujetos se pueden probar con respecto a niveles aberrantes de la molécula a la que se une la inmunoglobulina, y/o con respecto a la presencia de formas anormales de estas moléculas. Por "niveles aberrantes" se entiende incrementados o reducidos con relación al presente o un nivel estándar que representa el presente, en una muestra análoga procedente de una porción del cuerpo o de un sujeto que no tiene la enfermedad. Los anticuerpos de esta invención también se pueden incluir como un reactivo en un estuche para el uso en una técnica de diagnóstico o pronóstico.S+-

15 En un aspecto, un anticuerpo de la invención que se une inmuno-específicamente a un péptido pestiviral se puede usar para diagnosticar, pronosticar o cribar una infección pestiviral.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un método para diagnosticar o cribar la presencia de una infección pestiviral o inmunidad a la misma, que comprende medir en un sujeto el nivel de unión inmuno-específica de un anticuerpo a una muestra derivada del sujeto, en el que el anticuerpo se une inmuno-específicamente a un péptido pestiviral en el que un incremento en el nivel de dicha unión inmuno-específica, con relación al nivel de dicha unión inmuno-específica en una muestra análoga procedente de un sujeto que no tiene el agente patógeno infeccioso, indica la presencia de pestivirus.

25 Ejemplos de ensayos adecuados para detectar la presencia de péptidos pestivirales o sus antagonistas incluyen, pero no se limitan a, ELISA, radioinmunoensayos, un ensayo de reacción de precipitación con difusión en gel, un ensayo de inmunodifusión, un ensayo de aglutinación, un inmunoensayo fluorescente, un inmunoensayo de proteína A o un ensayo de inmunoelectroforesis.

Los inmunoensayos para la molécula particular comprenderán típicamente incubar una muestra, tal como un fluido biológico, un extracto tisular, células recientemente recogidas o lisadas de células cultivadas, en presencia de un anticuerpo marcado detectablemente y detectar el anticuerpo unido mediante cualquiera de un número de técnicas bien conocidas en la especialidad.

30 La actividad de unión de un anticuerpo dado se puede determinar según métodos muy conocidos. Los expertos en la especialidad serán capaces de determinar condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación al emplear experimentación común.

35 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a estuches de diagnóstico para la detección o medida de pestivirus. Se proporcionan estuches para uso diagnóstico, que comprenden uno o más recipientes, un anticuerpo anti-péptido pestiviral y, opcionalmente, un socio de unión marcado para el anticuerpo. Alternativamente, el anticuerpo anti-péptido pestiviral se puede marcar (con un marcador detectable, p. ej., un resto quimioluminescente, enzimático, fluorescente o radiactivo). Según esto, la presente invención proporciona un estuche de diagnóstico que comprende un anticuerpo anti-péptido pestiviral y una inmunoglobulina de control. En una realización específica, uno de los compuestos precedentes del recipiente puede estar marcado detectablemente. Opcionalmente, un estuche puede comprender en un recipiente una cantidad predeterminada de un péptido pestiviral reconocido por el anticuerpo del estuche, para el uso como un patrón o control.

Otra realización más de la invención incluye un estuche para vacunar a una cerda adulta o una cerda joven preñada contra enfermedades asociadas con pestivirus que comprende: un dosificador capaz de administrar una vacuna a una cerda adulta o cerda joven preñada; y una vacuna pestiviral según se describe en la presente.

45 Si se desea, las composiciones se pueden presentar en un envase o dispositivo dosificador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El estuche puede comprender, por ejemplo, una lámina metálica o plástica, tal como un blíster. El estuche o el dispositivo dosificador puede estar acompañado por instrucciones para la administración, preferiblemente para la administración a un mamífero, especialmente un cerdo. Asociada con este recipiente o recipientes puede haber una notificación en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, notificación que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, el uso o la venta para la administración a seres humanos.

55 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la especialidad a la que pertenece esta invención en el momento de la presentación. El significado y el alcance de los términos debe ser claro; sin embargo, en caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en la presente toman preferencia sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca. Además, a menos que se requiera otra cosa por el contexto, los términos singulares incluirán los plurales y los términos plurales incluirán los singulares. En la presente, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique otra cosa. Por otra parte, el uso del término "que incluye", así como otras formas tales

como "incluye" e "incluido", no es limitativo. Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la presente se incorporan mediante referencia en la presente.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante, química de proteínas e inmunología, que están dentro de la experiencia de la especialidad. Estas técnicas se explican a fondo en la bibliografía. Véase, p. ej., Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. I, II y III, Segunda Edición (1989); *DNA Cloning*, Vols. 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 y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Protein purification methods - a practical approach* (E.L.V. Harris y S. Angal, eds., IRL Press at Oxford University Press); y *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

Se ha de entender que esta invención no se limita a un ADN particular, las secuencias polipeptídicas o los parámetros de procesamiento, como tales, pueden variar. También se entiende que la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir realizaciones particulares de la invención solamente, y no está destinada a ser limitativa. Se debe apuntar que, según se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno(a)" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contenido dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "un antígeno" incluye una mezcla de dos o más antígenos, la referencia a "un excipiente" incluye mezclas de dos o más excipientes, y similares.

Una "composición inmunogénica o inmunológica o vacuna", todos usados intercambiamente en esta solicitud, se refiere a una composición de interés que comprende al menos un pestivirus de la presente invención o una de sus porciones inmunogénicas, 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 inmunogénica induce una respuesta inmunitaria y, más preferiblemente, confiere inmunidad protectora contra uno o más signos clínicos de una infección CT.

Un "inmunógeno" o "antígeno", según se usa en la presente, se refiere a un polipéptido o una proteína que provoca una respuesta inmunológica según se describe en la presente. Esto incluye respuestas inmunitarias celulares y/o humorales. Dependiendo de la función pretendida de la composición, se pueden incluir uno o más antígenos. Una proteína o un polipéptido pestiviral "inmunogénico" incluye la secuencia de longitud completa de cualquiera de los pestivirus identificados en la presente o sus análogos o fragmentos inmunogénicos. El término "fragmento inmunogénico" o "porción inmunogénica", usados intercambiamente en la solicitud, se refiere a un fragmento o una forma truncada y/o sustituida de un pestivirus que incluye uno o más epítomos y así provoca la respuesta inmunológica descrita en la presente. En general, estas formas o fragmentos truncados y/o sustituidos comprenderán al menos seis aminoácidos contiguos de la proteína pestiviral de longitud completa. Más preferiblemente, las formas o fragmentos truncados o sustituidos tendrán al menos 10, más preferiblemente al menos 15, y aún más preferiblemente al menos 19 aminoácidos contiguos de la proteína pestiviral de longitud completa. Estos fragmentos se pueden identificar usando cualquier número de técnicas cartográficas epitópicas, bien conocidas en la especialidad. Véase, p. ej., *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, se pueden determinar epítomos lineales al sintetizar simultáneamente grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a porciones de la molécula proteínica, y hacer reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos todavía están ligados a los soportes. Estas técnicas son conocidas y se describen en la especialidad, véanse p. ej., la Patente de EE. UU. Nº 4.708.871; Geysen y cols. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; y Geysen y cols. (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715. De forma similar, se identifican fácilmente epítomos conformacionales al determinar la conformación espacial de aminoácidos tal como mediante, p. ej., cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase *Epitope Mapping Protocols*, anteriormente. También se incluyen dentro de la definición antígenos sintéticos, por ejemplo, poliepítomos, epítomos de flanqueo y otros antígenos recombinantes o derivados sintéticamente. Véanse, p. ej., Bergmann y cols. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:2777-2781; Bergmann y cols. (1996), *J. Immunol.* 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), *Immunol. and Cell Biol.* 75:402-408; y Gardner y cols., (1998) 12th World AIDS Conference, Ginebra, Suiza, 28 de junio-3 de julio de 1998. (Cuyas enseñanzas y contenido se incorporan todos mediante referencia en la presente.)

El término "vacuna" según se usa en la presente se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un componente inmunológicamente activo que induce una respuesta inmunológica en un animal y posiblemente pero no necesariamente uno o más componentes adicionales que potencian la actividad inmunológica del componente activo. Una vacuna también puede comprender adicionalmente componentes típicos de las composiciones farmacéuticas. A modo de distinción, el componente inmunológicamente activo de una vacuna puede comprender partículas virales completas bien en su forma original o bien como partículas atenuadas en una llamada vacuna viva modificada (MLV) o partículas inactivadas por métodos apropiados en una llamada vacuna destruida (KV). En otra forma, el componente inmunológicamente activo de una vacuna puede comprender elementos apropiados de los organismos (vacunas subunitarias) con lo que estos elementos se generan bien al destruir la partícula entera o bien los cultivos en desarrollo que contienen estas partículas y opcionalmente etapas de purificación posteriores que dan la estructura o las estructuras deseadas o mediante procedimientos sintéticos que incluyen una manipulación apropiada mediante el uso de un sistema adecuado basado en, por ejemplo, bacterias, insectos, mamíferos u otras especies más opcionalmente procedimientos de aislamiento y purificación posteriores o mediante la inducción de los

procedimientos sintéticos en el animal que necesita una vacuna mediante la incorporación directa de material genético usando composiciones farmacéuticas adecuadas (vacunación con polinucleótidos). Una vacuna puede comprender uno o simultáneamente más de uno de los elementos descritos anteriormente. El término "vacuna" según se entiende en la presente es una vacuna atenuada viva modificada para uso veterinario que comprende sustancias antigénicas y se administra con el propósito de inducir una inmunidad específica y activa contra una enfermedad provocada por una infección pestiviral. El pestivirus inactivado o atenuado, en particular el pestivirus atenuado vivo inactivado o modificado según se describe en la presente, confiere inmunidad activa que se puede transferir pasivamente a través de anticuerpos maternos contra los inmunógenos que contiene y a veces también contra organismos antigénicamente relacionados.

Según se usan en la presente, los términos "inactivado" o "destruido" se usan sinónimamente. Se conocen en la especialidad diversos métodos físicos y químicos de inactivación. El término "inactivado" se refiere a un virus o una bacteria previamente virulentos o no virulentos que se han irradiado (ultravioleta (UV), rayos X, haz electrónico o radiación gamma), calentado tratado químicamente para inactivar, destruir, mientras que retiene su inmunogenicidad. En una realización, el virus inactivado divulgado en la presente se inactiva mediante tratamiento con un agente inactivante. Agentes inactivantes adecuados incluyen beta-propiolactona, etilenimina binaria o beta o acetilada, glutaraldehído, ozono y formalina (formaldehído).

Para la inactivación mediante formalina o formaldehído, el formaldehído se mezcla típicamente con agua y alcohol metílico para crear formalina. La adición de alcohol metílico evita la degradación o la reacción cruzada durante el procedimiento de inactivación. Una realización usa aproximadamente de 0,1 a 1% de una solución al 37% de formaldehído para inactivar el virus o la bacteria. Es crítico ajustar la cantidad de formalina para asegurar que el material se inactiva pero no tanto que se produzcan efectos secundarios por una alta dosificación.

Un método de inactivación más preferido es el uso de etilenimina y derivados relacionados, tales como etilenimina binaria (BEI) y acetiletilenimina, son ejemplos de agentes inactivantes químicos adecuados para el uso en la inactivación del virus pestiviral. También se pueden usar otros agentes inactivantes químicos, p. ej., beta-propiolactona, aldehídos (tales como formaldehído) y/o detergentes (p. ej., detergente TWEEN®, TRITON® X o sales de alquiltrimetilamonio) para inactivar el virus. La inactivación se puede realizar usando métodos estándar conocidos por los expertos en la especialidad. También se pueden tomar muestras a intervalos de tiempo periódicos y ensayarse con respecto al virus vivo residual. La comprobación del efecto citopático sobre una línea celular apropiada y/o la tinción fluorescente con un anticuerpo monoclonal o policlonal específico apropiado se puede usar para detectar la presencia de virus vivo residual. Alternativamente, se puede utilizar un desarrollo comprobado mediante PCR en cuantitativa en tiempo real en el pase en serie para determinar la presencia de virus infeccioso residual.

La inactivación con BEI se puede efectuar al combinar una solución madre de BEI (p. ej., una solución formada al añadir hidrobromuro de 2-bromoetilamina 0,1-0,2 M a NaOH acuoso 0,1-0,2 N) con fluidos virales hasta una concentración final de BEI aproximadamente 1-5 mM. La inactivación se realiza comúnmente al mantener la mezcla de BEI-virus a 35-40°C (p. ej., 37°C) con mezclas constante durante aproximadamente 24-72 horas. La inactivación del virus se puede detener mediante la adición de solución de tiosulfato sódico hasta una concentración final por encima de la concentración de BEI (p. ej., adición de tiosulfato sódico al 17% del volumen de BEI para neutralizar el exceso de BEI) seguido por mezclas.

Más particularmente, el término "inactivado" en el contexto de un virus significa que el virus es incapaz de replicación *in vivo* o *in vitro* y, respectivamente, el término "inactivado" en el contexto de un virus significa que el virus es incapaz de reproducción *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, el término "inactivado" se puede referir a un virus que se ha propagado *in vitro*, p. ej., *in vitro*, y a continuación se ha desactivado usando medios químicos o físicos de modo que ya no sea capaz de replicarse. En otro ejemplo, el término "inactivado" se puede referir a un virus que se ha propagado, y a continuación desactivado usando medios químicos o físicos que den como resultado una suspensión del virus, fragmentos o componentes del virus, tal como dando como resultado una solución que se puede usar como un componente de una vacuna.

El término "vacuna viva" se refiere a una vacuna que comprende un componente activo vivo, en particular, uno viral vivo.

Una "vacuna subunitaria" puede incluir antígenos que estimulan mejor el sistema inmunitario. En algunos casos, estas vacunas usan las proteínas Npro, de la cápsida, Erns, E1, E2, NS2-3, helicasa, NS4B, NS5A y/o ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) del pestivirus o epítomos procedentes de esas proteínas. Debido a que las vacunas subunitarias contienen solamente los antígenos esenciales y en absoluto las otras moléculas que constituyen el pestivirus, las posibilidades de reacciones adversas a la vacuna son inferiores.

Las vacunas subunitarias pueden contener cualesquiera de uno a 10 o más antígenos, p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 antígenos. Los operarios expertos apreciarán cómo elaborar vacunas subunitarias. Por ejemplo, las moléculas de antígeno se pueden expresar usando tecnología de ADN recombinante. Las vacunas producidas de este modo se denominan "vacunas subunitarias recombinantes".

Una "composición farmacéutica" consiste esencialmente en uno o más ingredientes capaces de modificar funciones fisiológicas, p. ej., inmunológicas, del organismo al que se administra o de organismos que viven en o sobre el organismo. El término incluye, pero no está restringido a, antibióticos o antiparasitarios, así como otros constituyentes usados comúnmente para conseguir ciertos objetivos tales como, pero no limitados a, rasgos de procesamiento,

esterilidad, estabilidad, viabilidad para administrar la composición a través de vías enterales o parenterales tales como oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica u otra vía adecuada, tolerancia después de la administración o propiedades de liberación controlada. Un ejemplo no limitativo de esta composición farmacéutica, dado solamente con propósitos de demostración, se podría preparar como sigue: el sobrenadante de cultivo celular de un cultivo celular infectado se mezcla con un estabilizante (p. ej., espermidina y/o albúmina sérica bovina (BSA)) y posteriormente la mezcla se liofiliza o deshidrata mediante otros métodos. Antes de la vacunación, la mezcla se rehidrata a continuación en soluciones acuosas (p. ej., salina, salina tamponada con fosfato (PBS)) o no acuosas (p. ej., emulsión oleosa, adyuvante a base de aluminio).

Según se usa en la presente, "portador farmacéutica o veterinariamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardadores de la adsorción, y similares. En algunas realizaciones preferidas, y especialmente las que incluyen composiciones inmunogénicas liofilizadas, agentes estabilizantes para el uso en la presente invención incluyen estabilizantes para liofilización o criosecado.

