



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización y
Digitalización CSA Ltda

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones



PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-134464

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO Poxvirus de mapache que expresa genes
de virus porcino

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE Wyeth LLC

DOMICILIO Estados Unidos de America.

74. APODERADO Alvaro Gomez Ordoñez
C.C. 79.143.366 de Uquén.

22. BOGOTÁ, D.C., _____

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-134464-00000-0000

Fecha: 2009-11-25 16:21:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 186

ón

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE :

☒ Patente de Invención	☐ Patente de Modelo de Utilidad
☒ Capítulo I.	☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: WYETH LLC Dirección: Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América Lugar de Constitución: Estados Unidos de América Teléfono: Fax: E-Mail:	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6 Teléfono: 6341500 Fax: 3762211 E-Mail: office.bogota@bakernet.com	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 79.143.366 Usaquén TP 20281
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: WU, Stephen, Qitu; GILL, Michael, A.; CHU, Hsien-Jue. Dirección: 1921 Greenbrier Drive, Fort Dodge, Iowa 50501, Estados Unidos de América; 215 Avenue O, Apt. W6A, Fort Dodge, Iowa 50501, Estados Unidos de América; 15671 Cedar Lane, Bonner Springs, Kansas 66012, Estados Unidos de América. Nacionalidad o Domicilio: Estadounidenses	

5 PCT (85)	Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2008/006735</u>	Fecha <u>28.05.2008</u>
	Publicación Internacional No. <u>WO/2009/029130</u>	Fecha <u>05.03.2009</u>

6 Título (54)	<u>POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO</u>
-----------------------------	---

7 Clasificación Internacional (51)	<u>C12N 15/86</u>
--	-------------------

8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>US</u>	(32) Fecha <u>30.05.2007</u>	(31) Número de Solicitud <u>60/932,421</u>
---	----------------------------------	---------------------------------	---

9 Comprobante de pago No.	09-72,948; 09-57,145; 09-57,146, 09-80,272; 09-72696; 09-72697	Fecha <u>SEP 28/09; AGOSTO 3/09; AGOSTO 3/09; OCT 26/09; SEP 28/09; SEP 28/09</u>
---	--	--

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

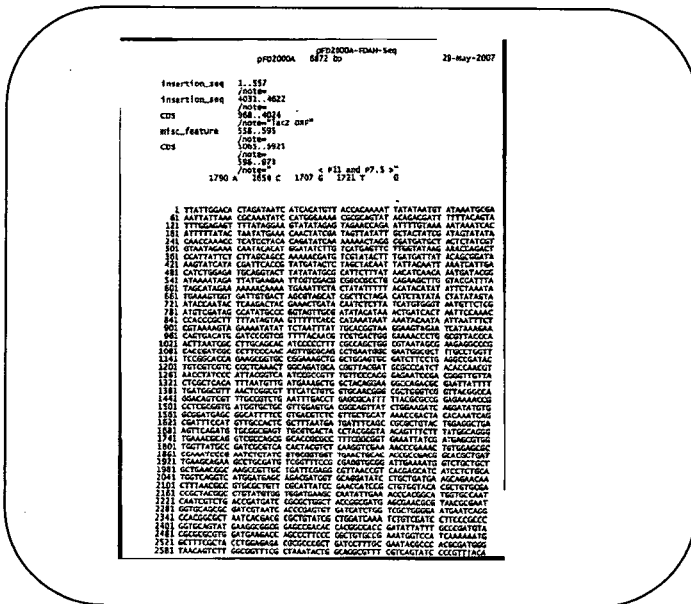
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos

11

FIGURA CARATERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



000003

(43) International Publication Date
5 March 2009 (05.03.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/029130 A2

(51) International Patent Classification:
C12N 15/09 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2008/006735

(22) International Filing Date: 28 May 2008 (28.05.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/932,421 30 May 2007 (30.05.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940
(US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WU, Stephen, Qitu
[US/US]; 1921 Greenbrier Drive, Fort Dodge, Iowa 50501
(US). GILL, Michael, A. [US/US]; 215 Avenue O, Apt.
W6A, Fort Dodge, Iowa 50501 (US). CHU, Hsien-Jue
[US/US]; 15671 Cedar Lane, Bonner Springs, Kansas
66012 (US).

(74) Agent: MALLON, Veronica; Wyeth, Patent Law Depart-
ment, Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 7940,
(US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,

[Continued on next page]

(54) Title: RACCOON POXVIRUS EXPRESSING GENES OF PORCINE VIRUS

Plasmid pFD2000A-FDAH-Seq

1 TTATTGGACA CTAGATAATC ATCAGATGTT ACCACAAAAT TATATAATGT ATAAATCGGA
61 AATTATTAAA CGCAATATATC CATGGGAJAA CGCGCAGTAT ACAGACGATT TTTTACAGTA
121 TTTGGAGAGT TTTATAGGAA GTATATAGAG TAGAACGAGA ATTTTGTAAA AATAAATCAC
181 AATTTTATAC TAATATGAAA CAACATATCGA TAGTTATATT CTAATATATG ATAGTATATA
241 CAACCAAAAC TCATCTAACA CAGATATCAA AAAAATAGG CGATGATGCT ACCTCATCGT
301 GTATAGAAA CAATACACAT GGATATCTTG TCATGAGTTC TTGGTATAGG AAACGACACT
361 CCATTATCTT CTTAGCAGCG AAAAAAGATG TCGTATACCT TGATGATATY ACACGGGATA
421 AAGTATGATA CGATTACAGG TATGATACCT TAGCTACAAAT TATTACAATT AAATCATTTGA
481 CATCTCGAGA TGCAGGTAAT TATATATGCG CATCTCTTAT AACATCAACA AATGATACGG
541 ATAAATAGAA TTATGAAGAA TTCGTGACGG CGGCAGCGTG CAGAACGTTG AATGATACGG
601 TAGCATAGAA AAAAACAAAA TGAATTTCTA CTATATTTTT ACATACATAT ATTCTAAATA
661 TGAAGTGGT GATTGTGACT AGCGTAGCAT CGCTCTCAGA CATCTATATA CTATATAGTA
721 ATACCAATAC TCAAGACTAC GAAACTGATA CAATCTCTTA TCATGTGGGT AATGTTCTCG
781 ATGTCGATAG CCATATGCCC GGTAGTTGCG ATATACATAA ACTGATCACT AATTECAAAC
841 CGAGCGCTT TTTATAGTAA GTTTTTCAAC CATAAATAAT AAATACAATA ATTAATTTCT
901 CGTAAAGTA GAAATATAT TCTAATTTAT TGCACGTAAG GGAAGTAGAA TCATAAGAAA
961 CAGTGACATG GATCCGCTCG TTTTACAAAG TCGTGAETGG GAAAGCCCTG CGGTTAACEA
1021 ACTTAATCGG CTTGACAGCAC ATCCGCTTTT TCGTGAETGG GAAAGCCCTG CGGTTAACEA
1081 CAGCGATCGG CTTTCCCAAC AGTTGCGGAG CCTGATGCG GAATGCGCT TTGCTGCTT
1141 TCCGCGACCA GAAGCGGTGC CGGAAAGCTG GCTGAGTGC GATCTCTCTG AGGCGGATAC
1201 TGTCGTCGCT CCGTCAAACT GGCAGATGCA CGGTACGAT GCGGCCATCT ACACCAAGGT
1261 AACCTATCCC ATTACGGTCA ATCCGCGCTT TGTTCACAG GAGAATCCGA CGGTTTGTTA
1321 CTGCTGACCA TTTAATGTTG ATGAAAGCTG GCTACAGGAA GCGCAGCGCG GAATTAATTT
1381 TGATGCGGTT AACTCGGCGT TGCATCTGTC GTGCAAGCGG CGCTGGGTG GTTACGGCCA
1441 GGAAGTCTGT TTGCGCTCTG AATTGACCT GAGCGCATTT TTACGCGCGG GAGAAAACCG
1501 CCTCGCGCTG ATGCTGCTGC GTTGAAGTGA GCGCAGTTAT CTGGAAGATC AGGATATGTG
1561 GCGGATGAGC GGCATTTTCC GCTTAAATGA TGAATTCAGT AAACCGACTA CACAAATCAG
1621 CATTTCATAT GTTGCCACTC GCTTAAATGA TGAATTCAGT AAACCGACTA CACAAATCAG
1681 AGTTACAGAT TCGCGCGAGT TCGGTGACTA CTTACGGGTA ACATTTCTT ATGAGCTG
1741 TGAACCGAG GTGCGCAGCG GCACGCGGCG TTTGCGGCT GAAATTTCTG ATGAGCTG
1801 TGTTATGCGG GATCGCGTCA CACTAGCTCT CAAGGTGCAA AACCGGAAAC TGTGAGCGC
1861 CGAAATCCCG AATCTCTATC GTGCGGPGGT TGAATCTCAC ACOCGCGAGC GCACGCTGAT
1921 TGAAGCAGAA GCCTGCGATG TCGGTTTCCG CGAGGTGCGG ATTGAAATG GTCTGCTGCT
1981 GCTGAACGCG AAGCGCTTGC TGATTGAGG CGTTAACCGT CACGAGCATC ATCTCTTGCA
2041 TGCTCAGGTC ATGAGATGAG AGACCATGCT GCAGGATATC CTGCTGATGA AGCAGAACAA
2101 CTTTACGCGG GTGCGCTGTT CCGATTATCC GAAACATCCG CTGCTGATGA AGCAGAACAA
2161 CCGCTACGCG GTGATGATG TGGATTGAAG ACCGCGGATG TCGCTGATGA AGCAGAACAA
2221 CAATGCTCTG ACCGATGATC CGCGCTGCT ACCGCGGATG TCGCTGATGA AGCAGAACAA
2281 GGTGACGCGC GATCGTAATC ACCGAGTGT GATCATCTG TCGCTGATGA AGCAGAACAA
2341 CCACGCGCTT AATCAGCAGC CGCTGTATCG CTGGATEAAA TCTGCTGATC CTGCTGATGA
2401 GGTGAGTAT GAAGCGCGCG GAGCGGACAC CACGCGCACC GATATATTTT CCGCGATGTA
2461 CGCGCGCGTG GATGAAGACC AGCCCTTCCC GCGTGTGCGG AAATGCTCCA TCAAAAATG
2521 GCTTTCGCTA CCGTGAGACA CGCGCGCTGT GATCCTTTG GATACGCTCC ACAGGATGCG
2581 TAACAGTCTT GCGCGTTTGC CTAAATACTG CGAGCGGTTT CGTCACTAT CCGCTTATCA

Figure 1

(57) Abstract: The present invention relates to a new recombinant raccoon poxvirus vector vaccine in which the vector expresses one or more antigenic proteins encoded by multiple open reading frames, preferably the ORF5, ORF6 and/or ORF3/ORF4/ORF7, of one or more porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains alone or in combination with an open reading frame of porcine circovirus type 2 (PCV-2), preferably ORF2, at the hemagglutinin (ha) and/or thymidine kinase (tk) loci.

WO 2009/029130 A2



NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

- without international search report and to be republished upon receipt of that report
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

FIELD OF THE INVENTION

The present invention concerns a new recombinant raccoon poxvirus vector that expresses the genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) alone or
5 in combination with porcine circovirus (PCV) and its use as a vaccine in the prophylaxis of disease caused by PCV and/or PRRSV.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a positive-strand RNA virus, a member of the family Arteriviridae, genus Arterivirus. PRRSV infects swine, causing
10 "Mystery Swine Disease" that was initially detected in 1987 in North America, then the disease spread to and through Europe in 1990. Since 1990, PRRSV has become a major global threat to the swine industry, affecting heavy production losses in pig herds.

Now known as Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS), the Mystery Swine Disease (also called Blue Ear disease, Porcine Epidemic Abortion and Respiratory
15 Syndrome (PEARS) or Respiratory Syndrome (SIRS)) is characterized by reproductive failure of pregnant sows that results in an abnormally high number of abortions during the last phase of gestation, anorexia, stillbirths, mummified fetuses, post-farrowing respiratory problems and weak piglets that die shortly after birth of respiratory disease or secondary infections. In piglets, infection with the PRRSV causes respiratory distress and a high mortality rate that can reach as
20 high as 70% mortality in piglets and greater. Older pigs may show mild signs of respiratory disease or secondary infections. The virus spreads quickly in the swine populations, and up to 95% of swine in a herd can become sero-positive within two to three months after initial infection. Even if the infections become stabilized, there is a strong likelihood that the PRRSV shed by excreting young female swine will infect the pregnant sows and the reproductive
25 problems will reoccur. The economic impact of PRRS in pig breeding herds is considerable.

Isolated first in the Netherlands as the cause of the Mystery Swine Disease, PRRSV was identified as Lelystad virus (LV) (G. Wesvoort *et al.*, Vet. Quarterly 3:121-130 (1991)). Shortly thereafter, a different Olot isolate was found in Spain (Plana *et al.*, Vet. Microbiol., 33:203.211, 1992). Subsequently, new isolates of PRRSV have been described in several publications (see,
30 for example, EP application No. 0 529 584 A2, WO 93/06211 and WO 93/07898).

Further publications revealed the structural characteristics of the PRRS virus isolates such as the entire Lelystad virus (LV) genome (J.J.M. Meulenber *et al.*, "Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to

LDV and EAV," Virology 192: 62-72 (1993)); a segment of the Tübingen (Germany) PRRS virus isolate (TV) genome (K-K. Cozelmann *et al.*, "Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the Arterivirus group," Virology 193: 329-339 (1993)) and other isolates, permitting the genes to be cloned and sequenced.

5 Arterivirus virions, in general, are 50-70 nm in diameter and contain an isomeric (probably icosahedral) nucleocapsid, 35 nm in diameter, surrounded by a closely adherent envelope with honeycomb-like surface structures. The genome consists of a single molecule of linear positive-sense, ssRNA, 13 to 15 kb in size. The PRRS virus has a size of 50-60 nm, with an envelope of approximately 30-35 nm contained in the nucleocapsid, and a single RNA
10 molecule. The genomic RNA of PRRSV is approximately 15 kb (15000 base pairs). The genome encodes the RNA replicase (ORF1a and ORF1b), the glycoproteins GP2 to GP5, the integral membrane protein M, and the nucleocapsid protein N (ORFs 2 to 7). Genomic RNA is synthesized via full-length, negative-sense replicative intermediate.

The single strand RNA molecule of the PRRSV genome contains a poly-A tail at 3' end.
15 The structure contains seven open reading frames (ORFs) encoding the viral proteins. ORF1 to ORF7 show small overlapping segments between them. Synthesis of the viral proteins is produced from a group of different length subgenomic transcripts (mRNA), but of similar 3' polyadenylated end, and 5' leader sequence originating from the non-coding 5' end sequence. This form of viral protein expression is considered nested mRNAs and has been previously
20 described for coronaviruses (W. J. M. Spaan *et al.*, J. Gen. Virol. 69:2939-2952 (1988)). Based on the Lelystad (LV) and Tübingen (TV) PRRSV viral isolate nucleotide sequence, and by homology with what has been observed with other arteriviruses, it has been proposed that in the viral genome, ORF1 (a and b) code for viral polymerase and replicase. ORF2 to ORF6 encode the viral envelope proteins, and ORF7 encode the nucleocapsid protein. Viral replicase and
25 polymerase are large-sized proteins, 260 and 163 kDa respectively, and both of them contain three possible glycosylation sites. Envelope proteins (ORFs 2 to 6) located at 3' end are small, between 30 and 19 kDa. All of them contain more than two possible glycosylation sites, especially ORF3 which contains 7 sites. All of these proteins contain hydrophobic sequences at the amino (N-) and carboxy (C-) terminal ends that might work as leader sequence and
30 membrane anchor. Generally, they are hydrophobic proteins, in accord with their location associated to a membrane. ORF6 has 3 hydrophobic segments located within the 90 amino acid residues at the N-terminal end. The protein coded by ORF7, possibly corresponding to the viral nucleocapsid, is extremely basic with arginine, lysine and histidine residues at the N-terminal end. The amino acid sequences of LV and TV viral polymerase, structural proteins and
35 nucleocapsid show an identity of between 29% and 67% in comparison with the LDV virus, and between 20% and 36% in comparison with the EAV virus.

The disease caused by PRRSV is responsible for severe losses to the global pig industry. For this reason, research has been spent developing vaccines capable of preventing the infection caused by PRRSV. The basis for the older vaccine development is the fact that PRRSV grows in primary alveolar macrophages of the host cells (the pig) and in monkey kidney cell lines. In large part, the prior vaccines against PRRSV, which have been described in WO 92/21375, WO 93/06211, WO 93/07898 and ES P9301973, are conventional vaccines obtained from viruses grown on macrophages and subsequently inactivated. The vaccines are disclosed as being capable of avoiding Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) and preventing reproductive alterations in sows.

Also of major significance to the welfare of pigs is another wide-spread disease called Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS). PMWS, which typically affects weaning piglets between around 5-18 weeks of age, poses a current or potential health threat to the piglets in epidemic proportions and seriously impacts the economic interests of the global swine industry. Clinical signs of PMWS consist of progressive weight loss, dyspnea, tachypnea, anemia, diarrhea and jaundice. Although more prevalent in weaning piglets, the debilitating disease can affect any animal of the porcine family including swine, hogs and adult pigs. Mortality rate may vary from 1% to 2%, and up to 40% in some complicated cases throughout the world. Porcine circovirus type 2 (commonly referred to as PCV-2) has been identified as the primary causative agent of PMWS (G. M. Allan *et al.*, "Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes," Vet. Rec., Vol. 142, pages 467-468, 1998; G. M. Allan *et al.*, "Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe," J. Vet. Diagn. Invest., Vol. 10, pages 3-10, 1998). It is a critical goal within the commercial swine business, therefore, to prevent outbreaks of PMWS in the pig family through the development of an effective vaccine against PCV2, the etiologic agent of PMWS, as a target for mass vaccination of the animals at risk.

United States Patent No. 6,217,883, corresponding to French Patent No. 2,781,159B, concerns five isolated PCV strains from pulmonary or ganglionic samples taken from pigs infected with PMWS in Canada, California and France and their use in combination with at least one porcine parvovirus antigen in multivalent immunogenic compositions. Proteins encoded by PCV2 open reading frames (ORF) consisting of ORF1 to ORF13 are broadly described in the patent but there is no exemplification of any specific protein exhibiting immunogenic properties. The patent discloses vectors consisting of DNA plasmids, linear DNA molecules and recombinant viruses that contain and express *in vivo* a nucleic acid molecule encoding the PCV antigen.

United States Patent No. 6,368,601 relates to new porcine circovirus strains isolated from pulmonary or ganglionic samples obtained from farms affected by the post-weaning

multisystemic wasting syndrome (PMWS). In particular, the patent describes purified preparations of these strains, conventional attenuated or inactivated vaccines, recombinant live vaccines, plasmid vaccines and subunit vaccines, as well as reagents and diagnostic methods. The patent further discloses a vector comprising isolated DNA molecule sequences which can be used for the production of subunits in an *in vitro* expression vector or as sequences to be integrated into a virus or plasmid type *in vivo* expression vector. The patent broadly describes their vector as being a pig herpes virus, a porcine adenovirus or a poxvirus and, more particularly, Aujeszky's disease virus, vaccinia virus, avipox virus or swinepox virus.

Previously, certain porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) genes (ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7) have been expressed in different vector systems: Baculovirus, Psuedorabies virus, TGEV and plasmid DNA. All of these expression systems are limited by being capable of expressing only one or two open reading frames in one viral construct.

For instance, United States Patent No. 5,888,513 relates to the recombinant proteins of the causative virus of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS), corresponding to ORF2 to ORF7 of the PRRSV Spanish isolate (PRRS-Olot), that have been produced in baculovirus expression system using Sf 9 (*Spodoptera frugiperda* insect cells) cell cultures as a permissive host. The patent describes the recombinant proteins as suitable for the formulation of vaccines capable of protecting porcine livestock from PRRS and for the preparation of diagnostic kits for detection of anti-PRRSV antibodies as well as of PRRSV in a pig biological sample. Specifically, the patent concerns a recombinant expression system comprising a recombinant baculovirus and a method of expressing isolated viral subunit proteins from at least one isolated nucleotide sequence selected from the group consisting of ORF2 to ORF7 of the PRRS-Olot isolate from a baculovirus transfer vector. The patent also describes a recombinant vaccine that contains at least one recombinant PRRSV protein.

There is a significant amount of published information on the topic of recombinant raccoon poxvirus for the expression of porcine antigens and use as vaccines. For instance, United States Patent No. 6,294,176 discloses a recombinant raccoon poxvirus (RCNV) vector that provides the insertion of one or two foreign DNA sequences of the open reading frames (ORFs) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), swine influenza virus hemagglutinin (SIV HA), swine influenza virus neuraminidase (SIV NA) and porcine parvovirus (PPV), such as one of ORF2-7 of PRRSV, in a non-essential region within the *HindIII* "U" genomic region, the *HindIII* "M" genomic region or the *HindIII* "N" genomic region of the raccoon poxvirus genome. The raccoon poxvirus viral genome is described in the patent as containing a deletion in the raccoon poxvirus host range gene of the viral genome. The patent provides a homology vector for producing the recombinant raccoon poxvirus by inserting the foreign DNA

sequence into the raccoon poxvirus genome. In the examples, the patent only shows how to prepare the insertion of the foreign DNA into the *HindIII* "U" genomic region. DNA sequence analysis indicates that the *HindIII* "U" genomic region disclosed by the patentees is not the hemagglutinin (*ha*) insertion and/or the thymidine kinase (*tk*) regions of the recombinant raccoon poxvirus genome.

United States Patent No. 7,109,025 discloses viral vectors and vaccines using recombinant porcine adenoviruses. In particular, the patent describes an *in vivo* replicating and recombinant porcine adenovirus comprising a heterologous nucleotide sequence inserted into the porcine adenovirus under conditions enabling the latter to be replicated *in vivo* and to express the inserted heterologous nucleotide sequence. The patent further describes using an adenovirus genome from porcine adenovirus (PAV) serotype 3 or 5 (PAV-3 or PAV-5) and inserting the heterologous nucleotide sequence encoding at least one product in a non-essential zone of the E3 region of the PAV-3 or PAV-5 genome located downstream of the major late promoter (MLP). The patent also relates to a DNA fragment comprising all or part of the referenced nucleotide sequence. The recombinant PAV vector is shown to express a porcine pathogenic agent selected from the group consisting of pseudorabies virus, swine influenza virus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, parvovirus virus, Hog Cholera Virus, porcine circovirus type 2, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Mycoplasma hyopneumoniae*.

United States Patent Number 6,497,883 deals with the use of a recombinant poxvirus, such as avipox virus, containing foreign DNA from porcine circovirus type 2 along with methods of treating or preventing disease caused by porcine circovirus type 2. Specifically, the recombinant poxvirus of the patent comprises an isolated DNA molecule consisting of ORFs 1 to 13 of porcine circovirus type 2, wherein the recombinant poxvirus is a recombinant ALVAC canarypox virus.

United States Patent Number 7,211,379 concerns a method for reducing viral load of porcine circovirus type 2 (PCV-2) in a pig by inducing an immune response against PCV-2 through the administration of an immunogenic composition comprising a PCV-2 antigen. The patent describes the antigen as a vector containing an exogenous PCV-2 nucleotide sequence, wherein the PCV-2 nucleotide sequence encodes and expresses ORF4, ORF13, or ORF4 and ORF13. In some embodiments shown in the patent, the immunogenic composition includes one or more additional pig pathogens. The composition used in the method disclosed in the patent additionally comprises at least one immunogen from at least one additional pig pathogen or a vector expressing such an immunogen in which the additional pig pathogen is selected from the group consisting of PRRS, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, atrophic rhinitis, pseudorabies, hog cholera, swine influenza, encephalomyocarditis virus, and PPV. The vectors disclosed in the patent comprise a DNA

vector plasmid, a bacteria such as an *E. coli*, a virus such as baculovirus, a herpesvirus including pig herpes viruses or Aujeszky's disease virus (pseudorabies), an adenovirus including a porcine adenovirus, and a poxvirus including a vaccinia virus, an avipox virus, a canarypox virus, a racoonpox and a swinepox virus.

5 The disclosures of United States Patent Number 6,241,989 and its continuation United States Patent Number 7,087,234 that deal with multivalent recombinant raccoon poxviruses, containing more than one exogenous gene inserted into either the thymidine kinase gene or the hemagglutinin gene. Disclosed in these two related patents is the use of the multivalent recombinant raccoon poxviruses as vaccines to immunize felines against subsequent challenge
10 by feline pathogens. Also disclosed is a method of making a multivalent recombinant raccoon poxvirus by a recombinant process involving the construction of an insertion vector into which the exogenous genes are inserted; and flanking the inserted genes are sequences which can recombine into the raccoon poxvirus thymidine kinase gene or the hemagglutinin gene; introducing both the insertion vector containing the exogenous genes, and raccoon poxvirus into
15 susceptible host cells; and selecting the recombinant raccoon poxvirus from the resultant plaques. The multivalent, recombinant raccoon poxvirus of the patents can infect and replicate in feline cells, and contains more than one exogenous gene inserted into a region consisting of a hemagglutinin gene or a thymidine kinase gene of the raccoon poxvirus genome which is non-essential for viral replication, notably wherein the exogenous genes are operably linked to a promoter for expression; and each exogenous gene encodes a feline pathogen antigen. The patents describe exogenous genes encoding feline pathogen antigens such as feline leukemia virus (FeLV Env), feline immunodeficiency virus (FIV Gag), feline immunodeficiency virus (FIV Env), feline infectious peritonitis virus (FIPV M), feline infectious peritonitis virus (FIPV N), feline calicivirus (FCV capsid protein), feline panleukopenia virus (FPV VP2) and rabies-G.

25 Despite all the efforts made in the veterinary vaccine art, there is still an art-recognized need for a safe and effective monovalent or multivalent PCV and/or PRRSV recombinant vaccine that would adequately protect pigs from being infected with the virus or viruses. Also needed is a safe and effective method for the prevention of infection or disease caused by PCV and/or PRRSV through the administration of a recombinant vaccine that can give an adequate
30 protective immune response in a pig against PMWS and/or PRRS. In addition to safety and efficacy upon administration to pigs, other benefits over the conventional, inactivated PRRSV vaccines would be attained by the recombinant vaccine that eliminates the risk of an accidental infection from the free virus or the inactivated virus reverting to its pathogenic state. It is clear that the development of a safe and effective raccoon poxvirus-vectored porcine vaccine would
35 result in important advantages in usage to prevent serious pig diseases, to ensure employee

safety during vaccine production and to completely eliminate any chance of the pathogen viruses surviving inactivation and decontamination procedures used in commercial production.

All patents and publications cited in this specification are hereby incorporated by reference in their entirety.

000011

5 SUMMARY OF THE INVENTION

In its broadest aspect, the invention provides a safe and effective recombinant poxvirus vector vaccine in which the vector expresses one or more of the antigenic proteins encoded by one or more porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates, preferably the antigenic proteins encoded by the multiple open reading frames of one or more porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates, alone or in combination with one or more open reading frames of porcine circovirus type 2 (PCV-2) at the *ha* and/or *tk* loci. In a particular embodiment, the vector further comprises a nucleic acid molecule encoding the glycoprotein of the feline leukemia virus bearing the FeLV P27⁺ phenotype. The FeLV P27⁺ or PCV-2 capsid gene is useful as a unique marker to screen the clones in different combinations.

10 This invention also provides a method of protecting pigs against Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome and/or Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome by administering the potent new recombinant vaccine to pigs in need of protection.

Accordingly, a first aspect of the invention provides a recombinant raccoon poxvirus vector (rRCPV) comprising one or more exogenous nucleic acid molecules encoding a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) protein, wherein:

20

- a.) at least one nucleic acid molecule is inserted into the hemagglutinin locus or the thymidine kinase locus of the raccoon poxvirus genome; or
- b.) at least two nucleic acid molecules are inserted into the hemagglutinin locus or the thymidine kinase locus of the raccoon poxvirus genome; or
- 25 c.) at least one nucleic acid molecule is inserted into the hemagglutinin locus and at least one nucleic acid molecule is inserted into the thymidine kinase locus of the raccoon poxvirus genome; or

In one embodiment, the raccoon poxvirus vector comprises at least two nucleic acid molecules that are inserted into the hemagglutinin locus and at least two nucleic acid molecules that are inserted into the thymidine kinase locus of the raccoon poxvirus genome.

30

In one embodiment, the recombinant raccoon poxvirus vector further comprises a nucleic acid molecule encoding a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) protein that is inserted into a third non-essential site of the raccoon poxvirus genome in addition

to the thymidine kinase and the hemagglutinin loci of the raccoon poxvirus genome. Any non-essential site of the recombinant raccoon poxvirus genome may be contemplated for use in the invention.

5 In one embodiment, the third non-essential site of the raccoon poxvirus genome is the serine protease inhibitor site.

In one embodiment, each of the one or more exogenous nucleic acid molecules encodes one or more open reading frames of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus. The open reading frames are selected from the group consisting of ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 and a combination thereof.

10 In one embodiment, the poxvirus vector encodes at least two copies of the same porcine reproductive and respiratory syndrome virus protein. The two copies of the same protein may be encoded by two different nucleic acid molecules, or they may be encoded by the same nucleic acid molecule. The two copies of the same protein may be operably linked to one promoter, or the two copies of the same protein may be operably linked to separate promoters.
15 The two copies of the same protein are encoded by a porcine reproductive and respiratory syndrome virus open reading frame selected from the group consisting of ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 and a combination thereof.

In one embodiment, the two or more nucleic acid molecules are inserted into the hemagglutinin locus and/or the thymidine kinase locus of the raccoon poxvirus genome.

20 In one embodiment, the two or more exogenous nucleic acid molecules encode at least two open reading frames of porcine reproductive and respiratory syndrome virus selected from the group consisting of ORF5-ORF6, ORF5-ORF6-ORF7, ORF3-ORF5-ORF6, ORF3-ORF4-ORF7, ORF3-ORF4-ORF5-ORF7, ORF3-ORF4-ORF6-ORF7, and ORF3-ORF4-ORF5-ORF6-ORF7.

25 In one embodiment, the porcine reproductive and respiratory syndrome virus is ISU12 (Iowa), Olot/91 (Spanish) or both.

In one embodiment, the recombinant raccoon poxvirus vector further comprises a nucleic acid molecule encoding an open reading frame (ORF) of porcine circovirus type 2 (PCV2).

30 In one embodiment, the porcine circovirus 2 open reading frame is ORF2.

In one embodiment, the PCV2 ORF2 may be separately inserted into the thymidine kinase locus of the raccoon poxvirus genome.

In one embodiment, the recombinant raccoon poxvirus vector further comprises a nucleotide sequence encoding a glycoprotein of feline leukemia virus P27⁺ phenotype.

35 In one embodiment, the raccoon poxvirus is live and replicable.

A second aspect of the invention provides a recombinant porcine vaccine comprising an immunologically effective amount of any one or more of the recombinant raccoon poxvirus vectors described herein, and, optionally, a suitable carrier, diluent or adjuvant. 000013

5 In one embodiment, the recombinant porcine vaccine comprises an immunologically effective amount of two or more of the recombinant raccoon poxvirus vectors as described herein, and, optionally, a suitable carrier or diluent.

In one embodiment, the raccoon poxvirus is live and replicable.

In one embodiment, the vaccine is adjuvant-free.

In one embodiment, the vaccine is administered as a single dose or as repeated doses.

10 In one embodiment, the recombinant porcine vaccine further comprises at least one additional porcine antigen. The additional porcine antigen is selected from the group consisting of *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen, *Haemophilus parasuis* antigen, *Pasteurella multocida* antigen, *Streptococcus suis* antigen, *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigen, *Bordetella bronchiseptica* antigen, *Salmonella choleraesuis* antigen, *Erysipelothrix rhusiopathiae* antigen, leptospira bacteria antigen, swine influenza virus antigen, porcine parvovirus antigen, *Escherichia coli* antigen, porcine respiratory coronavirus antigen, rotavirus antigen, an antigen from a pathogen causative of Aujeszky's Disease, Swine Transmissible Gastroenteritis antigen and a combination thereof.

20 A third aspect of the invention provides a method for inducing an immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus, comprising administering to a porcine animal a recombinant porcine vaccine comprised of one or more of the recombinant raccoon poxvirus vectors as described herein.

In one embodiment, the immune response is a humoral or antibody mediated response. In one embodiment, the immune response is a cell-mediated or T cell mediated immune response. 25

In one embodiment, the protective immune response is induced by administering a vaccine dose that ranges from about 4.5 Log₁₀TCID₅₀/ml to about 7.5 Log₁₀TCID₅₀/ml.

In one embodiment, the recombinant porcine vaccine utilized for inducing an immune response comprises one or more of a live and replicable recombinant raccoon poxvirus vector(s). 30

In one embodiment, the recombinant porcine vaccine utilized for inducing an immune response comprises two or more live and replicable recombinant raccoon poxvirus vectors.

A fourth aspect of the invention provides a method for preventing porcine reproductive and respiratory syndrome and Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, comprising 35 administering to a porcine animal in need of protection a recombinant porcine vaccine

comprising an immunologically effective amount of one or more of the recombinant raccoon poxvirus vector(s) as described herein, and optionally, a suitable carrier, diluent or adjuvant.

In one embodiment, the recombinant raccoon poxvirus vector(s) is/are live and replicable.

