



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 343 371**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06824866 .5**
(96) Fecha de presentación : **30.08.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1929047**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2008**

(54) Título: **Procedimientos y composiciones para la vacunación de animales con antígenos de VSRRP con una inmunogenicidad mejorada.**

(30) Prioridad: **30.08.2005 US 712357 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.07.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.07.2010

(73) Titular/es:
**Board of Regents of the University of Nebraska
Regents Hall, 3835 Holdredge Street
Lincoln, Nebraska 68583, US**

(72) Inventor/es: **Ansari, Israrul, H.;
Osorio, Fernando, A. y
Pattnaik, Asit, K.**

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 343 371 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

Procedimientos y composiciones para la vacunación de animales con antígenos de VSRRP con una inmunogenicidad mejorada.

Declaración en Relación con una Investigación o Desarrollo Financiado por el Gobierno Federal de los Estados Unidos

La presente invención se realizó con financiación del Gobierno de los Estados Unidos de acuerdo con la National Research Initiative Competitive Grant N° 2004-01576 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y de acuerdo con el programa COBRE del Instituto Nacional de la Salud del National Center for Research Resources Project N° P20RR15636. El gobierno tiene ciertos derechos respecto a la presente invención.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a composiciones que comprenden antígenos del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (VSRRP) con una inmunogenicidad mejorada y a procedimientos para su uso. Las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento dan como resultado respuestas inmunogénicas mejoradas de cerdos a antígenos de VSRRP, proporcionando de este modo una protección mejorada de los cerdos frente a la infección por VSRRP.

Técnica relacionada

El VSRRP es un patógeno económicamente importante que afecta a cerdos. La infección de cerdas multíparas y cerdas nulíparas con VSRRP puede dar como resultado el fracaso reproductivo. El VSRRP también causa enfermedades respiratorias en cerdos de todas las edades. Es posible vacunar a los cerdos para protegerlos de la infección por VSRRP. Sin embargo, las vacunas actuales disponibles en el mercado (siendo la mayoría vacunas vivas atenuadas) son algo ineficaces y por lo tanto deberían mejorarse. Los mecanismos inmunológicos completos de la protección frente al VSRRP no están claros; sin embargo, se ha demostrado claramente que los anticuerpos neutralizantes contra VSRRP son fundamentales para esta protección. Desgraciadamente, el propio VSRRP (en su forma de tipo silvestre) o las vacunas vivas actuales obtenidas a partir del mismo tienen una escasa capacidad para inducir anticuerpos neutralizantes específicos de virus de una forma oportuna y a niveles eficaces (es decir, protectores).

La Patente de Estados Unidos N° 6.500.662, "Infectious cDNA clone of North American porcine reproductive and respiratory syndrome (SRRP) virus and uses thereof" (por Calvert y col., 31 de diciembre, 2002) describe el desarrollo de un clon de ADNc de VSRRP norteamericano infeccioso y su uso como vacuna. Sin embargo, la Patente de Estados Unidos N° 6.500.662 no desvela vacunas de VSRRP que comprendan antígenos de VSRRP hipoglicosilados.

En otro estudio, se compararon secuencias de la proteína GP5 (o proteína de la ORF5) de diversas cepas de VSRRP norteamericano entre sí y con el aislado de VSRRP europeo representativo conocido como la cepa Lelystad, poniendo de manifiesto que los sitios de glicosilación ligada a N en la Asparagina 44 (N44) y la Asparagina 51 (N51) de la secuencia consenso de GP5 estaban conservados en todos los aislados de VSRRP examinados (Pirzadeh y col., Can. J. Vet Res., 1998, 62: 170-177). Sin embargo, el sitio de N-glicosilación localizado en la Asparagina 31 (N31) de la secuencia consenso de GP5 estaba ausente en ciertos aislados de VSRRP norteamericanos y estaba ausente en el aislado de la cepa Lelystad de VSRRP europeo. Se produjeron proteínas de fusión recombinantes GST-GP5 de cuatro (4) cepas de VSRRP norteamericano y de la cepa Lelystad en *E. coli* como cuerpos de inclusión insolubles, se renaturalizaron y se usaron como inmunógenos en conejos. Dichas proteínas recombinantes producidas en *E. coli* conservan pero no glicosilan sus sitios de N-glicosilación nativos.

También se ha demostrado que la inoculación de cerdos con una vacuna de ADN que comprende la fusión de un promotor de CMV con el gen de GP5 del aislado de VSRRP norteamericano IAF-Klop proporciona protección en animales inmunizados frente a la exposición a VSRRP (Pirzadeh y Dea, 1998, J. General Virology, 79, 989-999). Este aislado de gen de GP5 particular codifica una proteína GP5 que contiene los restos Asparagina N31, N44 y N51 que presumiblemente están glicosilados cuando se expresan en cerdos inmunizados con la vacuna de ADN. La vacunación de cerdos con GST-GP5 producida en *E. coli*, que conserva pero no glicosila los sitios de N-glicosilación nativos del gen de GP5 de la cepa IAF-Klop, no protegía los pulmones de los cerdos expuestos a virus.

También se han descrito clones infecciosos de VSRRP europeo que contienen mutaciones que dan como resultado la expresión de proteínas de VSRRP hipoglicosiladas (Wissink y col., 2004, J. Gen. Virol. 85: 3715-23). Esta referencia particular informa de que los VSRRP que contienen mutaciones en el resto Asparagina 53 (N53) de la proteína GP(5) de la cepa Lelystad de VSRRP, que impiden la glicosilación ligada a N de ese sitio, son infecciosos y pueden producir partículas de virus de la cepa Lelystad de VSRRP infecciosas. Por el contrario, los VSRRP que contienen mutaciones en la N46 de la proteína GP(5) de la cepa Lelystad de VSRRP, que impiden la glicosilación ligada a N de ese sitio, no son infecciosos y no producen partículas de virus de la cepa Lelystad de VSRRP infecciosas. Wissink y col. especulan que los sitios de N-glicanos en la proteína GP_{2a} del VSRRP europeo y, por analogía, el sitio N53 de la proteína GP5, podrían actuar a muchos niveles diferentes en el huésped natural, incluyendo interacciones con receptores o protección

frente al sistema inmune. Kwang y col. (Research in Veterinary Science, vol. 67, nº 2, 1 de enero de 1999) desvelaron respuestas inmunes celulares y humorales después de procedimientos de inmunización con ADN usando las ORF 4, 5, 6 y 7 del virus SRRP. Plagemann y col. (Archives of Virology, vol. 147, 1 de enero de 2002) desvela que un epítipo neutralizante de GP5 de VSRRP estaba localizado en un sitio asociado con la unión de N-glicanos y que el sitio estaba conservado entre aislados europeos y norteamericanos.

En virus distintos del VSRRP, se ha implicado a los restos de glicanos en una diversidad de papeles. La glicosilación ligada a N, en general, es importante para un plegamiento, direccionamiento y actividad biológica correctos de las proteínas (Helenius, A. y M. Aebi., Annu. Rev. Biochem. 73: 1019-1049, 2004; Williams, D. B. y Glycoconj J., 12: iii-iv, 1995; Zhang, y col. Glycobiology 14: 1229-46, 2004). En muchos virus con envoltura, las proteínas de la envoltura se modifican por adición de restos de azúcares y la glicosilación ligada a N de proteínas de la envoltura desempeña diversas funciones de glicoproteínas virales tales como unión a receptor, fusión de membrana, penetración en células y gemación de virus (Braakman, I. y E. van Anken, Traffic 1: 533-9, 2000; Doms y col. Virology 193: 545-62, 1993). Estudios recientes han demostrado el papel de la glicosilación ligada a N de la glicoproteína de virus Hantaan en el plegamiento de proteínas y el transporte intracelular (Shi, X. y R. M., Elliott, J. Virol. 78: 5414-22, 2004), así como en la actividad biológica y la antigenicidad de la proteína hemaglutinina (HA) de virus influenza (Abe, Y., y col., J. Virol. 78: 9605-11, 2004). Además, se ha hecho evidente que la glicosilación de proteínas de la envoltura viral es un mecanismo principal para la evasión del sistema inmune y la persistencia usado por varios virus con envoltura diferentes para escapar, bloquear o minimizar la respuesta de anticuerpos neutralizantes de virus. Se ha informado de ejemplos de este efecto para el VIS (Reitter, J. N. y col., Nat. Med. 4: 679-84, 1998) y el VIH-1 (Wei, X. y col., Nature 422: 307-12, 2003), el VHB (Lee, J. y col. Biochem. Biophys. Res. Commun. 303: 427-32, 2003), virus influenza (Skehel, J. J. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1779-83, 1984) y el arterivirus VLD (Chen, Z. y col. Virology 266: 88-98, 2000).

Sumario de la invención

La presente invención se desarrolló a la vista de los problemas anteriores. Se demuestra que las variantes hipoglicosiladas de una proteína de superficie principal de VSRRP GP5 aumentaba el nivel de anticuerpos neutralizantes de VSRRP producidos por cerdos inmunizados respecto a los niveles de anticuerpos neutralizantes producidos por cerdos inmunizados con GP5 de tipo silvestre (wt) o glicosilada.

La presente invención proporciona primero una composición que comprende un polinucleótido que codifica una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada, en la que al menos un sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 o a la asparagina 34 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está inactivado, para su uso en un procedimiento de generación de una respuesta inmune mejorada en un cerdo contra un antígeno de virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRRP). El polinucleótido puede comprender una molécula de ARN de VSRRP infecciosa o una molécula de ADN que codifique una molécula de ARN de VSRRP infecciosa. La molécula de ARN de VSRRP infecciosa puede ser un derivado de VSRRP norteamericano o un derivado VSRRP europeo. Como alternativa, este polinucleótido puede comprender una molécula de ADN en la que un promotor activo en células de mamífero se une operativamente a dicho polinucleótido que codifica una proteína GP5 hipoglicosilada. Este promotor es un promotor de CMV en ciertas realizaciones preferidas de la invención. Como alternativa, el polinucleótido puede ser un vector viral. Los vectores virales representativos que pueden usarse incluyen vectores de virus vaccinia, vectores de virus herpes simple, vectores de adenovirus, vectores de alfavirus y vectores del virus de la GET.

Pueden usarse una diversidad de tipos y fuentes de secuencias de VSRRP para obtener el polinucleótido que codifica una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada, en la que al menos un sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 34 o a la asparagina 51 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está inactivado. En ciertas realizaciones de la invención, se obtiene un polinucleótido que codifica una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada por síntesis directa, mutagénesis de una secuencia de nucleótidos de GP5 aislada de VSRRP norteamericano o mutagénesis de una secuencia de nucleótidos consenso de GP5 de VSRRP norteamericano. La secuencia de nucleótidos de GP5 aislada de VSRRP norteamericano puede seleccionarse del grupo de nucleótidos que codifican las proteínas GP5 de las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12 y SEC ID N°: 13. La secuencia de nucleótidos consenso de GP5 de VSRRP norteamericano codifica una proteína GP5 consenso que tiene una identidad de al menos el 85% con la SEC ID N°: 14. En otras realizaciones de la invención, el polinucleótido que codifica una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada se obtiene por síntesis directa, mutagénesis de una secuencia de nucleótidos de GP5 aislada de VSRRP europeo o mutagénesis de una secuencia de nucleótidos consenso de GP5 de VSRRP europeo. La secuencia de nucleótidos de GP5 aislada de VSRRP europeo codifica una proteína GP5 que tiene una identidad de al menos el 85% con la SEC ID N°: 15.

Pueden usarse una diversidad de procedimientos de inactivación de sitios de glicosilación ligada a N específicos para poner en práctica eficazmente el procedimiento de la presente invención. Un procedimiento preferido de inactivación de un sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 consiste en sustituir el codón de asparagina con un codón que codifica un aminoácido distinto de asparagina. Este codón de sustitución puede codificar un resto alanina o glutamina. En realizaciones más preferidas, ambos de dichos sitios de glicosilación ligada a N correspondientes a la asparagina 34 y a la asparagina 51 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 están inactivadas. En otras realizaciones, el sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 34 está

inactivado. Este sitio de glicosilación ligada a N de la asparagina 34 puede inactivarse por sustitución de un codón que codifique dicha asparagina 34 con un codón que codifique un aminoácido distinto de asparagina. El codón que codifica otro aminoácido puede codificar un resto alanina o glutamina. En otras realizaciones preferidas, ambos sitios de glicosilación ligada a N correspondientes a la asparagina 34 y a la asparagina 51 de una proteína GP5 de referencia pueden inactivarse por sustitución de los codones que codifican la asparagina 34 y la asparagina 51 con codones que codifiquen un aminoácido distinto de asparagina. Ambos codones que codifican la asparagina 34 y la asparagina 51 pueden sustituirse con codones que codifiquen un resto alanina o glutamina para inactivar esos sitios de glicosilación. Como alternativa, ambos codones pueden sustituirse con codones que codifiquen un resto alanina para inactivar ambos sitios de glicosilación. Como alternativa, uno de los sitios de glicosilación ligada a N se inactiva por sustitución de un codón que codifica dicha asparagina 34 o dicha asparagina 51 con un codón que codifica un aminoácido distinto de asparagina, mientras que el otro sitio de glicosilación ligada a N se inactiva por otras técnicas.

En realizaciones preferidas, la invención emplea una molécula de ARN de VSRRP infecciosa que es un derivado de VSRRP norteamericano que codifica una proteína variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada en la que al menos un sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 34 o a la asparagina 51 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está inactivado. En realizaciones más preferidas, ambos de dichos sitios de glicosilación ligada a N correspondientes a la asparagina 34 y a la asparagina 51 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 están inactivados. Ambos sitios de glicosilación ligada a N correspondientes a la asparagina 34 y a la asparagina 51 de una proteína GP5 de referencia pueden inactivarse por sustitución de los codones que codifican la asparagina 34 y la asparagina 51 con codones que codifiquen un aminoácido distinto de asparagina. Ambos codones que codifican la asparagina 34 y la asparagina 51 pueden sustituirse con codones que codifiquen un resto alanina o glutamina para inactivar esos sitios de glicosilación. Como alternativa, ambos codones pueden sustituirse con codones que codifiquen un resto alanina para inactivar ese sitio de glicosilación.

Para poner en práctica la invención, la composición que contiene un polinucleótido se administra por inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intradérmica, inyección parenteral, inyección intramuscular, inyección sin aguja, electroporación, administración por vía oral, administración intranasal, administración oronasal o cualquier combinación de las mismas. La composición administrada puede comprender además un vehículo terapéuticamente aceptable. Este vehículo terapéuticamente aceptable se selecciona del grupo constituido por una proteína, un tampón, un tensioactivo y un polímero de polietilenglicol, o cualquier combinación de los mismos.

La composición administrada puede comprender además un adyuvante. Este adyuvante puede ser hidróxido de aluminio, Quil A, una suspensión de gel de alúmina, aceites minerales, glicéridos, ácidos grasos, subproductos de ácidos grasos, micobacterias y oligodesoxinucleótidos CpG o cualquier combinación de los mismos. La composición administrada también puede comprender un segundo adyuvante tal como interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL4, IL-5, IL6, IL-12, interferón gamma (IFN-g), factor de necrosis tumoral, MDP (dipéptido de muramilo), complejo inmunoestimulante (ISCOM) y liposomas.

La respuesta inmune mejorada de un cerdo contra un antígeno de VSRRP puede comprender una producción aumentada de anticuerpos neutralizantes de VSRRP por dicho cerdo. La producción aumentada de anticuerpos neutralizantes de VSRRP se observa típicamente tras la inmunización del cerdo por los procedimientos y composiciones de la presente invención. La respuesta inmune mejorada puede obtenerse en una cerda múltipara, una cerda nulípara, un verraco o un cochinitillo.

La invención también proporciona una composición que comprende una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada, en la que al menos un sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 y a la asparagina 34 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está inactivado, para su uso en un procedimiento de generación de una respuesta inmune mejorada en un cerdo contra un antígeno del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRRP). La proteína variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada puede producirse mediante los mismos polinucleótidos usados en los procedimientos descritos anteriormente en sistemas de expresión bacterianos, de levaduras o mamíferos.

La presente invención también proporciona composiciones que comprenden un polinucleótido que codifica una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada, en la que al menos un sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está inactivado, y un vehículo terapéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, las composiciones comprenden polinucleótidos en los que ambos sitios de glicosilación ligada a N correspondientes a la asparagina 34 y a la asparagina 51 de la SEC ID N°: 1 están inactivados. En realizaciones preferidas, esta composición puede comprender una molécula de ARN de VSRRP norteamericano infecciosa o una molécula de ADN que codifique una molécula de ARN de VSRRP norteamericano infecciosa. En otras realizaciones, el polinucleótido comprende una molécula de ADN en la que un promotor activo en células de mamífero se une operativamente a dicho polinucleótido que codifica dicha variante polipeptídica de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada. En ciertas realizaciones preferidas, este promotor es un promotor de CMV. En otras realizaciones más, el polinucleótido de la composición comprende un vector viral. Los vectores virales que pueden usarse en la composición pueden ser uno cualquiera de un vector de virus vaccinia, un vector de virus herpes simple, un vector de adenovirus, un vector de alfavirus o un vector del virus de la GET.

En los polinucleótidos de la composición, un sitio de glicosilación ligada a N se inactiva por sustitución de un codón que codifica dicha asparagina 51 con un codón que codifica un aminoácido distinto de asparagina. El codón

que codifica un aminoácido distinto de asparagina codifica un resto alanina o glutamina. En otras realizaciones de esta composición, un sitio de glicosilación ligada a N adicional se inactiva por sustitución de un codón que codifica la asparagina 34 con un codón que codifica un aminoácido distinto de asparagina. Este codón que codifica otro aminoácido puede codificar un resto alanina o glutamina. Se proporcionan por lo tanto mediante esta solicitud composiciones preferidas que comprenden polinucleótidos que codifican una proteína variante polipeptídica de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada, en la que ambos de dichos sitios de glicosilación ligada a N correspondientes a la asparagina 34 y a la asparagina 51 de una proteína GP5 de referencia de virus norteamericano de la SEC ID N°: 1 están inactivados. Ambos de dichos sitios de glicosilación ligada a N pueden inactivarse por sustitución de los codones que codifican dicha asparagina 34 y dicha asparagina 51 con codones que codifiquen un aminoácido distinto de asparagina. Estos codones que codifican un aminoácido distinto de asparagina pueden codificar un resto alanina o glutamina.

El vehículo terapéuticamente aceptable usado en la composición puede ser una proteína, un tampón, un tensioactivo y un polímero de polietilenglicol, o cualquier combinación de los mismos. La composición comprende además al menos un adyuvante. Este adyuvante puede ser hidróxido de aluminio, Quil A, una suspensión de gel de alúmina, aceites minerales, glicéridos, ácidos grasos, subproductos de ácidos grasos, micobacterias y oligodesoxinucleótidos CpG o cualquier combinación de los mismos. La composición puede comprender además un segundo adyuvante seleccionado del grupo constituido por interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL4, IL-5, IL6, IL-12, interferón gamma (IFN-g), factor de necrosis tumoral, MDP (dipéptido de muramilo), complejo inmunoestimulante (ISCOM) y liposomas.

También se proporciona mediante la presente invención una composición que comprende una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada, en la que al menos un sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está inactivado, y un vehículo terapéuticamente aceptable. En realizaciones preferidas, los sitios de glicosilación ligada a N correspondientes tanto a la asparagina 34 como a la asparagina 51 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 están inactivados. La proteína variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada puede producirse mediante los mismos polinucleótidos usados en los procedimientos descritos anteriormente en sistemas de expresión bacterianos, de levaduras o mamíferos.

La presente invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada en la que al menos un sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está inactivado. En ciertas realizaciones, se proporcionan polinucleótidos en los que ambos sitios de glicosilación ligada a N correspondientes a la asparagina 34 y a la asparagina 51 están inactivados. En realizaciones preferidas, este polinucleótido aislado puede comprender una molécula de ARN de VSRRP norteamericano infecciosa o una molécula de ADN que codifica una molécula de ARN de VSRRP norteamericano infecciosa. En otras realizaciones, el polinucleótido aislado comprende una molécula de ADN en la que un promotor activo en células de mamíferos se une operativamente a dicho polinucleótido que codifica dicha variante polipeptídica de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada. En ciertas realizaciones preferidas, este promotor es un promotor de CMV. En otras realizaciones más, el polinucleótido aislado comprende un vector viral. Los vectores virales que pueden usarse en la composición pueden ser uno cualquiera de un vector de virus vaccinia, un vector de virus herpes simple, un vector de adenovirus, un vector de alfavirus y un vector del virus de la GET.

En los polinucleótidos aislados, un sitio de glicosilación ligada a N se inactiva por sustitución de un codón que codifica dicha asparagina 51 con un codón que codifica un aminoácido distinto de asparagina. El codón que codifica un aminoácido distinto de asparagina codifica un resto alanina o glutamina. En otras realizaciones preferidas, un sitio de glicosilación ligada a N adicional se inactiva por sustitución de un codón que codifica la asparagina 34 con un codón que codifica un aminoácido distinto de asparagina. Este codón que codifica otro aminoácido puede codificar un resto alanina o glutamina. Por lo tanto, se proporcionan polinucleótidos preferidos que codifican una proteína variante polipeptídica de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada en la que ambos de dichos sitios de glicosilación ligada a N correspondientes a la asparagina 34 y a la asparagina 51 de una proteína GP5 de referencia de virus norteamericano de la SEC ID N°: 1 están inactivados. Ambos de dichos sitios de glicosilación ligada a N pueden inactivarse por sustitución de los codones que codifican dicha asparagina 34 y dicha asparagina 51 con codones que codifiquen un aminoácido distinto de asparagina. Estos codones que codifican un aminoácido distinto de asparagina pueden codificar un resto alanina o glutamina.

La invención también proporciona un polipéptido aislado que es una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada, en la que al menos un sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está inactivado. La proteína variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada puede producirse mediante los mismos polinucleótidos usados en los procedimientos descritos anteriormente en sistemas de expresión bacterianos, de levaduras o mamíferos, y purificarse por cromatografía u otras técnicas.

Características y ventajas adicionales de la presente invención, así como la estructura y el funcionamiento de diversas realizaciones de la presente invención, se describen en detalle a continuación con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y forman parte de la memoria descriptiva, ilustran las realizaciones de la presente invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención. En los dibujos:

La Figura 1 ilustra la expresión transitoria de las proteínas GP5 y M de VSRRP. A. Representación esquemática de la construcción bicistrónica que muestra las regiones codificantes de GP5 y M flanqueando el IRES (IE) del virus de la encefalomiocarditis. Las regiones codificantes están bajo el control del promotor de la ARN polimerasa de T7 (rectángulo negro), presente inmediatamente cadena arriba de la región codificante de GP5. La flecha doblada muestra la posición y la dirección de la transcripción por la ARN polimerasa de T7 desde el vector. B. Expresión de las proteínas GP5 y M en células transfectadas con el vector bicistrónico. Las células con transfección simulada (carril 1) o transfectadas con plásmido (carriles 2-7) se radiomarcaron como se describe en los Materiales y Procedimientos, se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-Gp5 (carriles 1-5) o anticuerpo anti-M (carriles 6-7). Las proteínas inmunoprecipitadas se dejaron sin tratar (-) (carriles 1, 2, 6 y 7) o se trataron (+) con Endo H (carril 3), PNGasa F (carril 4) y se analizaron por electroforesis. El carril 5 contiene proteínas inmunoprecipitadas de células transfectadas tratadas (+) con tunicamicina. Se muestra la movilidad de las proteínas con respecto a su masa molecular relativa (Mr) en kilodaltons.

La Figura 2 ilustra el análisis de glicosilación de WT-GP5 y sus mutantes usando un plásmido bicistrónico. A. Se muestra una representación esquemática del vector bicistrónico y de la GP5 de VSRRP con los tres supuestos sitios de glicosilación en las posiciones aminoacídicas 34, 44 y 51. B. Diversos mutantes usados en el presente estudio. C. Expresión de GP5 wt y mutante y su sensibilidad a Endo H. El experimento se realizó como se describe en la leyenda de la Figura 1, las proteínas se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-GP5, se digirieron con Endo H (+) o se dejaron sin digerir (-) y se analizaron por electroforesis. Las proteínas GP5 mutantes se muestran mediante puntas de flecha. Se muestra a la derecha la movilidad de las proteínas con respecto a su masa molecular relativa (Mr) en kilodaltons.

La Figura 3 ilustra la caracterización de virus mutantes que codifican una GP5 mutante. A. Cinética de crecimiento en una sola etapa de VSRRP wt (FL-12) y diversos VSRRP mutantes en células MARC-145. Se infectaron células en placas de seis pocillos con VSRRP a una MOI de 3, se recogieron los sobrenadantes de cultivo a los tiempos indicados después de la infección y se determinaron los títulos de virus. Se muestra el promedio de los títulos con su desviación típica (barras de error) de tres experimentos independientes. B. Morfología de placas de virus mutantes. Las flechas sin relleno y puntas de flecha muestran placas que están menos claras. C. Trans-complementación para recuperar VSRRP mutantes. Análisis cuantitativo de la recuperación de virus mutante a partir de células que expresan proteína GP5 wt. Se muestra el promedio de la producción de virus de tres experimentos independientes con su desviación típica (representada mediante barras de error).

La Figura 4 ilustra un examen de la GP5 incorporada en viriones mutantes y sintetizada en células infectadas por virus mutante. A. Los viriones radiomarcados de sobrenadantes de cultivo de células infectadas se sedimentaron, se inmunoprecipitó la proteína GP5, se trató con (+) o sin (-) Endo H y se analizó por electroforesis. La GP5 con y sin digestión con Endo H en los carriles 1 y 2 se muestra mediante llaves blancas. B. Se radiomarcaron células infectadas con diversos virus mutantes, se inmunoprecipitó la GP5, se trató con (+) o sin (-) Endo H y se analizó por electroforesis. La GP5 con y sin digestión con Endo H en los carriles 2 y 3 se muestra mediante llaves blancas. La movilidad de las proteínas con respecto a su masa molecular relativa (Mr) en kilodaltons se muestra en el lado derecho de cada panel.

La Figura 5 ilustra un alineamiento de secuencias de aminoácidos N-terminales de GP5 de VSRRP norteamericano con la secuencia N-terminal de referencia de GP5 de VSRRP norteamericano (SEC ID N°: 1; cepa NVSL 97-7895). Se muestran los primeros 60 aminoácidos N-terminales de un alineamiento de las proteínas de 200 aminoácidos. Los sitios de glicosilación ligada a N de la asparagina 34 "NSS" y de la asparagina 51 "NGT" de las proteínas se muestran en negrita. Otros sitios de glicosilación ligada a N localizados entre los restos 29 y 35 de la proteína GP5 de referencia están subrayados.