En algunas realizaciones, la composición inmunogénica de la presente invención contiene un adyuvante. Los "adyuvantes", según se usa en la presente, pueden incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, p. ej., Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), una emulsión de agua en aceite, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite en agua. La emulsión se puede basar en particular en aceite de vaselina líquido ligero (tipo 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 o alcoholes ramificados, en particular ésteres de ácido isoesteárico. El aceite se usa en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son preferiblemente tensioactivos iónicos, en particular ésteres de sorbitano, de manida (p. ej., oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol y ácido oleico, isoesteárico, ricinoleico o hidroxiesteárico, que están opcionalmente etoxilados, y bloques de copolímeros de polioxipropileno-polioxietileno, en particular los productos Pluronic, especialmente L121. Véase Hunter y cols., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), John Wiley and Sons, NY, pp. 51-94 (1995) y Todd y cols., *Vaccine* 15:564-570 (1997). Adyuvantes ejemplares son la emulsión de SPT descrita en la página 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" editado por M. Powell y 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 alquénico. Compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros de ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con éteres polialquénicos de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen por el término carbómero (Phameuropa Vol. 8, Nº 2, junio de 1996). Los expertos en la especialidad también se pueden referir a la Patente de EE. UU. Nº 2.909.462 que describe estos polímeros acrílicos reticulados con un compuesto polihidroxilado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferiblemente no más de 8, reemplazándose los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos 2 átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, p. ej., vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener ellos mismos otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos vendidos bajo el nombre Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EE. UU. de A.) son particularmente apropiados. Están reticulados con una alilsacarosa o con alilpentaeritritol. Entre ellos, se pueden mencionar Carbopol 974P, 934P y 971P. Lo más preferido es el uso de Carbopol 971P. Entre los copolímeros de anhídrido maleico y derivado alquénico, están los copolímeros EMA (Monsanto), que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno. La disolución de estos polímeros en agua conduce a una solución ácida que se neutralizará, preferiblemente hasta pH fisiológico, a fin de dar la solución adyuvante en la que se incorporará la composición inmunogénica, inmunológica o vacunal.

Adyuvantes adecuados adicionales incluyen, pero no se limitan a, el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), un copolímero de bloques (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), lípido A monofosforilado, adyuvante lípido-amínico avridina, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante o de otro modo), toxina del cólera, IMS 1314 o dipéptido muramílico o citocinas presentes en la naturaleza o recombinantes o sus análogos o estimulantes de la liberación de citocinas endógenas, entre muchos otros.

Se espera que un adyuvante se pueda añadir en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por dosis, más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg por dosis, incluso más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 2,5 mg por dosis, y lo más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis. Alternativamente, el adyuvante puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01 a 50%, preferiblemente en una concentración de aproximadamente 2% a 30%, más preferiblemente en una concentración de aproximadamente 5% a 25%, aún más preferiblemente en una concentración de aproximadamente 7% a 22%, y lo más preferiblemente en una concentración de 10% a 20% en volumen del producto final.

Los "diluyentes" pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol, y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina y sales alcalinas de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), entre otros.

5 "Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" desde su estado natural, es decir, si está presente en la naturaleza, se ha cambiado o retirado de su estado original o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido presente en la naturaleza en un organismo vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado", según se emplea el término en la presente.

10 "Atenuación" significa reducir la virulencia de un patógeno. En la presente invención, un virus atenuado es uno en el que la virulencia se ha reducido de modo que no provoque signos clínicos de una infección pestiviral pero sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero elegido, pero también puede significar que los signos clínicos se reducen en incidencia o gravedad en animales infectados con el pestivirus inactivado o atenuado en comparación con un "grupo de control" de animales infectados con pestivirus silvestres no atenuado y que no reciben el virus inactivado o atenuado. En este contexto, el término "reducir/reducido" significa una reducción de al menos 10%, preferiblemente 25%, incluso más preferiblemente 50%, aún más preferiblemente 60%, incluso más preferiblemente 70%, aún más preferiblemente 80%, incluso más preferiblemente 90% y lo más preferiblemente de 100% en comparación con el grupo de control según se define anteriormente. Así, un aislado pestiviral inactivado, atenuado y/o avirulento es uno que sea adecuado para la incorporación en una composición inmunogénica que comprende un pestivirus vivo inactivado o modificado.

20 Un "virus atenuado" es un virus viable ("vivo"), en el que se ha reducido la virulencia del agente infeccioso, p. ej. a través del pase del virus en una línea celular específica o a través de manipulación genética del genoma viral. La atenuación del virus trata de su virulencia (patogenicidad), pero no necesariamente afecta a la capacidad replicativa de un virus. Un virus atenuado todavía puede ser capaz de replicación. Así, puede ser una cepa de un virus cuya patogenicidad se ha reducido de modo que iniciará la respuesta inmunitaria sin provocar la enfermedad específica. En el contexto de la presente invención, un virus atenuado puede ser un pestivirus cuya patogenicidad se ha suprimido o reducido al inactivar al menos un gen o una proteína implicados en la virulencia. En la presente invención, "atenuación" es sinónimo de "avirulento". En este contexto, el término "reducir/reducido" significa una reducción en la patogenicidad de al menos 10%, preferiblemente 25%, incluso más preferiblemente 50%, aún más preferiblemente 60%, incluso más preferiblemente 70%, aún más preferiblemente 80%, incluso más preferiblemente 90% y lo más preferiblemente de 100% en comparación con un grupo de control.

30 "Vivo modificado" significa que el virus se ha reducido en virulencia mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la especialidad tales como, incluyendo pero no limitados a, pase repetido en cultivo celular; adaptación forzada al desarrollo a temperaturas normalmente restrictivas; tratamiento con mutágenos químicos para forzar altos números de mutaciones y selección con respecto a las características deseadas; y eliminación o inserción de genes usando tecnología de ADN. Por el término "no virulento" o "avirulento" se entiende que el virus vivo modificado exhibe signos clínicos reducidos o nulos de infección cuando se administra.

"Virulento" se refiere a la capacidad de un aislado pestiviral para provocar una enfermedad asociada con pestivirus. La virulencia se puede evaluar al observar la progresión de la enfermedad en el animal. Un ejemplo de una cepa "virulenta" de pestivirus es el ejemplificado por la cepa estimuladora, según se describe y se usa en la presente invención.

40 "Avirulento" se refiere a aislados de pestivirus que carecen de virulencia. Esto es, cepas, aislados o construcciones avirulentos son no patógenos y son incapaces de provocar enfermedad. Según se usa en la presente, el término "avirulento" se usa sinónimamente al término "no virulento".

Según se usan en la presente, los términos "cepa" o "aislado" se usan intercambiamente.

45 El término "pestivirus silvestre", según se usa en la presente, se dirige en particular a un pestivirus patógeno infeccioso, que particularmente es capaz de provocar CT en cerdos y especialmente lechones. En una realización preferida particular, el término "virus silvestre" se dirige a un pestivirus cuyo genoma comprende una secuencia de ARN o consiste en un polinucleótido de ARN, en donde dicha secuencia de ARN o polinucleótido de ARN es una copia de ARN de un polinucleótido que comprende SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o 21. En algunas realizaciones, un pestivirus silvestre comprende una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 22.

En la presente, "dosis eficaz" significa, pero no se limita a, una cantidad de antígeno que incita o es capaz de incitar una respuesta inmunitaria que da una reducción de síntomas clínicos en un animal al que se administra el antígeno.

55 Según se usa en la presente, el término "cantidad eficaz" significa, en el contexto de una composición, una cantidad de una composición inmunogénica capaz de inducir una respuesta inmunitaria que reduce la incidencia de o reduce la gravedad de la infección o la incidencia de la enfermedad en un animal. Particularmente, una cantidad eficaz se refiere a un título medido en dosis infecciosa de cultivo tisular 50 o unidades formadoras de placas por dosis. Alternativamente, en el contexto de una terapia, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la gravedad o la duración de una enfermedad o un trastorno o uno o más de sus síntomas, prevenir el avance de una enfermedad o un trastorno, provocar la regresión de una enfermedad o un

trastorno, prevenir la recaída, el desarrollo, el comienzo o la progresión de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o un trastorno o potenciar o mejorar la profilaxis o el tratamiento de otra terapia o agente terapéutico.

El término "inmunorreactivo al pestivirus", según se usa en la presente, significa que el péptido o el fragmento induce la respuesta inmunológica contra pestivirus.

5 Los términos "identidad de secuencia" o "porcentaje de identidad" se usan intercambiamente en la presente. Para el propósito de esta invención, se define en la presente que a fin de determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean con propósitos de comparación óptimos (p. ej., se pueden introducir huecos en la secuencia de un primer aminoácido o ácido nucleico para el alineamiento óptimo con una segunda secuencia amínica o de ácido nucleico). Los residuos de aminoácido o nucleótido en las correspondientes posiciones de aminoácidos o nucleótidos se comparan a continuación. Cuando una posición de la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas / número total de posiciones (es decir, posiciones solapadas) x 100). Preferiblemente, las dos secuencias tienen la misma longitud.

"Homología de secuencia", según se usa en la presente, se refiere a un método para determinar la relación de dos secuencias. Para determinar la homología de secuencia, dos o más secuencias se alinean óptimamente, y se introducen huecos si es necesario. Sin embargo, en contraste con la "identidad de secuencia", las sustituciones de aminoácidos conservativas se cuentan como una coincidencia cuando se determina la homología de secuencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido o polinucleótido que tiene una homología de secuencia de 95% con una homología de secuencia con una secuencia de referencia, 85%, preferiblemente 90%, incluso más preferiblemente 95% de los residuos de aminoácido o los nucleótidos en la secuencia de referencia deben coincidir con o comprender una sustitución conservativa con otro aminoácido o nucleótido o un número de aminoácidos o nucleótidos hasta 15%, preferiblemente hasta 10%, incluso más preferiblemente hasta 5% de los residuos de aminoácido o nucleótidos totales, sin incluir sustituciones conservativas, en la secuencia de referencia se pueden insertar 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.

Una "sustitución conservativa" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido que tenga características o propiedades similares incluyendo el tamaño, la hidrofobia, etc., de modo que la funcionalidad global no cambie significativamente.

El experto estará al tanto del hecho de que están disponibles varios programas informáticos diferentes para determinar la homología entre dos secuencias. A modo de ejemplo, se puede realizar una comparación de secuencias y una determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias usando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o ácido nucleico se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software Accelrys GCG (disponible en [www.accelrys.com/products/gcg](http://www.accelrys.com/products/gcg)), usando bien una matriz de Blosum 62 o bien una matriz de PAM250, y un peso de los huecos de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El experto apreciará que estos parámetros diferentes darán resultados ligeramente diferentes pero que el porcentaje de identidad global de dos secuencias no se ve significativamente alterado cuando se usen diferentes algoritmos.

Una comparación de secuencias se puede llevar a cabo sobre las longitudes completas de dos secuencias que se comparan o sobre un fragmento de las dos secuencias. Típicamente, la comparación se llevará a cabo sobre la longitud completa de las dos secuencias que se comparan. Sin embargo, la identidad de secuencia se puede llevar a cabo sobre una región de, por ejemplo, veinte, cincuenta, cien o más residuos de aminoácido contiguos.

45 "Identidad de secuencia", según se sabe en la especialidad, se refiere a una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, a saber una secuencia de referencia y una secuencia dada que se va a comparar con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia se determina al comparar la secuencia dada con la secuencia de referencia después de que las secuencias se hayan alineado óptimamente para producir el mayor grado de similitud de secuencia, según se determina por la coincidencia entre cadenas de estas secuencias. Tras este alineamiento, la identidad de secuencia se evalúa sobre una base de posición por posición, p. ej., las secuencias son "idénticas" en una posición dada si en esa posición los nucleótidos o los residuos de aminoácido son idénticos. El número total de estas identidades de posición se divide a continuación por el número total de nucleótidos o residuos en la secuencia de referencia para dar el % de identidad de secuencia. La identidad de secuencia se puede calcular fácilmente mediante métodos conocidos incluyendo, pero no limitados a, 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), cuyas enseñanzas se incorporan en la presente mediante referencia. Métodos preferidos para determinar la identidad de secuencia se diseñan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias probadas. Métodos para determinar la identidad de secuencia se codifican en programas informáticos disponibles públicamente que determinan la identidad de secuencia

entre secuencias dadas. Ejemplos de estos programas incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG (Devereux, J., y cols., *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. y cols., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990). El programa BLASTX está disponible públicamente de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S. y cols., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. y cols., *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990), cuyas enseñanzas se incorporan en la presente mediante referencia). Estos programas alinean óptimamente secuencias que usan pesos de huecos por defecto a fin de producir el mayor nivel de identidad de secuencia entre las secuencias dada y de referencia. Como una ilustración, por un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que tiene al menos, por ejemplo, 95%, p. ej., al menos 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de "identidad de secuencia" con una secuencia nucleotídica de referencia se entiende que la secuencia nucleotídica del polinucleótido dado es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia polinucleotídica dada puede incluir hasta 5, 4, 3, 2, 1 o 0 mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia nucleotídica de referencia. En otras palabras, en un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que tiene al menos 95%, p. ej., al menos 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con relación a la secuencia nucleotídica de referencia, hasta 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o 0% de los nucleótidos de la secuencia de referencia se puede eliminar o sustituir por otro nucleótido o un número de nucleótidos hasta 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o 0% de los nucleótidos totales de la secuencia de referencia se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia se pueden presentar en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia nucleotídica de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre nucleótidos de la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Análogamente, por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos dada que tiene al menos, por ejemplo, 95%, p. ej., al menos 96%, 97%, 98%, 99% o 100% 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 por que la secuencia polipeptídica dada puede incluir hasta 5, 4, 3, 2, 1 o 0 alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia polipeptídica dada que tiene al menos 95%, p. ej., al menos 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o 0% de los residuos de aminoácido de la secuencia de referencia se pueden suprimir o sustituir por otro aminoácido o un número de aminoácidos hasta 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o 0% del número total de residuos de aminoácido en la secuencia de referencia se pueden insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia se puede producir en las posiciones terminales amino o carboxi de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o bien en el uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas. Sin embargo, las sustituciones conservativas no se incluyen como una coincidencia cuando se determina la identidad de secuencia.

El término "mutación" en el contexto de la invención se entiende como un cambio en una secuencia genómica, en particular en la secuencia de ARN de un pestivirus. Puesto que los virus que usan ARN como su material genético tienen velocidades de mutación rápidas, el término "mutación", según se menciona en la presente, se dirige particularmente a un cambio genéticamente manipulado en una secuencia genómica, tal como mediante clonación, recombinación forzada, desarrollo en presencia de mutágenos u otras técnicas usadas para alterar experimentalmente el genoma, que en particular dé como resultado un virus que se desarrolle hasta títulos inferiores que el pestivirus silvestre en el hospedador infectado, cuando se propague bajo las mismas condiciones. Por otra parte, en otra realización preferida, la mutación descrita en la presente también puede ser provocada por mutación natural y aislamiento posterior del pestivirus según la invención, en donde dicho virus aislado incluye la mutación descrita en la presente.

Las secuencias proteínicas o secuencias de ácido nucleico de la presente invención se pueden usar adicionalmente como una "secuencia interrogante" para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias. Estas búsquedas se pueden realizar usando los programas BLASTN y BLASTP (versión 2.0) de Altschul y cols. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de proteínas con BLAST se pueden realizar con el programa BLASTP, puntuación=50, longitud de palabra=3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineamientos por huecos con propósitos de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST según se describe en Altschul y cols. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402. Cuando se utilicen los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (p. ej., BLASTP y BLASTN). Véase la página de inicio de the National Center for Biotechnology Information en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

El término "vector", como se sabe en la especialidad, se refiere a una construcción polinucleotídica, típicamente un plásmido o un virus, usada para transmitir material genético a una célula hospedadora. Los vectores pueden ser, por ejemplo, virus, plásmidos, cósmidos o un fago. Un vector, según se usa en la presente, puede estar compuesto bien por ADN o bien por ARN. En algunas realizaciones, un vector está compuesto por ADN. Un "vector de expresión" es un vector que es capaz de dirigir la expresión de una proteína codificada por uno o más genes soportados por el vector cuando esté presente en el ambiente apropiado. Preferiblemente, los vectores son capaces de replicación autónoma. Típicamente, un vector de expresión comprende un promotor de la transcripción, un gen y un terminador de la transcripción. La expresión génica se sitúa habitualmente bajo el control de un promotor, y se dice que un gen está "ligado operativamente al" promotor.

