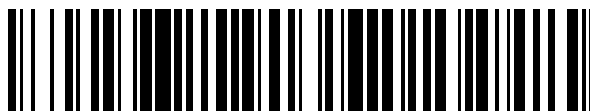


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 317 679**

51 Int. Cl.:

C07K 14/01 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **98958957 .7**

96 Fecha de presentación: **04.12.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1036180**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.09.2000**

54 Título: **COMPOSICIÓN VACUNAL PREPARADA A PARTIR DE SECUENCIAS DE CIRCOVIRUS DE TIPO B ASOCIADO CON LA ENFERMEDAD DEL ADELGAZAMIENTO DEL LECHÓN (MAP).**

30 Prioridad:
05.12.1997 FR 9715396

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.04.2009**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **24.02.2012**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **24.02.2012**

73 Titular/es:
Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, NJ 07940, US

72 Inventor/es:
JESTIN, André;
ALBINA, Emmanuel;
LE CANN, Pierre;
BLANCHARD, Philippe;
HUTET, Evelyne;
ARNAULD, Claire;
TRUONG, Catherine;
MAHE, Dominique;
CARIOLET, Roland y
MADEC, François

74 Agente: **Curell Aguilá, Mireia**

ES 2 317 679 T5

DESCRIPCIÓN

Composición vacunal preparada a partir de secuencias de circovirus de tipo B asociado con la enfermedad del adelgazamiento del lechón (MAP)

La invención tiene por objeto una composición vacunal obtenida a partir de la secuencia ORF2 de la secuencia genómica y de las secuencias nucleotídicas que codifican para unos polipéptidos de circovirus MAP de tipo B. La invención comprende asimismo unas composiciones farmacéuticas, en particular vacunales, para la prevención y/o el tratamiento de infecciones víricas por circovirus MAP de tipo B.

Se ha descrito ampliamente la enfermedad del adelgazamiento del lechón (MAP) o también denominada decaimiento fatal del lechón (DFP) en América del Norte (Harding, J.C., 1997), y unos autores han relatado la existencia de una relación entre esta patología y la presencia de circovirus porcino (Daft, B. *et al.*, 1996; Clark, E.G., 1997; Harding, J.C., 1997; Harding, J.C. y Clark, E.G., 1997; Nayar, G.P. *et al.*, 1997). Ya se ha demostrado un circovirus porcino en unos cultivos celulares derivados del cerdo establecidos en línea e infectados crónicamente (Tischer, I., 1986, 1988, 1995; Dulac, G.C., 1989; Edwards, S., 1994; Allan, G.M., 1995 y McNeilly, F., 1996). Este virus, durante una infección experimental de lechones, no resultaba ser patógeno para el cerdo (Tischer, I., 1986, Horner, G.W., 1991) y se ha determinado y caracterizado su secuencia nucleotídica (Tischer, I., 1982; Meehan, B. M. *et al.*, 1997; Mankertz, A., 1997). El circovirus porcino, denominado virus PCV, pertenece al género circovirus de la familia de los circoviridae (Murphy, F.A. *et al.*, 1995) cuyo virión posee un ADN circular de tamaño comprendido entre 1,7 y 2,3 kb, ADN que comprende 3 marcos abiertos de lectura (ORF1 a ORF3), que codifica para una proteína de replicación REP implicada en la fase de iniciación y de terminación de la replicación circular desarrolladora (RCR) (Heyraud-Nitschke, F., *et al.*, 1995; Harding, M.R. *et al.*, 1993; Hanson, S.F. *et al.*, 1995; Fontes, E.P.B. *et al.*, 1994), que codifica para una proteína de cápside (Boulton, L.H. *et al.*, 1997; Hackland, A.F. *et al.*, 1994; Chu, P.W.G. *et al.*, 1993) y que codifica para una proteína no estructural denominada de diseminación (Lazarowitz, S.G. *et al.*, 1989).

Se puede citar asimismo el documento Meehan *et al.* (Journal of General Virology, vol. 79, nº 9, páginas 2171-2179, 1998) que describe el aislamiento de cuatro variantes de circovirus de tipo 2 (PCV2) a partir de cerdos que presentan el síndrome de la enfermedad del adelgazamiento del lechón. Este documento describe asimismo la secuencia genómica completa de estas cuatro variantes así como las secuencias peptídicas de cuatro ORF (ORF1, ORF2, ORF3 y ORF4) presentes en estos genomas.

Los autores de la presente invención han observado que las manifestaciones clínicas perceptibles en el cerdo y relacionadas con la infección por el circovirus MAP, están muy individualizadas. Estas manifestaciones aparecen en general en unos cerdos de 8 a 12 semanas de edad, destetados desde 4 a 8 semanas. Las primeras señales son la hipotonía sin que se llegue a hablar de postración. Rápidamente (48 horas) los flancos se ahuecan, se marca la línea de la espalda, los cerdos "blanquean". Estas señales se acompañan en general de hipertermia, de anorexia y lo más frecuentemente de manifestaciones respiratorias (tos, disnea, polipnea). Pueden aparecer asimismo unas diarreas transitorias. La fase de estado de la enfermedad tarda aproximadamente un mes al final del cual los porcentajes de mortalidad varían de 5 a 20%. A estas mortalidades conviene añadir una proporción variable (5-10%) de animales cadavéricos que ya no pueden presentar ningún futuro económico. Se debe observar que fuera de este estado crítico de fin de post-destetado, no aparece ninguna anomalía en las ganaderías. En particular, la función de reproducción se mantiene perfectamente.

En el plano epidemiológico, las primeras manifestaciones de esta patología han aparecido a principios de 1995 en el Este del departamento de las Côtes d'Armor en Francia, y las ganaderías afectadas se han acantonado sobre todo en esta zona del departamento. En diciembre de 1996, no se puede evaluar con precisión el número de ganaderías afectadas debido a la ausencia de un método de diagnóstico específico en laboratorio ni un dispositivo de epidemiovigilancia del ganado. Basándose en los hechos clínicos así como en los resultados de exámenes necrópsicos suministrados por los veterinarios, se puede estimar este número en varias decenas (80-100). La contagiosidad de la enfermedad es baja a moderada. Se han señalado unos casos fuera de la zona inicial y son el resultado en su mayoría de la transferencia de animales procedentes de ganaderías que conocen el problema. Sin embargo, una particularidad de la afección es su alta persistencia. Así, unas ganaderías afectadas desde hace un año están todavía afectadas a pesar de la aplicación masiva de terapéuticos. Las ganaderías con expresión clínica se reclutan en las diferentes categorías de especialización (crías-cebadores, post-destetados-cebadores) y diferentes estructuras económicas están afectadas. Por otro lado, los trastornos aparecen incluso en unas ganaderías en las que se respetan las reglas de zootecnia.

Se han realizado numerosos exámenes necrópsicos o bien en las ganaderías o bien en el laboratorio. Los elementos de la tabla relativa a las lesiones son disparatados. Las lesiones macroscópicas más constantes son la neumonía que se presenta a veces en cuadrícula, así como una hipertrofia de los ganglios linfáticos. Las demás lesiones se refieren sobre todo a las vísceras torácicas incluyendo en particular la pericarditis y la pleuresía. Pero se observan asimismo unas artritis y unas úlceras gástricas. Las lesiones reveladas en el examen histológico se sitúan esencialmente a nivel pulmonar (neumonía intersticial), ganglionar (depleción linfóide de los nudos linfáticos, células gigantes) y renal (glomerulonefritis, vascularitis). Los agentes infecciosos han sido objeto de amplias

investigaciones. Se ha podido excluir la intervención de los pestivirus y de la enfermedad de Aujeszky. Los trastornos aparecen en los ganados SDRP (Síndrome Disgénico y Respiratorio Porcino, infección relacionada con un arteriovirus) seropositivos, pero no se ha podido establecer la función de este último en la génesis de los trastornos (la mayoría de las ganaderías de Bretaña son SDRP seropositivas).

Los autores de la presente invención, con el objetivo de identificar el agente etiológico responsable de la MAP, han realizado unas pruebas de "contacto" entre lechones manifiestamente "enfermos" y unos cerdos EOPS (Exentos de Organismos Patógenos Específicos) del CNEVA (Centro Nacional de Estudios Veterinarios y Alimenticios, Francia). Estas pruebas han permitido observar el desarrollo en los animalarios protegidos de las manifestaciones comparables con las observadas en ganaderías. Las manifestaciones discretas tales como la hipertermia moderada, la anorexia y la diarrea intermitente, han aparecido después de una semana de contacto. Se debe observar que el virus SDRP únicamente se ha difundido posteriormente a las manifestaciones clínicas. Por otro lado, unas inoculaciones de triturados de órganos de animales enfermos a unos cerdos sanos ha permitido reproducir unas manifestaciones parecidas a las observadas en las ganaderías, con, sin embargo, una incidencia menos fuerte relacionada con las condiciones favorables de mantenimiento de los animales en las instalaciones experimentales.

Así, los autores de la presente invención han podido demostrar que las manifestaciones patológicas se presentan como una entidad bien definida que afecta al cerdo en un estadio particular de su crecimiento.

No se ha descrito nunca esta patología en Francia. Sin embargo, unas informaciones dispersas en particular canadienses relatan unos hechos parecidos.

Los trastornos no se pueden controlar mediante las terapias existentes.

Los datos recogidos tanto en ganaderías como en experimentaciones han permitido resaltar los siguientes puntos:

- la enfermedad MAP es transmisible pero su contagiosidad es poco elevada,
- su origen etiológico es de naturaleza infecciosa y probablemente vírica,
- la enfermedad MAP presenta un carácter persistente en las ganaderías afectadas.

Se desprenden de ello unas consecuencias económicas considerables para las ganaderías.

Así, una necesidad importante en la actualidad se refiere a un diagnóstico específico y sensible, de realización práctica y rápida, que permite la detección precoz de la infección. Se desea, por lo tanto, una prueba fiable, sensible y práctica, que permita la distinción entre las cepas de circovirus porcino (PCV).

Por otro lado, una necesidad de tratamiento eficaz, y bien tolerado de las infecciones por circovirus MAP sigue siendo asimismo deseado, al no estar disponible en la actualidad ninguna vacuna contra el circovirus MAP.

Tratándose del circovirus MAP, se necesitará probablemente comprender el papel de la defensa inmunitaria en la fisiología y la patología de la enfermedad para desarrollar unas vacunas satisfactorias.

Una información más amplia referente a la biología de estas cepas, sus interacciones con sus hospedantes, los fenómenos de infectividad asociados y los de escapatoria a las defensas inmunitarias del hospedante en particular, y por último su implicación en el desarrollo de las patologías asociadas, permitirá una mejor comprensión de estos mecanismos. Teniendo en cuenta lo anterior, y que muestra en particular las limitaciones de los medios de lucha contra la infección por el circovirus MAP, es por lo tanto primordial en la actualidad por un lado desarrollar unas herramientas moleculares, en particular a partir de un mejor conocimiento genético del circovirus MAP, pero también elaborar nuevos tratamientos preventivos y terapéuticos, nuevos métodos de diagnóstico y nuevas estrategias vacunales específicas, eficaces y toleradas. Esto constituye precisamente el objetivo de la presente invención.

Se describen en la presente memoria las secuencias nucleotídicas del genoma de circovirus MAP de secuencias SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, o uno de sus fragmentos.

Las secuencias nucleotídicas de secuencias SEC ID nº 1 y SEC ID nº 2 corresponden respectivamente a la secuencia genómica nucleotídica de la hebra de polaridad (+) y de la hebra de polaridad (-) del circovirus MAP de tipo A (o PCVA), estando la secuencia SEC ID nº 2 representada según la orientación 5' → 3'.

Las secuencias nucleotídicas de secuencias SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10 corresponden respectivamente a la secuencia genómica de la hebra de polaridad (+) y de la hebra de polaridad (-) del circovirus MAP de tipo B (PCVB), estando la secuencia SEC ID nº 10 representada según la orientación 5' → 3'.

Mediante la expresión "secuencia nucleotídica, polinucleótido o ácido nucleico" se entiende, según la presente invención, tanto un ADN bicatenario como monocatenario en unas formas monoméricas y diméricas (denominadas en tándem) como unos productos de transcripción de dichos ADN.

Las secuencias nucleotídicas SEC ID nº 1 y SEC ID nº 9 han sido obtenidas mediante secuenciación del genoma por el método de Sanger.

5 Mediante la expresión "fragmento de secuencia nucleotídica" se entenderá designar cualquier fragmento nucleotídico del circovirus MAP, de tipo A o B, de longitud de por lo menos 8 nucleótidos, preferentemente por lo menos 12 nucleótidos, y más preferentemente por lo menos 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia de la cual procede.

10 Mediante la expresión "fragmento específico de secuencia nucleotídica" se entenderá designar cualquier fragmento nucleotídico del circovirus MAP, de tipo A o B, que presenta, después de la alineación y de la comparación con los fragmentos correspondientes del circovirus porcino conocido, por lo menos un nucleótido o base de naturaleza diferente. Por ejemplo, los fragmentos nucleotídicos específicos de circovirus MAP de tipo A se pueden determinar fácilmente haciendo referencia a la figura 3 de la presente invención en la que se ponen en evidencia los nucleótidos o bases de la secuencia SEC ID nº 1 (circopordfp) que son de naturaleza diferente, después de la alineación de
15 dicha secuencia SEC ID nº 1 con las otras dos secuencias de circovirus porcino conocidas (circopormeeh y circopormank).

20 Mediante la expresión "secuencia nucleotídica homóloga" en el sentido de la presente invención, se entiende una secuencia nucleotídica que presenta por lo menos un porcentaje de identidad con las bases de una secuencia nucleotídica según la invención de por lo menos 80%, preferentemente 90% y 95%, siendo este porcentaje puramente estadístico y pudiendo las diferencias entre las dos secuencias nucleotídicas ser repartidas al azar y sobre toda su longitud.

25 Mediante la expresión "secuencia nucleotídica homóloga específica" en el sentido de la presente invención, se entiende una secuencia nucleotídica homóloga que presenta por lo menos una secuencia nucleotídica de fragmento específico, tal como se ha definido anteriormente. Dichas secuencias homólogas "específicas" pueden comprender, por ejemplo, las secuencias que corresponden a la secuencia genómica o a las secuencias de sus fragmentos representativos de variantes de circovirus MAP de tipo A o B. Así, estas secuencias homólogas específicas pueden corresponder a unas variaciones relacionadas con unas mutaciones en el seno de las cepas de circovirus MAP de
30 tipo A o B, y corresponder en particular a unos truncamientos, a unas sustituciones, a unas delecciones y/o a unas adiciones de por lo menos un nucleótido. Dichas secuencias homólogas pueden corresponder asimismo a unas variaciones relacionadas con la degeneración del código genético.

35 En la presente descripción, se entenderá designar mediante circovirus MAP, los circovirus asociados con la enfermedad del adelgazamiento del lechón (MAP) de tipo A (PCVA) o de tipo B (PCVB), definidos a continuación por su secuencia genómica, así como los circovirus cuyas secuencias nucleicas son homólogas a las secuencias de los circovirus MAP de tipo A o B, tales como en particular los circovirus que corresponden a unas variantes de tipo A o de tipo B.

40 Mediante la expresión "secuencia nucleotídica complementaria de una secuencia de la invención", se entiende cualquier ADN cuyos nucleótidos son complementarios de los de la secuencia de la invención, y cuya orientación está invertida (secuencia antiparalela).

45 Mediante la expresión "hibridación en unas condiciones de astringencia con una secuencia nucleotídica según la invención", se entiende una hibridación en unas condiciones de temperatura y de fuerza iónica elegidas de tal manera que permiten el mantenimiento de la hibridación entre dos fragmentos de ADN complementarios.

50 A título ilustrativo, unas condiciones de fuerte astringencia de la etapa de hibridación con el fin de definir los fragmentos nucleotídicos descritos anteriormente, son ventajosamente las siguientes.

La hibridación se realiza a una temperatura preferida de 65°C en presencia de tampón SSC, 1 x SSC que corresponde a 0,15 M de NaCl y 0,05 M de citrato de Na. Las etapas de lavado pueden ser por ejemplo las siguientes:

55 – 2 x SSC, a temperatura ambiente seguido de 2 lavados a 2 x SSC, 0,5% SDS a 65°C; 2 x 0,5 x SSC, 0,5% SDS; a 65°C durante 10 minutos cada uno.

60 Las condiciones de astringencia intermedia, usando por ejemplo una temperatura de 42°C en presencia de un tampón 2 x SSC, o de baja astringencia, por ejemplo una temperatura de 37°C en presencia de un tampón 2 x SSC, requieren respectivamente para la hibridación entre las dos secuencias una complementariedad globpor lo menos importante.

65 Las condiciones astringentes de hibridación descritas anteriormente para un polinucleótido de tamaño de aproximadamente 350 bases, serán adaptadas por el experto en la materia para unos oligonucleótidos de tamaño más grande o más pequeño, según las enseñanzas de Sambrook *et al*, 1989.

Se describen en la presente memoria unas secuencias nucleotídicas que se pueden utilizar asimismo como cebador o sonda en unos métodos que permiten obtener las secuencias homólogas, siendo estos métodos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la clonación y la secuenciación de ácido nucleotídico bien conocidos por el experto en la materia.

Se describen en la presente memoria unas secuencias nucleotídicas que corresponden a unos marcos abiertos de lectura, denominados secuencias ORF (ORF por "open reading frame"), y que codifican para unos polipéptidos, tales como, por ejemplo, las secuencias SEC ID nº 3 (ORF1), SEC ID nº 4 (ORF2) y SEC ID nº 5 (ORF3), determinadas a partir de la secuencia SEC ID nº 1 y de la secuencia SEC ID nº 2, o también las secuencias SEC ID nº 11 (ORF-1), SEC ID nº 12 (ORF'2) y SEC ID nº 13 (ORF'3), determinadas a partir de la secuencia SEC ID nº 9 y de la secuencia SEC ID nº 10.

Los fragmentos de secuencia nucleotídica se pueden obtener, por ejemplo, mediante amplificación específica, tal como la PCR, o después de la digestión mediante unas enzimas de restricción apropiadas de secuencias nucleotídicas; estos métodos se describen en particular en los trabajos de Sambrook *et al.*, 1989. Dichos fragmentos representativos se pueden obtener asimismo mediante síntesis química cuando su tamaño no es demasiado importante y según unos métodos bien conocidos por el experto en la materia.

Mediante la expresión "secuencia nucleotídica modificada" se entenderá cualquier secuencia nucleotídica obtenida mediante mutagénesis según unas técnicas bien conocidas por el experto en la materia, y que comprenden unas modificaciones con relación a las secuencias normales según la invención, por ejemplo unas mutaciones en las secuencias reguladoras y/o promotoras de la expresión de polipéptido, que conducen en particular a una modificación del porcentaje de expresión de dicho polipéptido o a una modulación del ciclo replicativo.

Mediante la expresión "secuencia nucleotídica modificada" se entenderá asimismo cualquier secuencia nucleotídica que codifica para un polipéptido modificado tal como se definirá a continuación.

Se describen asimismo unas secuencias nucleotídicas de circovirus MAP, caracterizadas porque se seleccionan de entre las secuencias SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, o uno de sus fragmentos.

En lo que se refiere a la homología con las secuencias nucleotídicas SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, o uno de sus fragmentos, se prefieren las secuencias homólogas, en particular específicas, que presentan un porcentaje de identidad con una de las secuencias SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, o uno de sus fragmentos de por lo menos 80%, preferentemente de 90% y de 95%. Dichas secuencias homólogas específicas pueden comprender, por ejemplo, las secuencias que corresponden a las secuencias ORF1, ORF2, ORF3, ORF'1, ORF'2 y ORF'3 de variante de circovirus MAP de tipo A o de tipo B. Estas secuencias homólogas específicas pueden corresponder de la misma manera a unas variaciones relacionadas con unas mutaciones en el seno de las cepas de circovirus MAP de tipo A o de tipo B, y corresponder en particular a unos truncamientos, unas sustituciones, unas delecciones y/o unas adiciones de por lo menos un nucleótido.

Se describen en la presente memoria los polipéptidos codificados por una secuencia nucleotídica según la invención, preferentemente un polipéptido cuya secuencia está representada por un fragmento, en particular específico, de una de las 6 secuencias de aminoácidos representadas en la figura 2, correspondiendo estas 6 secuencias de aminoácidos a los polipéptidos que pueden ser codificados según unos de los 3 marcos de lectura posibles de la secuencia SEC ID nº 1 o de la secuencia SEC ID nº 2, o un polipéptido cuya secuencia está representada por un fragmento, en particular específico, de una de las 6 secuencias de aminoácidos representadas en la figura 8, correspondiendo estas 6 secuencias de aminoácidos a los polipéptidos que pueden ser codificados según uno de los 3 marcos de lectura posibles de la secuencia SEC ID nº 9 o de la secuencia SEC ID nº 10.

Se describen asimismo en la presente memoria los polipéptidos caracterizados porque comprenden un polipéptido seleccionado de entre las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, o uno de sus fragmentos.

Se describen asimismo en la presente memoria los polipéptidos de secuencias de aminoácidos SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19 y SEC ID nº 20, siendo estos polipéptidos en particular capaces de reconocer de manera específica los anticuerpos producidos durante la infección por el circovirus MAP de tipo B. Estos polipéptidos presentan así unos epítomos específicos del circovirus MAP de tipo B y pueden, por lo tanto, ser usados en particular en el campo del diagnóstico o como agente inmunógeno para conferir una protección en el cerdo contra la infección por el circovirus MAP, en particular de tipo B.

En la presente descripción, los términos polipéptido, péptido y proteína son intercambiables.

Los polipéptidos descritos en la presente memoria no se refieren a los polipéptidos en forma natural, es decir, que no se recogen en su entorno natural sino que se han podido aislar u obtener mediante purificación a partir de fuentes

naturales, o bien obtenidos mediante recombinación genética, o también mediante síntesis química, y que pueden comprender entonces unos aminoácidos no naturales, tal como se describirá a continuación.

5 Mediante la expresión "fragmento polipéptido", se entiende designar un polipéptido que comprende como mínimo 5 aminoácidos, preferentemente 10 aminoácidos y 15 aminoácidos.

Mediante la expresión "fragmento específico de polipéptido", se entiende designar, en la presente invención, un fragmento de polipéptido codificado por una secuencia nucleotídica de fragmento específico.

10 Mediante la expresión "polipéptido homólogo" se entenderá designar los polipéptidos que presentan, con relación al polipéptido natural, ciertas modificaciones como en particular una delección, una adición o una sustitución de por lo menos un aminoácido, un truncamiento, un alargamiento, una fusión quimérica y/o una mutación. Entre los polipéptidos homólogos, se prefieren aquéllos cuya secuencia de aminoácidos presenta por lo menos 80%, preferentemente 90%, de homología con las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos.

15 Mediante la expresión "polipéptido homólogo específico" se entenderá designar los polipéptidos homólogos tales como se han definido anteriormente y que presentan un fragmento específico de polipéptido.

20 En el caso de una sustitución, se sustituyen uno o varios aminoácidos consecutivos o no consecutivos por unos aminoácidos "equivalentes". La expresión aminoácido "equivalente" tiende aquí a designar cualquier aminoácido susceptible de ser sustituido con uno de los aminoácidos de la estructura de base sin modificar sin embargo esencialmente las actividades biológicas de los péptidos correspondientes y tales como se definirán a continuación.

25 Estos aminoácidos equivalentes pueden ser determinados o bien apoyándose en su homología de estructura con los aminoácidos con los que se sustituyen, o bien en unos resultados de ensayos comparativos de actividad biológica entre los diferentes polipéptidos susceptibles de ser efectuados.

30 A título de ejemplo, se mencionarán las posibilidades de sustituciones susceptibles de ser efectuadas sin que resulte de ello ninguna modificación profunda de la actividad biológica de los polipéptidos modificados correspondientes, las sustituciones, por ejemplo, de la leucina por la valina o la isoleucina, del ácido aspártico por el ácido glutámico, de la glutamina por la asparagina, de la arginina por la lisina, etc., siendo las sustituciones inversas naturalmente factibles en las mismas condiciones.

35 Los polipéptidos homólogos específicos corresponden asimismo a los polipéptidos codificados por las secuencias nucleotídicas homólogas específicas tales como se han definido anteriormente y comprenden así en la presente definición los polipéptidos mutados o que corresponden a unas variantes, que pueden existir en circovirus MAP, y que corresponden en particular a unos truncamientos, unas sustituciones, unas delecciones y/o unas adiciones de por lo menos un residuo de aminoácido.

40 Mediante la expresión "fragmento específico biológicamente activo de un polipéptido", se entenderá designar en particular un fragmento específico de polipéptido, tal como se ha definido anteriormente, que presenta por lo menos una de las características de los polipéptidos, en particular porque es:

- 45 – capaz de inducir una reacción de inmunogenicidad dirigida contra un circovirus MAP; y/o
- capaz de ser reconocido por un anticuerpo específico de un polipéptido según la invención; y/o
- capaz de unirse a un polipéptido o a una secuencia nucleotídica de circovirus MAP; y/o
- 50 – capaz de ejercer una actividad fisiológica, incluso parcial, tal como, por ejemplo, una actividad de diseminación o estructural (cápside); y/o
- capaz de modular, inducir o inhibir la expresión de gen de circovirus MAP o una de sus variantes, y/o capaz de modular el ciclo de replicación de circovirus MAP en la célula y/o el organismo hospedante.

55 Los fragmentos de polipéptido pueden corresponder a unos fragmentos aislados o purificados naturalmente presentes en un circovirus MAP o corresponder a unos fragmentos que se pueden obtener mediante escisión de dicho polipéptido por una enzima proteolítica tal como la tripsina o la quimiotripsina o la collagenasa, o mediante un reactivo químico, tal como el bromuro de cianógeno (CNBr) o también disponiendo dicho polipéptido en un entorno muy ácido, por ejemplo a pH 2,5. Dichos fragmentos polipeptídicos se puede preparar asimismo indiferentemente mediante síntesis química, a partir de hospedantes transformados por un vector de expresión según la invención que contienen un ácido nucleico que permite la expresión de dichos fragmentos, dispuesto bajo el control de los elementos de regulación y/o de expresión apropiados.

65 Mediante la expresión "polipéptido modificado" de un polipéptido, se entiende designar un polipéptido obtenido

mediante recombinación genética o mediante síntesis química tal como se describirá a continuación, que presenta por lo menos una modificación con relación a la secuencia normal. Estas modificaciones podrán apoyarse asimismo sobre unos aminoácidos en el origen de una especificidad, de la patología y/o de virulencia, o en el origen de la conformación estructural, y de la capacidad de inserción membranaria del polipéptido según la invención. Así, se podrán crear unos polipéptidos de actividad equivalente, aumentada o disminuida, y de especificidad equivalente, más estrecha, o más ancha. Entre los polipéptidos modificados, se deben citar los polipéptidos en los que se pueden modificar hasta 5 aminoácidos, truncados en el extremo N- o C-terminal, o bien delecionados, o bien añadidos.

Tal como se indica, las modificaciones del polipéptido tendrán como objetivo en particular:

- hacer que sea capaz de modular, inhibir o inducir la expresión de gen de circovirus MAP y/o capaz de modular el ciclo de replicación de circovirus MAP en la célula y/o el organismo hospedante,
- permitir su incorporación en unas composiciones vacunales,
- modificar su biodisponibilidad como compuesto de uso terapéutico.

Los métodos que permiten demostrar dichas modulaciones sobre unas células eucariotas o procariotas son bien conocidos por el experto en la materia. Se entiende asimismo que las secuencias nucleotídicas que codifican para dichos polipéptidos modificados se podrán usar para dichas modulaciones, por ejemplo por medio de vectores según la invención y descritos a continuación, con el fin, por ejemplo, de prevenir o tratar las patologías relacionadas con la infección.

Los polipéptidos modificados anteriores se pueden obtener usando la química combinatoria, en la que es posible hacer variar sistemáticamente unas partes de polipéptido antes de ensayarlas sobre unos modelos, cultivos celulares o microorganismos por ejemplo, para seleccionar los compuestos más activos o que presentan las propiedades buscadas.

La síntesis química presenta asimismo la ventaja de poder usar:

- unos aminoácidos no naturales, o
- unas uniones no peptídicas.

Así, con el fin de mejorar la duración de vida de los polipéptidos según la invención, podrá ser interesante usar unos aminoácidos no naturales, por ejemplo en forma D, o bien unos análogos de aminoácidos, en particular unas formas azufradas por ejemplo.

Por último, la estructura de los polipéptidos según la invención, sus formas homólogas específicas o modificadas, se podrá integrar en unas estructuras químicas de tipo polipeptídica u otras. Así, puede ser interesante prever en los extremos N y C-terminales unos compuestos no reconocidos por las proteasas.

Se describe en la presente memoria un vector para la clonación y/o la expresión de una secuencia, caracterizado porque contiene una secuencia nucleotídica tal como se describe en la invención.

Los vectores, caracterizados porque comprenden los elementos que permiten la expresión y/o la secreción de dichas secuencias nucleotídicas en una célula hospedante se describen asimismo en la presente memoria.

El vector debe entonces comprender un promotor, unas señales de iniciación y de terminación de la traducción, así como unas regiones apropiadas de regulación de la transcripción. Debe poder ser mantenido de manera estable en la célula hospedante y puede eventualmente poseer unas señales particulares que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos diferentes elementos se eligen en función del hospedante celular usado. Con este fin, las secuencias nucleotídicas según la invención se pueden insertar en unos vectores de replicación autónoma en el seno del hospedante elegido, o en unos vectores integradores del hospedante elegido.

Dichos vectores se prepararán según los métodos usados habitualmente por el experto en la materia, y los clones resultantes se podrán introducir en un hospedante apropiado mediante unos métodos estándares, tales como, por ejemplo, la lipofección, la electroporación, el choque térmico.

Estos vectores son, por ejemplo, unos vectores de origen plasmídico o vírico.

Un vector preferido para la expresión de los polipéptidos de la invención es el baculovirus.

Se puede citar asimismo el vector pBS KS en el que se inserta la secuencia de ADN en tándem del circovirus MAP de tipo A (o DFP), tal como el depositado en la CNCM el 3 de julio de 1997, con el número 1-1891.

Estos vectores son útiles para transformar unas células hospedantes con el fin de clonar o expresar las secuencias nucleotídicas.

Se describen asimismo en la presente memoria las células hospedantes transformadas por un vector.

Estas células se pueden obtener mediante la introducción en unas células hospedantes de una secuencia nucleotídica insertada en un vector tal como se ha definido anteriormente, y después el cultivo de dichas células en unas condiciones que permiten la replicación y/o la expresión de la secuencia nucleotídica transfectada.

El hospedante celular se puede seleccionar de entre unos sistemas procariotas o eucariotas, tal como, por ejemplo, las células bacterianas (Olins y Lee, 1993), pero también las células de levadura (Buckholz, 1993), al igual que las células animales, en particular los cultivos de células de mamíferos (Edwards y Aruffo, 1993), y en particular las células de ovario de hámster chino (CHO), pero también las células de insectos en las que se pueden usar unos procedimientos que usan unos baculovirus por ejemplo (Luckow, 1993).

Una célula hospedante para la expresión de las proteínas está constituida por las células de insectos sf9.

Se puede citar asimismo *E. coli*, tal como está depositado en la CNCM el 3 de julio de 1997, con el número I-1891.

Se describen asimismo en la presente memoria los animales que comprenden una de dichas células transformadas.

La obtención de animales transgénicos que sobreexpresan uno o varios genes de circovirus MAP o parte de genes se realizará de manera preferida sobre unas ratas, unos ratones o unos conejos según unos métodos bien conocidos por el experto en la materia, tales como mediante transfecciones, víricas o no víricas. Los animales transgénicos que sobreexpresan uno o varios de dichos genes se podrán obtener mediante la transfección de copias múltiples de dichos genes bajo el control de un potente promotor de naturaleza ubicua, o selectivo de un tipo de tejido. Los animales transgénicos se podrán obtener asimismo mediante recombinación homóloga sobre células cepas embrionarias, transferencia de estas células cepas a unos embriones, selección de las quimeras afectadas a nivel de las líneas reproductoras, y crecimiento de dichas quimeras.

Las células transformadas así como los animales transgénicos se pueden utilizar en unos procedimientos de preparación de polipéptido recombinante.

En la actualidad es posible producir unos polipéptidos recombinantes en cantidad relativamente importante mediante ingeniería genética usando las células transformadas por unos vectores de expresión o usando unos animales transgénicos.

Se describen en la presente memoria unos procedimientos de preparación de un polipéptido en forma recombinante, caracterizados porque usan un vector y/o una célula transformada por un vector y/o un animal transgénico que comprende una de dichas células transformadas.