La Figura 6 ilustra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos N-terminal de GP5 de VSRRP europeo con la secuencia N-terminal de referencia de GP5 de VSRRP norteamericano (SEC ID N°: 1; cepa NVSL 97-7895). Se muestra un alineamiento de la proteína GP5 completa de proteínas de aproximadamente 200 aminoácidos en el que el sitio de glicosilación ligada a N de la asparagina 51 "NGT" se muestra en negrita (es decir, la asparagina 53 de la SEC ID N°: 15).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Definiciones

La expresión "vehículo aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a un vehículo que no es perjudicial para los demás ingredientes de la composición y que no es perjudicial para el material al que se va a aplicar. La expresión "vehículo terapéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo que no es perjudicial para los demás ingredientes de la composición y que no es perjudicial para el ser humano u otro destinatario animal de la

misma. En el contexto de los demás ingredientes de la composición, “no perjudicial” significa que el vehículo no reaccionará con ni degradará los demás ingredientes ni interferirá de otro modo con su eficacia. La interferencia con la eficacia de un ingrediente no incluye la simple dilución del ingrediente. En el contexto del animal, “no perjudicial” significa que el vehículo no causa lesiones ni es letal para la planta o animal.

5

El término “adyuvante”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier material usado junto con un antígeno que aumenta la capacidad de ese antígeno para inducir una respuesta inmune.

La “administración”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier medio para proporcionar un polinucleótido, un polipéptido o composición de los mismos a un sujeto. Los ejemplos no limitantes de medios de administración incluyen la inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intradérmica, inyección parenteral, inyección intramuscular, inyección sin aguja, electroporación, administración por vía oral, administración intranasal, administración oronasal o cualquier combinación de las mismas.

El término “antígeno”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier entidad que induzca una respuesta inmune en un huésped.

La expresión “secuencia consenso”, como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos, de ADN o ARN generada por alineamiento de dos o más secuencias homólogas y de la que se obtiene a nueva secuencia que representa la secuencia común de aminoácidos, ADN o ARN.

La expresión “variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada”, como se usa en el presente documento, se refiere a proteínas GP5 de VSRRP en las que la secuencia de aminoácidos original o no variante que comprende uno o más sitios de glicosilación ligada a N se ha modificado para reducir el número de sitios de glicosilación ligada a N en la proteína variante de GP5 resultante. De acuerdo con esta definición, la expresión de una proteína GP5 original o no variante en *E. coli* para producir una proteína GP5 con la secuencia original de GP5 que contenga el mismo número de sitios de glicosilación no daría como resultado la producción de una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada.

La expresión “respuesta inmune”, como se usa en el presente documento, se refiere a la producción de anticuerpos y/o células (tales como linfocitos T) que se unen, degradan o inhiben de otro modo un antígeno particular. Expresiones relacionadas tales como “una respuesta inmune mejorada” se refieren al uso de los procedimientos y composiciones que dan como resultado cualquier mejora medible en la respuesta de un huésped inmunizado contra un antígeno. Por ejemplo, las mejoras medibles en una respuesta inmune incluyen, pero sin limitación, una producción aumentada de anticuerpos neutralizantes (es decir, títulos de anticuerpos aumentados) respecto a los niveles de producción observados en animales de control que se han inmunizado con antígenos que carecen de las modificaciones estructurales que proporcionan una respuesta inmune mejorada.

La expresión “molécula de ARN infecciosa” se refiere a una molécula de ARN que codifica todos los elementos necesarios para la producción de un virión funcional cuando se introduce en una célula huésped permisiva.

La expresión “clon infeccioso”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa.

La expresión “VSRRP norteamericano”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier VSRRP que comprende secuencias polinucleotídicas asociadas con aislados de VSRRP norteamericanos tales como, pero sin limitación, la cepa NVSL 97-7895 (Truong y col., Virology, 325: 308-319 y referencias contenidas en la misma) o las cepas IAF-Klop, MLV, ATCC VR-2332, ATCC VR-2385, IAF-BAJ, IAF-DESR, IAF-CM, IAF 93-653, IAF 93-2616, IAF 94-3182, IAF 94-287 descritas en Pirzadeh y col. Can. J. Vet Res, 62: 170-177 y referencias contenidas en la misma). Para la presente invención, los VSRRP que comprenden secuencias polinucleotídicas asociadas con aislados de VSRRP norteamericanos son VSRRP que contienen secuencias polinucleotídicas en las que la región codificante de GP5 codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia proteica de al menos el 85% con la SEC ID N°: 1.

La expresión “VSRRP europeo”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier VSRRP que comprende secuencias polinucleotídicas asociadas con aislados de VSRRP norteamericanos, tales como, pero sin limitación, la cepa Lelystad (Wissink y col., J. Gen. Virol. 85: 3715, 2004 y referencias contenidas en la misma). Para la presente invención, los VSRRP que comprenden secuencias polinucleotídicas asociadas con aislados de VSRRP europeos son VSRRP que contienen secuencias polinucleotídicas en las que la región codificante de GP5 codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencia proteica de al menos el 85% con la SEC ID N°: 15.

El “porcentaje de identidad”, como se usa en el presente documento, se refiere al número de elementos (es decir, aminoácidos o nucleótidos) en una secuencia que son idénticos dentro de una longitud definida de dos segmentos de ADN, ARN o proteína óptimamente alineados. Para calcular el “porcentaje de identidad”, el número de elementos idénticos se divide entre el número total de elementos en la longitud definida de los segmentos alineados y se multiplica por 100. Cuando el porcentaje de identidad se usa en relación con proteínas, se entiende que ciertos restos aminoácidos pueden no ser idénticos pero ser sin embargo sustituciones de aminoácidos conservativas, que refle-

jan sustituciones de restos aminoacídicos con propiedades químicas similares (por ejemplo, restos ácidos o básicos, hidrófobos, hidrófilos, donadores o aceptores de enlaces de hidrógeno). Dichas sustituciones pueden no cambiar las propiedades funcionales de la molécula. Por consiguiente, el porcentaje de identidad de las secuencias de proteínas puede aumentarse para representar las sustituciones conservativas.

5

Introducción

La glicoproteína 5 (GP5) del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRRP) es la glicoproteína de la envoltura más abundante y un inductor muy importante de anticuerpos neutralizantes *in vivo*. Tres supuestos sitios de glicosilación ligada a N (N34, N44 y N51) se localizan en el ectodominio de GP5, donde también existe un epítipo de neutralización principal. Para determinar cuál de estos supuestos sitios de glicosilación se usa en el ciclo vital del VSRRP y el papel de los restos de glicanos en la inducción de anticuerpos neutralizantes, los presentes inventores generaron un panel de mutantes de GP5 que contenían sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples en estos sitios. La expresión transitoria de las proteínas de tipo silvestre (wt) así como mutantes y los estudios bioquímicos posteriores pusieron de manifiesto que la GP5 madura contiene restos de azúcares de tipo de alto contenido en manosa en los tres sitios. Posteriormente estas mutaciones se incorporaron en un clon de ADNc de longitud completa para recuperar VSRRP infeccioso. Los resultados de los presentes inventores demuestran que las mutaciones que implicaban al resto N44 no daban como resultado la producción de progenie infecciosa, indicando que la N44 es el resto aminoacídico más crítico para la infectividad viral. Los virus que llevaban mutaciones en las posiciones N34, N51 y N34/51 se desarrollaban hasta títulos menores que el VSRRP wt y presentaban un efecto citopático reducido en células MARC 145. En ensayos de neutralización en suero, los virus mutantes presentaban una sensibilidad aumentada a la neutralización por anticuerpos específicos de VSRRP wt. Además, la inoculación de cerdos con los virus mutantes inducía niveles significativamente superiores de anticuerpos neutralizantes contra el VSRRP mutante así como contra el VSRRP wt, sugiriendo por lo tanto que la pérdida de restos de glicanos en el ectodominio de GP5 aumenta tanto la sensibilidad de estos virus a la neutralización *in vitro* como la inmunogenicidad del epítipo de neutralización cercano. Estos resultados deberían tener una gran importancia para el desarrollo de vacunas de VSRRP de eficacia protectora mejorada.

Se sabe que los anticuerpos neutralizantes son un factor de correlación importante de la protección frente al VSRRP. Los presentes inventores han descubierto que la eliminación de sitios de glicosilación en la proteína GP5 de VSRRP da como resultado un aumento significativo de: (1) la capacidad de la cepa de VSRRP modificada para ser neutralizada por un antisuero de convaleciente de VSRRP y (2) la capacidad de esta cepa de VSRRP modificada para producir niveles de anticuerpos neutralizantes de VSRRP sin precedentes cuando se usa para inocular cerdos. La aplicación de este concepto a cualquier virus vivo (wt o atenuado) para la inmunización frente a la infección por VSRRP tendría un impacto significativo en su uso para conferir una protección eficaz frente a la infección por VSRRP.

En el momento actual, existen tres estrategias principales para inmunizar frente a infecciones por VSRRP: (1) vacunas vivas atenuadas, (2) vacunas inactivadas (que se basan en VSRRP wt cultivado *in vitro* e inactivado químicamente) y (3) el uso de una infección a propósito con VSRRP wt virulento de forma sistemática a todos los animales de la piara. Existen muchas discusiones y controversia acerca de cuál de estas 3 formas es la más eficaz. La presente invención sería beneficiosa independientemente de la estrategia usada para la inmunización. La alteración genética de un VSRRP vivo para modificar el nivel de glicosilación de sus proteínas puede realizarse en la cepa vacunal de VSRRP atenuada o la cepa de VSRRP wt usada para producir una vacuna inactivada, o la cepa de VSRRP wt usada para la inoculación directa de la piara por infección masiva.

El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRRP) pertenece a la familia *Arteriviridae* dentro del orden *Nidovirales*, que también incluye el virus de la arteritis equina (VAE), el virus elevador de la lactato deshidrogenasa (VLD) y el virus de la fiebre hemorrágica de los simios (VFHS). El genoma viral es una molécula de ARN lineal de cadena positiva de aproximadamente 15,0 kb de longitud y posee una estructura de caperuza en el extremo 5' y una cola poli(A) en el extremo 3'. Están codificadas ocho fases de lectura abierta (ORF) en el genoma viral. Las primeras dos fases de lectura abierta (ORF1a y ORF1ab) codifican poliproteínas virales no estructurales (NS) que están implicadas en el procesamiento de las poliproteínas y en la transcripción y replicación del genoma. Las proteínas virales estructurales, codificadas en las ORF2-7, se expresan a partir de seis ARNm subgenómicos con caperuza y poliadenilados que se sintetizan como un conjunto anidado 3'-coterminal de ARNm con una secuencia líder común en el extremo 5'. La proteína de la envoltura viral principal es la glicoproteína 5 (GP5), que está codificada en la ORF5 del genoma viral. La GP5 es una proteína transmembrana glicosilada de aproximadamente 25 kDa de tamaño. Tiene un supuesto péptido señal N-terminal y posee tres sitios de glicosilación ligada a N potenciales que se localizan en un pequeño ectodominio que comprende los primeros 40 restos de la proteína madura. En el VAE y el VLD, la glicoproteína de la envoltura principal forma un heterodímero unido por enlace disulfuro con el producto génico de la ORF6, la proteína viral de la matriz (M). Se ha observado una interacción similar entre las proteínas GP5 y M del VSRRP pero el modo de interacción no se ha definido todavía. Se ha postulado que la formación de heterodímeros de las proteínas GP5 y M puede desempeñar un papel crítico en el ensamblaje de VSRRP infecciosos. Además de este papel en el ensamblaje del virus, la GP5 parece estar implicada en la entrada del virus en células huésped susceptibles. Se supone que la GP5 interacciona con el receptor de la célula huésped, la sialoadhesina, para su entrada en macrófagos alveolares porcinos (MAP), las células diana *in vivo* para el VSRRP. El papel de la GP5 en el reconocimiento del receptor se confirma por la presencia de un epítipo de neutralización principal en el ectodominio N-terminal, implicando por lo tanto un papel fundamental del ectodominio de GP5 en el proceso infeccioso.

Los glicanos ligados a N del ectodominio GP5 pueden ser críticos para un funcionamiento apropiado de la proteína. La glicosilación ligada a N, en general, es importante para el plegamiento, direccionamiento y actividad biológica correctos de las proteínas. En muchos virus con envoltura, las proteínas de la envoltura se modifican por adición de restos de azúcares y la glicosilación ligada a N de la proteína de la envoltura desempeña diversas funciones de glicoproteínas virales tales como unión a receptor, fusión de membrana, penetración en células y gemación de virus. Estudios recientes han demostrado el papel de la glicosilación ligada a N de la glicoproteína de virus Hantaan en el plegamiento de la proteína y el transporte intracelular, así como en la actividad biológica y en la antigenicidad de la proteína hemaglutinina (HA) de virus influenza. Además, se ha hecho evidente que la glicosilación de proteínas de la envoltura viral es un mecanismo principal para la evasión inmune y la persistencia del virus usado por varios virus con envoltura diferentes para escapar, bloquear o minimizar la respuesta de anticuerpos neutralizantes de virus. Se ha informado de ejemplos de este efecto para el VIS y el VIH-1, el VHB, virus influenza y, lo que es más importante en el caso del VSRRP, el arterivirus VLD.

Recientemente, se ha informado del desarrollo de sistemas genéticos inversos para VSRRP en varios laboratorios incluyendo el de los presentes inventores. Evidentemente, los estudios mutacionales con clones infecciosos han conducido a un mejor entendimiento de los mecanismos de transcripción y replicación del genoma viral de los arterivirus. Por lo tanto, para examinar la importancia de la glicosilación ligada a N en la actividad biológica de GP5 de VSRRP en la generación de virus infecciosos o la generación de anticuerpos neutralizantes *in vivo*, los presentes inventores han construido una serie de proteínas GP5 mutantes en las que cada uno de los sitios de glicosilación ligada a N potenciales se ha mutado individualmente o en diversas combinaciones. Las proteínas mutantes resultantes se examinaron para determinar su patrón de glicosilación, su papel en la recuperación de virus infeccioso y en la neutralización cruzada por anticuerpos generados, por medio de inoculaciones experimentales, contra el VSRRP wt o contra los virus mutantes. Los datos de los presentes inventores muestran que los tres supuestos sitios de glicosilación se usan para la glicosilación con glicanos de tipo de alto contenido en manosa y que la glicosilación de la proteína GP5 en el resto 44 es crítica para la recuperación de VSRRP infecciosos. De forma muy importante, los datos de los presentes inventores a partir de los estudios de neutralización y respuesta de anticuerpos indican que la infección natural con VSRRP puede implicar una evasión del sistema inmune basada en mecanismos de protección de glicanos como se ha descrito previamente para otros virus, contribuyendo por lo tanto a explicar la respuesta inmune humoral protectora bastante ineficaz que se observa en animales infectados por VSRRP.

Sitios de Glicosilación Ligada a N y Procedimientos de Inactivación

La glicosilación ligada a N en glicoproteínas se produce típicamente en secuencias Asn-Xaa-Ser/Thr (NXS/T) donde Xaa (X) es cualquier resto aminoacídico excepto Pro. Pueden introducirse una diversidad de mutaciones en sitios de glicosilación ligada a N para proporcionar su inactivación. Un procedimiento de inactivación preferido comprende la sustitución del resto asparagina con un resto que codifique cualquier aminoácido distinto de asparagina. En realizaciones más preferidas de la presente invención, el resto asparagina se sustituye con un resto alanina o glutamina.

Otros procedimientos de inactivación de sitios glicosilación ligada a N y, en particular, los sitios de glicosilación ligada a N correspondientes a las asparaginas 34 y/o 51 de la proteína de referencia GP5 de la SEC ID N°: 1, también se contemplan en el presente documento. Las sustituciones de ciertos aminoácidos tales como prolina, triptófano, aspartato, glutamato o leucina en la posición Xaa también pueden usarse para inactivar sitios de glicosilación ligada a N (Kasturi y col., *Biochem J.* 323 (2):415-9, 1997). Como alternativa, también pueden usarse sustituciones de la posición hidroxiaminoacídica final del sitio de glicosilación ligada a N (es decir, el resto serina o treonina de la secuencia NXS/T) con cualquier aminoácido que no sea un hidroxiaminoácido (es decir, cualquier aminoácido distinto de serina o treonina) para inactivar el sitio de glicosilación ligada a N. Los ejemplos de aminoácidos que no son hidroxiaminoácidos que se han usado para inactivar sitios de glicosilación ligada a N incluyen cisteína (Kasturi y col., *J. Biol. Chemistry* 270 (24), 14756-14761, 1995).

Además de las sustituciones de aminoácidos, también se contemplan en la presente invención otros tipos de mutaciones que inactiven sitios de glicosilación ligada a N tales como inserciones de aminoácidos o deleciones de aminoácidos. Los expertos en la materia apreciarán que un sitio de glicosilación ligada a N puede inactivarse fácilmente por deleciones que eliminen aminoácidos clave en la secuencia NXS/T (es decir, los restos asparagina), que darán como resultado la inactivación de ese sitio de glicosilación. Las deleciones del resto X o del resto serina/treonina pueden inactivar de forma similar ciertos sitios de glicosilación ligada a N en los que el resto S o T no está seguido de otro resto S o T en la secuencia de origen natural. Cuando X es un aminoácido que no es un hidroxiaminoácido (es decir, no es serina ni treonina), las inserciones de cualquier resto aminoacídico en el extremo carboxi terminal del resto N pueden inactivar el sitio de glicosilación ligada a N. Las inserciones de cualquier aminoácido que no sea un hidroxiaminoácido en el extremo carboxi terminal del resto X también pueden inactivar el sitio de glicosilación ligada a N.

En resumen, se entiende que la característica clave de la mutación usada para realizar la invención es que inactiva los sitios de glicosilación ligada a N en la asparagina 34 y/o la asparagina 51 de una proteína GP5. Aunque quedar ligado a teoría alguna, se cree que la característica clave de estas mutaciones es que impiden la glicosilación en una región determinada de la proteína (es decir, los restos correspondientes a los sitios de la aspa-

ragina 34 y/o la asparagina 51 en una proteína de referencia GP5 de la SEC ID N°: 1). Impidiendo la glicosilación en estos sitios, se eliminan los restos de azúcares que comúnmente protegen a epítopes clave del virus de tipo silvestre, permitiendo de este modo la generación de una respuesta inmune mejorada. Por consiguiente, se prevé que puedan usarse varios tipos de mutaciones diferentes (es decir, sustitución, inserción o delección de aminoácidos) para inactivar los sitios de glicosilación ligada a N y obtener un antígeno que generará la respuesta inmune mejorada.

Descripción de polinucleótidos y polipéptidos de VSRRP de la invención

Los procedimientos de la presente invención pueden ponerse en práctica con una diversidad de polinucleótidos diferentes que pueden obtenerse de una diversidad de fuentes diferentes. La característica común de todos los polinucleótidos es que codifican una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada en la que los sitios de glicosilación ligada a N correspondientes a la asparagina 34, a la asparagina 51 o tanto a la asparagina 34 como a la asparagina 54 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 están inactivados. Para identificar los sitios de glicosilación ligada a N correspondientes a la asparagina 34 y a la asparagina 54 de la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1, la secuencia polipeptídica de GP5 de VSRRP no variante y normalmente glicosilada puede alinearse con la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1. Se presentan ejemplos de dicho alineamiento en las Figuras 5 y 6. Las secuencias particulares usadas en este alineamiento se describen en la Tabla 1.

TABLA 1

Descripción de Secuencias

Descripción	Acceso de GenBank (Referencia)	Secuencia ID N°:
Proteína GP5 de cepa de VSRRP norteamericana NVSL 97-7895	AAS59265.1 (Truong, H. M., y col. Virology 325 (2), 308-319, 2004)	SEC ID N°: 1
Proteína GP5 de cepa de VSRRP norteamericana 1. Proteína GP5 de IAF-Klop	AAC41206.1	SEC ID N°: 2
Proteína GP5 de cepa de VSRRP norteamericana IAF-BAJ	AAC41209.1	SEC ID N°: 3
Proteína GP5 de cepa de VSRRP norteamericana IAF-DESR	AAC41212.1	SEC ID N°: 4
Proteína GP5 de cepa de VSRRP norteamericana IAF 93-653	AAC41215.1	SEC ID N°: 5
Proteína GP5 de cepa de VSRRP norteamericana IAF 93-2616	AAC41218.1	SEC ID N°: 6
Proteína GP5 de cepa VSRRP norteamericana 94-3182	AAC41221.1	SEC ID N°: 7
Proteína GP5 de cepa de VSRRP norteamericana 94-287	AAC41224.1	SEC ID N°: 8
Proteína GP5 de cepa de VSRRP norteamericana IAF-CM	AAC28399.1 (con Ser 106 como por Pirzadeh, B., y col. Can. J. Vet. Res. 62 (3), 170-177 (1998))	SEC ID N°: 9

Descripción	Acceso de GenBank (Referencia)	Secuencia ID N°:
Proteína GP5 de cepa de VSRRP norteamericana ONT-TS	AAC41227.1	SEC ID N°: 10
Proteína GP5 de cepa de VSRRP norteamericana VR-2332	AAD12129.1	SEC ID N°: 11
Proteína GP5 de cepa de VSRRP norteamericana VR-2385	AAA67155.1	SEC ID N°: 12
Proteína GP5 de cepa de VSRRP norteamericana MLV	AAD27656.1	SEC ID N°: 13
Proteína GP5 de cepa de VSRRP norteamericana Consenso	Pirzadeh, B., y col. can. J. vet. Res. 62 (3), 170-177 (1998)	SEC ID N°: 14
Proteína GP5 de cepa de VSRRP europea LV	AAA47105.1	SEC ID N°: 15
ADN de clon infeccioso de VSRRP de cepa de VSRRP norteamericana NVSL 97-7895	AAS59265 . (Truong, H. M., y col. Virology 325 (2), 308-319 , 2004)	SEC ID N°: 16
ADN de clon infeccioso de VSRRP de cepa de VSRRP norteamericana VR-2332	AY150564 . (Nielsen, H. S., y col., J. Virol. 77 (6), 3702-3711, 2003)	SEC ID N°: 17

Para identificar los sitios de glicosilación ligada a N correspondientes a la asparagina 34 o a la asparagina 51 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 que pueden inactivarse y usarse en los procedimientos de la presente invención, las proteínas GP5 de un aislado de VSRRP norteamericano (Figura 5) o un aislado de VSRRP europeo (Figura 6) deseado se alinean con la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 (cepa norteamericana NVSL-97-7895). Mediante el uso de la proteína GP5 de la SEC ID N°: 1 como proteína de referencia, un experto en la materia puede identificar fácilmente los sitios de glicosilación ligada a N en cualquier proteína GP5 y después construir las variantes proteicas de GP5 hipoglicosiladas de la presente invención. Por lo tanto, es evidente que la expresión “correspondiente a (la asparagina 34 y/o la asparagina 51) en una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1” sirve como descriptor del sitio de glicosilación ligada a N en cualquier proteína GP5.

La proteína GP5 hipoglicosilada puede obtenerse a partir de un aislado de VSRRP norteamericano incluyendo, pero sin limitación, la SEC ID N°: 1-13, un aislado de VSRRP norteamericano que tiene una identidad de al menos el 85% a nivel de secuencia de aminoácidos con una secuencia consenso de VSRRP norteamericano tal como la SEC ID N°: 14, o a partir de una secuencia consenso de VSRRP norteamericano. La proteína GP5 hipoglicosilada también puede obtenerse a partir de aislados de VSRRP europeo incluyendo, pero sin limitación, la SEC ID N°: 15, un aislado de VSRRP europeo que tiene una identidad de al menos el 85% a nivel de secuencia de aminoácidos con una secuencia consenso de VSRRP europeo tal como la SEC ID N°: 15, o a partir de una secuencia consenso de VSRRP europeo. Para obtener los polinucleótidos codificantes de variantes de GP5 hipoglicosiladas, pueden mutarse polinucleótidos de cualquiera de las fuentes enumeradas anteriormente mediante técnicas de mutagénesis dirigida convencionales de modo que codifiquen un polipéptido variante de GP5 hipoglicosilado. Como alternativa, puede construirse una secuencia de ADN totalmente sintética que codifique el polipéptido variante de GP5 hipoglicosilado deseado. Esto se logra típicamente usando un programa de análisis de secuencia tal como “back translate” (retrotraducción) que convierte una secuencia polipeptídica en la secuencia polinucleotídica correspondiente (GCG Wisconsin Package™, Accelrys, Inc., San Diego, CA). Si se desea, puede incorporarse una “preferencia de codones” adecuada en el programa “back translate” para proporcionar el diseño de un gen sintético que incorpore codones apropiados para su uso en el huésped de expresión deseado (es decir, mamífero o levadura).

El sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 de la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está presente en todos los aislados de VSRRP norteamericano representativos que se muestran en la Figura 5 y en la cepa de VSRRP europeo representativa Lelystad (Figura 6). En estas cepas de VSRRP nortea-

mericano y europeo ejemplares y no limitantes, el sitio de glicosilación ligada a N en esta posición comprende la secuencia “NGT”. Sin embargo, también se prevé que otras variantes de VSRRP puedan comprender otros sitios de glicosilación ligada a N estructuralmente intercambiables en esta posición (es decir, NXS o T) que también podrían inactivarse por medio de los procedimientos contenidos en el presente documento. Este sitio de glicosilación ligada a N puede inactivarse por sustitución de codones que codifiquen otros restos aminoácídicos tales como glutamina o alanina en lugar de la asparagina 51 en la secuencia polinucleotídica correspondiente. En estos casos, la secuencia de aminoácidos correspondiente en la variante proteica de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada comprendería secuencias tales como “QGT”, “AGT” o “XGT”, en las que X es cualquier aminoácido distinto de asparagina. Estas u otras variantes hipoglicosiladas de los aislados de proteína GP5 de VSRRP norteamericanos, en los que el sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 está inactivado, también pueden combinarse con otras variantes de GP5 hipoglicosiladas en las que estén inactivados otros sitios de glicosilación ligada a N. Otros procedimientos de inactivación de sitios de glicosilación ligada a N incluyen sustituciones de aminoácidos de los restos “X” o “S/T” de la secuencia NXS/T, delecciones de aminoácidos o inserciones de aminoácidos, y se han descrito anteriormente.