Según se usa en la presente, el término "ligado operativamente" se usa para describir la conexión entre elementos reguladores y un gen o su región codificante. Típicamente, la expresión génica se sitúa bajo el control de uno o más elementos reguladores, por ejemplo, sin limitación, promotores constitutivos o inducibles, elementos reguladores específicos de tejidos y potenciadores. Se dice que un gen o una región codificante está "ligado operativamente a" o "asociado operativamente con" los elementos reguladores, significando que el gen o la región codificante está controlado o influido por el elemento regulador. A modo de ejemplo, un promotor está ligado operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o la expresión de la secuencia codificante.

El término "construcción", según se usa en la presente, se refiere a un ácido nucleico recombinante que se ha generado con el propósito de la expresión de una secuencia o secuencias nucleotídicas específicas o que se ha de usar en la construcción de otras secuencias nucleotídicas recombinantes.

Vectores y métodos para elaborar y/o usar vectores (o recombinantes) para expresión pueden ser mediante o análogos a los métodos divulgados en: las Patentes de EE. UU. Nº 4.603.112, 4.769.330, 5.174.993, 5.505.941, 5.338.683, 5.494.807, 4.722.848, 5.942.235, 5.364.773, 5.762.938, 5.770.212, 5.942.235, 382.425, las publicaciones PCT WO 94/16716, WO 96/39491, WO 95/30018; Paoletti, "Applications of pox virus vectors to vaccination: An update," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11349-11353, octubre de 1996; Moss, "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11341-11348, octubre de 1996; Smith y cols., la Patente de EE. UU. Nº 4.745.051 (baculovirus recombinante); Richardson, C. D. (Editor), *Methods in Molecular Biology* 39, "Baculovirus Expression Protocols" (1995 Humana Press Inc.); Smith y cols., "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector", *Molecular and Cellular Biology*, diciembre de 1983, Vol. 3, Nº 12, p. 2156-2165; Pennock y cols., "Strong and Regulated Expression of Escherichia coli B-Galactosidase in Infect Cells with a Baculovirus vector," *Molecular and Cellular Biology* marzo de 1984, Vol. 4, Nº 3, p. 406; el documento EPA0 370 573; la Solicitud de EE. UU. Nº 920.197, presentada el 16 de oct. de 1986; la publicación de patente EP Nº 265785; la Patente de EE. UU. Nº 4.769.331 (herpesvirus recombinante); Roizman, "The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11307-11312, octubre de 1996; Andreansky y cols., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11313-11318, octubre de 1996; Robertson y cols., "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11334-11340, octubre de 1996; Frolov y cols., "Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11371-11377, 1996; Kitson y cols., *J. Virol.* 65, 3068-3075, 1991; las Patentes de EE. UU. Nº 5.591.439, 5.552.143; el documento WO 98/00166; las Solicitudes de EE. UU. concedidas Nº 08/675.556 y 08/675.566, ambas presentadas el 3 de julio de 1996 (adenovirus recombinante); Grunhaus y cols., 1992, "Adenovirus as cloning vectors," *Seminars in Virology* 3:237-52, 1993; Ballay y cols. *EMBO Journal* 4:3861-65, Graham, *Tibtech* 8:85-87, 1990; Prevec y cols., *J. Gen Virol.* 70:429-34; el documento PCT WO 91/11525; Felgner y cols. (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561, *Science* 259:1745-49, 1993; y McClements y cols., "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11414-11420, 1996; y las Patentes de EE. UU. Nº 5.591.639, 5.589.466 y 5.580.859, así como los documentos WO 90/11092, WO93/19183, WO94/21797, WO95/11307, WO95/20660; Tang y cols., *Nature*, y Furth y cols., *Analytical Biochemistry*, que se refiere a vectores de expresión de ADN, entre otros. Véanse además el documento WO 98/33510; Ju y cols., *Diabetologia*, 41: 736-739, 1998 (sistema de expresión lentiviral); Sanford y cols., Patente de EE. UU. Nº 4.945.050; Fischbach y cols. (Intracel); el documento WO 90/01543; Robinson y cols., *Seminars in Immunology* vol. 9, pp. 271-283 (1997), (sistemas vectoriales de ADN); Szoka y cols., Patente de EE. UU. Nº 4.394.448 (método para insertar ADN en células vivas); McCormick y cols., Patente de EE. UU. Nº 5.677.178 (uso de virus citopáticos); y la Patente de EE. UU. Nº 5.928.913 (vectores para aporte génico); así como otros documentos citados en la presente.

Según se usan en la presente, los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" son intercambiables y se refieren a cualquier ácido nucleico. Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" también incluyen específicamente ácidos nucleicos compuestos por bases distintas a las cinco bases que se presentan biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo).

El término "elemento regulador" y "elemento de control de la expresión" se usan intercambiamente y se refieren a moléculas de ácido nucleico que pueden influir en la expresión de una secuencia codificante ligada operativamente en un organismo hospedador particular. Estos términos se usan ampliamente para y cubren todos los elementos que promueven o regulan la transcripción, incluyendo promotores, elementos nucleares requeridos para la interacción básica de ARN polimerasa y factores de transcripción, elementos aguas arriba, potenciadores y elementos de respuesta. Elementos reguladores ejemplares en procariontes incluyen promotores, secuencias operadoras y sitios de unión al ribosoma. Elementos reguladores que se usan en células eucarióticas pueden incluir, sin limitación, secuencias de control de la transcripción y traducción, tales como promotores, potenciadores, señales de empalme, señales de poliadenilación, terminadores, señales de degradación de proteínas, un elemento interno de entrada al ribosoma (IRES), secuencias 2A, y similares, que proporcionan y/o regulan la expresión de una secuencia codificante y/o la producción de un polipéptido codificado en una célula hospedadora.

Según se usa en la presente, el término "promotor" es una secuencia nucleotídica que permite la unión de ARN polimerasa y dirige la transcripción de un gen. Típicamente, un promotor está situado en la región no codificante 5' de un gen, próximo al sitio de inicio de transcripción del gen. Los elementos de la secuencia dentro de promotores que funcionan en el inicio de la transcripción se caracterizan a menudo por secuencias nucleotídicas de consenso.

Ejemplos de promotores incluyen, pero no se limitan a, promotores procedentes de bacterias, levaduras, plantas, virus y mamíferos (incluyendo seres humanos). Un promotor puede ser inducible, represible y/o constitutivo. Los promotores inducibles inician niveles incrementados de transcripción a partir de ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tal como un cambio en la temperatura.

5 Según se usa en la presente, el término "potenciador" se refiere a un tipo de elemento regulador que puede incrementar la eficacia de la transcripción, independientemente de la distancia u orientación del potenciador con relación al sitio de inicio de la transcripción.

La generación de un vector viral se puede efectuar usando cualesquiera técnicas de manipulación genética adecuadas bien conocidas en la especialidad, incluyendo, sin limitación, las técnicas estándar de digestión con endonucleasas de restricción, ligación, transformación, purificación plasmídica y secuenciación de ADN, por ejemplo según se describe en Sambrook y cols. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)).

Un vector viral puede incorporar secuencias procedentes del genoma de cualquier organismo conocido. Las secuencias se pueden incorporar en su forma natural o se pueden modificar de cualquier modo para obtener una actividad deseada. Por ejemplo, las secuencias pueden comprender inserciones, eliminaciones o sustituciones.

Un vector viral puede incluir regiones codificantes para dos o más proteínas de interés. Por ejemplo, el vector viral puede incluir la región codificante para una primera proteína de interés y la región codificante para una segunda proteína de interés. La primera proteína de interés y la segunda proteína de interés pueden ser iguales o diferentes. En algunas realizaciones, el vector viral puede incluir la región o las regiones codificantes para una tercera o una cuarta proteína de interés. La tercera y la cuarta proteína de interés pueden ser iguales o diferentes. La longitud total de las dos o más proteínas de interés codificadas por un vector viral puede variar. Por ejemplo, la longitud total de las dos o más proteínas puede ser al menos aproximadamente 400 aminoácidos, al menos aproximadamente 450 aminoácidos, al menos aproximadamente 500 aminoácidos, al menos aproximadamente 550 aminoácidos, al menos aproximadamente 600 aminoácidos, al menos aproximadamente 650 aminoácidos, al menos aproximadamente 700 aminoácidos, al menos aproximadamente 750 aminoácidos, al menos aproximadamente 800 aminoácidos o más larga.

Vectores virales preferidos incluyen baculovirus tales como BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Calif.), en particular con la condición de que las células de producción sean células de insecto. Aunque se prefiere el sistema de expresión baculoviral, se entiende por los expertos en la especialidad que otros sistemas de expresión funcionarán para los propósitos de la presente invención, a saber la expresión de E o E<sub>ms</sub> en el sobrenadante de un cultivo celular. Estos otros sistemas de expresión pueden requerir el uso de una secuencia de señal a fin de provocar la expresión de E o E<sub>ms</sub> en el medio.

El término "genogrupo", según se conoce en la especialidad, se refiere a virus relacionados dentro de un género; que se puede subdividir adicionalmente en aglomerados genéticos. Genogrupos identificados del género pestiviral incluyen virus de la enfermedad de la frontera, virus de diarrea bovina 1 (BVD-1), BVD-2, virus de la fiebre porcina clásico y otros pestivirus no clasificados.

El término "clado", según se sabe en la especialidad, se refiere a un grupo que consiste en un antecesor y todos sus descendientes, una "rama" simple en un árbol filogenético. El antecesor puede ser, como un ejemplo, un individuo, una población o una especie. Un genogrupo puede incluir múltiples clados.

Una "respuesta inmunitaria" o "respuesta inmunológica" significa, pero no se limita a, el desarrollo de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpo a la composición o la vacuna de interés. Habitualmente, una respuesta inmunitaria o inmunológica incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes efectos: la producción o activación de anticuerpos, células B, células T cooperadoras, células T supresoras y/o células T citotóxicas, dirigidos específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el hospedador presentará una respuesta inmunológica (memoria) bien terapéutica o bien protectora tal que la resistencia a una nueva infección se potencie y/o la gravedad clínica de la enfermedad se reduzca. Esta protección se demostrará mediante una reducción en el número de síntomas, la gravedad de los síntomas o la falta de uno o más de los síntomas asociados con la infección del patógeno, un retraso en el comienzo de la viremia, una persistencia viral reducida, una reducción en la carga viral global y/o una reducción de la excreción viral.

En la presente, "específicamente inmunorreactivo" se refiere a una proteína o un polipéptido inmunorreactivo que reconoce un antígeno característico de infección pestiviral o CT pero no reacciona con un antígeno característico de un control estricto de la estimulación.

"Protección contra la enfermedad", "inmunidad protectora", "inmunidad funcional" y expresiones similares significan una respuesta contra una enfermedad o afección generada mediante la administración de una o más composiciones terapéuticas de la invención o una de sus combinaciones, que da como resultado menos efectos perjudiciales de los que se esperarían en un sujeto no inmunizado que se ha expuesto a la enfermedad o la infección. Esto es, la gravedad de los efectos perjudiciales de la infección se reducen en un sujeto vacunado. La infección se puede reducir, frenar o posiblemente prevenir totalmente, en un sujeto vacunado. En la presente, cuando se entiende una prevención completa de la infección, se indica específicamente. Si no se indica una prevención completa, entonces el término incluye prevención parcial.

En la presente, "reducción de la incidencia y/o la gravedad de signos clínicos" o "reducción de síntomas clínicos" significa, pero no se limita a, reducir el número de sujetos infectados en un grupo, reducir o eliminar el número de sujetos que exhiben signos clínicos de infección o reducir la gravedad de cualesquiera signos clínicos que están presentes en uno o más sujetos, en comparación con la infección silvestre. Por ejemplo, se referirá a cualquier reducción de la carga patógena, la difusión de patógenos, reducción en la transmisión de patógenos o reducción de cualquier signo clínico sintomático de CT. Preferiblemente, estos signos clínicos se reducen en uno o más sujetos que reciben la composición terapéutica de la presente invención en al menos 10% en comparación con sujetos que no reciben la composición y que se infectan. Más preferiblemente, los signos clínicos se reducen en sujetos que reciben una composición de la presente invención en al menos 20%, preferiblemente en al menos 30%, más preferiblemente en al menos 40%, e incluso más preferiblemente en al menos 50%.

El término "protección incrementada" significa en la presente, pero no se limita a, una reducción estadísticamente significativa de uno o más síntomas clínicos que están asociados con la infección por un agente infeccioso, preferiblemente un CT generado por pestivirus, respectivamente, en un grupo de sujetos vacunados frente a un grupo de sujetos no vacunados. El término "reducción estadísticamente significativa de síntomas clínicos" significa, pero no se limita a, que la frecuencia en la incidencia de al menos un síntoma clínico en el grupo de sujetos vacunados es al menos 10%, preferiblemente 20%, más preferiblemente 30%, incluso más preferiblemente 50%, e incluso más preferiblemente 70% inferior que en el grupo de control no vacunado después de la estimulación del 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 del ganado, lo más preferido es que la protección a largo plazo persista hasta la edad promedio a la que los animales se comercializan para carne.

Según se usa en la presente, el término "viremia" se entiende particularmente como una afección en la que partículas pestivirales se reproducen y circulan en la corriente sanguínea de un animal, en particular de un lechón.

El término "reducción de la viremia" inducida por pestivirus significa, pero no se limita a, la reducción de pestivirus que entran en la corriente sanguínea de un animal, en donde el nivel de viremia, es decir, el número de copias de pestivirus por ml de suero sanguíneo o el número de unidades formadoras de placas por decilitro de suero se reduce en el suero de sujetos que reciben la composición de la presente invención en al menos 50% en comparación con sujetos que no reciben la composición y se pueden infectar. Más preferiblemente, el nivel de viremia se reduce en sujetos que reciben la composición de la presente invención en al menos 90%, preferiblemente en al menos 99,9%, más preferiblemente en al menos 99,99%, e incluso más preferiblemente en al menos 99,999%.

"Seguridad" se refiere a la ausencia de consecuencias adversas en un animal vacunado después de la vacunación, incluyendo, pero no limitadas a: regresión potencial de una vacuna a base de bacterias hasta la virulencia, efectos secundarios clínicamente significativos tales como dolencia sistémica persistente o inflamación inaceptable en la zona de administración de la vacuna.

Los términos "vacunación" o "vacunar" o sus variantes, según se usan en la presente, significan, pero no se limitan a, un procedimiento que incluye la administración de una composición inmunogénica de la invención que, cuando se administra a un animal, promueve o es capaz de promover - directa o indirectamente - una respuesta inmunitaria en el animal contra pestivirus o CT.

"Mortalidad", en el contexto de la presente invención, se refiere a la muerte provocada por infección pestiviral o CT, e incluye la situación en la que la infección es tan grave que un animal se sacrifica para evitar que sufra y proporcionar un final compasivo a su vida.

Los siguientes ejemplos se incluyen para mostrar realizaciones preferidas de la invención. Se debe apreciar por los expertos en la especialidad que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los inventores para funcionar bien en la práctica de la invención, y así se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la especialidad, a la luz de la presente divulgación, apreciarán que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y obtener no obstante un resultado igual o similar sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención.

## **EJEMPLOS**

### **EJEMPLO 1**

El propósito de este estudio era determinar si la enfermedad clínica se podría reproducir en cerdos privados de calostro derivado de cesárea (CDCD) usando un homogenado tisular que contiene el nuevo pestivirus de la presente invención. Específicamente, el propósito es reproducir viremia y colonización tisular (según se detecta mediante qRT-PCR) en lechones CDCD después de la estimulación con suero que contiene un nuevo pestivirus.

### **Cuidado animal**

Los cerdos se alojaron en el centro para animales en VRI en Cambridge, IA a lo largo de la duración del estudio. Los cerdos fueron alimentados con una ración comercial (UltraCare Medicated, lote nº 4Jun16) que fuera apropiada para su tamaño, edad y condición según prácticas de cría de animales aceptables para la región (se incluían antibióticos). Estaba disponible agua a voluntad. El espacio de suelo y de comederos cumplía o superaba los requisitos del

Consortio "Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching", tercera edición, enero de 2010.

5 Cualquier animal moribundo y los animales reacios a comer o beber se sacrificaron antes de la fecha de la necropsia a discreción del investigador. Cualquier animal que muriera o se sacrificara a la largo del período del estudio era  
 10 sometido a necropsia por un veterinario. Todos los animales se sacrificaron al final del estudio, se contabilizaron y se eliminaron mediante incineración.