- 5 A fifth aspect of the invention provides for use of any of the vectors or vaccines of the invention for the preparation of a medicament for inducing a protective immune response to a porcine virus in a mammal, or for preventing porcine reproductive and respiratory syndrome and/or Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in a mammal.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- 10 Figure 1 is the nucleic acid sequence of the pFD2000A-FDAH plasmid (SEQ ID NO: 1)
Figure 2 is the nucleic acid sequence of the pFD2001 TK-FDAH plasmid (SEQ ID NO: 2)
Figure 3 is the nucleic acid sequence of the pFD2003SEL-FDAH plasmid (SEQ ID NO: 3)
Figure 4 is the nucleic acid sequence of the pFD2003SEL-GPV-PV-FDAH plasmid (SEQ ID NO: 4)
15 Figure 5 is the nucleic acid sequence of PCV2A ORF2-FDAH (SEQ ID NO: 5)
Figure 6 is the nucleic acid sequence of PCV2B ORF2-FDAH (SEQ ID NO: 6)
Figure 7 is the nucleic acid sequence of PRRSV ISU12-ORF3-FDAH (SEQ ID NO: 7)
Figure 8 is the nucleic acid sequence of PRRSV ISU12-ORF4-FDAH (SEQ ID NO: 8)
20 Figure 9 is the nucleic acid sequence of PRRSV ISU12-ORF5-FDAH (SEQ ID NO: 9)
Figure 10 is the nucleic acid sequence of PRRSV ISU12-ORF6-FDAH (SEQ ID NO: 10)
Figure 11 is the nucleic acid sequence of PRRSV ISU12-ORF7-FDAH (SEQ ID NO: 11)
Figure 12 is the nucleic acid sequence of PRRSV Olot91-ORF5-FDAH (SEQ ID NO: 12)

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

- 25 Before the present methods and treatment methodology are described, it is to be understood that this invention is not limited to particular methods, and experimental conditions described, as such methods and conditions may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for purposes of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting, since the scope of the present invention will be limited only in the
30 appended claims.

As used in this specification and the appended claims, the singular forms "a", "an", and "the" include plural references unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, references to "the method" includes one or more methods, and/or steps of the type described

herein and/or which will become apparent to those persons skilled in the art upon reading this disclosure and so forth.

000015

Accordingly, in the present application, there may be employed conventional molecular biology, microbiology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Byrd, CM and Hruby, DE, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 269: *Vaccinia Virus and Poxvirology*, Chapter 3, pages 31-40; Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); *Transcription And Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986)); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, (1986)); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the invention, the preferred methods and materials are now described. All publications mentioned herein are incorporated herein by reference in their entirety.

DEFINITIONS

The terms used herein have the meanings recognized and known to those of skill in the art, however, for convenience and completeness, particular terms and their meanings are set forth below.

The term "about" means within 20%, more preferably within 10% and more preferably within 5%.

The term "adjuvant" refers to a compound or mixture that enhances the immune response to an antigen. An adjuvant can serve as a tissue depot that slowly releases the antigen and also as a lymphoid system activator that non-specifically enhances the immune response (Hood et al., *Immunology, Second Ed.*, 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, p. 384). Depending on the circumstances, a primary challenge with an antigen alone, in the absence of an adjuvant, may fail to elicit a humoral or cellular immune response. Adjuvants include, but are not limited to, complete Freund's adjuvant, incomplete Freund's adjuvant, saponin, mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil or hydrocarbon emulsions, keyhole limpet hemocyanins, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (*bacille*

Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum*. Preferably, the adjuvant is pharmaceutically acceptable.

. 000316

The term "antigen" refers to a compound, composition, or immunogenic substance that can stimulate the production of antibodies or a T-cell response in an animal, including compositions that are injected or absorbed into an animal. The term may be used to refer to an individual macromolecule or to a homogeneous or heterogeneous population of antigenic macromolecules. An antigen reacts with the products of specific humoral or cellular immunity. The term "antigen" broadly encompasses moieties including proteins, polypeptides, antigenic protein fragments, nucleic acids, oligosaccharides, polysaccharides, organic or inorganic chemicals or compositions, and the like. Furthermore, the antigen can be derived or obtained from any virus, bacterium, parasite, protozoan, or fungus, and can be a whole organism. The term "antigen" includes all related antigenic epitopes. Similarly, an oligonucleotide or polynucleotide, which expresses an antigen, such as in nucleic acid immunization applications, is also included in the definition. Synthetic antigens are also included, for example, polypeptides, flanking epitopes, and other recombinant or synthetically derived antigens (Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777 2781; Bergmann et al. (1996) J. Immunol. 157:3242 3249; Suhrbier, A. (1997) Immunol. and Cell Biol. 75:402 408; Gardner et al. (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, Jun. 28 Jul. 3, 1998).

"Encoded by" or "encoding" refers to a nucleic acid sequence which codes for a polypeptide sequence, wherein the polypeptide sequence contains an amino acid sequence of at least 3 to 5 amino acids, more preferably at least 8 to 10 amino acids, and even more preferably at least 15 to 20 amino acids, a polypeptide encoded by the nucleic acid sequences. Also encompassed are polypeptide sequences, which are immunologically identifiable with a polypeptide encoded by the sequence. Thus, an antigen "polypeptide," "protein," or "amino acid" sequence may have at least 70% similarity, preferably at least about 80% similarity, more preferably about 90-95% similarity, and most preferably about 99% similarity, to a polypeptide or amino acid sequence of an antigen.

The term "exogenous" as used herein is intended to encompass that which is produced, originated, derived or developed outside the raccoon poxvirus genome, *i.e.*, originating externally to the poxvirus genome such as, for example, the gene material obtained or isolated from the PRRSV that is considered foreign to the raccoon poxvirus genome.

A "gene" as used in the context of the present invention is a sequence of nucleotides in a nucleic acid molecule (chromosome, plasmid, etc.) with which a genetic function is associated. A gene is a hereditary unit, for example of an organism, comprising a polynucleotide sequence (e.g., a DNA sequence for mammals) that occupies a specific physical location (a "gene locus" or "genetic locus") within the genome of an organism. A gene can encode an

expressed product, such as a polypeptide or a polynucleotide (e.g., tRNA). Alternatively, a gene may define a genomic location for a particular event/function, such as the binding of proteins and/or nucleic acids (e.g., phage attachment sites), wherein the gene does not encode an expressed product. Typically, a gene includes coding sequences, such as polypeptide encoding sequences, and non-coding sequences, such as promoter sequences, poly-adenylation sequences, transcriptional regulatory sequences (e.g., enhancer sequences). Many eucaryotic genes have "exons" (coding sequences) interrupted by "introns" (non-coding sequences). In certain cases, a gene may share sequences with another gene(s) (e.g., overlapping genes).

An "immune response" to an antigen or vaccine composition is the development in a subject of a humoral and/or a cell-mediated immune response to molecules present in the antigen or vaccine composition of interest. For purposes of the present invention, a "humoral immune response" is an antibody-mediated immune response and involves the generation of antibodies with affinity for the antigen/vaccine of the invention, while a "cell-mediated immune response" is one mediated by T-lymphocytes and/or other white blood cells. A "cell-mediated immune response" is elicited by the presentation of antigenic epitopes in association with Class I or Class II molecules of the major histocompatibility complex (MHC). This activates antigen-specific CD4+ T helper cells or CD8+ cytotoxic T lymphocyte cells ("CTLs"). CTLs have specificity for peptide antigens that are presented in association with proteins encoded by the major histocompatibility complex (MHC) and expressed on the surfaces of cells. CTLs help induce and promote the intracellular destruction of intracellular microbes, or the lysis of cells infected with such microbes. Another aspect of cellular immunity involves an antigen-specific response by helper T-cells. Helper T-cells act to help stimulate the function, and focus the activity of, nonspecific effector cells against cells displaying peptide antigens in association with MHC molecules on their surface. A "cell-mediated immune response" also refers to the production of cytokines, chemokines and other such molecules produced by activated T-cells and/or other white blood cells, including those derived from CD4+ and CD8+ T-cells. The ability of a particular antigen or composition to stimulate a cell-mediated immunological response may be determined by a number of assays, such as by lymphoproliferation (lymphocyte activation) assays, CTL cytotoxic cell assays, by assaying for T-lymphocytes specific for the antigen in a sensitized subject, or by measurement of cytokine production by T cells in response to restimulation with antigen. Such assays are well known in the art. See, e.g., Erickson et al., J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376.

An "immunogenic ORF" or "immunogenic orf" refers to an open reading frame that elicits an immune response.

An "immunologically effective amount" as used herein refers to the amount of antigen or vaccine sufficient to elicit an immune response, either a cellular (T cell) or humoral (B cell or

antibody) response, as measured by standard assays known to one skilled in the art. For example, with respect to the present invention, an "immunologically effective amount" is a minimal protection dose (titer) of ≥ 4.5 to $7.5 \text{ Log}_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$. The effectiveness of an antigen as an immunogen, can be measured either by proliferation assays, by cytolytic assays, such as chromium release assays to measure the ability of a T cell to lyse its specific target cell, or by measuring the levels of B cell activity by measuring the levels of circulating antibodies specific for the antigen in serum. Furthermore, the level of protection of the immune response may be measured by challenging the immunized host with the antigen that has been injected. For example, if the antigen to which an immune response is desired is a virus or a tumor cell, the level of protection induced by the "immunologically effective amount" of the antigen is measured by detecting the percent survival or the percent mortality after virus or tumor cell challenge of the animals.

As defined herein "a non-essential site" in the raccoon poxvirus genome means a region in the viral genome, which is not necessary for viral infection or replication. Examples of non-essential sites in the raccoon poxvirus genome include, but are not limited to, the thymidine kinase (TK) site, the hemagglutinin (HA) site and the serine protease inhibitor site. The TK site of raccoon poxvirus is described in C. Lutze-Wallace, M. Sidhu and A. Kappeler, *Virus Genes* 10 (1995), pp. 81-84. The sequence of the TK gene of raccoon poxvirus can also be found in PubMed accession numbers DQ066544 and U08228. The HA site of raccoon poxvirus is described in Cavallaro KF and Esposito, JJ, *Virology* (1992), 190(1): 434-9. The sequence of the HA gene of raccoon poxvirus can also be found in PubMed accession number AF375116.

The term "nucleic acid molecule" or "nucleic acid sequence" has its plain meaning to refer to long chains of repeating nucleotides such as the repeated units of purine and pyrimidine bases that direct the course of protein synthesis, that is, they encode and express the protein substance. As the term is used in the claims, the nucleic acid refers to the known exogenous or foreign genes that encode the porcine reproductive and respiratory syndrome virus proteins, desirably, the open reading frame genes.

The term "open reading frame" or "ORF", or "orf", as used herein, refers to the minimal nucleotide sequence required to encode a particular virus protein without an intervening stop codon.

"Operably linked" refers to an arrangement of elements wherein the components so described are configured so as to perform their usual function. Thus, a given promoter that is operably linked to a coding sequence (e.g., a sequence encoding an antigen or interest) is capable of effecting the expression of the coding sequence when the regulatory proteins and proper enzymes are present. In some instances, certain control elements need not be contiguous with the coding sequence, so long as they function to direct the expression thereof.

For example, intervening untranslated yet transcribed sequences can be present between the promoter sequence and the coding sequence and the promoter sequence can still be considered "operably linked" to the coding sequence. Thus, a coding sequence is "operably linked" to a transcriptional and translational control sequence in a cell when RNA polymerase transcribes the coding sequence into mRNA, which is then trans-RNA spliced and translated into the protein encoded by the coding sequence.

The terms "porcine" and "swine" are used interchangeably and refer to any animal that is a member of the family Suidae such as, for example, a pig.

A "protective" immune response refers to the ability of a vaccine to elicit an immune response, either humoral or cell mediated, which serves to protect the mammal from an infection. The protection provided need not be absolute, i.e., the infection need not be totally prevented or eradicated, if there is a statistically significant improvement compared with a control population of porcine mammals, e.g. infected animals not administered the vaccine. Protection may be limited to mitigating the severity or rapidity of onset of symptoms of the infection.

The term "recombinant" as used herein simply refers to the raccoon poxvirus constructs that are produced by standard genetic engineering methods.

The term "replicable" refers to a microorganism, for example, a virus such as the raccoon poxvirus that is capable of replicating, duplicating or reproducing in a suitable host cell.

The terms "vaccine" or "vaccine composition" are used interchangeably herein and refer to a pharmaceutical composition comprising at least one immunologically active component that induces an immune response in an animal, and/or protects the animal from disease or possible death due to an infection, and may or may not include one or more additional components that enhance the immunological activity of the active component. A vaccine may additionally comprise further components typical to pharmaceutical compositions.

A "vector" is a DNA molecule, capable of replication in a host organism, into which a gene is inserted to construct a recombinant DNA molecule.

GENERAL DESCRIPTION

In accordance with the present invention, there is provided a unique recombinant poxvirus vector in which the vector comprises one or more exogenous nucleic acid molecules encoding a porcine reproductive and respiratory syndrome virus protein. In one embodiment, the poxvirus vector may encode at least two copies of the same porcine reproductive and respiratory syndrome virus protein. The two copies of the same protein may be encoded by two different nucleic acid molecules or the two copies of the same protein may be encoded by the

same nucleic acid molecule. The two copies of the same protein may be operably linked to one promoter or to separate promoters.

The proteins may be encoded by an open reading frame such as ORF1a or ORF1b to ORF7, preferably the ORF5, ORF6 and/or ORF3/ORF4/ORF7, of one or more porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates with or without one or more open reading frames such as ORF1 to ORF13, preferably ORF2, of porcine circovirus type 2 (PCV-2) at the hemagglutinin (*ha*) and/or thymidine kinase (*tk*) loci, respectively. Another third non-essential site of the poxvirus genome for insertion of any of the nucleic acid molecules described herein is the serine protease inhibitor site. In one particular embodiment, the two or more exogenous nucleic acid molecules encode two or more open reading frames of porcine reproductive and respiratory syndrome virus selected from the group consisting of ORF5-ORF6, ORF5-ORF6-ORF7, ORF3-ORF5-ORF6, ORF3-ORF4-ORF7, ORF3-ORF4-ORF5-ORF7, ORF3-ORF4-ORF6-ORF7, and ORF3-ORF4-ORF5-ORF6-ORF7.

Also inserted at *ha* and/or *tk* loci is the gene expressing the glycoprotein of the feline leukemia virus (FeLV) that bears the FeLV P27⁺ phenotype (blue color in FeLV P27 ELISA). In these constructs, the FeLV P27⁺ or PCV-2 ORF2 (capsid gene) is used as a unique marker to screen the clones in different combinations. Preferred PRRSV isolates comprise the ISU12 (Iowa) and Olot/91 (Spanish) strains but other isolates may be readily substituted for the strains illustrating the invention in the examples below.

The object of the present invention, therefore, is to express four or more open reading frames (ORFs) of the U.S. and E.U. strains of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) alone or in combination with the ORF of porcine circovirus (PCV2) at the hemagglutinin (*ha*) and/or the thymidine kinase (*tk*) locus of the raccoon poxvirus (RCNV) genome in one viral construct to make a potent vaccine.

Another object of the invention is to use a new clone screening system that utilizes either limited dilution and blue-to-white plaque approach or limited dilution and virus ELISA as the screening marker rather than a conventional screening marker like *LacZ*.

The foregoing objects are accomplished by providing the novel vaccine comprising a recombinant raccoon poxvirus vector (rRCNV) in which the rRCNV expresses multiple open reading frames, preferably the ORF5, ORF6 and/or ORF3/ORF4/ORF7, of one or more PRRSV isolates with or without an open reading frame, preferably ORF2, of PCV-2 at the hemagglutinin (*ha*) and/or thymidine kinase (*tk*) loci, respectively.

Previous expression systems have been limited in their ability to express only one or two open reading frames (ORFs) of the PRRSV genes in one viral construct. The present invention advantageously permits the expression of four or more ORFs of the U.S. and E.U. strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) alone or in combination with the

open reading frame of porcine circovirus type 2 (PCV-2). Heretofore not described in the art, the superior expression system of this invention allows the insertion of multiple ORFs from PRRSV into the *ha* and/or *tk* loci and/or serine protease inhibitor locus of the raccoon poxvirus (RCNV) genome in one viral construct thereby creating a potent recombinant vaccine to protect pigs against PRRS.

The present invention uses a screening system that utilizes either limiting dilution and the blue-to-white plaque approach or limiting dilution and an ELISA as a screening marker. Quite beneficially, this screening system affords multiple site expression in one viral construct.

Raccoon poxvirus (Herman strain) was first isolated from the respiratory tract of raccoons with no clinical symptoms by Y. F. Herman in Aberdeen, Maryland in 1961-1962 (Y. F. Herman, "Isolation and characterization of a naturally occurring pox virus of raccoons," In: Bacteriol. Proc., 64th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, p. 117 (1964)). In the rRCNV-PRRS construct of the present invention, the insertion of multiple open reading frames such as, for example, ORF5, ORF6 and/or ORF3/ORF4/ORF7, of one or more strains of PRRSV genes into the *ha* and/or *tk* loci of the raccoon poxvirus (RCNV) genome further attenuates the avirulent Herman strain. Advantageously, the rRCNV vectored PRRSV vaccine of the present invention also improves employee safety during vaccine production and completely eliminates any chance of the pathogenic virus surviving inactivation and decontamination procedures used during commercial production.

It is contemplated that the scientific advancement and novel method described in the present invention may be applied by the person having ordinary skill in the art to antigenic proteins of multiple reading frames obtained from PRRSV strains other than ISU12 and Olot/91 and can be inserted at the *tk* and/or *ha* loci of the raccoon poxvirus vector to provide an immunogenic vaccine for the protection against PRRS. For instance, other strains such as the North American strain VR-2332, the European strain Lelystad Virus and the like may readily substitute for the ISU12 and/or Olot/91 strains. Since the RNA virus is subject to mutations, alternatively, the desired ORF gene of a new field isolate or virus mutant may be isolated and utilized in the recombinant vaccine of the invention. Nevertheless, there is high homology between many mutants and numerous isolates of PRRSV found to date and, thus, using certain open reading frames such as the ORF5 or ORF6 in the vaccine construct of the invention has the advantage of being significantly effective against PRRS. For those isolates with lower homology around 40%, the practical advantage of the construct of the invention is that it can readily accommodate the antigenic proteins of several ORFs from multiple viral sources to provide an efficacious, broad-spectrum vaccine. Such prevention of PRRS through a successful inoculation program of piglets is of extreme importance to the pig industry as there is no effective long term treatment for the disease.

It is further contemplated that the poxvirus vector useful in the invention may comprise, but is not limited to, the raccoon poxvirus, the canary poxvirus, the fowlpox virus, the swinepox virus, the vaccinia virus and the like but desirably the raccoon poxvirus is employed. While an inactivated poxvirus vector is useable in the practice of the method of the present invention, a
5 live vector is preferred.

This invention also provides a new method of protecting pigs against Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) and/or Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) by administering the potent new recombinant vaccine to pigs in need of protection.

10 In the method of the invention, an immunologically effective amount of the vaccines of the present invention is administered to a pig, particularly young piglets, in need of protection against PMWS and/or PRRS in order to induce a protective immune response in the animals. An effective immunizing amount given to the pig is one in which a sufficient immunological response to the vaccine is attained to protect the pig from the harmful effects of PCV-2 and/or
15 PRRSV. A protective immune response is considered to be obtained when the vaccine is able to protect at least a significant number of the inoculated pigs as required by standard values in the vaccine field. The immunologically effective dosage or the effective immunizing amount that inoculates the animal and elicits satisfactory vaccination effects can be easily determined or readily titrated by routine testing such as, for example, by standard titration studies.

20 The novel vaccine constructs of the present invention are employed for the vaccination of healthy piglets at approximately three months of age for the prevention of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) and/or Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS). The vaccine may also be given to mature or adult sows (*i.e.*, older than three months) prior to breeding. The vaccine can be administered in a single dose or in
25 repeated doses if antibody titers decline and a booster shot is deemed necessary. Desirably, the vaccine is administered to healthy animals in a single inoculation to provide long term protection against disease, protecting the animals for at least one year to three years or longer. Appropriate dosages are determined by standard dose titration studies. The vaccine may contain an immunologically effective amount of any one of the recombinant raccoon poxvirus
30 vectored constructs described herein. In another embodiment, the vaccine may contain an immunologically effective amount of any two or more of the recombinant raccoon poxvirus vector constructs described herein.

The vaccine can be readily given by any route of administration, orally, intranasally, transdermally (*i.e.*, applied on or at the skin surface for systemic absorption), parenterally, *etc.*,
35 though some routes may be logistically more difficult depending on the particular animal and the handler. The parenteral route of administration includes, but is not limited to, subcutaneous,

intramuscular, intravenous, intraperitoneal, intradermal (*i.e.*, injected or otherwise placed under the skin) routes and the like. Preferably, the vaccine is administered subcutaneously.

The poxvirus vector may be live or inactivated by conventional procedures for preparing inactivated viral vaccines, for example, using BEI (binary ethyleneimine), formalin and the like, with BEI being a preferred inactivant, though it is highly desirable for the vaccine of the present invention to use a live raccoon poxvirus for optimal and potent immunological efficacy.

Beneficially, the live recombinant RCNV expressing multiple ORFs of PCV-2 and/or PRRSV are useful as a vaccine, either alone or in combination with suitable carriers, diluents and adjuvants. The vaccine product may optionally contain a variety of typical, non-toxic, pharmaceutically acceptable additives, diluents and adjuvants that include, but are not limited to, preservatives; stabilizers; emulsifiers; aluminum hydroxide; aluminum phosphate; pH adjusters such as sodium hydroxide, hydrochloric acid, *etc.*; surfactants such as Tween® 80 (polysorbate 80, commercially available from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); liposomes; iscom adjuvant; synthetic glycopeptides such as muramyl dipeptides; extenders such as dextran or dextran combinations, for example, with aluminum phosphate, dextran sulfate, DEAE-Dextran and the like; carboxypolymethylene, such as CARBOPOL® (polyacrylic polymer commercially available from B.F. Goodrich Company, Cleveland, Ohio); ethylene maleic anhydride or ethylene/maleic anhydride copolymers (EMA®, a linear ethylene/maleic anhydride copolymer having approximately equal amounts of ethylene and maleic anhydride, having an estimated average molecular weight of about 75,000 to 100,000, commercially available from Monsanto Co., St. Louis, MO); acrylic copolymer emulsions such as a copolymer of styrene with a mixture of acrylic acid and methacrylic acid like NEOCRYL® A640 (*e.g.* U.S. Patent No. 5,047,238, an uncoalesced aqueous acrylic acid copolymer of acrylic acid and methacrylic acid mixed with styrene, commercially available from Polyvinyl Chemicals, Inc., Wilmington, MA); bacterial cell walls such as mycobacterial cell wall extract; *Corynebacterium*-derived adjuvants such as *Corynebacterium parvum*; *Propionibacterium*-derived adjuvants such as *Propionibacterium acne*; *Mycobacterium bovis* (Bacille Calmette-Guerin, or BCG); subviral particle adjuvants such as orbivirus; cholera toxin; N,N-dioctadecyl-N',N'-bis(2-hydroxyethyl)-propanediamine (avridine); monophosphoryl lipid A; dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA, commercially available from Kodak, Rochester, NY); synthetics and mixtures thereof. Further additives that may be employed in the present vaccine include, but are not limited to, dextrose, conventional antioxidants and conventional chelating agents, such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). Other pharmaceutically acceptable adjuvants that may optionally supplement the vaccine formulation include, but are not limited to, polyanions, polycations, peptides, mineral oil emulsion, immunomodulators, a variety of combinations and the like. Further non-limiting examples of suitable adjuvants include squalane and squalene (or

000024

other oils of animal origin); polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymers such as PLURONIC® (L121, for example, commercially available from BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen, Germany); saponin; Quil A (commercial name of a purified form of Quillaja saponaria, available from Iscotec AB, Sweden and Superfos Biosector a/s, Vedbaek, Denmark);
5 mineral oils such as MARCOL® (a purified mixture of liquid saturated hydrocarbons, commercially available from Exxon-Mobil, Fairfax, VA); vegetable oils such as peanut oil; interleukins such as interleukin-2 and interleukin-12; interferons such as gamma interferon; animal poxvirus proteins or mixtures thereof. Examples of suitable stabilizers include, but are not limited to, sucrose, gelatin, peptone, digested protein extracts such as NZ-Amine or NZ-
10 Amine AS. Examples of emulsifiers include, but are not limited to, mineral oil, vegetable oil, peanut oil and other standard, metabolizable, nontoxic oils useful for injectables or intranasal vaccines. Desirably, aluminum hydroxide is admixed with other adjuvants such as saponin or Quil A to form combinations such as saponin-aluminum hydroxide or Quil A-aluminum hydroxide.

15 A preferred adjuvant comprises ethylene/maleic anhydride copolymer, copolymer of styrene with a mixture of acrylic acid and methacrylic acid, mineral oil emulsion or combinations thereof. A particularly preferred adjuvant system that significantly enhances the potency of the rRCNV-PRRS construct of the present invention comprises the combination of an ethylene/maleic copolymer such as EMA-31® (a linear ethylene/maleic anhydride copolymer
20 having approximately equal amounts of ethylene and maleic anhydride, having an estimated average molecular weight of about 75,000 to 100,000, commercially available from Monsanto Co., St. Louis, MO) and an acrylic acid copolymer emulsion such as NEOCRYL® (an uncoalesced aqueous acrylic acid copolymer of acrylic acid and methacrylic acid mixed with styrene (acrylic-styrene emulsion), commercially available from Polyvinyl Chemicals, Inc.,
25 Wilmington, MA).

The recombinant vaccine composition of the present invention may also optionally contain a mixture with one or more additional porcine antigens such as, for example, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*,
30 *Erysipelothrix rhusiopathiae*, leptospira bacteria, swine influenza virus (SIV), porcine parvovirus, *Escherichia coli*, porcine respiratory coronavirus, rotavirus, a pathogen causative of Aujeszky's Disease, Swine Transmissible Gastroenteritis, etc.

Any method known to those skilled in the art may be used to prepare the genetic constructs of the present invention. For example, advantage may be taken of particular
35 restriction sites for insertion of any of the desired nucleic acid sequences into the raccoon poxvirus vector using standard methodologies. Alternatively, one may utilize homologous

recombination techniques when the insertion of large sequences is desired, or when it is desirable to insert multiple genes, as described herein. In this method, the plasmid sequences flanking the insertion site into which are to be inserted multiple genes, contain sequences which have sufficient homology with sequences present in the raccoon poxvirus genome to mediate recombination. The flanking sequences must be homologous to a region of the raccoon poxvirus that is non-essential for the growth and propagation of the raccoon poxvirus, such as the hemagglutinin locus, or the thymidine kinase locus, or the serine protease inhibitor locus. Although one promoter may be used to drive the expression of two exogenous genes to be recombined, the use of two promoters in an insertion vector, each promoter operably linked to an individual gene will also provide efficient expression.

Generally, the virus rRCNV-PRRS may be constructed by a blue-to-white plaque approach, for instance, by following five key steps: (1) Clone ORF5, ORF6, ORF7 or ORF3 of PRRSV ISU12 (Iowa) and Olot/91 (Spanish isolate) strains into plasmids pFD2000A and/or pFD2003SEL; (2) Construct the plasmid pFD2000A PRRS ORF7 (P₁₁)-ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL}) or the plasmid pFD2000A PRRS ORF3 (P₁₁)-ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL}); (3) Create pool clones by three-way infection/transfection: COS7 cells, plasmid at Step 2 and rRCNV-FeLV; (4) Clone screening by limited dilution and blue-to-white plaque approach; and (5) Determine molecular characterization of rRCNV-PRRS_{btw} by PCR, ELISA and Western blot. Alternatively, a white-to-blue plaque approach may be used in which the following five key steps are performed: (1) Clone ORF5 and ORF6 of PRRSV ISU12 and Olot/91 strains, FeLV P27 into plasmids pFD2000A and/or pFD2003SEL; (2) Construct the plasmid pFD2000A FeLV P27 (P₁₁)-PRRS ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL}) or pFD2000A PRRS ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5//LacZ (P_{7.5}); (3) Create pooled clones by three-way infection/transfection: COS7 cells, plasmid at Step 2 and RCNV; (4) Clone screening by limited dilution and FeLV P27 ELISA or LacZ; and (5) Determine molecular characterization of rRCNV-PRRS_{wtb} by PCR, ELISA and Western blot.

The rRCNV-PRRS-PCV of the present invention may be constructed by way of the following five key steps: (1) Clone ORF5, ORF6, ORF3 of PRRSV ISU12 and Olot/91 strains and PCV2 ORF2 (capsid gene) into plasmids pFD2000A and/or pFD2003SEL; (2) Construct the plasmid pFD2000A PRRS ORF3 (P₁₁)-ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL})-PCV2 ORF2 (P₁₁ or P_{SEL}); (3) Create pooled clones by three-way infection/transfection: COS7 cells, plasmid at Step 2 and RCNV; (4) Clone screening by limited dilution and PCV2 ELISA (as screening marker); and (5) Determine molecular characterization of rRCNV-PRRS_{pcv} by PCR, ELISA and Western blot. Alternatively, a white-to-blue plaque approach may be used in which the following four key steps are performed: (1) Clone PCV2 ORF2 into the plasmid pFD2001TK or pFD2006TK to generate the plasmid pFD2001TK PCV ORF2; (2) Create pooled clones by

three-way infection/transfection: COS7 cells, plasmid at Step 1 and rRCNV-PRRS ORF3 (P₁₁)-ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL}); (3) Clone screening by limited dilution and PCV2 ELISA or LacZ; and (5) Determine molecular characterization of rRCNV-PRRS//PCV by PCR, ELISA and Western blot.

000026

5 EXAMPLES

The following examples demonstrate certain aspects of the present invention. However, it is to be understood that these examples are for illustration only and do not purport to be wholly definitive as to conditions and scope of this invention. It should be appreciated that when typical reaction conditions (e.g., temperature, reaction times, etc.) have been given, the conditions both above and below the specified ranges can also be used, though generally less conveniently. The examples are conducted at room temperature (about 23°C to about 28°C) and at atmospheric pressure. All parts and percents referred to herein are on a weight basis and all temperatures are expressed in degrees centigrade unless otherwise specified.

EXAMPLE 1: CONSTRUCTION OF rRCNV-PRRS (BLUE-TO-WHITE PLAQUE APPROACH)

The rRCNV-PRRS_{btw} was constructed by the following five key steps: (1) Clone ORF5, ORF6, ORF7 or ORF3 of PRRSV ISU12 (Iowa) and Olot/91 (Spanish isolate) strains into plasmids pFD2000A and/or pFD2003SEL; (2) Construct the plasmid pFD2000A PRRS ORF7 or ORF3 (P₁₁)-ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL}); (3) Create pool clones by three-way infection/transfection: COS7 cells, plasmid at Step 2 and rRCNV-FeLV; (4) Clone screening by limited dilution and blue-to-white plaque approach; and (5) Determine molecular characterization of rRCNV-PRRS_{btw} by PCR, ELISA and Western blot.

The blue-to-white plaque screening approach uses the parent virus rRCNV-FeLV bearing the FeLV P27⁺ phenotype (blue color in FeLV P27 ELISA). Through homologous recombination of RCNV HA flanking sequence between rRCNV-FeLV and pFD200A PRRS ORF7- ORF5 (Olot)-ORF6-ORF5, the phenotype of recombinant rRCNV-PRRS will change from blue to white plaque because PRRSV ORFs are inserted at *ha* locus to replace the sequence of FeLV gag-env gp85 in the parent strain (rRCNV-FeLV-blue plaque).

EXAMPLE 2: CONSTRUCTION OF rRCNV-PRRS (WHITE-TO-BLUE PLAQUE APPROACH)

The rRCNV-PRRS_{wtb} was constructed by the following five key steps: (1) Clone ORF5 and ORF6 of PRRSV ISU12 and Olot/91 strains, FeLV P27 into plasmids pFD2000A and/or pFD2003SEL; (2) Construct the plasmid pFD2000A FeLV P27 (P₁₁)-PRRS ORF5 (Olot) (P_{SEL})-

ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL}); (3) Create pooled clones by three-way infection/transfection: COS7 cells, plasmid at Step 2 and RCNV; (4) Clone screening by limited dilution and FeLV P27 ELISA or LacZ; and (5) Determine molecular characterization of rRCNV-PRRS_{wtb} by PCR, ELISA and Western blot.

- 5 The white-to-blue plaque screening approach uses the recombinant virus rRCNV-PRRS_{wtb} bearing the FeLV P27⁺ or LacZ phenotype (blue color in FeLV P27 ELISA or LacZ⁺ phenotype) while wild type RCNV shows white color in FeLV P27 ELISA or LacZ staining.

EXAMPLE 3: CONSTRUCTION OF rRCNV-PRRS-PCV

- 10 The rRCNV-PRRS_{pcv} is constructed by the following five key steps: (1) Clone ORF5, ORF6, ORF3 of PRRSV ISU12 and Olot/91 strains and PCV2 ORF2 (capsid gene) into plasmids pFD2000A and/or pFD2003SEL; (2) Construct the plasmid pFD2000A PRRS ORF3 (P₁₁)-ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL})-PCV2 ORF2(P₁₁ or P_{SEL}); (3) Create pool clones by three-way infection/transfection: COS7 cells, plasmid at Step 2 and RCNV; (4) Clone screening by limited dilution and PCV2 ELISA (as screening marker); and (5) Determine molecular characterization of rRCNV-PRRS_{pcv} by PCR, ELISA and Western blot.

15 The PCV2 approach uses the PCV-2 capsid ELISA as a unique marker for screening of clones, and to create a new combination vaccine of rRCNV-PRRS/PCV in one viral construct.

- 20 Alternatively, the rRCNV-PRRS_{pcv} is constructed by the following four key steps: (1) Clone PCV2 ORF2 (capsid gene) into plasmids pFD2001TK and/or pFD2006TK to generate the plasmid pFD2001TK PCV2 ORF2 (P₁₁ or P_{SEL}); (2) Create pool clones by three-way infection/transfection: COS7 cells, plasmid at Step 1 and rRCNV-PRRS; (3) Clone screening by limited dilution and PCV2 ELISA (as screening marker); and (5) Determine molecular characterization of rRCNV-PRRS//PCV by PCR, ELISA and Western blot.