El sitio de glicosilación ligada a N que se corresponde exactamente con la asparagina 34 de la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está presente sólo en ciertos aislados de VSRRP norteamericanos representativos que se muestran en el presente documento (Figura 5). Más específicamente, las proteínas GP5 de los aislados de VSRRP norteamericanos representativos IAF-BAJ (SEC ID N°: 3), 94-3182 (SEC ID N°: 7) y 94-287 (SEC ID N°: 8) contienen el sitio de glicosilación ligada a N que se corresponde exactamente con la asparagina 34 de la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 y que comprende el sitio de glicosilación ligada a N “NSS”. Evidentemente, se prevé que otros aislados de GP5 de VSRRP que no se muestran en el presente documento también contendrán sitios de glicosilación ligada a N correspondientes a la asparagina 34 de la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 y que también pueden obtenerse variantes hipoglicosiladas de estas otras proteínas GP5 usando los procedimientos descritos en el presente documento. Este sitio de glicosilación ligada a N de las SEC ID N°: 3, 7 y 8 u otros aislados de VSRRP que contienen el sitio de glicosilación ligada a N de la asparagina 34 pueden inactivarse por sustitución de codones que codifiquen otros restos aminoácídicos tales como glutamina o alanina en lugar de la asparagina 34 en la secuencia polinucleotídica correspondiente. En estos casos, en los que el sitio de glicosilación ligada a N de la asparagina 34 es “NSS”, la secuencia de aminoácidos correspondiente en la variante proteica de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada comprendería secuencias tales como “QSS”, “ASS” o “XSS”, en las que X es cualquier aminoácido distinto de asparagina. Como alternativa, el resto serina de la secuencia “NSS” puede sustituirse con un aminoácido que no sea un hidroxiaminoácido (es decir, que no sea serina ni treonina). En estos casos, la secuencia de aminoácidos correspondiente en la variante proteica GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada comprendería la secuencia “NSX”, en la que X es cualquier aminoácido distinto de asparagina. También puede usarse una inserción de un aminoácido que no sea un hidroxiaminoácido entre los dos restos serina de la secuencia “NSS” (es decir, entre las serinas 35 y 36) para inactivar este sitio de glicosilación particular.

En otros aislados de VSRRP norteamericanos que carecen del sitio de glicosilación ligada a N que se corresponde exactamente con la asparagina 34 de la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1, también pueden inactivarse otros sitios de glicosilación ligada a N localizados en el resto 30 (Figura 5 “NAS” en las SEC ID N°: 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 13) y el resto 33 (Figura 5 “NNS” en las SEC ID N°: 3, 8; “NSS” en las SEC ID N°: 6, 10, “NDS” en las SEC ID N°: 11, 13). En otras palabras, también pueden inactivarse sitios de glicosilación ligada a N en otros aislados norteamericanos localizados en posiciones aminoácídicas correspondientes a los restos 30 y 33 de la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1, y usarse en los procedimientos de la presente invención. Sin quedar ligado a teoría alguna, la región particular de la proteína GP5 de VSRRP localizada entre los restos 29 y 35 de la proteína de referencia GP5 de la SEC ID N°: 1 parece ser una región hipervariable (Figura 5) que puede tolerar una diversidad de secuencias aminoácídicas diferentes (Figura 5; véase también Pirzadeh y col., Can. J. Vet Res., 1998, 62: 170-177). Aunque ciertos aislados de VSRRP de origen natural no contienen sitios de glicosilación ligada a N en esta región (es decir, los aislados norteamericanos de las SEC ID N°: 5, 12; el aislado europeo de la SEC ID N°: 15), otros aislados pueden contener entre 1 y 3 sitios de glicosilación en esta región. Por consiguiente, la inactivación de uno cualquiera de los sitios de glicosilación de una proteína GP5 dada en la región localizada entre los restos 29 y 35 de la proteína de referencia GP5 de la SEC ID N°: 1 se contempla en el presente documento como una composición o procedimiento para generar una respuesta inmune mejorada contra la proteína GP5 de VSRRP. Además, la inactivación de más de uno o de todos los sitios de glicosilación de una proteína GP5 dada en la región localizada entre los restos 29 y 35 de la proteína de referencia GP5 de la SEC ID N°: 1 también se contempla en el presente documento como una composición o procedimiento para generar una respuesta inmune mejorada contra la proteína GP5 de VSRRP.

El alineamiento de la secuencia de VSRRP norteamericanos y europeos muestra que el sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 de la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 también está presente en un aislado de VSRRP europeo representativo. En este caso particular, el sitio de glicosilación ligada a N comprende la secuencia “NGT” y la asparagina 51 de la secuencia de referencia de la SEC ID N°: 1 se corresponde con la asparagina 53 de la SEC ID N°: 15. Este sitio de glicosilación ligada a N puede inactivarse por sustitución de codones que codifiquen otros restos aminoácídicos tales como glutamina o alanina en lugar de la asparagina 53 en la secuencia polinucleotídica de VSRRP europeo correspondiente. En estos casos, la secuencia de aminoácidos correspondiente en la variante proteica de GP5 de VSRRP europeo hipoglicosilada comprendería secuencias tales como “QGT”, “AGT” o “XGT”, en las que X es cualquier aminoácido distinto de asparagina. Estas u otras variantes hipoglicosiladas de los

aislados de VSRRP europeos en los que el sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 está inactivado también pueden combinarse con otras variantes de GP5 hipoglicosiladas en las que estén inactivados otros sitios de glicosilación ligada a N.

5 Las proteínas variantes de GP5 hipoglicosiladas pueden estar codificadas por virus SRRP que pueden usarse para preparar vacunas vivas, muertas o atenuadas para proteger a los cerdos de infecciones por VSRRP. En realizaciones preferidas de la invención, las proteínas variantes de GP5 hipoglicosiladas de la presente invención se modifican por ingeniería genética hacia clones de VSRRP infecciosos que sean capaces de producir ARN de VSRRP infeccioso. Se encuentran descripciones de clones de VSRRP norteamericanos infecciosos que podrían modificarse por ingeniería genética para codificar proteínas variantes de GP5 hipoglicosiladas en la Patente de Estados Unidos N° 6.500.662, 10 Nielsen y col., J. Virol. 77: 3702-11, 2003, y Truong y col., Virology 325: 308-19, 2004. Las secuencias de clones infecciosos de VSRRP norteamericanos que pueden mutarse para obtener virus VSRRP para su uso en vacunas incluyen, pero sin limitación, las cepas norteamericanas NVSL 97-7895 (SEC ID N°: 16) y la cepa VR-2332 (SEC ID N°: 17). Se encuentran descripciones de clones de VSRRP europeos infecciosos que podrían modificarse por ingeniería genética para codificar proteínas variantes de GP5 hipoglicosiladas en la Patente de Estados Unidos N° 6.268.199. En 15 realizaciones en las que la vacuna comprende un VSRRP vivo o atenuado, el sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la N44 en la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 (es decir, la secuencia "NLT" en las Figuras 5 y 6) no está inactivado ya que la glicosilación de este sitio es necesaria para la infectividad del VSRRP. En el caso de los aislados de VSRRP europeos, el sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la N44 en la proteína GP5 de 20 referencia de la SEC ID N°: 1 es la secuencia NLT que comienza en la asparagina 46 de la cepa de VSRRP europea representativa Lelystad (SEC ID N°: 15; Figura 6). El sitio de glicosilación ligada a N N46 de las cepas de VSRRP europeo también es necesario para la infectividad y no se inactiva en realizaciones de la invención en las que se usa una vacuna de VSRRP viva o atenuada.

25 Como alternativa, las proteínas variantes de GP5 hipoglicosiladas pueden introducirse en cerdos con vacunas de ADN. Dichas vacunas de ADN comprenden típicamente una molécula de ADN en la que un promotor activo en células de mamífero se une operativamente a dicho polinucleótido que codifica dicha variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada. Los promotores que pueden usarse para dirigir la expresión de las proteínas variantes de GP5 hipoglicosiladas incluyen, pero sin limitación, el promotor temprano inmediato de CMV (citomegalovirus), el promotor de la repetición terminal larga de VSR (virus del sarcoma de Rous) y el promotor del antígeno T del VS40 (Virus de los Simios 40). En ciertas realizaciones preferidas, este promotor es un promotor de CMV. 30

En otras realizaciones más, el polinucleótido aislado que expresa la proteína variante de GP5 hipoglicosilada 35 comprende un vector viral distinto de VSRRP. Los vectores virales distintos de VSRRP incluyen, pero sin limitación, vectores de virus vaccinia, vectores de virus herpes simple, vectores de adenovirus, vectores de alfavirus y vectores del virus de la GET. Dichos vectores se describen en diversas publicaciones tales como las Patentes de Estados Unidos N° 7.041.300 (para vectores del virus de la GET) y 6.692.750 (para vectores de alfavirus).

40 *Vehículos y adyuvantes terapéuticamente aceptables*

En la práctica de la invención, los polipéptidos variantes de GP5 hipoglicosilados o polinucleótidos que codifican polipéptidos variantes de GP5 hipoglicosilados pueden combinarse con vehículos o excipientes terapéuticamente 45 aceptables. Los ejemplos no limitantes de dichos vehículos incluyen solución salina fisiológica u otras soluciones salinas similares, proteínas tales como proteínas de albúmina sérica, tampones tales como carbonato, fosfato, fosfonato o tampones basados en Tris, tensioactivos tales como NP40 o Triton X100 y polímeros de polietilenglicol. Cualquier combinación de dichos vehículos puede usarse en las composiciones y procedimientos de la presente invención. Un vehículo preferido para composiciones que comprenden virus VSRRP vivos o atenuados es acetato de dl- α -tocoferol 50 a una concentración de entre 50 y 100 mg/ml.

También se contempla el uso de adyuvantes en composiciones que contienen los polipéptidos variantes de GP5 hipoglicosilados o polinucleótidos que codifican polipéptidos variantes de GP5 hipoglicosilados. Dichos adyuvantes son típicamente de naturaleza acuosa u oleosa. Los adyuvantes que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, 55 hidróxido de aluminio, Quil A, una suspensión de gel de alúmina, aceites minerales, glicéridos, ácidos grasos, subproductos de ácidos grasos, micobacterias y oligodesoxinucleótidos CpG, o cualquier combinación de los mismos. Se describen diversos tipos de adyuvantes de CpG que pueden usarse en las Patentes de Estados Unidos N° 6.977.245 y 6.406.705.

60 También se contempla el uso de otros adyuvantes que potencian respuestas inmunes celulares (es decir, potenciadores de subpoblaciones de células T auxiliares (Th.sub.1 y Th.sub.2)). Dichos adyuvantes incluyen, pero sin limitación, interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL4, IL-5, IL6, IL-12, interferón gamma (IFN-g), factor de necrosis tumoral, MDP (dipéptido de muramilo), complejo inmunoestimulante (ISCOM) y liposomas.

65 La administración de la composición puede realizarse por inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intradérmica, inyección parenteral, inyección intramuscular, inyección sin aguja, electroporación, administración por vía oral, administración intranasal, administración oronasal o cualquier combinación de las mismas. La inyección sin

aguja se efectúa típicamente con un dispositivo tal como un inyector Agro-Jet® (Medical International Technologies, Montreal, Canadá).

5 Ejemplos

Ejemplo 1

10 El ejemplo siguiente ilustra la construcción de diversos polinucleótidos de VSRRP que codifican diversas variantes polipeptídicas de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosiladas, composiciones que incluyen dichos polinucleótidos que se usan para generar respuestas inmunes mejoradas contra un antígeno de VSRRP y procedimientos de uso de los polinucleótidos y composiciones para generar una respuesta inmune mejorada en un cerdo contra un antígeno de VSRRP.

15 *Materiales y procedimientos*

Células, medios y anticuerpos. Las células MARC-145 se propagaron en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS) y 100 unidades de penicilina, 20 unidades de estreptomicina y 20 unidades de kanamicina por ml de medio de cultivo. Estas células se usaron para la electroporación de ARN, infección viral, cultivo de virus y ensayos de placas. Las células de riñón de cría de hámster (BHK-21) se mantuvieron en Medio Esencial Mínimo (MEM) con sal de Earl que contenía FBS al 5% y los antibióticos mencionados anteriormente. Las células BHK-21 se usaron para la expresión transitoria de GP5 seguida de ensayos de inmunofluorescencia (IFA) o experimentos de radiomarcaje e inmunoprecipitación. Todas las células se mantuvieron a 37°C y en un entorno de CO₂ al 5%. Los anticuerpos policlonales de conejo contra las proteínas GP5 y M de VSRRP se obtuvieron por cortesía de Carl A. Gagnon (Universidad of Quebec, Montreal, Canadá). El anticuerpo monoclonal (SDOW17) contra la proteína de la nucleocápside (N) se adquirió en National Veterinary Laboratories (NVSL, Ames, IA, Estados Unidos). El anticuerpo anti-ratón Alexa-488 se obtuvo en Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregón, Estados Unidos).

30

Manipulación genética de plásmidos que codifican GP5 y clon infeccioso de VSRRP

35 El clon de ADNc infeccioso de VSRRP de longitud completa (FL12, SEC ID N°: 16) en pBR322 se digirió con las enzimas de restricción EcoRV y BstZ17 I y el fragmento de ~4,9 kpb que incluía la mayor parte de la ORF2, las ORF3-7 completas y la 3'UTR completa de VSRRP se clonó en pBR322 usando los mismos sitios enzimáticos. Este plásmido intermedio servía como molde para la mutagénesis para introducir mutaciones en los sitios de glicosilación ligada a N potenciales (N34, N44 y N51) dentro de GP5 (Figura 2). La mutagénesis se llevó a cabo usando PCR de extensión por solapamiento con cebadores sintéticos (Tabla 2) usando técnicas convencionales.

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

Tabla 2. Cebadores y sus secuencias usados en el presente estudio. Las secuencias de codones subrayadas indican el sitio de mutación.

Cebadores	Secuencias de Nucleótidos
GP5-N34A-Dir	5' GCCAACAGCGCCAGCAGCTCTC 3' (SEC ID N°: 18)
GP5-N44A-Dir	5' GTTGATTTACGCCCTTGACGCTATG 3' (SEC ID N°: 19)
GP5-N51A-Dir	5' GTGAGCTGGCTGGCAGAGATTG 3' (SEC ID N°: 20)
GP5-N34/44A-Dir	5'GCCAACAGCGCCAGCAGCTCTCATCTTCAGTTGATTTACGCCCTTGACGCTATG (SEC ID N°: 21)3'
GP5-N44/51A-Dir	5' GTTGATTTACGCCCTTGACGCTATGTGAGCTGGCTGGCAGAGATTG 3' (SEC ID N°: 22)
GP5-N34/51A-Dir	5' <u>GCCAACAGCGCCAGCAGCTCTCATCTTCAGTTGATTACAACTTGACGCTATG</u> TGAGCTGGCIGGCACAGATTG 3' (SEC ID N°: 23)
GP5-N34/44/51A-Dir	5' <u>GCCAACAGCGCCAGCAGCTCTCATCTTCAGTTGATTACGCCCTTGACGCTATG</u> TGAGCTGGCIGGCACAGATTG 3' (SEC ID N°: 24)
VSRRP-13177-Dir	5' CTACCAACATCAGGTCGATGGCGG 3' (SEC ID NO:25)
VSRRP-14473-Inv	5' GTCGGCGCGGACTTACCTTTAGAG 3' (SEC ID NO:26)

El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción BsrGI y BstEII y se volvió a colocar en el plásmido intermedio. Se identificaron los clones que contenían las mutaciones deseadas y se confirmaron por secuenciación. La región codificante completa de GP5 se secuenció para asegurarse de que no estaban presentes mutaciones adicionales en los clones. El fragmento EcoRV-PacI del plásmido intermedio que contenía mutaciones en la región codificante de GP5 se movió de nuevo al clon de ADNc de longitud completa usando los mismos sitios de enzimas de restricción. La región codificante de GP5 en los clones de longitud completa se secuenció de nuevo con cebadores internos específicos de VSRRP para confirmar la presencia de las mutaciones.

La GP5 wt y los mutantes individuales se clonaron en un vector bicistrónico en el que la GP5 es el primer cis-trón, seguido del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis (VEMC) y de las secuencias codificantes de M (Figura 1A). La GP5 de longitud completa también se clonó en un vector dirigido por el promotor de CMV (pcDNA 3.0TM, Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, Estados Unidos) para estudios de complementación. Con este fin, la región codificante de la GP5 se amplificó por PCR, se clonó y se secuenció.

Transcripción y electroporación *in vitro*

Los plásmidos de longitud completa se digirieron con AcII y se usó ADN linealizado como molde para generar transcritos de ARN con caperuza usando el kit mMESSAGE mMACHINE Ultra T7TM de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Ambion, Inc., Austin, Tx, Estados Unidos) y como se ha descrito anteriormente. La mezcla de reacción se trató con DNase para digerir el molde de ADN y se extrajo con fenol y cloroformo y, por último, se precipitó con isopropanol. Se analizó la integridad de los transcritos *in vitro* mediante electroforesis en gel de agarosa con gloxal seguida de tinción con bromuro de etidio.

Se sometieron a electroporación células MARC-145 con aproximadamente 5,0 µg de transcritos *in vitro*, con 5,0 µg de ARN total aislado de células MARC-145. Aproximadamente 2 x 10⁶ células en 400 µl de DMEM que contenía DMSO al 1,25% se sometieron a un pulso usando Bio-Rad Gene Pulser XCellTM (Bio-Rad, Inc., Hercules, CA, Estados Unidos) a 250 V, 950 µF en una cubeta de 4,0 mm. Las células se diluyeron en medio de cultivo normal, se sembraron en una placa de cultivo de células de 60 mm. Se sembró una pequeña porción de las células sometidas a electroporación en una placa de 24 pocillos para examinar la expresión de proteína N a las 48 h después de la electroporación, que indicaría la replicación y la transcripción del genoma. Una vez confirmada la expresión de proteína N usando un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA), se recogió el sobrenadante del volumen de células sometidas a electroporación en placa de 60 mm a las 48 h después de la electroporación, se aclaró y se pasó sobre células MARC-145 sin tratamiento previo. Las células infectadas se observaron para determinar el efecto citopático (ECP) junto con la expresión de proteína N usando IFA. Se determinó que los sobrenadantes de células infectadas que mostraban tanto ECP como fluorescencia positiva contenían virus infeccioso. Después de la confirmación, la reserva de virus se cultivó y se congeló a -80°C en alícuotas pequeñas para estudios adicionales. En todos los experimentos, se usaron como controles FL12 que contenía genoma de VSRRP wt y FL12pol que contenía genoma de VSRRP deficiente en polimerasa.

Radiomarcaje metabólico y análisis de proteínas

Se infectaron células de BHK-21 en placas de seis pocillos con virus vaccinia recombinante (vTF7-3) a un MOI de 3,0 y posteriormente se transfectaron con ADN plasmídico bicistrónico que codificaba GP5 wt o diversas GP5 mutantes bajo el promotor de la ARN polimerasa de T7. Se llevó a cabo una transfección de ADN usando Lipofectamine2000TM de acuerdo con el protocolo del fabricante (Life Technologies, Estados Unidos). A las 16 horas después de la transfección, las células se lavaron dos veces con PBS y se las privó de DMEM sin metionina/cisteína durante una h y se radiomarcaron con 0,6 ml de DMEM sin metionina/cisteína que contenía 100 µCi de mezcla de marcaje de proteínas Expre³⁵S³⁵S (NEN Life Sciences, Boston, MA) por ml de medio durante tres horas. Después del radiomarcaje, las células se lavaron en PBS frío tres veces y se prepararon extractos celulares en 300 µl de tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, SDS al 0,1%, desoxicolato sódico al 1% e inhibidor de proteasas 1x). Los extractos celulares aclarados se incubaron durante una noche a 40°C con anticuerpos de conejo anti-GP5 o anti-proteína M. Se añadió una suspensión de aproximadamente 4,0 mg de proteína A Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Suecia) en 100 µl de tampón RIPA y se incubó adicionalmente durante 2 h. Los complejos inmunoprecipitados se lavaron 3 veces con 500 µl de tampón RIPA y se usaron para un análisis adicional.

Para el tratamiento con endoglicosidasa H (Endo H), los complejos inmunoprecipitados se resuspendieron en 20 µl de tampón desnaturalizante 1x (SDS al 0,5%, β-mercaptoetanol al 1,0%) y se llevaron a ebullición durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió, se ajustó a tampón G5 1x (citato sódico 0,05 M, pH 5,5) y se incubó durante 16 h a 37°C con 100 unidades de Endo H (New England Biolabs, Beverly, MA, Estados Unidos). Las muestras de control sin digerir se procesaron de forma similar pero no se añadió Endo H. Después de la digestión con Endo H, las muestras se mezclaron con un volumen equivalente de tampón de muestras de SDS-PAGE 2x, se llevaron a ebullición durante 5 min y se resolvieron mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones desnaturalizantes junto con marcador de proteínas (Protein Plus Precision Standard, Bio-Rad, Inc). El gel se fijó con ácido acético al 10% durante 15 min, se lavó tres veces con agua, se trató con salicilato sódico 0,5 M durante 30 min, se secó y, por último, se expuso a una película de rayos X a -70°C. Para la digestión peptídica con N-glicosidasa F (PNGase F) (New England Biolabs, Inc), se resuspendieron complejos inmunoprecipitados en tampón G7 1x (fosfato sódico 0,05 M, pH 7,5, NP-40 al 1,0%) y se realizó una digestión por incubación durante 16 h a 37°C con 2 unidades de la enzima. Para examinar la

síntesis de GP5 en presencia de tunicamicina (Sigma, St. Louis, MO), se trataron células transfectadas con 2,0 μ g de tunicamicina por ml de medio durante una h y se realizó el radiomarcaje en presencia del fármaco durante 3 h como anteriormente.

Para obtener GP5 radiomarcada expresada en viriones extracelulares o virus intracelulares, se infectaron células MARC-145 con VSRRP wt o mutantes. A las 48 h después de la infección, las células se privaron de medio durante una h y se radiomarcaron con 100 μ Ci de mezcla de marcaje de proteínas Expre³⁵S³⁵S por ml de medio que contenía DMEM sin metionina/cisteína al 90% y DMEM normal al 10% durante 24 h. Después del marcaje, se recogió el sobrenadante de cultivo, se aclaró de residuos celulares y los viriones extracelulares se sedimentaron a 100.000 x g durante 3 h a 4°C. Los sedimentos virales se resuspendieron en 200 μ l de tampón de RIPA, se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-GP5 y las proteínas se examinaron con o sin tratamiento con Endo-H. Para la inmunoprecipitación de GP5 expresada en virus intracelular, se llevó a cabo una infección como anteriormente y a las 24 h después de la infección las células se privaron de medio durante una h, y se radiomarcaron como anteriormente durante 2 h antes de preparar los extractos celulares.

Cinética de la multiplicación viral y ensayo de placas

Se infectaron células MARC-145 con VSRRP mutante o wt a una MOI de 3,0 UFP por célula y se incubaron a 37°C en una incubadora. A diversos puntos temporales postinfección, se recogieron alícuotas de sobrenadantes de cultivo de células infectadas y se determinó el título de virus en los sobrenadantes y se expresó por dosis infecciosa en cultivo de tejidos 50 por ml (DICT50/ml). La cinética de multiplicación viral se realizó tres veces. Para examinar la morfología de las placas de virus mutantes, se realizó un ensayo de placas usando células MARC-145. Las células se infectaron con diluciones seriadas de 10 veces de virus individuales durante una h a 37°C. La monocapa de células infectadas se lavó con PBS y se cubrió con DMEM-FBS al 5% que contenía agarosa Seaplaque al 0,8% (FMC Bioproducts, Rockland, ME, Estados Unidos). Después de 96 h, los tapones de agarosa se retiraron y se incubó la monocapa de células con solución de tinción (formaldehído al 20%, etanol al 9,0% y cristal violeta al 0,1%) durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron suavemente con agua para eliminar el exceso de colorante y se secaron al aire para examinarlas y realizar el recuento de las placas.

Complementación de la recuperación de virus por expresión de GP5 wt en trans

Se transfectaron células BHK-21 con pcDNA-GP5. A las 40 horas después de la transfección, las células se recogieron y se sometieron a electroporación con transcritos con caperuza obtenidos *in vitro* a partir de ADNc de VSRRP de longitud completa que codifica GP5 mutante. Las células sometidas a electroporación se diluyeron con medio recién preparado y se sembraron en placas de 6 pocillos. Se recogió el sobrenadante de las células sometidas a electroporación a las 48 h después de la electroporación, se centrifugaron para eliminar los residuos celulares y se usaron para infectar células MARC-145 sin tratamiento previo. Las células MARC-145 infectadas se examinaron a las 48 h después de la infección para determinar la expresión de proteína N mediante IFA como se ha descrito anteriormente. Se contó el número de células positivas para determinar el número de pseudopartículas producidas en el sobrenadante. Se calculó el número promedio de células positivas a partir de tres experimentos independientes y se presentó como el número de pseudopartículas producidas por microgramo de ARN transcrito *in vitro* usado para transfectar células.

Ensayos de neutralización en suero (NS)

El título de anticuerpos neutralizantes de VSRRP en una muestra de suero se determinó usando el ensayo de neutralización de focos fluorescentes descrito anteriormente. Se incubaron diluciones seriadas de los sueros de ensayo durante 60 min a 37°C en presencia de DICT50 200 del virus de exposición, que estaba constituido por FL12 (VSRRP wt) o cualquiera de los virus codificantes de una GP5 mutante, FL-N34A, FL-N51A y FL-N34/51A en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco que contenía suero fetal de ternera al 5%. Las mezclas se añadieron a placas de microtitulación de 96 pocillos que contenían células MARC-145 confluentes que se habían sembrado 48 h antes. Después de la incubación durante 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5%, las células se fijaron durante 10 min con una solución de metanol al 50% y acetona al 50%. Después de un lavado exhaustivo con PBS, se detectó la expresión de proteína N de VSRRP con el anticuerpo monoclonal SDOW17 usando una dilución 1:500, seguida de incubación con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) a una dilución 1:100. Los títulos de neutralización se expresaron como la inversa de la mayor dilución que inhibía el 90% de los focos presentes en los pocillos de control.

Inoculación experimental de cerdos con mutantes de GP5 y VSRRP wt

Se usaron reservas de alto título (obtenidas por medio de 3 pases en células MARC 145) de los virus con GP5 mutante (FL-N34A, FL-N51A y FL-N34/51A) y del FL12 (VSRRP wt) para infectar cerdos jóvenes. Se adquirieron cerdos recién destetados de veintiún días de edad de una piara libre de patógenos específicos con un registro certificado de ausencia de infección por VSRRP. Todos los animales eran negativos para anticuerpos anti-VSRRP según se ensayó mediante ELISA (Idexx Labs, Portland, ME). Se infectaron tres cerdos por grupo con VSRRP wt FL12 o los mutantes FL-N34A, FL-N51A y FL-N34/51A. En todos los casos, el inóculo estaba constituido por una DICT50 de 105 diluida en 2 ml y administrada por vía intramuscular en el cuello. Las temperaturas rectales de los animales inoculados se controlaron durante 15 días después de la inoculación (PI). Se midió la viremia por aislamiento normal en células MARC 145 los días 4, 7 y 14 PI. Se extrajeron muestras de suero semanalmente durante un periodo total de 49 días

PI. Las muestras de suero se usaron para detectar títulos de neutralización cruzada homóloga y heteróloga para cada uno de los VSRRP mutantes y wt.

Resultados

Expresión y caracterización de GP5 de VSRRP

La GP5 de la cepa de VSRRP 97-7895 tiene tres sitios de glicosilación posibles (N34, N44 y N51). Para examinar el patrón de glicosilación de la GP5, los presentes inventores generaron primero un vector bicistrónico en el que las regiones codificantes de las proteínas GP5 y M flanqueando el IRES del VEMC se colocaron bajo el control del promotor de la ARN polimerasa de T7 (Figura 1A). El fundamento para construir el vector bicistrónico es que las proteínas GP5 y M se sabe (para el VLD y el VAE) o se postula (para el VSRRP) que interaccionan entre sí y que dichas interacciones pueden ser importantes para el plegamiento de proteínas, la glicosilación, el transporte intracelular y/u otra actividad biológica de GP5.