### **Diseño Experimental**

Se usó un total de diez cerdos CDCD para este bioensayo. Los cerdos se aleatorizaron en dos grupos. Los animales del grupo 1 (n=6) se estimularon mediante tres vías (intracraneal, intranasal e intravenosa) con suero que contiene pestivirus. Los animales del grupo 2 (n=4) fueron inoculados de un modo similar con material de placebo y servían como controles negativos. Los animales de cada grupo se mantenían en habitaciones separadas. Después de la estimulación, los cerdos se comprobaron diariamente con respecto a los signos clínicos desde los días posteriores a la estimulación (D0) hasta D28. Se tomaron las temperaturas rectales dos veces a la semana a lo largo del estudio. Se recogieron muestras séricas, fecales y nasales dos veces a la semana a lo largo del estudio. Las muestras se  
 15 cribaron con respecto al ARN pestiviral. Los pesos de los animales se tomaron en el D0 y en el momento de la necropsia para evaluar el impacto de la estimulación sobre el aumento medio diario. Un animal procedente del grupo estimulado se sacrificó el D10, 14, 17, 21, 24 y 28. La decisión sobre qué animal se sacrificaba se basaba en la detección de ARN pestiviral en suero. Un animal procedente del grupo del placebo se sacrificaba el D17, 21, 24 y 28. Los tejidos y los sueros terminales recogidos en el momento de la necropsia se cribaban con respecto a la presencia de ARN pestiviral mediante qRT-PCR (FIG. 4).  
 20

Sueros procedentes de NAC#20140530, ID animal nº 21-24, lote nº 2815-105-2 a 2815-105-5 se descongelaron a 37°C y se reunieron. Los sueros reunidos se filtraron a través de 0,2 µm y se diluyeron al añadir 6 ml de suero a 29 ml de solución salina tamponada con fosfato IX (Gibco cat#10010-023, L#1535358). El material preparado se denominó L#2815-171-A y se almacenó a -70°C±10°C hasta el uso (FreezerWorks id#466528). El día de la estimulación, el material se descongeló y se mantuvo sobre hielo durante el período de estimulación. Tres partes alícuotas de 2 ml se almacenaron como muestras de retención a -70°C±10°C (FreezerWorks id#466044). El material reunido se retuvo pero no se probó adicionalmente.  
 25

Tabla 1. Esquema de episodios clave, donde DPC se refiere a día después de la estimulación

<b>Día del Estudio</b>	<b>Episodio del Estudio</b>
D0 (05 agosto 14)	<b>Cerdos estimulados</b>  -Recogida de muestras séricas, nasales y fecales antes de la estimulación  -Medida del peso antes de la estimulación
D2, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27	-Recogida de muestras séricas, nasales y fecales  -Temperaturas rectales
D10	-Recogida de suero de todos los animales disponibles
D10, 14, 17, 21, 24, 28	<b>Necropsia de 1 animal al día para el grupo estimulado</b>  -Recogida de sangre terminal  -Medida del peso
D17, 21, 24, 28	<b>Necropsia de 1 animal al día para el grupo del placebo</b>  -Recogida de sangre terminal  -Medida del peso

Día del Estudio	Episodio del Estudio
D0-28	Observaciones clínicas diarias
TBD	Llegada de lechones a VRI <b>Evaluación de los lechones</b>
DPC0	<b>Lechones estimulados</b> -Recogida de muestras séricas, nasales y fecales antes de la estimulación -Medida del peso antes de la estimulación
DPC1, 3, 5, 7	-Recogida de muestras séricas, nasales y fecales -Temperaturas rectales -Fotografía o video si se producen signos clínicos
DPC 8-28	-Recogida de muestras séricas, nasales y fecales <b>dos veces por semana</b> -Temperaturas rectales <b>dos veces por semana</b>
DPC0-28	Observaciones clínicas diarias
DPC3,7,10,14, 21,28	<b>Necropsia</b> -Recogida de sangre terminal -Medida del peso

### **Estimulación**

***Estimulación intranasal:*** El DPC0, el investigador administraba 2 ml de material estimulante, 1 ml por fosa nasal, usando una jeringa estéril. Esto se administraba antes de anestesiarse al animal.

5 ***Estimulación intracraneal:*** El DPC0, el investigador anestesiaba a los animales con una mezcla de ketamina, xilacina y telazol. El calvario se limpió y se desinfectó. Se había de usar un troquel para biopsias (Miltex Instrument Company, Inc.) para retirar una sección de 4 mm de piel del calvario. Se trepanó un orificio a través del calvario usando una taladradora de mano. El material estimulante se inyectó en el cerebro usando un catéter de calibre 20 de 4,77 cm (1,88 pulgadas) de longitud (BD AngioCath pieza nº H3272). Después de la inyección del inóculo, se insertaron 0,5 ml de PBS IX en el catéter para asegurar el aporte del inóculo. La incisión cutánea se cerró con una sola sutura.

10 ***Estimulación intravenosa:*** Mientras los lechones estaban anestesiados, 2 ml de material estimulante se administraron lentamente en la vena auricular usando un catéter de mariposa estéril y una jeringa.

### **Observaciones clínicas**

15 Después de la estimulación, los lechones se comprobaron una vez al día con respecto a la presencia de signos clínicos. Como se desconoce si los signos clínicos eran similares a otros pestivirus porcinos (p. ej., fiebre porcina clásica, virus de Bungowannah), los lechones se comprobaron con respecto a signos de infección sistémica así como signos neurológicos.

### **Recogida de muestras fecales**

Se recogió por el investigador material fecal de lechones. Las muestras eran un frotis (catálogo de Fisher nº 23-400-111) situado en un tubo Falcon. Las muestras se recogieron del animal y no del suelo. El material se transfirió el día

de la recogida y las muestras se mantuvieron a 2-8°C si se probaban < 24 horas después de la entrega o se mantuvieron a -70°C± 10°C si se probaban en un día posterior.

**Recogida de muestras nasales**

5 Se recogieron por el investigados frotis nasales de lechones. Las muestras eran un frotis (catálogo de Fisher nº 23-400-111) situado en un tubo Falcon. Las muestras se recogieron del animal al frotar ambas fosas nasales. Las muestras se etiquetaron con un mínimo de número del estudio, día del estudio e identificación del animal. El material se transfirió el día de la recogida y las muestras se mantuvieron a 2-8°C si se probaban < 24 horas después de la entrega o se mantuvieron a -70°C±10°C si se probaban en un día posterior.

**Recogida de sangre**

10 En días de recogida de sangre, de cuatro a 15 ml de sangre entera venosa fueron recogidos por el investigador a través de la vena cava anterior de cada cerdo usando una aguja VACCUTAINER® estéril de 18-20g x 2,54 cm (1 pulgada) a 3,81 cm (1,5 pulgadas), un soporte para agujas VACCUTAINER® y tubos separadores de suero (SST) de 9 o 13 ml. El suero se separó del coágulo mediante centrifugación y se decantó en un vial criogénico con tapón de rosca. El material se transfirió el día de la recogida y las muestras se mantuvieron a 2-8°C si se probaban < 24 horas después de la entrega o se mantuvieron a -70°C± 10°C si se probaban en un día posterior.

**Necropsia**

20 Visión general: Cualesquiera animales moribundos se sangraron, se sacrificaron compasivamente y a continuación se sometieron a necropsia por un veterinario. Los cerdos se seleccionaron para la necropsia basándose en los datos de viremia (un valor de Ct <30) generados el día antes de la necropsia programada. Los lechones se pesaron en el momento de la necropsia y se registraron las lesiones macroscópicas.

25 Recogida y procesamiento de sangre terminal: Los lechones fueron anestesiados profundamente antes de la recogida de sangre. La sangre (aproximadamente 5% del peso corporal) se recogió en tarros, botellas o múltiples tubos SST estériles y se dejó coagular a temperatura ambiente. El suero se separó del coágulo mediante centrifugación y se decantó en botellas estériles. Las muestras de suero se mantuvieron a 2-8°C si se probaban < 24 horas después de la entrega o se mantuvieron a -70°C si se probaban en un día posterior.

30 Recogida de muestras: El investigador recogió muestras tisulares fijadas con formalina de cerebro (1/2 del órgano), cerebelo (1/2 del órgano), tallo encefálico (1/2 del órgano), médula espinal (6 secciones), médula ósea (recójase una sección de hueso largo), amígdala (1 sección), pulmón (1 sección de lóbulo accesorio o zona con lesión), corazón (2 secciones), bazo (1 sección), riñón (1 sección), hígado (1 sección), nódulo linfático (traqueobronquial y mesentérico), intestino delgado (3 secciones de íleon), intestino grueso (3 secciones). Se recomiendan una sección de 2,54 cm (1 pulgada) de pulmón y secciones de 2,54 a 5,8 cm (de una a dos pulgadas) de intestino, de modo que se mantenga una relación 1:10 de tejido fijado a formalina. Todos los tejidos fijados se introdujeron en un recipiente que contenía 10% de solución de formalina tamponada. Para cada lechón, y una muestra de réplica de las secciones listadas anteriormente se recogieron en bolsas estériles separadas.

35 Procesamiento tisular: Las muestras se transportaron el día de la recogida y las muestras se mantuvieron a 2-8°C si se probaban < 24 horas después de la entrega o se mantuvieron a -70°C si se probaban en un día posterior. Los tejidos fijados se mantuvieron a temperatura ambiente.

**Medida del peso**

40 Se tomaron medidas del peso en los lechones en DPC0 el día de la necropsia. Los pesos se tomaron en una balanza calibrada y se registraron en una forma apropiada proporcionada por el centro para animales. Los pesos se usaron para calcular un aumento diario medio.

**Prueba de las muestras**

45 Se realizó PCR del pestivirus sobre todas las muestras. Muestras seleccionadas se cribaron con respecto a enterovirus, calicivirus porcino, virus de gastroenteritis transmisible, *Escherichia coli*, *Salmonella* y/o *Clostridium sp.* u otros agentes infecciosos.

**EJEMPLO 2**

50 Los objetivos de este proyecto eran 1) detectar un patógeno o patógenos potenciales en muestras procedentes de lechones con temblores congénitos y 2) desarrollar un modelo de infección para reproducir la enfermedad. Usando secuenciación de próxima generación, se detectó un pestivirus de linaje divergente en lechones con temblores congénitos. Originalmente, el virus estaba muy estrechamente relacionado con un pestivirus de murciélago, pero ahora está más estrechamente relacionado con un nuevo pestivirus porcino recientemente publicado denominado provisionalmente pestivirus porcino atípico. Una PCR en cuantitativa en tiempo real detectaba el virus en muestras procedentes de lechones neonatos con temblores congénitos de dos granjas separadas, pero no en muestras procedentes de lechones no afectados de la misma granja. Para cumplir el segundo objetivo, cerdas adultas preñadas fueron inoculadas bien con suero que contenía el pestivirus o bien con PBS (control) por vías intravenosa e intranasal simultáneamente con inoculación directa de vesículas amnióticas fetales mediante una técnica quirúrgica guiada por ultrasonidos. Las inoculaciones se realizaron bien a los 45 o bien a los 62 días de gestación. Todas las cerdas adultas

inoculadas con el nuevo pestivirus parían lechones afectados de temblores congénitos mientras que los lechones de control inoculados con PBS no estaban afectados. La gravedad de los temblores para cada lechón se puntuó a partir de videos tomados 0, 1 y 2 días después del parto. La gravedad de los temblores permanecía relativamente constante de 0 a 2 días después del parto para una mayoría de los lechones. La prevalencia de temblores congénitos en camadas inoculadas con pestivirus variaba de 57% (4 de 7 lechones afectados) a 100% (10 de 10 lechones afectados). El virus era detectado coherentemente mediante PCR en tejidos procedentes de lechones con temblores congénitos pero no se detectaba en lechones de control. Muestras positivas mediante PCR en más de 90% de los lechones muestreados incluían tallo encefálico (37 de 41), nódulo linfático mesentérico (37 de 41), nódulo linfático traqueobronquial (37 de 41) y sangre entera (19 de 20). Aunque la primera descripción de temblores congénitos se produjo en 1922, esta es la primera reproducción presentada de temblores congénitos después de la inoculación experimental con un pestivirus porcino de linaje divergente. Son necesarios estudios que investiguen el mecanismo de la enfermedad, la epidemiología y el desarrollo de ensayos de diagnóstico para entender mejor la patofisiología de temblores congénitos debidos a este pestivirus.

### **Secuenciación de Próxima Generación**

Se obtuvieron tejidos porcinos variados (suero, cerebro, cerebelo, médula espinal, fluido cerebroespinal (CSF) y/o pulmón) de tres investigaciones diagnósticas de CT: tejido pulmonar procedente de un solo lechón (ID 20130103); bien tejido cerebral reunido o bien tejido pulmonar reunido procedente de seis lechones (ID 20120705); y CSF (n=2; Granja B), suero (n=2; Granja A y B) y pulmón (n=2; Granja A y B) procedentes de seis lechones diferentes originarios de dos granjas diferentes (ID 2014016573). Con la excepción del tejido pulmonar procedente de la muestra ID 20120705, todas las muestras probadas exhibían secuencia genómica pestiviral al menos parcial. El suero o los homogenados tisulares se resuspendieron en solución salina equilibrada de Hanks (Corning-Cellgro) y se enriquecieron con respecto a ácidos nucleicos protegidos en partículas mediante digestión con una combinación de nucleasas: RNase A (Invitrogen), Baseline Zero DNase (Epicentre) y Turbo DNase (Invitrogen). Los ácidos nucleicos virales se extrajeron mediante el protocolo del fabricante usando Qiagen Viral RNA blood kit. Después de la extracción, los ácidos nucleicos se trataron adicionalmente con Turbo DNase para retirar ADN viral potencial o del hospedador, enriqueciendo así adicionalmente el ARN viral. Se generó ADNc bicatenario a través de transcripción inversa y tratamiento de Klenow (NEB) usando cebado con hexámeros aleatorios.

Las muestras se procesaron con respecto a la secuenciación basada en MiSeq a través de la generación de bibliotecas usando el estuche de preparación de bibliotecas NextEra XT (Illumina) mediante el protocolo sugerido por el fabricante, con sustitución de la elución de la columna (Qiagen, MinElute) en lugar de normalización con cuentas. La biblioteca se desarrolló en el MiSeq usando el estuche 500-cycle (Illumina) y los datos se analizaron usando una combinación de NextGene (versión 2.3.4.2) y el software Sequencher (versión 5.1). Se seleccionaron secuencias de alta calidad como las que contenían una puntuación Q mediana de más de 25 y se recortaron con un corte de no más de 3 sin denominación en el extremo 3' o 3 bases consecutivas con una puntuación Q que medía menos de 16. Las secuencias ensambladas de novo se analizaron mediante comparación con la secuencia del GenBank a través de BLASTn y BLASTx. Se usó el alineamiento ClustalW para el análisis filogenético de la secuencia de 215 aminoácidos del gen NS3 y la secuencia de 170 aminoácidos del gen Npro. Se generaron árboles filogenéticos de mínima evolución a partir de 1.000 réplicas usando el software MEGA 6.0.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa en Cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR)**

Se diseñó una RT-qPCR que elige como diana la región N3S del genoma del pestivirus de linaje divergente. Muestras tisulares (n=362) procedentes de cerdos en desarrollo que se sometían al Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory (ISU VDL) para una prueba diagnóstica convencional se usaron para determinar la frecuencia del pestivirus en este grupo de muestras. También se recogieron dos grupos de muestras de granjas con temblores congénitos. Estas muestras incluían suero, cerebro, cerebelo, tallo encefálico y médula espinal. El primer grupo (Granja A) consistía en 6 lechones preláctantes afectados y 2 no afectados, suero procedente de cinco cerdas adultas de las que se seleccionaban los lechones preláctantes y 5 lechones posláctantes afectados y 2 no afectados de entre 6 y 14 días de edad. El segundo grupo (Granja B: ISUVDL2014016573) consistía en 5 lechones afectados de estado de lactancia desconocido y suero procedente de cinco cerdas adultas con lechones afectados.