Entre dichos procedimientos de preparación de un polipéptido en forma recombinante, se pueden citar en particular los procedimientos de preparación que usan un vector y/o una célula transformada por dicho vector y/o un animal transgénico que comprende una de dichas células transformadas, que contiene una secuencia nucleotídica según la invención que codifica para un polipéptido de circovirus MAP.

Los polipéptidos recombinantes obtenidos como se ha indicado anteriormente, se pueden presentar tanto en forma glucosilada como no glucosilada, y pueden presentar o no la estructura terciaria natural.

Una variante preferida consiste en producir un polipéptido recombinante fusionado con una proteína "portadora" (proteína quimera). La ventaja de este sistema es que permite una estabilización y una disminución de la proteólisis del producto recombinante, un aumento de la solubilidad durante la renaturalización *in vitro* y/o una simplificación de la purificación cuando la pareja de fusión posee una afinidad para un ligando específico.

Más particularmente, se describe un procedimiento de preparación de un polipéptido que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar las células transformadas en unas condiciones que permiten la expresión de un polipéptido recombinante de secuencia nucleotídica;
- b) llegado el caso, recuperar dicho polipéptido recombinante.

Cuando el procedimiento de preparación de un polipéptido usa un animal transgénico, el polipéptido recombinante se extrae a continuación de dicho animal.

Por ejemplo, se recurrirá a la técnica de síntesis en disolución homogénea descrita por Houbenweyl en 1974.

Este método de síntesis consiste en condensar sucesivamente de dos en dos los aminoácidos sucesivos en el orden requerido, o en condensar unos aminoácidos y unos fragmentos previamente formados y que contienen ya varios aminoácidos en el orden apropiado, o también varios fragmentos previamente preparados así, entendiéndose que se

5 habrá tenido el cuidado de proteger previamente todas las funciones reactivas contenidas por estos aminoácidos o fragmentos, con la excepción de las funciones aminas de uno y carboxilos del otro o viceversa, que deben intervenir normalmente en la formación de las uniones peptídicas, en particular después de la activación de la función carboxilo, según los métodos bien conocidos en la síntesis de los péptidos.

10 Según otra técnica, se recurre a la descrita por Merrifield.

Para fabricar una cadena peptídica según el procedimiento de Merrifield, se recurre a una resina polímera muy porosa, sobre la cual se fija el primer aminoácido C-terminal de la cadena. Este aminoácido se fija sobre una resina por medio de su grupo carboxílico y se protege su función amina. Así se fijan, unos detrás de otros, los aminoácidos

15 que constituirán la cadena peptídica sobre el grupo amina cada vez desprotegido previamente de la porción de la cadena peptídica ya formada, y que está ligada a la resina. Cuando la totalidad de la cadena peptídica deseada está formada, se eliminan los grupos protectores de los diferentes aminoácidos que constituyen la cadena peptídica y se suelta el péptido de la resina con la ayuda de un ácido.

20 Se describe asimismo en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado de entre los compuestos descritos anteriormente, tal como:

- a) una secuencia nucleotídica;
- b) un polipéptido;
- 25 c) un vector, una partícula vírica o una célula transformada;
- d) un anticuerpo; o

eventualmente en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, llegado el caso, con uno o varios adyuvantes de inmunidad apropiados.

30 La invención tiene por objeto un compuesto para su uso como vacuna, caracterizado porque dicho compuesto es seleccionado de entre los siguientes compuestos:

- a) una secuencia nucleotídica;
- 35 b) un polipéptido;

y tal como se formula en las reivindicaciones 1 a 9 siguientes.

40 Se describe además una composición inmunógena y/o vacunal, caracterizada porque comprende por lo menos uno de los siguientes compuestos:

- una secuencia nucleotídica SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, o uno de sus fragmentos;
- un polipéptido de secuencia SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, o uno de sus fragmentos;
- 45 - un vector o una partícula vírica, particularmente un vector o una partícula vírica que comprende una secuencia nucleotídica SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, o uno de sus fragmentos;
- una célula, particularmente una célula transformada capaz de expresar un polipéptido de secuencias SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, o uno de sus fragmentos; o
- 50 - una mezcla de por lo menos dos de dichos compuestos.

55 Se describe asimismo una composición inmunógena y/o vacunal según la invención, caracterizada porque comprende dicha mezcla de por lo menos dos de dichos compuestos como producto de combinación para un uso simultáneo, separado o espaciado en el tiempo para la prevención o el tratamiento de infecciones por un circovirus MAP, en particular de tipo B.

60 En un modo de realización, la composición vacunal descrita en la presente memoria comprende la mezcla de los siguientes compuestos:

- un plásmido pcDNA3 que contiene un ácido nucleico de secuencia SEC ID nº 11;
- un plásmido pcDNA3 que contiene un ácido nucleico de secuencia SEC ID nº 12;
- 65 - un plásmido pcDNA3 que contiene un ácido nucleico que codifica para la proteína GM-CSF;

- un baculovirus recombinante que contiene un ácido nucleico de secuencia SEC ID nº 11;
- un baculovirus recombinante que contiene un ácido nucleico de secuencia SEC ID nº 12; y
- llegado el caso, un adyuvante de la inmunidad apropiado, en particular el adyuvante AIFTM.

Se describe asimismo en la presente memoria una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de una infección por un circovirus MAP de tipo B.

Se describe asimismo el uso de una composición para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de una infección por un circovirus MAP de tipo B.

En el cerdo, tal como en el ratón, en los que se administra una dosis ponderal de la composición vacunal comparable con la dosis usada en el ser humano, la reacción de anticuerpos se ensaya mediante la extracción del suero seguido por un estudio de formación de un complejo entre los anticuerpos presentes en el suero y el antígeno de la composición vacunal, según las técnicas habituales.

Las composiciones farmacéuticas contendrán una cantidad eficaz de los compuestos de la invención, es decir, en cantidad suficiente de dicho o de dichos compuestos que permite obtener el efecto deseado, tal como por ejemplo la modulación de la replicación celular de circovirus MAP. El experto en la materia sabrá determinar esta cantidad, en función por ejemplo de la edad y del peso del individuo a tratar, del estado de desarrollo de la patología, de los efectos secundarios eventuales y por medio de un ensayo de evaluación de los efectos obtenidos sobre una muestra de población, siendo estos ensayos conocidos en estos campos de aplicaciones.

Dichas composiciones vacunales estarán preferentemente en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, llegado el caso, con uno o varios adyuvantes de la inmunidad apropiados.

En la actualidad, diversos tipos de vacunas están disponibles para proteger el animal o el ser humano contra unas enfermedades infecciosas: microorganismos vivos atenuados (*M. bovis* - BSG para la tuberculosis), microorganismos desactivados (virus de la gripe), unos extractos acelulares (*Bordetella pertussis* para la tos ferina), proteínas recombinadas (antígeno de superficie del virus de la hepatitis B), unos poliósidos (neumococos). Unas vacunas preparadas a partir de péptidos de síntesis o de microorganismos genéticamente modificados que expresan unos antígenos heterólogos están en curso de experimentación. Más recientemente todavía, se han propuesto unos ADN plasmídicos recombinados que comprenden unos genes que codifican para unos antígenos protectores como estrategia vacunal alternativa. Este tipo de vacunación se realiza con un plásmido particular que se deriva de un plásmido de *E. coli* que no se replica *in vivo* y que codifica únicamente para la proteína vacunante. Se han inmunizado unos animales inyectando simplemente el ADN plasmídico desnudo en el músculo. Esta técnica conduce a la expresión de la proteína vacunal *in situ* y a una respuesta inmunitaria de tipo celular (CTL) y de tipo humoral (anticuerpo). Esta doble inducción de la respuesta inmunitaria es una de las principales ventajas de la técnica de vacunación con ADN desnudo.

Las composiciones vacunales que comprenden unas secuencias nucleotídicas o unos vectores en los que se insertan dichas secuencias, se describen en particular en la solicitud internacional WO 90/11092 y asimismo en la solicitud internacional WO 95/11307.

La secuencia nucleotídica constitutiva de la composición vacunal se puede inyectar al hospedante después de haber sido acoplada a unos compuestos que favorecen la penetración de este polinucleótido en el interior de la célula o su transporte hasta el núcleo celular. Los conjugados resultantes se pueden encapsular en unas micropartículas polímeras, tal como se describe en la solicitud internacional WO 94/27238 (Medisorb Technologies International).

Según otro modo de realización de la composición vacunal, la secuencia nucleotídica, preferentemente un ADN, se compleja con un DEAE-dextrano (Pagano *et al.*, 1967) o con unas proteínas nucleares (Kaneda *et al.*, 1989), con unos lípidos (Felgner *et al.*, 1987) o se encapsula en unos liposomas (Fraleigh *et al.*, 1980) o también se introduce en forma de un gel que facilita su transfección en las células (Midoux *et al.*, 1993, Pastore *et al.*, 1994). El polinucleótido o el vector según la invención puede estar asimismo en suspensión en una disolución tampón o estar asociado con unos liposomas.

Ventajosamente, dicha vacuna se preparará según la técnica descrita por Tacson *et al.* O Huygen *et al.* en 1996 o también según la técnica descrita por Davis *et al.* en la solicitud internacional WO 95/11307.

Dicha vacuna se puede preparar asimismo en forma de una composición que contiene un vector, dispuesta bajo el control de elementos de regulación que permiten su expresión en el ser humano o en el animal. Se podrá usar, por ejemplo, como vector de expresión *in vivo* del antígeno polipeptídico de interés, el plásmido pcDNA3 o el plásmido pcDNA1/neo, ambos comercializados por Invitrogen (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido). También se puede usar el plásmido VJns.tPA, descrito por Shiver *et al.* en 1995. Dicha vacuna comprenderá ventajosamente, además del

vector recombinante, una disolución salina, por ejemplo una disolución de cloruro de sodio.

Mediante la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable”, se entiende designar un compuesto o una combinación de compuestos que entran en una composición farmacéutica o vacunal que no provoca reacciones secundarias y que permite, por ejemplo, facilitar la administración del compuesto activo, el aumento de su duración de vida y/o de su eficacia en el organismo, el aumento de su solubilidad en disolución o también la mejora de su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y serán adaptados por el experto en la materia en función de la naturaleza y del modo de administración del compuesto activo elegido.

En lo que se refiere a las formulaciones vacunales, éstas pueden comprender unos adyuvantes de la inmunidad apropiados que son conocidos por el experto en la materia, como por ejemplo el hidróxido de aluminio, un representante de la familia de los péptidos muramilo como de los derivados peptídicos del N-acetil-muramilo, un lisado bacteriano, o también el adyuvante incompleto de Freund.

Estos compuestos se pueden administrar por vía sistémica, en particular por vía intravenosa, por vía intramuscular, intradérmica o sub-cutánea, o por vía oral. De manera más preferida, la composición vacunal que comprende unos polipéptidos según la invención, se administrará por vía intramuscular, a través de la alimentación o mediante vaporización en varias veces, de manera espaciada en el tiempo.

Sus modos de administración, posologías y formas galénicas óptimas se pueden determinar según los criterios tenidos en cuenta generalmente en el establecimiento de un tratamiento adaptado a un animal como, por ejemplo, la edad o el peso, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios constatados.

Otras características y ventajas de la invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de los ejemplos y de las figuras siguientes:

Leyenda de las figuras

Figura 1: Esquema experimental que ha permitido llegar al aislamiento y a la identificación del circovirus asociado con el MAP de tipo A o B.

Ensayo 1: reproducción experimental del MAP mediante inoculación de triturados de órganos de cerdos de ganaderías que padecen MAP.

Ensayo 2: reproducción experimental del MAP.

Ensayo 3: reproducción experimental del MAP.

Ensayo 4: ninguna reproducción experimental del MAP.

Figura 2: Organización del genoma de circovirus asociado con el MAP de tipo A (PCVA)

- hebra de polaridad (+) (SEC ID nº 1);
- hebra de polaridad (-) (SEC ID nº 2, representada según la orientación 3' → 5');
- secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por las dos hebras de ADN en los tres marcos de lectura posibles.

Figura 3: Alineación de la secuencia nucleotídica SEC ID nº 1 del circovirus MAP de tipo A (PCVA) y de los circovirus cepa MEEHAN y cepa MANKERTZ de las líneas celulares porcinas.

Figura 4: Alineación de la secuencia de aminoácidos SEC ID Nº 6 de polipéptido codificado por la secuencia nucleotídica SEC ID nº 3 (ORF1) del circovirus MAP de tipo A (PCVA) y de las secuencias nucleotídicas correspondientes de los circovirus cepa MEEHAN y cepa MANKERTZ de las líneas celulares porcinas.

Figura 5: Alineación de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7 de polipéptido codificado por la secuencia nucleotídica SEC ID nº 4 (ORF2) del circovirus MAP de tipo A (PCVA) y de las secuencias nucleotídicas correspondientes de los circovirus cepa MEEHAN y cepa MANKERTZ de las líneas celulares porcinas.

Figura 6: Alineación de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8 de polipéptido codificado por la secuencia nucleotídica SEC ID nº 5 (ORF3) del circovirus MAP de tipo A (PCVA) y de las secuencias nucleotídicas correspondientes de los circovirus cepa MEEHAN y cepa MANKERTZ de las líneas celulares porcinas.

Figura 7: Análisis mediante transferencia Western de las proteínas recombinantes del circovirus MAP de tipo A (PCVA). Los análisis se han realizado sobre unos extractos celulares de células Sf9 obtenidos después de la infección por el baculovirus recombinante PCV ORF1.

Figura 8: Organización del genoma del circovirus asociado a MAP de tipo B (PCVB)

- hebra de polaridad (+) (SEC ID nº 9);
- hebra de polaridad (-) (SEC ID nº 10, representada según la orientación 3' → 5');
 - secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por las dos hebras de ADN en los tres marcos de lectura posibles.

Figura 9: Evolución de la ganancia media diaria (GMQ) de cerdos de ganaderías que padecen la enfermedad de adelgazamiento del lechón (MAP o DFP), puestos en las condiciones experimentales.

Figura 10: GMQ comparada para los 3 lotes de cerdos (F1, F3 y F4) calculada sobre un periodo de 28 días después del ensayo de vacunación.

Figura 11: Hipertermia superior a 41°C, expresada en porcentaje comparado para los 3 lotes de cerdos (F1, F3 y F4) calculada sobre un periodo de 28 días después del ensayo de vacunación.

Figura 12: Membranas de los puntos peptídicos que corresponden a los ORF2 reveladas con la ayuda de un suero de cerdo infectado, procedente de una ganadería convencional.

Los números de péptidos específicos del circovirus de tipo B así como sus homólogos no reactivos (tipo A) se indican en negrita.

Los péptidos inmunógenos no específicos se indican en cursiva.

Figura 13: Alineación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por el ORF2 del circovirus MAP de tipo A y por el ORF2 del circovirus MAP de tipo B. La posición de 4 péptidos que corresponden a unos epítomos específicos del circovirus MAP de tipo B se indica sobre la secuencia correspondiente en trazo en negrita, su homólogo sobre la secuencia del circovirus MAP de tipo A se indica asimismo mediante un trazo simple.

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación, secuenciación y caracterización del circovirus MAP de tipo A (PCVA)

1 - Procedimientos experimentales

Reproducción experimental de la infección y de su síndrome (véase la figura 1).

Se ha efectuado un primer ensayo con unos cerdos procedentes de una ganadería muy bien atendida, pero afectada por la enfermedad del adelgazamiento del lechón (MAP) o denominada asimismo DFP (Decaimiento fatal del lechón). Unas pruebas de contacto con unos cerdos EOPS (exento de organismos patógenos específicos) han mostrado una transferencia de contaminante(s) que se traduce por una patología compleja que asocia la hipertermia, la disminución del crecimiento, diarrea y conjuntivitis. El virus SDRP (síndrome disgenésico y respiratorio porcino, enfermedad infecciosa debida a un arterivirus) se ha aislado rápidamente a partir de los cerdos de ganadería y de los cerdos de contacto. El conjunto de las señales clínicas podría haber sido atribuido a la presencia del virus SDRP. Sin embargo, dos cerdos de ganadería han presentado unas señales de DFP sin que el virus SDRP haya sido aislado. Los análisis histológicos y las fórmulas sanguíneas han mostrado, sin embargo, que estos cerdos padecían un proceso infeccioso de origen viral.

En un segundo ensayo, se han inoculado unos cerdos EOPS de 8 semanas por vía intra-traqueal con los triturados de órganos procedentes de dos cerdos de ganaderías que padecen DFP. Los cerdos inoculados han presentado hipertermia 8 a 9 días post-infección, y después su crecimiento se ha ralentizado. Otros cerdos EOPS, puestos en contacto, han presentado unas señales similares, atenuadas, 30 días después de la prueba inicial. No se ha observado ninguna seroconversión frente a una cepa europea o canadiense de virus SDRP en estos animales.

Un tercer ensayo ha permitido reproducir el síndrome a partir de extracciones efectuadas sobre los cerdos del segundo ensayo.

Conclusión

El síndrome se reproduce en las condiciones experimentales, y se determina mediante por lo menos un agente infeccioso, transmisible por contacto directo. Las constantes clínicas son una hipertermia a veces elevada (superior o igual a 41,5°C) que se desarrolla 8 a 10 días después de la infección. Se puede observar una disminución del crecimiento. Las demás manifestaciones son una inversión de la fórmula sanguínea (inversión de la relación linfocito/polinuclear de 70/30 a 30/70) y unas lesiones frecuentes sobre los ganglios, en particular los que drenan el aparato respiratorio (hipertrofia ganglionar, pérdida de estructura con necrosis e infiltración por unas células mononucleadas o polinucleadas gigantes).

2 - Estudios en laboratorio

Se han usado diversos soportes celulares que incluyen unas células de riñón de cerdo primarias o en línea, unas células de testículo de cerdo, unas células de riñón de monos, unos linfocitos de cerdo, unos macrófagos alveolares de cerdos, unos monocitos de la sangre circulante, para demostrar la presencia eventual de un virus. No se ha demostrado ningún efecto citopático sobre estas células. En cambio, el uso de un suero de cerdo enfermo después de la infección experimental ha permitido revelar un antígeno intracelular en los monocitos, los macrófagos y aproximadamente 10% de las células de riñón de cerdo (RP) infectadas con los triturados de órgano. Esta revelación indirecta ha sido realizada en cinética en diferentes momentos de cultivo. De ello se desprende que el antígeno aparece inicialmente en el núcleo de las células infectadas antes de expandirse en el citoplasma. Los pasos sucesivos en cultivo celular no han permitido amplificar la señal.

En microscopia electrónica sobre unos triturados de órganos, se han visualizado unas partículas esféricas marcadas específicamente por el suero de cerdos enfermos, infectados en las condiciones experimentales. El tamaño de estas partículas se estima en 20 nm.

Después de dos pasos de estos triturados de órganos sobre unos linfocitos de cerdo y después de tres pasos sobre células de riñón o de testículo de cerdo, se ha desarrollado y amplificado un efecto citopático. En el microscopio electrónico se ha visualizado un adenovirus que, en las condiciones experimentales, no ha reproducido el DFP (se observa sólo un pico de hipertermia 24 a 48 horas después de la infección, y después nada más).

Se han podido demostrar unas bandas de ADN en ciertas extracciones de cerdos infectados en las condiciones experimentales y que han presentado unas señales de la enfermedad (resultados no representados). Existe una cierta correspondencia entre las extracciones que dan un resultado positivo en cultivo celular y los que presentan una banda de ADN.

Conclusión

Por lo menos dos tipos de virus se han demostrado en los triturados de órganos procedentes de cerdos enfermos de DFP. Uno es un adenovirus, pero no reproduce por sí mismo la enfermedad. El otro tipo de virus es un circovirus y está asociado al DFP. Este circovirus, del cual se han aislado y secuenciado dos tipos, denominados a continuación circovirus MAP de tipo A (o PCVA) y circovirus MAP de tipo B (o PCVB) presentan unas mutaciones con relación a las secuencias conocidas de circovirus no patógenas para el cerdo.

3 - Clonación y secuenciación del ADN de circovirus MAP de tipo A

Extracción del ADN forma replicativa (RF), escisión por la enzima Kpn I y amplificación mediante un par de cebadores que flanquean el sitio de restricción Kpn I. Secuenciación de las dos hebras por lo menos dos veces mediante el método de Sanger.

La secuencia nucleica de la hebra de polaridad (+) del genoma de circovirus MAP de tipo A (o PCVA), cepa DFP, está representada por la secuencia SEC ID nº 1 en el listado de las secuencias, estando la secuencia nucleica de la hebra de polaridad (-) del genoma del circovirus MAP de tipo A (o PCVA) representada por la secuencia nucleica 3' → 5' de la figura 3 o por la secuencia SEC ID nº 2 (representada según la orientación 5' → 3') en el listado de secuencias.

Las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 6, SEC ID nº 7 y SEC ID nº 8 del listado de secuencias representan respectivamente las secuencias de las proteínas codificadas por las secuencias nucleicas de los 3 marcos abiertos de lectura SEC ID nº 3 (ORF1), que corresponde a la proteína REP, SEC ID nº 4 (ORF2) y SEC ID nº 5 (ORF3), determinadas a partir de la secuencia SEC ID nº 1 de la hebra de polaridad (+) o de la secuencia nucleica SEC ID nº 2 de la hebra de polaridad (-) del genoma del circovirus MAP de tipo A.

4 - Comparación de las secuencias nucleotídicas y de los aminoácidos del circovirus MAP de tipo A (o asociado a MAP) obtenidas con las secuencias correspondientes de circovirus MEEHAN y MANKERTZ de líneas celulares porcinas

Uso del programa de análisis de secuencia de ADN, DNASIS.

Secuencia de los oligonucleótidos usados como cebadores o sondas en los procedimientos de detección y/o de identificación

1. detección específica del circovirus MAP de tipo A:

cebador PCV5: 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';
cebador PCV10: 5' TGG AAT GTT AAC GAG CTG AG 3';

2. detección específica del circovirus de las líneas celulares:

cebador PCV5: 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';
cebador MEE1: 5' TGG AAT GTT AAC TAC ATC AA 3';

3. detección diferencial:

los pares de cebadores usados son los descritos por ejemplo en los párrafos 1 y 2 anteriores;

4. detección de las formas replicativas RF (replicative forms) circulares monoméricas:

cebador PCV5: 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';
cebador PCV6: 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3';

5. detección de los vectores que comprenden los dímeros en tándem:

dímero Nar:

cebador KS 620: 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3';
cebador PCV5: 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3';

dímero Kpn:

cebador KS 620: 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3';
cebador PCV 6: 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3';

6. detección diferencial:

los pares de cebadores usados son los descritos, por ejemplo, en los párrafos 4 y 5 anteriores.

Los procedimientos que usan los pares de cebadores descritos en los párrafos 4 y 5 son particularmente interesantes para detectar de manera diferencial las formas monoméricas circulares de formas replicativas específicas del virión o del ADN en replicación y las formas diméricas encontradas en las construcciones moleculares denominadas en tándem.

Las construcciones en tándem del genoma viral (dímeros) tales como las construcciones usadas para la preparación del vector pBS KS+ Tándem PCV Kpn 1, depositado en la CNCM con el número I-1891, el 3 de julio de 1997 (*E. coli* transformado por dicho vector) son muy interesantes para su uso en unos métodos de producción en cantidad suficiente de un inóculo constituido por ADN, destinado a la producción de virus, y esto en ausencia de protocolo satisfactorio de producción de virus en sistema celular. Dichos métodos de producción que usan estas construcciones en tándem del genoma vírico permitirán estudiar mediante mutación los factores de virulencia y por consiguiente, se podrán usar para la fabricación de una colección de virus que comprenden las mutaciones indicadas en la construcción de los vectores que presentarán el tropismo y la virulencia apropiados. Estos vectores con estructura autorreplicativa presentan unas propiedades buscadas en transferencia de genes, en particular para sus aplicaciones en terapia génica, y en vacunología.

Análisis mediante transferencia Western de las proteínas recombinantes del circovirus MAP de tipo A

Los resultados han sido obtenidos usando un antisuero específico del circovirus MAP producido durante el ensayo 1 (véase la figura 1).

Tipo de productos analizados

Se han realizado los análisis sobre unos extractos celulares de células Sf9 obtenidos después de la infección por el baculovirus recombinante PCV ORF 1.

El cultivo de las células Sf9 se ha realizado en caja de Petri de 25 cm² según los métodos de cultivo estándares para estas células. Después de la centrifugación, los residuos celulares se recogen mediante 300 µl de tampón PBS (tampón fosfato salino).

Electroforesis (PAGE-SDS)

La electroforesis se realiza sobre los extractos celulares Sf9 obtenidos anteriormente sobre 5 muestras (véase la tabla 1 a continuación) en las siguientes condiciones:

% de gel de poliacrilamida: 8%; Condiciones: desnaturalizantes
Voltaje: 80V; duración: 135 min.

Tabla 1: Naturaleza de las muestras sometidas a la electroforesis

Nº de pocillo	1	2	3	4	5
Depósitos	PM Rainbow	Raoul 24h	Raoul 48h	Raoul 72h	Raoul 96h
µl muestra	10	15	15	15	15
µl Laemli 4X	0	5	5	5	5
Leyendas de la tabla 1: Laemli 4X: tampón de carga PM Rainbow: marcadores de peso molecular (35, 52, 77, 107, 160 y 250 kD) Raoul 24h, 48h, 72h y 96h: productos de expresión del ORF1 del circovirus MAP de tipo A					

Transferencia western

Después de la electroforesis, se transfieren las bandas obtenidas en los diferentes pocillos sobre una membrana de nitrocelulosa durante 1h a 100v en un tampón TGM (Tris-glicina-metanol).

La transferencia western se realiza en las siguientes condiciones:

1) Saturación mediante una disolución que contiene 5% de leche desnatada; 0,05% de Tween 20 en un tampón TBS 1X (Tris buffer saline) durante 30 min.

2) 1^{er} anticuerpo:

se añaden 10 ml de anticuerpo anticircovirus MAP de tipo A diluidos a 1/100, y el medio de reacción se incuba a continuación una noche a 4°C. Se efectúan tres lavados de 10 min. en TBS 1 X.

3) 2^o anticuerpo:

se añaden 10 ml de anticuerpo P164 de conejo anti-inmunoglobulinas de cerdo, acoplados con la peroxidasa (Dakopath) diluidos a 1/100, y se incuba a continuación el medio de reacción durante 3 horas a 37°C. Se efectúan tres lavados de 10 min. en TBS 1 X.

4) Revelado

Se usa el sustrato 4-cloro-1-naftol, en presencia de agua oxigenada para el revelado.

Resultados

Los resultados se representan en la figura 7.

Cinética de aparición de los anticuerpos específicos de la proteína recombinante REP del circovirus MAP de tipo A expresado en baculovirus después de la infección de los cerdos por el circovirus MAP de tipo A (ensayo 4, véase la figura 1)

Después de la infección de los cerdos, se extrae una muestra de suero de cada uno de los cerdos infectados en diferentes periodos en la tabla por fecha de extracción (efectuado en este caso el mismo año) y después se analiza mediante transferencia western.

El revelado de los anticuerpos específicos se realiza de la manera descrita anteriormente.

Los resultados obtenidos se representan en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2: Cinética de aparición de los anticuerpos específicos

Muestra	Cerdos	10/06	16/06	23/06	01/07	08/07	15/07	21/07
A3	1						Neg.	
Control	2						Neg.	
B2	1	Neg.	Neg.	Neg.	+	+	++	+++
infec.	2	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
RP+	3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	+	+	+
	4	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	++

Leyendas de la tabla 2:
A3 Control: animales de control no infectados;
B2 Infec. RP+: animales infectados con unas células de riñón de cerdos (RP) que contienen el circovirus;
Neg.: negativo;
+, ++, +++: escala de intensidad de la reacción positiva;
10/06, 16/06, 23/06, 01/07, 08/07, 15/07, 21/07: fecha expresadas en día/mes en las que se han efectuado las diferentes extracciones de suero.

Ejemplo 2: Clonación, secuenciación y caracterización del circovirus MAP de tipo B (PCVB)

Las técnicas usadas para la clonación, la secuenciación y la caracterización del circovirus MAP de tipo B (PCVB) son las usadas en el ejemplo 1 anterior para el circovirus MAP de tipo A (PCVA).

La secuencia nucleica de la hebra de polaridad (+) del genoma del circovirus MAP de tipo B (o PCVB) está representada por la secuencia SEC ID nº 9 en el listado de secuencias, estando la secuencia nucleica de la hebra de polaridad (-) del genoma del circovirus MAP de tipo B (o PCVB) representada por la secuencia nucleica 3' → 5' de la figura 8 o por la secuencia SEC ID nº 10 (representada según la orientación 5' → 3') en el listado de secuencias.

Las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 14, SEC ID nº 15 y SEC ID nº 16 del listado de secuencias representan respectivamente las secuencias de las proteínas codificadas por las secuencias nucleicas de los 3 marcos abiertos de lectura SEC ID nº 11 (ORF'1), que corresponden a la proteína REP, SEC ID nº 12 (ORF'2) y SEC ID nº 13 (ORF'3), determinadas a partir de la secuencia SEC ID nº 9 de la hebra de polaridad (+) o de la secuencia nucleica SEC ID nº 10 de la hebra de polaridad (-) del genoma del circovirus MAP de tipo B.

Ejemplo 3: Análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas (ORF1, ORF2 y genómica) y de las secuencias de aminoácidos codificados por ORF1 y ORF2 de los circovirus MAP de tipo A (PCVA) o de tipo B (PCVB).

Los resultados expresados en % de homología se representan en las tablas 3 y 4 siguientes.

Tabla 3: Análisis comparado de las secuencias de aminoácidos

% de homología	ORF1	ORF2
PCVA/PCVB	80,4	56,2

Tabla 4: Análisis comparado de las secuencias nucleotídicas

% de homología	Genómico	ORF1	ORF2	Resto
PCVA/PCVB	70,4	80,4	60,1	66,1

Ejemplo 4: Observación de la enfermedad y reproducción de la enfermedad en las condiciones experimentales

a) Ensayo nº 1: Observación de la enfermedad

El objetivo es seleccionar unos animales de ganaderías al principio de la enfermedad y disponerlos en las condiciones experimentales para seguir la evolución de la patología y describir todas las manifestaciones clínicas. Este primer ensayo se ha efectuado sobre 3 cerdos de ganadería de 10 semanas de edad de los cuales 2 ya estaban enfermos (afectados de decaimiento), y sobre 3 otros cerdos de 13 semanas de edad, que no presentaban ninguna señal de enfermedad. La observación clínica se ha desplegado sobre un periodo de 37 días. Dos cerdos de 10 semanas han decaído rápidamente (cerdo 1 y 2, figura 9) y fueron eutanasiados 5 y 6 días después de su llegada. Uno solo ha presentado hipertermia en 5 días y diarrea. Otros dos cerdos han presentado disnea y tos, de los cuales uno ha tenido además hipertermia, superior a 41°C, los dos primeros días de su estancia. Otro cerdo ha tenido un crecimiento ralentizado en la segunda semana (cerdo 6, figura 9), sin que haya revelado ninguna otra señal clínica. En el plano lesional, 5 cerdos de 6 han presentado unas lesiones macroscópicas de neumonía gris, y el sexto presentaba unas lesiones cicatriciales sobre el pulmón.

b) Ensayo nº 2: Reproducción de la enfermedad a partir de inóculos preparados sobre cerdos de ganadería.

5 Los dos cerdos enfermos del ensayo 1 han servido para preparar unos inóculos que se ha ensayado en el ensayo 2 sobre unos cerdos exentos de organismos patógenos específicos (EOPS, SPF en versión anglo-sajona). Los cerdos EOPS tenían 9 semanas de edad en el momento de la inoculación. Los resultados clínicos y lesionales se representan en la tabla 5.