La expresión transitoria de GP5 y M por transfección del plásmido bicistrónico seguida de radiomarcaje e inmunoprecipitación con anticuerpo anti-GP5 puso de manifiesto dos especies proteicas principales. La especie proteica que migra con una masa de ~25,5 kDa es la forma totalmente glicosilada de la GP5 (Figura 1B, carril 2). Puesto que cada glicosilación ligada a N añade ~2,5 kDa de masa molecular a una proteína, esto indica que los tres sitios de glicosilación potenciales se usan posiblemente para la glicosilación de GP5. La especie proteica de 19,0 kDa es la proteína M viral puesto que también se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-M (carril 7). Los resultados indican que las proteínas GP5 y M interaccionan entre sí en células que expresan ambas proteínas. Después del tratamiento con Endo H, una enzima que elimina cadenas de oligosacáridos de tipo de alto contenido en manosa, se reducía el tamaño de la GP5 hasta ~18 kDa, mientras que el tamaño de la proteína M permanecía sin cambios (carril 3). El tratamiento de la GP5 con PNGasa F (carril 4), una enzima que elimina los azúcares de todo tipo de la cadena principal de la proteína, o la síntesis de GP5 en presencia de tunicamicina (carril 5) daban como resultado una proteína que migraba con una movilidad electroforética ligeramente más rápida que la proteína con tratamiento con Endo H. Esto se espera, puesto que el tratamiento con tunicamicina o la digestión con PNGasa F generaría proteínas sin glicosilar, mientras que el tratamiento con Endo H daría como resultado proteínas que conservan restos N-acetilglucosamina en cada uno de los sitios de glicosilación ligada a N. Debe señalarse que se inmunoprecipitó una especie proteica destacada de una masa molecular ~30 kDa con anticuerpo anti-M. La identidad de esta proteína no se conoce pero podría ser una proteína celular que interaccione con la proteína M.

Los resultados de los estudios anteriores sugieren que las formas sin glicosilar y totalmente glicosilada de la GP5 poseen tamaños moleculares aparentes de 18,0 kDa y 25,5 kDa, respectivamente. Parece que los tres sitios de glicosilación potenciales se usan para generar la forma totalmente glicosilada de la GP5. Los restos de glicanos añadidos a estos sitios son de tipo de alto contenido en manosa puesto que son sensibles a la digestión por Endo H. Además, los resultados indican que ambas formas sin glicosilar y totalmente glicosilada de la GP5 parecen interaccionar con la proteína M.

Análisis de los sitios de glicosilación ligada a N usados para la glicosilación de GP5

Para determinar con mayor exactitud si se usan todos o algunos de los sitios de glicosilación ligada a N potenciales de la GP5 para la adición de restos de azúcares, se generaron una serie de mutantes en el plásmido bicistrónico en los que se modificaban los tres sitios de glicosilación potenciales N34, N44 y N51 (Figura 2A) a alaninas, individualmente o en diversas combinaciones (Figura 2B). En células transfectadas con plásmido, las proteínas se radiomarcaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-GP5. Los inmunocomplejos se dejaron sin tratar o se trataron con Endo H y se examinaron mediante SDS-PAGE. Como puede observarse a partir de los datos presentados en la Figura 2C, las proteínas GP5 mutantes que llevaban mutaciones individuales (N34A, N44A o N51A) migraban como especies proteicas de aproximadamente 23,0 kDa (carriles 4, 6 y 8, punta de flecha). Tras el tratamiento con Endo H, estas proteínas migraban como especies proteicas de ~18,0 kDa (carriles 5, 7 y 9, respectivamente) similares a la GP5 wt después del tratamiento con Endo H (carril 3). Las diferencias minoritarias en la movilidad electroforética de las proteínas reflejan más probablemente el hecho de que la proteína wt conservaría los tres restos N-acetilglucosamina después del tratamiento con Endo H en comparación con los mutantes individuales que contendrían dos restos de este tipo. Los dobles mutantes (N34/44A, N44/51A y N34/51A) producían especies proteicas que migraban próximas a la proteína de ~20,5 kDa (carriles 10, 12 y 14) y, tras el tratamiento con Endo H, el tamaño de las proteínas se reducía hasta 18,0 kDa (carriles 11, 13 y 15). El triple mutante (N34/44/51A) generaba una proteína que migraba como una proteína de 18,0 kDa (carril 16) y era resistente a la digestión con Endo H (carril 17).

Por lo tanto, a partir de los estudios mutacionales anteriores es evidente que los tres sitios de glicosilación potenciales se usan para la glicosilación para generar GP5 de VSRRP totalmente madura. Parece que los tres sitios de glicosilación están modificados por restos de glicanos de tipo de alto contenido en manosa.

Recuperación de virus VSRRP infeccioso con mutantes de GP5

Para evaluar la importancia de la glicosilación ligada a N en la generación de VSRRP infeccioso, se insertaron las regiones codificantes de las proteínas GP5 mutantes en el clon de ADNc de longitud completa. Los transcritos con caperuza producidos *in vitro* a partir de los clones se introdujeron por electroporación en células MARC-145 y se

examinó la generación de VSRRP infeccioso. Los resultados de los presentes inventores mostraban que se recuperaba fácilmente virus infeccioso a partir de las células sometidas a electroporación con transcritos de longitud completa que contenían mutaciones en las posiciones N34, N51 y N34/51. Sin embargo, en condiciones de recuperación de virus similares, los intentos repetidos para recuperar otros virus mutantes no tuvieron éxito. Aunque la cinética de multiplicación de los virus recuperados era similar a la del virus wt, la producción global de virus FL-N34A y FL-N51A que contenían mutaciones en las posiciones N34 y N51 era aproximadamente un logaritmo menor en células MARC-145, mientras que la del FL-N34/51A con dobles mutaciones (N34/51A) era casi 1,5 logaritmos menor que la del VSRRP wt (Figura 3A). La amplificación por RT-PCR de ARN de células infectadas seguida de secuenciación de nucleótidos indicaba que estos virus eran estables, contenían las mutaciones deseadas y no se detectaron otras mutaciones en la región completa de la GP5 (no se muestran los datos).

Se realizó un ensayo de placas virales en células MARC-145 para controlar el fenotipo de placas de los virus mutantes. Las placas generadas por el VSRRP wt eran claras y definidas, mientras que los virus mutantes producían placas que tenían fenotipos diferentes. Los virus FL-N34A, FL-N51A y FL-N34/51A generaban placas que estaban menos definidas y muchas de las células dentro de la placa parecían normales (Figura 3B, flecha sin relleno). Además, los FL-N51A, FL-N34/51A producían algunas placas en las que los virus no conseguían despejar la monocapa de células (Figura 3B, flecha con relleno). Estos datos indican que los virus mutantes recuperados son de hecho menos citopáticos en comparación con el VSRRP wt.

Puesto que los presentes inventores fueron incapaces de recuperar VSRRP infeccioso con los moldes mutantes FL-N44A, FL-N31/44A, FL-N44/51A y FL-N31/44/51A, es posible que las mutaciones en la región codificante de la GP5 puedan haber afectado algunas otras funciones de los moldes de ARN, tales como el empaquetamiento del ARN genómico en partículas. Para abordar esto, los presentes inventores examinaron si las células que expresaban GP5 wt en trans podían servir de soporte al empaquetamiento de moldes de ARN mutantes que de otro modo serían defectuosos en la generación de VSRRP infeccioso. Células BHK-21 transfectadas con pcDNA-GP5 se sometieron a electroporación con transcritos *in vitro* y a las 48 h después de la electroporación se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se usaron para infectar células MARC-145 sin tratamiento previo para determinar la producción de pseudopartículas de VSRRP. Si se generan pseudopartículas, entonces se esperaría observar expresión de la proteína N en estas células MARC-145 infectadas. La expresión de N sólo es posible cuando células MARC-145 sin tratamiento previo reciben genoma de ARN mutante encapsidado de longitud completa que pone en marcha la replicación después de la entrada de las pseudopartículas en células. De todos los mutantes que no pudieron recuperarse anteriormente, los presentes inventores fueron capaces de recuperar pseudopartículas que contenían dos genomas mutantes de longitud completa (FL-N44A y FL-N34/44A) (Figura 3C). Cada célula verde fluorescente en el cultivo infectado con virus mutante representa una pseudopartícula infecciosa. Puesto que estas partículas sólo contienen la GP5 wt funcional en la envoltura pero contienen las secuencias codificantes para GP5 mutante no funcional en el genoma, no pueden producir partículas infecciosas para propagarse a las células circundantes. Los múltiples intentos para recuperar pseudopartículas infecciosas con los otros moldes mutantes (FL-N44/51A y FL-N31/44/51A) no tuvieron éxito.

Una estimación cuantitativa del número de pseudopartículas infecciosas producidas a partir de estos experimentos sugiere que se producen aproximadamente 1000 partículas por microgramo de ARN mutante introducido por electroporación en las células (Figura 3D). Esto es aproximadamente 100 veces menos de lo obtenido con ARN que codifica GP5 wt. La producción de dichos bajos niveles de pseudopartículas infecciosas podría deberse al hecho de que sólo aproximadamente el 5-10% de las células que expresaban la GP5 wt recibían los transcritos de longitud completa, como se observa por la expresión de la proteína N en estas células. También es posible que los bajos niveles de expresión de GP5 wt en las células transfectadas puedan haber contribuido a los bajos niveles de producción de estos pseudoviriones.

Examen de la GP5 incorporada en virus mutantes y de las expresadas en células infectadas

Para determinar la naturaleza de la proteína GP5 incorporada en viriones infecciosos producidos a partir de células transfectadas, los presentes inventores generaron VSRRP radiomarcado a partir de células infectadas con virus wt y mutantes. Los viriones extracelulares presentes en el sobrenadante de cultivo se sedimentaron por ultracentrifugación y se examinó la GP5 presente en estos viriones por inmunoprecipitación usando anticuerpo anti-GP5 y posterior análisis electroforético. Los resultados muestran que la GP5 wt incorporada en viriones migraba como una banda ampliamente difusa de una especie proteica de ~25-27 kDa (Figura 4A, carril 1), que es parcialmente resistente a la digestión con Endo H (carril 2). Las GP5 mutantes (N34A y N51A) incorporadas en viriones eran sensibles a Endo H. Basándose en el tamaño de los productos generados después de la digestión con Endo H, parece que sólo un resto glicano en estos mutantes de un solo sitio es sensible mientras que el otro es resistente. Por el contrario, la GP5 doble mutante (N43/51A) era resistente a Endo H. Además, la digestión con Endo H de GP5 de virus mutantes también producía cantidades muy pequeñas de cadena principal de proteína GP5, indicando que estos virus incorporan proteínas GP5 que contienen restos de glicanos resistentes a Endo H así como sensibles a Endo H.

Puesto que en las células transfectadas con el vector bicistrónico las proteínas GP wt así como mutantes eran completamente sensibles a Endo H (Figuras 1 y 2), los presentes inventores estaban sorprendidos de la observación de que la GP5 en viriones de SRRP contenía formas enormemente resistentes a Endo H. Para examinar si las formas resistentes a Endo H de la proteína también se sintetizan en células infectadas, se radiomarcaron células MARC-145 infectadas con VSRRP wt o mutante, se inmunoprecipitaron proteínas GP con anticuerpo anti-GP5 y se analizaron por electroforesis con o sin digestión con Endo H. Los resultados de un experimento de este tipo se muestran en la Figura

4B. La mayoría de la GP5 wt contenía glicanos resistentes a Endo H en los tres sitios (carriles 2 y 3) mientras que los dos mutantes individuales contenían glicanos resistentes a Endo-H sólo en un sitio (carriles 4-7). Algunos de los restos de glicanos en el doble mutante eran resistentes mientras que otros eran sensibles a Endo H (carriles 8 y 9). Aunque el patrón de resistencia a Endo H es similar al observado para la GP5 asociada a viriones, es diferente del observado en células que expresan proteínas tanto GP5 como M (Figuras 1 y 2). Estos resultados indican que otras proteínas virales pueden desempeñar un papel en la modificación adicional de glicanos en GP5.

Influencia de la hipoglicosilación de GP5 sobre la capacidad del VSRRP para ser neutralizado por anticuerpos específicos

Se sabe que el nivel de glicosilación de glicoproteínas virales que están implicadas en la interacción con receptores virales afecta a la capacidad de los viriones para reaccionar con anticuerpos neutralizantes de virus. Para ensayar si este fenómeno se produce en el caso del VSRRP, los mutantes de GP5 de VSRRP con patrones de glicosilación alterados (FL-N34A, FL-N51A y FL-N34/51A) se compararon con el VSRRP wt (FL12) en su capacidad para neutralizarse por antisueros de convalecientes. Para esto, los presentes inventores usaron antisueros de convalecientes (47 días p.i.) de 4 animales que se habían infectado con VSRRP wt. Se usaron dosis similares (DICT50 2.000) de mutantes de GP5 de VSRRP infecciosos (FL-N34A, FL-N51A y FL-N34/51A), así como del VSRRP wt derivado de un clon infeccioso (FL12), como virus de exposición en ensayos de neutralización en suero siguiendo el protocolo de ensayo convencional de los presentes inventores, y el conjunto de 4 sueros anti-VSRRP wt (FL12) usado como referencia. La Tabla 3 muestra los diferentes títulos de neutralización en suero a punto final obtenidos. Normalmente, una muestra de suero de convaleciente de VSRRP wt recogida a los 47-54 días p.i. contiene niveles moderados de actividad neutralizante de VSRRP wt (de 1:8 a 1:32, Tablas 3 y 4), reflejando el carácter relativamente débil y tardío de la respuesta de anticuerpos neutralizantes que es típica de infecciones con VSRRP wt. Sin embargo, el uso de mutantes de VSRRP hipoglicosilados (que carecen de uno o dos restos glicanos en el ectodominio de GP5) como virus de exposición en los ensayos de NS parece haber aumentado significativamente el punto final de los sueros de referencia, con un aumento del título a punto final que varía de seis a veintidós veces (Tabla 3). Esta observación sugiere claramente que la eliminación de uno, y particularmente dos, de los restos glicanos aumenta la accesibilidad del epítipo neutralizante a anticuerpos específicos. Estos resultados parecen indicar la presencia de una cantidad significativa de anticuerpos neutralizantes de VSRRP en los sueros de convalecientes infectados por VSRRP que de otro modo sería indetectable, debido al uso típico de VSRRP wt que contiene GP5 totalmente glicosilada en los ensayos de NS.

TABLA 3

Efecto de la alteración del patrón de glicosilación de la GP5 de VSRRP sobre la capacidad del virión infeccioso para reaccionar con anticuerpos neutralizantes. Los números de la Tabla 3 corresponden a la inversa de la dilución a punto final, que muestra la neutralización (punto final de la NS)

Suero de animales infectados con 10 ⁵ DICT ₅₀ de VSRRP wt FL12	Cepa de VSRRP usada como exposición para el ensayo de NS			
	VSRRP wt (FL12)	FL-N34A	FL-N51A	FL-N34/51A
Animal N° 11404 (47 días pi)	1:31	1:256	1:256	1:32.768
Animal N° 11346 (47 días pi)	1:8	1:64	1:256	1:16.384
Animal N° 11457 (47 días pi)	1:16	ND	1:128	1:2.048
Animal N° 11407 (47 días pi)	1:8	ND	1:64	1:2.048

Influencia de la hipoglicosilación de GP5 sobre la capacidad del VSRRP para inducir anticuerpos neutralizantes in vivo

Un efecto notable que se ha descrito cuando la eliminación de carbohidratos de una glicoproteína de la envoltura viral conduce a la producción de altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus mutante cuando se usa este mutante para la inoculación *in vivo* del huésped, en algunos casos induce también mayores títulos de anticuerpo contra el virus wt que el propio virus wt. Los presentes inventores infectaron grupos de cerdos con dosis idénticas del VSRRP wt FL12 o de cada uno de los mutantes con patrones de glicosilación alterados. Curiosamente, la evaluación clínica/virológica de la infección por evaluación de la temperatura rectal y evaluación de la viremia los días 4, 7 y 10 p.i. indicaban un patrón de infección similar en todos los grupos, como se ha descrito anteriormente para el FL12, sin pruebas de atenuación o exacerbación de la virulencia para ninguno de los mutantes (no se muestran los datos). Sin embargo, el muestreo secuencial de suero de estos animales durante todo un periodo de 48 días indicaba diferencias pronunciadas entre el VSRRP wt y los mutantes en su cinética de inducción de una respuesta de anticuerpos neutralizante de VSRRP (Tablas 4A y 4B). Los mutantes desarrollaron una respuesta de anticuerpos neutralizantes homólogos temprana y más robusta que la desarrollada por VSRRP wt, hasta el punto en el que, en el caso de los mutantes, la naturaleza característicamente lenta y escasa de la respuesta de anticuerpos neutralizantes contra VSRRP

parece haberse corregido (Tabla 4B). La cinética de aparición de anticuerpos neutralizantes homólogos de mutantes (Tabla 4B) indica una seroconversión de anticuerpos neutralizantes más regular, que concuerda con la descrita para otras infecciones víricas tales como para virus influenza o de la pseudorrabia, pero no para VSRRP. Es de suma importancia el hecho de que la infección con mutantes de glicosilación de GP5 inducía una respuesta de anticuerpos neutralizantes específicos de VSRRP wt que es significativamente superior a la respuesta con el propio VSRRP wt. Los virus mutantes FL-N34 y FL-N51A inducían niveles cinco veces mayores ($p < 0,05$) de título de anticuerpos neutralizantes contra VSRRP wt que el propio VSRRP wt, mientras que el mutante FL-N34/51 inducía un título seis veces mayor ($p < 0,01$) de anticuerpos neutralizantes de VSRRP que el propio VSRRP wt (Tabla 4B).

TABLA 4A

Efecto de la alteración del patrón de glicosilación de la GP5 de VSRRP sobre la capacidad de las cepas de VSRRP para inducir anticuerpos neutralizantes contra el VSRRP wt (4A) o contra la cepa homóloga infecciosa (4B) ().*

Los números de las Tablas 4A y B corresponden a las medias geométricas del punto final de NS para el grupo ($n = 3$)

Grupo infectado con	Actividad de anticuerpos neutralizantes contra FL12 a diferentes tiempos PI (días PI)			
	0	14	21	48
VSRRP wt FL-12	1,0 *	1,0	3,2	25,4
FL-N34A	1,0	1,0	4,0	128,0
FL-N51A	1,0	1,0	4,0	128,0
FL-N34/51A	1,0	1,0	5,0	161,3

Tabla 4A

Grupo infectado con	Título a punto final contra la cepa infecciosa homóloga a diferentes periodos PI			
	0	14	21	48
VSRRP wt FL-12	1,0	1,0	3,2	25,4
FL-N34A	1,0	4,0	128	8.192
FL-N51A	1,0	4,0	128	2.048
FL-N34/51A	1,0	4,0	64	4.096

Tabla 4B

Discusión

En el presente estudio, se examinó la influencia de la glicosilación de GP5 de VSRRP en la recuperación de virus infeccioso, su papel en la capacidad de los virus mutantes para ser neutralizados por anticuerpos y en la inducción de anticuerpos neutralizantes *in vivo*. Los presentes inventores han descubierto que los tres sitios de glicosilación potenciales (N34, N44 y N51) en GP5 se usan para la adición de restos de glicanos. Los resultados de los presentes inventores ponen de manifiesto que la adición de glicanos en el sitio N44 es más crítica para la recuperación de virus infeccioso. Además, los resultados de los presentes inventores muestran que los VSRRP que contienen formas hipoglicosiladas de GP5 son exquisitamente sensibles a la neutralización por anticuerpos y que los virus mutantes inducen niveles significativamente mayores de anticuerpos neutralizantes, no sólo contra los virus mutantes homólogos, sino también contra el VSRRP wt.

La confirmación de que los tres sitios de glicosilación ligada a N potenciales se usan para la adición de glicanos en GP5 se proporcionó usando mutantes con modificaciones en uno solo o en múltiples sitios (Figura 2). Los estudios bioquímicos mostraban que la proteína GP5 de VSRRP, cuando se coexpresaba con la proteína M en células transfectadas, contiene glicanos de tipo de alto contenido en manosa sensibles a Endo H. La observación de que la mayoría de la GP5 incorporada en viriones es resistente a Endo H (Figura 4A), mientras que la GP5 expresada en presencia de proteína M en células transfectadas es totalmente sensible a Endo H, es intrigante. Es posible que cuando la GP5

se expresa en presencia de proteína M en células transfectadas, se acumule en su mayor parte en el RE o en la región cis-Golgi, y de este modo continúe siendo sensible a Endo H. Sin embargo, en células infectadas por VSRRP, la GP5 puede interaccionar con proteínas virales adicionales y el transporte de la GP5 más allá del RE o del cis-Golgi se facilita por la formación de complejos con las demás proteínas virales. De acuerdo con esta interpretación, los presentes inventores han observado que en células infectadas por VSRRP wt o mutante, la proteína GP5 también es resistente a Endo H. Los presentes inventores sugieren que la GP5, que se sintetiza en el RE en células infectadas, se transporta a las regiones medial- y/o trans-Golgi donde la mayoría de las moléculas de GP5 adquieren resistencia a Endo H antes de incorporarse en viriones de VSRRP. Varios estudios con arterivirus incluyendo VSRRP sugieren que las proteínas GP5 y M forman heterodímeros, que pueden desempeñar un papel clave en la infectividad viral. En el VAE y el VLD, se ha demostrado la interacción directa de proteína GP5 y M por medio de la formación de enlaces disulfuro. Dichas interacciones pueden producirse antes del procesamiento adicional de cadenas laterales de oligosacáridos ligados a N, presumiblemente antes de que la GP5 se transporte fuera del RE o del compartimento cis-Golgi.

Es interesante observar que el patrón de resistencia a Endo H de la GP5 incorporada en viriones wt y mutantes es diferente. Aunque la mayoría de las moléculas de GP5 en VSRRP wt eran resistentes a Endo H, la mayoría de las moléculas de GP5 en los viriones mutantes en un solo sitio (FL-N34A y FL-N51A) eran sensibles a Endo H (Figura 4A). Además, de los dos restos de glicanos en estos mutantes, sólo uno era sensible mientras que el otro era resistente. El virión doble mutante (FL-N34/51A) también incorporaba una GP5 que contenía glicanos, algunos de los cuales también eran sensibles a Endo H. Estos datos concuerdan con la interpretación de que los viriones de VSRRP wt así como mutantes incorporan una población mixta de moléculas de GP5 que contienen restos de glicanos diferentes en diferentes sitios. Estudios previos que demuestran la incorporación de formas glicosiladas de forma diferente de GP5 en viriones de VSRRP wt refuerzan adicionalmente la interpretación de los presentes inventores. A partir del patrón de sensibilidad a Endo H de la GP5 incorporada en los viriones, es tentador especular que el sitio N44 puede contener los glicanos resistentes a Endo H, aunque se incorporaron en los viriones algunas moléculas de GP5 con glicanos sensibles a Endo H en este sitio. Todavía tiene que investigarse si este patrón de glicanos poco habitual en diversos sitios de la GP5 y la incorporación de diversas formas de GP5 en viriones tiene alguna relevancia para el patrón de respuesta inmune observado en animales infectados con VSRRP.

En un estudio reciente, se demostró que de los dos sitios de glicosilación ligada a N (N46 y N53) en la GP5 del VSRRP Lelystad, la glicosilación del resto N46 era claramente necesaria para la producción de partículas de virus. La producción de virus infeccioso se redujo aproximadamente 100 veces con la mutación en la posición N46. Los resultados de los presentes inventores sugieren que la adición de glicanos en la N44 (para VSRRP norteamericanos) es absolutamente esencial para la recuperación de VSRRP infecciosos. Entonces es posible que los aislados europeos y norteamericanos de VSRRP puedan diferir algo en sus necesidades de glicosilación ligada a N para la producción de virus infecciosos. A este respecto, debe señalarse que el virus Lelystad contiene sólo dos sitios de glicosilación ligada a N, mientras que el aislado norteamericano que han usado los presentes inventores en el presente estudio contiene tres sitios de este tipo.

La GP5 es la glicoproteína más importante del VSRRP implicada en la generación de anticuerpos neutralizantes de VSRRP y de una inmunidad protectora. Los resultados de los presentes inventores ponen de manifiesto que la ausencia de glicanos en los restos 34 y 51 del ectodominio de GP5, al tiempo que genera mutantes de VSRRP viables, aumenta tanto la sensibilidad de estos mutantes a la neutralización por anticuerpos como la inmunogenicidad del epítipo de neutralización cercano. El efecto inmediato de la ausencia de glicanos en GP5 de VSRRP mutantes ha sido la sensibilidad aumentada de los virus a la neutralización por sueros de convalecientes de cerdos infectados con VSRRP wt (Tabla 3). Los estudios con VIH-1 y VIS han demostrado que la adquisición o eliminación de glicanos en los bucles variables de la gp160 modifica su sensibilidad a la neutralización. Por lo tanto, se ha postulado que los glicanos desempeñan al menos dos tipos de papeles esenciales durante la biosíntesis de glicoproteínas de la envoltura viral. En un caso, la ausencia de glicanos implica defectos de la glicoproteína y, por lo tanto, en la viabilidad global de la cepa viral. Los presentes inventores proponen que los glicanos en la posición N44 de la GP5 de VSRRP cumplen un papel similar. En el segundo caso, los glicanos sirven potencialmente para proteger a las proteínas virales frente a la neutralización por anticuerpos. Para la GP5 de VSRRP, los glicanos en las posiciones N34 y N51 pueden tener un papel similar. En el caso del VIH, se postula que la “protección de glicanos” es un mecanismo primario para explicar la evasión de la respuesta inmune neutralizante, asegurando de este modo la persistencia del VIH *in vivo*. Esto invita a sacar algunos paralelismos con el VSRRP. La infección con VSRRP, que se sabe que persiste durante varios meses en animales individuales, presenta un comportamiento poco habitual en términos de inducción de respuesta inmune neutralizante específica de virus. Está bien establecido que a los animales infectados con VSRRP habitualmente les lleva más tiempo del normal establecer una respuesta de anticuerpos neutralizantes de VSRRP detectable. Una vez establecida, esta respuesta neutralizante de VSRRP es débil y varía significativamente de un animal a otro. Se ha postulado que el retraso en la respuesta de anticuerpos neutralizantes se debe a la presencia de un epítipo señuelo inmunodominante cercano (posiciones aminoacídicas 27 a 30) que provoca una respuesta inmune robusta temprana no protectora que enmascara y/o ralentiza la respuesta contra el epítipo neutralizante (posiciones aminoacídicas 37 a 45) (26, 38). Aunque esta es una explicación verosímil para el carácter atípico de la respuesta de anticuerpos neutralizantes de VSRRP, todavía tiene que ensayarse. En el laboratorio de los presentes inventores, la delección del epítipo señuelo ha demostrado sistemáticamente ser letal para la recuperación de VSRRP infeccioso (Ansari y col., datos no publicados), haciendo por lo tanto difícil ensayar esta hipótesis.