EXAMPLE 4: EFFICACY STUDY OF rRCNV-PRRS VACCINE CANDIDATE IN PIGS

- 25 The above constructs (rRCNV-PRRS_{btw}, rRCNV-PRRS_{wtb} and rRCNV-PRRS_{pcv}) are formulated with or without an immune enhancing adjuvant and evaluated for vaccine efficacy in pigs. The successful results of the challenge studies will show the efficacy of the recombinant PRRS, PCV or combination vaccine in pigs.

30 EXAMPLE 5: CONSTRUCTION OF rRCNV-PRRSV

Briefly, the virus rRCNV-PRRSV was constructed by insertion of envelope glycoprotein (orf 5) gene and matrix protein (orf 6) gene of the porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV) ISU 12 (US strain) and the envelope glycoprotein (orf 5) gene of

PRRSV Olot 91 (EU strain) genes into the hemagglutination (*ha*) locus of the RCNV genome, an avirulent Herman strain.

The construction processes of rRCNV-PRRSV were provided through two major steps. First, the PCR-amplified 603-bp orf 5 and 525-bp orf6 of PRRSV ISU 12 strain and 606-bp orf 5 of PRRSV Olot 91 strain were subcloned into a plasmid pFD2003SEL vector (containing a lacZ reporter gene under the control of promoter P11) to generate plasmid pFD2003SEL-PRRSV Olot 91 orf5-(SEL)-ISU 12 orf 6 (SEL)-ISU 12 orf 5 (SEL). Both PRRSV ISU 12 orf 5 and orf 6 and PRRSV Olo 91 orf 5 genes are co-expressed under the control of promoter P_{SEL}. Second, three-way co-infection/transfection of rRCNV-FCV (2280-DD1) and plasmid pFD2003SEL-PRRSV Olot 91 orf5-(SEL)-ISU 12 orf 6 (SEL)-ISU 12 orf 5 (SEL) in COS-7 cells was conducted to generate rRCNV-PRRSV by allelic exchange at the *ha* locus. The blue plaques (Lac⁺) were cloned by five successive rounds of plaque purification in Vero cells. The clone candidates were further expanded two more times in Vero cells using Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 0.05% lactalbumin hydrolysate (LAH), 30 µg/mL gentamicin sulfate and 5% fetal bovine serum, and thereafter confirmed by gene-specific PCR. The seventh passage was used to prepare a pre-master seed. The Master Seed was established by a 1:20,000 dilution of pre-master seed, and designated rRCNV-PRRSV, in which the raccoon poxvirus as a live vector is capable of expressing the PRRSV envelope glycoproteins (orf5) and matrix protein (M) of PRRSV ISU 12 and Olot 91 strains at the *ha* locus, respectively. The master seed virus of the PRRSV vaccine, live raccoon poxvirus vector (rRCNV-PRRSV) was identified by PRRSV orf5 or orf6 gene(s)-specific PCR testing. Immunogenicity studies of porcine respiratory and reproductive syndrome virus vaccine, live/inactivated raccoon poxvirus vector alone or in combination with Suvaxyn PCV2 One Dose and or Suvaxyn MH-one, or live chimeric cPCV1-2 and or modified live *Mycoplasma hyopneumoniae* (for example, J strain) are being conducted in piglets and sows.

EXAMPLE 6: Immunogenicity Study of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Vaccine, Live Raccoon Poxvirus Vector Alone or in Combination with Suvaxyn PCV2 One Dose, in Piglets

To demonstrate the efficacy of the PRRSV fraction, pigs will be administered the rRCNV-PRRSV vaccine (lyophilized cake) and adjuvant-containing sterile water or Suvaxyn PCV2 One Dose as diluent in two-dose regimen at a 2-3 week interval, followed by virulent PRRSV challenge or PRRSV/PCV2 co-challenge 2-3 weeks post the second vaccination. The efficacy of the rRCNV-PRRSV fraction will be evaluated based on the reduction of PRRSV

WO 2009/029130
viremia and reduction of lung lesions caused by PRRSV. Suvaxyn® PCV2 One contains
inactivated Porcine Circovirus Type 1-Type 2 Chimera (cPCV1-2) formulated with FDAH's
proprietary adjuvant.

PCT/US2008/006735

000929

Materials and Methods

5 Test Animals

No fewer than 40 (20 vaccinates and 20 controls) mixed breed male and female conventional pigs, 3 weeks of age or older, will be used for this study. The pigs for the study will be purchased from a commercial farm and identified using an ear tag. Pigs will be obtained from a single source herd. At the time of the first vaccination pigs will be seronegative to PRRSV as
10 determined by IDEXX HerdCheck ELISA kits (S/P ratio < 0.4).

Test Vaccines

Composition of Test Vaccines

Lyophilized fraction: The vaccine consists of live rRCNV-PRRSV. The vaccine's virus
titer will be titrated in five replicate assays in order to establish the dose administered in the
15 study. Liquid fraction: The diluent will be Suvaxyn PCV2 One Dose or 20% SL-CD adjuvant.
The lyophilized fraction of rRCNV-PRRSV will be rehydrated with the liquid fraction at the time
of vaccination.

Study Design

The proposed studies will be randomized complete block designs (superiority trial).
20 Litters will be allocated to each study replicate. The piglets within litters in each study will then
be divided into two groups as follows:

Group	Vaccine	Number of Animals
VI vaccinates	Lyophilized rRCNV-PRRSV (cake) + Suvaxyn PCV2 One Dose	≥20
C1-Controls	Suvaxyn PCV2 One Dose (Diluent)	≥ 20

V2-Vaccinates	Lyophilized rRCNV-PRRSV (Cake) + Water-SL-CD Adjuvant (Diluent)	≥ 20
C2-Controls	Water-SL-CD Adjuvant (Diluent)	≥ 20

Vaccination

The vaccination route will be intramuscular on the right side of neck.

For pigs in Study 1: group V1 will be given two 2.0 mL doses of the rRCNV-PRRSV +
5 Suvaxyn PCV2 One Dose; pigs in control group C1 will be given two 2.0 mL doses of Suvaxyn
PCV2 One Dose.

For pigs in Study 2: group V2 will be given two 2.0 mL doses of rRCNV-PRRSV +
Water-SL-CD; pigs in control group C2 will be given two 2.0 mL doses of Water-SL-CD Adjuvant

The first vaccination will be administered at 3 weeks of age, and repeat vaccination will
10 be 2-3 weeks later.

Challenge

All animals will be virulently challenged two to three weeks following the second
vaccination.

Pigs in groups V1 and C1 will be challenged with at least $2 \times 10^{4.8}$ FAID₅₀ of the wild type
15 pathogenic PCV2 (strain 40895) and with at least $2 \times 10^{4.0}$ TCID₅₀ of PRRSV (ISU-12 or
equivalent). These two challenge materials will be mixed together for at least 30 minutes prior
to challenge. Challenge dose will be 4 mL intranasally (2 mL per nostril).

Pigs in groups V2 and C2 will be challenged with at least $2 \times 10^{4.0}$ TCID₅₀ of PRRSV
(ISU-12 or equivalent). Challenge dose will be 2 mL intranasally (1 mL per nostril). See
20 Attachment 2 for challenge record.

The challenge viruses will be titrated by PCV2-specific and PRRSV-specific indirect
immunofluorescence assays (IFA) on the day of challenge.

Observation

000031

All pigs will be observed for clinical signs and temperatures daily from -2 to 10 days post challenge (DPC). Any abnormal observation will be reported to the study director or plant veterinarian.

- 5 Monitored clinical signs may include, but not be limited to, inappetence, lethargy, depression, diarrhea, sneezing, coughing, nasal discharge, ocular discharge, dyspnea and death. If any pig dies during the post-challenge observation period, necropsy will be performed and the necropsy report will be attached to the final report.

Sample Collection and Testing

10 Sample Collection

Nasal Swabs

Nasal swabs will be collected on 0 day post vaccination one (DPV1) for PRRSV and PCV2 isolation to ensure there is no PRRSV or PCV2 infection in the tested animals prior to vaccination.

- 15 The nasal swab samples will be placed into individual sterile tubes containing 3 mL of MEM with lactalbumin hydrolysate (LAH) and gentamicin (60 µg/mL), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL), and stored at or below -50°C until tested.

Serum Samples

- 20 Pigs will be bled for serum samples (no more than ten mL) at 0 DPV1, 0 DPV2, 7 DPV2, 14 DPV2, -1, 6, and 9 for ELISA testing; and at -1, 3, 6, and 9 for PCR testing.

Necropsy

All animals will be necropsied at 10-11 DPC. The lungs will be collected for lung lesion scoring.

Sample Testing

25 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

- 30 Serum antibodies to PRRSV will be detected by IDEXX® HerdCheck ELISA kit (Westbrook, ME). Briefly, serum samples are diluted 1:40 in Sample Diluent and 100 µL of each sample are added in duplicate (one well for PRRSV antigen and one well for normal host cell (NHC) antigen) to antigen-coated 96-well plates. After 30-minute incubation period at room temperature, liquid is decanted and the plates washed 3-5 times with approximately 300 µL of the phosphate-buffered wash solution. 100 µL of anti-Porcine-HRPO Conjugate is then added to all wells. Plates are incubated for 30-minutes at room temperature. After incubation period,

plates are washed again as above. 100 µL of TMB Substrate Solution is then added to each well. Plates are incubated at room temperature for 15 minutes before 100 µL of Stop Solution is added to all wells to stop the reaction. The optical density (OD) is then measured at 650 nm on a microplate reader. The arbitrary serum titer will be reported as the sample/positive (S/P) ratio and is determined by taking the quantity of the sample OD-PRRSV minus the sample OD-NHC divided by the quantity of mean positive control-PRRSV minus the mean positive control-NHC.

PCR Testing

PRRSV-specific RT-PCR testing will be used to detect the presence of PRRSV in serum. RNA-extraction will be performed on serum samples using QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Valencia, CA).

Lung Lesion Scoring

The lungs of each individual pig will be examined by two independent scorers for gross macroscopic lesions based on the amount of lung parenchyma affected by lesions. The scorers of the lesions will be blinded to the identity of the treatment for each pig. Briefly, the score for lung lesions in each lobe will be determined by estimating the percentage of the lobe exhibiting PRRSV-like lesions (based on color and texture) and multiplied by the number of points possible for that lobe. Maximum score for each lobe is determined by the relative percentage of the total lung volume occupied by the lobe. The scores from the dorsal and ventral aspects of all lobes will then be added together to obtain the total score for each pig. The maximum total score possible for each animal is 100.

Primary Outcome

For the claim of reduction of lung lesions, total scores of lesions present on lungs will be assessed.

Secondary Outcome

Secondary outcome will be the occurrence of PRRSV viremia.

Statistical Analyses

Estimator

For the evaluation of reduction in severity of lung lesions, the estimator will be the mitigated fraction (MF) statistic. The mitigated fraction will be calculated as:

$$MF = \frac{2W_1 - n_c(1 + n_c + n_v)}{n_c n_v}$$

where:

W_1 = Wilcoxon Rank sum statistic

n_c = number of subjects in the control group

n_v = number of subjects in each vaccinated group

000033

*Note: the MF statistic will be estimated for each study replicate.

5

Statement of Method of Calculating Interval Estimates

The 95% confidence interval for the mitigated fraction for each study replicate will be calculated.

Hypothesis Statement

10 For the claim of reduction severity of lung lesions:

$$H_0: M_v = M_c$$

$$H_A: M_v \neq M_c$$

where:

M_v = Median of the lung lesion score rank in the vaccinated group

15 M_c = Median of the lung lesion score rank in the control group

These studies will test the null hypothesis that there is no difference in the severity (rank) in lung lesions between the vaccinated group and the placebo control group for each study replicate.

Other Statistical Considerations

20 The distribution of pigs litter will be randomly assigned within litter.

Statistical Analyses

Statistical Methods

Primary Outcome

25 The test repeatability of the score within animal will be assessed by intra class correlation. If the test repeatability is deemed sufficient, the mean lung score for each pig will be calculated by averaging the lung scores from each scorer. The calculated lung scores will be compared between the two treatment groups for each study replicate by Wilcoxon Rank Sum with the calculated lung score as the dependent variable and treatment included as an

independent variable. The analysis will be stratified by litter if there are sufficient complete blocks. The HL shift will be estimated. The MF will be estimated from the Wilcoxon statistic

Secondary Outcome

5 A secondary outcome will be assessed for occurrence of viremia. A single occurrence of viremia will categorize pig as positive for viremia (Yes or No). Viremia will be compared between treatment groups in a generalized linear mixed model with the occurrence of viremia (Yes or No) as the binomial dependent variable and treatment included as an independent variable. If there are sufficient complete blocks, the litter will be included as a random effect covariate in the model.

10 All statistical analysis will be performed using the SAS system (SAS Institute, Inc.). The level of significance will be set at $p < 0.05$

15 In the foregoing, there has been provided a detailed description of particular embodiments of the present invention for purpose of illustration and not limitation. It is to be understood that all other modifications, ramifications and equivalents obvious to those having skill in the art based on this disclosure are intended to be included within the scope of the invention as claimed.

20

25

30

1. A recombinant raccoon poxvirus vector (rRCPV) comprising one or more exogenous nucleic acid molecules encoding a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) protein, wherein:
 - (a) at least one nucleic acid molecule is inserted into the hemagglutinin locus or the thymidine kinase locus of the raccoon poxvirus genome; or
 - (b) at least two nucleic acid molecules are inserted into the hemagglutinin locus or the thymidine kinase locus of the raccoon poxvirus genome; or
 - (c) at least one nucleic acid molecule is inserted into the hemagglutinin locus and at least one nucleic acid molecule is inserted into the thymidine kinase locus of the raccoon poxvirus genome.
2. The recombinant raccoon poxvirus vector of claim 1, wherein at least two nucleic acid molecules are inserted into the hemagglutinin locus and at least two nucleic acid molecules are inserted into the thymidine kinase locus of the raccoon poxvirus genome.
3. The recombinant raccoon poxvirus vector according to either one of claims 1 or 2, further comprising a nucleic acid molecule encoding a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) protein that is inserted into a third non-essential site of the raccoon poxvirus genome in addition to the thymidine kinase and the hemagglutinin loci of the raccoon poxvirus genome.
4. The recombinant raccoon poxvirus vector of claim 3, wherein the third non-essential site of the raccoon poxvirus genome is the serine protease inhibitor site.
5. The recombinant raccoon poxvirus vector of any of claims 1-4, wherein the poxvirus vector encodes at least two copies of the same porcine reproductive and respiratory syndrome virus protein.

6. The recombinant raccoon poxvirus vector of claim 5, wherein said two copies of the same protein are encoded by two different nucleic acid molecules.
7. The recombinant raccoon poxvirus vector of claim 5, wherein said two copies of the same protein are encoded by the same nucleic acid molecule.
- 5 8. The recombinant raccoon poxvirus vector of claim 7, wherein said two copies of the same protein are operably linked to one promoter.
9. The recombinant raccoon poxvirus vector of either one of claims 6 or 7, wherein said two copies of the same protein are operably linked to separate promoters.
- 10 10. The recombinant raccoon poxvirus vector of any of claims 6, 7, 8 or 9, wherein said two copies of the same protein are encoded by a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) open reading frame (ORF) selected from the group consisting of ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 and a combination thereof.
11. The recombinant raccoon poxvirus vector of either one of claims 1 or 2, wherein each of the exogenous nucleic acid molecules encodes a PRRSV ORF.
- 15 12. The recombinant raccoon poxvirus vector of claim 11, wherein the ORF is one or more selected from the group consisting of ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 and a combination thereof.
- 20 13. The recombinant raccoon poxvirus vector of claim 2, wherein said two or more exogenous nucleic acid molecules encode two or more PRRSV ORFs selected from the group consisting of ORF5-ORF6, ORF5-ORF6-ORF7, ORF3-ORF5-ORF6, ORF3-ORF4-ORF7, ORF3-ORF4-ORF5-ORF7, ORF3-ORF4-ORF6-ORF7, and ORF3-ORF4-ORF5-ORF6-ORF7.
14. The recombinant raccoon poxvirus vector according to any one of claims 1-13, wherein the porcine reproductive and respiratory syndrome virus is ISU12 (Iowa), Olot/91 (Spanish) or both.

15. The recombinant raccoon poxvirus vector according to any one of claims 1-14, wherein two or more nucleic molecules are inserted into the hemagglutinin locus of the raccoon poxvirus genome.
16. The recombinant raccoon poxvirus vector according to claim 15, further comprising a nucleic acid molecule encoding an open reading frame of porcine circovirus type 2 (PCV2).
17. The recombinant raccoon poxvirus vector according to claim 16, wherein the PCV2 open reading frame is ORF2.
18. The recombinant raccoon poxvirus vector according to claim 17, wherein the PCV2 ORF2 is separately inserted into the thymidine kinase locus of the raccoon poxvirus genome.
19. The recombinant raccoon poxvirus vector according to any one of claims 15-18, further comprising a nucleotide sequence encoding a glycoprotein of feline leukemia virus P27⁺ phenotype.
20. The recombinant raccoon poxvirus vector according to any one of claims 1-19, wherein the raccoon poxvirus is live and replicable.
21. A recombinant porcine vaccine comprising an immunologically effective amount of the recombinant raccoon poxvirus vector of any one of claims 1-20 and, optionally, a suitable carrier, diluent or adjuvant.
22. A recombinant porcine vaccine comprising an immunologically effective amount of two or more of the recombinant raccoon poxvirus vectors of any one of claims 1-20 and, optionally, a suitable carrier or diluent.
23. The recombinant porcine vaccine according to either one of claims 21 or 22, wherein the raccoon poxvirus is live and replicable.
24. The recombinant porcine vaccine according to claim 21 or 22, further comprising at least one additional porcine antigen.

25. The recombinant porcine vaccine according to claim 24, wherein the additional porcine antigen is selected from the group consisting of *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen, *Haemophilus parasuis* antigen, *Pasteurella multocida* antigen, *Streptococcus suis* antigen, *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigen, *Bordetella bronchiseptica* antigen, *Salmonella choleraesuis* antigen, *Erysipelothrix rhusiopathiae* antigen, leptospira bacteria antigen, swine influenza virus antigen, porcine parvovirus antigen, *Escherichia coli* antigen, porcine respiratory coronavirus antigen, rotavirus antigen, an antigen from a pathogen causative of Aujeszky's Disease, Swine Transmissible Gastroenteritis antigen and a combination thereof.
26. A method for inducing an immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus, comprising administering to a porcine animal an immunologically effective amount of a recombinant porcine vaccine of any one of claims 21-25.
27. The method according to claim 24, wherein the recombinant porcine vaccine comprises a live and replicable recombinant raccoon poxvirus vector.
28. A method for preventing porcine reproductive and respiratory syndrome and Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, comprising administering to a porcine animal in need of protection a recombinant porcine vaccine comprising an immunologically effective amount of the recombinant raccoon poxvirus vector of any one of claims 16-19 and, optionally, a suitable carrier, diluent or adjuvant.
29. The method according to claim 28, wherein the recombinant raccoon poxvirus vector is live and replicable.
30. The method of claim 26, wherein the immunologically effective amount of the vaccine ranges from about 4.5 Log₁₀TCID₅₀/ml to about 7.5 Log₁₀TCID₅₀/ml.
31. The method of claim 26, wherein the vaccine is administered as a single dose or as repeated doses.
32. The recombinant porcine vaccine of any of claims 21-25, wherein the vaccine is adjuvant-free.

Figure 1

Plasmid pFD2000A-FDAH-Seq

```
1 TTATTGGACA CTAGATAATC ATCACATGTT ACCACAAAAT TATATAATGT ATAAATGCGA
61 AATTATTAATA CGCAAATATC CATGGGAAAA CGCGCAGTAT ACAGACGATT TTTTACAGTA
121 TTTGGAGAGT TTTATAGGAA GTATATAGAG TAGAACCAGA ATTTTGTAAT AATAAATCAC
181 ATTTTATATAC TAATATGAAA CAACTATCGA TAGTTATATT GCTACTATCG ATAGTATATA
241 CAACCAAACC TCATCCTACA CAGATATCAA AAAAAGTAGG CGATGATGCT ACTCTATCGT
301 GTAATAGAAA CAATACACAT GGATATCTTG TCATGAGTTC TTGGTATAAG AAACCAGACT
361 CCATTATTCT CTTAGCAGCC AAAAACGATG TCGTACTATT TGATGATTAT ACAGCGGATA
421 AAGTATCATA CGATTCCCGT TATGATACTC TAGCTACAAT TATTACAATT AAATCATTGA
481 CATCTGGAGA TGCAGGTACT TATATATGCG CATTCCTTAT AACATCAACA AATGATACGG
541 ATAAATAGAA TTATGAAGAA TTCGTGCGCG CGGCCGCTG CAGAAGCTTG GTACCATTTA
601 TAGCATAGAA AAAAACAAAA TGAAATTCTA CTATATTTT ACATACATAT ATTCTAAATA
661 TGAAAGTGGT GATTGTGACT AGCGTAGCAT CGTTCTAGA CATCTATATA CTATATAGTA
721 ATACCAATAC TCAAGACTAC GAAACTGATA CAATCTCTTA TCATGTGGGT AATGTTCTCG
781 ATGTCGATAG CCATATGCCC GGTAGTTGCG ATATACATAA ACTGATCACT AATTCCAAAC
841 CCACCCGCTT TTTATAGTAA GTTTTTCACC CATAAATAAT AAATAACAATA ATTAATTTCT
901 CGTAAAGTAA GAAATATAT TCTAATTTAT TGCACGGTAA GGAAGTAGAA TCATAAGAA
961 CAGTGACATG GATCCCGTGG TTTTACAACG TCGTGAAGTG GAAAACCTG GCGTTACCCA
1021 ACTTAATCGC CTTGCAGCAC ATCCCTCTTT CGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCCG
1081 CACCGATCGC CTTTCCCAAC AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGGCGCT TTGCTGGTT
1141 TCCGGCACCA GAAGCGGTGC CGGAAAGCTG GCTGGAGTGC GATCTTCCTG AGGCCGATAC
1201 TGTCGTCGTC CCCTCAAAC GGCAGATGCA CGGTTACGAT GCGCCCATCT ACACCAACGT
1261 AACCTATCCC ATTACGGTCA ATCCGCGCTT TGTTCACAG GAGAATCCGA CGGTTGTGA
1321 CTCGCTCACA TTTAATGTTG ATGAAAGCTG GCTACAGGAA GGCCAGACGC GAATTTATTT
1381 TGATGGCGTT AACTCGGCGT TTCATCTGTG GTGCAACGGG CGCTGGGTCT GTTACGGCCA
1441 GGACAGTCGT TTGCCGCTCG AATTTGACCT GAGCGCATTT TTACGCGCCG GAGAAAACCG
1501 CCTCGCGGTG ATGGTGCTGC GTTGGAGTGA CGGCAGTTAT CTGGAAGATC AGGATATGTG
1561 GCGGATGAGC GGCATTTTCC GTGACGTCTC GTTGCTGCAT AAACCGACTA CACAAATCAG
1621 CGATTTCCAT GTTGCCACTC GCTTTAATGA TGATTTGAGC CGCGCTGTAC TGGAGGCTGA
1681 AGTTCAGATG TGCGGCGAGT TCGGTGACTA CCTACGGGTA ACAGTTTCTT TATGGCAGGG
1741 TGAACGCGAG GTCGCCAGCG GCACCGCGCC TTTCCGCGGT GAAATTATCG ATGAGCGTGG
1801 TGGTTATGCC GATCGCGTCA CACTACGTCT CAAGGTGCGA AACCCGAAAC TGTGGAGCGC
1861 CGAAATCCCG AATCTCTATC GTGCGGTGGT TGAAGTGCAC ACCGCGGACG GCACGCTGAT
1921 TGAAGCAGAA GCCTGCGATG TCGGTTTCCG CGAGGTGCGG ATTGAAAATG GTCTGCTGCT
1981 GCTGAACGGC AAGCCGTTGC TGATTCGAGG CGTTAACCGT CACGAGCATC ATCCTCTGCA
2041 TGGTCAGGTC ATGGATGAGC AGACGATGGT GCAGGATATC CTGCTGATGA AGCAGAACAA
2101 CTTTAACGCC GTGCGCTGTT CGCATTATCC GAACCATCCG CTGTGGTACA CGCTGTGCGA
2161 CCGCTACGGC CTGTATGTGG TGGATGAAGC CAATATTGAA ACCCACGGCA TGGTGCCAAAT
2221 CAATCGTCTG ACCGATGATC CGCGCTGGCT ACCGCGGATG AGCGAACGCG TAACGCGAAT
2281 GGTGAGCGCG GATCGTAATC ACCCGAGTGT GATCATCTGG TCGCTGGGGA ATGAATCAGG
2341 CCACGGCGCT AATCACGACG CGCTGTATCG CTGGATCAAA TCTGTGATC CTTCGCGCCC
2401 GGTGCAGTAT GAAGCGGGCG GAGCCGACAC CACGGCCACC GATATTATTT GCGCGATGTA
2461 CGCGCGCGTG GATGAAGACC AGCCCTTCCC GGCTGTGCGG AAATGGTCCA TCAAAAAATG
2521 GCTTTCGCTA CCTGGAGAGA CGCGCCCGCT GATCCTTTGC GAATACGCCC ACGCGATGGG
2581 TAACAGTCTT GCGGTTTTCG CTAATACTG GCAGGCGTTT CGTCAGTATC CCCGTTTACA
```

Figure 1 (continued)

000040

Plasmid pFD2000A-FDAH-Seq

```
2641 GGGCGGCTTC GTCTGGGACT GGGTGGATCA GTCGCTGATT AAATATGATG AAAACGGCAA
2701 CCCGTGGTCTG GCTTACGGCG GTGATTTTGG CGATACGGCG AACGATCGCC AGTTCTGTAT
2761 GAACGGTCTG GTCTTTGCCG ACCGCACGCC GCATCCAGCG CTGACGGAAG CAAAACACCA
2821 GCAGCAGTTT TTCCAGTTCC GTTTATCCGG GCAAACCATC GAAGTGACCA GCGAATACCT
2881 GTTCCGTCAT AGCGATAACG AGCTCCTGCA CTGGATGGTG GCGCTGGATG GTAAGCCGCT
2941 GGCAAGCGGT GAAGTGCCCTC TGGATGTGGC TCCACAAGGT AAACAGTTGA TTGAACTGCC
3001 TGAACACCG CAGCCGGAGA GCGCCGGGCA ACTCTGGCTC ACAGTACGCG TAGTGCAACC
3061 GAACGGGACC GCATGGTCAG AAGCCGGGCA CATCAGCGCC TGGCAGCAGT GGCCTCTGGC
3121 GGAACACCTC AGTGTGACGC TCCCGCGCGC GTCCACGCC ATCCCGCATC TGACCACCAG
3181 CGAAATGGAT TTTTGCATCG AGCTGGGTAA TAAGCGTTGG CAATTTAACC GCCAGTCAGG
3241 CTTTCTTTCA CAGATGTGGA TTGGCGATAA AAAACAACCTG CTGACGCCGC TCGCGCATCA
3301 GTTACCCCGT GCACCGCTGG ATAACGACAT TGGCGTAAGT GAAGCGACCC GCATTGACCC
3361 TAACGCCTGG GTCGAACGCT GGAAGGCGGC GGGCCATTAC CAGGCCGAAG CAGCGTTGTT
3421 GCAGTGACAG GCAGATACAC TTGCTGATGC GGTGCTGATT ACGACCGGTC ACGCGTGCCA
3481 GCATCAGGGG AAAACCTTAT TTATCAGCCG GAAAACCTAC CGGATTGATG GTAGTGGTCA
3541 AATGGCGGAT ACCGTTGATG TTGAAGTGGC GAGCGATACA CCGCATCCGG CGCGGATTGG
3601 CCTGAACGTC CAGCTGGCGC AGGTAGCAGA GCGGGTAAAC TGGCTCGGAT TAGGGCCGCA
3661 AGAAAACCTAT CCCGACCGCC TTAAGTGGAT CTGTTTGGAC CGCTGGGATC TGCCATTGTC
3721 AGACATGTAT ACCCCGTACG TCTTCCCGAG CGAAAAACGGT CTGCGCTCGG GGACGCGCGA
3781 ATTGAATTAT GGGCCACACC AGTGGCGCGG CGACTTCCAG TTCAACATCA CCGCGGAAG
3841 TCAACAGCAA CTGATGGAAA CCAGCCATCG CCATCTGCTG CACGCGGAAG AAGGCACATG
3901 GCTGAATATC GACGGTTTCC ATATGGGGAT TGGTGGCGAC GACTCCTGGA GCCCGTCAGT
3961 ATCGCGCGAA TTCCAGCTGA GCGCGGTTCC CTACCATTAAC CAGTTGGTCT GGTGTCAAAA
4021 ATAAAGGATCC TCGATACCAA CAACGGTAGA AAGTGTACA ATATCTACTA CAAAATATAC
4081 AACTAGTGAC TTTATAGAGA TATTTGGCAT TGTTCCTACTA ATTTTATTAT TGGCCGTGGC
4141 GATTTTCTGT ATTATATATT ATTTCTGTAG TGGACGGTCT CGTAAACAAG AAACAAATAT
4201 ATTATAGATT TTAACCTAGA TAAATGTCTG GAATAATTAA ATCTATCGTT TTGAGCGGAC
4261 CATCTGGTTC CGGCAAGACA GCTATAGTCA GGAGACTCTT ACAAGATTAT GGAAATATAT
4321 TTGGATTGTT GGTATCCCAT ACCACTAGAT TTCCTCGTCC TATGGAACGA GAAGGTGTGC
4381 TCTACCATTG CGTTAACAGA GAGGCCATTT GGAAGGGAAT AGCCGCTGGA AACTTGCTAG
4441 AACATACAGA GTTTTGGGA AATATTTATG GGACTTCTAA AACATCCATG AACACAGCTG
4501 CTATTAAATA TCGTATATGT GTTATGGATT TAAACATTGA CCGAGTTAGG AGTCTTAAAA
4561 ACACATACTT GATGCCCTTAC TCTGTTTATA TAAGACCTAC ATCTCTTAAA ATGGTAGAAA
4621 TCGCATGCCC TGATCGGGTA TTTTCTCCTT ACGCATCTGT GCGGTATTTC ACACGCATA
4681 TGGTGCACTC TCAGTACAAT CTGCTCTGAT GCGCATAGT TAAGCCAGCC CCGACACCCG
4741 CCAACACCCG CTGACGCGCC CTGACGGGCT TGTCTGCTCC CGGCATCCGC TTACAGACAA
4801 GCTGTGACCG TCTCCGGGAG CTGCATGTGT CAGAGGTTTT TTTTATAGG TTAATGTCTA
4861 GCGAGACGAA AGGGCCTCGT GATACGCCCTA TTTTATAGG GCGGAACCCC TATTTGTTTA
4921 TTTTCTTAAA TACATTCAAA TATGTATCCG CTCATGAGAC AATAACCCCTG ATAAATGCTT
4981 TTTTCTTAAA TACATTCAAA TATGTATCCG CTCATGAGAC AATAACCCCTG ATAAATGCTT
5041 CAATAATATT GAAAAAGGAA GAGTATGAGT ATTCAACATT TCCGTGTCG CTTATTTCCT
5101 TTTTCTGCGG CATTTTGCCT TCCGTGTTTT GCTCACCAG AAACGCTGGT GAAAGTAAAA
5161 GATGCTGAAG ATCAGTTGGG TGCACGAGTG GGTATACATG AACTGGATCT CAACAGCGGT
5221 AAGATCCTTG AGAGTTTTTC CCCCAGAGAA CGTTTTCCAA TGATGAGCAC TTTTAAAGTT
5281 CTGCTATGTG GCGCGGTATT ATCCCGTATT GACGCCGGGC AAGAGCAACT CGGTGCGCGC
5341 ATACACTATT CTCAGAATGA CTGTTGTTGAG TACTCACCAG TCACAGAAAA GCATCTTACG
5401 GATGGCATGA CAGTAAGAGA ATTATGCAGT GCTGCCATAA CCATGAGTGA TAACACTGCG
5461 GCCAECTTAC TTCTGACAAC GATCGGAGGA CCGAAGGAGC TAACCGCTTT TTTGCAACAC
5521 ATGGGGGATC ATGTAACCTG CCTTGATCGT TGGGAACCGG AGCTGAATGA AGCCATACCA
5581 AACGACGAGC GTGACACCAC GATGCTCTGA GCAATGGCAA CAACGTTGCG CAAACTATTA
5641 ACTGGCGAAC TACTACTCT AGCTTCCCGG CAACAATTAA TAGACTGGAT GGAGGCGGAT
5701 AAAGTTGCAG GACCACTTCT GCGCTCGGCC CTTCGGGCTG GCTGTTTAT TGCTGATAAA
5761 TCTGGAGCCG GTGAGCGTGG GTCTCGCGGT ATCATTGCAG CACTGGGCCC AGATGGTAAG
5821 CCTCCCGTA TCGTAGTTAT CTACACGACG GGGAGTCAGG CAACTATGGA TGAACGAAAT
5881 AGACAGATCG CTGAGATAGG TGCTCACTG ATTAAGCATT GGTAACTGTC AGACCAAGTT
5941 TACTCATATA TACTTTAGAT TGCTTTAAAA CTTCATTTT AATTTAAAGG GATCTAGGTG
6001 AAGATCCTTT TTGATAATCT CATGACCAAA ATCCCTTAAC GTGAGTTTTT GTTCCACTGA
6061 GCGTCAGACC CCGTAGAAAA GATCAAGGA TCTTCTGAG ATCCTTTTTT TCTGCGCGTA
6121 ATCTGCTGCT TGCAACAAAA AAAACCAACG CTACAGCGG TGGTTTGTG GCCGGATCAA
6181 GAGCTACCAA CTCTTTTTCC GAAGGTAAC GGCTTCAGCA GAGCGCAGAT ACCAAATACT
6241 GTTCTTCTAG TGTAGCCGTA GTTAGGCCAC CACTTCAAGA ACTCTGTAGC ACCGCTTACA
6301 TACCTCGCTC TGCTAATCCT GTTACCAAGT GCTGCTGCCA GTGGCGATAA GTCGTGCTT
6361 ACCGGGTTGG ACTCAAGACG ATAGTTACCG GATAAGGCGC AGCGGTGCGG CTGAACGGGG
```