El estuche de RT-PCR monoetápica cuantitativa (iTaQ Universal Probes One-Step Kit; BioRad, nº cat 172-5141) se empleó en una reacción de 25 µl que contenía 2 µl de ácido nucleico total extraído, 1,0 µl de sonda (2 µM), 1 µl de cada cebador (5 µM), 12,5 µl de 2X mezcla de RT-PCR, 0,5 µl de transcriptasa inversa iScript y 7,0 µl de agua tratada con DEPC (Tabla 2). La reacción tenía lugar usando un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 (BioRad) bajo las siguientes condiciones: transcripción inversa inicial a 50°C durante 10 min, seguida por desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 s y renaturalización y extensión a 57°C durante 30 s. Para generar datos cuantitativos, se incluyó en cada prueba un ultrámero pestiviral (Integrated DNA Technologies) que abarcaba la región NS3 elegida como diana por los cebadores. Un corte para muestras positivas se estableció a valores de cuantificación del ciclo (Cq) menores de 36.

**Tabla 2. Cebador, Sonda y Secuencias de Ultrámero para PCR en Tiempo Real**

Secuencia	
Pesti_6332_F	TGC CTG GTA TTC GTG GC (SEQ ID NO:23)
Pesti_6455_R	TCA TCC CAT GTT CCA GAG T (SEQ ID NO:24)
Pesti_6351_P	/5Cy5/CCT CCG TCT CCG CGG CTT TGG /3BHQ_2/ (SEQ ID NO:25)
Pesti_ultra	AAC AGG AAA GAA CTG CCT GGT ATT CGT GGC AAC CAA AGA AGC CGC GGA GAC GGA GGC TAA AGA ACT GCG CAC CAG AGG AAT TAA CGC CAC CTA TTC AGG TAT AGA CCC TAA GAC TCT GGA ACA TGG GAT GAC CAA TCA GCC AT (SEQ ID NO:26)

**Modelo de Inoculación en Cerdas Adultas****Animales**

5 Todos los procedimientos estaban aprobados por the Institutional Animal Care and Use Committee of Iowa State University (Número de Registro: 1-14-7907-S 2). Ocho cerdas adultas mestizas identificadas individualmente con 38 días de gestación se obtuvieron de una fuente comercial sin historia previa conocida de CT. El suero de todas las cerdas adultas era negativo para PCV2a, PCV2b, PRRSV, PPV1, PPV5 y el nuevo pestivirus mediante RT-qPCR antes del transporte y la inoculación. Las cerdas adultas individuales fueron asignadas aleatoriamente a uno de tres grupo alojados separadamente [inoculadas simuladamente a los 45 días de gestación (n=1) y 62 días de gestación (n=1), inoculadas con pestivirus a los 45 días de gestación (n=3) e inoculadas con pestivirus a los 62 días de gestación (n=3)] y fueron alimentadas con una dieta nutricionalmente completa a lo largo del período del estudio.

**Inoculación de los Animales**

15 Las cerdas adultas se mantuvieron sin pienso ni agua durante 12 horas antes de la cirugía para reducir el riesgo de regurgitación anestésica. Suero terminal procedente de un cerdo virémico (ISUVDL2014016573) se descongeló a 37°C. El ácido nucleico total se extrajo y se cribó mediante PCR con respecto a la presencia de PCV2a, PCV2b, PRRSV, PPV1, PPV5 y el pestivirus; solo se detectaba el pestivirus (Cq = 27,47). El suero se filtro en 0,2 µm y se diluyó al añadir 6 ml de sueros a 35 ml de PBS IX (Gibco). El día de la inoculación, el inóculo se descongeló y se mantuvo sobre hielo durante el procedimiento de inoculación. Se indujo anestesia general con una inyección intramuscular de una combinación de tiletamina y zolazepam (TELAZOL®), ketamina y xilazina. Después de la inducción anestésica, cada cerda adulta se puso en recumbencia lateral izquierda y el abdomen derecho se preparó para laparotomía aséptica. El abdomen se afeitó para la cirugía y se administró un bloqueo lineal local con lidocaína al 2% antes de la incisión. Se realizó una incisión paramediana de aproximadamente 30 cm ~5 cm lateral al tejido mamario para dar acceso a la cavidad abdominal. El útero se exteriorizó y se usó un transductor ultrasónico de disposición lineal estéril de mano para obtener imágenes de cada unidad fetal y guiar la aguja de inoculación a la vesícula amniótica fetal. Cada vesícula se inoculó con 0,25 ml de inóculo (PBS o suero con pestivirus) usando una aguja de calibre pequeño (22 g) (S2 MP4). La pared abdominal se cerró en tres capas usando poliglactina 910 de tamaño 2. El inóculo también se administró directamente a la cerda adulta a través de una vía intranasal (2 ml) e intravenosa (2 ml) inmediatamente después del procedimiento quirúrgico. Dosis individuales de flunixinomeglumina (BANAMINE-S®) y ácido libre cristalino de ceftiofur (EXCEDE®) se aportaron intramuscularmente inmediatamente después del cierre de la incisión y antes de la recuperación anestésica. La inducción anestésica se producía a las 8:30 AM para la primera cerda adulta el día de la cirugía respectivo. Cada operación llevaba aproximadamente 1 h. La inducción anestésica de la cerda adulta final se producía a las 11:30 AM.

**Observaciones Clínicas, Recogida de Muestras y Necropsia**

35 Después de la inoculación, las cerdas adultas se comprobaron diariamente y se tomaron las temperaturas rectales de 0-7 días después de la inoculación (DPI). Se recogieron material fecal, sangre y frotis nasales de cerdas adultas los DPI 2, 7, 10 y 14 y a continuación semanalmente hasta el parto. En el momento del parto, los lechones se identificaron individualmente y se recogieron suero, frotis nasales y frotis fecales. En un subgrupo de lechones (n=7), se recogió sangre del cordón umbilical. Se tomaron videos de lechones individuales diariamente desde 0-2 días después del parto (DPF). Cuatro investigadores con anonimato para los grupos revisaban los videos y cada lechón recibía una puntuación de la gravedad de los temblores: 0 - ausentes, 1 – fasciculación muscular fina, 2 – temblor leve, 3 – temblor moderado, 4 – temblor grave con cojera pronunciada. A continuación, las puntuaciones se promediaron para asignar a cada lechón una puntuación global de gravedad de los temblores mediante DPF. Se consideraba que los lechones que recibían una puntuación de ≥ 0,75 en DPF 2 estaban afectados. También se registró la presencia o ausencia de abducción de las patas en cada DPF para cada lechón. Las cerdas adultas y los lechones se sacrificaron el DPF 2 a

través de una pistola de perno cautivo y una sobredosis de barbiturato inyectable, respectivamente. En la necropsia, se recogieron suero, cerebro, cerebelo, tronco encefálico, médula espinal, riñón, nódulo linfático mesentérico, nódulo linfático traqueobronquial, timo, corazón y bazo del lechón. En un subgrupo de lechones, se recogieron sangre entera (tubos de EDTA; n=20) y CSF (n=29). También se recogió en la necropsia suero de las cerdas adultas.

5 **Identificación de Pestivirus**

**Secuenciación de Próxima Generación**

10 A través del uso de tecnología de secuencias de próxima generación, un virus estrechamente relacionado con un pestivirus de murciélago chino, y que se sabe ahora que está más estrechamente relacionado con uno presentado recientemente denominado provisionalmente pestivirus porcino atípico, se descubrió a partir de tres investigaciones independientes de la enfermedad del temblor congénito. El genoma casi completo se obtuvo a partir de una de las tres  
 15 investigaciones. Este virus del suero procedente de un animal virémico se usó posteriormente para inoculaciones en animales en este estudio. El análisis filogenético del NS3 y Npro apoya la clasificación del virus identificado en la presente como un miembro de la especie de "pestivirus porcino atípico" putativo (FIG. 5), con 88,0% y 94,6% de identidad de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente. Un análisis retrospectivo del ARN pestiviral mediante RT-qPCR a partir de casos sometidos al ISU VDL indicaba que 21 de 362 muestras (6%) eran positivas. Estos casos eran presentaciones comunes procedentes de piaras que experimentaban signos clínicos variados.

**RT-qPCR**

20 Muestras de lechones procedentes de animales que exhibían temblores congénitos y grupos no afectados se recogieron de dos granjas, Granja A y Granja B. Los animales que eran diagnosticados de temblores congénitos eran positivos para el pestivirus mediante RT-qPCR, mientras que el virus no se detectaba en el sistema nervioso central o el suero de lechones no afectados (Tabla 3). El virus se detectaba en el suero procedente de una sola cerda adulta de la Granja A.

**Tabla 3. Resultados de PCR Cuantitativa en Tiempo Real de Muestras de Lechones de la Granja A y la Granja B.**

Granja	ID Animal	Estado de la Enfermedad <sup>a</sup>	Tipo de Muestra									
			Cerebro		Cerebelo		Tronco Encefálico		Médula Espinal		Suero	
			Cq <sup>b</sup>	SQ <sup>c</sup>	Cq	SQ	Cq	SQ	Cq	SQ	Cq	SQ
	P1	-	U <sup>d</sup>	0	U	0	U	0	U	0	U	0
	P2a	+	U	0	34,18	3,95E+02	35,93	1,36E+02	33,39	6,38E+02	30,64	1,14E+05
	P2b	+	U	0	35,92	1,37E+02	U	0	35,53	1,74E+02	30,14	1,47E+05
	P4a	+	U	0	32,44	1,13E+03	U	0	36,51	9,56E+01	36,44	6,62E+03
	P4b	+	U	0	29,37	2,14E+05	35,41	1,87E+02	U	0	30,97	9,71E+04
A	P5a	-	U	0	U	0	U	0	U	0	U	0
	P6a	+	U	0	33,65	4,76E+02	U	0	33,89	4,71E+02	U	0
	P6b	+	U	0	28,75	2,89E+05	U	0	U	0	31,37	8,00E+04
	1	+	32,65	1,00E+03	U	0	U	0	35,65	1,61E+02	30,92	1,05E+05
	2	+	U	0	32,31	1,23E+05	U	0	35,72	1,54E+02	30,77	1,13E+05
	3	-	U	0	U	0	U	0	U	0	U	0
	4	-	U	0	U	0	U	0	U	0	U	0

Granja	ID Animal	Estado de la Enfermedad <sup>a</sup>	Tipo de Muestra									
			Cerebro		Cerebelo		Tronco Encefálico		Médula Espinal		Suero	
			Cq <sup>b</sup>	SQ <sup>c</sup>	Cq	SQ	Cq	SQ	Cq	SQ	Cq	SQ
	5	+	U	0	30,50	3,69E+03	U	0	35,90	1,38E+02	33,97	2,31E+04
	6	+	ND <sup>e</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	29,40	2,23E+05
	7	+	U	0	32,39	0	U	0	U	0	31,29	8,74E+04
	20	+	26,59	8,36E+05	24,04	2,92E+06	24,56	2,27E+06	25,50	1,42E+06	26,04	1,09E+06
	21	+	30,92	9,96E+04	26,25	9,89E+05	27,41	5,58E+05	26,14	1,04E+06	22,26	6,98E+06
B	22	+	25,79	1,24E+05	29,32	2,19E+05	27,31	5,85E+05	26,14	1,04E+06	22,25	7,04E+06
	23	+	27,51	5,31E+05	23,45	3,91E+06	26,43	9,05E+05	24,46	2,38E+06	22,47	6,31E+06
	24	+	27,93	4,34E+05	24,13	2,79E+06	27,25	6,05E+05	24,10	2,38E+06	22,25	7,04E+06

<sup>a</sup>Presencia (+) o ausencia (-) de temblores congénitos.

<sup>b</sup>Cq = valor del ciclo de cuantificación.

5 <sup>c</sup>SQ = cantidad de partida.

<sup>d</sup>U = "no detectado" después de 40 ciclos.

<sup>e</sup>ND = No realizado.

10 **Modelo de Inoculación en Cerdas Adultas**

**Observaciones y Muestras de las Cerdas Adultas**

15 Una cerda adulta inoculada simuladamente a los 45 días de gestación desarrollaba una fiebre moderada después de la cirugía y abortaba todos los fetos el DPI 3 y 4. Se encontró que una cerda adulta procedente del grupo que se iba a inocular a los 45 días de gestación no estaba preñada en el momento de la inoculación; se retiró del estudio. Las cerdas adultas inoculadas simuladamente e inoculadas con pestivirus no presentaban signos clínicos ni desarrollaban una viremia o difundían el virus a niveles detectables mediante RT-qPCR. Todas las cerdas adultas parían naturalmente. Había un lechón nacido muerto (ID Cerda Adulta 3661) y un feto macerado (ID Cerda Adulta 3500).

**Observaciones y Muestras de los Lechones**

20 Los lechones inoculados simuladamente no tenían signos clínicos coherentes con CT el DPF 0, 1 o 2 (S4 MP4). Una mayoría de los lechones que se incubaban con pestivirus como fetos a los 45 o 62 días de gestación tenía signos clínicos coherentes con CT (S4 MP4). La prevalencia de temblores congénitos (S5 MP4) y abducción de las patas (S6 MP4) en camadas inoculadas con pestivirus variaba de 57% a 100% y de 0% a 40% el DPF 2, respectivamente (Tabla 4). La gravedad de los temblores variaba dentro de las camadas por lechón pero permanecía relativamente constante a lo largo del período de observación de dos días en una mayoría de los lechones (Tabla 5).

25

**Tabla 4. Prevalencia de Temblores Congénitos y Abducción de las Patas en Camadas Inoculadas con Pestivirus el Día 2 Después del Parto**

<i>ID Cerda Adulta / Día de Gestación<sup>a</sup></i>	<b>Temblores congénitos</b>		<b>Abducción de Patas</b>	
	<i>Nº Afectado<sup>b</sup> / Nº en la Camada</i>	<i>Prevalencia (%)</i>	<i>Nº Afectado / Nº en la Camada</i>	<i>Prevalencia (%)</i>
4036/45	5 / 8	62,5	1 / 8	12,5
3992/45	7 / 9	77,7	2 / 9	22,2
3661/62	4 / 6	66,6	0 / 6	0,0
3500/62	10 / 10	100	4 / 10	40,0
4023/62	4 / 7	57,1	0 / 7	0,0

<sup>a</sup>Día de gestación en el momento de la inoculación.

<sup>b</sup>Se consideraba que los lechones estaban afectados por temblores congénitos si la puntuación de la gravedad de los temblores era  $\geq 0,75$ .

**Tabla 5. Puntuación de Temblores Congénitos por Lechón y Días Después del Parto**

<i>ID Cerda Adulta / Día de Gestación<sup>a</sup></i>	<i>ID Animal</i>	<i>Puntuación Promedio de la Gravedad de los Temblores</i>		
		<i>DPF<sup>b</sup> 0</i>	<i>DPF 1</i>	<i>DPF 2</i>
	71	0	0	0
	72	0,25	0	NA
	73	0	0	0
2427/PBS/62	74	0,50	0	0
	75	0	0	0
	124	0,25	0,5	0
	125	0	0	0
	31	2,00	0	0,75
	32	0,25	0,25	0
	33	3,50	4,00	4,00
4036/pestivirus/45	34	0,50	0	0
	35	3,75	4,0	4,0
	36	3,75	4,0	4,0
	37	1,00	0	0,25

*Puntuación Promedio de la Gravedad de los Temblores*

<i>ID Cerda Adulta / Día de Gestación<sup>a</sup></i>	<i>ID Animal</i>	<i>DPF<sup>b</sup> 0</i>	<i>DPF 1</i>	<i>DPF 2</i>
	38	3,50	3,5	3,5
	40	4,00	3,25	3,25
	41	0,25	0	0
	42	3,00	1,75	1,5
	43	2,00	0,25	0,25
3992/pestivirus/45	44	2,50	1,50	1,75
	45	3,00	3,75	4,00
	46	3,25	2,50	2,75
	47	2,25	1,25	1,25
	48	3,00	2,00	2,50
	94	1,00	2,5	3,0
	95	0	NA	NA
	96	2,00	3,00	3,25
3661/pestivirus/62	97	0,75	0	0
	98	2,50	2,0	2,5
	99	2,25	2,50	2,25
	100	0	0	0,25
	89	2,75	2,75	3,25
	90	3,75	3,25	3,50
	111	3,50	3,00	2,50
3500/pestivirus/62	112	1,75	NA	NA
	113	2,50	2,50	3,00
	116	3,25	3,75	4,00
	117	3,50	3,25	3,25

**Puntuación Promedio de la Gravedad de los Temblores**

<i>ID Cerda Adulta / Día de Gestación<sup>a</sup></i>	<i>ID Animal</i>	<i>DPF<sup>b</sup> 0</i>	<i>DPF 1</i>	<i>DPF 2</i>
	118	3,25	4,00	3,75
	121	2,75	1,75	3,00
	122	2,00	2,75	2,75
	123	3,00	2,75	2,75
	114	0,50	0	0,50
	115	1,50	3,50	4,00
	119	1,00	1,50	2,25
4023/pestivirus/62	120	0	0	0,25
	130	1,00	0,50	2,25
	131	0	1,00	0
	132	1,75	0,25	0,75

<sup>a</sup>Día de gestación en el momento de la inoculación.