Es posible que pueda imaginarse un mecanismo alternativo o complementario para explicar la naturaleza peculiar de la respuesta neutralizante de VSRRP mediante el fenómeno de “protección de glicanos” propuesto para el VIH

y el VIS. El uso de VSRRP mutantes que carecen de uno o dos restos de glicanos en los estudios de los presentes inventores proporciona por primera vez pruebas de la presencia de grandes cantidades de anticuerpos neutralizantes de VSRRP en los sueros de animales infectados por VSRRP wt que de otro modo serían indetectables debido al uso de VSRRP wt en los ensayos de NS. Los anticuerpos neutralizantes de VSRRP, aunque están presentes en la respuesta del huésped, son incapaces de reaccionar con los viriones de VSRRP wt infecciosos debido al bloqueo o la protección del epítipo neutralizante por los restos de glicanos en GP5.

Un precedente importante para el escape a la neutralización por glicosilación de glicoproteínas en arterivirus se ha descrito para el virus elevador de la lactato deshidrogenasa (VLD). El VLD es altamente resistente a la neutralización por anticuerpos debido a la gran protección de glicanos de su glicoproteína principal, VP-3, sin embargo, ciertas cepas de origen natural de VLD son altamente susceptibles a la neutralización, debido a la pérdida de dos sitios de glicosilación en el ectodominio de la VP-3. Curiosamente, este fenotipo sensible a la neutralización se correlaciona con un alto grado de neurotropismo en el huésped adquirido por estas cepas de VLD fácilmente neutralizables. Dicha potenciación de su neuropatogenicidad refleja probablemente la facilitación de la interacción de las glicoproteínas virales con receptores en células neuronales, posiblemente debido a la ausencia de la protección de glicanos. En el modelo de cerdos jóvenes que se usó para la inoculación con VSRRP, los presentes inventores no fueron capaces de detectar diferencias patogénicas entre ninguno de los VSRRP mutantes y el VSRRP wt, aunque los presentes inventores limitaron sus observaciones a las mediciones de la temperatura y de la viremia. Es posible que en condiciones experimentales diferentes (es decir, en un modelo de cerda gestante), puedan observarse algunas alteraciones en la patogenicidad de estos VSRRP mutantes. No se sabe si el descubrimiento de cepas de VSRRP hipoglicosiladas de origen natural es un hecho común, aunque informes previos han sugerido su presencia.

Una observación notable en los experimentos de los presentes inventores ha sido que los mutantes de GP5, cuando infectan cerdos *in vivo*, pueden superar al VSRRP wt en su capacidad para organizar una respuesta neutralizante de VSRRP wt considerable en fases tardías de la infección (Tabla 4A). En un escenario paralelo, los presentes inventores han observado no sólo mayores títulos de anticuerpos neutralizantes contra mutantes de VSRRP homólogos, sino también títulos considerables contra el VSRRP wt (Tabla 4A). Además, la respuesta se producía antes, con títulos neutralizantes detectables a los 14 días p.i., una observación que no se observa típicamente con la infección por VSRRP wt (Tabla 4B). La neutralización aumentada de VSRRP wt por sueros de cerdos infectados con los mutantes de VSRRP sugiere que los glicanos estaban enmascarando el epítipo o epítopos neutralizantes, que no inducían anticuerpos neutralizantes cuando estaban presentes los glicanos. Esta observación tiene una gran importancia sobre el diseño de vacunas de VSRRP mejores y más eficaces, sugiriendo que nuevas vacunas diseñadas racionalmente deberían llevar modificaciones en el patrón de glicosilación de la GP5 para aumentar la producción de anticuerpos neutralizantes. Además, será importante estudiar los efectos que esta eliminación de carbohidratos de glicoproteínas inmunológicamente importantes de VSRRP pueda tener sobre el aumento de los títulos de NS, no sólo contra la cepa inmunizante homóloga sino también contra diversas cepas de VSRRP no relacionadas.

Ejemplo 2

Identificación de sitios de glicosilación ligada a N en aislados de VSRRP norteamericanos y europeos

Para identificar los sitios de glicosilación ligada a N correspondientes a la asparagina 34 o a la asparagina 51 en una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 que pueden inactivarse y usarse en los procedimientos de la presente invención, las proteínas GP5 de un aislado de VSRRP norteamericano (Figura 5) o un aislado de VSRRP europeo (Figura 6) deseado se alinean con la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 (cepa norteamericana NVSL 97-7895). En este ejemplo, los alineamientos se generaron con el programa MegAlign™ de DNASTAR, Inc. (Madison, WI, Estados Unidos) usando el procedimiento de alineamiento de Jotun-Hein (Hein, J. J. en *Methods in Enzymology*, Vol. 183: págs. 626-645, 1990). Los parámetros de alineamiento de múltiples secuencias eran una penalización por huecos de 11 y una penalización por longitud de huecos de 3. Para las comparaciones por parejas, se usó un valor Ktuple de 2.

En la Figura 5, está claro que el sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 de la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está presente en todos los aislados de VSRRP norteamericanos mostrados y comprende el sitio de glicosilación ligada a N "NGT". Este sitio de glicosilación ligada a N puede inactivarse por sustitución de codones que codifiquen otros restos aminoácídicos tales como glutamina o alanina en lugar de la asparagina 51 en la secuencia polinucleotídica correspondiente. En estos casos, la secuencia de aminoácidos correspondiente en la variante proteica de GP5 a VSRRP norteamericano hipoglicosilada comprendería secuencias tales como "QGT", "AGT" o "XGT", en las que X es cualquier aminoácido distinto de asparagina. Estas y otras variantes hipoglicosiladas de los aislados de VSRRP norteamericanos en los que el sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 está inactivado también pueden combinarse con otras variantes de GP5 hipoglicosiladas en las que están inactivados otros sitios de glicosilación ligada a N.

También es evidente a partir de la Figura 5 que el sitio de glicosilación ligada a N que se corresponde exactamente con la asparagina 34 de la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está presente sólo en ciertos aislados de VSRRP norteamericanos. Más específicamente, las proteínas GP5 de los aislados de VSRRP norteamericanos IAF-BAJ (SEC ID N°: 3), 94-3182 (SEC ID N°: 7) y 94-287 (SEC ID N°: 8) contienen el sitio de glicosilación ligada a N que se corresponde exactamente con la asparagina 34 de la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 y que

comprende el sitio de glicosilación ligada a N "NSS". Este sitio de glicosilación ligada a N de las SEC ID N°: 3, 7 y 8 puede inactivarse por sustitución de codones que codifiquen otros restos aminoacídicos tales como glutamina o alanina en lugar de la asparagina 34 en la secuencia polinucleotídica correspondiente. En estos casos, la secuencia de aminoácidos correspondiente en la variante proteica de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada comprendería 5 secuencias tales como "QSS", "ASS" o "XSS", en las que X es cualquier aminoácido distinto de asparagina.

En otros aislados de VSRRP norteamericanos que carecen del sitio de glicosilación ligada a N que se corresponde exactamente con la asparagina 34 de la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1, también pueden inactivarse otros sitios de glicosilación ligada a N localizados en el resto 30 (Figura 5 "NAS" en las SEC ID N°: 2, 3, 4, 6, 7, 10 8, 9, 11, 13) y el resto 33 (Figura 5 "NNS" en las SEC ID N°: 3, 8; "NSS" en las SEC ID N°: 6, 10, "NDS" en las SEC ID N°: 11, 13). En otras palabras, también pueden inactivarse sitios de glicosilación ligada a N en otros aislados norteamericanos localizados en las posiciones aminoacídicas correspondientes a los restos 30 y 33 de la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 y usarse en los procedimientos de la presente invención.

En la Figura 6, está claro que el sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 de la proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 también está presente en un aislado de VSRRP europeo representativo y comprende el sitio de glicosilación ligada a N "NGT". Este sitio de glicosilación ligada a N puede inactivarse por sustitución de codones que codifiquen otros restos aminoacídicos tales como glutamina o alanina en lugar de la asparagina 51 en la secuencia polinucleotídica correspondiente. En estos casos, la secuencia de aminoácidos correspondiente en la variante proteica de GP5 de VSRRP europeo hipoglicosilada comprendería secuencias tales como "QGT", "AGT" 20 o "XGT", en las que X es cualquier aminoácido distinto de asparagina. Estas u otras variantes hipoglicosiladas de los aislados de VSRRP europeos en los que el sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 está inactivado también pueden combinarse con otras variantes de GP5 hipoglicosiladas en las que están inactivados otros 25 sitios de glicosilación ligada a N.

En vista de lo anterior, se observará que se consiguen y logran varias ventajas de la invención.

Las realizaciones se seleccionaron y describieron para explicar mejor los principios de la invención y su aplicación práctica para permitir de este modo que otros expertos en la materia utilicen mejor la invención en diversas 30 realizaciones y con diversas modificaciones según sean apropiadas para el uso particular contemplado.

Ya que podrían realizarse diversas modificaciones en las construcciones y procedimientos del presente documento descrito e ilustrado sin alejarse del ámbito de la invención, se pretende que toda la materia contenida en la descripción anterior o que se muestra en los dibujos adjuntos deberá interpretarse como ilustrativa más que limitante. Por lo tanto, 35 la amplitud y el ámbito de la presente invención no deberían limitarse a ninguna de las realizaciones ejemplares descritas anteriormente, sino que deberían definirse solamente de acuerdo con las siguientes reivindicaciones adjuntas al presente documento y sus equivalentes.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un polinucleótido que codifica una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada, en la que al menos un sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 o a la asparagina 34 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está inactivado, para su uso en un procedimiento de generación de una respuesta inmune mejorada en un cerdo contra un antígeno del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (VSRRP).
- 10 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que cualquiera o ambos de dichos sitios de glicosilación ligada a N se inactivan por sustitución de los codones que codifican dicha asparagina 51 o dicha asparagina 34 con un codón que codifica un aminoácido distinto de asparagina.
- 15 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho codón que codifica otro aminoácido codifica un resto alanina o glutamina.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho codón que codifica otro aminoácido codifica un resto alanina.
- 20 5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho polinucleótido comprende una molécula de ARN de VSRRP infecciosa.
6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho polinucleótido comprende una molécula de ADN que codifica una molécula de ARN de VSRRP infecciosa.
- 25 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en la que dicha molécula de ARN de VSRRP infecciosa es un derivado de VSRRP europeo o un derivado de VSRRP norteamericano.
8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho polinucleótido comprende una molécula de ADN en la que un promotor activo en células de mamíferos se une operativamente a dicho polinucleótido que codifica una proteína GP5 hipoglicosilada.
- 30 9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicho promotor es un promotor de CMV.
- 35 10. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho polinucleótido comprende un vector viral seleccionado del grupo constituido por un vector de virus vaccinia, un vector de virus herpes simple, un vector de adenovirus, un vector de alfavirus y un vector del virus de la GET.
- 40 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende además un vehículo o un adyuvante terapéuticamente aceptable.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho vehículo se selecciona del grupo constituido por una proteína, un tampón, un tensioactivo y un polímero de polietilenglicol o cualquier combinación de los mismos.
- 45 13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho adyuvante se selecciona del grupo constituido por hidróxido de aluminio, Quil A, una suspensión de gel de alúmina, aceites minerales, glicéridos, ácidos grasos, subproductos de ácidos grasos, micobacterias y oligodesoxinucleótidos CpG o cualquier combinación de los mismos.
- 50 14. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición se administra por inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intradérmica, inyección parenteral, inyección intramuscular, inyección sin aguja, electroporación, administración por vía oral, administración intranasal, administración oronasal o cualquier combinación de las mismas.
- 55 15. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha respuesta inmune mejorada de dicho cerdo contra un antígeno de VSRRP comprende una producción aumentada de anticuerpos neutralizantes de VSRRP por dicho cerdo.
- 60 16. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho cerdo es una cerda múltipara, una cerda nulípara, un verraco o un cochinito.
- 65 17. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho polinucleótido que codifica una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada se obtiene por síntesis directa, mutagénesis de una secuencia de nucleótidos de GP5 aislada de VSRRP europeo o mutagénesis de una secuencia de nucleótidos consenso de GP5 de VSRRP europeo.

18. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en la que dicha secuencia de nucleótidos de GP5 aislada de VSRRP europeo codifica una proteína GP5 que tiene una identidad de al menos el 85% con la SEC ID N°: 15.
- 5 19. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en la que dicha secuencia de nucleótidos de GP5 de VSRRP europeo es la SEC ID N°: 15.
- 10 20. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que dicho polinucleótido que codifica una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada se obtiene por síntesis directa, mutagénesis de una secuencia de nucleótidos de GP5 aislada de VSRRP norteamericano o mutagénesis de una secuencia de nucleótidos consenso de GP5 de VSRRP norteamericano.
- 15 21. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en la que dicha secuencia de nucleótidos de GP5 aislada de VSRRP norteamericano codifica un péptido seleccionado del grupo constituido por las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12 y SEC ID N°: 13.
- 20 22. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en la que dicha secuencia de nucleótidos consenso de GP5 de VSRRP norteamericano codifica una proteína GP5 consenso que tiene una identidad de al menos el 85% con la SEC ID N°: 14.
- 25 23. Una composición que comprende una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP hipoglicosilada, en la que al menos un sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 o a la asparagina 34 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está inactivado, para su uso en un procedimiento de generación de una respuesta inmune mejorada en un cerdo contra un antígeno del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (VSRRP).
- 30 24. Un polinucleótido aislado que codifica una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada en la que al menos un sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 de una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está inactivado.
- 35 25. El polinucleótido aislado de la reivindicación 24, en el que dicho sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 se inactiva por sustitución de un codón que codifica dicha asparagina 51 con un codón que codifica un aminoácido distinto de asparagina.
- 40 26. El polinucleótido aislado de la reivindicación 24 ó 25, en el que ambos sitios de glicosilación ligada a N correspondientes a la asparagina 34 y a la asparagina 51 de la SEC ID N°: 1 están inactivados.
- 45 27. El polinucleótido aislado de la reivindicación 26, en el que dicho sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 34 se inactiva por sustitución de un codón que codifica dicha asparagina 34 con un codón que codifica un aminoácido distinto de asparagina.
- 50 28. El polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 25 ó 27, en el que dicho codón que codifica otro aminoácido codifica un resto alanina o glutamina.
- 55 29. El polinucleótido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, en el que dicho polinucleótido comprende una molécula de ARN de VSRRP norteamericano infecciosa.
- 60 30. El polinucleótido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, en el que dicho polinucleótido comprende una molécula de ADN que codifica una molécula de ARN de VSRRP norteamericano infecciosa.
- 65 31. El polinucleótido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, en el que dicho polinucleótido comprende una molécula de ADN en la que un promotor activo en células de mamíferos se une operativamente a dicho polinucleótido que codifica dicha variante polipeptídica de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada.
32. El polinucleótido aislado de la reivindicación 31, en el que dicho promotor es un promotor de CMV.
- 60 33. El polinucleótido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, en el que dicho polinucleótido comprende un vector viral seleccionado del grupo constituido por un vector de virus vaccinia, un vector de virus herpes simple, un vector de adenovirus, un vector de alfavirus y un vector del virus de la GET.
34. Una composición que comprende un polinucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, y un vehículo terapéuticamente aceptable y, opcionalmente, al menos un adyuvante.
- 65 35. La composición de la reivindicación 33, en la que dicho vehículo terapéuticamente aceptable se selecciona del grupo constituido por una proteína, un tampón, un tensioactivo y un polímero de polietilenglicol, o cualquier combinación de los mismos.

ES 2 343 371 T3

36. La composición de la reivindicación 34 ó 35, en la que dicho adyuvante se selecciona del grupo constituido por hidróxido de aluminio, Quil A, una suspensión de gel de alúmina, aceites minerales, glicéridos, ácidos grasos, subproductos de ácidos grasos, micobacterias y oligodesoxinucleótidos CpG, o cualquier combinación de los mismos.

5 37. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 36, en la que dicha composición comprende además un segundo adyuvante que se selecciona del grupo constituido por interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, interferón gamma (IFN-g), factor de necrosis tumoral, MDP (dipéptido de muramilo), complejo inmunoestimulante (ISCOM) y liposomas.

10 38. Una composición que comprende una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada, en la que al menos un sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 en una proteína consenso GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está inactivado, y un vehículo terapéuticamente aceptable.

15 39. Un polipéptido aislado que es una variante polipeptídica de GP5 de VSRRP norteamericano hipoglicosilada, en la que al menos un sitio de glicosilación ligada a N correspondiente a la asparagina 51 en una proteína GP5 de referencia de la SEC ID N°: 1 está inactivado.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1A

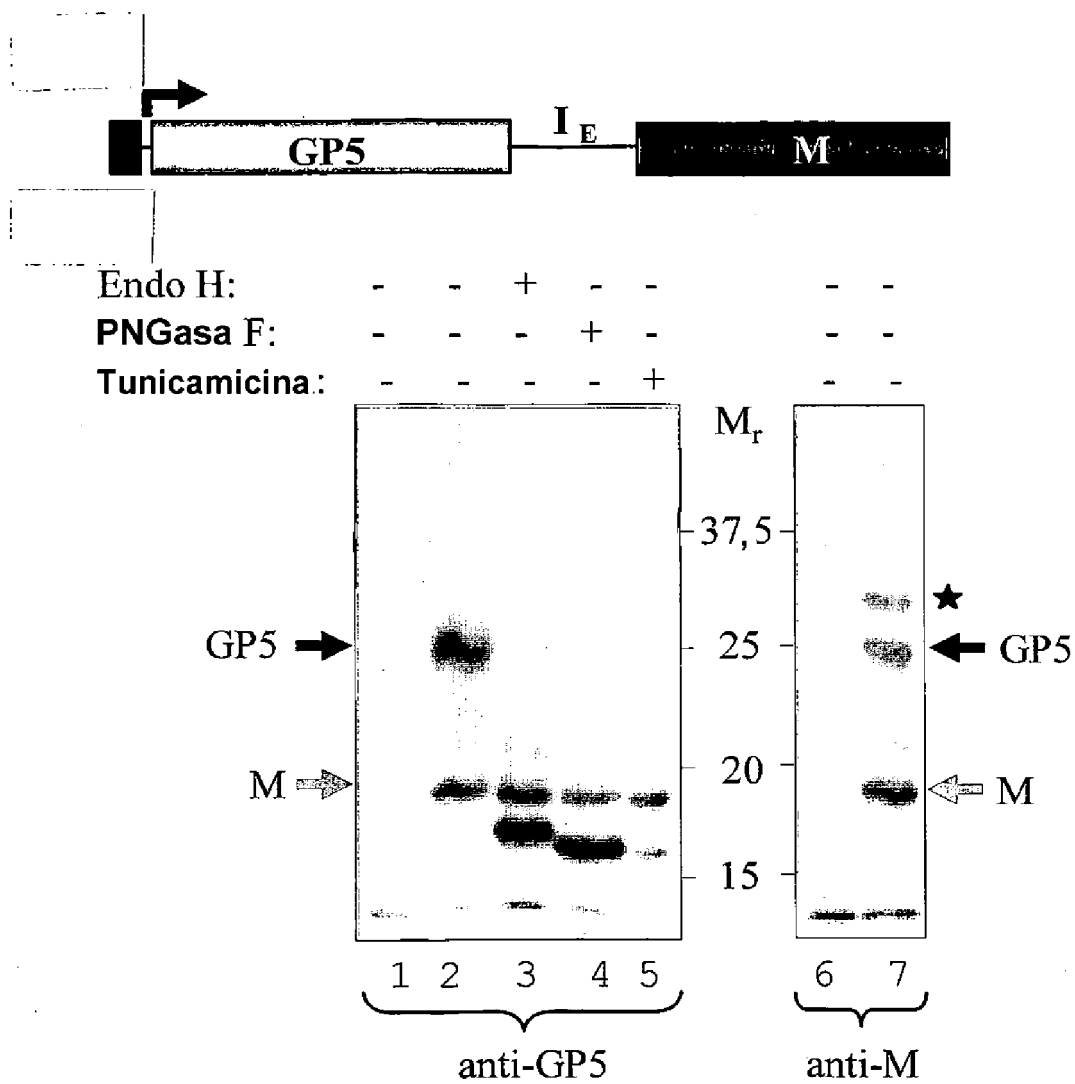


FIG. 1B

FIG. 2A

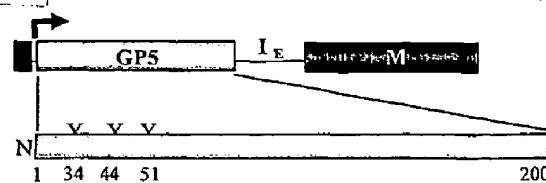


FIG. 2B

	34	44	51
GP5(wt)	N	N	N
N34A	A	N	N
N44A	N	A	N
N51A	N	N	A
N34/44A	A	A	N
N44/51A	N	A	A
N34/51A	A	N	A
N34/44/51A	A	A	A

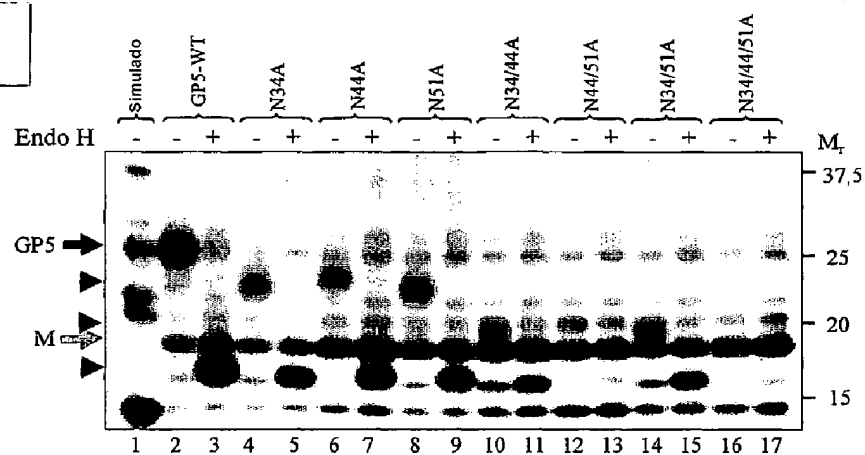
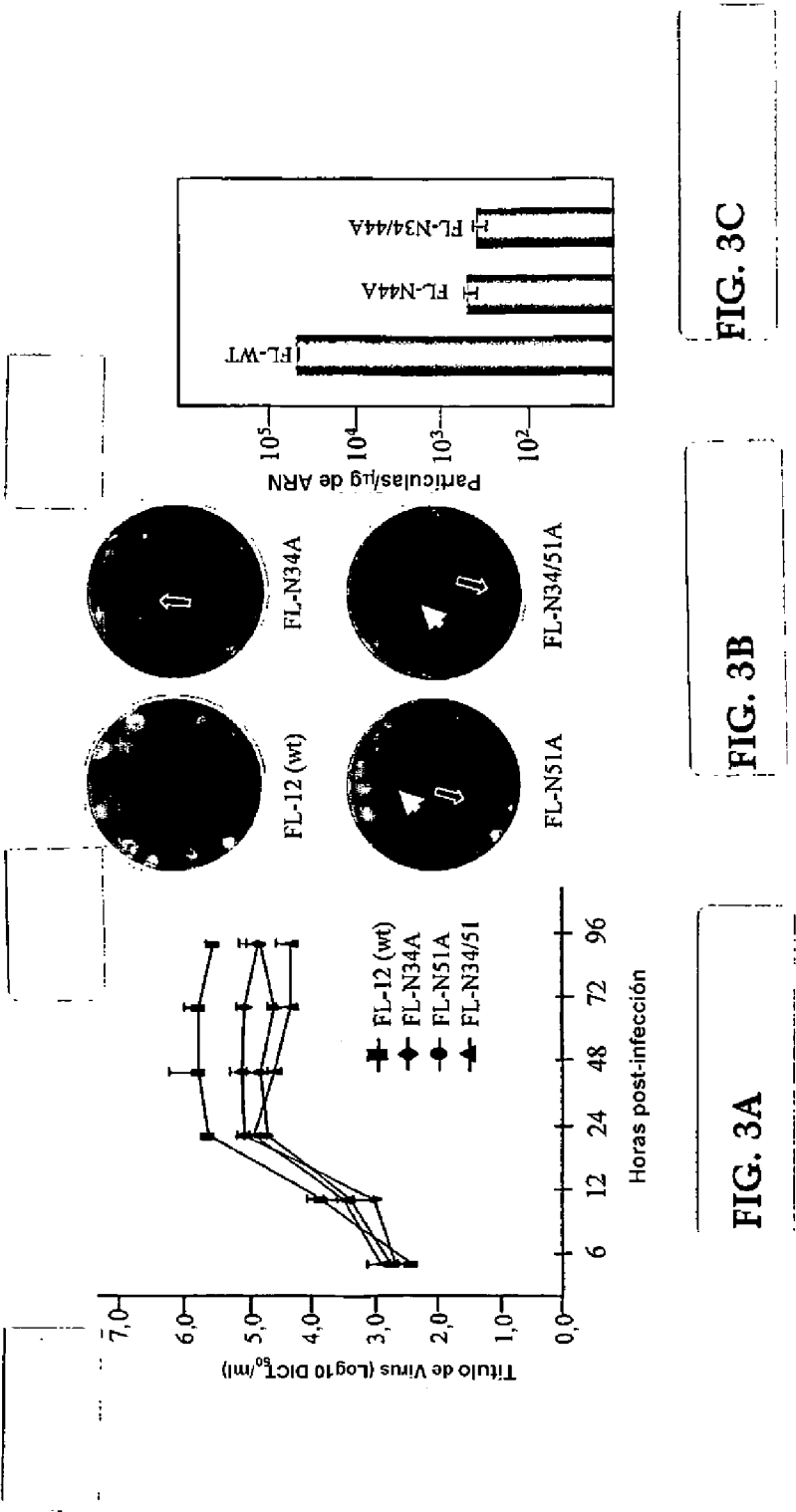