Figure 1 (continued)

Plasmid pFD2000A-FDAH-Seq

6421	GGTTCGTGCA	CACAGCCCAG	CTTGGAGCGA	ACGACCTACA	CCGAACTGAG	ATACCTACAG
6481	CGTGAGCTAT	GAGAAAGCGC	CACGCTTCCC	GAAGGGAGAA	AGGCCGACAG	GTATCCGGTA
6541	AGCGGCAGGG	TCGGAACAGG	AGAGCGCACG	AGGGAGCTTC	CAGGGGGAAA	CGCCTGGTAT
6601	CTTTATAGTC	CTGTCGGGTT	TCGCCACCTC	TGACTTGAGC	GTCGATTTTT	GTGATGCTCG
6661	TCAGGGGGGC	GGAGCCTATG	GAAAAACGCC	AGCAACGCGG	CCTTTTTACG	GTTCTGGGCC
6721	TTTTGCTGGC	CTTTTGCTCA	CATGTTCTTT	CCTGCGTTAT	CCCCTGATTC	TGTGGATAAC
6781	CGTATTACCG	CCTTTGAGTG	AGCTGATACC	GCTCGCCGCA	GCCGAACGAC	CGAGCGCAGC
6841	GAGTCAGTGA	GCGAGGAAGC	GGAAGAGAGC	TC		

Figure 2

000042

Plasmid pFD2001TK-FDAH-seq

```
1 GAGCTCATAA ATAGTAAACC GATAGTGTAT AAAGATTGTG CAATGCTTTT GCGATCAATA
61 AATGGATCAC AACCAGTATC TGTTGACGAT GTTCTTCGCA GATGATGATT CATTTTTTAA
121 ATATTTAGCT AGTCAAGACG ATGAATCTTC ATTATCCGAT ATATTGCAAA TTACCCAATA
181 TCTTGATTTT TTATTGTTGT TATTGATACA GTCAAAAAAT AAACCTAGAGG CTGTAGGTCA
241 TTGTTATGAA TCTCTTTCGG AGGAATATAG ACAAATTGGCG AAATTTACAG ACACTCAAGA
301 GTTTAAAAAA CTATTTAATA AGGTTTCTAT TGCTACAGAC GGACGCGTTA AACTTAATAA
361 AGGGTATTTA TTTGACTTTG TTGTCAGTAT GATGAGATTT AAAAAAGAGT CATCTATAAT
421 ACCAAACATA GATCCGGTTC GATACATAGA TCCTCGTCTGA GATATAGTAT TTTCTAACGT
481 AATGGATATA TTAAAGTCTA ATAAAGTGAA CAATAATTAA ATTTTATTG TCACCTAGGA
541 ATTCGTCGAC GCGGCCGCTT GCAGAAGCTT GGTACCATTT ATATTCCAAA AAAAAAAAT
601 AAAATTTCAA TTTTACATA CATATATTCT AAATATGAAA GTGGTGATTG TGACTAGCGT
661 AGCATCGCTT CTAGACATCT ATATACTATA TAGTAATACC AATACTCAAG ACTACGAAAC
721 TGATACAATC TCTTATCATG TGGGTAATGT TCTCGATGTC GATAGCCATA TGCCCGGTAG
781 TTGCGATATA CATAAACTGA TCACTAATTC CAAACCCACC CGCTTTTAT AGTAAGTTTT
841 TCACCCATAA ATAATAAATA CAATAATTAA TTTCTCGTAA AAGTAGAAAA TATATTCTAA
901 TTTATTGCAC GGTAAAGGAAG TAGAATCATA AAGAACAGTG ACATGGATCC GGTCCGTCCT
961 GTAGAAACCC CAACCCGTGA AATCAAAAAA CTCGACGGCC TGTGGGCATT CAGTCTGGAT
1021 CGCGAAACT GTGGAATTGA TCAGCGTTGG TGGGAAAGCG CGTTACAAGA AAGCCGGGCA
1081 ATTGCTGTGC CAGGCAGTTT TAACGATCAG TTCGCCGATG CAGATATTCTG TAATTATGCG
1141 GGCAACGCTT GGTATCAGCG CGAAGTCTTT ATACCGAAAG GTTGGGCAGG CCAGCGTATC
1201 GTGCTGCGTT TCGATGCGGT CACTCATTAC GGCAAAGTGT GGGTCAATAA TCAGGAAGTG
1261 ATGGAGCATC AGGGCGGCTA TACGCCATTT GAAGCCGATG TCACGCCGTA TGTATTGGCC
1321 GGGAAAAGTG TACGTATCAC CGTTTGTGTG AACAAACGAAC TGAACCTGGCA GACTATCCCG
1381 CCGGGAATGG TGATTACCGA CGAAAACGGC AAGAAAAAGC AGTCTTACTT CCATGATTTT
1441 TTTAACTATG CCGGAATCCA TCGCAGCGTA ATGCTCTACA CCACGCCGAA CACCTGGGTG
1501 GACGATATCA CCGTGGTGAC GCATGTCGCG CAAGACTGTA ACCACGCGTC TGTGACTGG
1561 CAGGTGGTGG CCAATGGTGA TGTACGCGT GAACGCGTG ATGCGGATCA ACAGGTGGTT
1621 GCACTGGAC AAGGCACTAG CGGGACTTTG CAAGTGGTGA ATCCGCACCT CTGGCAACCG
1681 GGTGAAGGTT ATCTCTATGA ACTGTGCGTC ACAGCCAAAA GCCAGACAGA GTGTGATATC
1741 TACCCGCTTC GCGTCGGCAT CCGGTCACTG GCAGTGAAGG GCCAACAGTT CCTGATTAAC
1801 CACAAACCGT TCTACTTTAC TGGCTTTGGT CGTCATGAAG ATGCGGACTT ACCTGGCAAA
1861 GGATTGCGATA ACGTGCTGAT GGTGACGAC CACGCATTAA TGGACTGGAT TGGGGCCAAC
1921 TCCTACCGTA CCTCGCATTA CCCTTACGCT GAAGAGATGC TCGACTGGGC AGATGAACAT
1981 GGCATCGTGG TGATTGATGA AACTGCTGCT GTCGGCTTTT CGCTCTCTTT AGGCATTGGT
2041 TTCGAAGCGG GCAACAAGCC GAAAGAACTG TACAGCGAAG AGGCAGTCAA CGGGGAAACT
2101 CAGCAAGCGC ACTTACAGGC GATTAAAGAG CTGATAGCGC GTGACAAAAA CCACCCAAGC
2161 GTGGTGATGT GGAGTATTGC CAACGAACCG GATACCCGTC CGCAAGGTGC ACGGGAATAT
2221 TTCGCGCCAC TGGCGGAAGC AACCGGTAAA CTCGACCGCA CGCGTCCGAT CACCTGCGTC
2281 AATGTAATGT TCTGCGACGC TCACACCGAT ACCATCAGCG ATCTCTTTGA TGTGCTGTGC
2341 CTGAACCGTT ATTACGGATG GTATGTCCAA AGCGGCGATT TGGAAACGGC AGAGAAGGTA
2401 CTGGAAAAAG AACTTCTGGC CTGGCAGGAG AAACCTGCATC AGCCGATTAT CATACCGAA
2461 TACGGCGTGG ATACGTTAGC CGGGCTGCAC TCAATGTACA CCGACATGTG GAGTGAAGAG
```

Figure 2 (continued)

Plasmid pFD2001TK-FDAH-seq

```
2521 TATCAGTGTG CATGGCTGGA TATGTATCAC CGCGTCTTTG ATCGCGTCAG CGCCGTCGTC
2581 GGTGAACAGG TATGGAATTT CGCCGATTTT GCGACCTCGC AAGGCATATT GCGCGTTGGC
2641 GGTAAACAAG AAGGGATCTT CACTCGCGAC CGCAAACCGA AGTCGGCGGC TTTTCTGCTG
2701 CAAAAACGCT GGACTGGCAT GAATTCGGT GAAAAACCGC AGCAGGGAGG CAAACAATGA
2761 GGATCCGGAA ATGGTAGTAA AACTGACAGC GGTATGTATG AAATGCTTTA AAGAGGCGTC
2821 GTTTTCTAAA CGTTTGGGAA CGGAAACCGA GATCGAAATA ATTGGTGGTG AAGATATGTA
2881 TCAATCCGTA TGCAGAAAGT GTTACATCAA CGAATGATAA TTTTCTATA AAAAAGTAAA
2941 AATAAACATT GATTAAATTT TAATATAATA CTTAAAAATG GATGTTGTGT CACTGGGATAA
3001 ACCGTTTATG TATTTTGAGG AAATAGATAA TGAAGTAGAA TACGAACCGA AAAGTGCAAA
3061 TGAGGTTGCT AAAAAACTTC CATATCAGGG ACAATTAATA CTATTACTAG GAGAATTGTT
3121 TTTTCTTAGT AAGCTACAGA GACACGGTAT ATTGGACGGT GCCACTGTAG TGTATATAGG
3181 ATCGGCTCCT GGTACACACA TACGTTATCT ACCTGATCAT TTCTATAATT TAGGGGTAAT
3241 CATCAATGG ATGCTAATTG ACGGGCATGC CCTGATGCGG TATTTTCTCC TTACGCTATC
3301 GTGCGGTATT TCACACCGCA TATGGTGAC TCTCAGTACA ATCTGCTCTG ATGCGCGATA
3361 GTTAAGCCAG CCGGACACCC CGCCAAACACC CGCTGACGCG CCCTGACGGG CTTGCTGCTG
3421 CCGGCGATCC GCTTACAGAC AAGCTGTGAC CGTCTCCGGG AGCTGCATGT GTGATACGCC
3481 TTCACCGTCA TCACCGAAAC GCGCGAGACG AAAGGGCCCTC GTGATACGCC TATTTTATA
3541 GGTTAATGTC ATGATAATTA TGGTTTCTTA GAGCTCAGGT GGCACCTTTT GGGGAAATGT
3601 GCGCGGAACC CCTATTTGTT TATTTTCTTA AATACATTCA AATATGTATC CGCTCATGAG
3661 ACAATAACCC TGATAAATGC CTCTTTTTCG GGCATTTTGC CTTCTGTTT TTGCTCACCC
3721 TTTCCGTGTC GCCCTTATTC CTTTTTTTGC GGCATTTTGC CTTCTGTTT TTGCTCACCC
3781 AGAAACGCTG GTGAAAGTAA AAGATGCTGA AGATCAGTTG GGTGCACGAG TGGGTTACAT
3841 CGAACTGGAT CTCAACAGCG GTAAGATCCT TGAGAGTTT CGCCCCGAAG AACGTTTCC
3901 AATGATGAGC ACTTTTAAAG TTCTGCTATG TGGCGCGGTA TTATCCGTA TTGACCGCGG
3961 GCAAGAGCAA CTCGGTCGCC GCATACACTA TTCTCAGAAT GACTTGGTTG AGTACTCACC
4021 AGTCACAGAA AAGCATCTTA CGGATGGCAT GACAGTAAGA GAATTAATGCA GTGCTGCCAT
4081 AACCATGAGT GATAACACTG CGGCCAACTT ACTTCTGACA ACGATCGGAG GACCGAAGGA
4141 GCTAACCGCT TTTTTCACA ACATGGGGGA TCATGTAAC CGCCTTGATC GTTGGGAACC
4201 GGAGCTGAAT GAAGCCATAC CAAACGACGA GCGTGACACC ACGATGCTG TAGCAATGGC
4261 AACACGTTG CGCAAACAT ATAAAGTTGC AGGACCACTT CTAGCTTCCC GGCAACAATT
4321 AATAGACTGG ATGGAGGCGG AATCTGGAGC CGGTGAGCGT CTGCGCTCGG CCCTTCCGGC
4381 TGGCTGTTTT ATTGCTGATA AGCCCTCCCG TATCGTAGTT ATCTACACGA CGGGGAGTCA
4441 AGCACTGGGG CCAGATGGTA AGCTCTCCCG CGGTGAGCGT GGGTCTCGCG GTATCATTTG
4501 GGCAACTATG GATGAACGAA ATAGACAGAT CGCTGAGATA GGTGCCTCAC TGATTAAGCA
4561 TTGGTAACTG TCAGACCAAG TTTACTCATA TATACCTTAG ATTGATTTAA AACTTCATTT
4621 TTAATTTAAA AGGATCTAGG TGAAGATCCT TTTTGATAAT CTATGACCA AAATCCCTTA
4681 ACGTGAGTTT TCGTTCCTCT GAGCGTCAGA CCCCCTAGAA AAGATCAAAG GATCTTCTTG
4741 AGATCCTTTT TTTCTGCGCG TAATCTGCTG CTTGCAACAA AAAAAACCA CGCTACCAGC
4801 GGTGTTTTGT TTGCCGATC AAGAGCTACC AACTCTTTT CCGAAGGTAA CTGGCTTCA
4861 CAGAGCGCAG ATACCAAATA CTGTTCTTCT AGTGTAGCCG TAGTTAGGCC ACCACTTCAA
4921 GAACCTCTGA GCACCGCCTA CATACCTCGC TCTGTAATC CTGTTACCAG TGGCTGCTGC
4981 CAGTGGCGAT AAGTCGTGTC TTACCGGGTT GGAACAAGA CGATAGTTAC CGGATAAGGC
5041 GCAGCGGTG GGTGAACGG GGGTTTCGTG CACACAGCCC AGCTTGAGC GAACGACCTA
5101 CACCGAACTG AGATACCTAC AGCGTGAGCT ATGAGAAAGC GCCACGCTTC CCGAAGGGAG
5161 AAAGCGGGAC AGGTATCCGG TAAGCGGCAG GGTGGAACA GGAGAGCGCA CGAGGGAGCT
5221 TCCAGGGGGA AACGCTGTT ATCTTTATAG TCTGTGCGG TTTCCGCCAC TCTGACTTGA
5281 GCGTCGATTT TTGTGATGCT CGTCAGGGGG GCGGAGCCTA TGGAAAAACG CCAGCAACGC
5341 GGCCTTTTAA CGGTTCTCTG CCTTTTCTG GCTTTTCTG CACATGTTCT TTCCTGCGTT
5401 ATCCCTGAT TCTGTGGATA ACCGTATTAC CGCCTTTGAG TGAGCTGATA CCGCTGCGCG
5461 CAGCCGAACG ACCGAGCGCA GCGAGTCAGT GAGCGAGGAA GCGGAAGA
```

Figure 3

000044

Plasmid pFD2003SEL-FDAH-Seq

1 TTATTGGACA CTAGATAATC ATCACATGTT ACCACAAAAT TATATAATGT ATAAATGCCA
61 AATTATTAAA CGCAAATATC CATGGGAAAA CGCGCAGTAT ACAGACGATT TTTTACAGTA
121 TTTGGAGAGT TTTATAGGAA GTATATAGAG TAGAACCAGA ATTTTGTAAG AATAAATCAC
181 ATTTTATATAC TAATATGAAA CAACTATCGA TAGTTATATT GCTACTATCG ATAGTATATA
241 CAACCAAACC TCATCCTACA CAGATATCAA AAAAAGTAGG CGATGATGCT ACTCTATCGT
301 GTAATAGAAA CAATACACAT GGATATCTTG TCATGAGTTC TTGGTATAAG AAACCAGACT
361 CCATTATTCT CTTAGCAGCC AAAAACGATG TCGTATACTT TGATGATTAT ACAGCGGATA
421 AAGTATCATA CGATTACCGG TATGATACTC TAGCTACAAT TATTACAATT AAATCAATTGA
481 CATCTGGAGA TGCAGGTACT TATATATGCG CATTCTTTAT AACATCAACA AATGATACGG
541 ATAAATAGA TTATGAAGAA TTCGTGACG CGGCCGCTG CAGAAGCTTG GTACCATGGG
601 TATTTATATT CCAAAAAAAT AAAATAAAAT TTCAATTTTT GCTCTAGACA TCTATATACT
661 ATATAGTAAT ACCAATACTC AAGACTACGA AACTGATACA ATCTCTTATC ATGTGGGTAA
721 TGTTCTCGAT GTCGATAGCC ATATGCCCGG TAGTTGCGAT ATACATAAAC TGATCACTAA
781 TTCCAAACCC ACCCGCTTTT TATAGTAAGT TTTTCAACCA TAAATAATAA ATACAATAAT
841 TAATTTCTCG TAAAAGTAGA AAATATATTG TAATTTATTG CACGTAAGG AAGTAGAATC
901 ATAAAGAACA GTGACATGGA TCCCGTCGTT TTACAACGTC GTGACTGGGA AAACCTGGC
961 GTTACCCAAC TTAATCGCCT TGCAGCACAT CCCCCTTTCG CCAGCTGGCG TAATAGCGAA
1021 GAGGCCCGCA CCGATCGCCC TTCCCAACAG TTGCGCAGCC TGAATGGCGA ATGGCGCTTT
1081 GCCTGGTTTC CGGCACCAGA AGCGGTGCCG GAAAGCTGGC TGGAGTGCGA TCTTCTGAG
1141 GCCGATACTG TCGTCGTCCC CTCAAACTGG CAGATGCACG GTTACGATGC GCCCATCTAC
1201 ACCAACGTAA CCTATCCCAT TACGGTCAAT CCGCCGTTTG TTCCACCGGA GAATCCGACG
1261 GGTGTGTACT CGCTCACATT TAATGTTGAT GAAAGCTGGC TACAGGAAGG CCAGACGCGA
1321 ATTATTTTTG ATGGCGTTAA CTCGGCGTTT CATCTGTGGT GCAACGGGCG CTGGGTGCGT
1381 TACGGCCAGG ACAGTCGTTT GCCGTCTGAA TTTGACCTGA GCGCATTTTT ACGCGCCGGA
1441 GAAACCGCC TCGCGGTGAT GGTGCTGCGT TGGAGTGACG GCAGTTATCT GGAAGATCAG
1501 GATATGTGGC GGATGAGCGG CATTTCCTG GACGTCTCGT TGCTGCATAA ACCGACTACA
1561 CAAATCAGCG ATTTCCATGT TGCCACTCGC TTTAATGATG ATTTAGCCG CGCTGTACTG
1621 GAGGCTGAAG TTCAGATGTG CGGCGAGTTG CGTGACTACC TACGGGTAAAC AGTTTCTTTA
1681 TGGCAGGGTG AAACGCAGGT CGCCAGCGGC ACCGCGCCTT TCGGCGGTGA AATTATCGAT
1741 GAGCGTGGTG GTTATGCCGA TCGCGTCACA CTACGTCTCA AGGTGAAAAA CCCGAACTG
1801 TGGAGCGCGG AAATCCCGAA TCTCTATCGT GCGGTGGTTG AACTGCACAC CGCCGACGGC
1861 ACGCTGATTG AAGCAGAAGC CTGCGATGTC GGTTCGCGG AGGTGCGGAT TGAATATGGT
1921 CTGCTGCTGC TGAACGGCAA GCCGTGCTG ATTCCAGGCG TTAACCGTCA CGAGCATCAT
1981 CCTCTGCATG GTCAGGTCTT GGATGAGCAG ACGATGGTGC AGGATATCCT GCTGATGAAG
2041 CAGAACAACT TTAACGCCGT GCGCTGTTTC CATTATCCGA ACCATCCGCT GTGGTACACG
2101 CTGTGCGACC GCTACGGCCT GTATGTGGTG GATGAAGCCA ATATTGAAAC CCACGGCATG
2161 GTGCCAATCA ATCGTCTGAC CGATGATCCG CGCTGGCTAC CGGCGATGAG CGAACCGGTA
2221 ACGCGAATGG TGCAGCGCGA TCGTAATCAC CCGAGTGTGA TCATCTGGTC GCTGGGGAAT
2281 GAATCAGGCC ACGGCGCTAA TCACGACGCG CTGTATCGCT GGATCAAAATC TGTCGATCCT
2341 TCCGCGCCGG TGCAGTATGA AGGCGGCGGA GCCGACACCA CGGCCACCGA TATTATTTGC
2401 CCGATGTACG CGGCGGTGGA TGAAGACCAG CCCTTCCCGG CTGTGCCGAA ATGGTCCATC
2461 AAAAAATGGC TTTGCTACC TGGAGAGACG CGCCCGCTGA TCCTTTGCGA ATACGCCAC

Figure 3 (continued)

Plasmid pFD2003SEL-FDAH-Seq

000045

```
2521 GCGATGGGTA ACAGTCTTGG CGGTTTCGCT AAATACTGGC AGGCGTTTCG TCAGTATCCCC
2581 CGTTTACAGG GCGGCTTCGT CTGGGACTGG GTGGATCAGT CGCTGATTAA ATATGATGAA
2641 AACGGCAACC CGTGGTCGGC TTACGGCGGT GATTTTGGCG ATACGCCGAA CGATCGCCAG
2701 TTCTGTATGA ACGGTCTGGT CTTTGGCCGAC CGCACGCCGC ATCCAGCGCT GACGGAAGCA
2761 AAACACCAGC AGCAGTTTTT CCAGTTCGGT TTATCCGGGC AAACCATCGA AGTGACCAGC
2821 GAATACCTGT TCCGTATAG CGATAACGAG CTCCTGCACT GGATGGTGGC GCTGGATGGT
2881 AAGCCCGCTG CAAGCGGTGA AGTGCCCTCG GATGTGCTC CACAAGGTAA ACAGTTGATT
2941 GAACTGCCTG AACTACCGCA GCCGGAGAGC GCCGGGCAAC TCTGGCTCAC AGTACCGGTA
3001 GTGCAACCGA ACGCGACCGC ATGGTCAGAA GCCGGGCACA TCAGCGCCTG GCAGCAGTGG
3061 CGTCTGGCGG AAAACCTCAG TGTGACGCTC CCCGCCGCGT CCCACGCCAT CCCGCATCTG
3121 ACCACCAGCG AAATGGATTT TTGCATCGAG CTGGGTAATA AGCGTTGGCA ATTTAACCGC
3181 CAGTCAGGCT TTCTTTTACA GATGTGGATT GCGGATAAAA AACAACTGCT GACGCCGCTG
3241 CGCGATCAGT TCACCCGTGC ACCGCTGGAT AACGACATTG GCGTAAGTGA AGCGACCCGC
3301 ATTGACCTTA ACGCCTGGGT CGAACGCTGG AAGCGCGCGG GCCATTACCA GGCCGAAGCA
3361 GCGTTGTTCG AGTGACCGGC AGATACACTT GCTGATGCGG TGCTGATTAC GACCGGTCAC
3421 GCGTGGCAGC ATCAGGGGAA AACCTTATTT ATCAGCCGGA AAACCTACCC GATTGATGGT
3481 AGTGGTCAAA TGGCGATTAC CGTTGATGTT GAAGTGGCGA GCGATACACC GCATCCGGCG
3541 CCGATTGGCC TGAATGCCA GCTGGCGCAG GTAGCAGAGC GGGTAAACTG GCTCGGATTA
3601 GGGCCGCAAG AAAACTATCC CGACCGCCTT ACTGCCGCTT GTTTTGACCG CTGGGATCTG
3661 CCATTGTGAG ACATGTATAC CCCGTACGTC TTCCGAGCGG AAAACGGTCT GCGCTGCGGG
3721 ACCGCGCAAT AAGGATCCTC GATGGAACCC AGCCATCGCC ATCTGCTGCA CAACATCAGC
3781 CGCTACAGTC AACAGCAACT GATGGAACCC AGCCATCGCC ATCTGCTGCA CAACATCAGC
3841 GGCACATGGC TGAATATCGA CGGTTTCCAT ATGGGGATTG GTGGCGACGA CTCCTGGAGC
3901 CCGTCAGTAT CGGCGGAATT CCAGCTGAGC GCCGTTTCGT ACCATTACCA GTTGGTCTGG
3961 TGTCAAAAT AAGGATCCTC GATACCAACA ACGGTAGAAA GTGTTACAAT ATCTACTACA
4021 AAATATACAA CTAGTGACTT TATAGAGATA TTTGGCATTG TTTCACTAAT TTTATTATTG
4081 CCGGTGGCGA TTTTCTGTAT TATATATTAT TTCTGTAGTG GACGGTCTCG TAAACAAGAA
4141 ACAATATAT TATAGATTTT AACTCAGATA AATGTCGGA ATAATTAAAT CTATCGTTTT
4201 GAGCGGACCA TCTGGTTCGG GCAAGACAGC TATAGTCAGG AGACTCTTAC AAGATTATGG
4261 AAATATATTT GGATTTGTGG TATCCCATAC CACTAGATTT CTEGTCCTA TGGAACGAGA
4321 AGGTGTGCTC TACCATTACG TTAACAGAGA GGCCATTGGG AAGGGAATAG CCGCTGGAAA
4381 CTTGCTAGAA CATAAGAGT TTTTGGGAAA TATTTATGGG ACTTCTAAAA CATCCATGAA
4441 CACAGCTGCT ATTAATAATC GTATATGTGT TATGGATTGA AACATTGACG GAGTTAGGAG
4501 TCTTAAAAAC ACATACTTGA TGCTTACTC TGTTTATATA AGACCTACAT CTCTTAAAT
4561 GGTAGAAACT GCATGCCCTG ATGCGGTATT TTCTCCTTAC GCATCTGTGC GGTATTTCAC
4621 ACCGCATATG GTGCACTCTC AGTACAATCT GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGCCCC
4681 GACACCCGCC AACACCCGCT GACCGGCCCT GACGGGCTTG TCTGCTCCCG GCATCCGCTT
4741 ACAGACAAGC TGTGACCCTC TCCGGGAGCT GCATGTGTCA GAGGTTTTCA CCGTCATCAC
4801 CGAAACGCGC GAGACGAAAG GGCCTCGTGA TACGCTATT TTTATAGGTT AATGTCATGA
4861 TAATAATGGT TTCTTAGACG TCAGGTGGCA CTTTTCGGG AAATGTGCGC GGAACCCCTA
4921 TTTGTTTATT TTTCTAAATA CATTCAAATA TGTATCCGCT CATGAGACAA TAACCTGAT
4981 AAATGCTTCA ATAATATTGA AAAAGGAAGA GTATGAGTAT TCAACATTCG CGTGTGCCCC
5041 TTATTCCTCT TTTTGGCGCA TTTTGCCTTC CTGTTTTTGC TCACCCAGAA ACGCTGGTGA
5101 AAGTAAAAGA TGCTGAAGAT CAGTTGGGTG CACGAGTGGG TTACATCGAA CTGGATCTCA
5161 ACAGCGGTAA GATCCTTGAG AGTTTTCGCC CCGAAGAACG TTTTCCAATG ATGAGCACTT
5221 TTAAGTTCT GCTATGTGGC GCGGTATTAT CCCGTATTGA CGCCGGGCAA GAGCAACTCG
5281 GTCGCGCAT ACATATTCT CAGAATGACT TGGTTGAGTA CTCACCAGTC ACAGAAAAGC
5341 ATCTTACGGA TGGCATGACA GTAAGAGAA TATGCAGTGC TGCCATAACC ATGAGTGATA
5401 AACTGCGGC CAACCTACTT CTGACAACGA TCGGAGGACC GAAGGAGCTA ACCGCTTTTT
5461 TGCACAACAT GGGGGATCAT GTAACCTGCC TTGATCGTTG GGAACCGSAG CTGAATGAAG
5521 CCATACCAAA CGACGAGCGT GACACCAAGA TGCCGTGAGC AATGGCAACA ACGTTGCGCA
5581 AACTATTAAC TGGCGAACTA CTTACTCTAG CTTCCCGGCA ACAATTAATA GACTGGATGG
5641 AGGCGGATAA AGTTGCAGGA CCACCTCTGC GCTCGGCCCT TCCGGCTGGC TGGTTTATTG
5701 CTGATAAATC TGGAGCCGGT GAGCGTGGGT CTCGCGGTAT CATTGCAGCA CTGGGGCCAG
5761 ATGGTAAGCC CTCCGATATC GTAGTTATCT ACACGACGGG GAGTCAGGCA ACTATGGATG
5821 AACGAAATAG ACAGATCGCT GAGATAGGTG CCTCACTGAT TAAGCATTGG TAACTGTGAG
5881 ACCAAGTTTA CTATATATA CTTTAGATTG ATTTAAACT TCATTTTTAA TTTAAAGGA
5941 TCTAGGTGAA GATCCTTTTT GATAATCTCA TGACCAAAAT CCCTTAACGT GAGTTTTCTG
6001 TCCACTGAGC GTCAGACCCC GTAGAAAAAG TCAAAGGATC TTCTTGAGAT CCTTTTTTTC
6061 TGCGCGTAAT CTGCTGCTTG CAAACAAAAA AACCACCGCT ACCAGCGGTG GTTTGTTTGC
6121 CGGATCAAGA GCTACCAACT CTTTTTCCGA AGGTAACCTG CTTGAGCAGA GCGCAGATAC
6181 CAAATACTGT TCTTCTAGTG TAGCCGTAGT TAGGCCACCA CTTCAAGAAC TCTGTAGCAC
6241 CGCTACATA CTTGCTCTG CTAATCCTGT TACCAGTGGC TGCTGCCAGT GGCATAAGT
```

Figure 3 (continued)

000046

Plasmid pFD2003SEL-FDAH-Seq

6301	CGTGTCTTAC	CGGGTTGGAC	TCAAGACGAT	AGTTACCGGA	TAAAGGCGCAG	CGGTCGGGCT
6361	GAACGGGGGG	TTCGTGCACA	CAGCCCAGCT	TGGAGCGAAC	GACCTACACC	GAACTGAGAT
6421	ACCTACAGCG	TGAGCTATGA	GAAAGCGCCA	CGCTTCCGA	AGGGAGAAAG	GCGGACAGGT
6481	ATCCGGTAAG	CGGCAGGGTC	GGAACAGGAG	AGCGCACGAG	GGAGCTTCCA	GGGGGAAACG
6541	CCTGGTATCT	TTATAGTCCT	GTCCGGTTTC	GCCACCTCTG	ACTTGAGCGT	CGATTTTGT
6601	GATGCTCGTC	AGGGGGGCGG	AGCCTATGGA	AAAACGCCAG	CAACGCGGCC	TTTTTACGGT
6661	TCCTGGCCTT	TTGCTGGCCT	TTTGCTCACA	TGTTCTTTCC	TGCGTTATCC	CCTGATTCTG
6721	TGGATAACCG	TATTACCGCC	TTTGAGTGAG	CTGATACCGC	TCGCCGCAGC	CGAACGACCG
6781	AGCGCAGCGA	GTCAGTGAGC	GAGGAAGCGG	AAGAGAGCTC		

Figure 4

000047

Plasmid pFD2003SEL-GPV-PV-FDAH-Seq

1 TTATTGGACA CTAGATAATC ATCATATGTT ACCACAAAAT TATATAATGT ATAAATGCCA
61 AATTATTAAA CGCAAATATC CATGGGAAAA CGCGCAGTAT ACAGACGATT TTTTACAGTA
121 TTTGGAGAGT TTTATAGGAA GTATATAGAG TAGAACCAGA ATTTTGTAAT AATAAATCAC
181 ATTTTATATC TAATATGAAA CAACTATCGA TAGTTATATT GCTACTATCG ATAGTATATA
241 CAACCAAACC TCATCCTACA CAGATATCAA AAAAAGTAGG CGATGATGCT ACTCTATCGT
301 GTAATAGAAA CAATACACAT GGATATCTTG TCATGAGTTC TTGGTATAAG AAACCAGACT
361 CCATTATTCT CTTAGCAGCC AAAAACGATG TCGTATACCT TGATGATTAT ACAGCGGATA
421 AAGTATCATA CGATTCCACG TATGATACTC TAGCTACAAT TATTACAATT AAATCATTGA
481 CATCTGGAGA TGCAGGTACT TATATATGCG CATTCTTTAT AACATCAACA AATGATACGG
541 ATAAAATAGA TTATGAAGAA TTCGTCGACT CACAGTCCGG TCTCACCCTC GCTCTTGTAT
601 GATTCCCATG AAGATATGAT CTTCCCGCTT TGGGGAGTGA CTGACACCTC CCTCCCTGTC
661 CCTCTGAGAT TGTGTTGTGT AGGTTCCGAT CGATTGACTC TTCTCCAGCA TGTATCAGG
721 AAAATTATCA ACATCAAGGC AGTCAGGGCC CCGTCACTCA GTAATACATA CTTCCCCCAG
781 TTCGGGAGAC CCAAGTCAAC TCCTGAGATC CGTTCGTGCA CATCGGGAAG GTGAACCTCA
841 ACAAATCCT CAGCCTCGTC ACCGTTCTTG AAAACGGTAG ACGGGTCTGC CAGGGGGTGC
901 ATAAGGGGGA TAACCGAGGA TACCAACAAC TCCATATGTT GCTGGAGGAG GGATGATTGC
961 ATCTCTGGGA TTAAGACATT GCCGTGAGGT CCTAATATTA TACCATTGAA AAATACCCCG
1021 TTTACATGAG GATGACACCT CCCCCAAT CTTAAACACC CTTTGAAGG GATGATCTCA
1081 TTCCAAGTTC TGACTGACTT GTAGTGAGCA TCGGCTTCCA TCAAGGTCTT GTTGAATATG
1141 GTATATGCTT TTCCAACCC AGGGACAAGT TTTCTTAAT GACTGAGACG TCTGAACTC
1201 ACTGACTTGG TGGTCATGAT GGACTCTAGT GCATCCAGAC ACTCCTCTCT CTTCTTGACC
1261 AACTCCTCTA CAACAAGGTG CTCAATTTCT TCTGAGCGAA AGTCGTGCAA ATTGATCAAC
1321 TGACCGGGAG GGCACCATTT GGTTCATTT GATGTTTGCA TCGAGACCCA TGTTCATCC
1381 ATAAGTCTAA GTCCGAGAAC TCCACATAAC TGGAGTTTGC ATGCTCCTTT TAAAGACTTA
1441 TATAGGCCCTC TTTTCTCTAC AAAGCCGCAA GTCTCACTCC CTTTGGATGC TCTCTCCCT
1501 CTACTATTGG TAAAAATGTC ACAAGACATC CCTAGTCTCG GATTCTCGGG CATCCAAATG
1561 GTGTAATCGT GGTAGTGGGA GCAGTAGGTA GAAGACACCG CTACTCCTGA GCACTTCCCG
1621 CCAGGGAAGA CCCTCGAGTG AAGGGATCTG TCATATGGGT CCAAATCTGC CACTTGGGA
1681 GATATGATAA CGAGAGACTC CTTGGTGGT TTTACAGTTC GAAGCCAGTG GTAGTCAGGG
1741 TACGGATTGT GTAGAGACTC TTCATATCTG GGGTCACCGG CCATCTTCCA GTTGACCGG
1801 GCTCTACATG CATCTGGTGT TGGGCGGAAA TGCTTTCTTT TGAACGTGGT TGTGACATAA
1861 CCAACGAAGT TAGTGTAGGT TTCAGCTCC GTCAACCGC CTGTGCAAGT GAACCCGTTT
1921 ATTTTATGG CTGAGATGTA TCCAACCTTA AGTTCATGT AGGAGAACCC TGACAGGTTG
1981 GTGCATCCTT CGTCTCCAC TACCAAAATTG TTTGGGCAGC TGAGGTGATG TATGTCAATC
2041 GGGCTCCAGG GACCAAGCTT GTCTGGTATC GTGTAATAG GGAATTTCCC AAAACACAAT
2101 GGAAAAACCA GAAGGGGTAC AAACAGGAGA GCCTGAGGAA CCGGTACCAT GGGTATTAT
2161 ATTCCAAAAA AAAAAATAA AATTTCAAT TTTGCTCTAG ACATCTATAT ACTATATAGT
2221 AATACCAATA CTCAAGACTA CGAACTGAT ACAATCTCT ATCATGTGGG TAATGTTCTC
2281 GATGTCGATA GCCATATGCC CGGTAGTTGC GATATACATA AACTGATCAC TAATTCCAAA
2341 CCCACCCGCT TTTTATAGTA AGTTTTCAC CCATAAATA TAAATACAAT AATTAATTTT