Tabla 5: recapitativo de las medidas efectuadas durante unas reproducciones experimentales de la MAP (entre paréntesis se indican los valores de los animales de control, los valores subrayados indican una diferencia entre animales infectados y animales de control)

Medida	Ensayo	2	3	4	5	6	7
Situación de los cerdos	EOPS CNEVA	EOPS tereno	EOPS CNEVA	EOPS CNEVA	EOPS CNEVA	Convencionales	Convencionales
Edad	9 semanas	6 semanas	5 semanas	5 semanas	5 semanas	5 semanas	6-7 semanas
Número	4	6	12	8	8	8	8
Vía de inoculación	Vía intratraqueal	Vía intratraqueal	Vía intratraqueal + intramuscular	Vía intratraqueal + intramuscular	Vía intratraqueal + intramuscular	Vía intratraqueal + intramuscular	Vía intratraqueal + intramuscular
Título inóculo por cerdo	ND*	ND*	$10^{4.53}$ TCID ₅₀ por ml: 1 ml mi + 5 ml IT	$10^{4.53}$ TCID ₅₀ por ml: 1 ml mi + 5 ml IT	$10^{4.53}$ TCID ₅₀ por ml: 1 ml mi + 5 ml IT	$10^{4.53}$ TCID ₅₀ por ml: 1 ml mi + 5 ml IT	$10^{4.53}$ TCID ₅₀ por ml: 1 ml mi + 5 ml IT
Principio de las hipotermias	10 días post-infección	9-13 días post-infección	12-13 días post-infección	9-14 días post-infección	8-12 días post-infección	12 días post-infección	12 días post-infección
% de cerdos en hipotermia**	100%	83%	92%	100%	75%	88%	88%
Nº de días de hipotermia por cerdo**	7	4,5	3,3	5,8	7,5	11,6	11,6
Temperaturas máximas***	40,4 a 41,7°C	40,6 a 42,3°C	40,2 a 41,6°C	40,3 a 40,8°C	40,6 a 42°C	40,2 a 41,9°C	40,2 a 41,9°C
Hipotermia****							
% por semana							
S1	3,5 (3,5)	17 (36)	7 (5)	37 (17)	16 (17)	20 (28)	20 (28)
S2	42 (3,5)	7 (13)	<u>13 (1)</u>	<u>21 (3)</u>	<u>52 (10)</u>	<u>37 (28)</u>	<u>37 (28)</u>
S3	<u>35 (3,5)</u>	<u>33 (10)</u>	<u>28 (7)</u>	<u>62 (2)</u>	<u>34 (12)</u>	<u>79 (17)</u>	<u>79 (17)</u>
S4	<u>21 (3,5)</u>	<u>28 (7)</u>	5 (0)	6 (3)	25 (22)	<u>55 (3)</u>	<u>55 (3)</u>

Tabla 5 (Continuación)

Medida	Ensayo	2	3	4	5	6	7
GMQ:	S1 S2 S3 S4	928 (1053) <u>678 (1028)</u> <u>661 (1000)</u> <u>786 (1100)</u> Sí al 100%	417 (357) <u>428 (617)</u> <u>771 (642)</u> <u>550 (657)</u> Sí al 75%	564 (620) <u>503 (718)</u> <u>381 (657)</u> <u>764 (778)</u> No ensayado	650 (589) 612 (584) <u>520 (851)</u> 641 (696) No ensayado	401 (407) <u>294 (514)</u> <u>375 (586)</u> <u>473 (610)</u> No ensayado	509 (512) 410 (310) 435 (440) <u>451 (681)</u> No ensayado
Transmisión cerdos por contactos % de lesiones pulmonares % de lesiones ganglionares		25 17	75 33	0 67	25 25	25 50	12 12

* ND: no determinado,
 ** hipotermia cuando la temperatura es superior a 40°C,
 *** intervalo de las temperaturas máximas registradas a nivel individual,
 **** el porcentaje corresponde al número de registros de temperatura superior a 40°C dividido por el número total de registros de temperaturas en la semana sobre el conjunto de los cerdos.

En este ensayo, no ha habido ningún decaimiento, como mucho una ralentización del crecimiento en la segunda, tercera o cuarta semana después de la infección. Estos datos ilustran que ciertas condiciones de ganadería favorecen probablemente la expresión de la enfermedad.

5 c) Ensayos nº 3 a nº 7: Reproducción de los ensayos experimentales

La multiplicación de los ensayos experimentales sobre cerdos ha tenido como objetivo dominar y caracterizar mejor el modelo experimental. El conjunto de los resultados se presenta en la tabla 5.

10 En las condiciones experimentales, el MAP se caracteriza así por una larga incubación, de 8 a 14 días, unas verdaderas hipertermias de 2 a 8 días, una disminución del consumo alimenticio y una ralentización del crecimiento ponderal en la segunda, tercera o cuarta semana post-infección. La tabla lesional asociada a esta expresión clínica comprende esencialmente unas hipertrofias ganglionarias y unas lesiones de neumonía.

15 Conclusión

La realización de este modelo experimental permite demostrar de manera indiscutible el papel etiológico directo del circovirus MAP en la enfermedad. Además, este modelo es la herramienta indispensable para la comprensión de los mecanismos patogénicos y el estudio de futuros candidatos a vacunas.

20 **Ejemplo 5: Demostración de la eficacia protectora de una composición vacunal realizada a partir de fragmentos nucleicos de secuencia de circovirus MAP**

25 1) Animales usados para el estudio

Se han usado unos lechones que presentan la enfermedad MAP, reproducida en las condiciones experimentales descritas en el párrafo c) del Ejemplo 4, en un protocolo de evaluación de la eficacia de la composición vacunal que comprende unos fragmentos nucleicos de secuencia de circovirus MAP.

30 2) Composición vacunal ensayada y protocolo de vacunación

a) Componentes usados para el estudio

Se han obtenido los plásmidos a partir del plásmido pcDNA3 de INVITROGENE

35 - Plásmidos pcDNA3 ORF-

Estos plásmidos son unos plásmidos que no comprenden ninguna inserción de ácido nucleico de circovirus MAP y se usan a título de plásmido de control negativo.

40 - Plásmido pcDNA3ORF1+ y plásmido pcDNA3ORF2+

Los plásmidos pcDNA3ORF1+ y pcDNA3ORF2+ son unos plásmidos que comprenden una inserción de ácido nucleico de la secuencia del circovirus MAP de tipo B, respectivamente un inserción que comprende el fragmento de ácido nucleico SEC ID nº 11 (ORF'1) que codifica para la proteína Rep de secuencia SEC ID nº 14 y una inserción que comprende el fragmento de ácido nucleico SEC ID nº 12 (ORF'2) que codifica para la proteína de secuencia SEC ID nº 15, que corresponde probablemente a la proteína de cápside, comprendiendo estas construcciones nucleicas el codón ATG de iniciación de la secuencia que codifica la proteína correspondiente.

50 - Plásmido GMCSF+

El GM-CSF (Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor) es una citoquina que interviene en el desarrollo, la maduración y la activación de los macrófagos, de los granulocitos y de las células dendríticas presentadoras de antígeno. Se estima que la aportación beneficiosa del GM-CSF en la vacunación es una activación celular en particular con el reclutamiento y la diferenciación de células presentadoras de antígeno.

55 Este plásmido pcDNA3-GMCSF+ comprende una inserción de ácido nucleico que codifica para el factor de estimulación de colonias granulocitos/macrófago, la proteína GM-CSF.

60 El gen que codifica para esta proteína GM-CSF ha sido clonado y secuenciado por Inumaru *et al.* (Immunol. Cell. Biol., 1995, 73(5), 474-476). El plásmido pcDNA3-GMCSF ha sido obtenido del Dr. B. Charley del INRA de Jouy-en-Josas (78, Francia).

- Baculovirus recombinantes

65

Los baculovirus denominados ORF- son unos virus que no presenta ninguna inserción que comprende un fragmento de ácido nucleico capaz de expresar una proteína de circovirus MAP.

- 5 Los baculovirus denominados ORF1+ (BAC ORF1+) u ORF2+(BAC ORF2+) son unos baculovirus recombinantes que presentan respectivamente una inserción que comprende un fragmento de ácido nucleico SEC ID nº 11 (ORF'1) y una inserción que comprende el fragmento de ácido nucleico SEC ID nº 12 (ORF'2).

- Adyuvante

- 10 El adyuvante suministrado por la Compañía Seppic filial de AIR LIQUIDE es el adyuvante que corresponde a la referencia AIF SEPPIC.

b) Protocolo de vacunación

- 15 Se reparten unos lechones destetados de 3 semanas de edad en cuatro lotes A, B, C y D comprendiendo cada uno 8 lechones.

- 20 Los lotes A, B y C, de 3 semanas de edad, reciben cada uno una primera inyección (inyección M1) de 1 ml que contiene 200 microgramos de plásmidos (ADN desnudo) en PSB, pH: 7,2, por vía intramuscular para cada uno de los plásmidos mencionados a continuación para cada lote, y después, a las 5 semanas de edad una segunda inyección (inyección M2) que comprende estos mismos plásmidos. Se practica una tercera inyección simultáneamente por el otro lado del cuello. Esta tercera inyección comprende 1 ml de una suspensión que contiene $5 \cdot 10^6$ células infectadas por baculovirus recombinantes y 1 ml de adyuvante AIF SEPPIC.

- 25 Lote A (F1) (lote de control):

- primera inyección
Plásmido pcDNA3ORF1-, plásmido pcDNA3ORF2- y plásmido GMCSF+,
- 30 – segunda y tercera inyección (simultáneas)
Plásmido pcDNA3ORF1-, plásmido pcDNA3ORF2- y plásmido GMCSF+; Células transformadas por baculovirus que no contiene ninguna inserción de ácido nucleico que codifica para una proteína de circovirus MAP;
Adyuvante AIF SEPPIC.

- 35 Lote B (F2) (Lote de control):

- primera inyección
Plásmido pcDNA3ORF1-, plásmido pcDNA3ORF2- y plásmido GMCSF+;
- 40 – segunda y tercera inyección (simultáneas)
Plásmido pcDNA3ORF1-, plásmido pcDNA3ORF2- y plásmido GMCSF+; Células transformadas por baculovirus que no contiene ninguna inserción de ácido nucleico que codifica para una proteína de circovirus MAP;

- 45 Adyuvante AIF SEPPIC.

Lote C (F3):

- 50 – primera inyección
Plásmido pcDNA3ORF1-, plásmido pcDNA3ORF2+ y plásmido GMCSF+;
- segunda y tercera inyección (simultáneas)
Plásmido pcDNA3ORF1+, plásmido pcDNA3ORF2+ y plásmido GMCSF+;

- 55 Células transformadas por unos baculovirus recombinantes BAC ORF1+ y BAC ORF2+ capaz de expresar respectivamente la proteína Rep de secuencia SEC ID nº 14 y la proteína de secuencia SEC ID nº 15 del circovirus MAP de tipo B.

- 60 Lote D (F4) (lote de control): ninguna inyección

Los lotes de lechones B, C y D se inyectan (puesta a prueba) a las 6 semanas de edad mientras que el lote A no está sometido a la prueba.

- 65 3) Seguimiento de los lotes

- recuento tos-estornudos: 15 minutos/lote/día;
- consistencia de las materias fecales: todos los días;
- registros habituales: Toma de sangre semanal, pesaje;
- pesajes de los rechazos alimenticios: 3 veces por semana;
- cálculo de la ganancia diaria en peso (gmq);

Las ganancias medias diarias se han calculado para cada uno de los lotes en un periodo de 28 días tras la puesta a prueba (véase la figura 10), y se ha efectuado asimismo un cálculo intermedio de la gmq para cada uno de los lotes en el primer y el segundo periodo de 14 días. Los resultados obtenidos se indican a continuación en la tabla 6.

Tabla 6: Ganancias medias diarias

	F1	F2	F3	F4
D0-D14	411 g	450 g	511 g	461 g
D14-D28	623 g	362 g	601 g	443 g
D0-D28	554 g	406 g	556 g	452 g

15 - Medición de la hipertermia

La medición de la hipertermia, superior a 41°C (véase la figura 11) y superior a 40,2°C, se ha efectuado para cada uno de los lotes en un periodo total de 28 días tras la puesta a prueba. Los resultados obtenidos, que corresponden a la relación expresada en porcentaje entre el número de registros térmicos superiores a 41°C (o superiores a 40,2°C) y entre el número total de registros térmicos efectuados sobre el conjunto de los cerdos por periodos de una semana, se indican a continuación en las tablas 7 y 8, respectivamente para las mediciones de hipertermia superior a 41°C y superior a 40,2°C.

Tabla 7: Hipertermias > 41°C

	F1	F2	F3	F4
S1	4,1	0	0	0
S2	10,7	16	0	8,9
S3	4,7	27	0	45
S4	0	0	0	7,5

Tabla 8: Hipertermias > 40,2°C

	F1	F2	F3	F4
S1	29,1	10,41	29,1	20,8
S2	28,5	39,2	10,7	37,5
S3	14,3	68,7	25,0	81,2
S4	3,3	17,5	20,0	55

30 4) Conclusión

Los registros efectuados muestran claramente que los animales que han recibido las tres inyecciones de una composición vacunal que comprende unos fragmentos de ácido nucleico de circovirus MAP según la invención y/o capaces de expresar unas proteínas recombinantes de circovirus MAP, en particular de tipo B, no han presentado ninguna hipertermia (véase la figura 10). Estos animales no han conocido además ninguna disminución de su crecimiento, siendo las gmq comparables a las de los animales de control no infectados (véase la figura 9). No han presentado ninguna señal clínica particular.

Estos resultados demuestran la protección eficaz de los lechones contra la infección por un circovirus MAP de la invención, agente primario responsable de la MAP o DFP, aportada por una composición vacunal preparada a partir de un fragmento de ácido nucleico de la secuencia nucleica de circovirus MAP según la invención, en particular de tipo B, y/o a partir de proteínas recombinantes codificadas por estos fragmentos de ácidos nucleicos.

Estos resultados muestran en particular que las proteínas codificadas por ORF1 y ORF2 de circovirus MAP según la invención son unas proteínas inmunógenas que inducen una respuesta protectora eficaz para la prevención de la infección por un circovirus MAP.

Ejemplo 6: Diagnóstico serológico de circovirus MAP mediante inmunodosificación usando unas proteínas recombinantes o unos péptidos de síntesis de circovirus MAP

A - Diagnóstico serológico mediante proteínas recombinantes

La identificación y la secuenciación de circovirus porcino MAP permiten producir mediante las técnicas de recombinación genética bien conocidas por el experto en la materia unas proteínas recombinantes de circovirus MAP.

Mediante estas técnicas, se han expresado unas proteínas recombinantes codificadas en particular por el ORF'2 del circovirus MAP, de tipo B, mediante unas células de insecto Sf9 transformadas y después aisladas.

Se extraen estas proteínas recombinantes codificadas por el ORF'2, después del cultivo de las células Sf9 transformadas, mediante lisis celular térmica gracias a 3 ciclos de congelación/descongelación -70°C/+37°C. Se lisan asimismo unas células Sf9 sanas o Sf9 de control no transformadas.

Estas dos fracciones antigénicas procedentes de células Sf9 de control no transformadas y de células Sf9 que expresan el ORF'2 se precipitan a 4°C mediante una disolución al 60% más o menos 5% de sulfato de amonio saturado. Se realiza una dosificación de proteínas totales con la ayuda del kit Biorad. Se adsorben 500 ng de proteínas Sf9 de control y de proteínas Sf9 que expresan el ORF'2 semi-purificadas, en disolución en tampón bicarbonato 0,05 M pH 9,6, de forma pasiva en el fondo de 3 cúpulas diferentes de una microplaca Nunc Maxisorp mediante incubación durante una noche a +4°C.

La reactividad de los sueros de cerdos frente a cada una de estas fracciones antigénicas se evalúa mediante una reacción ELISA indirecta cuyo protocolo experimental se detalla a continuación:

- Etapa de saturación: 200 µl/cúpula de PBS1X/leche semi-desnatada 3%, incubación durante 1h30 a 37°C.
- Lavado: 200 µl/cúpula de PBS1X/Tween 20: 0,05%, 3 lavados rápidos.
- Etapa de incubación de los sueros: 100 µl/cúpula de suero diluido al 1/100 en PBS1X/leche semi-desnatada, 1%/Tween 20: 0,05%, incubación durante 1 h a 37°C.
- Lavado: 200 µl/cúpula de PBS1X/Tween 20: 0,05%, 2 lavados rápidos seguidos de 2 lavados de 5 min.
- Etapa de incubación del conjugado: 50 µl/cúpula de conjugado de conejo anti-cerdo diluido al 1/1000 en PBS1X/leche semi-desnatada, 1%/Tween 20: 0,05%, incubación durante 1h a 37°C.
- Lavado: 200 µl/cúpula de PBS1X/Tween 20: 0,05%, 2 lavados rápidos seguidos de 2 lavados de 5 min.
- Etapa de revelado: 100 µl/cúpula de sustrato OPD/Tampón de citrato/H₂O₂, incubación durante 15 min. a 37°C.
- Detención de la reacción: 50 µl/cúpula H₂SO₄ 1N.
- Lectura con el espectrofotómetro a 490 nm.

Resultados

Los resultados obtenidos se presentan a continuación en la tabla 9.

Tabla 9

Antígenos	Reactividad del suero de cerdo no inoculado por el circovirus	Reactividad del suero de cerdo inoculado por el circovirus
Sf9 de control purificado	0,076	0,088
Sf9 que expresa ORF'2 purificado	0,071	1,035

Los resultados se expresan en densidad óptica medida con el espectrofotómetro a 490 nm durante el análisis mediante ELISA de la reactividad de sueros de cerdo inoculado o no por el circovirus MAP de tipo B según el protocolo indicado anteriormente.

B - Diagnóstico serológico mediante péptido de síntesis

La cartografía epitópica de las proteínas codificadas, por ejemplo, por las secuencias nucleicas ORF1 y ORF2 de los dos tipos de circovirus MAP (tipos A y B) ha permitido entre otros identificar unos epítomos circovíricos inmunógenos sobre las proteínas codificadas por las secuencias nucleicas ORF'1 y ORF'2 así como los epítomos específicos de la proteína codificada por la secuencia nucleica ORF'2 del circovirus MAP de tipo B. Se han sintetizado en forma de péptido cuatro epítomos específicos del circovirus MAP de tipo B y un epítomo común a los dos tipos de circovirus

MAP situados sobre la proteína codificada por la secuencia nucleica ORF'2. Se han sintetizado asimismo los péptidos equivalentes en el circovirus de tipo A. Todos estos péptidos han sido evaluados como antígenos de diagnóstico en el ámbito de la realización de un ensayo serológico.

5 Resultados

Los resultados obtenidos se representan en la tabla 10 a continuación.

Tabla 10: Resultados de la evaluación como antígeno de diagnóstico de péptidos sintéticos codificados por las secuencias nucleicas ORF2 y ORF2 de circovirus MAP de tipo A y B.

Péptido	Tipo de circovirus MAP	Posición	Secuencia AA	Reactividad del suero de cerdo infectados por circovirus B			Especificidad epitópica
				Conventional 1 D0/D42	Conventional 2 D0/D42		
121	B	71-85	VDMRFNINDFLPPG	+/-, +++	-, +++		Circovirus B
177	A	70-84	NVNELRFMGCFLPP	+/-, +	+/-, -		
132	B	115-129	QGDGRGVGSSAVILDD	+/-, +/-	+/-, +		Circovirus B
188	A	114-127	TSNQRGVGSGTVVIL	+/-, -	+/-, +/-		
133	B	119-134	GVGSSAVILDDNVFTK	-, ++	+/-, ++		
189	A	118-132	RGVGSSTVILDANFV	+/-, -	+/-, +/-		
146	B	171-185	FTIDYFQPNKRNQL	-, ++	-, ++		Circovirus A y B
152	B	195-209	VDHVGLGTAFENSIY	-, ++	+/-, +		
208	A	194-208	NVEHTGLGYALQNAT	-, -	-, -		Circovirus B

+/-, +, ++, +++. Intensidades crecientes de las reactividades observadas en spot-péptidos sobre membrana de nitrocelulosa. Los sueros porcinos ensayados proceden de animales experimentalmente infectados por el circovirus de tipo B en el seno de los animalarios del CNEVA. Los animales se extraen antes de la inoculación el D0 y 42 días o 54 días después de la inoculación D42, D54.

Ejemplo 7: Caracterización de los epítomos específicos del circovirus MAP de tipo B

Se han elegido para este estudio las proteínas codificadas por el ORF2 de los circovirus porcinos de tipo A y B. Para cada una de las ORF2 (tipos A y B), se han sintetizado 56 péptidos de 15 aminoácidos que se solapan cada 4 aminoácidos, recubriendo así la totalidad de la proteína (véase la tabla 11 a continuación).

Tabla 11: Secuencia de aminoácidos de los 56 péptidos de 15 aminoácidos sintetizados a partir de la secuencia nucleica ORF'2 (tipo B) y ORF2 (tipo A) de circovirus MAP con su número de spot correspondiente (véase la figura 12)

ORF'2 tipo B		ORF2 tipo A	
Spot nº	Secuencia	Spot nº	Secuencia
104	MTYPRRRYRRRRHRP	160	MTWPRRRYRRRRTRP
105	RRRYRRRRHRPRSHL	161	RRRYRRRRTRPRSHL
106	RRRRHRPRSHLGQIL	162	RRRRTRPRSHLGNIL
107	HRPRSHLGQILRRRP	163	TRPRSHLGNILRRRP
108	SHLGQILRRRPWLHVH	164	SHLGNILRRRPYLVH
109	QILRRRPWLHVHPRHR	165	NILRRRPYLVHPAFR
110	RRPWLHVHPRHRYRWR	166	RRPYLVHPAFRNRYR
111	LVHPRHRYRWRRKNG	167	LVHPAFRNRYRWRRK
112	RHRYRWRRKNGIFNT	168	AFRNRYRWRRKTGIF
113	RWRRKNGIFNTRLR	169	RYRWRRKTGIFNSRL
114	KNGIFNTRLSRTFGY	170	RRKTGIFNSRLSREF
115	FNTRLSRTFGYTVKR	171	GIFNSRLSREFVLT
116	LSRTFGYTVKRRTTVR	172	SRLSREFVLTIRGGH
117	FGYTVKRRTTVRTPSW	173	REFVLTIRGGHSQPS
118	VKRRTTVRTPSWAVDM	174	LTIRGGHSQPSWNVN
119	TVRTPSWAVDMMRFN	175	GGHSQPSWNVNELRF
120	PSWAVDMMRFNINDF	176	QPSWNVNELRFNIGQ
121	VDMMRFNINDFLPPG	177	NVNELRFNIGQFLPP
122	RFNINDFLPPGGGSN	178	LRFNIGQFLPPSGGT
123	NDFLPPGGGSNPRSV	179	IGQFLPPSGGTNPLP
124	PPGGGSNPRSVPFY	180	LPPSGGTNPLPLPFQ
125	GSNPRSVPFYRIR	181	GGTNPLPLPFQYYRI
126	RSVPFYYRIRKVKV	182	PLPLPFQYYRIRKAK
127	FEYYRIRKVKVEFWP	183	PFQYYRIRKAKYEFY
128	RIRKVKVEFWPCSPI	184	YRIRKAKYEFYPRDP
129	VKVEFWPCSPITQGD	185	KAKYEFYPRDPITSN
130	FWPCSPITQGDRGVG	186	EFYPRDPITSNQRGV
131	SPITQGDRGVGSSAV	187	RDPITSNQRGVGSTV
132	QGDRGVGSSAVILDD	188	TSNQRGVGSTVVILD
133	GVGSSAVILDDNFVT	189	RGVGSTVVILDANFV
134	SAVILDDNFVTKATA	190	STVVILDANFVTPST
135	LDDNFVTKATALTYD	191	ILDANFVTPSTNLAY
136	FVTKATALTYDPYVN	192	NFVTPSTNLAYDPYI
137	ATALTYDPYVNYSSR	193	PSTNLAYDPYINYSS
138	TYDPYVNYSSRHTIT	194	LAYDPYINYSSRHTI
139	YVNYSSRHTITQPF	195	PYINYSSRHTIRQPF
140	SSRHTITQPFYHSR	196	YSSRHTIRQPFYHS
141	TITQPFYHSRYFT	197	HTIRQPFYHSRYFT
142	PFSYHSRYFTPKPVL	198	QPFTYHSRYFTPKPE
143	HSRYFTPKPVLDFTI	199	YHSRYFTPKPELDQT
144	FTPKPVLDFTIDYFQ	200	YFTPKPELDQTIDWF
145	PVLDFTIDYFQPNNK	201	KPELDQTIDWFQPNN
146	FTIDYFQPNNKRNQL	202	DQTIDWFQPNNKRNQ
147	YFQPNNKRNQLWLRL	203	DWFQPNNKRNQLWLH
148	NNKRNQLWLRLQTAG	204	PNNKRNQLWLHLNTH
149	NQLWLRLQTAGNVDH	205	RNQLWLHLNTHTNVE
150	LRLQTAGNVDHVGGL	206	WLHLNTHTNVEHTGL
151	TAGNVDHVGGLGTA	207	NHTNVEHTGLGYAL

(continuación)

ORF2 tipo B		ORF2 tipo A	
Spot nº	Secuencia	Spot nº	Secuencia
152	VDHVGLGTAFENSIY	208	NVEHTGLGYALQNAT
153	GLGTAFENSIYDQEY	209	TGLGYALQNATTAQN
154	AFENSIYDQEYNIRV	210	YALQNATTAQNYVVR
155	SIYDQEYNIRVTMYV	211	NATTAQNYVVRLTIY
156	QEYNIRVTMYVQFRE	212	AQNYVVRLTIYVQFR
157	IRVTMYVQFREFNFK	213	VVRLTIYVQFREFIL
158	MYVQFREFNFKDPPL	214	TIYVQFREFILKDPL
159	VQFREFNFKDPPLNP	215	YVQFREFILKDPLNE

Estos péptidos han sido sintetizados según el método "spot" que consiste en una síntesis simultánea de un gran número de péptidos sobre un soporte sólido de celulosa, constituyendo a cada lugar de síntesis de un péptido un spot (Synt:em, NIMES). Este método implica una orientación de los péptidos sobre la placa, estando éstos fijados de manera covalente por el extremo carboxi-terminal. Un spot representa aproximadamente 50 nmoles de péptido.

La referencia de los spot y de las secuencias peptídicas correspondientes se proporciona en la tabla 11.

Estas membranas han sido usadas para unos ensayos de inmunorreactividad frente a sueros de cerdos EOPS infectados o no experimentalmente por la cepa circoviral MAP de tipo B así como frente a sueros de cerdos infectados, procedentes de ganaderías convencionales (ganaderías convencionales 1 ó 2). Este estudio ha permitido demostrar unos péptidos inmunorreactivos específicos del circovirus de tipo B que corresponde a los spot nº 121, nº 132, nº 133 y nº 152 (respectivamente de secuencias de aminoácidos SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19 y SEC ID nº 20). Se presenta una ilustración en la figura 12 en la que las membranas se revelan con un suero de cerdo infectado, procedente de una ganadería convencional. Se han demostrado asimismo unos péptidos inmunorreactivos no específicos de tipo, entre los cuales se considerará el péptido nº 146 que es altamente inmunógeno.

Una comparación entre las secuencias peptídicas de los circovirus de tipo A y B (figura 13) indica una divergencia comprendida entre 20 y 60% para los péptidos inmunorreactivos específicos de tipo B, y una divergencia más baja (13%) entre los péptidos no específicos.

Referencias bibliográficas

- Allan, G. M. *et al.*, 1995, Vet. Microbiol., 44: 49-64.
 Barany, F., 1911, PNAS. USA, 88: 189-193.
 Boulton, L. H. *et al.*, 1997, J. Gen. Virol., 78 (Pt 6), 1265-1270.
 Buckholz, R.G., 1993, Yeast systems for the expression of heterologous gene products. Curr. Op. Biotechnology 4: 538-542.
 Burg, J. L. *et al.*, 1996, Mol. and Cell. Probes, 10: 257-271.
 Chu, B. C. F. *et al.*, 1986, NAR, 14: 5591-5603.
 Chu, P. W. G. *et al.*, 1993, Virus Research, 27: 161-171.
 Clark, E. G., 1997, American Association of Swine Practitioners, 499-501.
 Daft, B. *et al.*, 1996, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 32.
 Derse, D. *et al.*, 1995, J. Virol., 69(3): 1907-1912.
 Duck, P. *et al.*, 1990, Biotechniques, 9: 142-147.
 Dulac, G. C. *et al.*, 1989, Can. J. Vet. Res., 53: 431-433.
 Edwards, C. P., y Aruffo, A., 1993, Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Op. Biotechnology 4: 558-563.
 Edwards, S. *et al.*, 1994, Vet. Rec., 134: 680-681.
 Erlich, H. A., 1989, En PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. Nueva York: Stockton Press. Felgner, *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci., 84: 7413.
 Fontes, E. P. B. *et al.*, 1994, J. Biol. Chem., Vol. 269, nº 11: 8459-8465.
 Fraley *et al.*, 1980, J. Biol. Chem., 255: 10431.
 Guateli, J. C. *et al.*, 1990, PNAS. USA, 87: 1874-1878.
 Hackland, A. F. *et al.*, 1994, Arch. Virol., 139: 1-22.
 Hanson, S. F. *et al.*, 1995, Virology, 211: 1-9.
 Harding, J. C., 1997, American Association of Swine Practitioners, 503.
 Harding, R. M. *et al.*, 1993, Journal of General Virology, 74: 323-328.
 Harding, J. C. y Clark, E. G., 1997, Swine Health and Production, Vol. 5, nº 5: 201-203.
 Heyraud-Nitschke, F. *et al.*, 1995, Nucleic Acids Research, Vol. 23, nº 6.
 Horner, G. W., 1991, Surveillance 18(5): 23.
 Houbenweyl, 1974, en Meuthode der Organischen Chemie, E. Wunsch Ed., Volumen 15-1 y 15-11, Thieme, Stuttgart.