FIG. 2C



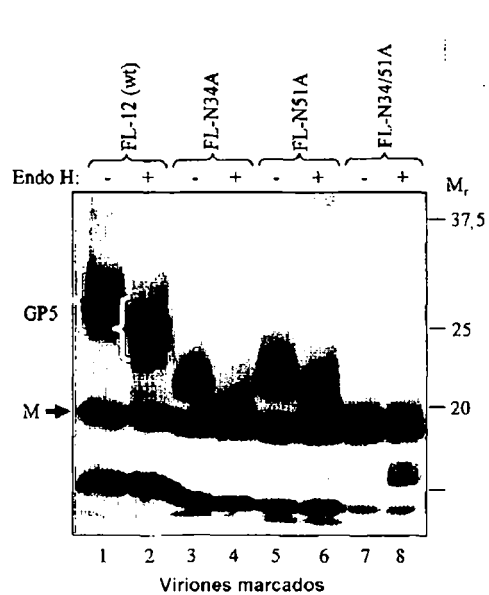


FIG. 4A

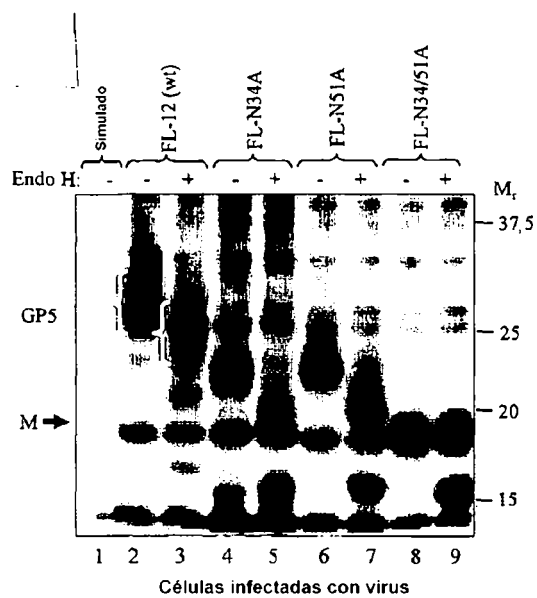


FIG. 4B

M L G K C L T A G C C S Q L P F L W C I V P F C F A A L V N																										Mayoria					
10										20										30											
+										+										+											
1	M	L	G	R	C	L	T	A	G	C	C	S	R	L	L	S	L	W	C	I	V	P	F	C	F	A	A	L	V	N	SEC ID Nº:1
1	M	L	G	K	C	L	T	A	G	C	C	S	Q	L	P	F	L	W	C	I	V	P	F	C	F	A	A	L	V	N	SEC ID Nº:2
1	M	L	G	K	C	L	T	A	G	C	C	S	Q	L	P	F	L	W	C	I	V	P	F	C	F	A	A	L	V	N	SEC ID Nº:3
1	M	L	G	K	C	L	T	V	G	Y	C	S	Q	L	P	F	L	W	C	I	V	P	F	C	F	A	A	L	V	N	SEC ID Nº:4
1	M	L	G	K	C	L	T	A	G	C	C	S	Q	L	P	F	L	W	C	I	V	P	F	C	F	V	A	L	V	N	SEC ID Nº:5
1	M	L	G	K	C	L	T	A	G	C	C	S	R	L	P	F	L	W	C	I	V	P	F	C	F	A	A	L	V	N	SEC ID Nº:6
1	M	L	G	K	C	L	T	A	G	C	C	S	R	L	P	F	L	W	C	I	V	P	F	C	F	A	V	L	V	N	SEC ID Nº:7
1	M	L	G	K	C	L	T	A	G	C	C	S	Q	L	P	F	L	W	C	I	V	P	F	C	F	A	A	L	V	N	SEC ID Nº:8
1	M	L	G	K	C	L	T	A	G	C	C	S	Q	L	P	F	L	W	C	I	V	P	F	C	F	A	A	L	V	N	SEC ID Nº:9
1	M	L	G	K	C	L	T	A	G	C	C	S	Q	L	L	F	L	W	C	I	V	P	S	W	F	V	A	L	V	S	SEC ID Nº:10
1	M	L	E	K	C	L	T	A	G	C	C	S	R	L	L	S	L	W	C	I	V	P	F	C	F	A	V	L	A	N	SEC ID Nº:11
1	M	L	G	K	C	L	T	A	G	C	C	S	Q	L	L	F	L	W	C	I	V	P	S	C	F	V	A	L	V	S	SEC ID Nº:12
1	M	L	E	K	C	L	T	A	G	C	C	S	Q	L	L	S	L	W	C	I	V	P	F	C	F	A	V	L	A	N	SEC ID Nº:13

A S N N S S S H L Q L I Y N L T I C E L N G T D W L N D K F																										Mayoria					
40										50										60											
-----+										-----+										-----+											
31	A	N	S	N	S	S	S	H	L	Q	L	I	Y	N	L	T	L	C	E	L	N	G	T	D	W	L	K	D	K	F	SEC ID Nº:1
31	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>F</u>	SEC ID Nº:2
31	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>F</u>	SEC ID Nº:3
31	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	SEC ID Nº:4	
31	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	SEC ID Nº:6
31	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>F</u>	SEC ID Nº:7
31	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	SEC ID Nº:8
31	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>K</u>	<u>N</u>	<u>F</u>	SEC ID Nº:9
31	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	SEC ID Nº:10
31	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	SEC ID Nº:11
31	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	SEC ID Nº:12
31	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>W</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	SEC ID Nº:13

FIG. 5

ES 2 343 371 T3

	M R C S H K L G R F L T A G S C S R L L S L L C I V P F C F	Mayoria
	10 20 30	
	-----+-----+-----	
1	M - - - - L G R C L T A G C C S R L L S L W C I V P F C F	SEC ID Nº:1
1	M R C S H K L G R F L T P H S C F W W L F L L C - - - - -	SEC ID Nº:15
	A G L V W S F A A G S G S S S T L Q L I Y N L T L C E L N G	Mayoria
	40 50 60	
	-----+-----+-----	
26	A A L V - - - N A N S N S S S H L Q L I Y N L T L C E L N G	SEC ID Nº:1
25	T G L S W S F A D G N G D S S T Y Q Y I Y N L T I C E L N G	SEC ID Nº:15
	T D W L S S K F G W A V E T F V L F P V A T H I V S L G A L	Mayoria
	70 80 90	
	-----+-----+-----	
53	T D W L K D K F D W A V E T F V I F P V L T H I V S Y G A L	SEC ID Nº:1
55	T D W L S S H F G W A V E T F V L Y P V A T H I L S L G F L	SEC ID Nº:15
	T T S H F L D A V G L G A V S T A G F V G G R Y V L S S V Y	Mayoria
	100 110 120	
	-----+-----+-----	
83	T T S H F L D T V G L V T V S T A G F Y H G R Y V L S S I Y	SEC ID Nº:1
85	T T S H F F D A L G L G A V S T A G F V G G R Y V L C S V Y	SEC ID Nº:15
	G A C A L A A L V C F V I R A A K N C M A W R Y A R T R F T	Mayoria
	130 140 150	
	-----+-----+-----	
113	A V C A L A A L I C F V I R L A K N C M S W R Y S C T R Y T	SEC ID Nº:1
115	G A C A F A A F V C F V I R A A K N C M A C R Y A R T R F T	SEC ID Nº:15
	N F L V D T K G R V H R W K S P V V V E K G G K A E V D G N	Mayoria
	160 170 180	
	-----+-----+-----	
143	N F L L D T K G R L Y R W R S P V I I E K G G K V E V E G H	SEC ID Nº:1
145	N F I V D D R G R V H R W K S P I V V E K L G K A E V D G N	SEC ID Nº:15
	L V T L K H V V L D G V V A T P L T R V S A E Q W G A L	Mayoria
	190 200	
	-----+-----+-----	
173	L I D L K R V V L D G S V A T P L T R V S A E Q W G R L	SEC ID Nº:1
175	L V T I K H V V L E G V K A Q P L T R T S A E Q W E A	SEC ID Nº:15

FIG. 6

ES 2 343 371 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Board of Reagents university of Nebraska-Lincoln
 5 <120> Procedimientos y composiciones para la vacunación de animales con antígenos de VSRRP con una inmunogenicidad mejorada
 <130> AHB/FP6533640
 <140> 06824866.5
 10 <141> 30-08-2006
 <150> PCT/US2006/033990
 <151> 30-08-2006
 <150> 60/712.357
 15 <151> 30-08-2005
 <160> 26
 <170> PatentIn versión 3.3
 20 <210> 1
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
 25 <400> 1

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

ES 2 343 371 T3

<210> 2

<211> 200

<212> PRT

5 <213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

<400> 2

10

Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Pro Phe
1 5 10 15

15

Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Ala Leu Val Asn Ala Ser
20 25 30

20

Ser Ser Ser Ser Ser Gln Leu Gln Ser Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys
35 40 45

Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Lys Asn Phe Asp Trp Ala Val
50 55 60

25

Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
65 70 75 80

30

Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Ala Val Gly Leu Ile Thr Val
85 90 95

Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Val Tyr
100 105 110

35

Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Thr
115 120 125

40

Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
130 135 140

Leu Leu Asp Ser Lys Gly Lys Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
145 150 155 160

45

Ile Glu Lys Gly Gly Lys Val Glu Val Asp Gly His Leu Ile Asp Leu
165 170 175

50

Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Lys Val
180 185 190

Ser Ala Glu Gln Trp Cys Arg Pro
195 200

55

<210> 3

<211> 200

60 <212> PRT

<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

65

ES 2 343 371 T3

<400> 3

5 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Pro Phe
1 5 10 15

10 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Ala Leu Val Asn Ala Ser
20 25 30

15 Asn Asn Ser Ser Ser Gln Leu Gln Ser Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys
35 40 45

20 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Lys Asn Phe Asp Trp Ala Val
50 55 60

25 Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
65 70 75 80

30 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Ile Thr Val
85 90 95

35 Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Val Tyr
100 105 110

40 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Thr
115 120 125

45 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
130 135 140

50 Leu Leu Asp Ser Lys Gly Lys Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
145 150 155 160

55 Ile Glu Lys Gly Gly Lys Val Glu Val Asp Gly His Leu Ile Asp Leu
165 170 175

60 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Lys Val
180 185 190

65 Ser Ala Glu Gln Trp Cys Arg Pro
195 200

<210> 4

<211> 200

<212> PRT

<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

ES 2 343 371 T3

<400> 4

5 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Val Gly Tyr Cys Ser Gln Leu Pro Phe
1 5 10 15

10 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Ala Leu Val Asn Ala Ser
20 25 30

15 Ser Thr Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys
35 40 45

20 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Glu Lys Phe Asp Trp Ala Val
50 55 60

25 Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
65 70 75 80

30 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Val Thr Val
85 90 95

35 Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr
100 105 110

40 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Val
115 120 125

45 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
130 135 140

50 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Lys Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
145 150 155 160

55 Val Glu Lys Arg Gly Lys Val Glu Val Gly Gly His Leu Ile Asp Leu
165 170 175

60 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Arg Val
180 185 190

65 Ser Ala Glu Gln Trp Gly Arg Pro
195 200

<210> 5

<211> 200

<212> PRT

<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

ES 2 343 371 T3

<400> 5

5 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Pro Phe
1 5 10 15

Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Val Ala Leu Val Asn Ala Asn
20 25 30

10 Thr Asp Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys
35 40 45

15 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Asp Lys Phe Asp Trp Ala Val
50 55 60

20 Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
65 70 75 80

Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Ile Thr Val
85 90 95

25 Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr
100 105 110

30 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Ala Ile Arg Leu Thr
115 120 125

Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
130 135 140

35 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Lys Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
145 150 155 160

40 Ile Glu Arg Gln Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp Leu
165 170 175

Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Arg Val
180 185 190

45

Ser Ala Glu Arg Trp Gly Arg Pro
195 200

50

<210> 6

<211> 200

<212> PRT

<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

ES 2 343 371 T3

<400> 6

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

<210> 7

<211> 200

<212> PRT

<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

ES 2 343 371 T3

<400> 7

5 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Arg Leu Pro Phe
1 5 10 15

10 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Val Leu Val Asn Ala Ser
20 25 30

15 Pro Asn Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys
35 40 45

20 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Ala Arg Phe Asp Trp Ala Val
50 55 60

Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Val Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
65 70 75 80

25 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Val Thr Val
85 90 95

30 Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr
100 105 110

Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Ala
115 120 125

35 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
130 135 140

40 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Lys Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
145 150 155 160

Ile Glu Lys Arg Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp Leu
165 170 175

45 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Arg Val
180 185 190

50 Ser Ala Glu Gln Trp Cys Arg Pro
195 200

55 <210> 8

<211> 200

<212> PRT

60 <213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

65

ES 2 343 371 T3

<400> 8

5 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Pro Phe
1 5 10 15

10 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Ala Leu Val Asn Ala Ser
20 25 30

15 Asn Asn Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys
35 40 45

20 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Asp Lys Phe Asp Trp Ala Val
50 55 60

25 Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
65 70 75 80

30 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Ile Thr Val
85 90 95

35 Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr

100 105 110

40 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Ala
115 120 125

45 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
130 135 140

50 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Arg Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
145 150 155 160

55 Ile Glu Lys Lys Gly Lys Val Glu Val Glu Gly Gln Leu Ile Asp Leu
165 170 175

60 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Ile Thr Arg Val
180 185 190

65 Ser Ala Glu Gln Trp Gly Arg Pro
195 200

<210> 9

<211> 200

<212> PRT

<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

ES 2 343 371 T3

<400> 9

5 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Pro Phe
1 5 10 15

Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Ala Leu Val Asn Ala Ser
20 25 30

10 Ser Ser Ser Ser Ser Gln Leu Gln Ser Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys
35 40 45

15 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Lys Asn Phe Asp Trp Ala Val
50 55 60

20 Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
65 70 75 80

Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Ala Val Gly Leu Ile Thr Val
85 90 95

25 Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Ser Val Leu Ser Ser Val Tyr
100 105 110

30 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Thr
115 120 125

Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
130 135 140

35 Leu Leu Asp Ser Lys Gly Lys Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
145 150 155 160

40 Ile Glu Lys Gly Gly Lys Val Glu Val Asp Gly His Leu Ile Asp Leu
165 170 175

45 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Lys Val
180 185 190

50 Ser Ala Glu Gln Trp Cys Arg Pro
195 200

<210> 10

<211> 200

<212> PRT

<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

ES 2 343 371 T3

<400> 10

```

5      Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Leu Phe
      1          5          10          15

10     Leu Trp Cys Ile Val Pro Ser Trp Phe Val Ala Leu Val Ser Ala Ser
      20          25          30

15     Asn Ser Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Leu Cys
      35          40          45

20     Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Ala Asp Lys Phe Asp Trp Ala Val
      50          55          60

25     Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
      65          70          75          80

30     Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Val Thr Val
      85          90          95

35     Ser Thr Ala Gly Phe His His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr
      100         105         110

40     Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Ala
      115         120         125

45     Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
      130         135         140

50     Leu Leu Asp Thr Lys Gly Arg Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
      145         150         155         160

55     Ile Glu Lys Gly Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp Leu
      165         170         175

60     Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Val Ala Thr Pro Ile Thr Arg Val
      180         185         190

65     Ser Ala Glu Gln Trp Gly Arg Pro
      195         200

```

<210> 11

55 <211> 200

<212> PRT

<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

60

65

ES 2 343 371 T3

<400> 11

5 Met Leu Glu Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Arg Leu Leu Ser
1 5 10 15

10 Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Val Leu Ala Asn Ala Ser
20 25 30

15 Asn Asp Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Leu Cys
35 40 45

Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Ala Asn Lys Phe Asp Trp Ala Val
50 55 60

20 Glu Ser Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
65 70 75 80

25 Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Ala Leu Val Thr Val
85 90 95

Ser Thr Ala Gly Phe Val His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr
100 105 110

30 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Thr Cys Phe Val Ile Arg Phe Ala
115 120 125

35 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ala Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
130 135 140

40 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Arg Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
145 150 155 160

Ile Glu Lys Arg Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp Leu
165 170 175

45 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Val Ala Thr Pro Ile Thr Arg Val
180 185 190

Ser Ala Glu Gln Trp Gly Arg Pro
195 200

<210> 12

55 <211> 200

<212> PRT

<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

60

65

ES 2 343 371 T3

<400> 12

5 Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Leu Phe
1 5 10 15

10 Leu Trp Cys Ile Val Pro Ser Cys Phe Val Ala Leu Val Ser Ala Asn
20 25 30

Gly Asn Ser Gly Ser Asn Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Leu Cys
35 40 45

15 Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Ala Asn Lys Phe Asp Trp Ala Val
50 55 60

20 Glu Cys Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
65 70 75 80

Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Val Thr Val
85 90 95

25 Ser Thr Ala Gly Phe Val His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Met Tyr
100 105 110

30 Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Ala
115 120 125

35 Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
130 135 140

40 Leu Leu Asp Thr Lys Gly Arg Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
145 150 155 160

Ile Glu Lys Arg Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp Leu
165 170 175

45 Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Arg Val
180 185 190

50 Ser Ala Glu Gln Trp Ser Arg Pro
195 200

<210> 13

55 <211> 200

<212> PRT

<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

60

65

ES 2 343 371 T3

<400> 13

```

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

```

<210> 14

<211> 200

55 <212> PRT

<213> Consenso de virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

<220>

60 <221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa puede ser Ser, Asp, Asn o Thr

<220>

65 <221> misc_feature

<222> (58)..(58)

ES 2 343 371 T3

<223> Xaa puede ser Lys, Asn, Glu, Asp, o Ala

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (94)..(94)

<223> Xaa puede ser Ile o Val

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (164)..(164)

<223> Xaa puede ser Gly, Arg, Lys, o Gln

15 <400> 14

Met Leu Gly Lys Cys Leu Thr Ala Gly Cys Cys Ser Gln Leu Pro Phe
1 5 10 15

20

Leu Trp Cys Ile Val Pro Phe Cys Phe Ala Ala Leu Val Asn Ala Ser
20 25 30

25

Asn Xaa Ser Ser Ser His Leu Gln Leu Ile Tyr Asn Leu Thr Ile Cys
35 40 45

30

Glu Leu Asn Gly Thr Asp Trp Leu Asn Xaa Lys Phe Asp Trp Ala Val
50 55 60

Glu Thr Phe Val Ile Phe Pro Val Leu Thr His Ile Val Ser Tyr Gly
65 70 75 80

35

Ala Leu Thr Thr Ser His Phe Leu Asp Thr Val Gly Leu Xaa Thr Val
85 90 95

40

Ser Thr Ala Gly Tyr Tyr His Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ser Ile Tyr
100 105 110

Ala Val Cys Ala Leu Ala Ala Leu Ile Cys Phe Val Ile Arg Leu Ala
115 120 125

45

Lys Asn Cys Met Ser Trp Arg Tyr Ser Cys Thr Arg Tyr Thr Asn Phe
130 135 140

50

Leu Leu Asp Thr Lys Gly Lys Leu Tyr Arg Trp Arg Ser Pro Val Ile
145 150 155 160

55

Ile Glu Lys Xaa Gly Lys Val Glu Val Glu Gly His Leu Ile Asp Leu
165 170 175

60

Lys Arg Val Val Leu Asp Gly Ser Ala Ala Thr Pro Val Thr Arg Val
180 185 190

65

Ser Ala Glu Gln Trp Gly Arg Pro
195 200

<210> 15

<211> 201

ES 2 343 371 T3

<212> PRT

<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

5 <400> 15

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

55 <210> 16

<211> 15414

<212> ADN

<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

60

<400> 16

atgacgtata ggtgttggt ctatgccatg acatttgtat tgtcaggagc tgcgaccatt 60
65

ES 2 343 371 T3

	ggtacagccc	aaaactagct	gcacagaaaa	cgcccttctg	tgacagccct	cttcagggga	120
	gcttaggggt	ctgtccctag	caccttgctt	ccggagttgc	actgctttac	ggtctctcca	180
5	accctttaac	catgtctggg	atacttgatc	ggtgcacgtg	cacccccaat	gccaggggtgt	240
	ttatggcggg	gggccaaagtc	tactgcacac	gatgtctcag	tgacaggtct	ctccttcctc	300
	tgaatctcca	agttcctgag	cttggagtg	tgggcctatt	ttacagggcc	gaagagccac	360
10	tccggctggac	gttgccacgt	gcattcccca	ctgttgagtg	ctccccgcc	ggggcctgct	420
	ggctttctgc	gatctttcca	attgcacgaa	tgaccagtg	aaacctgaac	tttcaacaaa	480
	gaatggctgc	ggtcgcagct	gagatttaca	gagccggcca	gctcaccctt	gcagtcttga	540
15	aggctctaca	agtttatgaa	cggggtgccc	gctggtagcc	tatagtcgga	cctgtccctg	600
	gagtggccgt	ttttgccaac	tccctacatg	tgagtgataa	acctttcccg	ggagcaactc	660
	atgtgctaac	caacctgcc	ctcccgcaga	ggcctaagcc	tgaagacttt	tgcccttttg	720
20	agtgtgctat	ggctgacgtc	tatgatattg	gtcatggcgc	cgtcatgtat	gtggccaaag	780
	ggaaagtctc	ctgggcccc	cgtggcgggg	atgaggcgaa	atttgaaact	gtccctagg	840
	agttgaagtt	gatcgcgaac	caactccaca	tctccttccc	gccccaccac	gcagtggaca	900
25	tgtctaagtt	tgtgttcata	gcccctggga	gtggtgtctc	tatgcgggtc	gagtgccac	960
	acggctgtct	ccccgcta	actgtccctg	aaggtaactg	ctgggtgggc	ttgtttgact	1020
	cgtcccact	ggacgttcag	aacaaagaaa	ttcgccgtgc	caaccaattc	ggctatcaaa	1080
30	ccaagcatgg	tgtcgttggc	aagtacctac	aacggaggct	gcaagcta	ggtctccgag	1140
	cagtgactga	tacagatgga	cccattgtcg	tacagtattt	ctctgttagg	gagagctgga	1200
	tccgccactt	cagactggcg	gaagagccta	gcctccctgg	gtttgaagac	ctcctcagaa	1260
35	taagggtaga	gcccataacg	tcgccattga	gtgacaaggg	tggaaaaatc	ttccggtttg	1320
	gcagtcacaa	atggtacgg	gctggaaaga	gagcaaggaa	agcacgctct	ggtatgacca	1380
	ccacagtcgc	tcaccgcgcc	ttgcccgtc	gtgaaatcca	gcaagccaaa	aagcacgagg	1440
40	atgccggcgc	tgataaggct	gtgcatctca	ggcactattc	tccgcctgcc	gacgggaact	1500
	gtggttgcca	ctgcatttcc	gccatcgcca	accgaatggt	gaattccaaa	tttgaaacta	1560
	ctcttcccga	gagggtgaga	ccttcagatg	actgggctac	tgacgaggac	cttgtgaaca	1620
45	ccatccaaat	tctcaagctc	cctgcggcct	tggacaggaa	cgggtgctgt	gttggcgcca	1680
	aatacgtgct	taagctggaa	ggcgagcatt	ggactgtctc	tgtgaccctt	gggatgtccc	1740
	cttctttgct	cccccttgaa	tgtgttcagg	gctgtttgtg	gcataagagc	ggacttggtc	1800
50	ccccagatgc	ggtcgaagtt	ttcggatttg	accctgcctg	ccttgaccga	ctggctgagg	1860
	taatgcactt	gcctagcagt	gtcatcccag	ctgctctggc	cgaaatgtcc	ggcgacccca	1920
	actgtccggc	ttccccggtc	actactgtgt	ggactgtttc	acaattcttt	gcccgccaca	1980
55	gaggaggaga	gcacctgat	cagggtgcgt	taggaaaaat	catcagcctt	tgtcaagttg	2040
	ttgaggaatg	ctgttgccat	cagaataaaa	ccaaccgggc	caccccgga	gaggttgcgg	2100
	caaggattga	tcagtacctc	catggtgcaa	caagtcttga	agaatgcttg	attaggcttg	2160
60	agagggtttg	cccgccgagc	gtgcgggaca	ccttctttga	ttggaatggt	gtgctccctg	2220
	gggttggggc	ttcaactcag	acaaccaa	agctccatgt	caaccagtc	cgcgtcttg	2280
	ttcctgtcgt	gactcaagag	cctttggaca	aagactcagt	ccctctgacc	gccttctcgc	2340
65	tgtccaattg	ctactatcct	gcacaagggt	acgagggttc	tcaccgtgag	aggctaaact	2400

ES 2 343 371 T3

	ccgtactctc taagctggag ggggttgttc gtgaggaata tgggctcacg ccaactgaac	2460
	ctggcccgcg acccgacta ccgaacgggc tcgtcgaact taaagaccag atggaggagg	2520
5	atctgctgaa actagtcaac gcccaggcaa cttcagaaat gatggcctgg gcagccgagc	2580
	aggttgatct gaaagcttgg gtcaaaaact acccacggtg gacaccgccca cccctccac	2640
	caagagttca gcctcgaaaa acaaagtctg tcaagagctt gccagggaac aaacctgtcc	2700
10	ccgctccacg caggaaggtc agatctgatt gtggcagccc gattttgatg ggcgacaatg	2760
	ttcctgacgg tcgggaagat ttgaactgtt gtggccccct tgatctttcg acaccatccg	2820
	agccgatgac acctctgagt gagcctgcac ttatgccgcg gttgcaatat atttctaggc	2880
15	cagtgacatc tttgagtgtg ctggccccag ttcttgcacc gcgtagaact gtgtcccgac	2940
	cggtgacgcc cttgagttag ccaatttttg tgtctgcacc gcgacacaaa tttcagcagg	3000
	tggagaagc gaatctggcg gcaacaacgc tgacgcacca ggacgaacct ctagatttgt	3060
20	ctgcatcttc acagactgaa tatgaggctt cccccctaac accactgcag aacatgggta	3120
	ttctggagggt gggggggcaa gaagctgagg aagtcttgag tgaaatctcg gatatactga	3180
	atgacatcaa ccctgcacct gtgtcatcaa gcagctccct gtcaagtgtt aagatcacac	3240
25	gccccaaaaca ctctgctcaa gccatcattg actcggggcg gccctgcagt gggcatctcc	3300
	gaagggaaaa agaagcatgc ctcagcatca tgcgtgaggc ttgtgatgcg gctaagctta	3360
	gtgaccttgc cacgcaggaa tggctttctc gcatgtggga tagggttgac atgctgactt	3420
30	ggcgcaacac gtctgcttac caggcgttcc gcatcttaga tggtaggttt gagtttctcc	3480
	caaagatgat actcgagaca ccgccgccct acccggtgtg gtttgtgatg ctgcctcaca	3540
	cgcttgcacc ttccgtgggt gcagagagtg accttaccat tggttcagtc gccactgaag	3600
35	atgttccacg catcctcggg aaaatagaaa acgccggcga gatgcccaac caggggctct	3660
	tgacatcctt cggggaagaa ccggtgtgcg accaacctgt caaggactcc tggatgtcgt	3720
	cgcggggggt tgacgagagc acaacggctc cgtccgctgg tacagggtgt gctgacttac	3780
40	ccaccgattt gccaccttca gatggttttg atgcggacga gtggggggccg ttacggacgg	3840
	taagaaagaa agctgaaagg ctcttcgacc aattgagccg tcaggttttt aacctcgtct	3900
	cccatctccc tgttttcttc tcacacctct tcaaacttga cagtggttat tctccgggtg	3960
45	attgggggtt tgcagctttt actttatttt gcctcttttt gtgttacagc taccattctt	4020
	ttggttttgt tcccccttgc ggtgtttttt ctgggtcttc tcggcggtgt cgcatggggg	4080
	tttttggtctg ttgggttggt tttgctgttg gcctgttcaa gcctgtgtcc gaccagtcg	4140
50	gcactgcttg tgagtttgac tcgccagagt gtaggaacgt ccttcattct tttgagcttc	4200
	tcaaaccttg ggacctgtt cgcagccttg ttgtgggccc cgtcggcttc ggaccttgcca	4260
	ttcttggcag gttactgggc ggggcacgct acatctggca ttttttgctt aggcttgcca	4320
55	ttgttgacga ttgtatcttg gctggagctt atgtgctttc tcaaggtagg tgtaaaaagt	4380
	gctggggatc ttgtgtaaga actgctccta atgaaatcgc cttcaacgtg ttccctttta	4440
	cgcgtgcgac caggctcgtca ctcatcgacc tgtgcgatcg gttttgtgcg ccaaaaggca	4500
60	tggaccccat tttcctcgtt actgggtggc gcgggtgtgt gaccggccga agtccattg	4560
	agcaaccctc tgaaaaaccc atcgcgttcg cccagttgga tgaaaagagg attacggcta	4620
	gaactgtggt cgctcagcct tatgatccta accaagccgt aaagtgttg cgggtgttac	4680
65	aggcgggtgg ggcgatagtg gccgaggcag tcccaaaagt ggtcaagggt tccgctattc	4740