Figure 4 (continued)

Plasmid pFD2003SEL-GPV-PV-FDAH-Seq

000048

```

2401 TCGTAAAGT AGAAAATATA TTCTAATTTA TTGCACGGTA AGGAAGTAGA ATCATAAAGA
2461 ACAGTGACAT GGATCCCGTC GTTTTACAAC GTCGTGACTG GGAAAACCCCT GGCCTTACCC
2521 AACTTAATCG CCTTGACGCA CATCCCCCTT TCGCCAGCTG GCGTAATAGC GAAGAGGCC
2581 GCACCGATCG CCCTTCCCAA CAGTTGCGCA GCCTGAATGG CGAATGGCGC TTTGCCTGGT
2641 TTCCGGCACC AGAAGCGGTG CCGGAAAGCT GGCTGGAGTG CGATCTTCTC GAGGCCGATA
2701 CTGTGTCGT CCCCTCAAAC TGGCAGATGC ACGGTTACGA TGCGCCCATC TACACCAACG
2761 TAACCTATCC CATTACGGTC AATCCGCCGT TTGTTCCAC GGAGAATCCG ACGGGTTGTT
2821 ACTCGCTCAC ATTTAATGTT GATGAAAGCT GGCTACAGGA AGGCCAGACG CGAATTATTT
2881 TTGATGGCGT TAACTCGGCG TTTCATCTGT GGTGCAACGG GCGCTGGGTC GGTACGGCC
2941 AGGACAGTCG TTTGCCGTCT GAATTTGACC TGAGCGCATT TTTACGCGCC GGAGAAAACC
3001 GCCTCGCGGT GATGGTGCTG CGTTGGAGTG ACGGCAGTTA TCTGGAAGAT CAGGATATGT
3061 GGCGGATGAG CGGCATTITC CGTGACGTCT CGTTGCTGCA TAAACCGACT ACACAAATCA
3121 GCGATTTCCA TGTTGGCAGT CGCTTTAATG ATGATTTTCA CCGCGCTGTA CTGGAGGCTG
3181 AAGTTTCAAT GTGCGGCGAG TTGCGTGACT ACCTACGGGT AACAGTTTCT TTATGGCAGG
3241 GTGAAACGCA GGTGCGCAGC GGCACCGCGC CTTTCGGCGG TGAATTTATC GATGAGCGTG
3301 GTGGTTATGC CGATCGCGTC ACACTACGTC TCAAGGTCGA AAACCCGAAA CTGTGGAGCG
3361 CCGAAATCCC GAATCTCTAT CGTGCGGTGG TTGAAGTCCA CACCGCCGAC GGCACGCTGA
3421 TTGAAGCAGA AGCCTCGCAT GTCGGTTTCC GCGAGGTGCG GATTGAAAAT GGTCTGCTGC
3481 TGCTGAACGG CAAGCGGTTG CTGATTCGAG GCGTTAACCG TCACGAGCAT CATCCTCTGC
3541 ATGGTCAGGT CATGGATGAG CAGACGATGG TGCAGGATAT CTGCTGATG AAGCAGAAAC
3601 ACTTTAACGC CGTGCGCTGT TCGCATTATC CGAACCATCC GCTGTGGTAC ACGCTGTGCG
3661 ACCGCTACGG CCTGTATGTG GTGGATGAAG CCAATATTGA AACCCACGGC ATGGTGCCAA
3721 TCAATCGTCT GACCGATGAT CCGCGCTGGC TACCGCGCAT GAGCGAACGC GTAACCGGAA
3781 TGGTGACGCG CGATCGTAAT CACCCGAGTG TGATCATCTG GTCGCTGGGG AATGAATCAG
3841 GCCACGGCGC TAATCACGAC GCGCTGTATC GCTGGATCAA ATCTGTGAT CCTTCCCGCC
3901 CCGTGACGTA TGAAGCGCGC GGAGCCGACA CCACGGCCAC CGATATTATT TGCCCGATGT
3961 ACGCGCGCGT GGATGAAGAC CAGCCCTTCC CGGCTGTGCC GAAATGGTCC ATCAAAAAAT
4021 GCGTTTCGCT ACCTGGAGAG ACGCGCCCGC TGATCCTTGG CGAATACGCC CACGCGATGG
4081 GTAACAGTCT TGGCGGTTTC GCTAAATACT GGCAGGCGTT TCGTCAGTAT CCCCCTTTAC
4141 AGGCGCGGCT CGTCTGGGAC TGGGTGGATC AGTCGCTGAT TAAATATGAT GAAAACGGCA
4201 ACCCGTGGTC GGCTTACGGC GGTGATTTTG GCGATACGCC GAACGATCGC CAGTTCTGTA
4261 TGAACGGTCT GGTCTTTGCC GACCGCACGC CGCATCCAGC GCTGACGGAA GCAAAACACC
4321 AGCAGCAGTT TTTCAGTTTC CGTTTATCCG GGCAAAACCAT CGAAGTGACC AGCGAATACC
4381 TGTTCCGCTA TAGCGATAAC GAGCTCCTGC ACTGGATGGT GGCGCTGGAT GGTAAAGCCG
4441 TGGCAAGCGG TGAAGTGCTT CTGGATGTGC CTCCAGAAGG TAAACAGTTG ATTGAAGTGC
4501 CTGAATACC GCAGCCGGAG AGCGCCGGGC AACTCTGGCT CACAGTACGC GTAGTGCAAC
4561 CGAACCGGAC CGCATGGTCA GAAGCCGGGC ACATCAGCGC CTGGCAGCAG TGGCGTCTGG
4621 CCGAAAACCT CAGTGTGACG CTCGCCCGCG CGTCCACGCG CATCCCGCAT CTGACCACCA
4681 GCGAAATGGA TTTTTCATC GAGCTGGGTA ATAAGCGTTG GCAATTTAAC CGCCAGTCAG
4741 GCTTCTTTC ACAGATGTGG ATTGGCGATA AAAAACAACT GCTGACGCCG CTGCGCGATC
4801 AGTTCACCCG TGCACCGCTG GATTAACGACA TTGGCGTAAG TGAAGCGACC CGCATTGACC
4861 CTAACGCGCT GGTGGAACGC TGGAAAGCGG CCGGCCATTA CCAGGCCGAA GCAGCGTTGT
4921 TGCAGTGAC GGCAGATACA CTTGCTGATG CGGTGCTGAT TACGACCGGT CACGCGTGGC
4981 AGCATCAGGG GAAAACCTTA TTTATCAGCC GGAACCTTA CCGGATTGAT GGTAGTGGTC
5041 AAATGGCGAT TACCGTTGAT GTTGAAGTGG CGAGCGATAC ACCGATCCG GCGCGGATTG
5101 GCCTGAACTG CCAGCTGGCG CAGGTAGCAG AGCGGGTAAA CTGGCTCGGA TTAGGGCCGC
5161 AAGAAAATA TCCCGACCGC CTTACTGCCG CCTGTTTTGA CCGCTGGGAT CTGCCATTGT
5221 CAGACATGTA TACCCCGTAC GTCTTCCCGA GCGAAAACGG TCTGCGCTGC GGGACGCGCG
5281 AATTGAATTA TGGCCACAC CAGTGGCGCG GCGACTTCCA GTTCAACATC AGCCGCTACA
5341 GTCAACAGCA ACTGATGGAA ACCAGCCATC GCCATCTGCT GCACGCGGAA GAAGGCACAT
5401 GGCTGAATAT CGACGGTTTC CATATGGGGA TTGGTGGCGA CGACTCTGG AGCCCGTCAG
5461 TATCGGCGGA ATTCCAGCTG AGCGCGGTTT GCTACCATTA CCAGTTGGTC TGGTGTCAAA
5521 AATAAGGATC CTCGATACCA ACAACGGTAG AAAGTGTAC AATATCTACT ACAAAATATA
5581 CACTAGTGA CTTTATAGAG ATATTTGGCA TTGTTTCACT AATTTATTA TTGGCCGTGG
5641 CGATTTTCTG TATTATATAT TATTCTGTA GTGGACGGTC TCGTAAACAA GAAACAAATA
5701 TATTATAGAT TTTAACTCAG ATAAATGTCT GGAATAATTA AATCTATCGT TTTGAGCGGA
5761 CCATCTGGTT CCGGCAAGAC AGCTATAGTC AGGAGACTCT TACAAGATTA TGGAAATATA
5821 TTTGGATTGG TGGTATCCCA TACCACTAGA TTCTCTGTC CTATGGAACG AGAAGGTGTC
5881 GTCTACCATT ACGTTAACAG AGAGGCCATT TGGAAAGGAA TAGCCGCTGG AACTTGCTA
5941 GAACATACAG AGTTTTTGGG AAATATTAT GGGACTTCTA AAACATCCAT GAACACAGCT
6001 GCTATTAATA ATCGTATATG TGTATGGAT TTAACATTG ACGGAGTTAG GAGTCTTAAA
6061 AACACATACT TGATGCCCTA CTCTGTTTAT ATAAGACCTA CATCTCTTAA AATGGTAGAA
6121 ACTGCATGCC CTGATGCGGT ATTTTCTCT TACGCATCTG TGCGGTATTT CACACCGCAT

```

Figure 4 (continued)

Plasmid pFD2003SEL-GPV-PV-FDAH-Seq

000049

```
6181 ATGGTGCACCT CTCAGTACAA TCTGCTCTGA TGCCGCATAG TTAAGCCAGC CCCGACACCC
6241 GCCAACACCC GCTGACGCGC CCTGACGGGC TTGTCTGCTC CCGGCATCCG CTTACAGACA
6301 AGCTGTGACC GTCTCCGGGA GCTGCATGTG TCAGAGGTTT TCACCGTCAT CACCGAAACG
6361 CGCGAGACGA AAGGGCCTCG TGATACGCCT ATTTTATAG GTTAATGTCA TGATAAATAT
6421 GGTTTCTTAG ACGTCAGGTG GCACTTTTCG GGGAAATGTG CGCGGAACCC CTATTTGTTT
6481 ATTTTCTAA ATACATTCAA ATATGTATCC GCTCATGAGA CAATAACCTT GATAAATGCT
6541 TCAATAATAT TGAAAAAGGA AGAGTATGAG TATTCAACAT TTCCGTGTG CCGTTATTCC
6601 CTTTTTGCG GCATTTTGCC TTCTGTGTTT TGCTCACCCA GAAACGCTGG TGAAGTAAA
6661 AGATGCTGAA GATCAGTTGG GTGCACGAGT GGGTTACATC GAACTGGATC TCAACAGCGG
6721 TAAGATCCTT GAGAGTTTTC GCCCGAAGA ACGTTTTCCA ATGATGAGCA CTTTTAAAGT
6781 TCTGCTATGT GCGCGGTAT TATCCCGTAT TGACGCCGGG CAAGAGCAAC TCGGTGCGCG
6841 CATACACTAT TCTCAGAATG ACTTGGTTGA GTACTACCA GTCACAGAAA AGCATCTTAC
6901 GGATGGCATG ACAGTAAGAG AATTATGCAG TGCTGCCATA ACCATGAGTG ATAACACTGC
6961 GGCCAACTTA CTTCTGACAA CGATCGGAGG ACCGAAGGAG CTAACCGCTT TTTTGACAA
7021 CATGGGGGAT CATGTAACTC GCCTTGATCG TTGGGAACCG GAGCTGAATG AAGCCATACC
7081 AAACGACGAG CGTGACACCA CGATGCCTGT AGCAATGGCA ACAACGTTGC GCAAACCTAT
7141 AACTGGCGAA CTACTTACTC TAGCTTCCCG GCAACAATTA ATAGACTGGA TGGAGGCGGA
7201 TAAAGTTGCA GGACCACTTC TGCGCTCGGC CCTCCGGCT GGCTGGTTTA TTGCTGATAA
7261 ATCTGGAGCC GGTGAGCGTG GGTCTCGCGG TATCATTGCA GCACTGGGGC CAGATGGTAA
7321 GCCCTCCCGT ATCGTAGTTA TCTACACGAC GGGGAGTCAG GCAACTATGG ATGAACGAAA
7381 TAGACAGATC GCTGAGATAG GTGCCTCACT GATTAAGCAT TGGTAACTGT CAGACCAAGT
7441 TTAATCATAT ATACTTTAGA TTGATTTAAA ACTTCATTTT TAATTTAAAA GGATCTAGGT
7501 GAAGATCCTT TTTGATAATC TCATGACCAA AATCCCTTAA CGTGAGTTTT CGTCCACTG
7561 AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTGA GATCCTTTTT TTCTGCGCGT
7621 AATCTGCTGC TTGCAAAACA AAAAACCACC GCTACCAGCG GTGGTTTGTG TGCCGGATCA
7681 AGAGCTACCA ACTCTTTTTC CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC AGAGCGCAGA TACCAAATAC
7741 TGTTCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG AACTCTGTAG CACCGCCTAC
7801 ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCAGT GGCTGCTGCC AGTGGCGATA AGTCGTGTCT
7861 TACCGGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG CAGCGGTCGG GCTGAACGGG
7921 GGGTTCGTGC ACACAGCCCA GCTTGGAGCG AACGACCTAC ACCGAACCTG GATACCTACA
7981 GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA AAGGCGGACA GGTATCCGGT
8041 AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT CCAGGGGGAA ACGCCTGGTA
8101 TCTTTATAGT CCTGTGCGGT TTCGCCACCT CTGACTTGAG CGTCGATTTT TGTGATGCTC
8161 GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT GGAAAAACGC CAGCAACCGG GCCTTTTAC GGTTCCTGGC
8221 CTTTTGCTGG CTTTTGCTC ACATGTTCTT TECTGCGTTA TCCCTGATT CTGTGATAA
8281 CCGTATTACC GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC AGCCGAACGA CCGAGCGCAG
8341 CGAGTCAGTG AGCGAGGAAG CGGAAGAGAG CTC
```

Figure 5

000050

PCV2a orf2-FDAH-Seq

```

1  ATGACGTATC CAAGGAGGCG TTACCGCAGA AGAAGACACC GCCCCCGCAG CCATCTTGGC
61 CAGATCCTCC GCCGCCGCC CTGGCTCGTC CACCCCGGCC ACCGCTACCG TTGGAGAAGG
121 AAAAATGGCA TCTTCAACAC CCGCCTCTCC CGCACCTTCG GATATACTGT CAAGGCTACC
181 ACAGTCAGAA CGCCCTCCTG GCGGTGGAC ATGATGAGAT TTAATATTGA CGACTTTGTT
241 CCCCCGGGAG GGGGGACCAA CAAAATCTCT ATACCCTTTG AATACTACAG AATAAGAAAG
301 GTTAAGGTTG AATTCTGGCC CTGCTCCCCC ATCACCAGG GTGATAGGGG AGTGGGCTCC
361 ACTGCTGTTA TTCTAGATGA TAACCTTGTG ACAAAGGCCA CAGCCCTAAC CTATGACCCA
421 TATGTAAACT ACTCCTCCCG CCATACAATC CCCCAACCCT TCTCCTACCA CTCCCGTTAC
481 TTCACACCCA AACCTGTTCT TGACTCCACC ATTGATTACT TCCAACCAA TAACAAAAGG
541 AATCAGCTTT GGATGAGGCT ACAAACCTCT AGAAATGTGG ACCACGTAGG CCTCGGCACT
601 GCGTTCGAAA ACAGTATATA CGACCAGGAC TACAATATCC GTGTAACCAT GTATGTACAA
661 TTCAGAGAAT TTAATCTTAA AGACCCCCCA CTAAACCCT AA

```

Figure 6

000051

PCV2b-orf2-FDAH-Seq

```
1 ATGACGTATC CAAGGAGGCG TTACCGAAGA AGAAGACACC GCCCCCGCAG CCATCTTGGC
61 CAGATCCTCC GCCGCCGCC CTGGCTCGTC CACCCCGGCC ACCGTTACCG CTGGAGAAGG
121 AAAAATGGCA TCTTCAACAC CCGCCTCTCC CGCACCTTCG GATATACTGT CAAGCGAACC
181 ACAGTCAGAA CGCCCTCCTG GCGGTGGAC ATGATGAGAT TCAATATTAA TGACTTTCTT
241 CCCCAGGAG GGGGCTCAAA CCCCCTCTCT GTGCCCTTTG AATACTACAG AATAAGAAAG
301 GTTAAGGTTG AATTCTGGCC CTGCTCCCCG ATCACCAGG GTGACAGGG AGTGGGCTCC
361 AGTGCTGTTA TTCTAGATGA TAACTTTGTA ACAAAGGCCA CAGCCCTCAC CTATGACCCC
421 TATGTAACT ACTCCTCCCG CCATACCATA ACCCAGCCCT TCTCCTACCA CTCCCGGTAC
481 TTTACCCCA AACCTGTCCT AGATTCCACT ATTGATTACT TCCAACCAA CAACAAAAGA
541 AACCAGCTGT GGCTGAGACT ACAAAGTCT GGAATGTAG ACCACGTAGG CCTCGGCACT
601 GCGTTCGAAA ACAGTATATA CGACCAGGAA TACAATATCC GTGTAACCAT GTATGTACAA
661 TTCAGAGAAT TTAATTTTAA AGACCCCA CTTAACCCTT AA
```

Figure 7

PRRSV ISU12-orf3-FDAH-Seq

000952

```
1 ATGGCTAATA GCTGTACATT CCTCCATATT TTCCTCTGTT GCAGCTTCTT GACTCTTTT
61 TGTGTGCTG TGGTTGCGGG TTCCAATGCT ACGTACTGTT TTTGGTTTCC GCTGGTTAGG
121 GGCAATTTTT CTTTCGAACT CACGGTGAAC TACACGGTGT GCCCGCCTTG CCTCACCCGG
181 CAAGCAGCCG CAGAGGCCTA CGAACCCGGT AGGTCCCTTT GGTGCAGGAT AGGGCATGAT
241 CGATGTGGGG AGGACGATCA TGATGAACTA GGGTTTGTGG TGCCGCCTGG CCTCTCCAGC
301 GAAGGCCACT TGACCAGTGC TTACGCCTGG TTGGCGTTCC TGTCTTCAG CTATACGGCC
361 CAGTTCCATC CCGAGATATT CGGGATAGGG AATGTGAGTC GAGTCTATGT TGACATCAAG
421 CACCAATTCA TTTGCGCTGT TCATGATGGG CAGAACACCA CCTTGCCCCA CCATGACAAC
481 ATTTAGCCG TGTTCAGAC CTATTACCAG CATCAGGTCT ACGGCGGCAA TTGGTTTCAC
541 CTAGAATGGC TGCCTCCCTT CTTTCTCTCT TGGTTGGTTT TAAATGTCTC TTGGTTTCTC
601 AGGCGTTTCG CTGCAAGCCA TGTTCAGTT CGAGTCTTTC AGACATCAAG ACCAACACCA
661 CCGCAGCGGC AGGCTTTGCT GTCCTCCAAG ACATCAGTTG CCTTAGGCAT CGCAACTCGG
721 CCTCTGAGGC GATTGCAAAA GTCCCTCAGT GCCGCACGGC GATAG
```

Figure 8

PRRSV ISU12-orf4-FDAH-Seq

000053

1 ATGGCTGCGT CCTTCCTTT CCTCTTGGT GGTTTTAAAT GTCTCTTGGT TTCTCAGGCG
61 TTCGCCTGCA AGCCATGTTT CAGTTCGAGT CTTTCAGACA TCAAGACCAA CACCACCGCA
121 GCGGCAGGCT TTGCTGTCCT CCAAGACATC AGTTGCCTTA GGCATCGCAA CTCGGCCTCT
181 GAGGCGATTG GCAAAGTCCC TCAGTGCCGC ACGGCGATAG GGACACCCGT GTATATCACT
241 GTCACAGCCA ATGTTACCGA TGAGAATTAT TTGCATTCTT CTGATCTTCT CATGCTTTCT
301 TCTTGCCTTT TCTATGCTTC TGAGATGAGT GAAAAGGGAT TTAAGGTGGT ATTTGGCAAT
361 GTGTCAAGCA TCGTGGCAGT GTGCGTCAAC TTCACCAATT ACGTCCAACA TGCAAGGAA
421 TTTACCCAAC GTTCCTTGGT AGTTGACCAT GTGCGGCTGC TCCATTTTAT GACGCCCGAG
481 ACCATGAGGT GGGCAACTGT TTTAGCCTGT CTTTTTGCCA TTCTGTTGGC AATTGGA

Figure 9

PRRSV-ISU12-orf5-FDAH-Seq

000054

1 ATGTTGGGGA AATGCTTGAC CGCGGGCTGT TGCTCGCAAT TGCTTTTTTT GTGGTGTATC
61 GTGCCGTCTT GTTTTGTTGC GCTCGTCAGC GCCAACGGGA ACAGCAGCTC AAATTTACAG
121 CTGATTTACA ACTTGACGCT ATGTGAGCTG AATGGCACAG ATTGGCTAGC TAATAAATTT
181 GACTGGGCAG TGGAGTGTTT TGTCATTTTT CCTGTGTTGA CTCACATTGT CTCTTATGGT
241 GCCCTCACTA CTAGCCATTT CCTTGACACA GTCGGTCTGG TCACTGTGTC TACCGCTGGG
301 TTTGTTTACG GGCGGTATGT TCTGAGTAGC ATCTACGGG TCTGTGCCCT GGCTGCGTTG
361 ATTTGCTTCG TCATTAGGCT TCGAAGAAT TGCATGTCCT GCGGCTACTC ATGTACCAGA
421 TATACCAACT TTCTTCTGGA CACTAAGGGC AGACTCTATC GTTGGCGGTC GCCTGTCATC
481 ATAGAGAAAA GGGGCAAAGT TGAGGTCGAA GGTCACTGA TCGACCTCAA AAGAGTTGTG
541 CTTGATGGTT CCGCGGCTAC CCCTGTAACC AGAGTTTCAG CGGAACAATG GGGTCGTCCT
601 TAG

Figure 10

000055

PRRSV-ISU12-orf6-FDAH-Seq

```
1 ATGGGGTCGT CCTTAGATGA CTTCTGTCAT GATAGCACGG CTCCACAAAA GGTGCTCTTG
61 GCGTTTTCTA TTACCTACAC GCCAGTGATG ATATATGCCC TAAAGGTGAG TCGCGGCCGA
121 CTGCTAGGGC TTCTGCACCT TTTGATCTTC CTGAATTGTG CTTTCACCTT CGGGTACATG
181 ACATTCGTGC ACTTTCAGAG TACAAATAAG GTCGCGCTCA CTATGGGAGC AGTAGTTGCA
241 CTCCTTTGGG GGGTGTAATC AGCCATAGAA ACCTGGAAAT TCATCACCTC CAGATGCCGT
301 TTGTGCTTGC TAGGCCGCAA GTACATTCTG GCCCTGCCC ACCACGTTGA AAGTGCCGCA
361 GGCTTTCATC CGATTGCGGC AAATGATAAC CACGCATTG TCGTCCGGCG TCCCGGCTCC
421 ACTACGGTCA ACGGCACATT GGTGCCCGGG TAAAAAGCC TCGTGTTGGG TGGCAGAAAA
481 GCTGTAAAC AGGGAGTGGT AAACCTTGTC AAATATGCCA AATAA
```

Figure 11

PRRSV-ISU12-orf7-FDAH-Seq

000056

```
1  ATGCCAAATA ACAACGGCAA GCAGCAGAAG AGAAAGAAGG GGGATGGCCA GCCAGTCAAT
61 CAGCTGTGCC AGATGCTGGG TAAGATCATC GCTCAGCAAA ACCAGTCCAG AGGCAAGGGA
121 CCGGAAAAGA AAAATAAGAA GAAAAACCCG GAGAAGCCCC ATTTCCCTCT AGCGACTGAA
181 GATGATGTCA GACATCACTT TACCCCTAGT GAGCGGCAAT TGTGTCTGTC GTCAATCCAG
241 ACCGCCTTTA ATCAAGGCGC TGGGACTTGC ACCCTGTCAG ATTCAGGGAG GATAAGTTAC
301 ACTGTGGAGT TTAGTTTGCC TACGCATCAT ACTGTGCGCC TGATCCGCGT CACAGCATCA
361 CCCTCAGCAT GA
```

Figure 12

PRRSV-Olot91-orf5-FDAH-seq

000957

```
1 ATGAGATGTT CTCACAAATT GGGGCGTTTC TTGACTCCTC ACTCTTGCTT CTGGTGGCTT
61 TTTTGTCTGT GTACCGGCTT GTCCTGGTCC TTTGTGCTG GCAGCGGCAG CAGCTCGACA
121 TACCAATACA TATATAACTT AACGATATGC GAGCTGAATG GGACCGACTG GTTGTCCAAC
181 CATTTTGATT GGGCAGTCGA GACCTTTGTG CTTTACCCGG TTGCCACTCA TATCCTCTCA
241 CTGGGTTTTT TCACAACAAG CCATTTTTTT GACGCGCTCG GTCTCGGCGC TGTGTCCACT
301 ACAGGATTTG TTGGCGGGCG GTATGTAATC AGCAGCGTGT ACGGCGCTTG TGCTTTCGCA
361 GCGCTCGTAT GTTTTGTCTT CCGTGCTGTT AAAAATTGCA TGGCTTGCCG CTATGCCAC
421 ACCCGGTTTA CCAACTTCAT TGTGGACGAC CGGGGGAGAA TCCATCGGTG GAAGTCTCCA
481 ATAGTGGTAG AGAAATTGGG CAAAGCTGAA GTCGGTGGCG ACCTTGTAC CATCAACAT
541 GTCGTCTCTG AAGGGGTAA AGCTCAACCC TTGACGAGGA CTTCGGCTGA GCAATGGGAA
601 GCCTAG
```

<110> Wyeth
<120> Raccoon Poxvirus Expressing Genes of Porcine Virus
<130> AM102713
<150> 60/932421
<151> 2007-05-30
<160> 12
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 6872
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> plasmid

<400> 1
ttattggaca ctagataatc atcacatggt accacaaaat tatataatgt ataaatgcga 60
aattattaaa cgcaaatatc catgggaaaa cgcgagat acagacgatt ttttacagta 120
tttgagagt tttataggaa gtatatagag tagaaccaga attttgtaaa aataaatcac 180
atttttatac taatatgaaa caactatcga tagttatatt gctactatcg atagtatata 240
caaccaaacc tcactctaca cagatatcaa aaaaactagg cgatgatgct actctatcgt 300
gtaatagaaa caatacacat ggatatcttg tcatgagttc ttgggtataag aaaccagact 360
ccattattct cttagcagcc aaaaacgatg tcgtatactt tgatgattat acagcggata 420
aagtatcata cgattcaccg tatgatactc tagctacaat tattacaatt aaatcattga 480
catctggaga tgcaggtact tatatatgcg cattctttat aacatcaaca aatgatacgg 540
ataaaataga ttatgaagaa ttcgctcgac cgccgcctg cagaagcttg gtaccattta 600
tagcatagaa aaaaacaaaa tgaaattcta ctatatattt acatacatat attctaaata 660
tgaaagtggg gattgtgact agcgtagcat cgcttctaga catctatata ctatatagta 720
ataccaatac tcaagactac gaaactgata caatctctta tcatgtgggt aatgttctcg 780
atgtcgatag ccatatgccc ggtagttgag atatacataa actgatcact aattccaaac 840
ccaccgctt tttatagtaa gtttttcacc cataaataat aaatacaata attaatttct 900
cgtaaaagta gaaaatatat tctaatttat tgcacggtaa ggaagtagaa tcataaagaa 960
cagtacatg gatcccgctg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca 1020
acttaatcgc cttgcagcac atccccctt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccc 1080
caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgct ttgcctgggt 1140
tccggcacca gaagcgggtg cggaagctg gctggagtgc gatcttcctg aggccgatac 1200

AM102713 SEQ LIST.ST25.txt

000058

tgctgctgct	ccctcaaact	ggcagatgca	cggttacgat	gcgcccattct	acaccaacgt	1260
aacctatccc	attacgggtca	atccgccgtt	tgttcccacg	gagaatccga	cgggttgtta	1320
ctcgctcaca	tttaatgttg	atgaaagctg	gctacaggaa	ggccagacgc	gaattatfff	1380
tgatggcggt	aactcggcgt	ttcatctgtg	gtgcaacggg	cgctgggtcg	gttacggcca	1440
ggacagtcgt	ttgccgtctg	aatttgacct	gagcgcattt	ttacgcgccg	gagaaaaccg	1500
cctcgcgggtg	atgggtgctgc	gttgaggatga	cggcagttat	ctggaagatc	aggatatgtg	1560
gcggatgagc	ggcattttcc	gtgacgtctc	gttgctgcat	aaaccgacta	cacaaatcag	1620
cgattttccat	gttgccactc	gctttaatga	tgatttcagc	cgcgctgtac	tggaggctga	1680
agttcagatg	tgccggcaggt	tgctgacta	cctacgggta	acagtttctt	tatggcaggg	1740
tgaaacgcag	gtcgccagcg	gcaccgcgcc	tttcggcggt	gaaattatcg	atgagcgtgg	1800
tggttatgcc	gatcgcgtca	cactacgtct	caaggtcgaa	aaccgcgaaac	tgtggagcgc	1860
cgaaatcccc	aatctctatc	gtgcgggtgt	tgaactgcac	accgccgacg	gcacgctgat	1920
tgaagcagaa	gcctgcgatg	tcggttttccg	cgaggtgcgg	attgaaaatg	gtctgctgct	1980
gctgaacggc	aagccgttgc	tgattcgagg	cgtaaacgt	cacgagcatc	atcctctgca	2040
tggtcagggtc	atggatgagc	agacgatggt	gcaggatatc	ctgctgatga	agcagaacaa	2100
ctttaacgcc	gtgcgctgtt	cgcattatcc	gaaccatccg	ctgtggtaca	cgctgtgcga	2160
ccgctacggc	ctgtatgtgg	tggtatgaagc	caatattgaa	accacggca	tggtgccaat	2220
caatcgtctg	accgatgatc	cgcgctgggt	accggcgatg	agcgaacgcg	taacgcgaat	2280
ggtgcagcgc	gatcgtaatc	accgcagtggt	gatcatctgg	tcgctgggga	atgaatcagg	2340
ccacggcgct	aatcacgacg	cgctgtatcg	ctggatcaaa	tctgtcgatc	cttccccccc	2400
ggtgcagtat	gaaggcgggc	gagccgacac	cacggccacc	gatattatff	gcccgatgta	2460
cgcgcgcggtg	gatgaagacc	agccctttccc	ggctgtgccc	aaatggtcca	tcaaaaaatg	2520
gctttcgcta	cctggagaga	cgcgcccgt	gaccttttgc	gaatacgccc	acgcgatggg	2580
taacagtctt	ggcgggtttcg	ctaaatactg	gcaggcgttt	cgtcagtatc	cccgtttaca	2640
gggcggcttc	gtctgggact	gggtggatca	gtcgctgatt	aaatatgatg	aaaacggcaa	2700
cccgtgggtcg	gcttacggcg	gtgatttttg	cgatacgccg	aacgatcgcc	agttctgtat	2760
gaacgggtctg	gtctttgccc	accgcacgcc	gcatccagcg	ctgacggaag	caaaacacca	2820
gcagcagttt	ttccagttcc	gtttatccgg	gcaaaccatc	gaagtgacca	gcgaatacct	2880
gttccgtcat	agcgataacg	agctcctgca	ctggatgggtg	gcgctggatg	gtaagccgt	2940
ggcaagcggt	gaagtgcctc	tggtatgtcg	tccacaaggt	aaacagttga	ttgaactgcc	3000
tgaactaccg	cagccggaga	gcgcccggca	actctggctc	acagtacgcg	tagtgcaacc	3060