- Huygen, K. *et al.*, 1996, *Nature Medicine*, 2(8): 893-898.
- Innis, M. A. *et al.*, 1990, en *PCR Protocols. A guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press.
- Kaneda, *et al.*, 1989, *Science*, 243: 375.
- Kievitis, T. *et al.*, 1991, *J. Virol. Methods*, 35: 273-286.
- 5 Kohler, G. *et al.*, 1975, *Nature*, 256(5517): 495-497.
- Kwoh, D. Y. *et al.*, 1989, *PNAS. USA*, 86: 1173-1177.
- Ladany, S. *et al.*, 1989, *J. Clin. Microbiol.* 27: 2778-2783.
- Lazarowitz, S. G. *et al.*, 1989, *The EMBO Journal*, Vol. 8 n° 4: 1023-1032.
- Luckow, V. A., 1993, *Baculovirus systems for the expression of human gene products*. *Curr. Op. Biotechnology* 4:
- 10 564-572.
- Mankertz, A. *et al.*, 1997, *J. Virol.*, 71: 2562-2566.
- Matthews, J. A. *et al.*, 1988, *Anal. Biochem.*, 169: 1-25.
- McNeilly, F. *et al.*, 1996, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 49: 295-306.
- Meehan, B. M. *et al.*, 1997, *J. Gen. Virol.*, 78: 221-227.
- 15 Merrifield, R. D., 1966, *J. Am. Chem. Soc.*, 88(21): 5051-5052.
- Midoux, 1993, *Nucleic Acids Research*, 21: 871-878.
- Miele, E. A. *et al.*, 1983, *J. Mol. Biol.*, 171: 281-295.
- Murphy, F. A. *et al.*, 1995, *Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer-Verlag
Wien Nueva York.
- 20 Nayar, G. P. *et al.*, 1997, *Can. Vet. J.* 38(6): 385-386.
- Clins, P. O., y Lee, S. C., 1993, *Recent advances in heterologous gene expression in E. coli*. *Curr. Op. Biotechnology*
4: 520-525.
- Pagano *et al.*, 1967, *J. Virol.*, 1: 891.
- Rolfs, A. *et al.*, 1991, *En PCR Topics. Usage of Polymerase Chain reaction in Genetic and Infectious Disease*. Berlin:
- 25 Springer-Verlag.
- Sambrook, J. *et al.*, 1989, *En Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor
Laboratory Press.
- Sanchez-Pescador, R., 1988, *J. Clin. Microbiol.*, 26(10): 1934-1938.
- Segev D., 1992, en «Non-radioactive Labeling and Detection of Biomolecules». Kessler C. Springer Verlag, Berlin,
- 30 Nueva-York: 197-205.
- Shiver, J.W., 1995, en *Vaccines 1995*, eds Chanock, R.M. Brown, F. Ginsberg, H.S. & Norrby, E., p.95-98, Cold
Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva-York.
- Tascon, R. E *et al.*, 1996, *Nature Medicine*, 2(8): 888-892.
- Tischer, I. *et al.*, 1982, *Nature*, 295: 64-66.
- 35 Tischer, I. *et al.*, 1986, *Arch. Virol.*, 91: 271-276.
- Tischer, I. *et al.*, 1988, *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 270: 280-287.
- Tischer, I. *et al.*, 1995, *Arch. Virol.*, 140: 737-743.
- Urdea, M. S., 1988, *Nucleic Acids Research*, 11: 4937-4957.
- Walker, G. T. *et al.*, 1992, *NAR* 20: 1691-1696.
- 40 Walker, G. T. *et al.*, 1992, *PNAS. USA*, 89: 392-396.
- White, B. A. *et al.*, 1997, *Methods in Molecular Biology*, 67, Humana Press, Towota.
- Zhao, T. M. *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93(13): 6653-6658.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CENTRO NACIONAL DE ESTUDIOS VETERINARIOS Y ALIMENTICIOS - CNEVA

5 <120> SECUENCIA GENÓMICA Y POLIPÉPTIDOS DE CIRCOVIRUS ASOCIADO CON LA ENFERMEDAD DEL ADELGAZAMIENTO DEL LECHÓN (map), APLICACIONES AL DIAGNÓSTICO Y A LA PREVENCIÓN Y/O AL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN

<130> D17221

10

<140>

<141>

<150> FR 97 15396

15

<151> 1997-12-05

<160> 20

<170> PatentIn Vers. 2.0

20

<210> 1

<211> 1759

<212> ADN genómico

<213> Circovirus MAP tipo A

25

<220> Hebra de polaridad + (5'-3')

<400> 1

```
accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcgtca gtgaaaatgc caagcaagaa 60
aagcggcccg caaccccata agagggtgggt gttcacccctt aataatcctt ccgaggagga 120
gaaaaacaaa atacgggagc ttccaatctc cctttttgat ttttttggtt gtggcgagga 180
agggttgga gagggtagaa ctccctcacct ccaggggttt gcgaattttg ctaagaagca 240
gacttttaac aagggtgaagt ggtatttttg tgcccgtgc cacatcgaga aagcgaagga 300
aaccgaccag cagaataaag aatactgcag taaagaaggc cacatactta tcgagtgtgg 360
agctccgcgg aaccagggga agcgcagcga cctgtctact gctgtgagta cccttttgga 420
gacgggggtct ttggtgactg tagccgagca gtttccctgta acgtatgtga gaaatttccg 480
cgggctggct gaacttttga aagtgcgcgg gaagatgcag aagcgtgatt ggaagacagc 540
tgtacacgtc atagtgggccc cgcccgttg tgggaagagc cagtgggccc gtaattttgc 600
tgagcctagg gacacctact ggaagcctag tagaaataag tgggtgggatg gatatcatgg 660
agaagaagtt gttgttttgg atgattttta tggctgggta ccttgggatg atctactgag 720
actgtgtgac cggtatccat tgactgtaga gactaaaggg ggtactgttc cttttttggc 780
ccgcagtatt ttgattacca gcaatcaggc cccccaggaa tggtaactct caactgctgt 840
cccagctgta gaagctctct atcggaggat tactactttg caattttgga agactgctgg 900
agaacaatcc acggaggtac ccgaaggccg atttgaagca gtggaccac cctgtgccct 960
tttcccatat aaaataaatt actgagtctt ttttggtatc acatcgtaat ggtttttatt 1020
tttattcatt tagagggtct ttcaggataa attctctgaa ttgtacataa atagtcaacc 1080
ttaccacata attttgggct gtggttgcat tttggagcgc atagcccagg cctgtgtgct 1140
cgacattggt gtgggtattt aaatggagcc acagctggtt tcttttatta tttggctgga 1200
accaatcaat tgtttgggtct agctctggtt tgggggtgaa gtacctggag tggtaggtaa 1260
agggctgcct tatggtgtgg cgggaggagt agttaatata ggggtcatag gccaaagtgg 1320
tggaaggggt tacaagttg gcatccaaga taacaacagt ggaccaaca cctctttgat 1380
tagagggtgat ggggtctctg gggtaaaatt catatttagc ctttctaata cggtagtatt 1440
ggaaaggtag gggtaggggg ttggtgccgc ctgagggggg gaggaactgg ccgatgttga 1500
atctcagctc gttaacattc caagatggct gcgagtgtcc tcctcttatg gtgagtacaa 1560
attctctaga aaggcgggaa ttgaagatac ccgtctttcg gcgccatctg taacggtttc 1620
tgaagggcgg gtgtacaaa tatggtcttc tccggaggat gtttccaaga tggctgcggg 1680
ggcgggtccg tcttctgcgg taacgcctcc ttggccacgt catcctataa aagtgaagaa 1740
agtgcgctgc tgtagtatt 1759
```

30

<210> 2

<211> 1759

<212> ADN genómico

35

<213> Circovirus MAP de tipo A

<220> Hebra de polaridad - (5'-3')

<400> 2

```

aatactacag cagcgcactt ctttcacttt tataggatga cgtggccaag gaggcgttac 60
cgcagaagac ggacccgccc ccgcagccat cttggaaacg tcctccggag aagaccatat 120
ttggtacacc ccgccttcag aaaccgttac agatggcgcc gaaagacggg tatcttcaat 180
tcccgccttt ctagagaatt tgtactcacc ataagaggag gacactcgca gccatcttgg 240
aatgttaacg agctgagatt caacatcggc cagtccctcc cccctcagg cggcaccaac 300
cccctacccc tacctttcca atactaccgt attagaaagg ctaaatatga attttaccoc 360
agagacccca tcacctctaa tcaaagaggt gttgggtcca ctgttggtat cttggatgcc 420
aactttgtaa cccctccac caacttggcc tatgaccct atattaacta ctcctccgc 480
cacaccataa ggcagccctt tacctaccac tccagggtact tcaccccaa accagagcta 540
gaccaaacia ttgattggtt ccagccaaat aataaaagaa accagctgtg gctccattta 600
aataccaca ccaatgtcga gcacacaggc ctgggctatg cgctccaaa tgcaaccaca 660
gcccaaaatt atgtggttaag gttgactatt tatgtacaat tcagagaatt tatcctgaaa 720
gacctctaa atgaataaaa ataaaaacca ttacgatgtg ataacaaaa agactcagta 780
atltatttta tatgggaaaa gggcacaggg tgggtccact gcttcaaac ggccttcggg 840
tacctccgtg gattgttctc cagcagtcct ccaaaattgc aaagtagtaa tcctccgata 900
gagagcttct acagctggga cagcagttga ggagtaccat tcctgggggg cctgattgct 960
ggtaatacaa atactgcggg ccaaaaaagg aacagtacc cctttagtct ctacagtcaa 1020
tggataccgg tcacacagtc tcagtagatc atcccaagg aaccagccat aaaaatcac 1080
caaaacaaca acttcttctc catgatatcc atcccaccac ttatttctac taggcttcca 1140
gtagggtgcc ctaggctcag caaaattacg ggcccactgg ctcttccac aaccgggagg 1200
gccactatg acgtgtacag ctgtcttcca atcacgctgc tgcattctcc cgctcacttt 1260
caaaagttca gccagccgc ggaaatttct cacatacgtt acaggaaact gctcggttac 1320
agtcacaaa gaccccgctt ccaaaagggt actcacagca gtagacaggt cgctgcgctt 1380
cccctgggtc cgcggagctc cacactcgat aagtatgtgg ccttctttac tgcagtattc 1440
tttattctgc tggtcgggtc ctttcgcttt ctcgatgtgg cagcgggcac caaaatacca 1500
cttcaccttg ttaaaagtct gcttcttagc aaaattcgca aaccctgga ggtgaggagt 1560
tctacctct tccaaacctt cctcgccaca acaaaaataa tcaaaaagg agattggaag 1620
ctcccgatt ttgttttctt cctcctcgga aggattatta aggggaaca cccacctctt 1680
atgggggtgc gggccgcttt tcttgcttgg cattttcact gacgctgcc aggtgctgcc 1740
gctgccgaag tgcgctggt 1759

```

<210> 3

5 <211> 939

<212> ADN

<213> Circovirus MAP de tipo A

<220> ORF1

10

<400> 3

```

atgccaagca agaaaagcgg cccgcaaccc cataagaggt ggggtgttac ccttaataat 60
ccttccgagg aggagaaaaa caaaatacgg gagcttccaa tctccctttt tgattatttt 120
gtttgtggcg aggaagggtt ggaagagggt agaactcctc acctccaggg gtttgcaat 180
tttgctaaga agcagacttt taacaagggt aagtggtatt ttggtgcccg ctgccacatc 240
gagaaagcga aaggaaccga ccagcagaat aaagaatact gcagtaaaga aggccacata 300

cttatcgagt gtggagctcc gcggaaccag gggaaagcga gcgacctgtc tactgctgtg 360
agtacccttt tggagacggg gtctttggtg actgtagccg agcagtttcc tgtaacgtat 420
gtgagaaatt tccgcgggct ggctgaactt ttgaaagtga gcgggaagat gcagcagctg 480
gattggaaga cagctgtaca cgtcatagtg ggcccggccg gttgtgggaa gagccagtgg 540
gcccgtaatt ttgctgagcc tagggacacc tactggaaagc ctagtagaan taagtgggtg 600
gatggatate atggagaaga agttgttgtt ttggatgatt tttatggctg gttaccttgg 660
gatgatctac tgagactgtg tgaccgggat ccattgactg tagagactaa agggggtact 720
gttccctttt tggcccgag tattttgatt accagcnatc agggccccc a gnatgggtac 780
tcctcaactg ctgtcccagc tgtagaagct ctctatcgga ggattactac tttgcaattt 840
tggaagactg ctggagaaca atccacggag gtacccgaag gccgatttga agcagtggtg 900
ccacctgtg cccctttccc atataaaata aattactga 939

```

ES 2 317 679 T5

<210> 4
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Circovirus MAP de tipo A

5

<220> ORF2

<400> 4

```
atgacgtggc caaggaggcg ttaccgcaga agacgggaccc gcccccgag ccatcttgga 60
aacatcctcc ggagaagacc atatttggtta cccccgcct tcagaaaccg ttacagatgg 120
cgccgaaaga cgggtatctt caattcccgc ctttctagag aatttgtagt caccataaga 180
ggaggacact cgcagccatc ttggaatggt aacgagctga gattcaacat cggccagttc 240
ctccccccct caggcggcac caacccccta cccctacctt tccaatacta ccgtattaga 300
aaggctaaat atgaatttta ccccagagac cccatcacct ctaatcaaag aggtgttggg 360
tccactgttg ttatcttgga tgccaacttt gtaacccct ccaccaactt ggccatgac 420
ccctatatata actactcttc ccgccacacc ataaggcagc cctttacctt ccaactccagg 480
tacttcaccc ccaaaccaga gctagaccaa acaattgatt ggttccagcc aaataataaa 540
agaaaccagc tgtggctcca tttaaatacc cacaccaatg tcgagcacac aggcctgggc 600
tatgcgctcc aaaatgcaac cacagcccaa aattatgtgg taagggtgac tatttatgta 660
caattcagag aatttatcct gaaagaccct ctaaataaat aa 702
```

10

<210> 5
 <211> 621
 <212> ADN
 <213> Circovirus MAP de tipo A

15

<220> ORF3

<400> 5

20

```
atgatatcca tcccaccact tatttctact aggttccag taggtgtccc taggctcagc 60
aaaattacgg gccactggc tcttcccaca accgggcggg cccactatga cgtgtacagc 120
tgtcttccaa tcacgtgct gcatcttccc gctcactttc aaaagttagc ccagcccgcg 180
gaaatttctc acatacgta caggaaactg ctgggtaca gtcaccaaag acccgtctc 240
caaaagggtta ctacagcag tagacaggct gctgcgcttc ccctgggttc gcggagctcc 300
acactcgata agtatgtggc cttctttact gcagtattct ttattctgct ggtcgggttc 360
tttcgctttc tcgatgtggc agcgggcacc aaaataccac ttcacctgt taaaagtctg 420
cttcttagca aaattcgcaa acccctggag gtgaggagtt ctacctctt ccaaaccctc 480
ctcgccacaa acaaaataat caaaaaggga gattggaagc tcccgtagtt tgttttctc 540
ctcctcgga ggattattaa gggtgaacac ccacctctta tgggggtgag ggccgctttt 600
cttgcttggc attttcaactg a 621
```

25

<210> 6
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Circovirus MAP de tipo A

30

<400> 6

Met	Pro	Ser	Lys	Lys	Ser	Gly	Pro	Gln	Pro	His	Lys	Arg	Trp	Val	Phe
1				5					10					15	
Thr	Leu	Asn	Asn	Pro	Ser	Glu	Glu	Glu	Lys	Asn	Lys	Ile	Arg	Glu	Leu
			20					25					30		
Pro	Ile	Ser	Leu	Phe	Asp	Tyr	Phe	Val	Cys	Gly	Glu	Glu	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			
Glu	Gly	Arg	Thr	Pro	His	Leu	Gln	Gly	Phe	Ala	Asn	Phe	Ala	Lys	Lys
	50					55					60				
Gln	Thr	Phe	Asn	Lys	Val	Lys	Trp	Tyr	Phe	Gly	Ala	Arg	Cys	His	Ile
65					70					75					80
Glu	Lys	Ala	Lys	Gly	Thr	Asp	Gln	Gln	Asn	Lys	Glu	Tyr	Cys	Ser	Lys
				85					90					95	
Glu	Gly	His	Ile	Leu	Ile	Glu	Cys	Gly	Ala	Pro	Arg	Asn	Gln	Gly	Lys
			100					105					110		
Arg	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Ala	Val	Ser	Thr	Leu	Leu	Glu	Thr	Gly	Ser
		115					120					125			
Leu	Val	Thr	Val	Ala	Glu	Gln	Phe	Pro	Val	Thr	Tyr	Val	Arg	Asn	Phe
	130					135					140				
Arg	Gly	Leu	Ala	Glu	Leu	Lys	Val	Ser	Gly	Lys	Met	Gln	Gln	Arg	
145					150				155					160	
Asp	Trp	Lys	Thr	Ala	Val	His	Val	Ile	Val	Gly	Pro	Pro	Gly	Cys	Gly
				165					170					175	
Lys	Ser	Gln	Trp	Ala	Arg	Asn	Phe	Ala	Glu	Pro	Arg	Asp	Thr	Tyr	Trp
			180					185					190		
Lys	Pro	Ser	Arg	Asn	Lys	Trp	Trp	Asp	Gly	Tyr	His	Gly	Glu	Glu	Val
		195					200					205			
Val	Val	Leu	Asp	Asp	Phe	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Trp	Asp	Asp	Leu	Leu
	210					215					220				
Arg	Leu	Cys	Asp	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val	Glu	Thr	Lys	Gly	Gly	Thr
225					230					235					240
Val	Pro	Phe	Leu	Ala	Arg	Ser	Ile	Leu	Ile	Thr	Ser	Asn	Gln	Ala	Pro
				245					250					255	
Gln	Glu	Trp	Tyr	Ser	Ser	Thr	Ala	Val	Pro	Ala	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr
			260					265					270		
Arg	Arg	Ile	Thr	Thr	Leu	Gln	Phe	Trp	Lys	Thr	Ala	Gly	Glu	Gln	Ser
		275					280					285			
Thr	Glu	Val	Pro	Glu	Gly	Arg	Phe	Glu	Ala	Val	Asp	Pro	Pro	Cys	Ala
	290					295					300				
Leu	Phe	Pro	Tyr	Lys	Ile	Asn	Tyr								
305					310										

<210> 7

<211> 233

<212> PRT

5 <213> Circovirus MAP de tipo A

<400> 7

Met	Thr	Trp	Pro	Arg	Arg	Arg	Tyr	Arg	Arg	Arg	Arg	Thr	Arg	Pro	Arg
1				5					10					15	
Ser	His	Leu	Gly	Asn	Ile	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	Tyr	Leu	Val	His	Pro
			20					25					30		
Ala	Phe	Arg	Asn	Arg	Tyr	Arg	Trp	Arg	Arg	Lys	Thr	Gly	Ile	Phe	Asn
		35					40					45			

```

Ser Arg Leu Ser Arg Glu Phe Val Leu Thr Ile Arg Gly Gly His Ser
 50          55          60
Gln Pro Ser Trp Asn Val Asn Glu Leu Arg Phe Asn Ile Gly Gln Phe
 65          70          75          80
Leu Pro Pro Ser Gly Gly Thr Asn Pro Leu Pro Phe Gln Tyr
          85          90          95
Tyr Arg Ile Arg Lys Ala Lys Tyr Glu Phe Tyr Pro Arg Asp Pro Ile
          100          105          110
Thr Ser Asn Gln Arg Gly Val Gly Ser Thr Val Val Ile Leu Asp Ala
          115          120          125
Asn Phe Val Thr Pro Ser Thr Asn Leu Ala Tyr Asp Pro Tyr Ile Asn
          130          135          140
Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Arg Gln Pro Phe Thr Tyr His Ser Arg
          145          150          155          160
Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Glu Leu Asp Gln Thr Ile Asp Trp Phe Gln
          165          170          175
Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu His Leu Asn Thr His Thr
          180          185          190
Asn Val Glu His Thr Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Gln Asn Ala Thr Thr
          195          200          205
Ala Gln Asn Tyr Val Val Arg Leu Thr Ile Tyr Val Gln Phe Arg Glu
          210          215          220
Phe Ile Leu Lys Asp Pro Leu Asn Glu
          225          230

```

<210> 8

<211> 206

<212> PRT

5 <213> Circovirus MAP de tipo A

<400> 8

```

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

```

Leu Met Gly Leu Arg Ala Ala Phe Leu Ala Trp His Phe His
195 200 205

<210> 9
<211> 1767
<212> ADN genómico
<213> Circovirus MAP de tipo B

<220> Hebra de polaridad + (5'-3')
<400> 9

```

accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgcccagca 60
agaagaatgg aagaagcgga ccccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact ctgaataatc 120
cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctattt gattatttta 180
ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt 240
ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtgggtattt ggggtgcccg tgcacatcg 300
agaaagcgaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggcaacttac 360
tgatggagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420
gtacctgtgt ggagagcggg agtctgggtga ccgttgccaga gcagcacctt gtaacgtttg 480
tcagaaatct ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagttag cgggaaaatg cagaagcgtg 540
attggaagac taatgtacac gtcattgttg ggccacctgg gtgtggtaaa agcaaatggg 600
ctgctaattt tgcagacccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtgg 660
atggttacca tgggtgaagaa gtggttggtt ttgatgactt ttatggctgg ctgccctggg 720
atgatctact gagactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa ggtggaaactg 780
tacctttttt ggcccgagc attctgatta ccagcaatca gaccccggtg gaatgggtact 840
cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcggag gattacttcc ttggtatttt 900
ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttegtcacc ctttcccccc 960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtcct ttttatact tcgtaatggt 1020
ttttattatt cattaagggt taagtggggg gtcttttaaa tttaaattctc tgaattgtac 1080
atacatggtt acacggatat tgcattcctg gtcttatata ctgttttcga acgcagtgcc 1140
gaggcctacg tgggtctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct ggtttctttt 1200
gttgtttggt tggaaagtaa caatagttaa atctaggaca ggtttggggg taaagtaccg 1260
ggagtggtag gagaagggtt ggggttatgt atgcccggag gtagagttaa catagggggtc 1320
ataggtgag gctgtggcct ttgttacaaa gttatcatct aaaataacag cactggagcc 1380
cactcccctg tcacctggg tgatcgggga gcagggccag aattcaacct taacctttct 1440
tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgac cccctcctg ggggaagaaa 1500
gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cgcccaggag ggcgttctga ctgtggttcg 1560
cttgacagta tatecgaagg tgcgggagag gcgggtgttg aagatgccat ttttcttct 1620
ccagcggtaa cgggtggcgg ggtggacgag ccagggggcg cggcgaggga tctggccaag 1680
atggctgcgg gggcggtgtc ttcttcttcg gtaacgcctc cttggatacg tcatatctga 1740
aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt 1767

```

<210> 10
<211> 1767
<212> ADN genómico
<213> Circovirus MAP de tipo B

<220> Hebra de polaridad - (5'-3')
<400> 10

```

aatacttaca ggcactttct ttcgtttttc gatatgacgt atccaaggag gcgttaccga 60
agaagaagac accgcccccg cagccatctt ggccagatcc tccgcgcgcg cccctggctc 120
gtccaccccc gccaccgtta ccgctggaga aggaaaaatg gcattctcaa caccgcctc 180
tcccgcacct tcggatatac tgtcaagcga accacagtca gaacgcctc ctgggcggtg 240
gacatgatga gattcaatat taatgacttt cttccccccg gaggggggtc aaacccccgc 300

```

ES 2 317 679 T5

```
tctgtgccct ttgaatacta cagaataaga aagggttaagg ttgaattctg gccctgctcc 360
ccgatcacc cagggtgacag gggagtgggc tccagtgcctg ttatttttaga tgataacttt 420
gtaacaaagg ccacagccct caccatgac cccatgttaa actactcctc ccgccatacc 480
ataaccagc ccttctccta ccactcccg tacttttacc ccaaacctgt cctagatttc 540
actattgatt acttccaacc aaacaacaaa agaaaccagc tgtggctgag actacnaact 600
gctggaaatg tagaccacgt aggcctcggc actgcgttcg naaacagtat atacgaccag 660
gaaatacata tccgtgtanc catgtatgta caattcagag aatttatttt taangacccc 720
ccacttaacc cttantgaat aataaaancc attacgaggt gataaaanag actcagtaat 780
ttatttcata tggaaattca gggcatgggg gggaaagggt gacgaactgg ccccttccct 840
ccgtggattg ttctgtagca ttcttccaaa ataccaagga agtaatectc cgataaagag 900
cttctacagc tgggacagca gttgaggagt accattccaa cgggggtctga ttgctggtaa 960
tcagaatact gcgggccaaa aaagggtacag ttccaccttt agtctctaca gtcaatggat 1020
atcgatcaca cagtctcagt agatcatccc agggcagcca gccataaaag tcatcaataa 1080
caaccacttc ttcacatagg taaccatccc accacttgtt tctaggtggg ttccagtatg 1140
tggtttccgg gtctgcaaaa ttagcagccc atttgctttt accacaccca ggtggcccca 1200
caatgacgtg tacattagtc ttccaatcac gcttctgcat ttcccgcctc actttcaaaa 1260
gttcagccag cccgcggaaa tttctgacaa acgttacagg gtgctgctct gcaacgggtca 1320
ccagactccc gctctccaac aagggtactca cagcagtaga caggtcactc cgttgtccct 1380
gagatctagg agctccacac tccatcagta agttgccttc tttactgcag tattctttat 1440
tctgctgate tgttccctttc gctttctcga tgtggcagcg ggcacccaaa taccacttca 1500
ctttattaaa agtctgcttc ttcacaaaat tagcgaaccc ctggagggtga ggtgttcgtc 1560
cttccctcatt accctcctcg ccaacaataa aataatcaaa tagggatatt ggaagatccc 1620
gtattttctt gcgctcgtct tcggaaggat tattcagagt gaacacccac cttttatggg 1680
gttgggggtc gcttcttcca ttcttcttgc tgggcatgtt gctgctgagg tgctgccgag 1740
gtgctgccgc tgcggaagtg cgctggt 1767
```

<210> 11

<211> 945

<212> ADN

5 <213> Circovirus MAP de tipo B

<220> ORF1

<400> 11

10

```
atgccagca agaagaatgg aagaagcgga ccccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact 60
ctgaataatc cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctattt 120
gattatttta ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg 180
ttcgctaatt ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtggatttt gggtgccgc 240
tgccacatcg agaaagcgaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa 300
ggcaacttac tgatggagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct 360
actgctgtga gtaccttgtt ggagagcggg agtctggtga ccgttgacga gcagcacctc 420
gtaacgtttg tcagaaattt ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagttag cgggaaaatg 480
cagaagcgtg attggaagac taatgtacac gtcattgttg ggccacctgg gtgtggtaaa 540
agcaaattgg ctgctaattt tgcagacccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac 600
aagtgggtgg atggttacca tgggtgaagaa gtggttggtt ttgatgactt ttatggctgg 660
ctgccctggg atgatctact gagactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa 720
ggtggaactg tacctttttt ggcccgagc attctgattt ccagcaatca gaccccgttg 780
gaatgggtact cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcgag gattacttcc 840
ttggtatttt ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc 900
ctttccccc catgccctga atttccatat gaaataaatt actga 945
```

<210> 12

<211> 702

<212> ADN

15 <213> Circovirus MAP de tipo B

<220> ORF2

<400> 12

```

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgaaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgcgcgcc ctggctcgtc cccccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaaac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caagcgacc 180
acagtcagaa cgcctcctcg ggcggtggac atgatgagat tcaatattaa tgactttctt 240
ccccaggag gggggtcaaa ccccgctct gtgccttttg aatactacag aatnagaang 300
gttaagggtt aattctggcc ctgctccccg atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
agtgtgttta ttttagatga taactttgtt acaagggea cagccctcac ctatgacccc 420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctctacca cteccggtag 480
tttaccceca aacctgtcct agatttccact attgattact tccaacnaaa caacaaaaga 540
aaccagctgt ggctgagact acaaaactgt ggaaatgtag accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
tccagagaat ttaattttta agacccccca cttaaccctt aa 702

```

<210> 13

5 <211> 315
<212> ADN

<213> Circovirus MAP de tipo B

<220> ORF3

10

<400> 13

```

atggtaacca tcccaccact tgtttctagg tggtttccag tatgtggttt cggggtctgc 60
aaaattagca gccatttgc ttttaccaca cccaggtggc cccacaatga cgtgtacatt 120
agtcttccaa tcacgtttct gcattttccc gctcactttc aaaagttcag ccagcccgcg 180
gaaatttctg acaaacgtta cagggtgctg ctctgcaacg gtcaccagac tcccgtcttc 240
caacaaggta ctcacagcag tagacaggtc actccgttgt ccctgagatc taggagctcc 300
acactccatc agtaa 315

```

<210> 14

15 <211> 314
<212> PRT

<213> Circovirus MAP de tipo B

<400> 14

20

```

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

```

```

                165                170                175
Gly Cys Gly Lys Ser Lys Trp Ala Ala Asn Phe Ala Asp Pro Glu Thr
                180                185                190
Thr Tyr Trp Lys Pro Pro Arg Asn Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly
                195                200                205
Glu Glu Val Val Val Ile Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro Trp Asp
                210                215                220
Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys
225                230                235                240
Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn
                245                250                255
Gln Thr Pro Leu Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu
                260                265                270
Ala Leu Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Leu Val Phe Trp Lys Asn Ala Thr
                275                280                285
Glu Gln Ser Thr Glu Glu Gly Gly Gln Phe Val Thr Leu Ser Pro Pro
                290                295                300
Cys Pro Glu Phe Pro Tyr Glu Ile Asn Tyr
305                310

```

<210> 15

<211> 233

<212> PRT

5 <213> Circovirus MAP de tipo B

<400> 15

```

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

```

10

<210> 16

<211> 104
<212> PRT
<213> Circovirus MAP de tipo B

5 <400> 16

```

Met Val Thr Ile Pro Pro Leu Val Ser Arg Trp Phe Pro Val Cys Gly
 1          5          10          15
Phe Arg Val Cys Lys Ile Ser Ser Pro Phe Ala Phe Thr Thr Pro Arg
          20          25          30
Trp Pro His Asn Asp Val Tyr Ile Ser Leu Pro Ile Thr Leu Leu His
          35          40          45
Phe Pro Ala His Phe Gln Lys Phe Ser Gln Pro Ala Glu Ile Ser Asp
          50          55          60
Lys Arg Tyr Arg Val Leu Leu Cys Asn Gly His Gln Thr Pro Ala Leu
          65          70          75          80
Gln Gln Gly Thr His Ser Ser Arg Gln Val Thr Pro Leu Ser Leu Arg
          85          90          95
Ser Arg Ser Ser Thr Leu His Gln
          100

```

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> Circovirus MAP de tipo B

10

<400> 17

15

```

Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu Pro Pro Gly
 1          5          10          15

```

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Circovirus MAP de tipo B

20

<400> 18

25

```

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp
 1          5          10          15

```

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Circovirus MAP de tipo B

30

<400> 19

```

Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr
 1          5          10          15

```

35

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> Circovirus MAP de tipo B

40

<400> 20

```

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr
 1          5          10          15

```

REIVINDICACIONES

1. Compuesto para su uso como vacuna, caracterizado porque dicho compuesto se selecciona de entre los siguientes compuestos:

- a) una secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 12, y que corresponde al ORF'2 de un circovirus MAP de tipo B de secuencia genómica SEC ID nº 9 que presenta unas variaciones relacionadas con unas mutaciones en el seno de las cepas de circovirus MAP de tipo B, comprendiendo esta secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 12 por lo menos la secuencia nucleica que codifica para el polipéptido de secuencia SEC ID nº 17,

con la excepción:

- de las secuencias nucleotídicas descritas en la solicitud internacional de patente publicada el 15 de abril de 1999 con el número WO 99/18214 denominadas COL13 de los circovirus de tipo II cepa IMP1011-48121 de secuencia:

Secuencia del aislado PCV Imp1011-48121

```

1  AATTCAACCT TAACCTTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG
51  GGGGTTTGAG CCCCTCCTG GGGGAAGAAA GTCATTAATA TTGAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGTTCTGA CTGTGGTTCG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TGCGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTCTCTTCT
201 CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC
301 CTGGGATACG TCATATCTGA AAACGAAAGA AGTGGCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCGAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCCATA AAAGTGGGT
451 GTTCACTCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGATC
501 TTCCAATATC CCTATTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTT GCTAATTTTG TGAAGAAGCA
601 GACTTTTAAT AAAGTGAAAG GGTATTGTTG TGCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCGAAAGG AACAGATCAG CAGAATAAAG AATACTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTGA TGGACTGTGG AGCTCCTAGA TCTCAGGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTTGTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCTGTGA ACGTTTGTCA GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTTGA AAGTGAGCGG GAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACTAA
901 TGTacACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGATAAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTTGC AGACCCGGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCCTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGA CTGTAGA GACTAAAGGT GGAACGTGAC CTTTTTGGC CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTTT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGA

```

1251 AGAATGCTAC AGAACAAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCCTT
 1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT
 1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TAAGGGTTAA GTGGGGGGTC
 1401 TTAAAGATTA AATTCTCTGA ATTGTACATA CATGGTTACA CGGATATTGT
 1451 ATTCCTGGTC GTATATACTG TTTTCGAACG CAGTGCCGAG GCCTACGTGG
 1501 TCTACATTTC CAGCAGTTTG TAGTCTCAGC CACAGCTGGT TTCTTTTGT
 1551 GTTTGGTTGG AAGTAATCAA TAGTGGAATC TAGGACAGGT TTGGGGGTAA
 1601 AGTAGCGGGA GTGGTAGGAG AAGGGCTGGG TTATGGTATG GCGGGAGGAG
 1651 TAGTTTACAT AGGGGTCATA GGTGAGGGCT GTGGCCTTTG TTACAAAGTT
 1701 ATCATCTAGA ATAACAGCAC TGGAGCCAC TCCCCTGTCA CCCTGGGTGA
 1751 TCGGGGAGCA GGGCCAG

y cepa IMP1011-48285 de secuencia:

5 Secuencia del aislado PCV Imp1011-48285

1 AATTCAACCT TAACCTTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG
 51 GGGGTTTGAG CCCCCCTCTG GGGGAAGAAA GTCATTAATA TTGAATCTCA
 101 TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GCGGTTTTGA CTGTGGTTCG CTTGACAGTA
 151 TATCCGAAGG TGCGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTCTCTTC
 201 CCAGCGGTAA CGGTGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA
 251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC
 301 CTTGGATACG TCATATCTGA AAACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATTACC
 351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
 401 CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCCATA AAAGGTGGGT
 451 GTTCACTCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGATC
 501 TTCCAATATC CCTATTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGTAATGAG
 551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTT GCTAATTTG TGAAGAAGCA
 601 GACTTTTAAAT AAAGTGAAGT GGTATTTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
 651 AAGCGAAAGG AACAGATCAG CAGAATAAAG AATACTGCAG TAAAGAAGGC
 701 AACTTACTGA TGGAGTGTG AGCTCCTAG TCTCAGGGAC AACGGAGTGA
 751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CTTGTTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
 801 TTGCAGAGCA GCACCCTGTA ACGTTTGTCA GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
 851 GAACTTTTGA AAGTGAGCGG GAAAATGCAG AAGCGTATT GGAAGACTAA
 901 TGTACACGTC ATTGTGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAAGC AAATGGGCTG
 951 CTAATTTTGC AGACCCGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
 1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA
 1051 TGGCTGGCTG CCCTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
 1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGAAGTGTAC CTTTTTTGGC CCGCAGTATT
 1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACGTCTGT
 1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTTT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGGG

```

1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCTT
1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TAAGGGTTAA GTGGGGGGTC
1401 TTTAAGATTA AATTCTCTGA ATTGTACATA CATGGTTACA CGGATATTGT
1451 ATTCCTGGTC GTATATACTG TTTTCGAACG CAGTGCCGAG GCCTACGTGG
1501 TCTACATTTC CAGTAGTTTG TAGTCTCAGC CACAGCTGAT TTCTTTTGTT
1551 GTTGGTTGG AAGTAATCAA TAGTGGAATC TAGGACAGGT TTGGGGGTAA
1601 AGTAGCGGGA GTGGTAGGAG AAGGGCTGGG TTATGGTATG GCGGGAGGAG
1651 TAGTTTACAT AGGGGTCATA GGTGAGGGCT GTGGCCTTTG TTACAAAGTT
1701 ATCATCTAGA ATAACAGCAC TGGAGCCAC TCCCCTGTCA CCCTGGGTGA
1751 TCGGGGAGCA GGGCCAG

```

- b) un polipéptido de secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 15 y que corresponde a un polipéptido codificado por el ORF'2 de un circovirus MAP de tipo B de secuencia genómica SEC ID nº 9 que presenta unas variaciones relacionadas con unas mutaciones en el seno de las cepas de circovirus MAP de tipo B, comprendiendo este polipéptido de secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 12 por lo menos el polipéptido de secuencia SEC ID nº 17,

con la excepción:

- de los polipéptidos codificados por las secuencias nucleotídicas denominadas COL13 de los circovirus de tipo II cepa IMP1011-48121 e IMP1011-48285 cuyas secuencias se describen en a).