<sup>b</sup>DPF = Días después del parto.

Se extrajeron ácidos nucleicos virales de tejidos, sueros y sangre entera recogidos y analizados mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Mientras que no se observaban positivos a pestivirus en ningún tejido dentro de la camada inoculada con placebo, casi todos los animales procedentes del grupo inoculado experimentalmente eran positivos en al menos un tejido. El tropismo tisular era amplio ya que se detectaba ARN pestiviral en suero (26 de 41), frotis nasales (12 de 41), heces (14 de 41), suero terminal (34 de 41), cerebro (30 de 41), cerebelo (36 de 41), tronco encefálico (37 de 41), médula espinal (33 de 41), riñón (35 de 41), nódulo linfático mesentérico (37 de 41), nódulo linfático traqueobronquial (36 de 41), timo (37 de 41), corazón (35 de 41) y bazo (37 de 41) mediante RT-qPCR en lechones inoculados con pestivirus nacidos vivos (FIG. 6); no se detectaba ARN viral en las mismas muestras procedentes de lechones inoculados con PBS. Además, se detectaba ARN pestiviral en sangre de cordón umbilical (5 de 7), sangre entera (19 de 20) y CSF (26 de 29) procedentes de un subgrupo de lechones (FIG. 6). El Cq promedio de suero, frotis nasales, CSF, nódulo linfático mesentérico, nódulo linfático traqueobronquial, bazo y sangre de cordón umbilical era menor de 26. El Cq promedio de heces, suero terminal, cerebelo, médula espinal, riñón, timo y corazón variaba de 26 a 28. El cerebro, el tronco encefálico y la sangre entera tenían los valores de Cq promedio más altos (>28). Se detectaba ARN pestiviral lo más comúnmente (>90% de las muestras tomadas) en el tronco encefálico, el nódulo linfático mesentérico, el nódulo linfático traqueobronquial y la sangre entera; menos comúnmente (de 80 a 90% de las muestras tomadas) en suero terminal, cerebelo, médula espinal, CSF, riñón, timo, corazón y bazo; y menos comúnmente (de 29 a 74% de las muestras tomadas) en suero, secreciones nasales, heces, cerebro y sangre de cordón umbilical. Sueros de dos animales (35 y 90) se seleccionaron aleatoriamente para evaluar la estabilidad genómica mediante secuenciación del genoma completo. Ambos animales exhibían cambios fijos de 7 nucleótidos idénticos respecto a la cepa parental que conducen a cuatro cambios de aminoácidos conservados. Al revisar los datos de secuenciación profunda del material estimulante, se observaba polimorfismo en cada una de estas posiciones.

**Análisis**

El síndrome de CT se documentó en primer lugar hace casi 100 años; sin embargo, la mayoría de los brotes contemporáneos se han atribuido a un virus no identificado. Usando secuenciación de próxima generación, un nuevo agente originalmente identificado por estar estrechamente relacionado con un pestivirus de murciélago se detectaba en muestras de lechones con CT.

Se diseñó una RT-qPCR que elegía como diana la porción N3S del genoma del pestivirus de linaje divergente a fin de detectar ARN viral en tipos de muestras múltiples y variados. Un análisis retrospectivo detectaba ARN pestiviral mediante RT-qPCR en 6% (21 de 362) de muestras procedentes de piaras que experimentaban signos clínicos variados que sugerían que el virus está presente en tejidos procedentes de esta muestra ajustados a una baja prevalencia. Se seleccionaron muestras procedentes del estudio de inoculación basándose en signos clínicos de CT y distribución tisular y sitios de replicación de CSFV. Muestras tisulares procedentes de lechones con CT de dos granjas no relacionadas contenían ARN viral que se detectaba coherentemente en suero y tejido del sistema nervioso central sugiriendo que el virus tiene una distribución sistémica aunque impacta clínicamente en la función del sistema nervioso central. Esto es apoyado adicionalmente por la distribución tisular de ARN viral en los lechones inoculados con pestivirus. No se determinaba un sitio de replicación específico, ya que todos los tejidos probados tenían niveles similares de ARN pestiviral detectable. Esto puede sugerir que la replicación viral se produce sistémicamente y puede incluir células mononucleares de sangre periférica o células endoteliales similares a CSFV.

El pestivirus usado para este modelo de inoculación era suero virémico ya que los intentos de cultivo de virus *in vitro* no han sido satisfactorios. El estado inmunitario de las cerdas adultas en este estudio no se conoce debido a la falta de un ensayo serológico para este virus recientemente descubierto. Para evitar una posible interferencia a partir de anticuerpos antipestivirales en la cerda adulta, las vesículas amnióticas fetales se inocularon directamente, ya que la placenta porcina no permite la transferencia de anticuerpos de la madre a los fetos.

Aunque una cerda adulta inoculada con PBS abortaba como resultado del procedimiento quirúrgico, no se observaron diferencias clínicas entre cerdas adultas inoculadas simuladamente y con pestivirus. Fetos nacidos muertos, momificados o macerados no se han presentado previamente con brotes de CT. El único nacido muerto en una camada y el único feto macerado en otra camada de cerdas adultas inoculadas con pestivirus se consideraban fortuitos y probablemente no un resultado de la infección fetal. A pesar de la inoculación IN e IV, las cerdas adultas no desarrollaban una viremia detectable o difundían el virus a niveles detectables por RT-qPCR. Por lo tanto, bien las cerdas adultas no se infectaban después de la estimulación o bien las pruebas diagnósticas disponibles eran insuficientes para detectar la infección.

Para que se manifieste CT, es probable que se deba producir infección fetal antes del desarrollo de inmunocompetencia fetal que se produce alrededor de 70-80 días de gestación en lechones. En este estudio, los fetos tanto con 45 como con 62 días de gestación eran sensibles a la infección con el pestivirus de linaje divergente que daba como resultado CT en una mayoría de los lechones infectados. La selección de estos dos momentos de gestación se basaba en una viremia aproximada de este pestivirus basada en CSFV que se producía antes del desarrollo de inmunidad fetal (día 45 de gestación) y el desarrollo del sistema nervioso central fetal (día 62 de gestación). Las infecciones pestivirales *in utero* en otras especies en diferentes momentos gestacionales tienen diferentes resultados clínicos incluyendo insuficiencia reproductiva, malformaciones congénitas o inmunotolerancia, con lo que un animal infectado persistentemente puede propagar el virus a lo largo de su vida. En este estudio, un número de lechones inoculados con pestivirus nacía con abducción de las patas. Esta afección se observa comúnmente en cerdos; sin embargo, la patogénesis y las etiologías actualmente son especulativas. El papel, si existe, de este pestivirus en la abducción de las patas, la insuficiencia reproductiva en cerdas adultas o la capacidad para la infección *in utero* para dar como resultado animales infectados persistentemente requiere investigación adicional.

En general, la enfermedad clínica reproducida en la presente imita brotes presentes en la naturaleza con variación en la prevalencia de CT entre camadas y la gravedad de los signos clínicos dentro de camadas. Se detectaba ARN viral en todos los lechones con CT. Por otra parte, se detectaba ARN viral en 41 de 42 lechones inoculados con pestivirus nacidos vivos. De los lechones inoculados con pestivirus nacidos vivos, once no tenían CT el DPF 2 o DPF 0 (95), y se detectaba ARN viral en todos los lechones no afectados inoculados con pestivirus menos uno (95). Sin embargo, el mecanismo de la disfunción del sistema nervioso central en una mayoría de lechones pero no todos los lechones infectados es actualmente desconocido. La ecología y la patogénesis de la interacción hospedador-virus es indefinida en este punto pero intrigante. La investigación del papel de la infección persistente o la respuesta inmunitaria difuncional en la expresión clínica de CT y el mecanismo de la disfunción del sistema nervioso central está garantizada. La bibliografía relativa a los mecanismos de trastornos temblorosos en seres humanos y animales es limitada a pesar de la gran prevalencia e importancia de esta sintomatología en medicina humana y veterinaria.

Este estudio identificaba un pestivirus porcino divergente descrito recientemente en lechones con CT y no en grupos no afectados y usaba este virus para reproducir CT a través del desarrollo de una técnica de inoculación innovadora. Este desarrollo satisfactorio de técnicas de aislamiento viral, ensayos de anticuerpos específicos, técnicas de detección *in situ* y herramientas moleculares refinadas conducirá indudablemente a una mejor comprensión de la patogénesis y la epidemiología de este virus.

### **Ejemplo 3**

El objetivo de este estudio es evaluar la eficacia de una vacuna pestiviral cuando se administre a madres sin pestivirus o seronegativas.

#### **Diseño del Estudio**

Se usó un total de 10 madres para este experimento. Las madres se aleatorizaron en tres grupos. Los animales del Grupo 1 (n=4) se vacunaron el D0 y D14 con una vacuna pestiviral prototípica justo antes o poco después de la reproducción. Los animales del Grupo 2 (n=4) se vacunaban con una preparación vacunal prototípica placebo. Los

animales del Grupo 3 (n=2) permanecían sin vacunar (controles estrictos). Los animales de cada grupo se mantenían en habitaciones separadas. Aproximadamente a los 42 días de gestación, las madres del Grupo 1 y 2 se estimularon con pestivirus mediante una vía tal como inoculación intravenosa, intramuscular, intranasal, intravaginal o intrauterina. Después de la estimulación, las madres se comprobarán diariamente con respecto a signos clínicos a lo largo del estudio. Se recogieron muestras séricas, fecales y nasales y las temperaturas rectales dos veces a la semana a lo largo de la gestación. Aproximadamente a los 80 días de gestación, se realizó una evaluación ultrasónica sobre todas las cerdas adultas. En el momento del parto, los lechones se evaluaron visualmente con respecto a la presencia de signos clínicos. Se recogieron suero, sangre del cordón umbilical y placenta para la detección del pestivirus. Los lechones se procesaron y se tomaron grabaciones de video. Los lechones se mantuvieron con la cerda adulta. Cuando los lechones tienen 24 horas de edad, los lechones se evaluaron visualmente con respecto a la presencia de signos clínicos y se tomaron grabaciones de video. Los lechones fueron sacrificados a las 48 horas de edad. Antes de la eutanasia, los lechones se evaluaron visualmente con respecto a la presencia de signos clínicos y se capturarán grabaciones de video. Se recogieron tejidos seleccionados y sangre en el momento de la necropsia. Las muestras se cribaron con respecto al ARN pestiviral y anticuerpos antipestivirales.

5  
10  
15

Tabla 6. Diseño experimental

Grupo	n	Vacunación (D0, D14)	Estimulación (~42 días de gestación)
1	4	Vacunal pestiviral prototípica	Sí
2	4	Ninguna	Sí
3	2	Estricta	No

Tabla 7. Esquema de episodios clave en el que DPC se refiere a días después de la estimulación

Día del Estudio	Episodio del Estudio
TBD	-Las madres llegan al ISU -Evaluación de las madres
D0-D14	-Cuadro de alimentación para todas las madres -Observaciones clínicas diarias
D18-D24	-Comprobación del estro con el macho y reproducción de todas las madres
D0, D14	<b>-Vacunación de las madres</b> -Recogida de muestras séricas, nasales y fecales antes de la vacunación
D54	-Comprobación de la preñez en todas las madres
D66 (~día 42 de gestación)	<b>-Madres estimuladas</b> -Recogida de muestras séricas, nasales y fecales antes de la estimulación
~D137 (día del parto)	-Día de parto esperado -Procesamiento de lechones

Día del Estudio	Episodio del Estudio
	-Video de todos los lechones en el momento del parto -Recogida de sangre de cordón umbilical, y placenta -Recogida de muestras sanguíneas, nasales y fecales de los lechones
~D138 (24 h después del parto)	-Video de todos los lechones en el momento del parto -Recogida de muestras sanguíneas, nasales y fecales de los lechones
~D139 (48 h después del parto)	-Video de todos los lechones en el momento del parto -Recogida de muestras sanguíneas, nasales y fecales de los lechones -Necropsia de todos los lechones y las cerdas adultas (recogida de tejidos)

Para asegurar el anonimato, la persona (administrador) que administra la vacuna de la presente invención y el control no era la misma persona responsable de la observación clínica y el muestreo de los animales de estudio. Las pruebas de laboratorio eran las mismas que se describen en el Ejemplo 2.

**5 Ejemplo 4**

El principal objetivo de este estudio era determinar la viabilidad de inducir una respuesta serológica específica de pestivirus después de la administración de vacuna viral entera inactivada. Específicamente, animales no tratados se expusieron a una inyección intramuscular de virus inactivado concentrado y se evaluaron mediante ELISA serológico antes y después de la vacunación.

10 Un nuevo virus muy estrechamente relacionado con un pestivirus de murciélago chino se descubrió usando una tecnología de secuenciación profunda a partir de múltiples casos de investigación de brotes. Las historias clínicas de estos casos incluían temblores congénitos (2 casos), lechones anémicos (1 caso) o lechones no viables que se cree que están asociados con PCVAD (1 caso). Basándose en los hallazgos, se diseñó una qPCR y se determinó la prevalencia del virus identificado en dos grupos de muestra recogidos de the Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory (ISU VDL). Se encontró que la prevalencia aparente era 7,3% (8/110) en un grupo de homogenados pulmonares y 5,2% (13/252) en un grupo de muestras clínicas procedentes de casos con una historia de poliserositis. Se recogieron muestras adicionales de dos granjas con una historia clínica de temblores congénitos a través de la colaboración con un miembro de la facultad ISU VDL (Dr. Paulo Arruda). Estas muestras se usaron para la inoculación de cerdos y se generó suero que contenía altos niveles de virus (Ejemplo 1). En un estudio de seguimiento, se demostraba que la inoculación intrauterina de suero a madres preñadas daba como resultado altos porcentajes de cerdos nacidos con temblores congénitos (Ejemplo 2). Debido a la capacidad del pestivirus para provocar enfermedad clínica, es interesante desarrollar una vacuna. Se incluyó en este estudio una vacuna inactivada convencional.

25 Se incluirá en el estudio una vacuna inactivada convencional. Además, se incluirá en el estudio un vector viral. Como el uso de vectores virales vivos para la expresión de antígenos pertinentes es un componente clave de la estrategia Lead2Grow, este estudio proporcionará una evaluación del vector en cerdos. Este estudio utilizará el vector adenoviral canino (CAV-2; autorizado para el uso en el CAV-2 Solo-Jec) que expresa la proteína E2 del pestivirus. El vector es competente para la replicación y se establece como hipótesis que induce una amplia respuesta inmunitaria de larga duración. Una construcción de CAV adicional que expresa un gen HA de gripe A se incluirá como un control de la construcción.

**Criterios de inclusión de animales**

35 Como el estudio se realizaba en animales que nacían bajo condiciones BSL2 y actualmente no están disponibles ensayos serológicos para pestivirus, no se realizaba un precribado de muestras séricas. Solo los cerdos que estaban sanos en el momento de la vacunación se incluían en el experimento. Si en el momento de la vacunación el investigador apreciaba animales que estaban enfermos, los animales no se vacunaban y se sacrificaban compasivamente.

**Cuidado de los animales**

Todos los animales se alojaban en el centro para animales de Sioux Center, IA a lo largo de la duración del estudio. Los animales se alimentaron con una ración comercial que fuera apropiada para su tamaño, edad y condición según prácticas de cría de animales aceptables para la región (se pueden incluir antibióticos). El agua estaba disponible a voluntad. El espacio de suelo y de comederos cumplía o superaba los requisitos del Consorcio "Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching", tercera edición, enero de 2010.