AM102713 SEQ LIST.ST25.txt

gaacgcgacc gcatgggtcag aagccgggca catcagcgcc tggcagcagt ggcgtctggc	3120
ggaaaacctc agtgtgacgc tccccgccgc gtccacgcc atcccgcatc tgaccaccag	3180
cgaatggat ttttgcacg agctgggtaa taagcgttg caatttaacc gccagtcagg	3240
ctttctttca cagatgtgga ttggcgataa aaaacaactg ctgacgccgc tgcgcgatca	3300
gttcacccgt gcaccgctgg ataacgacat tggcgtaagt gaagcgaccc gcattgaccc	3360
taacgcctgg gtcgaacgct ggaaggcggc gggccattac caggccgaag cagcgttggt	3420
gcagtgcacg gcagatacac ttgctgatgc ggtgctgatt acgaccggtc acgcgtggca	3480
gcatcagggg aaaaccttat ttatcagccg gaaaacctac cggattgatg gtagtggtca	3540
aatggcgatt accgttgatg ttgaagtggc gagcgataca ccgcatccgg cgcggattgg	3600
cctgaactgc cagctggcgc aggtagcaga gcgggtaaac tggctcggat tagggccgca	3660
agaaaactat cccgaccgcc ttactgccgc ctgttttgac cgctgggac tgccattgtc	3720
agacatgtat acccgtacg tcttcccag cgaaaacggc ctgcgctgcg ggacgcgcga	3780
attgaattat ggcccacacc agtggcgcgg cgacttcag ttcaacatca gccgtacag	3840
tcaacagcaa ctgatgaaa ccagccatcg ccatctgctg cacgcggaag aaggcacatg	3900
gctgaatata gacggtttcc atatggggat tgggtggcgac gactcctgga gcccgtcagt	3960
atcggcggaa ttccagctga gcgccgttcg ctaccattac cagttggtct ggtgtcaaaa	4020
ataaggatcc tcgataccaa caacggtaga aagtgttaca atatctacta caaaatatac	4080
aactagtac tttatagaga tatttggcat tgtttacta attttattat tggccgtggc	4140
gattttctgt attatatatt atttctgtag tggacggtct cgtaaacaag aaacaaatat	4200
attatagatt ttaactcaga taaatgtctg gaataattaa atctatcgtt ttgagcggac	4260
catctggttc cggcaagaca gctatagtca ggagactctt acaagattat ggaaatatat	4320
ttggatttgt ggtatcccat accactagat ttcctcgtcc tatggaacga gaaggtgtcg	4380
tctaccatta cgttaacaga gaggccattt ggaagggaaat agccgctgga aacttgctag	4440
aacatacaga gtttttggga aatatttatg ggacttctaa aacatccatg aacacagctg	4500
ctattaataa tcgtatatgt gttatggatt taaacattga cggagttagg agtcttaaaa	4560
acacatactt gatgccttac tctgtttata taagacctac atctcttaaa atggtagaaa	4620
ctgcatgccc tgatgcggtg ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc acaccgcata	4680
tgggtgcactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcatagt taagccagcc ccgacacccg	4740
ccaacacccg ctgacgcgcc ctgacgggt tgtctgctcc cggcatccgc ttacagacaa	4800
gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc	4860
gcgagacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat gataataatg	4920
gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta	4980

tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcagtagac aataaccctg ataaatgctt	5040
caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc	5100
ttttttgcgg ctttttgctt tcctgttttt gctcaccag aaacgctggt gaaagtaaaa	5160
gatgctgaag atcagttggg tgcacgagt gggtacatcg aactggatct caacagcgg	5220
aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt	5280
ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc	5340
atacactatt ctcaaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg	5400
gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taactctgcg	5460
gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt ttgcacaac	5520
atgggggatc atgtaactcg ctttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca	5580
aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta	5640
actggcgaac tacttactct agcttcccg caacaattaa tagactggat ggaggcggat	5700
aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa	5760
tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag	5820
ccctcccgtg tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat	5880
agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt	5940
tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctagggtg	6000
aagatccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga	6060
gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta	6120
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa	6180
gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact	6240
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca	6300
tacctcgctc tgctaatacct gttaccagt gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt	6360
accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg	6420
ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag	6480
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggta	6540
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat	6600
ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg	6660
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc	6720
ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac	6780
cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc	6840

gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagagc tc

6872

<210> 2
<211> 5508
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> plasmid

<400> 2

gagctcataa atagtaaacc gatagtgtat aaagattgtg caatgctttt gcgatcaata	60
aatggatcac aaccagtatc tgttgacgat gttcttcgca gatgatgatt ctttttttaa	120
atatttagct agtcaagacg atgaatcttc attatccgat atattgcaaa ttaccaata	180
tcttgatttt ttattgttgt tattgataca gtcaaaaaat aaactagagg ctgtaggtca	240
ttgttatgaa tctctttcgg aggaatatag acaattggcg aaatttacag aactcaaga	300
gtttaaaaaa ctatttaata aggttcctat tgctacagac ggacgcgta aacttaataa	360
agggatatta ttgtactttg ttgtcagtat gatgagattt aaaaaagagt catctataat	420
accaaacata gatccggttc gatacataga tcctcgtcga gatatagtat tttctaact	480
aatggatata ttaaagtcta ataaagtga caataattaa atttttattg tcacctagga	540
attcgtcgac gcggccgcct gcagaagctt ggtaccattt atattccaaa aaaaaaaat	600
aaaatttcaa tttttacata catatattct aaatatgaaa gtggtgattg tgactagcgt	660
agcatcgctt ctagacatct atatactata tagtaatacc aatactcaag actacgaaac	720
tgatacaatc tcttatcatg tgggtaatgt tctcgaatgc gatagccata tgcccggtag	780
ttgcgatata cataaactga tcaactaattc caaaccacc cgctttttat agtaagtttt	840
tcaccataa ataataaata caataattaa tttctcgtaa aagtagaaaa tatattctaa	900
tttattgcac ggtaaggaag tagaatcata aagaacagtg acatggatcc ggtccgtcct	960
gtagaaacc caaccgtga aatcaaaaaa ctcgacggcc tgtgggcatt cagtctggat	1020
cgcgaaaact gtggaattga tcagcgttgg tgggaaagcg cggtacaaga aagccgggca	1080
attgctgtgc caggcagttt taacgatcag ttcgccgatg cagatattcg taattatgcg	1140
ggcaacgtct ggtatcagcg cgaagtcttt ataccgaaag gttgggcagg ccagcgtatc	1200
gtgctgcgtt tcgatgcggt cactcattac ggcaaagtgt gggtaataa tcaggaagtg	1260
atggagcatc agggcggtta tacgccattt gaagccgatg tcacgccgta tgttattgcc	1320
gggaaaagtg tacgtatcac cgtttgtgtg aacaacgaac tgaactggca gactatccccg	1380
ccgggaatgg tgattaccga cgaaaacggc aagaaaaagc agtcttactt ccatgatttc	1440
tttaactatg ccggaatcca tcgcagcgta atgctctaca ccacgccgaa cacctgggtg	1500
gacgatatca ccgtggtgac gcatgtcgcg caagactgta accacgcgtc tgttgactgg	1560

caggtggtgg ccaatggtga tgtcagcggt gaactgctg atgcggatca acaggtggtt	1620
gcaactggac aaggcactag cgggactttg caagtgggtga atccgcacct ctggcaaccg	1680
ggtgaagggtt atctctatga actgtgctgc acagccaaaa gccagacaga gtgtgatatc	1740
tacccgcttc gcgtcggcat ccggtcagtg gcagtgaagg gccaacagtt cctgattaac	1800
cacaaaccgt tctactttac tggctttggt cgtcatgaag atgcggactt acgtggcaaa	1860
ggattcgata acgtgctgat ggtgcacgac cacgcattaa tggactggat tggggccaac	1920
tcctaccgta cctcgcatta cccttacgct gaagagatgc tcgactgggc agatgaacat	1980
ggcatcgtgg tgattgatga aactgctgct gtcggctttt cgctctcttt aggcatgtgt	2040
ttcgaagcgg gcaacaagcc gaaagaactg tacagcgaag aggcagtcaa cggggaaact	2100
cagcaagcgc acttacaggc gattaaagag ctgatagcgc gtgacaaaaa ccaccaagc	2160
gtggtgatgt ggagtattgc caacgaaccg gatacccgtc cgcaagggtc acgggaatat	2220
ttcgcgccac tggcggaagc aacgcgtaaa ctcgaccgca cgcgtccgat cacctgcgtc	2280
aatgtaatgt tctgcgacgc tcacaccgat accatcagcg atctctttga tgtgctgtgc	2340
ctgaaccgtt attacggatg gtatgtccaa agcggcgatt tggaaacggc agagaaggta	2400
ctggaaaaag aacttctggc ctggcaggag aaactgcac agccgattat catcaccgaa	2460
tacggcgtgg atacgttagc cgggctgcac tcaatgtaca ccgacatgtg gagtgaagag	2520
tatcagtgtg catggctgga tatgtatcac cgcgtctttg atcgcgtcag cgccgtcgtc	2580
ggtgaacagg tatggaattt cgccgatttt gcgacctgc aaggcatatt gcgcgttggc	2640
ggtaacaaga aagggatctt cactcgcgac cgaaaccga agtcggcggc ttttctgctg	2700
caaaaacgct ggactggcat gaacttcggt gaaaaaccgc agcagggagg caaacaatga	2760
ggatccggaa atggtagtaa aactgacagc ggtatgtatg aaatgcttta aagaggcgtc	2820
gttttctaaa cgtttgggaa cggaaccga gatcgaaata attggtgggtg aagatatgta	2880
tcaatccgta tgcagaaagt gttacatcaa cgaatgataa tttttctata aaaaactaaa	2940
aataaacatt gattaaattt taatataata cttaaaaatg gatgttgtgt cactggataa	3000
accgtttatg ttttttgagg aaatagataa tgaactagaa tacgaaccag aaagtgcaaa	3060
tgaggttgct aaaaaacttc catatcaggg acaattaaaa ctattactag gagaattgtt	3120
ttttcttagt aagctacaga gacacggtat attggacggt gccactgtag tgtatatagg	3180
atcggctcct ggtacacaca tacgttatct acgtgatcat ttctataatt taggggtaat	3240
catcaaatgg atgctaattg acgggcatgc cctgatgcgg tattttctcc ttacgcacct	3300
gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata	3360
gttaagccag ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct	3420

000064

AM102713 SEQ LIST.ST25.txt

cccgcatcc gcttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagagggt	3480
ttcaccgtca tcaccgaaac gcgcgagacg aaagggcctc gtgatacgcc tttttttata	3540
ggttaatgtc atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt	3600
gcgcggaacc cctatttggt ttttttctta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag	3660
acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca	3720
tttccgtgtc gcccttattc ctttttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc	3780
agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat	3840
cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc	3900
aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg tggcgcggtg ttatcccgtg ttgacgccgg	3960
gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc	4020
agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat	4080
aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga	4140
gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc	4200
ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc	4260
aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt	4320
aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc	4380
tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgg gtatcattgc	4440
agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca	4500
ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca	4560
ttggtaactg tcagaccaag ttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt	4620
ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta	4680
acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg	4740
agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc	4800
ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag	4860
cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa	4920
gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc	4980
cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc	5040
gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta	5100
caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag	5160
aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct	5220
tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga	5280
gcgtcgatth ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc	5340

000065

AM102713 SEQ LIST.ST25.txt

ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttcctgcgtt 5400
atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg 5460
cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaaga 5508

<210> 3
<211> 6820
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> plasmid

<400> 3
ttattggaca ctagataatc atcacatgtt accacaaaat tatataatgt ataaatgcga 60
aattattaaa cgcaaatatc catgggaaaa cgcgcagtat acagacgatt ttttacagta 120
tttgagaggt tttataggaa gtatatagag tagaaccaga attttgtaaa aataaatcac 180
atttttatac taatatgaaa caactatcga tagttatatt gctactatcg atagtatata 240
caaccaaacc tcctcctaca cagatatcaa aaaaactagg cgatgatgct actctatcgt 300
gtaatagaaa caatacacat ggatatcttg tcatgagttc ttggtataag aaaccagact 360
ccattattct cttagcagcc aaaaacgatg tcgtatactt tgatgattat acagcggata 420
aagtatcata cgattcaccg tatgatactc tagctacaat tattacaatt aaatcattga 480
catctggaga tgcaggtact tatatatgcg cattctttat aacatcaaca aatgatacgg 540
ataaaataga ttatgaagaa ttcgtcgacg cggccgcctg cagaagcttg gtaccatggg 600
tattttatatt ccaaaaaaaaa aaaataaaat ttcaattttt gctctagaca tctatatact 660
atatagtaat accaatactc aagactacga aactgataca atctcttatt atgtgggtaa 720
tgttctcgat gtcgatagcc atatgcccgg tagttgcgat atacataaac tgatcactaa 780
ttccaaaccc acccgctttt tatagtaagt ttttcacca taaataataa atacaataat 840
taatttctcg taaaagtaga aaatatattc taatttattg cacggtagg aagtagaatc 900
ataaagaaca gtgacatgga tcccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc 960
gttaccacac ttaatcgctt tgcagcacat ccccctttcg ccagctggcg taatagcgaa 1020
gaggcccgca ccgatcgccc ttcccaacag ttgvcagcc tgaatggcg atggcgcttt 1080
gcctggtttc cggcaccaga agcggtgccg gaaagctggc tggagtgcga tcttcctgag 1140
gccgatactg tcgtcgtccc ctcaaactgg cagatgcacg gttacgatgc gcccatctac 1200
accaacgtaa cctatcccat tacggtcaat ccgccgtttg ttcccacgga gaatccgacg 1260
ggttgttact cgctcacatt taatgttgat gaaagctggc tacaggaagg ccagacgcga 1320
attatTTTTG atggcgtaa ctcggcgttt catctgtggg gcaacgggcg ctgggtcggg 1380

000066

AM102713 SEQ LIST.ST25.txt

tacggccagg	acagtcgttt	gccgtctgaa	tttgacctga	gcgcattttt	acgcgccgga	1440
gaaaaccgcc	tcgcggtgat	ggtgctgcgt	tggagtgcgc	gcagttatct	ggaagatcag	1500
gatatgtggc	ggatgagcgg	cattttccgt	gacgtctcgt	tgctgcataa	accgactaca	1560
caaatcagcg	atttccatgt	tgccactcgc	tttaatgatg	atttcagccg	cgctgtactg	1620
gaggctgaag	ttcagatgtg	cggcgagttg	cgtgactacc	tacgggtaac	agttttcttta	1680
tggcaggggtg	aaacgcaggt	cgccagcggc	accgcgcctt	tcggcggtga	aattatcgat	1740
gagcgtgggtg	gttatgccga	tcgcgtcaca	ctacgtctca	aggtcgaaaa	cccgaactg	1800
tggagcgccg	aaatcccgaa	tctctatcgt	gcggtggttg	aactgcacac	cgccgacggc	1860
acgctgattg	aagcagaagc	ctgcgatgtc	ggtttccgcg	aggtgcggat	tgaaaatggt	1920
ctgctgctgc	tgaacggcaa	gccgttgctg	attcgaggcg	ttaaccgtca	cgagcatcat	1980
cctctgcatg	gtcaggtcat	ggatgagcag	acgatggtgc	aggatatcct	gctgatgaag	2040
cagaacaact	ttaacgccgt	gcgctgttcg	cattatccga	accatccgct	gtggtacacg	2100
ctgtgcgacc	gctacggcct	gtatgtgggtg	gatgaagcca	atattgaaac	ccacggcatg	2160
gtgccaatca	atcgtctgac	cgatgatccg	cgctggctac	cggcgatgag	cgaacgcgta	2220
acgcgaatgg	tgcagcgcca	tcgtaatcac	ccgagtgtga	tcattctggtc	gctggggaat	2280
gaatcaggcc	acggcgctaa	tcacgacgcg	ctgtatcgct	ggatcaaata	tgctgatcct	2340
tcccgcccgg	tgcagtatga	aggcggcgga	gccgacacca	cggccaccga	tattatttgc	2400
ccgatgtacg	cgcgctgga	tgaagaccag	cccttcccgg	ctgtgccgaa	atggtccatc	2460
aaaaaatggc	tttcgtacc	tggagagacg	cgcccgtga	tcctttgcga	atacgcccac	2520
gcgatgggta	acagtcttgg	cggtttcgct	aaatactggc	aggcgtttcg	tcagtatccc	2580
cgtttacagg	gcggcttcgt	ctgggactgg	gtggatcagt	cgctgattaa	atatgatgaa	2640
aacggcaacc	cgtggctcgg	ttacggcggg	gattttggcg	atacgccgaa	cgatcgccag	2700
ttctgtatga	acggtctggt	ctttgccgac	cgacgcgcgc	atccagcgct	gacggaagca	2760
aaacaccagc	agcagttttt	ccagttccgt	ttatccgggc	aaaccatcga	agtgaccagc	2820
gaatacctgt	tccgtcatag	cgataacgag	ctcctgcact	ggatggtggc	gctggatggt	2880
aagccgctgg	caagcgggtga	agtgccctctg	gatgtcgctc	cacaaggtaa	acagttgatt	2940
gaactgcctg	aactaccgca	gccggagagc	gccgggcaac	tctggctcac	agtacgcgta	3000
gtgcaaccga	acgcgaccgc	atggtcagaa	gccgggcaca	tcagcgccctg	gcagcagtgg	3060
cgtctggcgg	aaaacctcag	tgtgacgctc	cccgcgcgct	cccacgccat	cccgcactctg	3120
accaccagcg	aatggatttt	ttgcatcgag	ctgggtaata	agcgttggca	atttaaccgc	3180
cagtcaggct	ttctttcaca	gatgtggatt	ggcgataaaa	aacaactgct	gacgccgctg	3240
cgcgatcagt	tcacccgtgc	accgctggat	aacgacattg	gcgtaagtga	agcgacccgc	3300

AM102713 SEQ LIST.ST25.txt

attgacccta	acgcctgggt	cgaacgctgg	aaggcggcgg	gccattacca	ggccgaagca	3360
gcgttggtgc	agtgacggc	agatacactt	gctgatgcgg	tgctgattac	gaccggtcac	3420
gcgtggcagc	atcaggggaa	aaccttattt	atcagccgga	aaacctaccg	gattgatggt	3480
agtggcctaaa	tggcgattac	cgttgatgtt	gaagtggcga	gcgatacacc	gcatccggcg	3540
cggattggcc	tgaactgcc	gctggcgag	gtagcagagc	gggtaaactg	gctcggatta	3600
gggccgcaag	aaaactatcc	cgaccgcctt	actgccgcct	gttttgaccg	ctgggatctg	3660
ccattgtcag	acatgtatac	cccgtacgtc	ttcccagagc	aaaacggtct	gcgctgcggg	3720
acgcgcgaat	tgaattatgg	cccacaccag	tggcgcgggc	acttccagtt	caacatcagc	3780
cgctacagtc	aacagcaact	gatggaaacc	agccatcgcc	atctgctgca	cgcggaagaa	3840
ggcacatggc	tgaatatcga	cggtttccat	atggggattg	gtggcgacga	ctcctggagc	3900
ccgtcagtat	cggcggaatt	ccagctgagc	gccgttcgct	accattacca	gttggctctg	3960
tgtcaaaaat	aaggatcctc	gataccaaca	acggtagaaa	gtgttacaat	atctactaca	4020
aaatatacaa	ctagtgactt	tatagagata	tttggcattg	tttactaat	tttattattg	4080
gccgtggcga	ttttctgtat	tatatattat	ttctgtagtg	gacggtctcg	taaacaagaa	4140
acaaatatat	tatagatttt	aactcagata	aatgtctgga	ataattaaat	ctatcgtttt	4200
gagcggacca	tctgggtccg	gcaagacagc	tatagtcagg	agactcttac	aagattatgg	4260
aaatataatt	ggatttgtgg	tatcccatac	cactagattt	cctcgtccta	tggaacgaga	4320
agggtgctgc	taccattacg	ttaacagaga	ggccatttgg	aagggaatag	ccgctggaaa	4380
cttgctagaa	catacagagt	ttttgggaaa	tatttatggg	acttctaaaa	catccatgaa	4440
cacagctgct	attaataatc	gtatatgtgt	tatggattta	aacattgacg	gagttaggag	4500
tcttaaaaac	acatacttga	tgccttactc	tgtttatata	agacctacat	ctcttaaaat	4560
ggtagaaaact	gcatgccctg	atgcggtatt	ttctccttac	gcatctgtgc	ggtatttcac	4620
accgcatatg	gtgcactctc	agtacaatct	gctctgatgc	cgcatagtta	agccagcccc	4680
gacacccgcc	aacacccgct	gacgcgccct	gacgggcttg	tctgctcccg	gcatccgctt	4740
acagacaagc	tgtgaccgtc	tccgggagct	gcatgtgtca	gaggttttca	ccgtcatcac	4800
cgaaacgcgc	gagacgaaag	ggcctcgtga	tacgcctatt	tttatagggt	aatgtcatga	4860
taataatggg	ttcttagacg	tcagggtggc	cttttcgggg	aaatgtgcgc	ggaacccta	4920
tttgtttatt	tttctaaata	cattcaaata	tgtatccgct	catgagacaa	taaccctgat	4980
aaatgcttca	ataatattga	aaaaggaaga	gtatgagtat	tcaacatttc	cggtgtcgccc	5040
ttattccctt	ttttgcggca	ttttgccttc	ctgtttttgc	tcaccagaa	acgctggtga	5100
aagtaaaaga	tgctgaagat	cagttgggtg	cacgagtggg	ttacatcgaa	ctggatctca	5160

000068

AM102713 SEQ LIST.ST25.txt

acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg tttccaatg atgagcactt	5220
ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg	5280
gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc	5340
atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata	5400
acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt	5460
tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag	5520
ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca	5580
aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccgga acaattaata gactggatgg	5640
aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcgccct tccggctggc tggtttattg	5700
ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag	5760
atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg	5820
aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag	5880
accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga	5940
tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt gagttttcgt	6000
tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc	6060
tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttg	6120
cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaaactg cttcagcaga gcgcagatac	6180
caaatactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac	6240
cgctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt	6300
cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct	6360
gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat	6420
acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt	6480
atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgacagag ggagcttcca ggggaaacg	6540
cctggtatct ttatagtcct gtcgggttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt	6600
gatgctcgtc agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt	6660
tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttcttcc tcggttatcc cctgattctg	6720
tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg	6780
agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagagctc	6820

<210> 4
 <211> 8373
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>

<223> plasmid

<400> 4

ttattggaca ctagataatc atcacatggt accacaaaat tatataatgt ataaatgcga	60
aattattaaa cgcaaatac catgggaaaa cgcgagat acagacgatt ttttacagta	120
tttggagagt tttataggaa gtatatagag tagaaccaga attttgtaaa aataaatcac	180
atTTTTtatac taatatgaaa caactatcga tagttatatt gctactatcg atagtatata	240
caaccaaacc tcatcctaca cagatatcaa aaaaactagg cgatgatgct actctatcgt	300
gtaatagaaa caatacacat ggatatcttg tcatgagttc ttggtataag aaaccagact	360
ccattattct cttagcagcc aaaaacgatg tcgtatactt tgatgattat acagcggata	420
aagtatcata cgattcaccg tatgatactc tagctacaat tattacaatt aaatcattga	480
catctggaga tgcaggtact tatatatgcy cattctttat aacatcaaca aatgatacgg	540
ataaaataga ttatgaagaa ttcgtcgact cacagtccgg tctcaccccc gctcttgat	600
gattcccatg aagatatgat cttcccgctt tggggagtga ctgacacctc cctccctgtc	660
cctctgagat tgtgttgtgt aggttccgat cgattgactc ttctccagca tgtcatcagg	720
aaaattatca acatcaaggc agtcagggcc cctgcactca gtaatacata cttccccag	780
ttcgggagac ccaagtcaac tcctgagatc cgttcgtgca catcggaag gtgaacttca	840
acaaaatcct cagcctcgtc accgttcttg aaaacggtag acgggtctgc cagggggtgc	900
ataaggggga taaccgagga taccaacaac tccatatgtt gctggaggag ggatgattgc	960
atctctggga ttaagacatt gccgtcaggt cctaataatta taccattgaa aaataccccg	1020
tttacatgag gatgacacct ccccccaact cttaaaccac cttttgaagg gatgatctca	1080
ttccaagttc tgactgactt gtagtgagca tcggcttcca tcaaggctct gttgaatatg	1140
gtatatgctt ttccaaaccc agggacaagt tttcttaaag gactgagacg tctgaaactc	1200
actgacttgg tggatcatgat ggactctagt gcatccagac actcctctct cttcttgacc	1260
aactcctcta caacaagggt ctcaatttcg tctgagcgaa agtcgtgcaa attgatcaac	1320
tgaccgggag ggcaccattt ggtttcattt gatgtttgca tcgagacca tgttccatcc	1380
ataagtctaa gtccgagaac tccacataac tggagtttgc atgctccttt taaagactta	1440
tataggcctc tttcatctac aaagccgcaa gtctcactcc ctttgatgc tctcttcct	1500
ctactattgg taaaaatgtc acaagacatc cctagtctcg gattctcggg catccaaatg	1560
gtgtaatcgt ggttagtgga gcagtaggta gaagacaccg ctactcctga gcacttcccg	1620
ccagggaaga ccctcgagtg aagggatctg tcatatgggt ccaaactctgc cacacttgga	1680
gatatgataa cgagagactc cttggtgggt ttacagttc gaagccagtg gtagtcaggg	1740
tacggattgt gtagagactc ttcatatctg gggtcaccgg ccatcttcca gttgtacgcg	1800

AM102713 SEQ LIST.ST25.txt

gctctacatg catctggtgt tgggcggaaa tgctttcitt tgaacgtggt tgtgacataa	1860
ccaacgaagt tagtgtaggt ttacagcctcc gtcacaacgc ctgtgcaagt gaacccgttc	1920
atTTTTatgg ctgagatgta tccaacttta agttccatgt aggagaaccc tgacaggttg	1980
gtgcatcctt cgtcctccac taccaaattg tttgggcagc tgagggtgatg tatgtcaatc	2040
gggctccagg gaccaagctt gtctggtatc gtgtaaatag ggaatttccc aaaacacaat	2100
ggaaaaacca gaaggggtac aaacaggaga gcctgaggaa ccggtaccat gggtatTTat	2160
attccaaaaa aaaaaataa aatttcaatt tttgctctag acatctatat actatatagt	2220
aataccaata ctcaagacta cgaaactgat acaatctctt atcatgtggg taatgttctc	2280
gatgtcgata gccatatgcc cggtagttgc gatatacata aactgatcac taattccaaa	2340
cccacccgct ttttatagta agtttttcac ccataaataa taaatacaat aattaatttc	2400
tcgtaaaagt agaaaatata ttctaattta ttgcacggta aggaagtaga atcataaaga	2460
acagtgacat ggatcccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacc	2520
aacttaatcg ccttgagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc	2580
gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc tttgcctggt	2640
ttccggcacc agaagcgggt ccggaaagct ggctggagtg cgatcttcct gaggccgata	2700
ctgtcgtcgt cccctcaaac tggcagatgc acggttacga tgcgcccac tacaccaacg	2760
taacctatcc cattacggtc aatccgccgt ttgttcccac ggagaatccg acgggttgtt	2820
actcgtcac atttaatgtt gatgaaagct ggctacagga aggccagacg cgaattatTT	2880
ttgatggcgt taactcggcg tttcatctgt ggtgcaacgg gcgctgggtc ggttacggcc	2940
aggacagtcg tttgccgtct gaatttgacc tgagcgcatt tttacgcgcc ggagaaaacc	3000
gcctcgcggt gatggtgctg cgttgagtg acggcagtta tctggaagat caggatatgt	3060
ggcggatgag cggcattttc cgtgacgtct cgttgctgca taaaccgact acacaaatca	3120
gcgatttcca tgttgccact cgctttaatg atgatttcag ccgcgctgta ctggaggctg	3180
aagttcagat gtgcggcgag ttgcgtgact acctacgggt aacagtttct ttatggcagg	3240
gtgaaacgca ggtcgccagc ggcaccgcgc ctttcggcgg tgaaattatc gatgagcgtg	3300
gtggttatgc cgatcgcgtc aactacgtc tcaaggctga aaacccgaaa ctgtggagcg	3360
ccgaaatccc gaatctctat cgtgcggtgg ttgaactgca caccgccgac ggcacgctga	3420
ttgaagcaga agcctgcgat gtcggtttcc gcgaggtgcg gattgaaaat ggtctgctgc	3480
tgctgaacgg caagccgttg ctgattcgag gcgttaaccg tcacgagcat catcctctgc	3540
atggtcaggt catggatgag cagacgatgg tgcaggatat cctgctgatg aagcagaaca	3600
actttaacgc cgtgcgctgt tcgcattatc cgaaccatcc gctgtggtac acgctgtgcg	3660
accgctacgg cctgtatgtg gtggatgaag ccaatattga aaccacggc atggtgccaa	3720

000071

AM102713 SEQ LIST.ST25.txt

tcaatcgtct	gaccgatgat	ccgcgctggc	taccggcgat	gagcgaacgc	gtaacgcgaa	3780
tggtgcagcg	cgatcgtaat	cacccgagtg	tgatcatctg	gtcgtgggg	aatgaatcag	3840
gccacggcgc	taatcacgac	gcgctgtatc	gctggatcaa	atctgtcgat	ccttccccgcc	3900
cggtgcagta	tgaaggcggc	ggagccgaca	ccacggccac	cgatattatt	tgcccgatgt	3960
acgcgcgcgt	ggatgaagac	cagcccttcc	cggctgtgcc	gaaatgggcc	atcaaaaaat	4020
ggctttcgtc	acctggagag	acgcgcccgc	tgatcctttg	cgaatacgcc	cacgcgatgg	4080
gtaacagtct	tggcggtttc	gctaaatact	ggcaggcggt	tcgtcagtat	ccccgtttac	4140
agggcggtt	cgtctgggac	tgggtggatc	agtcgtgat	taaatatgat	gaaaacggca	4200
accctgggtc	ggcttacggc	ggtgattttg	gcgatacgcc	gaacgatcgc	cagttctgta	4260
tgaacggtct	ggtctttgcc	gaccgcacgc	cgcattccagc	gctgacggaa	gcaaaacacc	4320
agcagcagtt	tttccagttc	cgtttatccg	ggcaaaccat	cgaagtgacc	agcgaatacc	4380
tgttccgtca	tagcgataac	gagctcctgc	actggatggg	ggcgtggat	ggtaagccgc	4440
tggcaagcgg	tgaagtgcct	ctggatgtcg	ctccacaagg	taaacagttg	attgaactgc	4500
ctgaactacc	gcagccggag	agcgcggggc	aactctggct	cacagtacgc	gtagtgaac	4560
cgaacgcgac	cgcatgggtca	gaagccgggc	acatcagcgc	ctggcagcag	tggcgtctgg	4620
cggaaaacct	cagtgtgacg	ctccccgccg	cgtcccacgc	catccccgat	ctgaccacca	4680
gcgaaatgga	tttttgcac	gagctgggta	ataagcgttg	gcaatttaac	cgccagtcag	4740
gctttctttc	acagatgtgg	attggcgata	aaaaacaact	gctgacgccg	ctgcgcgatc	4800
agttcacccg	tgcaccgctg	gataacgaca	ttggcgtaag	tgaagcgacc	cgcattgacc	4860
ctaacgcctg	ggtcgaacgc	tgggaaggcg	cgggccatta	ccaggccgaa	gcagcgttgt	4920
tgcagtgcac	ggcagataca	cttgctgatg	cgggtgtgat	tacgaccggt	cacgcgtggc	4980
agcatcaggg	gaaaacctta	tttatcagcc	ggaaaacctta	ccggattgat	ggtagtggtc	5040
aaatggcgat	taccgttgat	gttgaagtgg	cgagcgatac	accgcatccg	gcgcggattg	5100
gcctgaactg	ccagctggcg	caggtagcag	agcgggtaaa	ctggctcgga	ttagggccgc	5160
aagaaaacta	tcccgaccgc	cttactgccg	cctgttttga	ccgctgggat	ctgccattgt	5220
cagacatgta	taccccgctac	gtcttcccg	gcgaaaacgg	tctgcgctgc	gggacgcgcg	5280
aattgaatta	tggcccacac	cagtggcgcg	gcgacttcca	gttcaacatc	agccgctaca	5340
gtcaacagca	actgatggaa	accagccatc	gccatctgct	gcacgcggaa	gaaggcacat	5400
ggctgaatat	cgacggtttc	catatgggga	ttggtggcga	cgactcctgg	agcccgtcag	5460
tatcggcgga	attccagctg	agcgcggttc	gctaccatta	ccagttggtc	tgggtgtcaa	5520
aataaggatc	ctcgatacca	acaacggtag	aaagtgttac	aatatctact	acaaaatata	5580