2. Compuesto para su uso como vacuna, caracterizado porque dicho compuesto se selecciona de entre los siguientes compuestos:

- a) una secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 12, y que corresponde al ORF'2 de un circovirus MAP de tipo B de secuencia genómica SEC ID nº 9 que presenta unas variaciones relacionadas con unas mutaciones en el seno de las cepas de circovirus MAP de tipo B, comprendiendo esta secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 12 por lo menos la secuencia nucleica que codifica para el polipéptido de secuencia SEC ID nº 18,

con la excepción:

- de las secuencias nucleotídicas descritas en la solicitud internacional de patente publicada el 15 de abril de 1999 con el número WO 99/18214 denominadas COL13 de los circovirus de tipo II:

cepa IMP1011-48121 de secuencia:

Secuencia del aislado PCV Imp1011-48121

ES 2 317 679 T5

```

1  AATTCAACCT TAACCTTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GTATAGAGAT
51  TTTGTTGGTC CCCCCTCCCG GGGGAACAAA GTCGTCAATT TTAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GCGGTTGTGA CTGTGGTACG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TCGGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
201 CCAACGGTAG CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTGCG GTAACGCCTC
301 CTTGGATACG TCATAGCTGA AAACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCACATA AAAGGTGGGT
451 GTTCACGCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGAGC
501 TCCCAATCTC CCTATTTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTT GCTAATTTTG TGAAGAAGCA
601 AACTTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCCAAAGG AACTGATCAG CAGAATAAAG AATATTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTTA TTGAATGTGG AGCTCCTCGA TCTCAAGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTTGTGGA GAGCGGGAGT CTGCTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCCTGTA ACCTTTGTCA GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACCTTTGA AAGTGAGCGG GAAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACCAA
901 TGTACACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTTGC AGACCCGGA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCGTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGAAGTGTAG GACTAAAGGT GGAAGTGTAC CTTTTTGGC CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTCT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGGT

1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCCTT
1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TTAGGGTTTA AGTGGGGGGT
1401 CTTTAAGATT AAATTCTCTG AATTGTACAT ACATGGTTAC ACGGATATTG
1451 TAGTCCTGGT CGTATTTACT GTTTTCGAAC GCAGCGCCGA GGCTACGTC
1501 GTCCACATTT CCAGAGGTTT GTAGTCTCAG CCAAAGCTGA TTCCTTTTGT
1551 TATTTGGTTG GAAGTAATCA ATAGTGGAGT CAAGAACAGG TTTGGGTGTG
1601 AAGTAACGGG AGTGGTAGGA GAAGGGTTGG GGGATTGTAT GCGGGGAGGA
1651 GTAGTTTACA TATGGGTCAT AGGTTAGGGC TGTGGCCTTT GTTACAAAGT
1701 TATCATCTAG AATAACAGCA GTGAGGCCCA CTCCCCTATC ACCCTGGGTG
1751 ATGGGGGAGC AGGGCCAG

```

5

cepa IMP1011-48285 de secuencia:

Secuencia del aislado PCV Imp1011-48285

```

1  AATCAACCT TAACCTTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG
51  GGGGTTTGAG CCCCTCCTG GGGGAAGAAA GTCATTAATA TTGAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGGTTTTGA CTGTGGTTCG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TCGGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTCTCTCT
201 CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC
301 CTTGGATACG TCATATCTGA AAACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCCATA AAAGTGGGT
451 GTTCACTCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGATC
501 TTCCAATATC CCTATTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTC GCTAATTTTG TGAAGAAGCA
601 GACTTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCGAAAGG AACAGATCAG CAGAATAAAG AATACTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTGA TGGAGTGTGG AGCTCCTAG TCTCAGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CTTGTTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCCTGTA ACGTTTGTC GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTGA AAGTGAGCGG GAAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACTAA
901 TGTACACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGTAAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTTGC AGACCCGGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCCTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGAAGTGTAC CTTTTTGGC CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAAGTCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTTT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGGA

1251 AGAATGCTAC AGAACAAATCC ACGGAGGAAG GGGCCAGTT CGTCACCCCT
1301 TCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTT
1351 TATCACTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TAAGGGTTAA GTGGGGGTC
1401 TTTAAGATTA AATTCTCTGA ATTGTACATA CATGTTTACA CGGATATTGT
1451 ATTCCTGGTC GTATATACTG TTTTCGAACG CAGTGCCGAG GCCTACGTGG
1501 TCTACATTC CAGTAGTTTG TAGTCTCAGC CACAGCTGAT TTCTTTTCTT
1551 GTTTGGTTGG AAGTAATCAA TAGTGAATC TAGGACAGGT TTGGGGGTAA
1601 AGTAGCGGGA GTGGTAGGAG AAGGGCTGGG TTATGGTATG GCGGAGGAG
1651 TAGTTTACAT AGGGGTCATA GGTGAGGCT GTGGCCTTGT TTACAAAGTT
1701 ATCATCTAGA ATAACAGCAC TGGAGCCAC TCCCTGTCA CCCTGGGTGA
1751 TCGGGAGCA GGGCCAG

```

- 5 b) un polipéptido de secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 15 y que corresponde a un polipéptido codificado por el ORF'2 de un circovirus MAP de tipo B de secuencia genómica SEC ID nº 9 que presenta unas variaciones relacionadas con unas mutaciones en el seno de las cepas de circovirus MAP de tipo B, comprendiendo este polipéptido de secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 15 por lo menos el polipéptido de secuencia SEC ID nº 18,

con la excepción:

- de los polipéptidos codificados por las secuencias nucleotídicas denominadas COL13 de los circovirus de tipo II cepa IMP1011-48121 e IMP1011-48285 cuyas secuencias se describen en a).

3. Compuesto para su uso como vacuna, caracterizado porque dicho compuesto se selecciona de entre los siguientes compuestos:

a) una secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 12, y que corresponde al ORF'2 de un circovirus MAP de tipo B de secuencia genómica SEC ID nº 9 que presenta unas variaciones relacionadas con unas mutaciones en el seno de las cepas de circovirus MAP de tipo B, comprendiendo esta secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 12 por lo menos la secuencia nucleica que codifica para el polipéptido de secuencia SEC ID nº 19,

con la excepción:

- de las secuencias nucleotídicas descritas en la solicitud internacional de patente publicada el 15 de abril de 1999 con el número WO 99/18214 denominadas COL13 de los circovirus de tipo II:

cepa IMP1011-48121 de secuencia:

Secuencia del aislado PCV Imp1011-48121

```

1  AATTCAACCT TAACCTTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GTATAGAGAT
51  TTGTGTGGTC CCCCTCCCCG GGGGAACAAA GTCGTCAATT TTAAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGGTGTGA CTGTGGTACG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TGCGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTCTCTCT
201 CCAACGCTAG CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGCGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTGCG GTAACGCCTC
301 CTGTGATACG TCATAGCTGA AAACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCACATA AAAGGTGGGT
451 GTTCAAGCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGAGC
501 TCCCAATCTC CCTATTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTC GCTAATTTG TGAAGAAGCA
601 AACTTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCCAAAGG AACTGATCAG CAGAATAAAG AATATTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTTA TTGAATGTGG AGCTCCTCGA TCTCAAGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTTGTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCCTGTA ACGTTTGTCA GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTTGA AAGTGAGCGG GAAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACCAA
901 TGTACACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTTGC AGACCCGGA ACCACATACT GGAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAACTG GTTGTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCGTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGAAGTAGA GACTAAAGGT GGAAGTGTAC CTTTTTGGC CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTCT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGGA
    
```

ES 2 317 679 T5

```

1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCCTT
1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TTAGGGTTTA AGTGGGGGGT
1401 CTTTAAGATT AAATTCTCTG AATTGTACAT ACATGGTTAC ACGGATATTG
1451 TAGTCCTGGT CGTATTTACT GTTTTCGAAC GCAGCGCCGA GGCCTACGTG
1501 GTCCACATTT CCAGAGGTTT GTAGTCTCAG CCAAAGCTGA TTCCTTTTGT
1551 TATTGTTTG GAAGTAATCA ATAGTGGAGT CAAGAACAGG TTTGGGTGTG
1601 AAGTAACGGG AGTGGTAGGA GAAGGGTTGG GGGATTGTAT GGCGGGAGGA
1651 GTAGTTTACA TATGGGTCAT AGGTTAGGGC TGTGGCCTTT GTTACAAAGT
1701 TATCATCTAG AATAACAGCA GTGGAGCCCA CTCCCCCTATC ACCCTGGGTG
1751 ATGGGGGAGC AGGGCCAG

```

Y cepa IMP1011-48285 de secuencia:

5

Secuencia del aislado PCV IMP1011-48285

```

1 AATTCAACCT TAACCTTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAG GCACAGAGCG
51 GGGGTTTGAG CCCCCTCCTG GGGGAAGAAA GTCATTAATA TTGAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGGTTCGA CTGTGGTTCG CTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TGCGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCTCTCT
201 CCAGCGGTAA CGGTGCGGG GGTGACGAG CCAGGGGCGG CGCGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC
301 CTTGATACG TCATATCTGA AAACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCGAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCCATA AAAGGTGGGT
451 GTTCACTCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGATC
501 TTCCAATATC CCTATTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTC GCTAATTTTG TGAAGAAGCA
601 GACTTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTGCGG TGCCCCCTGC CACATCGAGA
651 AAGCGAAAGG AACAGATCAG CAGAATAAAG AATACTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTGA TGGAGTGTGG AGCTCCTAGA TCTCAGGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTTGTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCTGTA ACGTTTGTC GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTTGA AAGTGAGCGG GAAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACTAA
901 TGTacACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTTGC AGACCCGGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCCTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGAAGTAGA GACTAAAGGT GGAAGTGTAC CTTTTTGGC CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGA

```

```

1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCCTT
1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TAAGGGTTAA GTGGGGGGTC
1401 TTTAAGATTA AATTCTCTGA ATTGTACATA CATGGTTACA CGGATATTGT
1451 ATTCTGGTC GTATATACTG TTTTCGAACG CAGTGCCGAG GCCTACGTGG
1501 TCCACATTTC CAGCAGTTTG TAGTCTCAGC CACAGCTGGT TTCTTTTGTT
1551 GTTTGGTTGG AAGTAATCAA TAGTGGAATC TAGGACAGGT TTGGGGGTAA
1601 AGTAGCGGGA GTGGTAGGAG AAGGGCTGGG TTATGGTATG GCGGGAGGAG
1651 TAGTTTACAT AGGGGTCTATA GGTGAGGGCT GTGGCCTTTG TTACAAAGTT
1701 ATCATCTAGA ATAACAGCAC TGGAGCCAC TCCCCTGTCA CCCTGGGTGA
1751 TCGGGGAGCA GGGCCAG

```

b) un polipéptido de secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 15 y que corresponde a un polipéptido codificado por el ORF'2 de un circovirus MAP de tipo B de secuencia genómica SEC ID nº 9 que presenta unas variaciones relacionadas con unas mutaciones en el seno de las cepas de circovirus MAP de tipo B, comprendiendo este polipéptido de secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 15 por lo menos el polipéptido de secuencia SEC ID nº 19,

con la excepción:

- de los polipéptidos codificados por las secuencias nucleotídicas denominadas COL13 de los circovirus de tipo II cepa IMP1011-48121 e IMP1011-48285 cuyas secuencias se describen en a).

4. Compuesto para su uso como vacuna, caracterizado porque dicho compuesto se selecciona de entre los siguientes compuestos:

a) una secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 12, y que corresponde al ORF'2 de un circovirus MAP de tipo B de secuencia genómica SEC ID nº 9 que presenta unas variaciones relacionadas con unas mutaciones en el seno de las cepas de circovirus MAP de tipo B, comprendiendo esta secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 12 por lo menos la secuencia nucleica que codifica para el polipéptido de secuencia SEC ID nº 20,

con la excepción:

de las secuencias nucleotídicas descritas en la solicitud internacional de patente publicada el 15 de abril de 1999 con el número WO 99/18214 denominadas COL13 de los circovirus de tipo II cepa IMP999 de secuencia:

Secuencia del aislado PCV Imp999

```

1  AATTCAACCT TAACCTTTTT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GTATAGAGAT
51  TTTGTTGGTC CCCCTCCCG GGGGAACAAA GTGTCATAA TTAAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGTTCCTGA CTGTGGTAGC CTGACAGTA
151 TATCGAAGG TCGGGGAGAG GCGGTGTTG AAGATGCCAT TTTCCTTCT
201 CCAACGGTAG CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTGCG GTAAACGCTC
301 CTTGGATACG TCATAGCTGA AAACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACACATA AAAGGTGGGT
451 GTTCACGCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGAGC
501 TCCCAATCTC CCTATTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTT GCTAATTTTG TGAAGAAGCA

```

601 AACTTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCCAAAGG AACTGATCAG CAGAATAAG AATATTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTTA TTGAATGTGG AGCTCCTCGA TCTCAAGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTTGTGGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCTGTGA ACGTTTGTC GAAATTTCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTGA AAGTGAGCGG GAAAATGCAG ARGCGTGATT GGAAGACCAA
901 TGTACACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTTGC AGACCCGGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCGTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGAACGTGAC CTTTTTTGGC CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTCT ATCGGAGGAT TACTTCTTG GTATTTTGGG
1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCCT
1301 TCCCCCAT GCCTGAATT TOCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TTAGGGTTTA AGTGGGGGT
1401 CTTTAAGATT AAATCTCTG AATTGTACAT ACATGGTTAC ACGGATATTG
1451 TAGTCTCGT CGTATATACT GTTTTCGAAC GCAGTCCGA GGCCTACGTG
1501 GTCCACATTT CTAGAGGTTT GTAGCCTCAG CCAAAGCTGA TTCCTTTTGT
1551 TATTGGTGT GAAGTAATCA ATAGTGGAGT CAAGAACAGG TTTGGGTGTG
1601 AAGTAACGG AGTGGTAGGA GAAGGGTTGG GGGATTGTAT GCGGGAGGA
1651 GTAGTTTACA TATGGGTCT AGGTAGGGC TGTGGCCTT GTTACAAAGT
1701 TATCATCTAG AATAACAGCA GTGGAGCCCA CTCCTCTATC ACCCTGGGTG
1751 ATGGGGAGC AGGGCCAG

5 cepa IMP1011-48121 de secuencia:

Secuencia del aislado PCV Imp1011-48121

1 AATTCAACCT TAACCTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG
51 GGGGTTTGAG CCCCTCCTG GGGGAAGAAA GTCATTAATA TTGAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGGTTCTGA CTGTGGTTTG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TCGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTCTCTCT
201 CCAGCGGTAA CGTGGCGGG GTTGGACGAG CCAGGGGCGG CGCGGAGGA
251 TCTGCCAAG ATGGCTGCG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCCTC
301 CTGGGATACG TCATATCTGA AAACGAAGA AGTGGCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACTCAG CAGCAACATG
401 CCGAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCCATA AAAGGTGGGT

10

```

451 GTTCACTCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGATC
501 TTCCAATATC CCTATTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTT CTAATTTTG TGAAGAAGCA
601 GACTTTTAAAT AAAGTGAAGT GGTATTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCGAAAGG AACAGATCAG CAGAATAAAG AATACTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTGA TGGAGTGTGG AGCTCCTAGA TCTCAGGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTGTGTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCCCTGT ACGTTTGTCA GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTTGA AAGTGAGCGG GAAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACTAA
901 TGTacACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTTGC AGACCCGGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCCTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGAAGTGTAC CTTTTTGGC CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTTT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGGG
1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCCT
1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTAT TAAAGGTTAA GTGGGGGGTC
1401 TTAAAGATTA AATTCTCTGA ATTGTACATA CATGGTTACA CGGATATTGT
1451 ATTCTGGTC GTATATACTG TTTTCGAACG CAGTCCGAG GCCTACGTGG
1501 TCTACATTTC CAGCAGTTTG TAGTCTCAGC CACAGCTGGT TTCTTTTGGT
1551 GTTGGTTGG AAGTAATCAA TAGTGGAATC TAGGACAGGT TTGGGGGTAA
1601 AGTAGCGGGA GTGGTAGGAG AAGGGCTGGG TTATGGTATG GCGGGAGGAG
1651 TAGTTTACAT AGGGGTCATA GGTGAGGGCT GTGGCCTTTG TTACAAAGTT
1701 ATCATCTAGA ATAACAGCAC TGGAGCCAC TCCCCTGTCA CCTGGGGTGA
1751 TCGGGGAGCA GGGOCAG

```

5

y cepa IMP1011-48285 de secuencia:

Secuencia del aislado PCV Imp1011-48285

10

```

1  AATTC AACCT TAACCTTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG
51  GGGGTTTGAG CCCCCTCCTG GGGGAAGAAA GTCATTAATA TTGAATCTCA
101 TCATGTCCAC GCGCCAGGAG GCGGTTTGA CTGTGTTTG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TCGGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
201 CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGCGGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAAAGCCTC
301 CTGGGATACG TCATATCTGA AAACGAAAGA AGTGGCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCCATA AAAGTGGGT
451 GTTCACTCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGATC
501 TTCCAATATC CCTATTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTC GCTAATTTTG TGAAGAAGCA
601 GACTTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCGAAAGG AACAGATCAG CAGAATAAG AATACTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTGA TGGAGTGTG AGCTCCTAG TCTCAGGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTGTGTGA GAGCGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCCTGTA ACGTTGTCA GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTTGA AAGTGAGCG GAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACTAA
901 TGTACACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTTGC AGACCCGGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCCTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGA CTGTAGTA GACTAAAGT GGAAGTGTAC CTTTTTGGC CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTTT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGA

1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCCT
1301 TCCCCCCCAT GCGCTGAAT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTT TATTATTCAT TAAGGGTTAA GTGGGGGGTC
1401 TTTAAGATTA AATTCTCTGA ATTGTACATA CATGGTTACA CGGATATTGT
1451 ATTCTGTGTC GTATATACTG TTTTCGAACG CAGTGCAGAG GCCTACGTGG
1501 TCTACATTTT CAGTAGTTTG TAGTCTCAGC CACAGCTGAT TTCTTTTGT
1551 GTTTGGTTGG AAGTAATCAA TAGTGGAATC TAGGACAGGT TTGGGGGTAA
1601 AGTAGCGGGA GTGGTAGGAG AAGGGCTGGG TTATGGTATG GCGGGAGGAG
1651 TAGTTTACAT AGGGGTCATA GGTGAGGGCT GTGGCCTTTG TTACAAAGTT
1701 ATCATCTAGA ATAACAGCAC TGGAGCCAC TCCCTGTCA CCTGGGTGA
1751 TCGGGGAGCA GGGCCAG

```

- 5 b) un polipéptido de secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 15 y que corresponde a un polipéptido codificado por el ORF2 de un circovirus MAP de tipo B de secuencia genómica SEC ID nº 9 que presenta unas variaciones relacionadas con unas mutaciones en el seno de las cepas de circovirus MAP de tipo B, comprendiendo este polipéptido de secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia

SEC ID nº 15 por lo menos el polipéptido de secuencia SEC ID nº 20,

con la excepción:

- 5 - de los polipéptidos codificados por las secuencias nucleotídicas denominadas COL13 de los circovirus de tipo II cepa IMP999, IMP1011-48121 e IMP1011-48285 cuyas secuencias se describen en a).

10 5. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dicha vacuna se destina a la prevención o al tratamiento de una infección por un circovirus MAP de tipo B de secuencia genómica SEC ID nº 9 o por una de sus variantes asociadas con la enfermedad del adelgazamiento del lechón (MAP).

15 6. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dicha secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 12 tiene por lo menos 90% de identidad con la secuencia SEC ID nº 12.

15 7. Compuesto según la reivindicación 6, caracterizado porque dicha secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 90% de identidad con la secuencia SEC ID nº 12 es la secuencia SEC ID nº 12.

20 8. Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dicho polipéptido de secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad con la secuencia SEC ID nº 15 es un polipéptido de secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad con la secuencia SEC ID nº 15.

25 9. Compuesto según la reivindicación 8, caracterizado porque dicho polipéptido de secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad es el polipéptido de secuencia SEC ID nº 15.

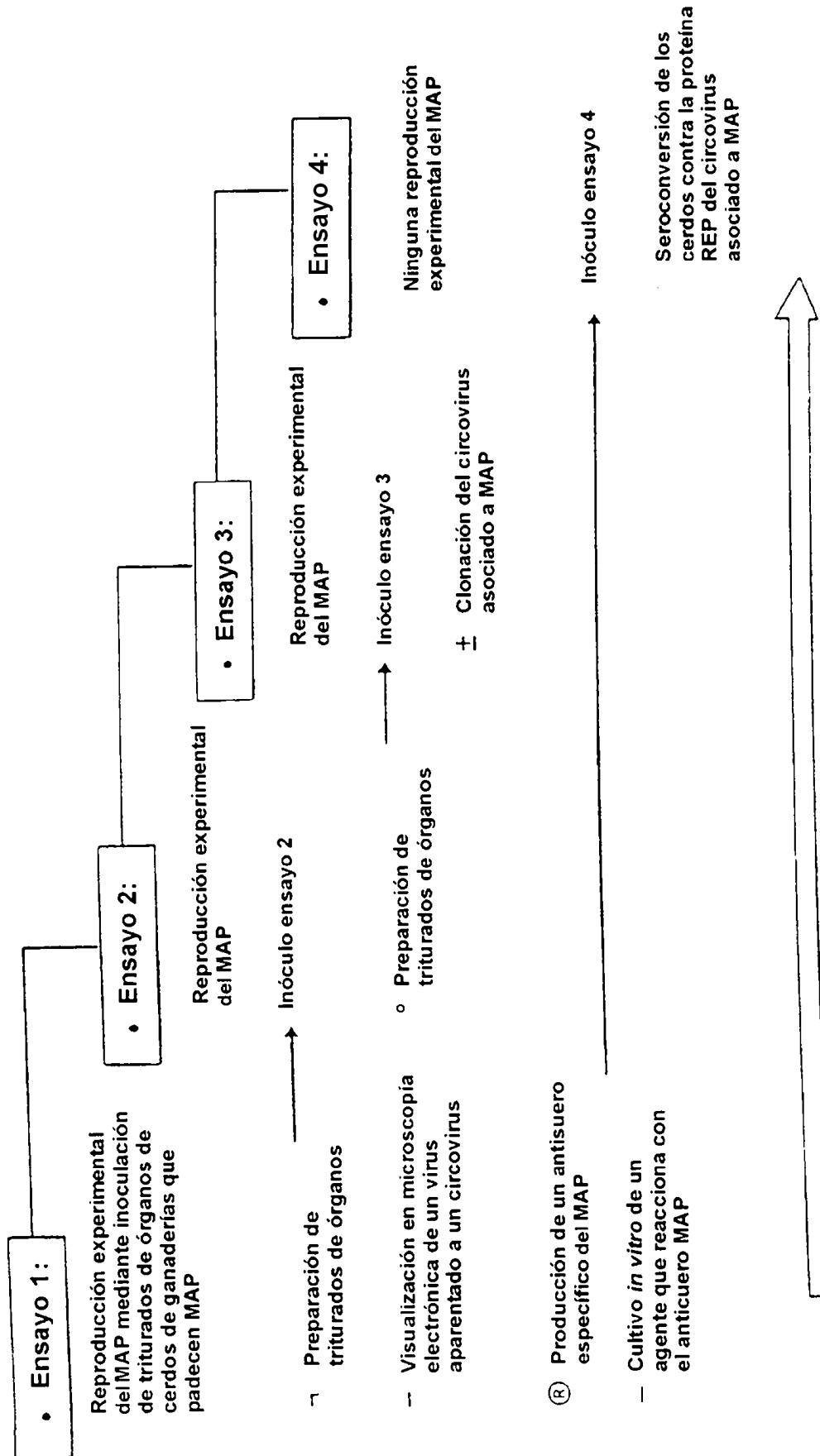


FIGURA 1

```

      Leu Ala Ser Arg Cys Arg Cys Cys Arg Pro Leu Thr Leu Ser Phe Ala Leu Cys
      Trp Arg Val Glu Ala Ala Ala Ala Gly Arg Cys Arg *** His Phe His Trp Ala
      Gly Ala Cys Lys Pro Leu Pro Leu Val Glu Ala Ala Asp Thr Phe Ile Gly Leu
      ---
3'  TGG TCG CGT GAA GCC GTC GCC GTC GTG GAG CCG TCG CAG TCA CTT TTA CGG TTC
      9      18      27      36      45      54
5'  ACC AGC GCA CTT CGG CAG CGG CAG CAC CTC GCC AGC GTC AGT GAA AAT GCC AAG
      ---
      Thr Ser Ala Leu Arg Gln Arg Gln His Leu Gly Ser Val Ser Glu Asn Ala Lys
      Pro Ala His Phe Gly Ser Gly Ser Thr Ser Ala Ala Ser Val Lys Met Pro Ser
      Gln Arg Thr Ser Ala Ala Ala Ala Pro Arg Gln Arg Gln *** Lys Cys Gln Ala

      Ser Phe Arg Gly Ala Val Gly Tyr Ser Thr Pro Thr *** Gly *** Tyr Asp Lys
      Leu Phe Ala Ala Arg Leu Gly Met Leu Pro Pro His Glu Gly Lys Ile Ile Arg
      Leu Phe Leu Pro Gly Cys Gly Trp Leu Leu His Thr Asn Val Arg Leu Leu Gly
      ---
      GTT CTT TTC GCC GGG CGT TGG GGT ATT CTC CAC CCA CAA GTG GGA ATT ATT AGG
      63      72      81      90      99      108
      CAA GAA AAG CGG CCC GCA ACC CCA TAA GAG GTG GGT GTT CAC CCT TAA TAA TCC
      ---
      Gln Glu Lys Arg Pro Ala Thr Pro *** Glu Val Gly Val His Pro *** Ser
      Lys Lys Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg Trp Val Phe Thr Leu Asn Asn Pro
      Arg Lys Ala Ala Arg Asn Pro Ile Arg Gly Gly Cys Ser Pro Leu Ile Ile Leu

      Arg Pro Pro Ser Phe Cys Phe Val Pro Ala Glu Leu Arg Gly Lys Gln Asn Asn
      Gly Leu Leu Leu Phe Val Phe Tyr Pro Leu Lys Trp Asp Gly Lys Lys Ile Ile
      Glu Ser Ser Ser Phe Phe Leu Ile Arg Ser Ser Gly Ile Glu Arg Lys Ser ***
      ---
      AAG GCT CCT CCT CTT TTT GTT TTA TGC CCT CGA AGG TTA GAG GGA AAA ACT AAT
      117      126      135      144      153      162
      TTC CGA GGA GGA GAA AAA CAA AAT ACG GGA CCT TCC AAT CTC CCT TTT TGA TTA
      ---
      Phe Arg Gly Gly Glu Lys Gln Asn Thr Gly Ala Ser Asn Leu Pro Phe *** Leu
      Ser Glu Glu Glu Lys Asn Lys Ile Arg Glu Leu Pro Ile Ser Leu Phe Asp Tyr
      Pro Arg Arg Arg Lys Thr Lys Tyr Gly Ser Phe Gln Ser Pro Phe Leu Ile Ile

      Gln Lys His Arg Pro Leu Asn Pro Leu Pro Tyr Phe Glu Glu Gly Gly Pro Thr
      Lys Asn Thr Ala Leu Phe Thr Gln Phe Leu Thr Ser Ser Arg Val Glu Leu Pro
      Lys Thr Gln Pro Ser Ser Pro Lys Ser Ser Pro Leu Val Gly *** Arg Trp Pro
      ---
      AAA ACA AAC ACC GCT CCT TCC AAA CCT TCT CCC ATC TTG AGG AGT GGA GGT CCC
      171      180      189      198      207      216
      TTT TGT TTG TGG CGA GGA AGG TTT GGA AGA GGG TAG AAC TCC TCA CCT CCA GGG
      ---
      Phe Cys Leu Trp Arg Gly Arg Phe Gly Arg Gly *** Asn Ser Ser Pro Pro Gly
      Phe Val Cys Gly Glu Glu Gly Leu Glu Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Gln Gly
      Leu Phe Val Ala Arg Lys Val Trp Lys Arg Val Glu Leu Leu Thr Ser Arg Gly

      Gln Ser Asn Gln *** Ser Ala Ser Lys *** Cys Pro Ser Thr Thr Asn Gln His
      Lys Arg Ile Lys Ser Leu Leu Leu Ser Lys Val Leu His Leu Pro Ile Lys Thr
      Asn Ala Phe Lys Ala Leu Phe Cys Val Lys Leu Leu Thr Phe His Tyr Lys Pro
      ---
      CAA ACG CTT AAA ACG ATT CTT CGT CTG AAA ATT GTT CCA CTT CAC CAT AAA ACC
      225      234      243      252      261      270
      GTT TGC GAA TTT TGC TAA GAA GCA GAC TTT TAA CAA GGT GAA GTG GTA TTT TGG
      ---
      Val Cys Glu Phe Cys *** Glu Ala Asp Phe *** Gln Gly Glu Val Val Phe Trp
      Phe Ala Asn Phe Ala Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Phe Gly
      Leu Arg Ile Leu Leu Arg Ser Arg Leu Leu Thr Arg *** Ser Gly Ile Leu Val

```

FIGURA 2

Gly Ser Gly Cys Arg Ser Leu Ser Leu Phe Arg Gly Ala Ser Tyr Leu Ile Ser
 Gly Ala Ala Val Asp Leu Phe Arg Phe Ser Gly Val Leu Leu Ile Phe Phe Val
 Ala Arg Gln Trp Met Ser Phe Ala Phe Pro Val Ser Trp Cys Phe Leu Ser Tyr

 ACG GGC GAC GGT GTA GCT CTT TCG CTT TCC TTG GCT GGT CGT CTT ATT TCT TAT
 279 288 297 306 315 324
 TGC CCG CTG CCA CAT CGA GAA AGC GAA AGG AAC CGA CCA GCA GAA TAA AGA ATA

 Cys Pro Leu Pro His Arg Glu Ser Glu Arg Asn Arg Pro Ala Glu *** Arg Ile
 Ala Arg Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr
 Pro Ala Ala Thr Ser Arg Lys Arg Lys Glu Pro Thr Ser Arg Ile Lys Asn Thr

Cys Tyr Leu Leu Gly Cys Val *** Arg Thr His Leu Glu Ala Ser Gly Pro Ser
 Ala Thr Phe Phe Ala Val Tyr Lys Asp Leu Thr Ser Ser Arg Pro Val Leu Pro
 Gln Leu Leu Ser Pro Trp Met Ser Ile Ser His Pro Ala Gly Arg Phe Trp Pro

 GAC GTC ATT TCT TCC GGT GTA TGA ATA GCT CAC ACC TCG AGG CGC CTT GGT CCC
 333 342 351 360 369 378
 CTG CAG TAA AGA AGG CCA CAT ACT TAT CGA GTG TGG AGC TCC GCG GAA CCA GGG

 Leu Gln *** Arg Arg Pro His Thr Tyr Arg Val Trp Ser Ser Ala Glu Pro Gly
 Cys Ser Lys Glu Gly His Ile Leu Ile Glu Cys Gly Ala Pro Arg Asn Gln Gly
 Ala Val Lys Lys Ala Thr Tyr Leu Ser Ser Val Glu Leu Arg Gly Thr Arg Gly