5 No se administraban otros productos biológicos o farmacéuticos a los animales de prueba sin una aprobación previa por el monitor del estudio.

**Criterios de retirada después de la inclusión**

10 Cualquier animal moribundo se sacrificó a discreción del veterinario/investigador responsable. Cualquier animal moribundo se definía como un animal que fuera reacio a comer o beber o esté gravemente deshidratado debido a signos clínicos graves. Cualquier animal que muriera o fuera sacrificado a lo largo del período del estudio fue sometido a necropsia por una veterinario. La necropsia se realizó como se describe posteriormente. El monitor y el investigador se consultaron para determinar si los datos procedentes de los animales de prueba retirados se incluían en los análisis de datos y el informe final.

15 **Eliminación de los animales de estudio**

Todos los animales se sacrificaron compasivamente, se contabilizaron y se eliminaron mediante cremación al final del estudio. Todos los procedimientos se realizaron según se describe en los SOPs del centro.

**Diseño Experimental**

**Descripción General**

20 Este experimento se diseñó para evaluar la respuesta serológica de vacunas pestivirales prototípicas en animales convencionales. Véase la Tabla 8 posterior para una explicación de los grupos experimentales.

25 En el momento del destete, un total de seis animales, de aproximadamente seis semanas de edad, se aleatorizó en el Grupo 1 y 2 y se le administró una dosis de 2 ml bien de vacuna o bien de placebo según la Tabla 8. Los animales se aleatorizaron y se mezclaron en jaulas separadas dentro de la misma habitación. Los animales del Grupo 3 se mezclaron en una habitación separada. Se registraron observaciones de la salud general a lo largo del estudio y no se observaron reacciones adversas. Aproximadamente a los 14 días después de la vacunación, se recogió suero y se mantuvo a 4°C hasta que se completaba el procesamiento para evaluación serológica. Se administró una vacunación de refuerzo de materiales idénticos 21 días después de la vacunación primaria. Se recogió suero de los animales 13 días después de la dosis de refuerzo (día 34).

30 Se ensayaron muestras de suero con respecto a la evidencia de seroconversión según estuvieran disponibles los ensayos. Se recogieron frotis orales, nasales y fecales de los cerdos diariamente en el Grupo 3 desde D0 - D7. Las muestras se ensayaron con respecto a la presencia de CAV vivo. Las zonas de inyección se observaron con respecto a reacciones durante un mínimo de tres días después de la administración de la vacuna. Los animales se sacrificaron compasivamente al final del experimento. Véase la Tabla 9 posterior para una visión general de los puntos de acción del estudio y los detalles específicos del procedimiento.

35

Tabla 8. Diseño experimental

Grupo	Habitación	N (lechones)	Tratamiento con vacuna (6 y 9 semanas después del parto)	Dosis/Vía
1	1	4	Vacuna pestiviral prototípica inactivada	2 ml/IM
2	1	8	Placebo (solución salina tamponada con fosfato + Emulsigen D al 12,5%)	2 ml/IM
3	2	~7	Vacuna prototípica pesti-CAV-2	2 ml/IM

Tabla 9. Esquema de episodios clave por habitación

Día de Estudio	Episodio del Estudio	Prueba
TBD	-Realícese GHO diariamente hasta D0	Ninguna
D0	<b>-Vacunación nº 1</b> -Observaciones de las zonas de inyección durante tres días después de la vacunación -Recogida de suero de todos los animales	Muestra de suero: ensayo serológico
D0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	-Recogida de frotis orales, nasales y fecales de animales del Grupo 3	Muestras de frotis: Muestras conservadas para la futura prueba/evaluación de la propagación
D21	<b>-Vacunación nº 2</b> -Recogida de suero de los animales -Observaciones de las zonas de inyección durante tres días después de la vacunación	Muestra de suero: ensayo serológico
D0-D35	Observaciones de la salud general (1 x diariamente)	Ninguna
D35	<b>-Necropsia</b> -Recogida de suero terminal (1 x botella de 250 ml) de todos los animales	Muestra de suero: ensayo serológico

**Material de la Vacuna**

El sobrenadante procedente de células SK6 infectadas se concentró 10 veces mediante ultracentrifugación y se inactivó con solución de BEI 5 mM durante 6 horas a 37°C. La vacuna se formuló con Emulsigen D al 12,5% almacenada a 4°C hasta el momento de la administración. Los cerdos del Grupo 2 recibían material de placebo (solución salina tamponada con fosfato + Emulsigen D al 12,5%). Se administró una dosis de 2 ml de la vacuna apropiada en la musculatura del cuello usando una aguja y una jeringa estériles de tamaños apropiados.

**Vacunación**

Antes de la administración de cualquier material vacunal, el investigador o la persona designada examinaba a todos los animales con respecto a la salud global y la inclusión en el estudio. El D0 y D21, se administró una dosis de 2 ml de la vacuna apropiada bien en la musculatura del cuello usando una aguja y una jeringa estériles de tamaños apropiados o se administró en la nariz (1 ml por fosa nasal) usando una jeringa y una cánula estériles. Para las inyecciones IM, se usó la musculatura de la derecha del cuello para la inyección el D0, y se usó la musculatura de la derecha del cuello para la inyección el D21. El número de lote, la cantidad de dosificación, los números de identificación de los animales y la cronología de la administración del material vacunal se registró en el registro de confirmación de vacunas.

**Observaciones clínicas**

Durante el período de vacunación, los animales se evaluaron diariamente usando un formulario de observación de la salud general. Las superficies de las zonas de inyección se comprobaron durante un mínimo de tres días después de la vacunación. Si se presentaban lesiones en las superficies de las zonas de inyección, las superficies se comprobaban hasta que la lesión desapareciera o hasta la finalización del estudio.

**Recogida de Sangre**

Los días de recogida de sangre, de tres a nueve ml de sangre entera venosa fueron recogidos por el investigador o la persona designada a través de la vena cava anterior. Se usó una aguja VACCUTAINER® estéril de 18-20 g x 2,54 cm (1 pulgada) a 3,81 cm (1,5 pulgadas), un soporte para agujas VACCUTAINER® y tubos separadores de suero (SST)

de tamaño apropiado. La sangre se transportó durante la noche a BIVI Biological R&D en Ames, Iowa sobre hielo el día de recogida, si se recogía de lunes a jueves. Si el suero se recogía el viernes o el sábado, el suero se separaba del coágulo mediante centrifugación y se decantaba a un vial criogénico con tapón de rosca etiquetado con al menos el número del estudio, el día del estudio y la ID del animal. Las muestras de suero procesadas se almacenaron a -70°C y se transportaron sobre hielo seco a Ames al día siguiente de transporte. En BIVI-Ames, las muestras de suero se siguieron a través del sistema de manejo electrónico FreezerWorks. Las muestras en BIVI-Ames se mantuvieron a 2-8°C si se probaban < 48 horas después de la entrega o se mantenían a -70°C si se probaban en un día posterior. Las muestras se almacenaron durante un mínimo de seis meses después de la finalización de este estudio.

### **Muestras de Frotis**

Los materiales se transportaron durante la noche a BIVI Biological R&D en Ames, Iowa sobre hielo. Si la recogida se producía en una semana, las muestras se congelaban a -70°C y se transportaban sobre hielo seco el siguiente día de muestreo. Las muestras en BIVI-Ames se mantuvieron a 2-8°C si se probaban < 24 horas después de la entrega o se mantuvieron a -70°C si se probaban en un día posterior. Las muestras se siguieron a través del sistema de manejo electrónico FreezerWorks. Las muestras se almacenaron durante un mínimo de seis meses después de la finalización de este estudio.

### **Necropsia**

Si, durante el estudio, había un animal moribundo, el animal era sacrificado y sometido a necropsia a discreción del veterinario responsable. Se recogieron muestras apropiadas para determinar la causa de la muerte. Las muestras se pueden enviar a un laboratorio de diagnóstico para una prueba confirmatoria.

Después de la prueba, los animales se anestesiaron profundamente por los SOP's del centro y se recogieron de cada animal 1 x botella de centrifuga de 250 ml de sangre (captura libre). El animal fue sacrificado siguiendo los SOPs del centro y se palpó la zona de inyección. Si las reacciones de la zona de inyección se palpan sin detalle en el momento de la necropsia, se recogía una muestra (reciente y fijada). Si se presentaban signos clínicos en el animal durante el estudio o había evidencia de enfermedad clínica, el animal se sometía a necropsia. Se recogieron muestras apropiadas para determinar la causa de la enfermedad. Las muestras se pueden enviar a un laboratorio de diagnóstico para una prueba confirmatoria.

### **Procedimiento de desinfección, entrada y trabajo de las habitaciones**

Las vacunas prototípicas no se consideran infecciosas para los seres humanos. Se usaban guantes, mascarillas y TYVEK® desechable cuando se trabajaba con animales. Las botas y el equipo protector personal (PPE) eran específicos de cada habitación. Se requería una ducha entre el trabajo realizado en animales del Grupo 3 y los animales de los Grupos 1 y 2. No se permitía la transferencia de suministros o PPE entre habitaciones. La desinfección del centro y el equipo era detallada y se hacía constar en el informe del investigador.

### **Respuesta Serológica**

Suero centrifugado se absorbió contra células pulmonares primaria porcina para reducir el fondo del ensayo de absorbancia con enzimas ligadas (ELISA). Las placas de ELISA se revistieron con 300 ng de pestivirus inactivado concentrado. Los sueros de prueba absorbidos procedentes de animales vacunados, animales tratados con placebo, sueros de controles positivos convalecientes y sueros procedentes de animales sin tratar se evaluaron por duplicado con los datos resumidos en la FIG. 7. Todos los sueros recogidos de todos los grupos eran negativos mediante ELISA el día 0 (OD <0,15). A los 13 días después de la inoculación de refuerzo de pestivirus inactivado, los cuatro animales exhibían una fuerte respuesta serológica mientras que ninguno de los controles tratados con placebo comparados superaba el umbral de OD 0,7 para el ensayo. Usando una prueba de la suma de rangos exacta de Wilcoxon, había un incremento estadísticamente significativo en la OD dentro del grupo vacunado en comparación con el placebo (valor de  $p = 0,004$ ), indicativo de una respuesta serológica específica al pestivirus.

### **Ejemplo 5**

El principal objetivo de este estudio era aislar y replicar productivamente el nuevo pestivirus *ex vivo*. Específicamente, se conseguía propagación viral en células derivadas de la especie hospedadora natural (porcina) y se comprobaron a través de técnicas biológicas moleculares.

### **Preparación de Inóculos**

Tejidos de lechones infectados procedentes del Ejemplo 2 se recogieron y se pesaron individualmente, y se añadió a cada uno medio esencial mínimo (MEM) modificado con SAFC para un peso:volumen final de 10%. Los tejidos se dispersaron mediante agitación a alta velocidad con cuentas metálicas, se clarificaron mediante microcentrifugación y se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm. Adicionalmente, se recogió individualmente sangre terminal de lechones infectados con pestivirus del Ejemplo 2. Cada uno de los homogenados tisulares y las muestras de suero se ensayó con respecto a la presencia y la concentración relativa de pestivirus usando qPCR. Las muestras con los títulos más altos se reunieron basándose en el tipo de muestra procedente de homogenados de suero terminal, bazo y riñón. Estas fracciones reunidas se usaron posteriormente como inóculo.

### **Inoculación de Tejidos Primarios Porcinos**

Se realizaron intentos de desarrollo viral usando el inóculo descrito anteriormente sobre cultivos celulares tanto de pulmón porcino embrionario primario como de riñón porcino embrionario primario. Los cultivos celulares primarios se prepararon a partir de tejidos recogidos de cerdos privados de calostro derivado de cesárea (CDCD).

5 El inóculo se diluyó con un volumen igual de MEM y se esterilizó al hacerlo pasar a través de filtros de 0,8 µm/0,2 µm. Las muestras se diluyeron adicionalmente bien 1:2 o bien 1:10 antes de la inoculación en un intento de retirar cualquier toxicidad asociada a suero o células hospedadoras.

10 El cultivo se realizó en medio de desarrollo (MEM con 10% de suero bovino fetal irradiado y 2,5% de HEPES 1 M). Después de siete días de cultivo, los materiales se sometieron a 3 ciclos de congelación/descongelación y a continuación se inocularon sobre células recientes al permitir la infección viral durante 1 hora a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% mientras se sacudían. Después de 1 hora, el inóculo se retiró y se reemplazó por medio de desarrollo. El pase continuaba durante 11 rondas en células pulmonares primarias y 4 rondas en células renales primarias. Los valores liminares del ciclo para las células renales primarias variaban entre 21,3 – 22,5, indicativo de replicación productiva. Los umbrales del ciclo para pulmón primario también son indicativos de replicación viral productiva y se resumen en la Tabla 8.

15 Tabla 8. Diseño experimental

Tipo de célula para el pase viral	Pase viral	Valor de Ct por qPCR del pestivirus
Pulmón primario	P1	28,6
Pulmón primario	P4	21,6
Pulmón primario	P7	20,9
Pulmón primario	P11	21,8
SK6	X+1	22,6
SK6	X+4	22,0
SK6	X+10	17,2
SK6	X+14	16,45

**Inoculación de Células Porcinas Inmortalizadas**

20 De forma similar a las condiciones de inoculación originales de células primarias, células renales porcinas inmortalizadas (SK6) se inocularon al añadir sobrenadante procedente del cultivo pulmonar primario del pase 11 (congelado/descongelado durante tres ciclos) y se incubaron durante 1 hora a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% mientras se sacudían. Después de 6 días de incubación a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%, el material se hizo pasar a células SK6 recientes del mismo modo. Se extrajeron ácidos nucleicos de cada pase después de 14 pases y se comprobaron mediante qPCR. Tras el pase en serie, los umbrales del ciclo disminuían (véase la Tabla 8) hasta ~17, indicativo de un incremento aproximado de 10 veces en el título viral. **Inactivación de la Recolección Viral**

25 Los sobrenadantes de las células SK6 del pase 11 se reunieron y se concentraron ~10 veces a través de centrifugación a alta velocidad para aglomerar el virus. Las pellas virales se resuspendieron en ~1/10<sup>o</sup> del volumen original de tampón inerte (1X solución salina tamponada con fosfato). El virus concentrado se inactivó usando etilenimina binaria (BEI) ciclada en una concentración final de 5 mM durante 6 horas y agitación constante a 37°C. Tras finalizar la inactivación, la BEI se inactivó con solución de tiosulfato sódico (17% en volumen) con incubación a 37°C durante 15 minutos. El pestivirus inactivado se formuló con una concentración final de Emulsigen D de 12,5% y se usó como candidato de  
30 vacuna putativo en el Ejemplo 4.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un pestivirus inactivado que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 1 según se define en las páginas 9 a 13.
- 5 2. Una composición que comprende un pestivirus inactivado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO:2 según se define en las páginas 13-14.
3. La composición según la reivindicación 1 o 2, en la que el pestivirus es un pestivirus químicamente inactivado, y en la que el pestivirus se inactiva mediante tratamiento con un agente inactivante seleccionado del grupo que consiste en etilenimina binaria, etilenimina, acetiletilenimina, beta-etilenimina, beta-propiolactona, glutaraldehído, ozono y formaldehído, o en la que el pestivirus es un pestivirus físicamente inactivado, y en la que el pestivirus se inactiva mediante tratamiento con radiación UV, radiación de rayos X, radiación gamma, congelación-descongelación y/o calentamiento.
- 10 4. La composición según la reivindicación 1 o 2, que comprende además un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en donde el portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable es un adyuvante, opcionalmente en donde el adyuvante es un adyuvante basado en una emulsión de aceite en agua.
- 15 5. Una composición que comprende un pestivirus atenuado que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO:1 según se define en las páginas 9 a 13.
6. Una composición que comprende un pestivirus atenuado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO:2 según se define en las páginas 13-14.
- 20 7. La composición según la reivindicación 5 o 6, que comprende además un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en donde el portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable es un adyuvante, opcionalmente en donde el adyuvante es un adyuvante basado en una emulsión de aceite en agua.
8. La composición según la reivindicación 5 o 6, en la que el pestivirus está en forma criosecada y/o en donde la composición comprende al menos aproximadamente  $10^4$  partículas virales.
- 25 9. Una composición que comprende un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO:3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o 21 según se definen en las páginas 14-21.
10. Una composición que comprende un vector que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO:4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 22 según se definen en las páginas 14-21.
11. La composición según la reivindicación 9 o 10, en la que el vector es un vector de expresión baculoviral o un vector adenoviral canino.
- 30 12. Una composición para el uso en un método para proteger a un lechón contra una enfermedad asociada con pestivirus, en donde el método comprende administrar a una cerda adulta o una cerda joven preñada o a una cerda adulta o una cerda joven antes de la reproducción la composición según la reivindicación 1, 2, 5, 6, 9 y/o 10, en una cantidad suficiente para proteger al lechón.
13. La composición para el uso según la reivindicación 12, en la que la enfermedad es temblor congénito.
- 35 14. La composición para el uso según la reivindicación 12, en la que el método comprende administrar la composición a una cerda adulta o una cerda joven preñada o en la que el método comprende administrar la composición a una cerda adulta o una cerda joven antes de la reproducción, opcionalmente en la que el método comprende administrar la composición a la cerda adulta o la cerda joven intramuscularmente.
- 40 15. La composición para el uso según la reivindicación 12, en la que la administración es una primera administración, y en la que el método comprende además una segunda administración de una a tres semanas después de la primera administración.