ES 2 343 371 T3

	cattccgagc tccctttttt cccaccggag tgaagggtga tccctgagtgc aggatcgtgg	4800
	tcgaccccga cacttttact acagctctcc ggcttggtta ctccaccaca aacctcgtcc	4860
5	ttggtgtggg ggactttgcc caactgaatg gattaaaaat caggcaaatt tccaagccct	4920
	cgggaggagg cccgcacctc attgctgccc tgcattgtgc ttgctcgatg gcgttgacaca	4980
	tgcttgctgg agtttatgta actgcagtgg ggctttgctg taccggcacc aacgatccgt	5040
10	gggtgcactaa cccattcgcc gtccctggct acggacctgg ctccctctgc acgtccagat	5100
	tgtgcatctc ccaacatggc cttaccctgc ccttgacagc acttggtggca ggattcggtc	5160
	ttcaggaaat tgccctagtc gttttgattt tcgtttccat cggaggcatg gctcatagg	5220
15	tgagttgtaa ggctgatatg ctgtgcgtct tacttgcaat cgccagctat gtttgggtac	5280
	cccttacctg gttgctctgt gtgtttcctt gctgggtgct ctggttctct ttgcaccctc	5340
	tcaccattct atgggtgggtg tttttcttga tgtctgtaaa tatgccttcg ggaatcttaa	5400
20	ccgtgggtgtt attggttgct ctttggtctc taggccgtta tactaatgtt gttgggtctg	5460
	ttaccccccta tgatattcat cattacacca atggcccccg cgggtgtgccc gccttggtcta	5520
	ccgcaccaga tgggacttac ttggccgctg tccgccgcgc tgcgttgact ggccgcaccg	5580
25	tgctgtttac cccgtctcag cttgggtccc ttcttgaggg cgctttcaga actcgaaagc	5640
	cctcactgaa caccgtcaat gtggctgggt cctccatggg ctctggcgga gtgttacta	5700
	tcgatgggaa aattaagtgc gtgactgccg cacatgtcct tacgggtaat tcagctaggg	5760
30	tttcgggggt cggcttcaat caaatgcttg actttgatgt aaaaggggac ttcgccatag	5820
	ctgattgccc gaattggcaa ggggctgctc ctaagacca attctgcgag gatggatgga	5880
	ctggccgcgc ctattggctg acatcctctg gcgtcgaaac cgggtgcatt gggaatggat	5940
35	tcgccttctg cttcacccg tgccggcgatt ccgggtcccc agtgatcacc gaagccgggtg	6000
	agcttgtcgg cgttcacaca ggatcaaaca aacaaggagg aggcattgtt acgcgcccc	6060
	ctggccagtt ttgcaatgtg gcacccatca agctgagcga attaatgag ttctttgctg	6120
40	gacctaaagg cccgctcggg gatgtgaagg ttggcagcca cataattaaa gacatatgcg	6180
	aggtaccttc agatctttgc gccttgcttg ctgcccacc cgaactggaa ggaggcctct	6240
	ccaccgtcca acttctgtgt gtgtttttcc tcctgtggag aatgatggga catgcctgga	6300
45	cgcccttggg tgctgttggg ttttttatct tgaatgagg tctcccagct gtactggtcc	6360
	ggagtgtttt ctccittgga atgtttgtgc tatcttggtt cacaccatgg tctgcgaag	6420
	ttctgatgat caggcttcta acagcagctc ttaacaggaa cagattgtca ctgcctttt	6480
50	acagccttgg tgcagcgacc ggttttgtcg cagatctggc ggcaactcaa gggcaccgt	6540
	tgcaggcagt aatgaattta agtacctatg ccttcctgcc tcggataatg gtcgtgacct	6600
	caccagtccc agtgattgcg tgtggtgttg tgcacctcct tgccataatt ttgtacttgt	6660
55	ttaagraccg ctgcctgcac aatgtccttg ttggcgatgg tgcgttctct gcggctttct	6720
	ttttgcgata ctttgccgag gggaaattga ggggaagggt gtcgcaatcc tgcgggatga	6780
	atcatgagtc gctgactggg gccctcgcta tgagacttaa tgacgaggac ttggattttc	6840
60	ttacgaaatg gactgatttt aagtgttttg tttctgcac caacatgagg aatgcggcgg	6900
	gccagtcatc cgaggctgcc tatgctaaag cacttagaat tgaacttgcc cagttggtgc	6960
	aggttgataa ggctcgagg actttggcca aacttgaagc ttttgcgtat accgtggcac	7020
65	cccaactctc gcccggtgac attgttgttg ctcttgcca tacgcctgtt ggcggtatct	7080

ES 2 343 371 T3

	tcgaccta	aa	ggttggt	agc	accaagc	ata	ccctcca	agc	cattgag	acc	agagttct	ttg	7140
	ccgggtcc	aa	aatgacc	gtg	gcgcg	gtgtcg	ttgatcca	aac	ccccac	accc	ccaccgc	cac	7200
5	ccgtgc	cctat	ccccctt	cca	ccgaa	agttc	tggaga	aatgg	tccaac	gcc	tggggg	gatg	7260
	aggatc	gttt	gaataa	gaag	aagagg	cgc	ggatgg	aaagc	cgtcgg	catc	tttgtt	atgg	7320
	gtggaa	agaa	atatc	agaaa	ttttgg	gaca	agaact	ccgg	tgatgt	gttt	tatg	aggagg	7380
10	tcgatg	ataa	cacag	acgcg	tgggag	tgcc	tcagag	ttga	caacc	ctgcc	gacttt	tgacc	7440
	ctgaga	aggg	aactct	gtgc	gggcata	cta	ccattg	aaaga	taagac	ttac	agtgt	ctacg	7500
	cctcccc	atc	tggca	agaaa	ttcctg	gtcc	ccgtct	accc	agagag	caaa	aaaaac	ccaat	7560
15	gggaag	ctgc	gaagctt	tcc	gtgga	acagg	cccttg	gcat	gatgaa	tgtc	gacgg	tgaac	7620
	tgacag	ccaa	agaag	tggag	aaactg	aaaa	gaataa	ttga	caaac	tccag	ggcctg	acta	7680
	aggagc	agtg	tttaaa	ctgc	tagccg	ccag	cggctt	gacc	cgctgt	ggtc	gcggcg	gctt	7740
20	ggttgt	tact	gagac	agcgg	taaaa	atagt	caaatt	ttcac	aaccg	gacct	tcacc	tagg	7800
	acctgt	gaat	ttaaa	agtgg	ccagt	gaggt	tgagct	aaaa	gacgc	ggtcg	agcata	aacca	7860
	acaccc	ggtt	gcaag	accgg	ttgat	ggtgg	tgttg	tgtc	ctgcg	ctccg	cagttc	cttc	7920
25	gcttat	agac	gtctta	atct	ccggc	gtga	tgcatt	ctcc	aagtt	actcg	cccgc	acgg	7980
	gccggg	aaaac	actggg	atcg	atggc	acgt	ttggg	atttt	gaggcc	gagg	ccacta	aaaga	8040
	ggaaat	tgca	ctcag	tgcgc	aaata	ataca	ggctt	gtgac	attagg	cgcg	gcgac	gcacc	8100
30	tgaaat	tgg	cttcct	tata	agctg	taccc	tgcag	gggg	aacct	gagc	gggtaa	aagg	8160
	agtttt	acag	aataca	aggt	ttgg	agacat	acctta	tataa	accccc	agtg	acactg	ggaag	8220
	ccagtg	cac	gcggct	gcct	gcctc	acgcc	caatg	ccact	ccggt	gactg	atggg	cgtc	8280
35	cgcttt	ggcc	acgact	atgc	cctccg	gttt	tgagt	tgtat	gtaccg	acca	ttccag	cgtc	8340
	tgtcct	tgat	tatctt	gatt	ctagg	cctga	ctgccc	caaa	cagtt	gacag	agcac	ggctg	8400
	tgagg	acgcc	gcatta	agag	acctct	ccaa	gtatg	acttg	tccac	ccaag	gctttg	tttt	8460
40	acctgg	agtt	cttcgc	cttg	tgcgt	aaagta	cctgtt	tgtc	catgt	gggta	agtgc	ccgcc	8520
	cgttcat	cgg	ccttcc	actt	accct	gccaa	gaatt	ctatg	gctgg	aaata	atggg	aaacag	8580
	gtttcca	acc	aaggac	atcc	agagc	gtccc	tgaat	cgac	gttct	gtg	cacag	gccgt	8640
45	gcggg	aaaac	tggcaa	actg	ttaccc	cttg	tacct	caag	aaacag	tatt	gtggg	aaagaa	8700
	gaagac	tagg	acaata	actg	gcacca	ataa	cttcatt	gca	ctggc	ccacc	gggcag	cggt	8760
	gagtgg	tgtc	acccag	ggct	tcatg	aaaaa	ggcgtt	taac	tcgcc	cattg	ccctc	ggtaa	8820
50	aaacaa	attt	aaagag	cttc	agact	ccgg	cttag	gcagg	tgctt	gaag	ctgat	cttgc	8880
	atcctg	cgat	cgctcc	acac	ctgca	attgt	ccgct	ggtt	gccgc	caatc	ttcttt	atga	8940
	acttg	cctgt	gctga	agagc	acctg	ccgtc	gtacg	tgtt	aactg	ctgcc	acgac	ctact	9000
55	ggtcac	gcag	tccgg	cgcag	taact	aagag	aggtg	gcctg	tcgtc	tggcg	acccg	atcac	9060
	ttctgt	gtcc	aacacc	attt	acagc	ttgg	gatata	tgca	caacac	atgg	tgctc	agtta	9120
	ctttaa	aagt	ggtcac	ctc	atggc	cttct	gtttc	tacaa	gaccag	ctga	agttt	gagga	9180
60	catgct	caag	gttca	acccc	tgatc	gtcta	ttcgg	acgac	ctcgt	actgt	atgcc	gagtc	9240
	tcccacc	atg	ccaaact	tacc	actgg	tgggt	tgaac	atctg	aacct	gatgc	tgggt	tttca	9300
	gacgg	accca	aagaag	acag	ccata	acaga	ctcgc	catca	tttct	aggct	gtagg	ataat	9360
65	aaatg	gacgc	cagct	cgctc	ctaacc	gtga	caggat	tctc	gcggc	ccctc	cctacc	atat	9420

ES 2 343 371 T3

	gaaggcaagc aatgtctctg aatactacgc ctcggcggtc gcgatactca tggacagctg	9480
	tgcttgttta gaggatgac ccgaatggtt tgaagagctt gtagttggga tagcgcagtg	9540
5	tgcccgcaag gacggctaca gttttcccg cccgccgttc ttcttgcca tgtgggaaaa	9600
	actcagatcc aatcatgagg ggaagaagtc cagaatgtgc gggactgcg gggccccggc	9660
	tccgtacgcc actgcctgtg gcctcgacgt ctgtatttac cacaccact tccaccagca	9720
10	ttgtccagtc atcatctggt gtggccaccc ggctggttct ggttcttgta gtgagtgcaa	9780
	accccccta gggaaaggca caagccctct agatgaggtg ttagaacaag tcccgtataa	9840
	gcctccacgg actgtaatca tgcagtgtga gcagggtctc accctcttg acccaggcag	9900
15	ataccagact cgccgcggat tagtctccgt taggcgtggc attagaggaa atgaggttga	9960
	tctaccagac ggtgattatg ctagcaccgc cctactccct acttgtaaag agattaacat	10020
	ggtcgtgtc gcctctaatt gtgtgcgag caggttcatc atcgqccgc ctggtgctgg	10080
20	gaaaacatac tggctccttc aacagggtcca ggatggtgat gtcatttaca cgccaactca	10140
	ccagaccatg ctcgatatga ttagggcttt ggggacgtgc cggttcaacg tcccagcagg	10200
	tacgacgctg caattccctg cccctcccg taccggccct tgggttcgca tcctagccgg	10260
25	cggttggtgt cctggcaaga attccttctt ggatgaagca gcgtattgta atcaccttga	10320
	tgtcttgagg ctctttagca aaactaccct cacctgtctg ggagatttca aacaactcra	10380
	cccagtgggt tttgattctc attgctatgt ttttgacatc atgcctcaga ctcaactgaa	10440
30	gaccatctgg agatttgagc agaatatctg tgatgccatt cagccagatt acagggacaa	10500
	acttgatcc atggtcaaca caaccgtgt aacctacgtg gaaaaacctg tcaagtatgg	10560
	gcaagtcctc acccttacc acagggaccg agaggacggc gccatcacaa ttgactccag	10620
35	tcaaggcgcc acatttgatg tggttacact gcatttgccc actaaagatt cactcaacag	10680
	gcaaagagcc cttgttgcta ttaccagggc aagacatgct atcttttgtgt atgaccacaa	10740
	caggcaactg cagagcatgt ttgatcttcc tgcgaaaggc acaccctca acctcgctgt	10800
40	gcaccgtgac gagcagctga tcgtgctaga tagaaataac aaagaatgca cggttgctca	10860
	ggctctaggc aatggggata aattcagggc cacagacaag cgctttagtag attctctccg	10920
	cgccatttgi gcagatctgg aagggtcgag ctccccgtc cccaaggctg cacacaactt	10980
45	gggattttat ttctcgctg atttgacaca gtttgctaaa ctcccggtag aacttgacc	11040
	ccactggccc gtggtgacaa ccagaaaca tgaaaagtgg ccagaccggt tggttgctag	11100
	ccttcgcccc gtccataagt atagccgcgc gtgcatcggc gccggctaca tgggtggccc	11160
50	ctcagtgttt ctgggcaccc ctggggttgt gtcatactat ctacaaaaat ttgtcagggg	11220
	cgaggctcaa atgcttccgg agacagtctt caqcaccggc cgaattgagg tagattgccg	11280
	tgagtatctt gatgaccggg agcgagaaat tgctgagtc ctccccatg ctttcatttg	11340
55	cgacgtcaaa ggcactaccg ttggaggatg tcaccatgtc acctccaaat accttcccg	11400
	cttcttccc aaggaatcag tcgcggtagt cggggtttca agccccggga aagccgcaaa	11460
	agcagtttgc acattaacag atgtgtatct ccagatctc gaagcttacc tccaccagaa	11520
60	gaccagtc aagtgtgga aaatgatgtt ggacttcaag gaagttcgac tgatggtctg	11580
	gaaggacaag acggcctatt ttcaacttga aggcggccat ttacctggc accagcttgc	11640
	aagctatgcc tcgtacatcc gagttcctgt taactctacg gtgtatttgg acccttgc	11700
65	gggccctgcc ctttgcaaca gaagagttgt cgggtccact cattggggag ctgacctgc	11760

ES 2 343 371 T3

agtcacccct tatgattacg gtgccaaaat catcctgtct agtgcatacc atggtgaaat 11820
 gccccctggg tacaaaatcc tggcgtgcgc ggagttctcg cttgacgac cagtgaaggta 11880
 5 caaacacacc tggggggtttg aatcggatac agcgtatctg tacgagttca ccggaacgg 11940
 tgaggactgg gaggattaca atgatgcgtt tcgtgcgcgc cagaaaggga aaatttataa 12000
 ggccactgcc accagcatga ggtttcattt tccccgggc cctgtcattg aaccaacttt 12060
 10 aggcctgaat tgaaatgaaa tgggggtccat gcaaagcctc ttgacaaaa ttggccaact 12120
 ttttgtggat gctttcacgg aatttttggt gtccattgtt gatatcatca tatttttggc 12180
 cattttgttt ggctttacca tcgctggctg gctgggtggtc ttctgcatcc gattgggttg 12240
 15 ctccgcggtg ctccgtgcgc gccctaccat tcaccctgag caattacaga agatcctatg 12300
 aggcctttct ttctcagtcg cagggtggata ttcccacctg gggaaactaga catcccctgg 12360
 ggatgctttg gcaccataag gtgtcaaccc tgattgatga aatggtgtcg cgtcggatgt 12420
 20 accgcaccat ggaaaaagca ggacaggctg cctggaaaca ggtggtgagc gaggccacgc 12480
 tgtctcgcat tagtggtttg gatgtggtgg ctcatcttca gcatcttgcc gccattgaag 12540
 ccgagacctg taaatatattg gcctctcggc tgcccatgct acacaatctg cgcattgacag 12600
 25 ggtcaaatgt aaccatagtg tataatagta ctttgaatca ggtgtttgct atttttccaa 12660
 cccctggatc ccggccaaag cttcatgatt ttcagcaatg gctaatagct gtgcactcct 12720
 ccatattttc ctccgttgcg gcttcttgta ctctttttgt tgtgctgtgg ttgctggattc 12780
 30 caatactacg tactgttttt gggttccgct gggtaggggc aatttttcct tcgaactcac 12840
 ggtgaattac acggtgtgtc cgctttgcct caccggcaa gcagccgctg aggtctacga 12900
 accaggcagg tctcttttgt gcaggatagg gcatgaccga tgtagtgagg acgaccatga 12960
 35 cgatctaggg ttcatgggtc cgcttggcct ctccagcgaa ggccacttga ccagtgttta 13020
 cgcttgggtg gcgttcctgt ccttcagcta cacggcccag ttccatccc agatatttgg 13080
 gatagggaat gtgagtcaag tttatgttga catcaagcac caattcatct gcgccgttca 13140
 40 cgacggggag aacgccacct tgccctgtca tgacaatatt tcagccgtat ttcagacct 13200
 ctaccaacat caagtcgacg gcggcaattg gtttcacct 13260
 tttctcttgg ttggttttaa atgtttcttg gtttctcagg cgttcgctg caagccatgt 13320
 45 ttcagttcaa gtctttcgga catcaaaacc aacactaccg cagcatcagg ctttgttgtc 13380
 ctccaggaca tcagctgcct taggcatggc gactcgtcct ctccagacgat tcgcaaaagc 13440
 tctcagtgcc gcgcggcgat agggacgccc gtgtacatca ctgtcacagc caatgtcaca 13500
 50 gatgagaatt atttacattc ttctgatctc cttatgcttt cttcttgccct tttctatgct 13560
 tctgagatga gtgaaaaggg attcaagggtg atatttggca atgtgtcagg catcgtggct 13620
 gtgtgtgtca actttaccag ctacgtccaa catgtcaagg agtttacc 13680
 55 gtggtcgatc atgtgcggct gctccatttc atgacacctg agaccatgag gtgggcaacc 13740
 gttttagcct gtttttttgc catcttactg gcaatttgaa tgttcaagta tgttggggag 13800
 atgcttgacc gcgggctgtt gctcgcgatt gctttctttg tgggtgtatc tgccattttg 13860
 60 ttttctgctg ctctgcaacg ccaacagcaa cagcagctct catcttcagt tgatttataa 13920
 cttgacgcta tgtgagctga atggcacaga ttggctgaaa gacaaatttg attgggcagt 13980
 ggagactttt gtcattcttc ccgtgttgac tcacattgtc tcatatggtg cactcaccac 14040
 65 tagccatttc cttgacacag tcggtctggt tactgtgtct accgccgggt tctaccacgg 14100

ES 2 343 371 T3

	gcggtatggt ctgagtagca tctacgcggt ctgcgctctg gccgcattga tttgcttcgt	14160
	cattaggctt gcgaagaact gcatgtcctg gcgctactct tgtaccagat atactaactt	14220
5	ccttctggac actaaggga gactctatcg ctggcggtcg cccgttatca tagagaaagg	14280
	gggtaagggt gaggtcgaag gtcacctgat cgacctcaaa agagttgtgc ttgatgggtc	14340
	cgtggcaacc cctttaacca gagtttcagc ggaacaatgg ggtcgtcttt agacgacttt	14400
10	tgctatgata gcacggctcc acaaaagggtg cttttggcgt tttccattac ctacacgcca	14460
	gtgatgatat atgctctaaa ggtaagtgcg ggccgacttt tagggcttct gcaccttttg	14520
	atctttctga attgtacttt taccttcggg tacatgacat tcgtgcactt taatagcaca	14580
15	aataaggctg cgctcactat gggagcagta gttgcacttc tttgggggggt gtactcagcc	14640
	atagaaacct ggaagtcat cacctccaga tgccgtttgt gcttgctagg ccgcaagtac	14700
	attctggccc ccgcccacca cgtcgaaagt gccgcgggct ttcacccgat cgcggcaaat	14760
20	gataaccacg catttgctgt ccggcgctcc ggctccacta cggttaacgg cacattgggtg	14820
	cccgggttga aaagcctcgt gttgggtggc agaaaagctg ttaaacaggg agtggtaaac	14880
	cttgtcaa atgccaaata acaacggcaa gcagcaaaag aaaaagaggg ggaatggcca	14940
	gccagtcaat cagctgtgcc agatgctggg taagatcatc gccagcaaa accagtccag	15000
25	aggcaaggga ccggggaaga aaattaagaa taaaaacccg gagaagcccc attttcctct	15060
	agcgactgaa gatgacgtca ggcacactt cacccttagt gagcggcaat tgtgtctgtc	15120
	gtcgatccag actgccttta accagggcgc tggaacctgt accctatcag attcaggtag	15180
30	gataagttac actgtggagt ttagtttgcc gacgcatcat actgtgcgcc tgatccgcgt	15240
	cacagcgcca tcatcagcgt aatgggctgg cattccttaa gcacctcagt gttagaattg	15300
	gaagaatgtg tgggtgaatgg cactgattgg cactgtgcct ctaagtcacc tattcaatta	15360
35	gggcgaccgt gtgggggtta agtttaattg gcgagaacca tgcggccgaa atta	15414

<210> 17

<211> 15451

40 <212> ADN

<213> Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

<400> 17

45	tatgacgtat aggtgttggc tctatgcctt ggcatttgta ttgtcaggag ctgtgaccat	60
	tggcacagcc caaaacttgc tgcacagaaa cacccttctg tgatagctc cttcagggga	120
50	gcttaggggtt tgtccctagc accttgcttc cggagttgca ctgctttacg gtctctccac	180
	ccctttaacc atgtctggga tacttgatcg gtgcacgtgt accccaatg ccagggtgtt	240
	tatggcggag ggccaagtat actgcacacg atgcctcagt gcacgggtctc tccttcccct	300
55	gaacctccaa gtttctgagc tcgggggtgct aggcctattc tacaggcccc aagagccact	360
	ccggtggacg ttgccacgtg cattccccac tgttgagtgc tccccgccc gggcctgctg	420
	gctttctgca atctttccaa tcgcacgaat gaccagtggg aacctgaact tccaacaaag	480
60	aatgggtacgg gtcgcagctg agctttacag agccggccag ctacacctg cagtcttgaa	540
	ggctctacaa gttttgaac ggggttgccg ctggtacccc attgttgga cgtctcctgg	600
	agtggccgtt ttcgccaatt ccctacatgt gagtataaaa cctttcccgg gagcaactca	660
65	cgtgttgacc aacctgccgc tcccgcagag acccaagcct gaagactttt gcccttttga	720
	gtgtgctatg gctactgtct atgacattgg tcatgacgcc gtcattgtat tggccgaaag	780

ES 2 343 371 T3

	gaaagtctcc t999ccccctc gtggcgggga tgaagtgaat tttgaagctg tccccgggga	840
	gttgaagtgt attgcgaacc ggctccgcac ctcttccccg cccaccaca cagtggacat	900
5	gtctaagtgc gccttcacag cccctgggtg tgggtgtttct atgcgggtcg aacgccaaca	960
	cggctgcctt cccgctgaca ctgtccctga aggcaactgc tggaggagct tgtttgactt	1020
	gcttccactg gaagtgcaga acaagaaat tcgccatgct aaccaatttg gctatcagac	1080
10	caagcatggt gtctctggca agtacctaca gcggaggctg caagttaatg gtctccgagc	1140
	agtaactgac ctaaacggac ctatcgctgt acagtacttc tccgttaagg agagttggat	1200
	ccgccatttg aaactggcgg gagaacccag ctactctggg tttgaggacc tcctcagaat	1260
15	aagggttgag cctaacacgt cgccattggc tgacaaggaa gaaaaattt tccggttttg	1320
	cagtcacaag tggtagcggc ctggaagag agcaagaaa gcacgctctt gtgcgactgc	1380
	tacagtgcgt ggccgcgctt tgtccgttcg tgaaacccg caggccaagg agcacgaggt	1440
20	tgccggcgcc aacaaggctg agcacctcaa acactactcc ccgcttgccg aagggattg	1500
	tggttggcac tgcatttccg ccacgcca cggatgggt aattccaaat ttgaaaccac	1560
	cttccccgaa agagtgcagc ctccagatga ctgggtact gacgaggatc ttgtgaatgc	1620
25	catccaaatc ctgagactcc ctgcgccctt agacaggaac ggtgcttcta ctacgcca	1680
	gtacgtactt aagctggaag gtgagcattg gactgtcact gtgacccctg ggatgtcccc	1740
	ttctttgctc cctcttgaat gtgttcaggg ctgttgtggg cacaaggcg gtcttggttc	1800
30	cccagatgca gtgcaggtct ccgatttga ccctgcctgc ctgaccggc tggctgaggt	1860
	gatgcacctg cctagcagtg ctatcccagc cgctctggcc gaaatgtctg gcgattccga	1920
	tcgttcggct tctccggtca ccaccgtgtg gactgtttcg cagttctttg cccgtcacag	1980
35	cggagggaat caccctgacc aagtgcgctt agggaaaatt atcagccttt gtcagggtgat	2040
	tgaggactgc tgcgtgtccc agaacaaaac caaccgggtc accccggagg aggtcgcagc	2100
	aaagattgac ctgtacctcc gtggtgcaac aaatcttgaa gaatgcttgg ccaggcttga	2160
40	gaaagcgcgc ccgccacgc taatcgacac ctctttgat tgggatgttg tgctccctgg	2220
	gggtgaggcg gcaaccacga cgatcaagct gcccaggtc aaccagtgtc gtgctctggg	2280
	ccctgtgttg actcaaaagt ccttgacaa caactcggc cccctgaccg ctttttact	2340
45	ggctaactac tactaccgtg cgcaagggtg cgaagtctgt caccgtgaaa gactaaccgc	2400
	cgtgctctcc aagtggaaa aggttgttcg agaagaatat gggctcatgc caaccgagcc	2460
	tggtcacag cccacactgc cagcgggct cgacgaactc aaagaccaga tggaggagga	2520
50	cttgctgaaa ctggctaacg cccagacgac ttcggacatg atggcctggg cagtcgagca	2580
	ggttgaccta aaaacttggg tcaagaacta ccgcgggtg acaccaccac cccctccgcc	2640
	aaaagttcag cctcgaaaaa cgaagcctgt caagagcttg ccggagagaa agcctgtccc	2700
55	cgccccgcgc aggaagggtg ggtccgattg tggcagccc gtttcattag gcggcgatgt	2760
	ccctaacagt tgggaagatt tggctgttag tagccccctt gatctcccga cccacctga	2820
	gccggcaaca cttcaagtg agctggtgat tgtgtctca ccgcaatgca tcttcaggcc	2880
60	ggcgacaccc ttgagtgaac cggtccaat tcccgacact cgcggaactg tgtctcgacc	2940
	gggtgacaccc ttgagtgaac cgatccctgt gcccgcaccg cggcgtaagt ttcagcaggt	3000
	gaaaagattg agttcggcgg cggcaatccc accgtaccag gacgagcccc tggatttgc	3060
65	tgttctctca cagactgaat atgaggcctc tccccagca ccgcccgcga gcgggggcgt	3120