Ala Cys Arg Gly Thr *** Gln Gln Ser Tyr Gly Lys Pro Ser Pro Thr Lys Pro
 Leu Ala Ala Val Gln Arg Ser Ser His Thr Gly Lys Gln Leu Arg Pro Arg Gln
 Phe Arg Leu Ser Arg Asp Val Ala Thr Leu Val Arg Lys Ser Val Pro Asp Lys

 CTT CGC GTC GCT GGA CAG ATG ACG ACA CTC ATG GGA AAA CCT CTG CCC CAG AAA
 387 396 405 414 423 432
 GAA GCG CAG CGA CCT GTC TAC TGC TGT GAG TAC CCT TTT GGA GAC GGG GTC TTT

 Glu Ala Gln Arg Pro Val Tyr Cys Cys Glu Tyr Pro Phe Gly Asp Gly Val Phe
 Lys Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu Thr Gly Ser Leu
 Ser Ala Ala Thr Cys Leu Leu Leu *** Val Pro Phe Trp Arg Arg Gly Leu Trp

Ser Gln Leu Arg Ala Thr Glu Gln Leu Thr His Ser Phe Asn Gly Arg Ala Pro
 His Ser Tyr Gly Leu Leu Lys Arg Tyr Arg Ile His Ser Ile Glu Ala Pro Gln
 Thr Val Thr Ala Ser Cys Asn Gly Thr Val Tyr Thr Leu Phe Lys Arg Pro Ser

 CCA CTG ACA TCG GCT CGT CAA AGG ACA TTG CAT ACA CTC TTT AAA GGC GCC CGA
 441 450 459 468 477 486
 GGT GAC TGT AGC CGA GCA GTT TCC TGT AAC GTA TGT GAG AAA TTT CCG CGG GCT

 Gly Asp Cys Ser Arg Ala Val Ser Cys Asn Val Cys Glu Lys Phe Pro Arg Ala
 Val Thr Val Ala Glu Gln Phe Pro Val Thr Tyr Val Arg Asn Phe Arg Gly Leu
 *** Leu *** Pro Ser Ser Phe Leu *** Arg Met *** Glu Ile Ser Ala Gly Trp

Gln Val Lys Ser Leu Ser Arg Ser Ser Ala Ala Ala His Asn Ser Ser Leu Gln
 Ser Phe Lys Gln Phe His Ala Pro Leu His Leu Leu Thr Ile Pro Leu Cys Ser
 Ala Ser Ser Lys Phe Thr Leu Pro Phe Ile Cys Cys Arg Ser Gln Phe Val Ala

 CCG ACT TGA AAA CTT TCA CTC GCC CTT CTA CGT CGT CGC ACT AAC CTT CTG TCG
 495 504 513 522 531 540
 GGC TGA ACT TTT GAA AGT GAG CGG GAA GAT GCA GCA CCG TGA TTG GAA GAC AGC

 Gly *** Thr Phe Glu Ser Glu Arg Glu Asp Ala Ala Ala *** Leu Glu Asp Ser
 Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met Gln Gln Arg Asp Trp Lys Thr Ala
 Leu Asn Phe *** Lys *** Ala Gly Arg Cys Ser Ser Val Ile Gly Arg Gln Leu

FIGURA 2 (continuación 1)

Val Arg *** Leu Pro Gly Ala Arg Asn His Ser Ser Gly Thr Pro Gly Tyr Asn
 Tyr Val Asp Tyr His Ala Arg Gly Thr Thr Pro Leu Ala Leu Pro Gly Thr Ile
 Thr Cys Thr Met Thr Pro Gly Gly Pro Gln Pro Phe Leu Trp His Ala Arg Leu

 ACA TGT GCA GTA TCA CCC GGG CGG GCC AAC ACC CTT CTC GGT CAC CCG GGC ATT
 549 558 567 576 585 594
 TGT ACA CGT CAT AGT GGG CCC GCC CGG TTG TGG GAA GAG CCA GTG GGC CCG TAA

 Cys Thr Arg His Ser Gly Pro Ala Arg Leu Trp Glu Glu Pro Val Gly Pro ***
 Val His Val Ile Val Gly Pro Pro Gly Cys Gly Lys Ser Gln Trp Ala Arg Asn
 Tyr Thr Ser *** Trp Ala Arg Pro Val Val Gly Arg Ala Ser Gly Pro Val Ile

Gln Gln Ala *** Pro Cys Arg Ser Ser Ala *** Tyr Phe Tyr Thr Thr Pro His
 Lys Ser Leu Arg Pro Val Gly Val Pro Leu Arg Thr Ser Ile Leu Pro Pro Ile
 Lys Ala Ser Gly Leu Ser Val *** Gln Phe Gly Leu Leu Phe Leu His His Ser

 AAA ACG ACT CGG ATC CCT GTG GAT GAC CTT CGG ATC ATC TTT ATT CAC CAC CCT
 603 612 621 630 639 648
 TTT TGC TGA GCC TAG GGA CAC CTA CTG GAA GCC TAG TAG AAA TAA GTG GTG GGA

 Phe Cys *** Ala *** Gly His Leu Leu Glu Ala *** *** Lys *** Val Val Gly
 Phe Ala Glu Pro Arg Asp Thr Tyr Trp Lys Pro Ser Arg Asn Lys Trp Trp Asp
 Leu Leu Ser Leu Gly Thr Pro Thr Gly Ser Leu Val Glu Ile Ser Gly Gly Met

Ile Asp His Leu Leu Leu Gln Gln Lys Pro His Asn Lys His Ser Thr Val Lys
 Ser Ile Met Ser Phe Phe Asn Asn Asn Gln Ile Ile Lys Ile Ala Pro *** Arg
 Pro Tyr *** Pro Ser Ser Thr Thr Thr Lys Ser Ser Lys *** Pro Gln Asn Gly

 ACC TAT AGT ACC TCT TCT TCA ACA ACA AAA CCT ACT AAA AAT ACC GAC CAA TGG
 657 666 675 684 693 702
 TGG ATA TCA TGG AGA AGA AGT TGT TGT TTT GGA TGA TTT TTA TGG CTG GTT ACC

 Trp Ile Ser Trp Arg Arg Ser Cys Cys Phe Gly *** Phe Leu Trp Leu Val Thr
 Gly Tyr His Gly Glu Glu Val Val Val Leu Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro
 Asp Ile Met Glu Lys Lys Leu Leu Phe Trp Met Ile Phe Met Ala Gly Tyr Leu

Pro His Asp Val Ser Val Thr His Gly Thr Asp Met Ser Gln Leu Ser *** Leu
 Pro Ile Ile *** Gln Ser Gln Thr Val Pro Ile Trp Gln Ser Tyr Leu Ser Phe
 Gln Ser Ser Arg Ser Leu Ser His Ser Arg Tyr Gly Asn Val Thr Ser Val Leu

 AAC CCT ACT AGA TGA CTC TGA CAC ACT GGC CAT AGG TAA CTG ACA TCT CTG ATT
 711 720 729 738 747 756
 TTG GGA TGA TCT ACT GAG ACT GTG TGA CCG GTA TCC ATT GAC TGT AGA GAC TAA

 Leu Gly *** Ser Thr Glu Thr Val *** Pro Val Ser Ile Asp Cys Arg Asp ***
 Trp Asp Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys
 Gly Met Ile Tyr *** Asp Cys Val Thr Gly Ile His *** Leu *** Arg Leu Lys

Pro Tyr Gln Glu Lys Lys Pro Gly Cys Tyr Lys Ser *** Trp Cys Asp Pro Gly
 Pro Thr Ser Asn Arg Lys Gln Gly Ala Thr Asn Gln Asn Gly Ala Ile Leu Gly
 Pro Pro Val Thr Gly Lys Lys Ala Arg Leu Ile Lys Ile Val Leu Leu *** Ala

 TCC CCC ATG ACA AGG AAA AAA CCG GGC GTC ATA AAA CTA ATG GTC GTT AGT CCG
 765 774 783 792 801 810
 AGG GGG TAC TGT TCC TTT TTT GGC CCG CAG TAT TTT GAT TAC CAG CAA TCA GGC

 Arg Gly Tyr Cys Ser Phe Phe Gly Pro Gln Tyr Phe Asp Tyr Gln Gln Ser Gly
 Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn Gln Ala
 Gly Val Leu Phe Leu Phe Trp Pro Ala Val Phe *** Leu Pro Ala Ile Arg Pro

FIGURA 2 (continuación 2)

Gly Pro Ile Thr Ser Arg Leu Gln Gln Gly Leu Gln Leu Leu Glu Arg Asp Ser
 Gly Leu Phe Pro Val Gly *** Ser Ser Asp Trp Ser Tyr Phe Ser Glu Ile Pro
 Gly Trp Ser His Tyr Glu Glu Val Ala Thr Gly Ala Thr Ser Ala Arg *** Arg

 GGG GGT CCT TAC CAT GAG GAG TTG ACG ACA GGG TCG ACA TCT TCG AGA GAT AGC
 819 828 837 846 855 864
 CCC CCA GGA ATG GTA CTC CTC AAC TGC TGT CCC AGC TGT AGA AGC TCT CTA TCG

 Pro Pro Gly Met Val Leu Leu Asn Cys Cys Pro Ser Cys Arg Ser Ser Leu Ser
 Pro Gln Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu Ala Leu Tyr Arg
 Pro Arg Asn Gly Thr Pro Gln Leu Leu Ser Gln Leu *** Lys Leu Ser Ile Gly

Ser *** *** Lys Ala Ile Lys Ser Ser Gln Gln Leu Val Ile Trp Pro Pro Val
 Pro Asn Ser Ser Gln Leu Lys Pro Leu Ser Ser Ser Phe Leu Gly Arg Leu Tyr
 Leu Ile Val Val Lys Cys Asn Gln Phe Val Ala Pro Ser Cys Asp Val Ser Thr

 CTC CTA ATG ATG AAA CGT TAA AAC CTT CTG ACG ACC TCT TGT TAG GTG CCT CCA
 873 882 891 900 909 918
 GAG GAT TAC TAC TTT GCA ATT TTG GAA GAC TGC TGG AGA ACA ATC CAC GGA GGT

 Glu Asp Tyr Tyr Phe Ala Ile Leu Glu Asp Cys Trp Arg Thr Ile His Gly Gly
 Arg Ile Thr Thr Leu Gln Phe Trp Lys Thr Ala Gly Glu Gln Ser Thr Glu Val
 Gly Leu Leu Leu Cys Asn Phe Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asn Pro Arg Arg Tyr

Arg Leu Gly Ile Gln Leu Leu Pro Gly Val Arg His Gly Lys Gly Met Tyr Phe
 Gly Phe Ala Ser Lys Phe Cys His Val Trp Gly Thr Gly Lys Glu Trp Ile Phe
 Gly Ser Pro Arg Asn Ser Ala Thr Ser Gly Gly Gln Ala Arg Lys Gly Tyr Leu

 TGG GCT TCC GGC TAA ACT TCG TCA CCT GGG TGG GAC ACG GGA AAA GGG TAT ATT
 927 936 945 954 963 972
 ACC CGA AGG CCG ATT TGA AGC AGT GGA CCC ACC CTG TCC CCT TTT CCC ATA TAA

 Thr Arg Arg Pro Ile *** Ser Ser Gly Pro Thr Leu Cys Pro Phe Pro Ile ***
 Pro Glu Gly Arg Phe Glu Ala Val Asp Pro Pro Cys Ala Leu Phe Pro Tyr Lys
 Pro Lys Ala Asp Leu Lys Gln Trp Thr His Pro Val Pro Phe Ser His Ile Lys

Leu Asn Ser Leu Arg Lys Gln *** *** Met Thr Ile Thr Lys Ile Lys Ile ***
 Tyr Ile Val Ser Asp Lys Lys Asn Asp Cys Arg Leu Pro Lys *** Lys *** Glu
 Ile Phe *** Gln Thr Lys Lys Thr Ile Val Asp Tyr His Asn Lys Asn Lys Asn

 TTA TTT AAT GAC TCA GAA AAA ACA ATA GTG TAG CAT TAC CAA AAA TAA AAA TAA
 981 990 999 1008 1017 1026
 AAT AAA TTA CTG AGT CTT TTT TGT TAT CAC ATC GTA ATG GTT TTT ATT TTT ATT

 Asn Lys Leu Leu Ser Leu Phe Cys Tyr His Ile Val Met Val Phe Ile Phe Ile
 Ile Asn Tyr *** Val Phe Phe Val Ile Thr Ser *** Trp Phe Leu Phe Leu Phe
 *** Ile Thr Glu Ser Phe Leu Leu Ser His Arg Asn Gly Phe Tyr Phe Tyr Ser

Lys Ser Pro Arg Glu Pro Tyr Ile Arg Gln Ile Thr Cys Leu Tyr Asp Val Lys
 Asn Leu Pro Asp Lys Leu Ile Phe Glu Arg Phe Gln Val Tyr Ile Thr Leu Arg
 Met *** Leu Thr Lys *** Ser Leu Asn Glu Ser Asn Tyr Met Phe Leu *** Gly

 GTA AAT CTC CCA GAA AGT CCT ATT TAA GAG ACT TAA CAT GTA TTT ATC AGT TGG
 1035 1044 1053 1062 1071 1080
 CAT TTA GAG GGT CTT TCA GGA TAA ATT CTC TGA ATT GTA CAT AAA TAG TCA ACC

 His Leu Glu Gly Leu Ser Gly *** Ile Leu *** Ile Val His Lys *** Ser Thr
 Ile *** Arg Val Phe Gln Asp Lys Phe Ser Glu Leu Tyr Ile Asn Ser Gln Pro
 Phe Arg Gly Ser Phe Arg Ile Asn Ser Leu Asn Cys Thr *** Ile Val Asn Leu

FIGURA 2 (continuación 3)

Gly Cys Leu Lys Pro Ser His Asn Cys Lys Pro Ala Cys Leu Gly Pro Arg His
 Val Val Tyr Asn Gln Ala Thr Thr Ala Asn Gln Leu Ala Tyr Gly Leu Gly Thr
 *** Trp Met Ile Lys Pro Gln Pro Gln Met Lys Ser Arg Met Ala Trp Ala Gln

 AAT GGT GTA TTA AAA CCC GAC ACC AAC GTA AAA CCT CGC GTA TCG GGT CCG GAC
 1089 1098 1107 1116 1125 1134
 TTA CCA CAT AAT TTT GGG CTG TGG TTG CAT TTT GGA GCG CAT AGC CCA GGC CTG

 Leu Pro His Asn Phe Gly Leu Trp Leu His Phe Gly Ala His Ser Pro Gly Leu
 Tyr His Ile Ile Leu Gly Cys Gly Cys Ile Leu Glu Arg Ile Ala Gln Ala Cys
 Thr Thr *** Phe Trp Ala Val Val Ala Phe Trp Ser Ala *** Pro Arg Pro Val

Ala Arg Cys Gln His Pro Tyr Lys Phe Pro Ala Val Ala Pro Lys Lys *** ***
 His Glu Val Asn Thr His Thr Asn Leu His Leu Trp Leu Gln Asn Arg Lys Asn
 Thr Ser Ser Met Pro Thr Pro Ile *** Ile Ser Gly Cys Ser Thr Glu Lys Ile

 ACA CGA GCT GTA ACC ACA CCC ATA AAT TTA CCT CGG TGT CGA CCA AAG AAA ATA
 1143 1152 1161 1170 1179 1188
 TGT GCT CGA CAT TGG TGT GGG TAT TTA AAT GGA GCC ACA GCT GGT TTC TTT TAT

 Cys Ala Arg His Trp Cys Gly Tyr Leu Asn Gly Ala Thr Ala Gly Phe Phe Tyr
 Val Leu Asp Ile Gly Val Gly Ile *** Met Glu Pro Gln Leu Val Ser Phe Ile
 Cys Ser Thr Leu Val Trp Val Phe Lys Trp Ser His Ser Trp Phe Leu Leu Leu

Lys Ala Pro Val Leu *** Asn Asn Pro Arg Ala Arg Thr Gln Pro His Leu Val
 Asn Pro Gln Phe Trp Asp Ile Thr Gln Asp Leu Glu Pro Lys Pro Thr Phe Tyr
 Ile Gln Ser Ser Gly Ile Leu Gln Lys Thr *** Ser Gln Asn Pro Pro Ser Thr

 ATA AAC CGA CCT TGG TTA GTT AAC AAA CCA GAT CGA GAC CAA ACC CCC ACT TCA
 1197 1206 1215 1224 1233 1242
 TAT TTG GCT GGA ACC AAT CAA TTG TTT GGT CTA GCT CTG GTT TGG GGG TGA AGT

 Tyr Leu Ala Gly Thr Asn Gln Leu Phe Gly Leu Ala Leu Val Trp Gly *** Ser
 Ile Trp Leu Glu Pro Ile Asn Cys Leu Val *** Leu Trp Phe Gly Gly Glu Val
 Phe Gly Trp Asn Gln Ser Ile Val Trp Ser Ser Ser Gly Leu Gly Val Lys Tyr

Gln Leu Pro Leu Tyr Leu Ala Ala Lys His His Pro Pro Leu Leu Leu *** Tyr
 Arg Ser His Tyr Thr Phe Pro Gln Arg Ile Thr His Arg Ser Ser Tyr Asn Ile
 Gly Pro Thr Thr Pro Leu Pro Ser Gly *** Pro Thr Ala Pro Pro Thr Thr Leu

 TGG ACC TCA CCA TCC ATT TCC CGA CGG AAT ACC ACA CCG CCC TCC TCA TCA ATT
 1251 1260 1269 1278 1287 1296
 ACC TGG AGT GGT AGG TAA AGG GCT GCC TTA TGG TGT GGC GGG AGG AGT AGT TAA

 Thr Trp Ser Gly Arg *** Arg Ala Ala Leu Trp Cys Gly Gly Arg Ser Ser ***
 Pro Gly Val Val Gly Lys Gly Leu Pro Tyr Gly Val Ala Gly Gly Val Val Asn
 Leu Glu Trp *** Val Lys Gly Cys Leu Met Val Trp Arg Glu Glu *** Leu Ile

Leu Pro *** Leu Gly Leu Gln His Leu Pro Asn Cys Leu Gln Cys Gly Leu Tyr
 Tyr Pro Asp Tyr Ala Leu Asn Thr Ser Pro Thr Val Phe Asn Ala Asp Leu Ile
 Ile Pro Thr Met Pro Trp Thr Pro Pro Pro Pro *** Leu Thr Pro Met Trp Ser

 ATA TCC CCA GTA TCC GGT TCA ACC ACC TCC CCC AAT GTT TCA ACC GTA GGT TCT
 1305 1314 1323 1332 1341 1350
 TAT AGG GGT CAT AGG CCA AGT TGG TGG AGG GGG TTA CAA AGT TGG CAT CCA AGA

 Tyr Arg Gly His Arg Pro Ser Trp Trp Arg Gly Leu Gln Ser Trp His Pro Arg
 Ile Gly Val Ile Gly Gln Val Gly Gly Gly Gly Tyr Lys Val Gly Ile Gln Asp
 *** Gly Ser *** Ala Lys Leu Val Glu Gly Val Thr Lys Leu Ala Ser Lys Ile

FIGURA 2 (continuación 4)

Cys Cys His Val Trp Cys Arg Lys Ser *** Leu His His Pro Arg Gln Pro Leu
 Val Val Thr Ser Gly Val Gly Arg Gln Asn Ser Thr Ile Pro Asp Arg Pro Tyr
 Leu Leu Leu Pro Gly Leu Val Glu Lys Ile Leu Pro Ser Pro Thr Glu Pro Thr

 ATT GTT GTC ACC TGG GTT GTG GAG AAA CTA ATC TCC ACT ACC CCA GAG ACC CCA
 1359 1368 1377 1386 1395 1404
 TAA CAA CAG TGG ACC CAA CAC CTC TTT GAT TAG AGG TGA TGG GGT CTC TGG GGT

 *** Gln Gln Trp Thr Gln His Leu Phe Asp *** Arg *** Trp Gly Leu Trp Gly
 Asn Asn Ser Gly Pro Asn Thr Ser Leu Ile Arg Gly Asp Gly Val Ser Gly Val
 Thr Thr Val Asp Pro Thr Pro Leu *** Leu Glu Val Met Gly Ser Leu Gly ***

Ile *** Ile *** Gly Lys *** Tyr Pro Leu Ile Pro Phe Thr Pro Thr Pro Pro
 Phe Glu Tyr Lys Ala Lys Arg Ile Arg Tyr Tyr Gln Phe Pro Leu Pro Leu Pro
 Phe Asn Met Asn Leu Arg Glu Leu Val Thr Thr Asn Ser Leu Tyr Pro Tyr Pro

 TTT TAA GTA TAA ATC GGA AAG ATT ATG CCA TCA TAA CCT TTC CAT CCC CAT CCC
 1413 1422 1431 1440 1449 1458
 AAA ATT CAT ATT TAG CCT TTC TAA TAC GGT AGT ATT GGA AAG GTA GGG GTA GGG

 Lys Ile His Ile *** Pro Phe *** Tyr Gly Ser Ile Gly Lys Val Gly Val Gly
 Lys Phe Ile Phe Ser Leu Ser Asn Thr Val Val Leu Glu Arg *** Gly *** Gly
 Asn Ser Tyr Leu Ala Phe Leu Ile Arg *** Tyr Trp Lys Gly Arg Gly Arg Gly

Gln His Arg Arg Leu Pro Pro Pro Val Pro Arg His Gln Ile Glu Ala Arg ***
 Asn Thr Gly Gly Ser Pro Pro Leu Phe Gln Gly Ile Asn Phe Arg Leu Glu Asn
 Thr Pro Ala Ala Gln Pro Pro Ser Ser Ser Ala Ser Thr Ser Asp *** Ser Thr

 CCA ACC ACG GCG GAC TCC CCC CCT CCT TGA CCG GCT ACA ACT TAG AGT CGA GCA
 1467 1476 1485 1494 1503 1512
 GGT TGG TGC CGC CTG AGG GGG GGA GGA ACT GGC CGA TGT TGA ATC TCA GCT CGT

 Gly Trp Cys Arg Leu Arg Gly Gly Gly Thr Gly Arg Cys *** Ile Ser Ala Arg
 Val Gly Ala Ala *** Gly Gly Glu Glu Leu Ala Asp Val Glu Ser Gln Leu Val
 Leu Val Pro Pro Glu Gly Gly Arg Asn Trp Pro Met Leu Asn Leu Ser Ser Leu

Cys Glu Leu Ile Ala Ala Leu Thr Arg Arg Lys His His Thr Cys Ile Arg ***
 Val Asn Trp Ser Pro Gln Ser His Gly Gly Arg Ile Thr Leu Val Phe Glu Arg
 Leu Met Gly Leu His Ser Arg Thr Asp Glu Glu *** Pro Ser Tyr Leu Asn Glu

 ATT GTA AGG TTC TAC CGA CGC TCA CAG GAG GAG AAT ACC ACT CAT GTT TAA GAG
 1521 1530 1539 1548 1557 1566
 TAA CAT TCC AAG ATG GCT GCG AGT GTC CTC CTC TTA TGG TGA GTA CAA ATT CTC

 *** His Ser Lys Met Ala Ala Ser Val Leu Leu Leu Trp *** Val Gln Ile Leu
 Asn Ile Pro Arg Trp Leu Arg Val Ser Ser Ser Tyr Gly Glu Tyr Lys Phe Ser
 Thr Phe Gln Asp Gly Cys Glu Cys Pro Pro Leu Met Val Ser Thr Asn Ser Leu

Phe Pro Pro Phe Gln Leu Tyr Gly Asp Lys Pro Ala Met Gln Leu Pro Lys Gln
 Ser Leu Arg Ser Asn Phe Ile Gly Thr Lys Arg Arg Trp Arg Tyr Arg Asn Arg
 Leu Phe Ala Pro Ile Ser Ser Val Arg Arg Glu Ala Gly Asp Thr Val Thr Glu

 ATC TTT CCG CCC TTA ACT TCT ATG GCC AGA AAG CCG CGG TAG ACA TTG CCA AAG
 1575 1584 1593 1602 1611 1620
 TAG AAA GGC GGG AAT TGA AGA TAC CCG TCT TTC GGC GCC ATC TGT AAC GGT TTC

 *** Lys Gly Gly Asn *** Arg Tyr Pro Ser Phe Gly Ala Ile Cys Asn Gly Phe
 Arg Lys Ala Gly Ile Glu Asp Thr Arg Leu Ser Ala Pro Ser Val Thr Val Ser
 Glu Arg Arg Glu Leu Lys Ile Pro Val Phe Arg Arg His Leu *** Arg Phe Leu

FIGURA 2 (continuación 5)

```

Leu Arg Pro Thr Gly Phe Ile Thr Lys Glu Pro Pro His Lys Trp Ser Pro Gln
Phe Ala Pro His Val Leu Tyr Pro Arg Arg Arg Leu Ile Asn Gly Leu His Ser
Ser Pro Pro Thr Tyr Trp Ile His Asp Glu Gly Ser Ser Thr Glu Leu Ile Ala
---
ACT TCC GCC CCA CAT GGT TTA TAC CAG AAG AGG CCT CCT ACA AAG GTT CTA CCG
1629      1638      1647      1656      1665      1674
TGA AGG CGG GGT GTA CCA AAT ATG GTC TTC TCC GGA GGA TGT TTC CAA GAT GGC
---
*** Arg Arg Gly Val Pro Asn Met Val Phe Ser Gly Gly Cys Phe Gln Asp Gly
Glu Gly Gly Val Tyr Gln Ile Trp Ser Ser Pro Glu Asp Val Ser Lys Met Ala
Lys Ala Gly Cys Thr Lys Tyr Gly Leu Leu Arg Arg Met Phe Pro Arg Trp Leu

Pro Pro Pro Asp Thr Lys Gln Pro Leu Ala Glu Lys Ala Val Asp Asp *** Leu
Arg Pro Arg Thr Arg Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Pro Trp Thr Met Arg Tyr
Ala Pro Ala Pro Gly Asp Glu Ala Thr Val Gly Gly Gln Gly Arg *** Gly Ile
---
ACG CCC CCG CCC AGG CAG AAG ACG CCA TTG CGG AGG AAC CCG TGC AGT AGG ATA
1683      1692      1701      1710      1719      1728
TGC GGG GGC GGG TCC GTC TTC TGC GGT AAC GCC TCC TTG GCC ACG TCA TCC TAT
---
Cys Gly Gly Gly Ser Val Phe Cys Gly Asn Ala Ser Leu Ala Thr Ser Ser Tyr
Ala Gly Ala Gly Pro Ser Ser Ala Val Thr Pro Pro Trp Pro Arg His Pro Ile
Arg Gly Arg Val Arg Leu Leu Arg *** Arg Leu Leu Gly His Val Ile Leu ***

Leu Ser Leu Leu Ala Ser Ser Tyr Tyr
Phe His Phe Phe His Ala Ala Thr Thr Asn
Phe Thr Phe Ser Thr Arg Gln Gln Leu Ile
---
TTT TCA CTT TCT TCA CGC GAC GAC ATC ATA A 5'
1737      1746      1755
AAA AGT GAA AGA AGT GCG CTG CTG TAG TAT T 3'
---
Lys Ser Glu Arg Ser Ala Leu Leu *** Tyr
Lys Val Lys Glu Val Arg Cys Cys Ser Ile
Lys *** Lys Lys Cys Ala Ala Val Val

```

FIGURA 2 (continuación 6)

circopormank	1	10	20	30	40	50	50
circopormeeh	1	ACCAGCGCAC	TTCGGCAGCG	GCAGCACCTC	GGCAGCGTCA	GTGAAAATGC	50
circopordfp	1	ACCAGCGCAC	TTCGGCAGCG	GCAGCACCTC	GGCAGCGTCA	GTGAAAATGC	50
circopormank	51	60	70	80	90	100	100
circopormeeh	51	CAAGCAAGAA	AAGCGGCCCG	CAACCCCATATA	AGAGGTGGGT	GTTCACCCCTT	100
circopordfp	51	CAAGCAAGAA	AAGCGGCCCG	CAACCCCATATA	AGAGGTGGGT	GTTCACCCCTT	100
circopormank	101	110	120	130	140	150	150
circopormeeh	101	AATAATCCTT	CCGAGGAGGA	GAAAAACAAA	ATACGGGAGC	TCCAATCTC	150
circopordfp	101	AATAATCCTT	CCGAGGAGGA	GAAAAACAAA	ATACGGGAGC	TCCAATCTC	150
circopormank	151	160	170	180	190	200	200
circopormeeh	151	CCTTTTGTAT	TATTTTGTTT	GCGGAGAGGA	AGGTTTGGAA	GAGGGTAGAA	200
circopordfp	151	CCTTTTGTAT	TATTTTGTTT	GCGGAGAGGA	AGGTTTGGAA	GAGGGTAGAA	200
circopormank	201	210	220	230	240	250	250
circopormeeh	201	CTCTCACCT	CCAGGGGTTT	CGTAATTTTG	TAAGAAGCA	GACTTTTAAC	250
circopordfp	201	CTCTCACCT	CCAGGGGTTT	CGTAATTTTG	TAAGAAGCA	GACTTTTAAC	250
circopormank	251	260	270	280	290	300	300
circopormeeh	251	AAGGTGAAGT	GGTATTTTGG	TGCCCCGTGC	CACATCGAGA	AAGCGAAAGG	300
circopordfp	251	AAGGTGAAGT	GGTATTTTGG	TGCCCCGTGC	CACATCGAGA	AAGCGAAAGG	300
circopormank	301	310	320	330	340	350	350
circopormeeh	301	AACCGACCAG	CAGAATAAAG	AATACTGCAG	TAAAGAAGGC	CACATACTTA	350
circopordfp	301	AACCGACCAG	CAGAATAAAG	AATACTGCAG	TAAAGAAGGC	CACATACTTA	350
circopormank	351	360	370	380	390	400	400
circopormeeh	351	TCGAGTGTGG	AGCTCCGCGG	AACGAGGGGA	AGCGCAGCGA	CCTGTCTACT	400
circopordfp	351	TCGAGTGTGG	AGCTCCGCGG	AACGAGGGGA	AGCGCAGCGA	CCTGTCTACT	400
circopormank	401	410	420	430	440	450	450
circopormeeh	401	GCTGTGAGTA	CCCTTTTGGG	GACGGGGTCT	TTGGTGACTG	TAGCCGAGCA	450
circopordfp	401	GCTGTGAGTA	CCCTTTTGGG	GACGGGGTCT	TTGGTGACTG	TAGCCGAGCA	450
circopormank	451	460	470	480	490	500	500
circopormeeh	451	GTTCCTGTGA	ACGTATGTGA	GAAATTTCCG	CGGGCTGGCT	GAACCTTTTGA	500
circopordfp	451	GTTCCTGTGA	ACGTATGTGA	GAAATTTCCG	CGGGCTGGCT	GAACCTTTTGA	500
circopormank	501	510	520	530	540	550	550
circopormeeh	501	AAGTGAGCGG	GAAGATGCAG	CAGCGTGATT	GGAAGACAGC	TGTACACGTC	550
circopordfp	501	AAGTGAGCGG	GAAGATGCAG	CAGCGTGATT	GGAAGACAGC	TGTACACGTC	550
circopormank	551	560	570	580	590	600	600
circopormeeh	551	ATAGTGGGCC	TGCCCCGTTG	TGGGAAGAGC	CAGTGGGCCC	GTAAATTTTGC	600
circopordfp	551	ATAGTGGGCC	TGCCCCGTTG	TGGGAAGAGC	CAGTGGGCCC	GTAAATTTTGC	600