FIG. 1

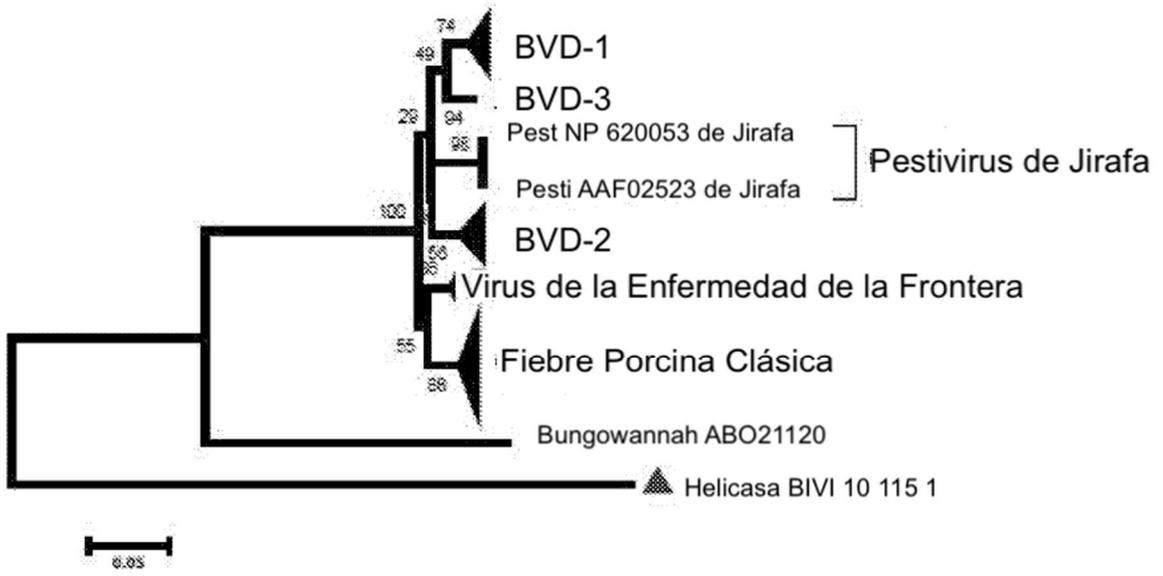


FIG. 2

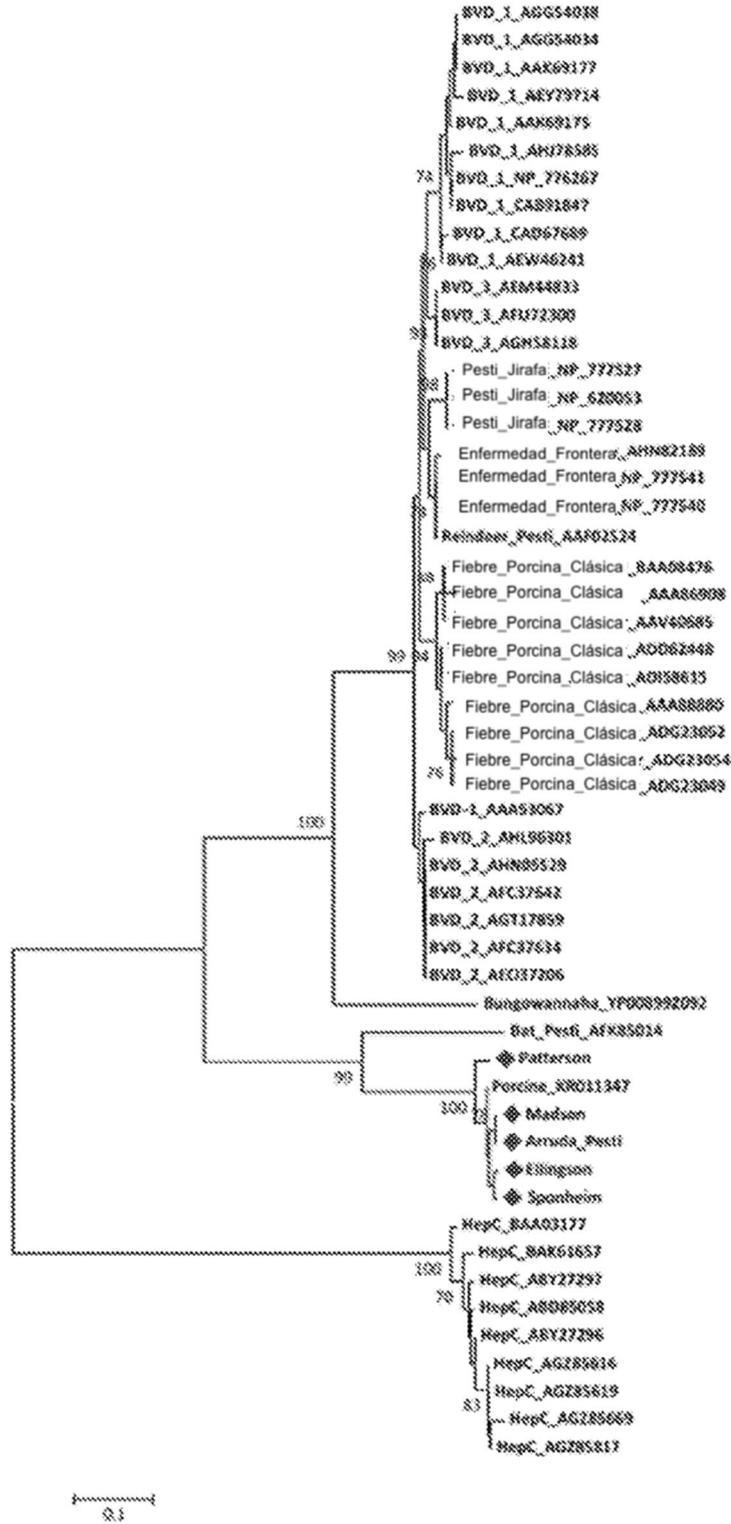


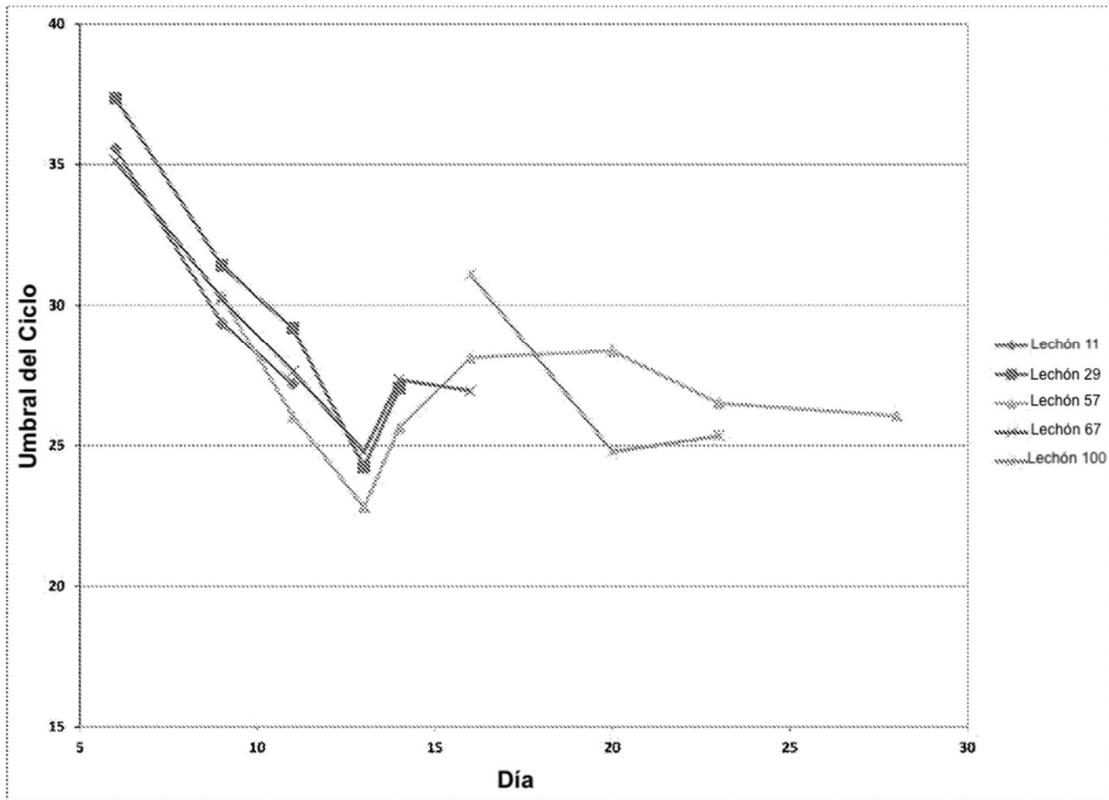
FIG. 3

Identidad de Aminoácidos

	Patterson	Sponheim	Madson	Ellingson	Arruda
Patterson		95,6%	95,1%	98,3%	95,6%
Sponheim	93,9%		98,3%	97,1%	98,6%
Madson	83,7%	89,2%		95,9%	100%
Ellingson	98,5%	93,4%	88,7%		97,5%
Arruda	88,1%	88,1%	99,1%	88,9	

Identidad de Nucleótidos

FIG. 4



FIGs. 5A y 5B

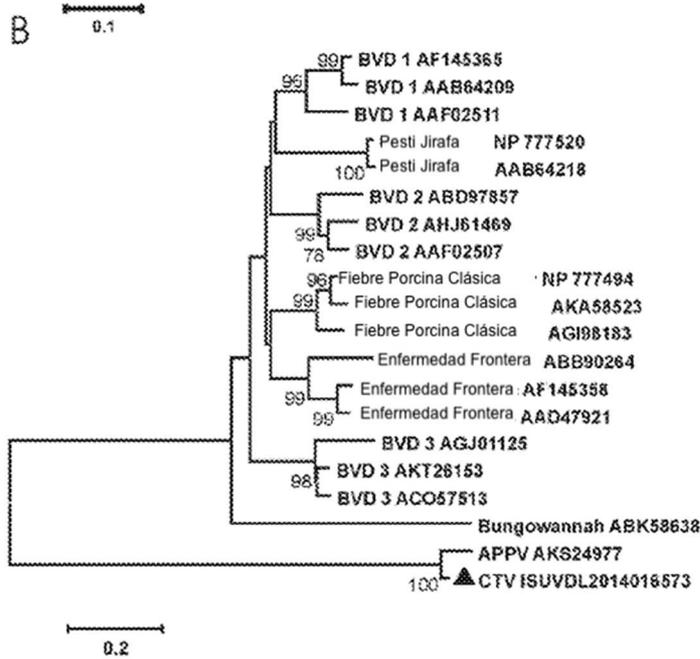
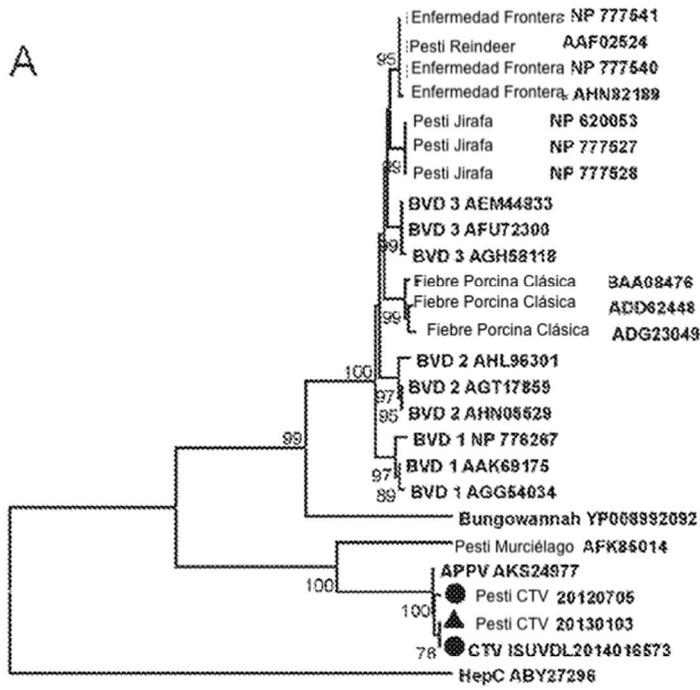


FIG. 6

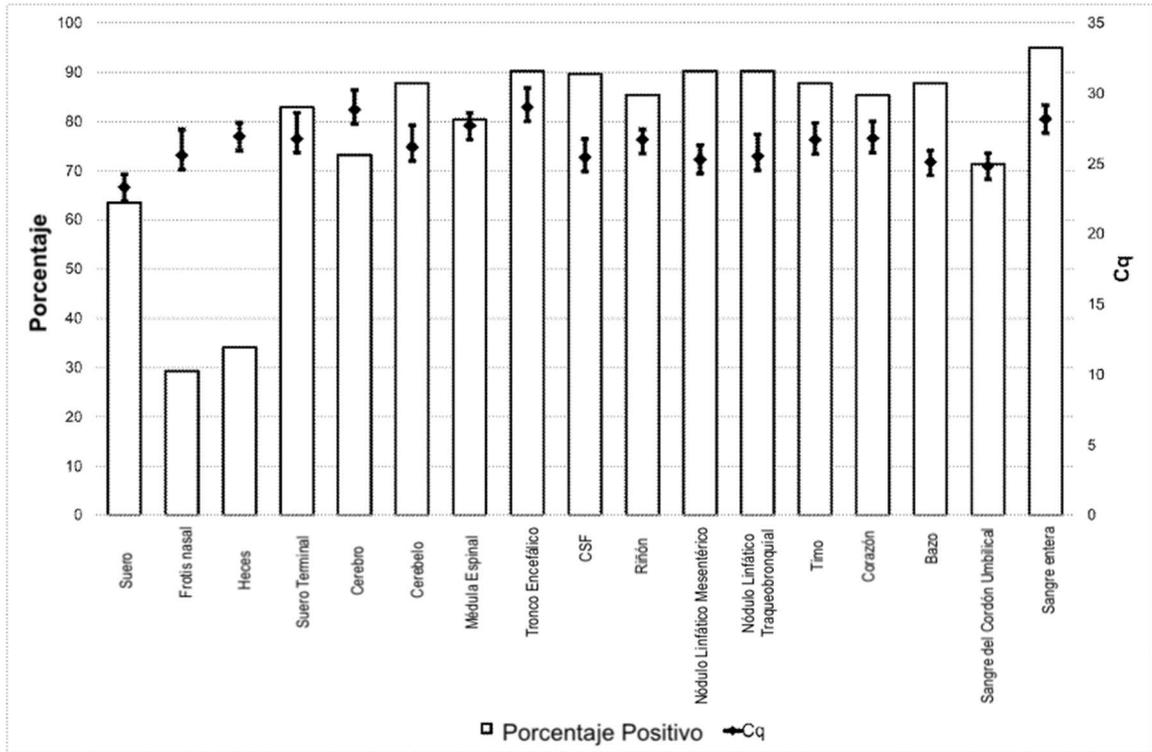


FIG. 7