ES 2 343 371 T3

	tctgggagta gaggggcatg aagctgagga aaccctgagt gaaatctcgg acatgtcggg	3180
	taacattaaa cctgcgtccg tgtcatcaag cagctccttg tccagcgtga gaatcacacg	3240
5	cccaaaatac tcagctcaag ccacatcga ctcgggcggg ccctgcagtg ggcattctcca	3300
	agagggtaaag gaaacatgcc ttagtgatcat gcgcgaggca tgtgatgcga ctaagcttga	3360
	tgaccctgct acgcaggaat ggctttctctg catgtgggat cgggtggaca tgctgacttg	3420
10	gcgcaacacg tctgtttacc aggcgatttg cacccttagat ggcagggttaa agttcctccc	3480
	aaaaatgata ctcgagacac cgccgcccta tccgtgtgag tttgtgatga tgcctcacac	3540
	gcctgcacct tccgtagggt cggagagcga ccttaccatt ggctcagttg ctactgaaga	3600
15	tggtccacgc atcctcgaga aaatagaaaa tgtcggcgag atggccaacc agggaccctt	3660
	ggccttctcc gaggataaac cggtagatga ccaacttgtc aacgaccccc ggatatcgtc	3720
	gcggaggcct gacgagagca catcagctcc gtccgcaggc acagggtggcg ccggctcttt	3780
20	taccgatttg ccgccttcag atggcgcgga tgcggacggg ggggggcccgt ttcggacggt	3840
	aaaaagaaaa gctgaaaggc tctttgacca actgagccgt cagggttttg acctcgtctc	3900
	ccatctccct gttttcttct cacgcctttt ctaccctggc ggtggttatt ctccgggtga	3960
25	ttggggtttt gcagctttta ctctatttg cctcttttta tgttacagtt acccagcctt	4020
	tggtattgct cccctcttgg gtgtgttttc tgggtcttct cggcgcttc gaatgggggt	4080
	ttttggctgc tgggtggctt ttgctgttgg tctgttcaag cctgtgtccg acccagtcgg	4140
30	cgtgcttgt gaggttgact cgccagagtg tagaaacatc ctccattctt ttgagcttct	4200
	caaaccttgg gacctgttc gcagccttgt tgtgggcccc gtccggtctcg gtcttgccat	4260
	tcttggcagg ttactggcg gggcacgctg catctggcac tttttgctta ggcttggcat	4320
35	tggtgcagac tgatatcttg ctggagctta cgtgctttct caaggtaggt gtaaaaagt	4380
	ctggggatct tgtataagaa ctgctcctaa tgaggctcgt ttaacgtgt ttcctttcac	4440
	acgtgcgacc aggtcgtcac ttatcgacct gtgcgacatc ttttgtgcgc caaaaggaat	4500
40	ggacccccatt tttctcgcca ctgggtggcg cgggtgctgg gccggccgaa gccccattga	4560
	gcaaccctct gaaaaaccca tcgcgtttgc ccaattggat gaaaagaaga ttacggctag	4620
	gactgtggtc gccagcctt atgaccccaa ccaagccgta aagtgcctgc ggggtattgca	4680
45	ggcgggtggg gcgatgggtg ctaaggcggg cccaaaagtg gtcaagggtt ccgctgttcc	4740
	attccgagcc cctttcttct ccaactggagt gaaagttgac cctgattgca gggctcgtgt	4800
	tgaccctgac accttcactg cagctctccg gtctggtac tccaccacaa acctcgtcct	4860
50	tggtgtaggg gactttgccc agctgaatgg attaaaaatc aggcataatt ccaagccttc	4920
	agggggaggc ccacatctca tggctgccct gcatgttgc tgctcgtggt ctctgcacat	4980
	gcttgctggg atttatgtga ctgcggtggg ttcttgccgc accggcacca acgaccctg	5040
55	gtgcgctaac ccgtttgccg tccctggcta cggacctggc tctctctgca cgtccagatt	5100
	gtgcatttcc caacacggcc ttaccctgcc cttgacagca cttgtggcgg gattcgggtat	5160
	tcaagaaatt gccttggctg ttttgatttt tgtttccatc ggaggcatgg ctcatagggt	5220
60	gagctgtaag gctgacatgc tgtgtgtttt gcttgcaatt gccagctatg tttgggtacc	5280
	tcttacctgg ttgctttgtg tgtttccttg ctgggtgcgc tgtttttctt tgcacccct	5340
	caccatccta tgggtgggtg ttttcttgat ttctgtgaat atgccttcag gaatcttggc	5400
65	catgggtgtg ttggttcttc tttggcttct tggctggtat actaatgtg ctggccttgt	5460

ES 2 343 371 T3

	cacccccctac gacatttcac attacaccag tggcccccg ggtgttgccg ccttggttat	5520
	cgcaccagat gggacctact tggccgctgt ccgccgcgct gcgttgactg gccgcaccat	5580
5	gctgtttacc ccgtcccagc ttgggtctct acttgagggg gctttcagaa ctcgaaagcc	5640
	ctcactgaac accgtcaatg tgatcgggtc ctccatgggc tctggcgggg tgtttaccat	5700
	cgacgggaaa gtcaagtgcg taactgccgc acatgtcctt acgggcaatt cagctcgggt	5760
10	ttccgggggtc ggcttcaatc aaatgcttga ctttgacgta aaggagatt tcgctatagc	5820
	tgattgcccg aattggcaag gggctgcccc caagacccaa ttctgcacgg atggatggac	5880
	tggccgtgcc tattggctaa catcctctgg cgtcgaaccc ggcgtcattg gaaaaggatt	5940
15	cgcttcttgc ttcaccgcat gtggcgattc cgggtcccca gtgatcaccg aggccggtga	6000
	gcttgtcggc gttcacacgg gatcgaataa acaagggggg ggcattgtta cgcgccccctc	6060
	aggccagttt tgtaatgtgg caccatcaa gctaagcgaa ttaagtgaat tctttgctgg	6120
20	gcctaaggtc ccgctcggtg atgtgaaggc cggcagccac ataattaaag acataagcga	6180
	ggtgccttca gatctttgtg ccttgcttgc tgccaaacct gaactggaag gaggcctctc	6240
	caccgtccaa cttctttgtg tgtttttct cctgtggaga atgatgggac atgcctggac	6300
25	gccccgggtt gctgtgagtt tctttatctt gaatgaggtt cttccagccg tcttggtccg	6360
	gagtgttttc tctttggaa tgtttgtgct atcctggctc acgccatggt ctgcgcaagt	6420
	tctgatgatc aggcctctga cagcagctct taacaggaa acagtggtcac ttgccttttt	6480
30	cagcctcgtt gcagtgaccg gttttgtcgc agatcttgcg gccactcagg ggcacccgtt	6540
	gcaggcagtg atgaatttga gcacctatgc attcctgcct cggatgatgg ttgtgacctc	6600
	accagtccca gtgatcacgt gtggtgtcgt gcacctactt gccatcattt tgtacttggt	6660
35	taagtaccgt ggcccgacc atatccttgt tggcgatgga gtgttctctg cggctttctt	6720
	cttgagatac ttgcccagg gaaagttag ggaaggggtg tcgcaatcct gcggaatgaa	6780
	tcatgagtct ctgactggtg ccctcgctat gagactcaat gacgaggact tggatttcct	6840
40	tatgaaatgg actaatttta agtgctttgt ttctgcgtcc aacatgagga atgcagcggg	6900
	tcaatttatc gaggctgcct atgctaaagc acttagagta gaactggccc agttggtgca	6960
	ggttgacaaa gttcgaggta ctttggccaa acttgaagct ttgctgata ccgtggcacc	7020
45	tcaactctcg cccggtgaca ttgttgtcgc tctcggccac acgctgttg gcagtatctt	7080
	cgacctaaag gttggttagc ccaagcatac cctccaagcc attgagacca gagtccctgc	7140
	tgggtccaaa atgaccgtgg cgcgcgtcgt cgacccgacc cccacgcccc caccgcacc	7200
50	cgtgcccatc cccctcccac cgaaagtctt ggagaatggc cccaacgctt ggggggatga	7260
	ggaccgtttg aataagaaga agaggcgag gatggaagcc ctcggcatct atgttatggg	7320
	cgggaaaaag taccagaaat ttggggacaa gaattccggt gatgtgtttt atgaggaggt	7380
55	ccataataac acagatgagt gggagtgtct cagagtggc gacctgccg actttgaccc	7440
	tgagaaggga actctgtgtg gacatgtcac cattgaaaac aaggcttacc atgtttacac	7500
	ctccccatct ggtaagaagt tcttggtccc cgtcaaccca gagaatggaa gagtccaatg	7560
60	ggaagctgca aagctttccg tggagcaggc cctaggtatg atgaatgtcg acggcgaact	7620
	gactgccaaa gaactggaga aactgaaaag aataattgac aaactccagg gcctgactaa	7680
	ggagcagtgt ttaaaactgct agccgccagc gacttgaccc gctgtggtcg cggcggcttg	7740
65	gttgttactg aaacagcggg aaaaatagtc aaatttcaca accggacctt caccctggga	7800

ES 2 343 371 T3

	cctgtgaatt taaaagtggc cagtgaaggtt gagctaaaag acgcggttga gcacaaccaa	7860
	cacccgggtt cgagaccgat cgatgggtga gttgtgtccc tgcgttccgc ggttcccttcg	7920
5	cttatagacg tcttgatctc cggtgctgat gcatctccca agttacttgc ccatcacggg	7980
	ccgggaaaca ctgggacga tggcacgctc tgggattttg agtccgaagc cactaaagag	8040
	gaagtgcac tcagtgcga aataatacag gcttgtgaca ttaggcgcgg cgacgctcct	8100
10	gaaattggtc tcccttaca gctgtaccct gttaggggta accctgagcg ggtgaaagga	8160
	gttctgcaga atacaagggt tggagacata ccttacaaaa cccccagtga cactggaagc	8220
	ccagtgcacg cggctgcctg ccttacgccc aacgccactc cggtgactga tgggcgctcc	8280
15	gtcttggcca cgaccatgcc ccccgggttt gagttatatg taccgaccat accagcgtct	8340
	gtccttgatt accttgactc taggcctgac tgccctaaac agctgacaga gcacggctgc	8400
	gaagatgccg cactgaaaga cctctctaaa tatgacttgt ccaccaagg ctttgtttta	8460
20	cctggagttc ttcgccttgt gcggaaatac ctgtttgccc atgtaggtaa gtgcccaccc	8520
	gttcatcggc cttctactta cctgtctaag aattctatgg ctggaataaa tgggaacagg	8580
	ttcccaacca aggacattca gagcgtccct gaaatcgacg ttctgtgcgc acaggctgtg	8640
25	cgagaaaact ggcaaaactgt cacccttgtt actcttaaga aacagtattg cgggaagaag	8700
	aagactagga ccatactcg caccaataac ttcacgcac tagcccaccg agcagtgttg	8760
	agtgggtgta cccagggctt catgaaaaag gcgtttaact cgcctatcgc cctcggaaag	8820
30	aacaagttta aggagctaca gactccggct ctgggcaggt gccttgaagc tgatctcgca	8880
	tcctgcgac gatccacgcc tgcaattgtc cgttggtttg ccgccaacct tctttatgaa	8940
	cttgctgtg ctgaagagca tctaccgtcg tacgtgtgta actgctgcca cgacttactg	9000
35	gtcacgcagt ccggcgcagt gactaagaga ggtggcctgt cgtctggcga cccgatcacc	9060
	tctgtgtcta acaccattta tagtttggtg atctatgcac agcatatggt gcttagttac	9120
	ttcaaaagtg gtcaccccca tggccttctg ttcttacaag accagctaaa gtttgaggac	9180
40	atgctcaagg ttcaaccctt gatcgtctat tcggacgacc tcgtgtgta tgccgagtct	9240
	cccaccatgc caaactatca ctgggtgggtt gaacatctga atttgatgct ggggtttcag	9300
	acggacccaa agaagacagc aataacagac tcgccatcat ttctaggctg tagaataata	9360
45	aatgggcgcc agctagtccc caaccgtgac aggatcctcg cggccctcgc ctatcacatg	9420
	aaggcgagta atgtttctga atactatgcc tcagcggctg caatactcat ggacagctgt	9480
	gcttgttttg agtatgatcc tgaatggttt gaagaacttg tagttggaat agcgcagtgc	9540
50	gcccgcagg acggctacag cttlcccgcc acgccgttct tcatgtccat gtgggaaaaa	9600
	ctcagggtcca attatgaggg gaagaagtcg agagtgtgcg ggtactgcgg ggccccggcc	9660
	ccgtacgcta ctgcctgtgg cctcgacgct tgcatttacc acaccactt ccaccagcat	9720
55	tgtccagtca caatctgggt tggccatcca gcgggttctg gttctttag tagtgcaaa	9780
	tccctgtag ggaaaggcac aagcccttta gacgaaggtc tggaaacaagt cccgtataag	9840
	ccccacgga ccgttatcat gcatgtggag cagggtctca cccccctga tccaggtaga	9900
60	taccaaactc gccgcggatt agtctctgtc aggcgtggaa ttaggggaaa tgaagttgaa	9960
	ctaccagacg gtgattatgc tagcaccgcc ttgctcccta cctgcaaaga gatcaacatg	10020
	gtcgtgtctg cttccaatgt attgcgcagc aggttcatca tcgcccacc cgggtgtggg	10080
65	aaaacatact ggctccttca acagggtccag gatggtgatg ttatttacac accaactcac	10140

ES 2 343 371 T3

cagaccatgc ttgacatgat tagggccttg gggacgtgcc gggtcaacgt cccggcaggc 10200
 acaacgctgc aattccccgt cccctcccg accggtccgt gggttcgcac cctagccggc 10260
 5 gggttggtgct ctggcaagaa ttccttccta gatgaagcag cgtattgcaa tcaccttgat 10320
 gttttgaggc ttcttagtaa aactaccctc acctgtctag gagacttcaa gcaactccac 10380
 ccagtgggtt ttgattctca ttgctatgtt tttgacatca tgcctcaaac tcaactgaag 10440
 10 accatctgga gggttggaaca gaatatctgt gatgccattc agccagatta cagggacaaa 10500
 ctcatgtcca tggcaaacac aaccggtgtg acctacgtgg aaaaacctgt caggtatggg 10560
 caggtcctca cccctacca cagggaccga gaggacgacg ccatactat tgactccagt 10620
 15 caaggcgcca cattcgatgt ggtcacattg catttgccca cttaaagattc actcaacagg 10680
 caaagagccc ttgttgccat caccagggca agacacgcta tctttgtgta tgaccacac 10740
 aggcagctgc agggcttgtt tgatcttctt gcaaaaggca caccgctcaa cctcgagtg 10800
 20 caccgcgacg ggcagctgat cgtgctggat agaaataaca aagaatgcac gggtgctcag 10860
 gctctaggca acggggataa atttagggcc acagacaagc gtgtgtaga ttctctccgc 10920
 gccatttggt ctgatctaga agggctgagc tctccgctcc ccaaggctcg acacaacttg 10980
 25 ggattttatt tctcacctga ttaaacacag tttgctaaac tcccagtaga acttgacact 11040
 cactggcccg tggtgacaac ccagaacaat gaaaagtggc cagatcggct gggtgccagc 11100
 cttcgcccta tccataaata cagccgcgcg tgcacgggtg ccggctatat ggtgggccct 11160
 30 tcgggtgttc taggcactcc tggggtcgtg tcatactatc tcacaaaatt tgttaagggc 11220
 gaggtcgaag tgcttccgga gacgggtttc agcaccggcc gaattgaggt agactgccgg 11280
 gaatatcttg atgatcggga gcgagaagtt gctgcgtccc tcccacacgc ttctattggc 11340
 35 gacgtcaaa gcaactaccgt tggaggatgt catcatgtca cctccagata cctccgcgc 11400
 gtccctccca aggaatcagt tgcggtagtc ggggtttcaa gccccgaaa agccgcgaaa 11460
 gcattgtgca cactgacaga tgtgtacctc ccagatcttg aagcctatct ccacccggag 11520
 40 acccagtcga agtgctggaa aatgatgttg gacttcaaag aagttcgact aatggcttg 11580
 aaagacaaaa cagcctatct ccaacttgaa ggtcgtatct tcacctggta tcagcttgcc 11640
 agctatgcct cgtacatccg tgttctgtc aactctacgg tgtacttga cccctgcatg 11700
 45 ggccccgccc tttgcaacag gagagtcgtc ggggtccacc actggggggc tgacctcgcg 11760
 gtcacccctt atgattacgg cgctaaatt atcctgtcta gcgcgtacca tggtgaaatg 11820
 cccccggat acaaaattct ggcgtgcgcg gagttctcgt tggatgacct agttaagtac 11880
 50 aaacatacct ggggggttga atcgataca gcgtatctgt atgagttcac cggaaacggt 11940
 gaggactggg aggattacaa tgatgcgttt cgtgcgcgcc aggaaggga aatttataag 12000
 gccactgcca ccagcttgaa gttttatctt cccccgggcc ctgtcattga accaacttta 12060
 55 ggcttgaatt gaaatgaaat ggggtccatg caaagcctt ttgacaaaat tggccaactt 12120
 tttgrggatg ctttcacgga gtcttgggtg tccattgttg atatcattat atttttggcc 12180
 attttgtttg gcttcacat cgcgggttg ctggtgtct tttgcatcag attggtttgc 12240
 60 tccgcgatac tccgtacgcg ccctgccatt cactctgagc aattacagaa gatcttatga 12300
 ggcctttctt tcccagtgcc aagtggacat tcccacctg ggaactaaac atcctttggg 12360
 gatgcttttg caccataagg tgtcaacct gattgatgaa atggtgtcgc gtcgaatgta 12420
 65 ccgcatcatg gaaaaagcag ggcaggctgc ctggaacag gtggtgagcg aggctacgct 12480

ES 2 343 371 T3

	gtctcgcat	agtagtttg	atgtggtgg	tcattttcag	catctagccg	ccattgaagc	12540
	cgagacctgt	aaatatttg	cctcccggct	gccatgcta	cacaacctgc	gcatgacagg	12600
5	gtcaaatgta	accatagtg	ataatagcac	tttgaatcag	gtgtttgcta	tttttccaac	12660
	ccctggttcc	cgcccaaagc	ttcatgattt	tcagcaatgg	ttaatagctg	tacattcctc	12720
	catattttcc	tctgttgca	cttcttgtag	tctttttgtt	gtgctgtggt	tgcggttcc	12780
10	aatactacgt	actgtttttg	gtttccgctg	gtaggggca	attttttctt	cgaactcaca	12840
	gtgaattaca	cggtgtgtcc	accttgccct	acccggcaag	cagccacaga	gatctacgaa	12900
	cccggtaggt	ctctttgggt	caggataggg	tatgaccgat	gtggggaggga	cgatcatgac	12960
15	gagctaggg	ttatgatacc	gcctggccct	tccagcgaag	gccacttgac	tagtgtttac	13020
	gcctgggttg	cgttcttctg	cttcagctac	acggcccagt	tccatcccga	gatattcggg	13080
	ataggggaatg	tgagtcgagt	ttatgttgac	atcaaacatc	aactcatctg	cgccgaacat	13140
20	gacgggcaga	acaccacctt	gcctcgtcat	gacaacattt	cagccgtgtt	tcagacctat	13200
	taccaacatc	aagtcgacgg	cgccaatttg	tttcacctag	aatggcttcg	tcccttcttt	13260
	tcctcgtggt	tggttttaaa	tgctctcttg	tttctcaggc	gttcgcctgc	aaaccatgtt	13320
25	tcagttcgag	tcttgagat	attaagacca	acaccaccgc	agcggaagc	tttgcgtgcc	13380
	tccaagacat	cagttgcctt	aggcatcgcg	actcggccct	tgaggcgatt	cgcaaaatcc	13440
	ctcagtgccg	tacggcgata	gggacaccgg	tgtagtttac	catcacagcc	aatgtgacag	13500
30	atgagaatta	tttacattct	tctgatctcc	tcagtcttcc	ttcttgccct	ttctatgctt	13560
	ctgagatgag	tgaaaagggg	tttaagggtg	tatttggaag	tggtgcaggc	atcgtggctg	13620
	tggtgtgcaa	ttttaccagc	tacgtccaac	atgtcaaggga	gtttacccaa	cgctccctgg	13680
35	tggtcgacca	tggtcggttg	ctccatttca	tgacacctga	gacctagagg	tgggcaactg	13740
	ttttagcctg	tctttttgcc	attctgtttg	caatttgaa	gtttaagcat	gttgagagaa	13800
	tgcttgaccg	cggtctgttg	ctcgcgattg	ctttctttgt	gggtgatcgt	gccgttctgt	13860
40	tttgcgtg	tcgccaacgc	cagcaacgac	agcagctccc	atctacagct	gatttacaac	13920
	ttgacgctat	gtgagctgaa	tgccacagat	tggttagcta	acaaatttga	ttgggcagtg	13980
	gagagttttg	tcattctttcc	cgttttgact	cacattgtct	cctatggtgc	cctcactacc	14040
45	agccatttcc	ttgacacagt	cgcttttagtc	actgtgtcta	ccgccgggtt	tgttcacggg	14100
	cggtatgtcc	taagtagcat	ctacgcggtc	tggtccctgg	ctgcgttgac	ttgcttcgtc	14160
	attaggtttg	caaagaattg	catgtccttg	cgctacgcgt	gtaccagata	taccaacttt	14220
50	cttctggaca	ctaagggcag	actctatcgt	tggtgggtgc	ctgtcatcat	agagaaaagg	14280
	ggcaaagtgt	aggtcgaaag	tcattctgatc	gacctcaaaa	gagttgtgct	tgatgggtcc	14340
	gtggcaaccc	ctataaccag	agtttcagcg	gaacaatggg	gtcgtcctta	gatgacttct	14400
55	gtcatgatag	cacggctcca	caaaagggtg	ttttggcggt	ttctattacc	tacacgccag	14460
	tgatgatata	tgccctaaag	gtgagtcgcg	gccgactgct	agggcttctg	caccttttga	14520
	tccttctgaa	ttgtgctttc	accttcgggt	acatgacttt	cgcgcacttt	cagagtacaa	14580
60	ataaggtcgc	gctcactatg	ggagcagtag	ttgcactcct	ttgggggggtg	tactcagcca	14640
	tagaaacctg	gaaattcatc	acctccagat	gccgtttgtg	cttgctaggc	cgcaagtaca	14700
	ttctggcccc	tgcccaccac	gttgaaagtg	ccgcaggcct	tcattccgatt	gcggcaaatg	14760
65	ataaccacgc	atttgtcgtc	cggtcgtccc	gctccactac	gggtcaacggc	acattgggtgc	14820

ES 2 343 371 T3

ccgggttaaa aagcctcgtg ttgggtggca gaaaagctgt taaacagga gtggtaaacc 14880
 ttgtcaaata tgccaaataa caacggcaag cagcagaaga gaaagaagg ggatggccag 14940
 5 ccagtcaatc agctgtgcca gatgctgggt aagatcatcg ctacagcaaaa ccagtccaga 15000
 ggcaagggaac cgggaaagaa aaataagaag aaaaacccgg agaagcccca ttttcctcta 15060
 gcgactgaag atgatgtcag acatcacttt acccctagt agcggcaatt gtgtctgtcg 15120
 10 tcaatccaga ccgcctttaa tcaaggcgct gggacttgca ccctgtcaga ttcagggagg 15180
 ataagttaca ctgtggagtt tagtttgctt acgcatcata ctgtgcgcct gatccgcgct 15240
 acagcatcac cctcagcatg atgggctggc attcttgagg catctcagt tttgaattgg 15300
 15 aagaatgtgt ggtaacggc actgattgac attgtgcctc taagtcacct attcaattag 15360
 ggcgaccgtg tgggggtgag atttaattgg cgagaaccat gcggccgaaa ttaaaaaaaaa 15420
 20 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 15451

<210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> sintético

30 <400> 18

gccaacagcg ccagcagctc tc 22

35 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> sintético

40 <400> 19

gttgatttac gccttgacgc tatg 24

45 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 50 <213> sintético

<400> 20

55 gtgagctggc tggcacagat tg

22

<210> 21
 <211> 53
 60 <212> ADN
 <213> sintético

<400> 21

65 gccaacagcg ccagcagctc tcattctcag ttgatttacg ccttgacgct atg

53

ES 2 343 371 T3

	<213> 22	
	<211> 45	
	<212> ADN	
5	<213> sintético	
	<400> 22	
10	gttgatttac gccttgacgc tatgtgagct ggctggcaca gattg	45
	<213> 23	
	<211> 74	
15	<212> ADN	
	<213> sintético	
	<400> 23	
20	gccaacagcg ccagcagctc tcatcttcag ttgatttaca acttgacgct atgtgagctg	60
	gctggcacag attg	74
25	<210> 24	
	<211> 74	
	<212> ADN	
30	<213> sintético	
	<400> 24	
35	gccaacagcg ccagcagctc tcatcttcag ttgatttacg ccttgacgct atgtgagctg	60
	gctggcacag attg	74
	<210> 25	
40	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> sintético	
45	<400> 25	
	ctaccaacat caggtcgatg gcgg	24
50	<210> 26	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> sintético	
55	<400> 26	
60	gtcggccgcg acttaccttt agag	24
65		