FIGURA 3

circopormank	601	610	620	630	640	650	
circopormeeh	601	610	620	630	640	650	650
circopordfp	601	610	620	630	640	650	650
circopormank	651	660	670	680	690	700	
circopormeeh	651	660	670	680	690	700	700
circopordfp	651	660	670	680	690	700	700
circopormank	701	710	720	730	740	750	
circopormeeh	701	710	720	730	740	750	750
circopordfp	701	710	720	730	740	750	750
circopormank	751	760	770	780	790	800	
circopormeeh	751	760	770	780	790	800	800
circopordfp	751	760	770	780	790	800	800
circopormank	801	810	820	830	840	850	
circopormeeh	801	810	820	830	840	850	850
circopordfp	801	810	820	830	840	850	850
circopormank	851	860	870	880	890	900	
circopormeeh	851	860	870	880	890	900	900
circopordfp	851	860	870	880	890	900	900
circopormank	901	910	920	930	940	950	
circopormeeh	901	910	920	930	940	950	950
circopordfp	901	910	920	930	940	950	950
circopormank	951	960	970	980	990	1000	
circopormeeh	951	960	970	980	990	1000	1000
circopordfp	951	960	970	980	990	1000	1000
circopormank	1001	1010	1020	1030	1040	1050	
circopormeeh	1001	1010	1020	1030	1040	1050	1050
circopordfp	1001	1010	1020	1030	1040	1050	1050
circopormank	1051	1060	1070	1080	1090	1100	
circopormeeh	1051	1060	1070	1080	1090	1100	1100
circopordfp	1051	1060	1070	1080	1090	1100	1100
circopormank	1101	1110	1120	1130	1140	1150	
circopormeeh	1101	1110	1120	1130	1140	1150	1150
circopordfp	1101	1110	1120	1130	1140	1150	1150
circopormank	1151	1160	1170	1180	1190	1200	
circopormeeh	1151	1160	1170	1180	1190	1200	1200
circopordfp	1151	1160	1170	1180	1190	1200	1200

FIGURA 3 (continuación 1)

		1210	1220	1230	1240	1250	
circopormank	1201	ACCATCAAT	TGTTTGGTCC	AGCTCAGGTT	TGGGGGTGAA	GTACCTGGAG	1250
circopormeeh	1201	ACCAATCAAT	TGTTTGGTCC	AGCTCAGGTT	TGGGGGTGAA	GTACCTGGAG	1250
circopordfp	1201	ACCAATCAAT	TGTTTGGTCT	AGCTCTGGTT	TGGGGGTGAA	GTACCTGGAG	1250
		1260	1270	1280	1290	1300	
circopormank	1251	TGGTAGGTAA	AGGGCTGCCT	TATGGTGTGG	CGGGAGGAGT	AGTTAATATA	1300
circopormeeh	1251	TGGTAGGTAA	AGGGCTGCCT	TATGGTGTGG	CGGGAGGAGT	AGTTAATATA	1300
circopordfp	1251	TGGTAGGTAA	AGGGCTGCCT	TATGGTGTGG	CGGGAGGAGT	AGTTAATATA	1300
		1310	1320	1330	1340	1350	
circopormank	1301	GGGGTCATAG	GCCAAGTTGG	TGGAGGGGGT	TACAAAGTTG	GCATCCAAGA	1350
circopormeeh	1301	GGGGTCATAG	GCCAAGTTGG	TGGAGGGGGT	TACAAAGTTG	GCATCCAAGA	1350
circopordfp	1301	GGGGTCATAG	GCCAAGTTGG	TGGAGGGGGT	TACAAAGTTG	GCATCCAAGA	1350
		1360	1370	1380	1390	1400	
circopormank	1351	TAACAACAGT	GGACCCAACA	CCTCTTTTAT	TAGAGGTGAT	GGGGTCTCTG	1400
circopormeeh	1351	TAACAACAGT	GGACCCAACA	CCTCTTTGAT	TAGAGGTGAT	GGGGTCTCTG	1400
circopordfp	1351	TAACAACAGT	GGACCCAACA	CCTCTTTGAT	TAGAGGTGAT	GGGGTCTCTG	1400
		1410	1420	1430	1440	1450	
circopormank	1401	GGGTAAAATT	CATATTTAGC	TTTCTAATA	CGGTAGTATT	GGAAAGGTAG	1450
circopormeeh	1401	GGGTAAAATT	CATATTTAGC	TTTCTAATA	CGGTAGTATT	GGAAAGGTAG	1450
circopordfp	1401	GGGTAAAATT	CATATTTAGC	TTTCTAATA	CGGTAGTATT	GGAAAGGTAG	1450
		1460	1470	1480	1490	1500	
circopormank	1451	GGGTAGGGGG	TGGTGCCCGC	CTGAGGGGGG	GAGGAACTGG	CCGATGTTGA	1500
circopormeeh	1451	GGGTAGGGGG	TGGTGCCCGC	CTGAGGGGGG	GAGGAACTGG	CCGATGTTGA	1500
circopordfp	1451	GGGTAGGGGG	TGGTGCCCGC	CTGAGGGGGG	GAGGAACTGG	CCGATGTTGA	1500
		1510	1520	1530	1540	1550	
circopormank	1501	ATCTGAGGTC	GTAAACATTC	CAAGATGGCT	GCGAGTATCC	TCTTTTATG	1550
circopormeeh	1501	ATCTGAGGTC	GTAAACATTC	CAAGATGGCT	GCGAGTATCC	TCTTTTATG	1550
circopordfp	1501	ATCTGAGGTC	GTAAACATTC	CAAGATGGCT	GCGAGTATCC	TCTTTTATG	1550
		1560	1570	1580	1590	1600	
circopormank	1551	GTGATACAA	ATTCTGTAGA	AAGGCGGGAA	TGAAGATAC	CCGTCTTTCG	1600
circopormeeh	1551	GTGAGTACAA	ATTCTGTAGA	AAGGCGGGAA	TGAAGATAC	CCGTCTTTCG	1600
circopordfp	1551	GTGAGTACAA	ATTCTGTAGA	AAGGCGGGAA	TGAAGATAC	CCGTCTTTCG	1600
		1610	1620	1630	1640	1650	
circopormank	1601	CGCCCATCTG	TAACGGTTTC	TGAAGGCGGG	GTGTGCCAAA	TATGGTCTTC	1650
circopormeeh	1601	CGCCCATCTG	TAACGGTTTC	TGAAGGCGGG	GTGTGCCAAA	TATGGTCTTC	1650
circopordfp	1601	CGCCCATCTG	TAACGGTTTC	TGAAGGCGGG	GTGTGCCAAA	TATGGTCTTC	1650
		1660	1670	1680	1690	1700	
circopormank	1651	TCCGGAGGAT	GTTCCTCAAGA	TGGCTGCGGG	GGCGGGTCCCT	TCTTCTGCGG	1700
circopormeeh	1651	TCCGGAGGAT	GTTCCTCAAGA	TGGCTGCGGG	GGCGGGTCCCT	TCTTCTGCGG	1700
circopordfp	1651	TCCGGAGGAT	GTTCCTCAAGA	TGGCTGCGGG	GGCGGGTCCCT	TCTTCTGCGG	1700
		1710	1720	1730	1740	1750	
circopormank	1701	TAACGCCTCC	TGGCCACGT	CATCCTATAA	SAGTGAAAGA	AGTGGCGCTGC	1750
circopormeeh	1701	TAACGCCTCC	TGGCCACGT	CATCCTATAA	SAGTGAAAGA	AGTGGCGCTGC	1750
circopordfp	1701	TAACGCCTCC	TGGCCACGT	CATCCTATAA	SAGTGAAAGA	AGTGGCGCTGC	1750
		1760	1770	1780	1790	1800	
circopormank	1751	TGTAGTATT					1800
circopormeeh	1751	TGTAGTATT					1800
circopordfp	1751	TGTAGTATT					1800

FIGURA 3 (continuación 2)

		10	20	30	40	50	
circopormank	1	MPSKKSGPQP	HKRWFVTLNN	PSEEEKNKIR	ELPISLFDYF	VCGEEGLEEG	50
circopormeeh	1	MPSKKSGPQP	HKRWFVTLNN	PSEEEKNKIR	ELPISLFDYF	VCGEEGLEEG	50
circopordfp[	1	MPSKKSGPQP	HKRWFVTLNN	PSEEEKNKIR	ELPISLFDYF	VCGEEGLEEG	50
		60	70	80	90	100	
circopormank	51	RTAHLQGFAN	FAKKQTFHKV	KWYFGARCHI	EKAKGTDQQN	KEYCSKEGHI	100
circopormeeh	51	RTPHLQGFAN	FAKKQTFHKV	KWYFGARCHI	EKAKGTDQQN	KEYCSKEGHI	100
circopordfp[	51	RTPHLQGFAN	FAKKQTFHKV	KWYFGARCHI	EKAKGTDQQN	KEYCSKEGHI	100
		110	120	130	140	150	
circopormank	101	IECGAPRNQ	GKRSOLSTAV	STLLETGSLV	TVAEQFPVTY	VRNFRGLAEL	150
circopormeeh	101	IECGAPRNQ	GKRSOLSTAV	STLLETGSLV	TVAEQFPVTY	VRNFRGLAEL	150
circopordfp[	101	IECGAPRNQ	GKRSOLSTAV	STLLETGSLV	TVAEQFPVTY	VRNFRGLAEL	150
		160	170	180	190	200	
circopormank	151	KVSGKMQR	DWKTAVHVIV	GPPGCGKSQW	ARNFAEP5DT	YWKPSRNKWW	200
circopormeeh	151	KVSGKMQR	DWKTAVHVIV	GPPGCGKSQW	ARNFAEPRDT	YWKPSRNKWW	200
circopordfp[	151	KVSGKMQR	DWKTAVHVIV	GPPGCGKSQW	ARNFAEPRDT	YWKPSRNKWW	200
		210	220	230	240	250	
circopormank	201	DGYHGEEVVV	DDFYGWL PW	ODLLRLCDRY	PLTVETKGGT	VPFLARSILI	250
circopormeeh	201	DGYHGEEVVV	DDFYGWL PW	ODLLRLCDRY	PLTVETKGGT	VPFLARSILI	250
circopordfp[	201	DGYHGEEVVV	DDFYGWL PW	ODLLRLCDRY	PLTVETKGGT	VPFLARSILI	250
		260	270	280	290	300	
circopormank	251	TSNQAPQEWY	SSTAVPAVEA	LYRRITTLQF	YKTAGEQSTE	VPEGRFEAVD	300
circopormeeh	251	TSNQAPQEWY	SSTAVPAVEA	LYRRITTLQF	YKTAGEQSTE	VPEGRFEAVD	300
circopordfp[	251	TSNQAPQEWY	SSTAVPAVEA	LYRRITTLQF	YKTAGEQSTE	VPEGRFEAVD	300
		310	320	330	340	350	
circopormank	301	PPCALFPYKI	NY				350
circopormeeh	301	PPCALFPYKI	NY				350
circopordfp[	301	PPCALFPYKI	NY				350

FIGURA 4

		10	20	30	40	50	
circopormank	1	MTWPRRRYRR	RTTRPRSHLG	HLRRRPYLA	HPAFRNRYRW	RRKTGIFNCR	50
circopormeeh	1	MTWPRRRYRR	RTTRPRSHLG	HLRRRPYLA	HPAFRNRYRW	RRKTGIFNSR	50
circopordfp[	1	MTWPRRRYRR	RTTRPRSHLG	HLRRRPYLV	HPAFRNRYRW	RRKTGIFNSR	50
		60	70	80	90	100	
circopormank	51	LSKEFVLTIK	GGYSQPSWIV	HLRFNIGQF	LPSSGGTNPL	PLPFQYYRIR	100
circopormeeh	51	LSKEFVLTIK	GGYSQPSWNV	HLRFNIGQF	LPSSGGTNPL	PLPFQYYRIR	100
circopordfp[	51	LSKEFVLTIK	GGISQPSWNV	HLRFNIGQF	LPSSGGTNPL	PLPFQYYRIR	100
		110	120	130	140	150	
circopormank	101	KAKYEFYPRD	PITSNERGVG	STVVILDANF	VTPSTNLAYD	PYINYSSRHT	150
circopormeeh	101	KAKYEFYPRD	PITSNQRGVG	STVVILDANF	VTPSTNLAYD	PYINYSSRHT	150
circopordfp[	101	KAKYEFYPRD	PITSNQRGVG	STVVILDANF	VTPSTNLAYD	PYINYSSRHT	150
		160	170	180	190	200	
circopormank	151	EROPFTYHSR	YFTPKEPELQ	TIWFHPNNK	RNQLWLHLNT	HTNVEHTGLG	200
circopormeeh	151	EROPFTYHSR	YFTPKEPELQ	TIWFHPNNK	RNQLWLHLNT	HTNVEHTGLG	200
circopordfp[	151	EROPFTYHSR	YFTPKEPELQ	TIWFHPNNK	RNQLWLHLNT	HTNVEHTGLG	200
		210	220	230	240	250	
circopormank	201	YALQNAATAQ	YVVVRLTIYV	DFREFILKDP	LNK*.....		250
circopormeeh	201	YALQNAATAQ	YVVVRLTIYV	DFREFILKDP	LNK*.....		250
circopordfp[	201	YALQNAATAQ	YVVVRLTIYV	DFREFILKDP	LNK*.....		250

FIGURA 5

		10	20	30	40	50	
circopormank	1	MISIPPLIST	RLPVGVRLS	KITGPLALPT	TGRAHYOVYS	CLPITLLHLP	50
circopormeeh	1	MISIPPLIST	RLPVGVRLS	KITGPLALPT	TGRAHYOVYS	CLPITLLHLP	50
circopordfp[	1	MISIPPLIST	RLPVGVRLS	KITGPLALPT	TGRAHYOVYS	CLPITLLHLP	50
		60	70	80	90	100	
circopormank	51	AHFQKFSQPA	EISHIRYREL	LGYSHORPRL	QKGTSSSRQV	AALPLVPRSS	100
circopormeeh	51	AHFQKFSQPA	EISHIRYREL	LGYSHORPRL	QKGTSSSRQV	AALPLVPRSS	100
circopordfp[	51	AHFQKFSQPA	EISHIRYRL	LGYSHORPRL	QKGTSSSRQV	AALPLVPRSS	100
		110	120	130	140	150	
circopormank	101	TLDKYVAFFT	AVFFILLVGS	FRFLDVAAGT	KIPLHLVKSL	LSKISKPLE	150
circopormeeh	101	TLDKYVAFFT	AVFFILLVGS	FRFLDVAAGT	KIPLHLVKSL	LSKIRKPLE	150
circopordfp[	101	TLDKYVAFFT	AVFFILLVGS	FRFLDVAAGT	KIPLHLVKSL	LSKIRKPLE	150
		160	170	180	190	200	
circopormank	151	VSSTLFQTF	LSANKIIKKG	DWKLPYFVFL	LLGRIIKGEH	PPLMGLRAAF	200
circopormeeh	151	VSSTLFQTF	LSANKIIKKG	DWKLPYFVFL	LLGRIIKGEH	PPLMGLRAAF	200
circopordfp[	151	VSSTLFQTF	LSANKIIKKG	DWKLPYFVFL	LLGRIIKGEH	PPLMGLRAAF	200
		210	220	230	240	250	
circopormank	201	LAWHFH					250
circopormeeh	201	LAWHFH					250
circopordfp[	201	LAWHFH					250

FIGURA 6

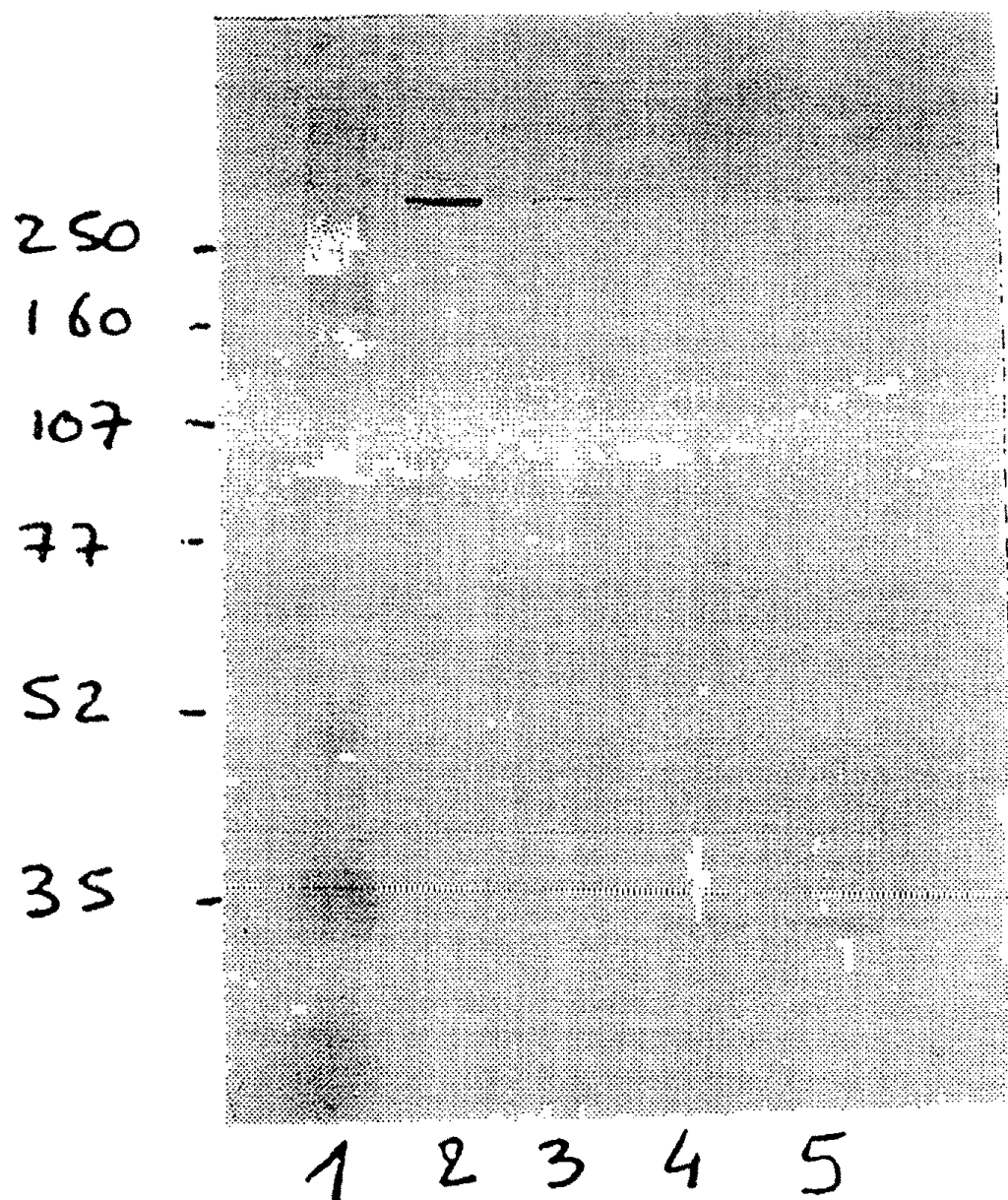


FIGURA 7

Leu Ala Ser Arg Cys Arg Cys Cys Arg Pro Leu Val Glu Ala Ala Val His Gly
 Trp Arg Val Glu Ala Ala Ala Ala Gly Arg Cys Cys Arg Leu Leu Leu Met Gly
 Gly Ala Cys Lys Pro Leu Pro Leu Val Glu Ala Ala Gly *** Cys Cys Cys Ala

 3' TGG TCG CGT GAA GCC GTC GCC GTC GTG GAG CCG TCG TCG AGT CGT CGT TGT ACG
 9 18 27 36 45 54
 5' ACC AGC GCA CTT CCG CAG CCG CAG CAC CTC GGC AGC ACC TCA GCA GCA ACA TGC

 Thr Ser Ala Leu Arg Gln Arg Gln His Leu Gly Ser Thr Ser Ala Ala Thr Cys
 Pro Ala His Phe Gly Ser Gly Ser Thr Ser Ala Ala Pro Gln Gln Gln His Ala
 Gln Arg Thr Ser Ala Ala Ala Ala Pro Arg Gln His Leu Ser Ser Asn Met Pro

 Ala Leu Leu Ile Ser Ser Ala Ser Gly Leu Gly Met Phe Pro Pro His Glu Ser
 Leu Leu Phe Phe Pro Leu Leu Pro Gly Trp Gly Trp Leu Leu His Thr Asn Val
 Trp Cys Ser Ser His Phe Phe Arg Val Gly Val Gly Tyr Phe Thr Pro Thr ***

 GGT CGT TCT TCT TAC CTT CTT CCG CTG GGG TTG GGG TAT TTT CCA CCC ACA AGT
 63 72 81 90 99 108
 CCA GCA AGA AGA ATG GAA GAA GCG GAC CCC AAC CCC ATA AAA GGT GCG TGT TCA

 Pro Ala Arg Arg Met Glu Glu Ala Asp Pro Asn Pro Ile Lys Gly Gly Cys Ser
 Gln Gln Glu Glu Trp Lys Lys Arg Thr Pro Thr Pro *** Lys Val Gly Val His
 Ser Lys Lys Asn Gly Arg Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg Trp Val Phe Thr

 Gln Ile Ile Arg Gly Phe Val Leu Ala Leu Phe Tyr Pro Ile Lys Trp Tyr Gly
 Arg Phe Leu Gly Glu Ser Ser Ser Arg Leu Phe Ile Arg Ser Arg Gly Ile Asp
 Glu Ser Tyr Asp Lys Arg Leu Arg Ala Cys Ser Phe Val Pro Asp Glu Leu Ile

 GAG ACT TAT TAG GAA GGC TTC TGC TCG CGT TCT TTT ATG CCC TAG AAG GTT ATA
 117 126 135 144 153 162
 CTC TGA ATA ATC CTT CCG AAG ACG AGC GCA AGA AAA TAC GGG ATC TTC CAA TAT

 Leu *** Ile Ile Leu Pro Lys Thr Ser Ala Arg Lys Tyr Gly Ile Phe Gln Tyr
 Ser Glu *** Ser Phe Arg Arg Arg Ala Gln Glu Asn Thr Gly Ser Ser Asn Ile
 Leu Asn Asn Pro Ser Glu Asp Glu Arg Lys Lys Ile Arg Asp Leu Pro Ile Ser

 *** Lys Ile Ile Lys Asn Asn Ala Leu Leu Thr Ile Leu Phe Ser Ser Cys Arg
 Arg Asn Ser *** Lys Ile Thr Pro Ser Ser Pro Leu Ser Ser Pro Arg Val Gly
 Gly Ile Gln Asn Asn *** Gln Gln Arg Pro Pro Tyr His Pro Leu Val Phe Val

 GGG ATA AAC TAA TAA AAT AAC AAC CCG TCC TCC CAT TAC TCC TTC CTG CTT GTG
 171 180 189 198 207 216
 CCC TAT TTG ATT ATT TTA TTG TTG GCG AGG AGG GTA ATG ACG AAG GAC GAA CAC

 Pro Tyr Leu Ile Ile Leu Leu Leu Ala Arg Arg Val Met Arg Lys Asp Glu His
 Pro Ile *** Leu Phe Tyr Cys Trp Arg Gly Gly *** *** Gly Arg Thr Asn Thr
 Leu Phe Asp Tyr Phe Ile Val Gly Glu Glu Gly Asn Glu Glu Gly Arg Thr Pro

 Val Glu Leu Pro Glu Ser Ile Lys His Leu Leu Leu Ser Lys Ile Phe His Leu
 *** Arg Trp Pro Asn Ala Leu Lys Thr Phe Phe Cys Val Lys Leu Leu Thr Phe
 Glu Gly Gly Pro Thr Arg *** Asn Gln Ser Ser Ala Ser Lys *** Tyr Leu Ser

 GAG TCG AGG TCC CCA AGC GAT TAA AAC ACT TCT TCG TCT GAA AAT TAT TTC ACT
 225 234 243 252 261 270
 CTC ACC TCC ACG GGT TCG CTA ATT TTG TGA AGA AGC AGA CTT TTA ATA AAG TGA

 Leu Thr Ser Arg Gly Ser Leu Ile Leu *** Arg Ser Arg Leu Leu Ile Lys ***
 Ser Pro Pro Gly Val Arg *** Phe Cys Glu Glu Ala Asp Phe *** *** Ser Glu
 His Leu Gln Gly Phe Ala Asn Phe Val Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys

FIGURA 8

Pro Ile Gln Thr Gly Ala Ala Val Asp Leu Phe Arg Phe Ser Cys Ile Leu Leu
His Tyr Lys Pro Ala Arg Gln Trp Met Ser Phe Ala Phe Pro Val Ser *** Cys
Thr Thr Asn Pro His Gly Ser Gly Cys Arg Ser Leu Ser Leu Phe Leu Asp Ala

TCA CCA TAA ACC CAC GGG CGA CGG TGT AGC TCT TTC GCT TTC CTT GTC TAG TCG
279 288 297 306 315 324
AGT GGT ATT TGG GTG CCC GCT GCC ACA TCG AGA AAG CGA AAG GAA CAG ATC AGC

Ser Gly Ile Trp Val Pro Ala Ala Thr Ser Arg Lys Arg Lys Glu Gln Ile Ser
Val Val Phe Gly Cys Pro Leu Pro His Arg Glu Ser Glu Arg Asn Arg Ser Ala
Trp Tyr Leu Gly Ala Arg Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln

Ile Phe Phe Val Ala Thr Phe Phe Ala Val *** Gln His Leu Thr Ser Ser Arg
Phe Leu Ser Tyr Gln Leu Leu Ser Pro Leu Lys Ser Ile Ser His Pro Ala Gly
Ser Tyr Leu Ile Ser Cys Tyr Leu Leu Cys Ser Val Ser Pro Thr His Leu Glu

TCT TAT TTC TTA TGA CGT CAT TTC TTC CGT TGA ATG ACT ACC TCA CAC CTC GAG
333 342 351 360 369 378
AGA ATA AAG AAT ACT GCA GTA AAG AAG GCA ACT TAC TGA TGG AGT GTG GAG CTC

Arg Ile Lys Asn Thr Ala Val Lys Lys Ala Thr Tyr *** Trp Ser Val Glu Leu
Glu *** Arg Ile Leu Gln *** Arg Arg Gln Leu Thr Asp Gly Val Trp Ser Ser
Asn Lys Glu Tyr Cys Ser Lys Glu Gly Asn Leu Leu Met Glu Cys Gly Ala Pro

Ser Arg Leu Ser Leu Pro Thr Val Gln Arg Ser Ser His Thr Gly Gln Gln Leu
Leu Asp *** Pro Cys Arg Leu Ser Arg Asp Val Ala Thr Leu Val Lys Asn Ser
*** Ile Glu Pro Val Val Ser His Gly Thr *** Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro

GAT CTA GAG TCC CTG TTG CCT CAC TCG ACA GAT GAC GAC ACT CAT GGA ACA ACC
387 396 405 414 423 432
CTA GAT CTC AGG GAC AAC GGA GTG ACC TGT CTA CTG CTG TGA GTA CCT TGT TCG

Leu Asp Leu Arg Asp Asn Gly Val Thr Cys Leu Leu Leu *** Val Pro Cys Trp
*** Ile Ser Gly Thr Thr Glu *** Pro Val Tyr Cys Cys Glu Tyr Leu Val Gly
Arg Ser Gln Gly Gln Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu

Ala Pro Thr Gln His Gly Asn Cys Leu Leu Val Arg Tyr Arg Lys Asp Ser Ile
Leu Pro Leu Arg Thr Val Thr Ala Ser Cys Cys Gly Thr Val Asn Thr Leu Phe
Ser Arg Ser Asp Pro Ser Arg Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Thr Gln *** Phe

TCT CGC CCT CAG ACC ACT GGC AAC GTC TCG TCG TGG GAC ATT GCA AAC AGT CTT
441 450 459 468 477 486
AGA GCG GGA GTC TGG TGA CCG TTG CAG AGC AGC ACC CTG TAA CGT TTG TCA GAA

Arg Ala Gly Val Trp *** Pro Leu Gln Ser Ser Thr Leu *** Arg Leu Ser Glu
Glu Arg Glu Ser Gly Asp Arg Cys Arg Ala Ala Pro Cys Asn Val Cys Gln Lys
Ser Gly Ser Leu Val Thr Val Ala Glu Gln His Pro Val Thr Phe Val Arg Asn

Glu Ala Pro Gln Ser Phe Lys Gln Phe His Ala Pro Phe His Leu Leu Thr Ile
Lys Arg Pro Ser Ala Ser Ser Lys Phe Thr Leu Pro Phe Ile Cys Phe Arg Ser
Asn Gly Arg Ala Pro Gln Val Lys Ser Leu Ser Arg Ser Phe Ala Ser Ala His

TAA AGG CGC CCG ACC GAC TTG AAA ACT TTC ACT CGC CCT TTT ACG TCT TCG CAC
495 504 513 522 531 540
ATT TCC GCG GGC TGG CTG AAC TTT TGA AAG TGA GCG GGA AAA TGC AGA AGC GTC

Ile Ser Ala Gly Trp Leu Asn Phe *** Lys *** Ala Gly Lys Cys Arg Ser Val
Phe Pro Arg Ala Gly *** Thr Phe Glu Ser Glu Arg Glu Asn Ala Glu Ala ***
Phe Arg Gly Leu Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met Gln Lys Arg Asp

FIGURA 8 (continuación 1)

Pro Leu Ser Ile Tyr Val Asp Asn His Pro Trp Arg Pro Thr Thr Phe Ala Phe
 Gln Phe Val Leu Thr Cys Thr Met Thr Pro Gly Gly Pro His Pro Leu Leu Leu
 Asn Ser Ser *** His Val Arg *** Gln Pro Ala Val Gln Thr His Tyr Phe Cys

 TAA CCT TCT GAT TAC ATG TGC AGT AAC ACC CCG GTG GAC CCA CAC CAT TTT CGT
 549 558 567 576 585 594
 ATT GGA AGA CTA ATG TAC ACG TCA TTG TGG GGC CAC CTG GGT GTG GTA AAA CCA

 Ile Gly Arg Leu Met Tyr Thr Ser Leu Trp Gly His Leu Gly Val Val Lys Ala
 Leu Glu Asp *** Cys Thr Arg His Cys Gly Ala Thr Trp Val Trp *** Lys Gln
 Trp Lys Thr Asn Val His Val Ile Val Gly Pro Pro Gly Cys Gly Lys Ser Lys

Pro Ser Ser Ile Lys Cys Val Arg Phe Gly Cys Val Pro Phe Trp Arg Ser Val
 His Ala Ala Leu Lys Ala Ser Gly Ser Val Val Tyr Gln Phe Gly Gly Leu Phe
 Ile Pro Gln *** Asn Gln Leu Gly Pro Phe Trp Met Ser Ser Val Val *** Phe

 TTA CCC GAC GAT TAA AAC GTC TGG GCC TTT GGT GTA TGA CCT TTC GTG GAT CTT
 603 612 621 630 639 648
 AAT GGG CTG CTA ATT TTG CAG ACC CCG AAA CCA CAT ACT GGA AAC CAC CTA GAA

 Asn Gly Leu Leu Ile Leu Gln Thr Arg Lys Pro His Thr Gly Asn His Leu Glu
 Met Gly Cys *** Phe Cys Arg Pro Gly Asn His Ile Leu Glu Thr Thr *** Lys
 Trp Ala Ala Asn Phe Ala Asp Pro Glu Thr Thr Tyr Trp Lys Pro Pro Arg Asn

Leu Pro Pro Ile Thr Val Met Thr Phe Phe His Asn Asn Asn Ile Val Lys Ile
 Leu His His Ser Pro *** Trp Pro Ser Ser Thr Thr Thr Ile Ser Ser Lys ***
 Cys Thr Thr Pro His Asn Gly His His Leu Leu Pro Gln *** Gln His Ser Lys

 TGT TCA CCA CCC TAC CAA TGG TAC CAC TTC TTC ACC AAC AAT AAC TAC TGA AAA
 657 666 675 684 693 702
 ACA AGT GGT GGG ATG GTT ACC ATG GTG AAG AAG TGG TTG TTA TTG ATG ACT TTT

 Thr Ser Gly Gly Met Val Thr Met Val Lys Lys Trp Leu Leu Leu Met Thr Phe
 Gln Val Val Gly Trp Leu Pro Trp *** Arg Ser Gly Cys Tyr *** *** Leu Leu
 Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly Glu Glu Val Val Val Ile Asp Asp Phe Tyr

Ala Pro Gln Gly Pro Ile Ile *** Gln Ser Gln Thr Ile Ser Ile Trp Gln Ser
 Pro Gln Ser Gly Gln Ser Ser Arg Ser Leu Ser His Ser Arg Tyr Gly Asn Val
 His Ser Ala Ala Arg Pro His Asp Val Ser Val Thr His Asp Ile Asp Met Ser

 TAC CGA CCG ACG GGA CCC TAC TAG ATG ACT CTG ACA CAC TAG CTA TAG GTA ACT
 711 720 729 738 747 756
 ATG GCT GCG TGC CCT GGG ATG ATC TAC TGA GAC TGT GTG ATC GAT ATC CAT TGA

 Met Ala Gly Cys Pro Gly Met Ile Tyr *** Asp Cys Val Ile Asp Ile His ***
 Trp Leu Ala Ala Leu Gly *** Ser Thr Glu Thr Val *** Ser Ile Ser Ile Asp
 Gly Trp Leu Pro Trp Asp Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr

Tyr Leu Ser Phe Thr Ser Ser Tyr Arg Lys Gln Gly Ala Thr Asn Gln Asn Gly
 Thr Ser Val Leu Pro Pro Val Thr Gly Lys Lys Ala Arg Leu Ile Arg Ile Val
 Gln Leu Ser *** Leu His Phe Gln Val Lys Lys Pro Gly Cys Tyr Glu Ser ***

 GAC ATC TCT GAT TTC CAC CTT GAC ATG GAA AAA ACC GGG CGT CAT AAG ACT AAT
 765 774 783 792 801 810
 CTG TAG AGA CTA AAG GTG GAA CTG TAC CTT TTT TGG CCC GCA GTA TTC TGA TTA

 Leu *** Arg Leu Lys Val Glu Leu Tyr Leu Phe Trp Pro Ala Val Phe *** Leu
 Cys Arg Asp *** Arg Trp Asn Cys Thr Phe Phe Gly Pro Gln Tyr Ser Asp Tyr
 Val Glu Thr Lys Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr

FIGURA 8 (continuación 2)

Ala Ile Leu Gly Arg Gln Phe Pro Val Gly *** Ser Ser Asp Trp Ser Tyr Phe
 Leu Leu *** Val Gly Asn Ser His Tyr Glu Glu Val Ala Thr Gly Ala Thr Ser
 Trp Cys Asp Ser Gly Thr Pro Ile Thr Ser Arg Leu Gln Gln Gly Leu Gln Leu

 GGT CGT TAG TCT GGG GCA ACC TTA CCA TGA GGA GTT GAC GAC AGG GTC GAC ATC
 819 828 837 846 855 864
 CCA GCA ATC AGA CCC CGT TGG AAT GGT ACT CCT CAA CTG CTG TCC CAG CTG TAG

 Pro Ala Ile Arg Pro Arg Trp Asn Gly Thr Pro Gln Leu Leu Ser Gln Leu ***
 Gln Gln Ser Asp Pro Val Gly Met Val Leu Leu Asn Cys Cys Pro Ser Cys Arg
 Ser Asn Gln Thr Pro Leu Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu

Ser Lys Ile Pro Pro Asn Ser Gly Gln Tyr Lys Pro Leu Ile Ser Cys Phe Leu
 Ala Arg *** Arg Leu Ile Val Glu Lys Thr Asn Gln Phe Phe Ala Val Ser Cys
 Leu Glu Lys Asp Ser Ser *** Lys Arg Pro Ile Lys Ser Ser His *** Leu Val

 TTC GAG AAA TAG CCT CCT AAT GAA GGA ACC ATA AAA CCT TCT TAC GAT GTC TTG
 873 882 891 900 909 918
 AAG CTC TTT ATC GGA GGA TTA CTT CCT TGG TAT TTT GGA AGA ATG CTA CAG AAC

 Lys Leu Phe Ile Gly Gly Leu Leu Pro Trp Tyr Phe Gly Arg Met Leu Gln Asn
 Ser Ser Leu Ser Glu Asp Tyr Phe Leu Gly Ile Leu Glu Glu Cys Tyr Arg Thr
 Ala Leu Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Leu Val Phe Trp Lys Asn Ala Thr Glu Gln

Gly Arg Leu Phe Pro Ala Leu Glu Asp Gly Lys Gly Gly Trp Ala Arg Phe Lys
 Asp Val Ser Ser Pro Pro Trp Asn Thr Val Arg Glu Gly Gly His Gly Ser Asn
 Ile Trp Pro Pro Leu Pro Gly Thr Arg *** Gly Lys Gly Gly Met Gly Gln Ile

 TTA GGT GCC TCC TTC CCC CCG TCA ACC AGT GGG AAA GGG GGG GTA CCG GAC TTA
 927 936 945 954 963 972
 AAT CCA CCG AGG AAG GGG GCC AGT TCG TCA CCC TTT CCC CCC CAT GCC CTG AAT

 Asn Pro Arg Arg Lys Gly Ala Ser Ser Ser Pro Phe Pro Pro His Ala Leu Asn
 Ile His Gly Gly Arg Gly Pro Val Arg His Pro Phe Pro Pro Met Pro *** Ile
 Ser Thr Glu Glu Gly Gly Gln Phe Val Thr Leu Ser Pro Pro Cys Pro Glu Phe

Trp Ile Phe Tyr Ile Val Ser Asp Lys Lys Asp Ser Arg Leu Pro Lys *** ***
 Gly Tyr Ser Ile Phe *** Gln Thr Lys Lys Ile Val Glu Tyr His Asn Lys Asn
 Glu Met His Phe Leu Asn Ser Leu Arg Lys *** *** Lys Thr Ile Thr Lys Ile

 AAG GTA TAC TTT ATT TAA TGA CTC AGA AAA AAT AGT GAA GCA TTA CCA AAA ATA
 981 990 999 1008 1017 1026
 TTC CAT ATG AAA TAA ATT ACT GAG TCT TTT TTA TCA CTT CGT AAT GGT TTT TAT

 Phe His Met Lys *** Ile Thr Glu Ser Phe Leu Ser Leu Arg Asn Gly Phe Tyr
 Ser Ile *** Asn Lys Leu Leu Ser Leu Phe Tyr His Phe Val Met Val Phe Ile
 Pro Tyr Glu Ile Asn Tyr *** Val Phe Phe Ile Thr Ser *** Trp Phe Leu Leu

Glu Asn Leu Thr Leu His Pro Thr Lys Leu Ile Leu Asn Glu Ser Asn Tyr Met
 Asn Met Leu Pro *** Thr Pro Pro Arg *** Phe *** Ile Arg Gln Ile Thr Cys
 Ile *** *** Pro Asn Leu Pro Pro Asp Lys Phe Asn Phe Glu Arg Phe Gln Val

 ATA AGT AAT TCC CAA TTC ACC CCC CAG AAA TTT TAA TTT AAG AGA CTT AAC ATG
 1035 1044 1053 1062 1071 1080
 TAT TCA TTA AGG GTT AAG TGG GGG GTC TTT AAA ATT AAA TTC TCT GAA TTG TAC

 Tyr Ser Leu Arg Val Lys Trp Gly Val Phe Lys Ile Lys Phe Ser Glu Leu Tyr
 Ile His *** Gly Leu Ser Gly Gly Ser Leu Lys Leu Asn Ser Leu Asn Cys Thr
 Phe Ile Lys Gly *** Val Gly Gly Leu *** Asn *** Ile Leu *** Ile Val His

FIGURA 8 (continuación 3)

Cys Pro *** Val Ser Ile Thr Asn Arg Thr Thr Tyr Val Thr Lys Ser Arg Leu
 Val His Asn Cys Pro Tyr Gln Ile Gly Pro Arg Ile Tyr Gln Lys Arg Val Cys
 Tyr Met Thr Val Arg Ile Asn Tyr Glu Gln Asp Tyr Ile Ser Asn Glu Phe Ala

 TAT GTA CCA ATG TGC CTA TAA CAT AAG GAC CAG CAT ATA TGA CAA AAG CTT GCG
 1089 1098 1107 1116 1125 1134
 ATA CAT GGT TAC ACG GAT ATT GTA TTC CTG GTC GTA TAT ACT GTT TTC GAA CCG

 Ile His Gly Tyr Thr Asp Ile Val Phe Leu Val Val Tyr Thr Val Phe Glu Arg
 Tyr Met Val Thr Arg Ile Leu Tyr Ser Trp Ser Tyr Ile Leu Phe Ser Asn Ala
 Thr Trp Leu His Gly Tyr Cys Ile Pro Gly Arg Ile Tyr Cys Phe Arg Thr Gln

Ala Ser Ala *** Thr Thr *** Met Glu Leu Leu Lys Tyr Asp *** Gly Cys Ser
 His Arg Pro Arg Arg Pro Arg Cys Lys Trp Cys Asn Thr Thr Glu Ala Val Ala
 Thr Gly Leu Gly Val His Asp Val Asn Gly Ala Thr Gln Leu Arg Leu Trp Leu

 TCA CGG CTC CGG ATG CAC CAG ATG TAA ACG TCG TCA AAC ATC AGA GTC GGT GTC
 1143 1152 1161 1170 1179 1188
 AGT GCC GAG GCC TAC GTG GTC TAC ATT TCC AGC AGT TTG TAG TCT CAG CCA CAG

 Ser Ala Glu Ala Tyr Val Val Tyr Ile Ser Ser Ser Leu *** Ser Gln Pro Gln
 Val Pro Arg Pro Thr Trp Ser Thr Phe Pro Ala Val Cys Ser Leu Ser His Ser
 Cys Arg Gly Leu Arg Gly Leu His Phe Gln Gln Phe Val Val Ser Ala Thr Ala

Thr Glu Lys Thr Thr Gln Asn Ser Thr Ile Leu Leu Ser Ile *** Ser Leu Asn
 Pro Lys Lys Gln Gln Lys Thr Pro Leu Leu *** Tyr His Phe Arg Pro Cys Thr
 Gln Asn Arg Lys Asn Asn Pro Gln Phe Tyr Asp Ile Thr Phe Asp Leu Val Pro

 GAC CAA AGA AAA CAA CAA ACC AAC CTT CAT TAG TTA TCA CTT TAG ATC CTG TCC
 1197 1206 1215 1224 1233 1242
 CTG GTT TCT TTT GTT GTT TGG TTG GAA GTA ATC AAT AGT GAA ATC TAG GAC ACG

 Leu Val Ser Phe Val Val Trp Leu Glu Val Ile Asn Ser Glu Ile *** Asp Arg
 Trp Phe Leu Leu Leu Phe Gly Trp Lys *** Ser Ile Val Lys Ser Arg Thr Gly
 Gly Phe Phe Cys Cys Leu Val Gly Ser Asn Gln *** *** Asn Leu Gly Gln Val

Pro Pro Leu Thr Gly Pro Thr Thr Pro Ser Pro Ser Pro *** Pro Ile Ala Pro
 Gln Pro Tyr Leu Val Pro Leu Pro Leu Leu Leu Ala Pro Asn His Tyr Pro Pro
 Lys Pro Thr Phe Tyr Arg Ser His Tyr Ser Phe Pro Gln Thr Ile Thr His Arg

 AAA CCC CCA TTT CAT GGC CCT CAC CAT CCT CTT CCC GAC CCA ATA CCA TAC CCG
 1251 1260 1269 1278 1287 1296
 TTT GGG GGT AAA GTA CCG GGA GTG GTA GGA GAA GGG CTG GGT TAT GGT ATG CCG

 Phe Gly Gly Lys Val Pro Gly Val Val Gly Glu Gly Leu Gly Tyr Gly Met Ala
 Leu Gly Val Lys Tyr Arg Glu Trp *** Glu Lys Gly Trp Val Met Val Trp Arg
 Trp Gly *** Ser Thr Gly Ser Gly Arg Arg Arg Ala Gly Leu Trp Tyr Gly Gly

Pro Thr Thr *** Met Pro Thr Met Pro Ser Pro Gln Pro Arg Gln *** Leu Thr
 Leu Leu Leu Lys Cys Leu Pro *** Leu His Pro Ser His Gly Lys Asn Cys Leu
 Ser Ser Tyr Asn Val Tyr Pro Asp Tyr Thr Leu Ala Thr Ala Lys Thr Val Phe

 CCT CCT CAT CAA ATG TAT CCC CAG TAT CCA CTC CCG ACA CCG GAA ACA ATG TTT
 1305 1314 1323 1332 1341 1350
 GGA GGA GTA GTT TAC ATA GGG GTC ATA GGT GAG GGC TGT GGC CTT TGT TAC AAA

 Gly Gly Val Val Tyr Ile Gly Val Ile Gly Glu Gly Cys Gly Leu Cys Tyr Lys
 Glu Glu *** Phe Thr *** Gly Ser *** Val Arg Ala Val Ala Phe Val Thr Lys
 Arg Ser Ser Leu His Arg Gly His Arg *** Gly Leu Trp Pro Leu Leu Gln Ser

FIGURA 8 (continuación 4)

Ile Met *** Phe Leu Leu Val Pro Ala Trp Glu Gly Thr Val Arg Pro Ser Arg
 *** *** Arg Phe Tyr Cys Cys Gln Leu Gly Ser Gly Gln *** Gly Pro His Asp
 Asn Asp Asp Leu Ile Val Ala Ser Ser Gly Val Gly Arg Asp Gly Gln Thr Ile

 CAA TAG TAG ATT TTA TTG TCG TGA CCT CGG GTG AGG GGA CAG TOG GAC CCA CTA
 1359 1368 1377 1386 1395 1404
 GTT ATC ATC TAA AAT AAC AGC ACT GGA GCC CAC TCC CCT GTC ACC CTG GGT GAT

 Val Ile Ile *** Asn Asn Ser Thr Gly Ala His Ser Pro Val Thr Leu Gly Asp
 Leu Ser Ser Lys Ile Thr Ala Leu Glu Pro Thr Pro Leu Ser Pro Trp Val Ile
 Tyr His Leu Lys *** Gln His Trp Ser Pro Leu Pro Cys His Pro Gly *** Ser

Pro Ala Pro Gly Ser Asn Leu Arg Leu Arg Glu *** Glu Thr Thr Asn Leu Pro
 Pro Leu Leu Ala Leu Ile *** Gly *** Gly Lys Lys Asn Gln Leu Ile *** Leu
 Pro Ser Cys Pro Trp Phe Glu Val Lys Val Lys Arg Ile Arg Tyr Tyr Glu Phe

 GCC CCT CGT CCC GGT CTT AAG TTG GAA TTG GAA AGA ATA AGA CAT CAT AAG TTT
 1413 1422 1431 1440 1449 1458
 CGG GGA GCA GGG CCA GAA TTC AAC CTT AAC CTT TCT TAT TCT GTA GTA TTC AAA

 Arg Gly Ala Gly Pro Glu Phe Asn Leu Asn Leu Ser Tyr Ser Val Val Phe Lys
 Gly Glu Gln Gly Gln Asn Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Leu *** Tyr Ser Lys
 Gly Ser Arg Ala Arg Ile Gln Pro *** Pro Phe Leu Phe Cys Ser Ile Gln Arg

Cys Leu Ala Pro Thr Gln Gly Gly Glu Gln Pro Phe Phe Thr Met Leu Ile Ser
 Ala Cys Leu Pro Pro Lys Val Gly Arg Arg Pro Ser Ser Leu *** *** Tyr Gln
 Pro Val Ser Arg Pro Asn Ser Gly Gly Gly Pro Pro Leu Phe Asp Asn Ile Asn

 CCC GTG TCT CCG CCC CAA ACT GGG GGG ACG ACC CCC TTC TTT CAG TAA TTA TAA
 1467 1476 1485 1494 1503 1512
 GGG CAC AGA GCG GCG GTT TGA CCC CCC TCC TOG GGG AAG AAA GTC ATT AAT ATT

 Gly His Arg Ala Gly Val *** Pro Pro Ser Trp Gly Lys Lys Val Ile Asn Ile
 Gly Thr Glu Arg Gly Phe Asp Pro Pro Pro Gly Gly Arg Lys Ser Leu Ile Leu
 Ala Gln Ser Gly Gly Leu Thr Pro Leu Leu Gly Glu Glu Ser His *** Tyr ***

Asp *** *** Thr Trp Arg Gly Pro Pro Arg Glu Ser Gln Pro Glu Ser Ser Leu
 Ile Glu Asp His Gly Gly Gly Leu Leu Ala Asn Gln Ser His Asn Ala Gln Cys
 Phe Arg Met Met Asp Val Ala Trp Ser Pro Thr Arg Val Thr Thr Arg Lys Val

 CTT AGA GTA GTA CAG GTG GCG GGT CCT CCC GCA AGA CTG ACA CCA AGC GAA CTG
 1521 1530 1539 1548 1557 1566
 GAA TCT CAT CAT GTC CAC CGC CCA GGA GGG CGT TCT GAC TGT GGT TCG CTT GAC

 Glu Ser His His Val His Arg Pro Gly Gly Arg Ser Asp Cys Gly Ser Leu Asp
 Asn Leu Ile Met Ser Thr Ala Gln Glu Gly Val Leu Thr Val Val Arg Leu Thr
 Ile Ser Ser Cys Pro Pro Pro Arg Arg Ala Phe *** Leu Trp Phe Ala *** Gln

Ile Asp Ser Pro Ala Pro Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ala Met Lys Gly Glu Gly
 Tyr Ile Arg Leu His Pro Leu Pro Pro His Gln Leu His Trp Lys Glu Lys Glu
 Thr Tyr Gly Phe Thr Arg Ser Leu Arg Thr Asn Phe Ile Gly Asn Lys Arg Arg

 TCA TAT AGG CTT CCA CGC CCT CTC CGC CCA CAA CTT CTA CGG TAA AAA GGA AGA
 1575 1584 1593 1602 1611 1620
 AGT ATA TCC GAA GGT GCG GGA GAG GCG GGT GTT GAA GAT GCC ATT TTT CCT TCT

 Ser Ile Ser Glu Gly Ala Gly Glu Ala Gly Val Glu Asp Ala Ile Phe Pro Ser
 Val Tyr Pro Lys Val Arg Glu Arg Arg Val Leu Lys Met Pro Phe Phe Leu Leu
 Tyr Ile Arg Arg Cys Gly Arg Gly Gly Cys *** Arg Cys His Phe Ser Phe Ser

FIGURA 8 (continuación 5)

Ala Thr Val Thr Ala Pro Thr Ser Ser Gly Pro Ala Ala Ala Ser Ser Arg Ala
 Leu Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Arg Ala Leu Pro Pro Pro Pro Asp Pro
 Trp Arg Tyr Arg His Arg Pro His Val Leu Trp Pro Arg Arg Arg Leu Ile Gln

 GGT CGC CAT TGC CAC CGC CCC CAC CTG CTC GGT CCC CGC CGC CTC CTA GAC
 1629 1638 1647 1656 1665 1674
 CCA GCG GTA ACG GTG GCG GGG GTG GAC GAG CCA GGG GCG GCG GCG GAG GAT CTG

 Pro Ala Val Thr Val Ala Gly Val Asp Glu Pro Gly Ala Ala Ala Glu Asp Leu
 Gln Arg *** Arg Trp Arg Gly Trp Thr Ser Gln Gly Arg Arg Arg Arg Ile Trp
 Ser Gly Asn Gly Gly Gly Gly Gly Arg Ala Arg Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly

Leu Ile Ala Ala Pro Ala Thr Asp Glu Glu Glu Thr Val Gly Gly Gln Ile Arg
 Trp Ser Pro Gln Pro Pro Pro Thr Lys Lys Lys Pro Leu Ala Glu Lys Ser Val
 Gly Leu His Ser Arg Pro Arg His Arg Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Pro Tyr

 CGG TTC TAC CGA CGC CCC CGC CAC AGA AGA AGA AGC CAT TGC GGA GGA ACC TAT
 1683 1692 1701 1710 1719 1728
 GCC AAG ATG GCT GCG GGG GCG GTG TCT TCT TCT TCG GTA ACG CCT CCT TCG ATA

 Ala Lys Met Ala Ala Gly Ala Val Ser Ser Ser Ser Val Thr Pro Pro Trp Ile
 Pro Arg Trp Leu Arg Gly Arg Cys Leu Leu Leu Arg *** Arg Leu Leu Gly Tyr
 Gln Asp Gly Cys Gly Gly Gly Val Phe Phe Phe Gly Asn Ala Ser Leu Asp Thr

*** Ile Gln Phe Arg Phe Phe His Ala Thr Leu Ile
 Asp Tyr Arg Phe Val Phe Ser Thr Arg Gln Leu Tyr
 Thr Met' Asp Ser Phe Ser Leu Leu Ala Ser Tyr Thr Asn

 GCA GTA TAG ACT TTT GCT TTC TTC ACG CGA CAT TCA TAA 5'
 1737 1746 1755 1764
 CGT CAT ATC TGA AAA CGA AAG AAG TGC GCT GTA AGT ATT 3'

 Arg His Ile *** Lys Arg Lys Lys Cys Ala Val Ser Ile
 Val Ile Ser Glu Asn Glu Arg Ser Ala Leu *** Val
 Ser Tyr Leu Lys Thr Lys Glu Val Arg Cys Lys Tyr

FIGURA 8 (continuación 6)

GMQ en gramos

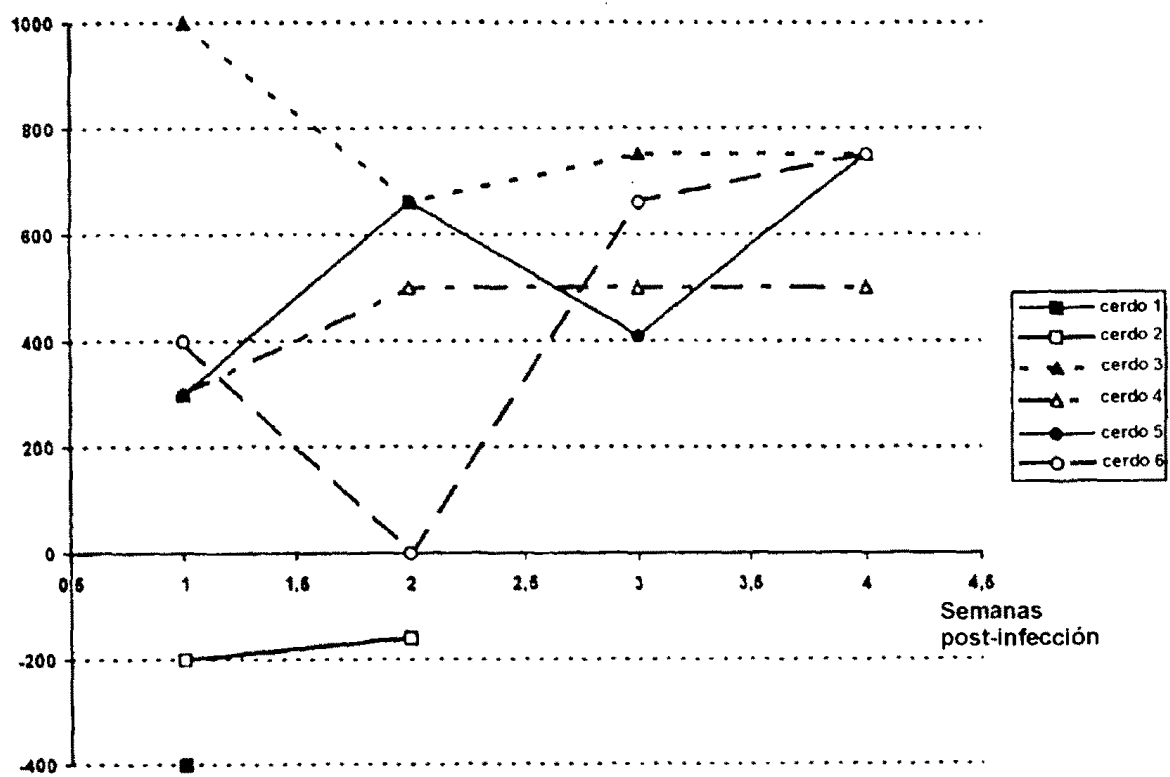


FIGURA 9

gmq : D0-D28

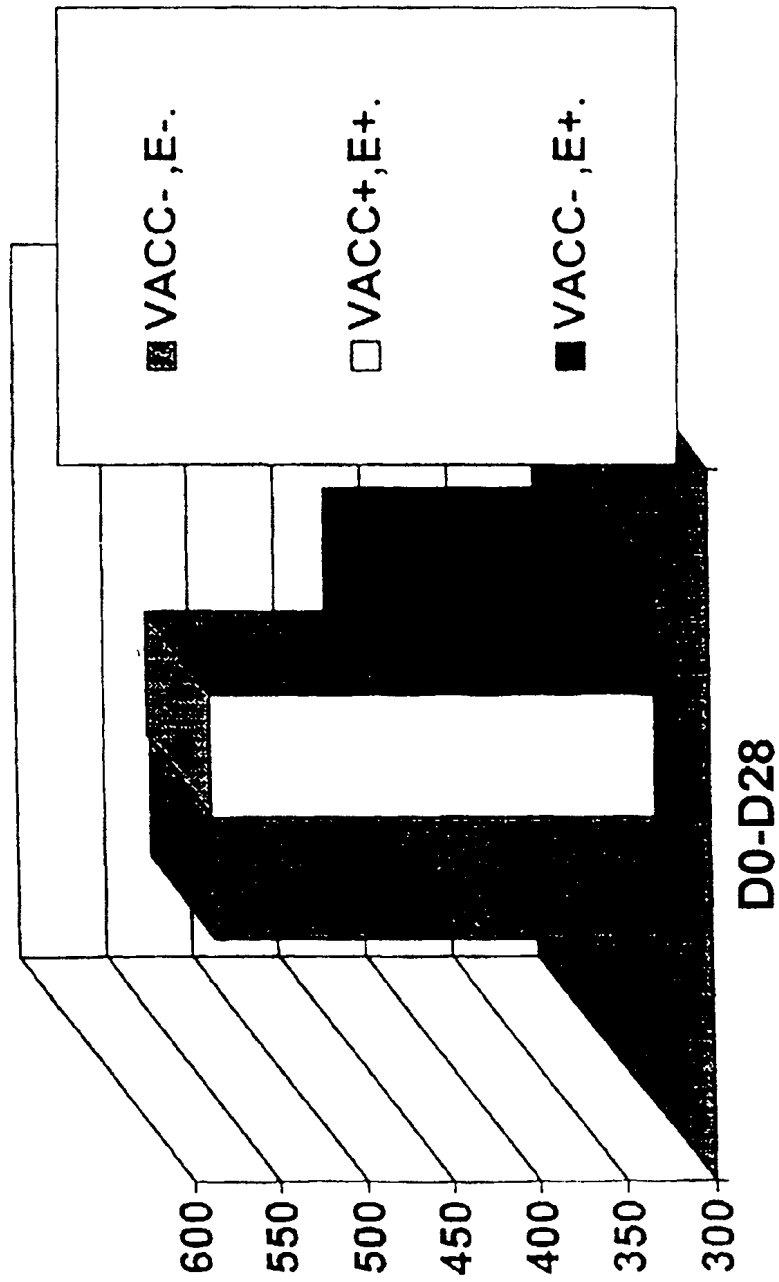


FIGURA 10

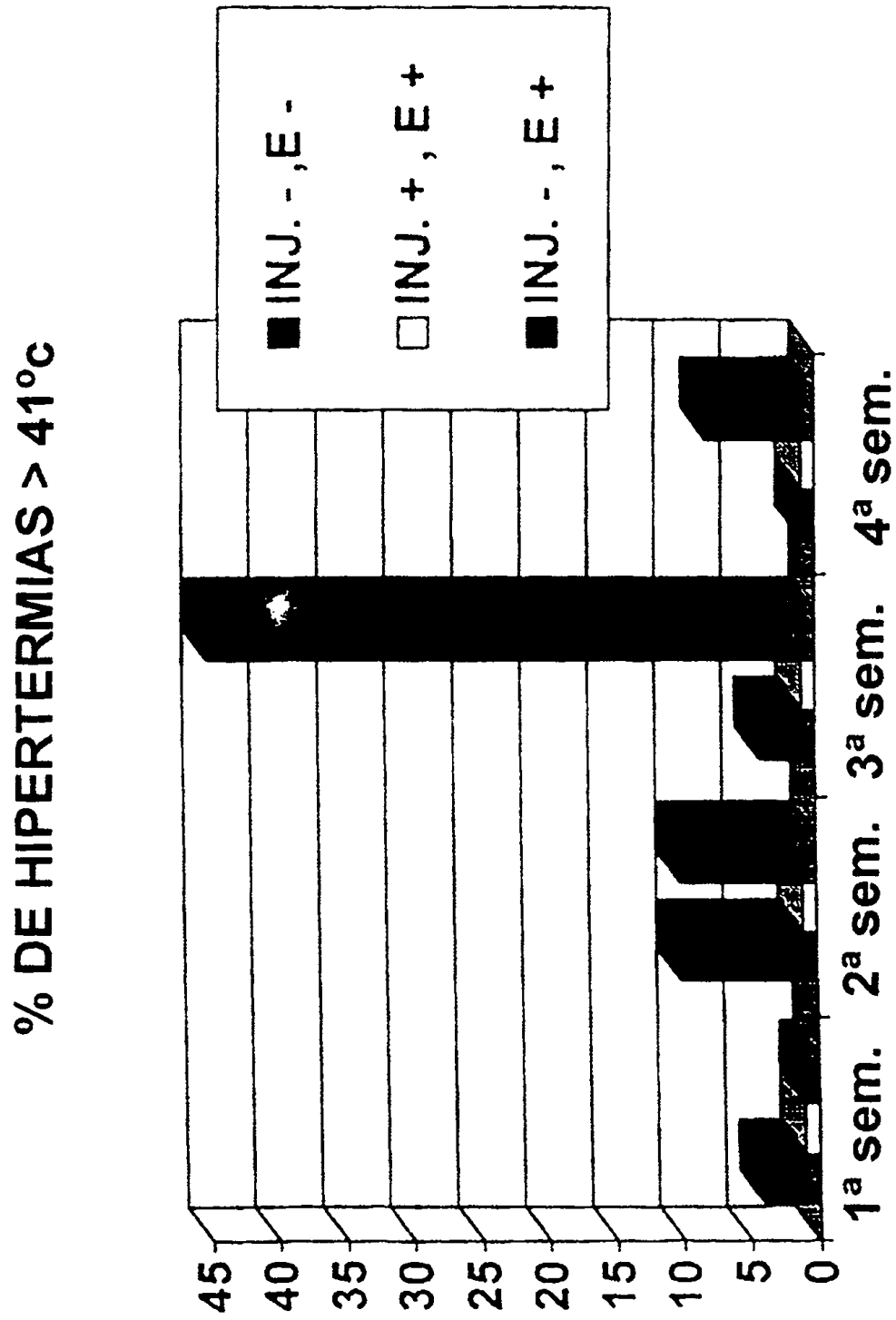


FIGURA 11

Tipo B
spot n° 103 a 159

Tipo A
spot n° 160 a 215

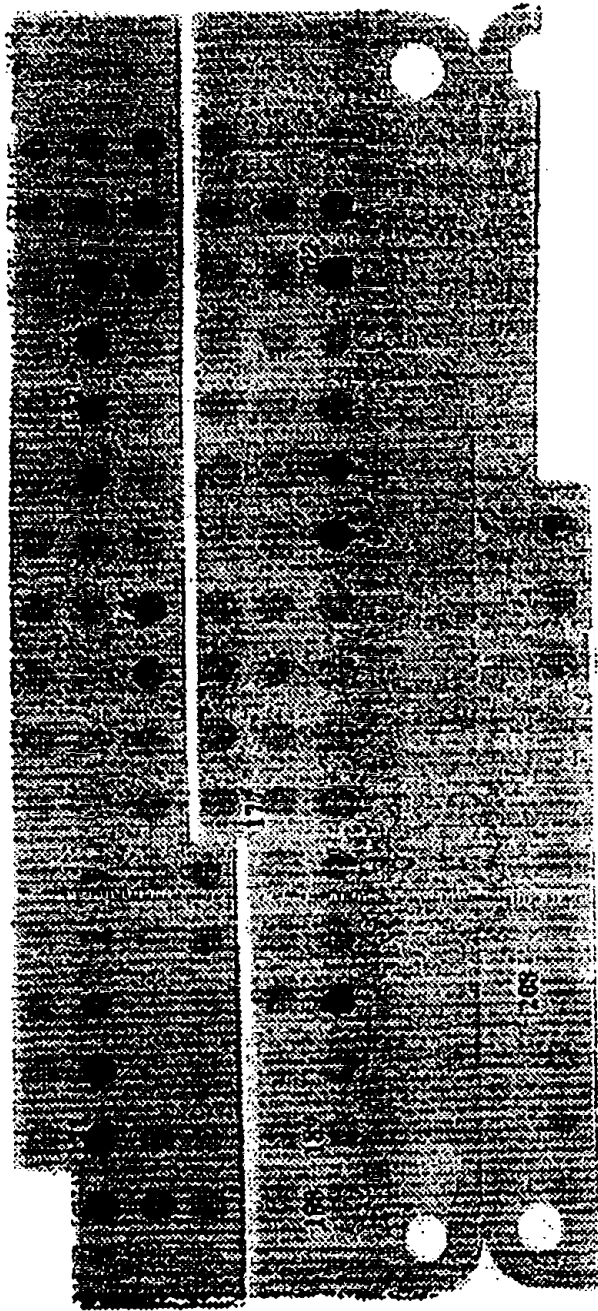


FIGURA 12

FIGURA 13