000072

AM102713 SEQ LIST.ST25.txt

caactagtga ctttatagag atatttggca ttgtttcact aattttatta ttggccgtgg	5640
cgattttctg tattatatat tattttctgta gtggacggtc tcgtaaaca gaaacaaata	5700
tattatagat ttttaactcag ataaatgtct ggaataatta aatctatcgt tttagcgga	5760
ccatctgggt ccggaagac agctatagtc aggagactct tacaagatta tggaaatata	5820
tttggatttg tggatccca taccactaga ttctctcgtc ctatggaacg agaagggtgc	5880
gtctaccatt acgttaacag agaggccatt tggaagggaa tagccgctgg aaacttgcta	5940
gaacatacag agtttttggg aaatatttat gggacttcta aaacatccat gaacacagct	6000
gctattaata atcgtatatg tgttatggat ttaaacattg acggagttag gagtcttaaa	6060
aacacatact tgatgcctta ctctgtttat ataagacct catctcttaa aatggtagaa	6120
actgcatgcc ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtatct cacaccgcat	6180
atggtgcact ctcatgaca tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc	6240
gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca	6300
agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagagggtt tcaccgtcat caccgaaacg	6360
cgcgagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat	6420
ggtttcttag acgtcagggt gcacttttct gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttggtt	6480
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct	6540
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc	6600
cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa	6660
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg	6720
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaagt	6780
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg	6840
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa agcatcttac	6900
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactgtc	6960
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaa	7020
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc	7080
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt	7140
aactggcgaa ctacttactc tagcttccc gcaacaatta atagactgga tggaggcgga	7200
taaagttgca ggaccattc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa	7260
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gactggggc cagatggtaa	7320
gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa	7380
tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggttaactgt cagaccaagt	7440
ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctagggt	7500

gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 7560
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgctg 7620
aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca 7680
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 7740
tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 7800
atacctcgct ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 7860
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 7920
gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 7980
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 8040
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 8100
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 8160
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 8220
cttttgctgg ctttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 8280
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 8340
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagag ctc 8373

<210> 5
<211> 702
<212> DNA
<213> Porcine circovirus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(702)
<223> Porcine circovirus type 2A ORF2

<400> 5
atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccattcttggc 60
cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc caccgccgcc accgctaccg ttggagaagg 120
aaaaatggca ttttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctacc 180
acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaattattga cgactttggt 240
ccccggggag gggggaccaa caaatctct ataccctttg aatactacag aataagaaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgatagggg agtgggctcc 360
actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgaccca 420
tatgtaaact actcctccc ccatacaatc cccaaccct tctcctacca ctcccgttac 480
ttcacacca aacctgttct tgactccacc attgattact tccaaccaa taacaaaagg 540
aatcagcttt ggatgaggct acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600

AM102713 SEQ LIST.ST25.txt

gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccct aa 702

<210> 6
<211> 702
<212> DNA
<213> Porcine circovirus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(702)
<223> Porcine circovirus type 2B ORF2

<400> 6
atgacgtatc caaggaggcg ttaccgaaga agaagacacc gcccccgag ccatcttggc 60
cagatcctcc gccgccgccc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caagcgaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat tcaatattaa tgactttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccccgtct gtgccctttg aatactacag aataagaaaag 300
gttaaggttg aattctggcc ctgctccccg atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
agtgtgttta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctcac ctatgacccc 420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata accagccct tctcctacca ctcccgttac 480
tttaccacca aacctgtcct agattccact attgattact tccaaccaa caacaaaaga 540
aaccagctgt ggctgagact acaaactgct ggaaatgtag accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaattttta agacccccca cttaaccctt aa 702

<210> 7
<211> 765
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(765)
<223> Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus strain ISU12 ORF3

<400> 7
atggctaata gctgtacatt cctccatatt ttctctgtt gcagcttctt gtactctttt 60
tgttgtgctg tggttgcggg ttccaatgct acgtactgtt tttggtttcc gctggtagg 120
ggcaattttt ctttcgaact cacggtgaac tacacggtgt gcccgccttg cctcaccggg 180
caagcagccg cagaggccta cgaacccggt aggtcccttt ggtgcaggat agggcatgat 240

AM102713 SEQ LIST.ST25.txt

cgatgtgggg aggacgatca tgatgaacta gggtttgtgg tgccgcctgg cctctccagc 300
gaaggccact tgaccagtgc ttacgcctgg ttggcggtcc tgccttcag ctatacggcc 360
cagttccatc ccgagatatt cgggataggg aatgtgagtc gagtctatgt tgacatcaag 420
caccaattca tttgcgctgt tcatgatggg cagaacacca ccttgcccca ccatgacaac 480
atttcagccg tgtttcagac ctattaccag catcaggtcg acggcgcaa ttggtttcac 540
ctagaatggc tgcgtccctt cttttcctct tggttggttt taaatgtctc ttggtttctc 600
aggcgttcgc ctgcaagcca tgtttcagtt cgagtctttc agacatcaag accaacacca 660
ccgcagcggc aggctttgct gtcctccaag acatcagttg ccttaggcat cgcaactcgg 720
cctctgaggc gattcgcaaa gtccctcagt gccgcacggc gatag 765

<210> 8
<211> 537
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(537)
<223> Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus strain ISU12 ORF4

<400> 8
atggctgcgt cccttctttt cctcttggtt ggttttaaata gtctcttggt ttctcaggcg 60
ttcgctgca agccatgttt cagttcgagt ctttcagaca tcaagaccaa caccaccgca 120
gcggcaggct ttgctgtcct ccaagacatc agttgcctta ggcatcgcaa ctcggcctct 180
gaggcgattc gcaaagtccc tcagtgccgc acggcgatag ggacaccctg gtatatcact 240
gtcacagcca atgttaccga tgagaattat ttgcattcct ctgatcttct catgctttct 300
tcttgctttt tctatgcttc tgagatgagt gaaaagggat ttaagggtgt atttggcaat 360
gtgtcaggca tcgtggcagt gtgcgtcaac ttcaccagtt acgtccaaca tgtcaaggaa 420
tttaccacaa gttccttggt agttgaccat gtgcggctgc tccatttcat gacgcccag 480
accatgaggt gggcaactgt tttagcctgt ctttttgcca ttctgttggc aatttga 537

<210> 9
<211> 603
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(603)
<223> Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus strain ISU12 ORF5

<400> 9
atgttgggga aatgcttgac cgcgggctgt tgctcgcaat tgcttttttt gtggtgtatc 60
gtgccgtctt gttttgttgc gctcgtcagc gccaacggga acagcagctc aaattttacag 120
ctgatttaca acttgacgct atgtgagctg aatggcacag attggctagc taataaatTT 180
gactgggagc tggagtgttt tgtcattttt cctgtgttga ctcacattgt ctcttatggt 240
gccctcacta ctagccattt ccttgacaca gtcgggtctg tcaactgtgtc taccgctggg 300
tttgttcacg ggcggtatgt tctgagtagc atctacgagg tctgtgccct ggctgcgttg 360
atTTgcttcg tcattaggct tgcgaagaat tgcattgtcct ggcgctactc atgtaccaga 420
tataccaact ttcttctgga cactaagggc agactctatc gttggcggtc gcctgtcatc 480
atagagaaaa ggggcaaagt tgaggtcgaa ggTcacctga tcgacctcaa aagagttgtg 540
cttgatgggt ccgcggtac cctgttaacc agagtttcag cggaacaatg gggtcgtcct 600
tag 603

<210> 10
<211> 525
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(525)
<223> Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus starin ISU12 ORF6

<400> 10
atgggggtcgt ccttagatga cttctgtcat gatagcacgg ctccacaaaa ggtgctcttg 60
gcgttttcta ttacctacac gccagtgatg atatatgcc taaagggtgag tcgcggccga 120
ctgctagggc ttctgcacct ttTgatcttc ctgaattgtg ctttcacctt cgggtacatg 180
acattcgtgc actttcagag tacaataaag gtcgcgctca ctatgggagc agtagttgca 240
ctcctttggg ggggtgtactc agccatagaa acctggaaat tcatcacctc cagatgccgt 300
ttgtgcttgc taggccgcaa gtacattctg gcccctgccc accacgttga aagtgccgca 360
ggctttcatc cgattgcggc aaatgataac cacgcatttg tcgtccggcg tcccggctcc 420
actacggtca acggcacatt ggtgcccggg ttaaaaagcc tcgtgttggg tggcagaaaa 480
gctgttaaac agggagtggg aaaccttgct aaatatgcc aataa 525

<210> 11
<211> 372
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(372)
<223> Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus strain ISU12
ORF7

<400> 11
atgccaaata acaacggcaa gcagcagaag agaaagaagg gggatggcca gccagtcaat 60
cagctgtgcc agatgctggg taagatcatc gctcagcaaa accagtccag aggcaaggga 120
ccgggaaaga aaaataagaa gaaaaacccg gagaagcccc atttccctct agcgactgaa 180
gatgatgtca gacatcactt tacccttagt gagcggcaat tgtgtctgtc gtcaatccag 240
accgccttta atcaaggcgc tgggacttgc accctgtcag attcagggag gataagttac 300
actgtggagt ttagtttgcc tacgcatcat actgtgcgcc tgatccgcgt cacagcatca 360
ccctcagcat ga 372

<210> 12
<211> 606
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(606)
<223> Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus strain Olot91
ORF5

<400> 12
atgagatgtt ctcacaaatt ggggcgtttc ttgactcctc actcttgctt ctggtggctt 60
tttttgcgtg gtaccggctt gtcctggtcc tttgtcgtg gcagcggcag cagctcgaca 120
taccaatata tatataactt aacgatatgc gagctgaatg ggaccgactg gttgtccaac 180
cattttgatt gggcagtcga gacctttgtg ctttaccggg ttgccactca taccctctca 240
ctgggttttc tcacaacaag ccattttttt gacgcgctcg gtctcggcgc tgtgtccact 300
acaggatttg ttggcgggcg gtatgtactc agcagcgtgt acggcgcttg tgctttcgca 360
gcgctcgat gttttgtcat ccgtgctgtt aaaaattgca tggcttgccg ctatgcccac 420
accgggttta ccaacttcat tgtggacgac cgggggagaa tccatcgggtg gaagtctcca 480
atagtggtag agaaattggg caaagctgaa gtcggtggcg accttgtcac catcaaacad 540
gtcgtcctcg aaggggttaa agctcaaccc ttgacgagga cttcggctga gcaatgggaa 600
gcctag 606

POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se relaciona con un nuevo vector de poxvirus recombinante de mapache que expresa los genes del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) solo o en combinación con el circovirus porcino (PCV) y su uso como una vacuna en la profilaxis de la enfermedad causada por PCV y/o PRRSV.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

 El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) es un virus de ARN de cadena positiva, un miembro de la familia Arteriviridae, género
15 Arterivirus. El PRRSV infecta cerdos, originando la "Enfermedad Porcina Misteriosa" que se detectó inicialmente en 1987 en Norte América, luego la enfermedad se esparció a través de Europa en 1990. Desde 1990, el PRRSV se ha vuelto una de las principales amenazas globales a la industria porcina, ocasionando fuertes pérdidas de producción en las manadas de cerdos.

20

 Ahora conocida como Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), la Enfermedad Porcina Misteriosa (también denominada enfermedad del Oído Azul, Síndrome de Aborto y Respiratorio Epidémico Porcino (PEARS) o Síndrome Respiratorio (SIRS)) se caracteriza por la falla reproductiva de las
25 cerdas embarazadas que da como resultado un número anormalmente alto de abortos durante la última fase de gestación, anorexia, muerte fetal, fetos momificados, problemas respiratorios por post-parto y lechones débiles que mueren poco después del nacimiento de enfermedad respiratoria o infecciones secundarias. En los lechones, la infección con PRRSV origina afecciones
30 respiratorias y una tasa alta de mortalidad que puede alcanzar tanto como el 70% de mortalidad en lechones o más. Los cerdos más viejos pueden mostrar signos

leves de enfermedad respiratoria o infecciones secundarias. El virus se esparce rápidamente en las poblaciones porcinas, y hasta el 95% de los cerdos en una manada se pueden volver sero-positivos a los dos a tres meses después de la infección inicial. Aún si las infecciones se estabilizan, existe una alta probabilidad de que el esparcimiento del PRRSV por las excretas de las cerdas hembra jóvenes infectará las cerdas embarazadas y volverán a ocurrir los problemas reproductivos. El impacto económico del PRRS en las manadas de cultivos de cerdo es considerable.

10 Aislado primero en Holanda como la causa de la Enfermedad Porcina Misteriosa, el PRRSV se identificó como el virus Lelystad (LV) (G. Wesvoort *et al.*, Vet. Quarterly 3:121-130 (1991)). Poco después, un diferente aislado Olot se encontró en España (Plana *et al.*, Vet. Microbiol., 33:203.211, 1992). Posteriormente, nuevos aislados de PRRSV se han descrito en varias
15 publicaciones (ver, por ejemplo, solicitud EP No. 0 529 584 A2, WO 93/06211 y WO 93/07898).

Publicaciones adicionales revelaron las características estructurales de los aislados de virus PRRS tal como el genoma del virus Lelystad (LV) completo
20 (J.J.M. Meulenberg *et al.*, "Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV," Virology 192: 62-72 (1993)); un segmento del genoma del aislado del virus (TV) PRRS de Tubingen (Alemania) (K-K. Cozelmann *et al.*, "Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the Arterivirus group," Virology 193: 329-339 (1993)) y otros aislados, permitiéndole a los genes
25 ser clonados y secuenciados.

Los viriones del arterivirus, en general, son de 50-70 nm de diámetro y contienen un nucleocápsido isomérico (probablemente icosaédrico), de 35 nm
30 de diámetro, circundado por una cubierta cercanamente adherente con estructuras de superficie similares a panales. El genoma consiste de una

molécula única de sentido positivo lineal, ssARN, de 13 a 15 kb en tamaño. El virus PRRS tiene un tamaño de 50-60 nm, con una cubierta de aproximadamente 30-35 nm contenida en el nucleocápsido, y una molécula de ARN única. El ARN genómico del PRRSV es aproximadamente 15 kb (15000 pares base). El genoma
5 codifica la ARN replicasa (ORF1a y ORF1b), las glicoproteínas GP2 a GP5, la proteína de membrana integral M, y la proteína de nucleocápsido N (los ORF 2 a 7). El ARN genómico se sintetiza por vía del intermedio replicativo de sentido negativo de longitud completa.

10 La molécula de ARN de cadena única del genoma del PRRSV contiene una cola de poli-A en el extremo 3'. La estructura contiene siete cuadros de lectura abiertos (ORF) que codifican las proteínas virales. Del ORF1 al ORF7 muestran pequeños segmentos traslapantes entre ellos. La síntesis de las proteínas virales se produce de un grupo de transcriptos subgenómicos de
15 diferente longitud (mARN), pero de un extremo poliadenilado 3' similar, y la secuencia líder 5' que se origina de la secuencia del extremo 5' no codificante. Esta forma de expresión de proteína viral es considerada como los mARN anidado y se han descrito previamente para coronavirus (W. J. m. Spaan *et al.*, J. Gen. Virol. 69:2939-2952 (1988)). Con base en la secuencia de nucleótido del
20 aislado viral de PRRSV Lelystad (LV) y Tubingen (TV), y por homología con lo que se había observado con otros arterivirus, se ha propuesto que en el genoma viral, el ORF1 (a y b) codifiquen para polimerasa y replicasa viral. Del ORF2 al ORF6 codifican las proteínas de cubierta viral, y el ORF7 codifica la proteína de nucleocápsido. La replicasa y polimerasa viral son proteínas de gran tamaño, 260
25 y 163 kDa respectivamente, y ambas contienen tres posibles sitios de glicosilación posibles. Las proteínas de cubierta (los ORF 2 a 6) localizados en el extremo 3' son pequeños, entre 30 y 19 kDa. Todos ellos contienen más de dos posibles sitios de glicosilación, especialmente el ORF3 que contiene 7 sitios. Todas esas proteínas contienen secuencias hidrófobas en los extremos
30 terminales amino (N-) y carboxi (C-) que podrían trabajar como la secuencia líder y el ancla de membrana. Generalmente, ellas son proteínas hidrófobas, de

acuerdo con su localización asociada a una membrana. El ORF 6 tiene 3 segmentos hidrófobos localizados dentro de los 90 residuos de aminoácido en el extremo N-terminal. La proteína codificada por ORF7, que posiblemente corresponde al nucleocápsido viral, es extremadamente básica con los residuos de arginina, lisina e histidina en el extremo N-terminal. Las secuencias de aminoácido de la polimerasa viral LV y TV, las proteínas estructurales y el nucleocápsido muestran una identidad de entre el 29% y el 67% en comparación con el virus LDV, y entre el 20% y 36% en comparación con el virus EAV.

La enfermedad originada por el PRRSV es responsable por pérdidas severas en la industria global de cerdos. Por esta razón, se han realizado investigaciones que han desarrollado vacunas capaces de evitar la infección originada por el PRRSV. La base para el desarrollo de la vacuna más vieja es el hecho de que el PRRSV crece en los macrófagos alveolares primarios de las células anfitrionas (el cerdo) y en las líneas celulares del riñón de mono. En gran parte, las vacunas anteriores contra PRRSV, que se han descrito en la WO 92/21375, WO 93/06211, WO 93/07898 y ES P9301973, son vacunas convencionales obtenidas de los virus que crecen sobre macrófagos y posteriormente inactivados. Las vacunas se describen como siendo capaces de evitar el Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) y evitar alteraciones reproductivas en cerdas.

También de significado mayor al bienestar de los cerdos es otra enfermedad ampliamente difundida denominada Síndrome de Desmedro Multisistémico Post-destete (PMWS). El PMWS, que afecta típicamente lechones destetados entre alrededor de 5-18 semanas de edad, posee una amenaza para la salud habitual o potencial para los lechones en proporciones epidémicas e impacta seriamente el interés económico de la industria porcina global. Los signos clínicos del PMWS consisten de pérdida de peso progresiva, disnea, taquipnea, anemia, diarrea e ictericia. Aunque más prevalente en lechones destetados, la enfermedad debilitante puede afectar a cualquier animal de la

familia porcina que incluye cerdos, porcinos y cerdos adultos. La tasa de mortalidad puede variar desde el 1% al 2%, y hasta el 40% en algunos casos complicados en todo el mundo. El circovirus porcino tipo 2 (comúnmente denominado como PCV-2) se ha identificado como el principal agente causante de PMWS (G. M. Alian *et al.*, "Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes," Vet. Rec., Vol. 142, páginas 467-468, 1998; G. M. Alian *et al.*, "Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe," J. Vet. Diagn. Invest., Vol. 10, páginas 3-10, 1998). Es una meta crítica dentro del negocio comercial de cerdos, por lo tanto, evitar brotes de PMWS en la familia de cerdos a través del desarrollo de una vacuna efectiva contra PCV2, el agente etiológico del PMWS, como un objetivo para la vacunación en masa de animales en riesgo.

La Patente Estadounidense No. 6,217,883, que corresponde a la Patente francesa No. 2,781,159B, se relaciona con cinco cepas PCV aisladas de muestras pulmonares o ganglionares tomadas de cerdos infectados con PMWS en Canadá, California y Francia y su uso en combinación con por lo menos un antígeno de parvovirus porcino en composiciones inmunogénicas multivalentes. Las proteínas codificadas por los cuadros de lectura abiertos (ORF) PCV2 que consisten de ORF1 a ORF13 se describen ampliamente en la patente pero no existe ejemplo de ninguna proteína específica que exhiba propiedades inmunogénicas. La patente describe vectores que consisten de plásmidos de ADN, moléculas de ADN lineales y los virus recombinantes que contienen y expresan *in vivo* una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno PCV.

25

La patente de los Estados Unidos No. 6,368,601 se relaciona con nuevas cepas de circovirus porcino aisladas de las muestras pulmonares o ganglionares obtenidas de las fincas afectadas por el Síndrome de Desmedro Multisistémico Post-destete (PMWS). En particular, la patente describe preparaciones purificadas de estas cepas, vacunas atenuadas o inactivadas convencionales, vacunas vivas recombinantes, vacunas de plásmido y vacunas sub-unitarias, así

30

como también reactivos y métodos de diagnóstico. La patente además describe un vector que comprende las secuencias de la molécula de ADN aislado que se pueden utilizar para la producción de subunidades en un vector de expresión *in vitro* o como secuencias que se van a integrar en un vector de expresión *in vivo* tipo virus o plásmido. La patente describe ampliamente su vector como el de un herpes virus de cerdo, un adenovirus porcino o un poxvirus y, más particularmente, un virus de la enfermedad de Aujeszky, el virus vaccinia, el virus de viruela aviar o el virus de viruela porcina.

10 Previamente, ciertos genes del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) (ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7) se han expresado en diferentes sistemas de vector; Baculovirus, virus de Pseudorabia, TGEV y ADN de plásmido. Todos estos sistemas de expresión están limitados por ser capaces de expresar solamente uno o dos cuadros de lectura abiertos en una construcción viral.

20 Por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 5,888,513 se relaciona con proteínas recombinantes del virus causante del Síndrome Reprodutor y Respiratorio Porcino (PRRS), que corresponde del ORF2 al ORF7 del aislado Español PRRSV (PRRS-Olot), que se ha producido en el sistema de expresión de baculovirus utilizando cultivos de célula Sf9 (células de insectos *Spodoptera frugiperda*) como un anfitrión permisivo. La patente describe las proteínas recombinantes como adecuadas para la formulación de vacunas capaces de proteger los rebaños porcinos del PRRS y para la preparación de kits de diagnóstico para la detección de los anticuerpos anti-PRRSV así como también del PRRSV en una muestra biológica de cerdo. Específicamente, la patente se relaciona con un sistema de expresión recombinante que comprende un baculovirus recombinante y un método para expresar las proteínas subunitarias virales aisladas entre por lo menos una secuencia de nucleótido aislada seleccionada del grupo que consiste de ORF2 a ORF7 del aislado PRRS-Olot de un vector de transferencia de baculovirus. La patente también describe una

vacuna recombinante que contiene por lo menos una proteína PRRSV recombinante.

Existe una cantidad significativa de información publicada sobre el tema del poxvirus recombinante de mapache para la expresión de antígenos porcinos y el uso como vacunas. Por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 6,294,176 describe un vector de poxvirus recombinante de mapache (RCNV) que suministra la inserción de una o más secuencias de ADN extraño de los cuadros de lectura abiertos (los ORF) del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), hemaglutinina del virus de la influenza de cerdos (SIV HA), neuraminidasa del virus de la influenza de cerdos (SIV NA) y parvovirus porcino (PPV), tal como uno del ORF2-7 del PRRSV, en una región no esencial dentro de la región genómica *HindIII* "U", la región genómica *HindIII* "M" o la región genómica *HindIII* "N" del genoma de poxvirus de mapache. El genoma viral del poxvirus de mapache se describe en la patente por contener una supresión en el gen con rango de huésped del poxvirus de mapache del genoma viral. La patente suministra un vector de homología para producir el poxvirus recombinante de mapache al insertar la secuencia de ADN extraña en el genoma de poxvirus de mapache. En los ejemplos, la patente solamente muestra cómo preparar la inserción del ADN extraño en la región genómica *HindIII* "U". El análisis de la secuencia de ADN indica que la región genómica *HindIII* "U" descrita por los propietarios de la patente no es la inserción de hemaglutinina (*ha*) y/o las regiones de timidina quinasa (*tk*) del genoma de poxvirus recombinante de mapache.

25

La Patente Estadounidense No. 7,109,025 describe vectores virales y vacunas que utilizan los adenovirus recombinantes porcinos. En particular, la patente describe un adenovirus porcino replicante y recombinante *in vivo* que comprende una secuencia de nucleótido heteróloga insertada en el adenovirus porcino bajo condiciones que le posibilitan posteriormente ser replicados *in vivo* y expresar la secuencia de nucleótido heteróloga insertada. La patente describe

30

además utilizar un genoma de adenovirus del serotipo 3 o 5 del adenovirus porcino (PAV) (PAV-3 o PAV-5) e insertar la secuencia de nucleótido heteróloga que codifica por lo menos un producto en una zona no esencial de la región E3 del genoma PAV-3 o PAV-5 localizada corriente abajo del promotor tardío mayor (MLP). La patente también se relaciona con un fragmento de ADN que comprende todo o parte de la secuencia de nucleótido referenciada. El vector PAV recombinante se muestra por expresar un agente patógeno porcino seleccionado del grupo que consiste de virus de pseudorabia, virus de la influenza de cerdos, virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, virus parvovirus, Virus de Cólera de Cerdos, circovirus porcino tipo 2, Actinobacillus pleuropneumoniae y Micoplasma hyopneumoniae.

La Patente Estadounidense Número 6,497,883 trata con el uso de un poxvirus recombinante, tal como el virus de viruela aviar, que contiene un ADN extraño del circovirus porcino tipo 2 junto con los métodos para tratar o evitar la enfermedad originada por el circovirus porcino tipo 2. Específicamente, el poxvirus recombinante de la patente comprende una molécula de ADN aislada que consiste de los ORF1 a 13 del circovirus porcino tipo 2, en donde el poxvirus recombinante es un virus de viruela de canario ALVAC recombinante.

La Patente Estadounidense Número 7,211,379 se relaciona con un método para reducir la carga viral del circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) en un cerdo al incluir una respuesta inmune contra PCV-2 a través de la administración de una composición inmunogénica que comprende un antígeno PCV-2. La patente describe el antígeno como un vector que contiene una secuencia de nucleótido PCV-2 exógena, en donde la secuencia de nucleótido PCV-2 codifica y expresa ORF4, ORF13, u ORF4 y ORF13. En algunas modalidades mostradas en la patente, la composición inmunogénica incluye uno o más de los patógenos de cerdo adicionales. La composición utilizada en el método descrito en la patente comprende adicionalmente por lo menos un inmunógeno proveniente de por lo menos un patógeno de cerdo adicional o un vector que expresa tal inmunógeno

en el cual el patógeno de cerdo adicional se selecciona del grupo que consiste de PRRS, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, rinitis atrófica, pseudorabia, cólera de cerdos, influenza de cerdos, virus de la encefalomiocarditis, y PPV. Los vectores descritos en la
5 patente comprenden un plásmido de vector de ADN, una bacteria tal como una *E. coli*, un virus tal como baculovirus, un herpesvirus que incluye los virus herpes del cerdo o un virus de la enfermedad de Aujeszky (pseudorabia), un adenovirus que incluye un adenovirus porcino, y un poxvirus que incluye un virus vaccinia, un virus de viruela aviar, un virus de viruela de canario, un virus de viruela de
10 mapache y de viruela de cerdo.

Las descripciones de la Patente Estadounidense Número 6,241,989 y su Patente Estadounidense continuación Número 7,087,234 que tratan con los poxvirus recombinantes multivalentes de mapache, que contienen más de un gen
15 exógeno insertado en el gen de timidina quinasa o el gen de hemaglutinina. Se describe en estas dos patentes relacionadas el uso de los poxvirus recombinantes multivalentes de mapache como vacunas para inmunizar felinos contra la posterior exposición a patógenos de felino. También se describe un
20 método para elaborar un poxvirus recombinante multivalente de mapache mediante un proceso recombinante que involucra la construcción de un vector de inserción en el cual se insertan los genes exógenos; y flanqueando los genes insertados están las secuencias que se pueden recombinar en el gen de la timidina quinasa de poxvirus de mapache o el gen de la hemaglutinina; introduciendo tanto el vector de inserción que contiene los genes exógenos,
25 como el poxvirus de mapache en las células anfitrionas susceptibles; y seleccionando el poxvirus recombinante de mapache de las placas resultantes. El poxvirus recombinante multivalente de mapache de las patentes puede infectar y replicarse en células de felino, y contiene más de un gen exógeno insertado en un región que consiste de un gen de hemaglutinina o un gen de timidina quinasa
30 del genoma de poxvirus de mapache que no es esencial para la replicación viral, notoriamente en donde los genes exógenos están operablemente ligados a un

promotor para la expresión; y cada gen exógeno codifica un antígeno de patógeno de felino. Las patentes describen genes exógenos que codifican los antígenos de patógeno de felino tales como el virus de la leucemia felina (FeLV Env), el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV Gag), el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV Env), el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV M), el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV N), el calicivirus felino (proteína de cápsido FCV), el virus de la panleucopenia felina (FPV PV2) y la rabia G. A pesar de todos los esfuerzos hechos en la técnica de vacuna veterinaria, subsiste aún una necesidad reconocida en la técnica por una vacuna recombinante PCV y/o PRRSV monovalente o multivalente segura y efectiva que protegería adecuadamente a los cerdos de ser infectados con el virus o los virus. También es necesario un método seguro y efectivo para la prevención de la infección o enfermedad originada por PCV y/o PRRSV a través de la administración de una vacuna recombinante que pueda dar una respuesta inmune protectora adecuada en un cerdo contra PMWS y/o PRRS. Además de la seguridad y eficacia luego de la administración a los cerdos, se lograrán otros beneficios con las vacunas PRRSV convencionales, inactivadas mediante la vacuna recombinante que elimina el riesgo de una infección accidental del virus libre o del virus inactivado que se revierte a su estado patógeno. Es claro que el desarrollo de una vacuna porcina vectorizada de poxvirus de mapache segura y efectiva daría como resultado importantes ventajas en el uso para evitar serias enfermedades de los cerdos, para asegurar la seguridad de los empleados durante la producción de la vacuna y para eliminar completamente cualquier cambio de los virus patógenos que sobrevivan la inactivación y los procedimientos de descontaminación utilizados en la producción comercial.

Todas las patentes y publicaciones citadas en esta especificación se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

RESUMEN DE LA INVENCION

000088

En su aspecto más amplio, la invención suministra una vacuna de vector recombinante de poxvirus segura y efectiva en la cual el vector expresa una o
5 más de las proteínas antigénicas codificadas por uno o más de los aislados de virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), preferiblemente las proteínas antigénicas codificadas mediante cuadros de lectura abiertos múltiples de uno o más aislados de virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), solo o en combinación con una o más de los cuadros de
10 lectura abiertos del circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) en los sitios *ha* y/o *tk*. En una modalidad particular, el vector comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica la glicoproteína del virus de la leucemia felina que lleva el fenotipo FeLV P27⁺. El gen del cápsido FeLV P27⁺ o PCV-2 es útil como un marcador único para seleccionar los clones en diferentes combinaciones. Esta
15 invención también suministra un método para proteger cerdos contra el Síndrome de Desmedro Multisistémico Post-destete y/o el Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino al administrar la nueva vacuna recombinante potente a los cerdos necesitados de la protección.

20 De acuerdo con esto, un primer aspecto de la invención suministra un vector de poxvirus recombinante de mapache (**rRCNV**) que comprende una o más moléculas de ácido nucleico exógeno que codifican una proteína del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), en donde:

- 25 a) por lo menos una molécula de ácido nucleico se inserta en el sitio de la hemaglutinina o en el sitio de la timidina quinasa del genoma del poxvirus de mapache; o
- b) por lo menos dos moléculas de ácido nucleico se insertan en el sitio de la hemaglutinina o en el sitio de la timidina quinasa del genoma del
30 poxvirus de mapache; o

- c) por lo menos una molécula de ácido nucleico se inserta en el sitio de la hemaglutinina y por lo menos una molécula de ácido nucleico se inserta en el sitio de la timidina quinasa del genoma del poxvirus de mapache; o

5

En una modalidad, el vector de poxvirus de mapache comprende por lo menos dos moléculas de ácido nucleico que se insertan en el sitio de la hemaglutinina y por lo menos dos moléculas de ácido nucleico que se insertan en el sitio de la timidina quinasa del genoma de poxvirus de mapache,

10

En una modalidad, el vector de poxvirus de mapache comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) que se inserta en un tercer sitio no esencial del genoma de poxvirus de mapache además de los sitios de la timidina quinasa y la hemaglutinina del genoma de poxvirus de mapache. Cualquier sitio

15 no esencial del genoma de poxvirus recombinante de mapache se puede contemplar para uso en la invención.

En una modalidad, el tercer sitio no esencial del genoma de poxvirus de

20 mapache es el sitio inhibidor de la serina proteasa.

En una modalidad, cada una de una o más moléculas de ácido nucleico exógenas codifican uno o más cuadros de lectura abiertos de un virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino. Los cuadros de lectura abiertos se

25 seleccionan del grupo que consiste de ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 y una combinación de éstos.

En una modalidad, el vector de poxvirus codifica por lo menos dos copias de la misma proteína del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.

30 Las dos copias de la misma proteína se pueden codificar mediante dos moléculas diferentes de ácido nucleico, o se pueden codificar por la misma molécula de

ácido nucleico. Las dos copias de la misma proteína pueden estar operablemente ligadas a un promotor, o las dos copias de la misma proteína pueden estar operablemente ligadas a promotores separados. Las dos copias de la misma proteína se codifican por un cuadro de lectura abierto del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino seleccionado del grupo que consiste de ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 y una combinación de éstos.

En una modalidad, las dos o más moléculas de ácido nucleico se insertan en el sitio de la hemaglutinina y/o el sitio de la timidina quinasa del genoma de poxvirus de mapache.

10

En una modalidad, las dos moléculas de ácido nucleico exógenas codifican por lo menos dos cuadros de lectura abiertos del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino seleccionado del grupo que consiste de ORF5-ORF6, ORF5-ORF6-ORF7, ORF3-ORF5-ORF6, ORF3-ORF4-ORF7, ORF3-ORF4-ORF5-ORF7, ORF3-ORF4-ORF6-ORF7, y ORF3-ORF4-ORF5-ORF6-ORF7.

15

En una modalidad, el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino es el ISU12 (Iowa), Olot/91 (Español) o ambos.

20

En una modalidad, el vector de poxvirus recombinante de mapache comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica un cuadro de lectura abierto (ORF) del circovirus porcino tipo 2 (PCV2).

25

En una modalidad, el cuadro de lectura abierto del circovirus porcino 2 es el ORF2.

En una modalidad, el PCV2 ORF2 se puede insertar separadamente en el sitio de la timidina quinasa del genoma de poxvirus de mapache.

000091

En una modalidad, el vector del poxvirus recombinante de mapache comprende además una secuencia de nucleótido que codifica una glicoproteína del fenotipo P27* del virus de leucemia felina.

5 En una modalidad, el poxvirus de mapache está vivo y es replicable.

Un segundo aspecto de la invención suministra una vacuna recombinante porcina que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de uno cualquiera o más de los vectores de poxvirus recombinantes de mapache
10 descritos aquí, y, opcionalmente, un vehículo, diluyente o adyuvante adecuado.

En una modalidad, la vacuna recombinante porcina comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de dos o más de los vectores de poxvirus recombinantes de mapache como se describen aquí, y, opcionalmente, un
15 vehículo o diluyente adecuado.

En una modalidad, el poxvirus de mapache está vivo y es replicable.

En una modalidad, la vacuna está libre de adyuvante.
20

En una modalidad, la vacuna se administra como una dosis única o como dosis repetidas.

En una modalidad, la vacuna recombinante porcina comprende además
25 por lo menos un antígeno porcino adicional. El antígeno porcino adicional se selecciona del grupo que consiste del antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae*, el antígeno de *Haemophilus parasuis*, el antígeno de *Pasteurella multocida*, el antígeno de *Streptococcus suis*, el antígeno de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, el antígeno de *Bordetella bronchiseptica*, el antígeno de
30 *Salmonella choleraesuis*, el antígeno de *Erysipelothrix rhusiopathiae*, el antígeno de la bacteria leptospira, el antígeno del virus de la influenza porcina, el

antígeno del parvovirus porcino, el antígeno de *Escherichia coli*, el antígeno del coronavirus respiratorio porcino, el antígeno de rotavirus, un antígeno de un patógeno causante de la Enfermedad de Aujeszky, el antígeno de la Gastroenteritis Transmisible Porcina y una combinación de éstos.

5

Un tercer aspecto de la invención suministra un método para inducir una respuesta inmune contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, que comprende administrar a un animal porcino una vacuna recombinante porcina comprendida de uno o más de los vectores del poxvirus recombinante de mapache como se describió aquí.

10

En una modalidad, la respuesta inmune es una respuesta humoral o mediada por anticuerpo. En una modalidad, la respuesta inmune es una respuesta inmune mediada por célula o mediada por célula T.

15

En una modalidad, la respuesta inmune protectora se induce al administrar una dosis de vacuna que varía desde aproximadamente $4.5 \text{ Log}_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ a aproximadamente $7.5 \text{ Log}_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$.

20

En una modalidad, la vacuna recombinante porcina utilizada para inducir una respuesta inmune comprende uno o más del o los vectores de un poxvirus recombinante de mapache vivos y replicables.

25

En una modalidad, la vacuna recombinante porcina utilizada para inducir una respuesta inmune comprende dos o más vectores de poxvirus recombinante de mapache vivos y replicables.

30

Un cuarto aspecto de la invención suministra un método para evitar el Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino y el Síndrome de Desmedro Multisistémico Post-destete, que comprende administrar a un animal porcino necesitado de protección una vacuna recombinante porcina que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de uno o más del o los vectores de poxvirus

recombinante de mapache como se describió aquí, y opcionalmente, un vehículo, diluyente o adyuvante adecuado.

5 En una modalidad, el o los vectores de poxvirus recombinante de mapache es/son vivos y replicables.

10 Un quinto aspecto de la invención suministra el uso de cualquiera de los vectores o vacunas de la invención para la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmune protectora a un virus porcino en un mamífero, o evitar el Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino y/o el Síndrome de Desmedro Multisistémico Post-destete en un mamífero.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 La Figura 1 es la secuencia de ácido nucleico del plásmido pFD2000A-FDAH (SEQ ID NO: 1)

20 La Figura 2 es la secuencia de ácido nucleico del plásmido pFD2001 TK-FDAH (SEQ ID NO: 2)

La Figura 3 es la secuencia de ácido nucleico del plásmido pFD2003SEL-FDAH (SEQ ID NO: 3)

25 La Figura 4 es la secuencia de ácido nucleico del plásmido pFD20003SEL-GPV-PV-FDAH (SEQ ID NO: 4)

La Figura 5 es la secuencia de ácido nucleico del PCV2A ORF2-FDAH (SEQ ID NO: 5)

30 La Figura 6 es la secuencia de ácido nucleico del PCV2B ORF2-FDAH (SEQ ID NO: 6)

La Figura 7 es la secuencia de ácido nucleico del PRRSV ISU12-ORF3-FDAH (SEQ ID NO: 7)

5 La Figura 8 es la secuencia de ácido nucleico del PRRSV ISU12-ORF4-FDAH (SEQ ID NO: 8)

La Figura 9 es la secuencia de ácido nucleico del PRRSV ISU12-ORF5-FDAH (SEQ ID NO: 9)

10

La Figura 10 es la secuencia de ácido nucleico del PRRSV ISU12-ORF6-FDAH (SEQ ID NO: 10)

La Figura 11 es la secuencia de ácido nucleico del PRRSV ISU12-ORF7-FDAH (SEQ ID NO: 11)

15

La Figura 12 es la secuencia de ácido nucleico del PRRSV Olot91-ORF5-FDAH (SEQ ID NO: 12)

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Antes que se describan los presentes métodos y la metodología de tratamiento, se debe entender que esta invención no está limitada a métodos particulares, y a las condiciones experimentales descritas, en razón a que tales métodos y condiciones pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada aquí es para propósitos de describir las modalidades particulares solamente, y no pretende ser limitante, en razón a que el alcance de la presente invención estará solamente limitado en las reivindicaciones finales.

25

30 Como se utiliza en esta especificación y las reivindicaciones finales, las formas singulares "un", "una", y "el" incluyen las referencias plurales a menos que

el contexto claramente dicte otra cosa. Así, por ejemplo, las referencias a “el método” incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo descritas aquí y/o que se volverán evidentes para aquellas personas expertas en la técnica luego de la lectura de esta descripción y así sucesivamente.

5

De acuerdo con esto, en la presente solicitud, se podría emplear biología molecular, microbiología, y técnicas de ADN recombinantes convencionales para el experto. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, Byrd, CM y Hruby, DE, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 269: *Vaccinia Virus and Poxvirology*, Capítulo 3, páginas 31-40; Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (1998) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (aquí “Sambrook et al., 1989”); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); *Transcription And Traslation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986)); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, (1986)), B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

20

Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la invención, se describen ahora los métodos y los materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas aquí se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

25

DEFINICIONES

Los términos utilizados aquí tienen los significados reconocidos y conocidos por aquellos expertos en la técnica, sin embargo, por conveniencia e integridad, los términos particulares y sus significados se establecen adelante.

30

El término "aproximado" significa dentro del 20%, más preferiblemente dentro del 10% y más preferiblemente dentro del 5%.

5 El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que mejora la respuesta inmune a un antígeno. Un adyuvante puede servir como un depósito de tejido que libera lentamente el antígeno y también como un activador del sistema linfático que mejora no específicamente la respuesta inmune (Hood et al., *Immunology, Segunda Ed.*, 1984, Benjamín/Cummings: Menlo Park, California, p.
10 384). Dependiendo de las circunstancias, una exposición primaria con un antígeno solo, en la ausencia de un adyuvante, puede fallar para elicitar una respuesta inmune humoral o celular. Los adyuvantes incluyen, pero no están limitados a, adyuvante de Freund completo, adyuvante de Freund incompleto, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias de
15 superficie activa tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburo, las hemocianinas de lapa ojo de cerradura, dinitrofenol, y potencialmente adyuvantes humanos útiles tales como BCG (*bacille Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Preferiblemente, el adyuvante es farmacéuticamente aceptable.

20

El término "antígeno" se refiere a un compuesto, composición, o sustancia inmunogénica que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de célula T en un animal, que incluye composiciones que se inyectan o absorben en el animal. El término se puede utilizar para referirse a una macromolécula
25 individual o a una población homogénea o heterogénea de macromoléculas antigénicas. Un antígeno reacciona con los productos de inmunidad humoral o celular específicos. El término "antígeno" comprende ampliamente grupos funcionales que incluyen proteínas, polipéptidos, fragmentos de proteína antigénicos, ácidos nucleicos, oligosacáridos, polisacáridos, químicos o
30 composiciones orgánicas o inorgánicas, y similares. adicionalmente, el antígeno se puede derivar u obtener de cualquier virus, bacteria, parásito, protozoo, u

hongos, y puede ser un organismo completo. El término "antígeno" incluye todos los epítomos antigénicos relacionados. De manera similar, un oligonucleótido o polinucleótido, que expresa un antígeno, tal como en las aplicaciones de inmunización de ácido nucleico, también se incluye en la definición. Los
5 antígenos sintéticos también se incluyen, por ejemplo, poliepítomos, epítomos de flaqueo, y otros antígenos recombinantes o sintéticamente derivados (Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777 2781; Bergmann et al. (1996) J. Immunol. 157:3242 3249; Suhrbier, A. (1997) Immunol. y Cell Biol. 75:402 408; Gardner et al. (1998) 12th World AIDS Conference, Geneve, Suiza, Jun. 28 Jul. 3, 1998).

10

"Codificado por" o "que codifica" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de polipéptido, en donde la secuencia de polipéptido contiene una secuencia de aminoácido de por lo menos 3 a 5 aminoácidos, más preferiblemente por lo menos 8 a 10, y aún más
15 preferiblemente por lo menos 15 a 20 aminoácidos, un polipéptido codificado por las secuencias de ácido nucleico. También están comprendidas las secuencias de polipéptido, que son inmunológicamente identificables con un polipéptido codificado por la secuencia. Así, una secuencia de antígeno "polipéptido", "proteína", o "aminoácido" puede tener por lo menos 70% de similitud,
20 preferiblemente por lo menos aproximadamente 80% de similitud, más preferiblemente aproximadamente 90-95% de similitud, y más preferiblemente aproximadamente 99% de similitud, a una secuencia de polipéptido o aminoácido de un antígeno.

25

El término "exógeno" como se utiliza aquí pretende comprender aquello que se produjo, originó, derivó o desarrolló por fuera del genoma de poxvirus de mapache, es decir, originado externamente al genoma de poxvirus tal como, por ejemplo, el material genético obtenido o aislado del PRRSV que se considera extraño al genoma del poxvirus de mapache.

30

Un "gen" como se utiliza en el contexto de la presente invención es una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico (cromosoma, plásmido, etc.) con el cual se asocia una función genética. Un gen es una unidad hereditaria, por ejemplo de un organismo, que comprende una secuencia de polinucleótido (por ejemplo, una secuencia de ADN para mamíferos) que ocupa un sitio físico específico (un "sitio de gen" o "sitio genético") dentro del genoma de un organismo. Un gen puede codificar un producto expresado, tal como un polipéptido o un polinucleótido (por ejemplo, tARN). Alternativamente, un gen puede definir un sitio genómico para un evento/función particular, tal como la unión de proteínas y/o ácidos nucleicos (por ejemplo, sitios de unión de fago), en donde el gen no codifica un producto expresado. Típicamente, un gen incluye secuencias codificantes, tales como secuencias que codifican polipéptido, y secuencias no codificantes, tales como secuencias promotoras, secuencias de poliadenilación, secuencias regulatorias transcripcionales (por ejemplo, secuencias mejoradoras). Muchos genes eucarióticos tienen "exones" (secuencias codificantes) interrumpidas por "intrones" (secuencias no codificantes). En ciertos casos, un gen puede compartir secuencias con otro gen(es) (por ejemplo, genes traslapantes).

Una "respuesta inmune" a un antígeno o composición de vacuna es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmune humoral y/o mediada por célula a moléculas presentes en el antígeno o composición de vacuna de interés. Para los propósitos de la presente invención, una "respuesta inmune humoral" es una respuesta inmune mediada por anticuerpo que involucra la generación de anticuerpos con afinidad para el antígeno/vacuna de la invención, aunque una "respuesta inmune mediada por célula" es aquella mediada por linfocitos T y/u otras células sanguíneas blancas. Una "respuesta inmune mediada por célula" es elicitada por la presentación de los epítopos antigénicos en asocio con las moléculas Clase I o Clase II del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). Este activa las células ayudantes T CD4+ específicas antígeno o las células de linfocito T citotóxicas CD8+ ("CTL"). Los CTL tienen especificidad por los

000099

antígenos de péptido que están presentes en asocio con las proteínas codificadas por el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) y expresadas sobre la superficie de las células. Los CTL ayudan a inducir y promover la destrucción intracelular de los microbios intracelulares, o la lisis de las células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular involucra una respuesta específica de antígeno por las células T ayudantes. Las células T ayudantes actúan para ayudar a estimular la función, y enfocar la actividad de, las células efectoras no específicas contra células que despliegan antígenos de péptido en asocio con moléculas MHC sobre su superficie. Una "respuesta inmune mediada por célula" también se refiere a la producción de citoquinas, quimioquinas y otras de tales moléculas producidas por células T activadas y/u otras células sanguíneas blancas, que incluyen aquellas derivadas de las células T CD4+ y CD8+. La capacidad de un antígeno o composición particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por una célula se puede determinar por un número de ensayos, tal como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, al ensayar para linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado, o por la medición de la producción de citoquina mediante las células T en respuesta a la re-estimulación con el antígeno. Tales ensayos son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Erickson et al., J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376.

Un "ORF inmunogénico" u "orf innunogénico" se refiere a un cuadro de lectura abierto que elicitaba una respuesta inmune.

25

Una "cantidad inmunológicamente efectiva" como se utiliza aquí se refiere a la cantidad de antígeno o vacuna suficiente para elicitaba una respuesta inmune, o una respuesta celular (célula T) o humoral (célula B o anticuerpo), medida mediante ensayos estándar conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, con respecto a la presente invención, una "cantidad inmunológicamente efectiva" es una dosis de protección mínima (título) de ≥ 4.5 a $7.5 \text{ Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$. La

30

efectividad de un antígeno como un inmunoógeno, se puede medir mediante ensayos de proliferación, mediante ensayos citolíticos, tales como ensayos de liberación de cromo para medir la capacidad de una célula T para lisar su célula objetivo específica, o al medir los niveles de actividad de célula B al medir los
5 niveles de anticuerpos circulantes específicos para el antígeno en el suero. Adicionalmente, el nivel de protección de la respuesta inmune se puede medir al exponer el huésped inmunizado con el antígeno que se ha inyectado. Por ejemplo, si el antígeno del cual se desea una respuesta inmune es un virus o una célula tumoral, el nivel de protección inducido por la "cantidad inmunológicamente
10 efectiva" del antígeno se mide al detectar el porcentaje de supervivencia o la mortalidad porcentual después de la exposición al virus o la célula tumoral de los animales.

Como se definió aquí "un sitio no esencial" en el genoma de poxvirus de
15 mapache significa una región en el genoma viral, que no es necesaria para la infección o replicación. Ejemplos de sitios no esenciales en el genoma de poxvirus de mapache incluyen, pero no están limitados a, el sitio de timidina quinasa (TK), el sitio de hemaglutinina (HA) y el sitio inhibidor de serina proteasa. El sitio TK del poxvirus de mapache se describe en C. Lutze-Wallace, M. Sidhu y
20 A. Kappeler, Virus Gnes 10 (1995), pp. 81-84. La secuencia del gen TK del poxvirus de mapache también se puede encontrar en los números de acceso de la PubMed DQ066544 y U08228. El sitio HA del poxvirus de mapache se describe en Cavallaro KF y Esposito, JJ, Virology (1992), 190(1): 434-9. La secuencia del gen HA del poxvirus de mapache también se puede encontrar en el
25 número de acceso de la PubMed AF375116.

El término "molécula de ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" tiene su significado normal para referirse a cadenas largas de nucleótidos repetidos tales como las unidades repetidas de las bases de purina y pirimidina
30 que dirigen el curso de la síntesis de proteína, esto es, ellas codifican y expresan la sustancia de proteína. Tal como se utiliza el término en las reivindicaciones, el

000101

ácido nucleico se refiere a los genes exógenos o extraños conocidos que codifican las proteínas del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, deseablemente, los genes de cuadro de lectura abierto.

- 5 El término "cuadro de lectura abierto" u "ORF", u "orf", como se utiliza aquí, se refiere a la secuencia de nucleótido mínima requerida para codificar una proteína de virus particular sin un codón de detención intercalado.

- 10 "Operablemente ligado" se refiere a un rearmado de elementos en donde los componentes así descritos se configuran con el fin de desarrollar su función usual. Así, un promotor dado que está operablemente ligado a una secuencia codificante (por ejemplo, una secuencia que codifica un antígeno o interés) es capaz de efectuar la expresión de la secuencia codificante cuando las proteínas regulatorias y las enzimas propias están presentes. En algunos casos, ciertos
- 15 elementos de control no necesitan estar contiguos con la secuencia codificante, en tanto ellas funcionen para dirigir la expresión de éstas. Por ejemplo, las secuencias no traducidas intercalantes aún transcritas pueden estar presentes entre la secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora se puede considerar aún "operablemente ligada" a la secuencia codificante. Así,
- 20 una secuencia codificante está "operablemente ligada" a una secuencia de control transcripcional o transduccional en una célula cuando el ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante en el mRNA, que es luego trans-ARN empalmado y traducido en la proteína codificada por la secuencia codificante.

- 25 Los términos "porcino" y "cerdo" se utilizan intercambiamente y se refieren a cualquier animal que sea miembro de la familia Suidae tal como, por ejemplo, un cerdo.

- 30 Una respuesta inmune "protectora" se refiere a la capacidad de una vacuna para elicitación una respuesta inmune, humoral o mediada por célula, que sirve para proteger al mamífero de una infección. La protección suministrada no

necesita ser absoluta, es decir, la infección no necesita ser totalmente evitada o erradicada, si hay una mejora estadísticamente significativa comparada con una población de control de mamíferos porcinos, por ejemplo, animales infectados a los que no se les administró la vacuna. La protección se puede limitar a mitigar la
5 severidad o la rapidez del brote de los síntomas de la infección.

El término "recombinante" como se utiliza aquí simplemente se refiere a las construcciones de poxvirus de mapache que se producen mediante métodos de ingeniería genética estándar.
10

El término "replicable" se refiere a un microorganismo, por ejemplo, un virus tal como el poxvirus de mapache que sea capaz de replicarse, duplicarse o reproducirse en una célula huésped adecuada.

15 Los términos "vacuna" o "composición de vacuna" se utilizan intercambiamente aquí y se refieren a una composición farmacéutica que comprende por lo menos un componente inmunológicamente activo que induce una respuesta inmune en un animal, y/o protege al animal de enfermedades o posible muerte debido a una infección, y puede o no incluir uno o más
20 componentes adicionales que mejoran la actividad inmunológica del componente activo. Una vacuna puede comprender adicionalmente componentes adicionales típicos a las composiciones farmacéuticas.

Un "vector" es una molécula de ADN, capaz de replicación en un
25 organismo huésped, en el cual se inserta un gen para construir una molécula de ADN recombinante.

DESCRIPCIÓN GENERAL

30 De acuerdo con la presente invención, se suministra un vector de poxvirus recombinante único en el cual el vector comprende una o más moléculas de

ácido nucleico exógenas que codifican una proteína del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino. En una modalidad, el vector de poxvirus puede codificar por lo menos dos copias de la misma proteína del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino. Las dos copias de la misma
5 proteína se pueden codificar por dos diferentes moléculas de ácido nucleico o las dos copias de la misma proteína se pueden codificar por la misma molécula de ácido nucleico. Las dos copias de la misma proteína se pueden ligar de manera operable a un promotor o a promotores separados.

10 Las proteínas se pueden codificar mediante un cuadro de lectura abierto tal como ORF1a u ORF1b a ORF7, preferiblemente el ORF5, ORF6 y/o ORF3/ORF4/ORF7, de uno o más de los aislados del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) con o sin uno o más de los cuadros de lectura abiertos tal como ORF1 a ORF13, preferiblemente ORF2, del
15 circovirus de porcino tipo 2 (PCV_29 en el sitio de hemaglutinina (*ha*) y/o timidina quinasa (*tk*), respectivamente. Otro tercer sitio no esencial del genoma de poxvirus para inserción de cualquier molécula de ácido nucleico descrita aquí se el sitio inhibidor de la serina proteasa. En una modalidad particular, las dos o más moléculas de ácido nucleico exógenas codifican dos o más cuadros de lectura
20 abiertos del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino seleccionadas del grupo que consiste de: ORF5-ORF6, ORF5-ORF6-ORF7, ORF3-ORF5-ORF6, ORF3-ORF4-ORF7, ORF3-ORF4-ORF5-ORF7, ORF3-ORF4-ORF6-ORF7, y ORF3-ORF4-ORF5-ORF6-ORF7.

25 También insertado en el sitio *ha* y/o *tk* está el gen que expresa la glicoproteína del virus de la leucemia felina (FeLV) que lleva el fenotipo FeLV P27* (color azul en el ELISA FeLV P27). En estas construcciones, se utiliza el FeLV P27* o PCV-2 ORF2 (gen cápsido) como un marcador único para seleccionar los clones en diferentes combinaciones. Los aislados PRRSV
30 preferidos comprenden las cepas ISU12 (Iowa) y Olot/91 (Español) pero otros

aislados se pueden sustituir fácilmente por las cepas que ilustran la invención en los ejemplos de adelante.

5 El objeto de la presente invención, es por lo tanto, expresar cuatro o más cuadros de lectura abiertos (ORF) de las cepas U.S. y E.U. del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) solo o en combinación con el ORF del circovirus porcino (PCV2) en el sitio de la hemaglutinina (*ha*) y/o la timidina quinasa (*tk*) del genoma de poxvirus de mapache (RCNV) en una construcción viral para elaborar una vacuna potente.

10

Otro objeto de la invención es utilizar un nuevo sistema de selección de clon que utiliza la dilución limitada y método de placa azul a blanco o dilución limitada y ELISA para virus como el marcador de selección diferente de un marcador de selección convencional como *LacZ*.

15

Los anteriores objetivos se logran la proporcionar la vacuna novedosa que comprende un vector del poxvirus de mapache recombinante (rRCNV) en el que los múltiples cuadros de lectura abiertos expresan rRCNV, preferiblemente el ORF5, ORF6 y/o ORF3/ORF4/ORF7, de uno o más aislados PRRSV con o sin un cuadro de lectura abierto, preferiblemente ORF2, de PCV-2 en el sitio de hemaglutinina /*ha*) y/o timidina quinasa (*tk*), respectivamente.

20

Los sistemas de expresión anteriores se han limitado en su capacidad para expresar solo uno o dos de los cuadros de lectura abiertos (ORF) de los genes PRRSV en una construcción viral. La presente invención permite ventajosamente la expresión de cuatro o más ORF de las cepas U.S. y E.U. del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) solo o en combinación con el cuadro de lectura abierto del circovirus porcino tipo 2 (PCV-2). Hasta ahora no se describe en la técnica el sistema de expresión superior de esta invención que permite la inserción de múltiples ORF del PRRSV en el sitio *ha* y/o *tk* y/o sitio del inhibidor de la porteasa serina del genoma de poxvirus de mapache (RCNV) en

25

30

una construcción viral creando por lo tanto una vacuna recombinante potente para proteger a los cerdos contra PRRS.

5 La presente invención utiliza un sistema de selección que usa limitar la dilución y el método de placa azul a blanco o limitar la dilución y un ELISA como un marcador de selección. En forma bastante benéfica, este sistema de selección produce múltiples sitios de expresión en una construcción viral.

10 El poxvirus de mapache (cepa Herman) se aisló primero del tracto respiratorio de mapaches sin síntomas clínicos por Y. F. Herman en Aberdeen, Maryland en 1961-1962 (Y. F. Herman, "Isolation and characterization of a naturally occurring pox virus of raccoons," In: Bacteriol. Proc. 64th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, p. 117 (1964)). En la construcción rRCNV-PRRS de la presente invención, la inserción de los múltiples cuadros de
15 lectura abiertos tal como, por ejemplo, ORF5, ORF6 y/o ORF3/ORF4/ORF7, de una o más cepas de los genes PRRSV en el sitio *ha* y/o *tk* del genoma de poxvirus de mapache (RCNV) atenúa adicionalmente la cepa Herman avirulenta. Ventajosamente, la vacuna PRRSV vectorizada rRCNV de la presente invención también mejora la seguridad del empleado durante la producción de la vacuna y
20 elimina completamente cualquier oportunidad de inactivación por supervivencia del virus patogénico y procedimientos de descontaminación utilizados durante la producción comercial.

25 Se contempla que el avance científico y el método novedoso descrito en la presente invención se pueden aplicar por la persona medianamente versada en la técnica a proteínas antigénicas de múltiples cuadros de lectura obtenidos de las cepas PRRSV diferentes de ISU12 y Olot/91 y se pueden insertar en el sitio *tk* y/o *ha* del vector de poxvirus de mapache para proporcionar una vacuna inmunogénica para la protección contra PRRS. Por ejemplo, otras cepas tal como
30 la cepa Norte Americana VR-2332, la cepa Europea del Virus Lelystad y similares se pueden sustituir fácilmente por las cepas ISU12 y/o Olot/91. En razón a que el

virus de ARN se somete a mutaciones, alternatively, el gen ORF deseado de un nuevo aislado de campo o virus mutante se puede aislar y utilizar en la vacuna recombinante de la invención. No obstante, hay alta homología entre varios mutantes y numerosos aislados del PRRSV encontrados hasta la fecha y, así, la
5 utilización de ciertos cuadros de lectura abiertos tal como el ORF5 u ORF6 en la construcción de vacuna de la invención tiene la ventaja de ser significativamente efectivo contra PRRS. Para aquellos aislados con menor homología de aproximadamente 40%, la ventaja práctica de la construcción de la invención es que se puede acomodar fácilmente a las proteínas antigénicas de varios ORF a
10 partir de múltiples fuentes virales para proporcionar una vacuna eficaz, de amplio espectro. Tal prevención del PRRS a través de un programa de inoculación exitoso de lechones es de extrema importancia para la industria porcina que no hay tratamiento efectivo a largo plazo para la enfermedad.

15 Se contempla adicionalmente que el vector de poxvirus útil en la invención puede comprender, pero no se limita a, el poxvirus de mapache, el virus de la viruela del canario, el virus de la viruela aviar, el virus de la viruela porcina, el virus vaccínea y similares pero de forma deseable se emplea el poxvirus de mapache. Mientras un vector del poxvirus inactivado se puede utilizar en la
20 práctica del método de la presente invención, se prefiere un vector vivo.

Esta invención también proporciona un nuevo método para proteger cerdos contra el Síndrome de Desmedro Post-destete (PMWS) y/o Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) al administrar la nueva vacuna
25 recombinante potente a cerdos en necesidad de protección.

En el método de la invención, una cantidad inmunológicamente efectiva de las vacunas de la presente invención se administran a un cerdo, particularmente lechones, en necesidad de protección contra PMWS y/o PRRS con el fin de
30 inducir una respuesta inmune protectora en los animales. Una cantidad inmunizante efectiva dada al cerdo es una en la que una respuesta inmunológica

suficiente a la vacuna se logra para proteger al cerdo de los efectos perjudiciales del PCV-2 y/o PRRSV. Una respuesta inmune protectora se considera que se obtiene cuando la vacuna es capaz de proteger por lo menos un número significativo de cerdos inoculados según se requiera por los valores estándar en el campo de vacunación. La dosificación inmunológicamente efectiva o la cantidad inmunizante efectiva que inocula el animal y elicit los efectos de vacunación satisfactorios se pueden determinar fácilmente o titular fácilmente por pruebas de rutina tal como, por ejemplo, por estudios de titulación estándar.

10 Las construcciones de vacuna novedosas de la presente invención se emplean para la vacunación de lechones saludables de aproximadamente tres meses de edad para la prevención del Síndrome de Desmedro Multisistémico Post-destete (PMWS) y/o Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS). La vacuna también se puede dar a cerdas maduras o adultas (es decir, mayores de tres meses) antes de reproducción. La vacuna se puede administrar en una dosis única o en dosis repetidas si los títulos de anticuerpo declinan y un refuerzo de vacunas si parece necesario. De manera deseable, la vacuna se administra a animales saludables en una inoculación única para proporcionar protección a largo plazo contra la enfermedad, proteger los animales durante por lo menos un año a tres años o más. Las dosificaciones apropiadas se determinan por los estudios de titulación de dosis estándar. La vacuna puede contener una cantidad inmunológicamente efectiva de una cualquiera de las construcciones vectorizadas de poxvirus recombinante de mapache descritas aquí. En otra modalidad, la vacuna puede contener una cantidad inmunológicamente efectiva de cualquiera de dos o más de las construcciones de vector de poxvirus recombinante de mapache descritas aquí.

La vacuna se puede dar fácilmente por vía de cualquier ruta de administración, oralmente, intranasalmente, transdérmicamente (es decir, aplicada sobre o en la superficie de la piel para absorción sistémica), parenteralmente, etc., aunque algunas rutas pueden ser logísticamente más

difíciles dependiendo del animal particular y el tratante. La ruta de administración parenteral incluye, pero no se limita a, administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica (es decir, inyectada o colocada de otra forma bajo la piel) y similares. Preferiblemente, la vacuna se administra subcutáneamente.

El vector poxvirus puede ser vivo o inactivado por procedimientos convencionales para preparar vacunas virales inactivas, por ejemplo, utilizando BEI (etilenoimina binaria), formalina y similares, siendo el BEI un inactivante preferido, aunque es altamente deseable para la vacuna de la presente invención utilizar un poxvirus de mapache vivo para eficacia inmunológica óptima y potente.

Benéficamente, el RCNV recombinante vivo que expresa múltiples ORF de PCV-2 y/o PRRSV son útiles como una vacuna, solas o en combinación con portadores, diluyentes y adyuvantes adecuados. El producto de vacuna puede contener opcionalmente una variedad de aditivos, diluyentes y adyuvantes farmacéuticamente aceptables, típicos, no tóxicos que incluyen, pero no se limitan a, conservantes; estabilizantes; emulsificantes; hidróxido de aluminio; fosfato de aluminio; ajustadores del pH tal como hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, etc., tensoactivos tales como Tween[®] 80 (polisorbato 80, disponible comercialmente de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); liposomas; adyuvante iscom; glicopéptidos sintéticos tal como dipéptidos muramilo; entendedores tales como dextrano o combinaciones de dextrano, por ejemplo, con fosfato de aluminio, sulfato de dextrano, DEAE-Dextrano y similares; carboxipolimetileno, tal como CARBOPOL[®] (polímero poliacrílico disponible comercialmente de B.F. Goodrich Company, Cleveland, Ohio); copolímeros de anhídrido maléico etileno o copolímeros de anhídrido maléico/etileno (EMA[®], un copolímero de anhídrido etileno/maléico lineal que tiene aproximadamente cantidades iguales de anhídrido maléico y etileno, que tiene un peso molecular promedio estimado de aproximadamente 75,000 a 100,000 disponible comercialmente de Monsanto Co., St. Louis, MO); emulsiones de copolímero acrílico tal como copolímero de

estireno con una mezcla de ácido acrílico y ácido metacrílico como NEOCRYL® A640 (por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,047,238, un copolímero de ácido acrílico acuoso no coalescente de ácido acrílico y ácido metacrílico mezclado con estireno, disponible comercialmente de Polyvinyl Chemicals, Inc., Wilmingotn, MA); paredes celulares bacterianas tales como extracto de pared celular micobacteriana; adyuvantes derivados de *Corinebacterium* tal como *Corynebacterium parvum*; adyuvante derivados de *Propionibacterium* tal como *Propionibacterium acne*; *Mycobacterium bovis* (Bacille Calmette-Guerin, o BCG); adyuvantes de partícula subvirales tal como orbivirus; toxina cólera; N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil)-propanodiamina (avridina); lípido monofosforilo A; bromuro de dimetildioctadecilamonio (DAA, disponible comercialmente de Kodak, Rochester, NY); sintéticos y mezclas de éstos. Aditivos adicionales que se pueden emplear en la presente vacuna incluyen, pero no se limitan a, dextrosa, antioxidantes convencionales y agentes de quelación convencionales, tal como ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA). Otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables que pueden complementar opcionalmente la formulación de vacuna incluyen, pero no se limitan a, polianiones, policationes, péptidos, emulsión de aceite mineral, inmunomoduladores, una variedad de combinaciones y similares. Ejemplos no limitante adicionales de adyuvantes adecuados incluyen escualeno y escualano (u otros aceites de origen animal); copolímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno tal como PLURONIC® (L121, por ejemplo, disponible comercialmente de BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen, Alemania); saponina; Quil A (nombre comercial de una forma purificada de Quillaja saponaria, disponible de Iscotec AB, Suecia y Superfos Biosector a/s, Vedbaek, Dinamarca); aceites minerales tales como MARCOL® (una mezcla purificada de hidrocarburos líquidos saturados, disponible comercialmente de Exxon-Mobil, Fairfax, VA); aceites vegetales tales como aceite de maní; interleuquinas tales como interleuquina-2 e interleuquina-12; interferones tales como inteferón gama; proteínas de poxvirus animal o mezclas de éstos. Ejemplos de estabilizantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, gelatina, peptona, extractos de proteína digerida tal como NZ-Amina o NZ-Amina AS.

000110

Ejemplos de emulsificadores incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, aceite vegetal, aceite de maní y otros aceites no tóxicos metabolizables estándar útiles para vacunas inyectables o intranasales. De forma deseable, se mezcla hidróxido de aluminio con otros adyuvantes tales como saponina o Quil A para formar combinaciones tales como saponina-hidróxido de aluminio o Quil A-hidróxido de aluminio.

Un adyuvante preferido comprende copolímero de anhídrido etileno/maléico, copolímero de estireno con una mezcla de ácido acrílico y ácido metacrílico, emulsión de aceite mineral o combinaciones de éstos. Un sistema adyuvante particularmente preferido que mejora significativamente la potencia de la construcción rRCNV-PRRS de la presente invención comprende la combinación de un copolímero etileno/maléico tal como EMA-31[®] (un copolímero de anhídrido etileno/maléico lineal que tiene aproximadamente cantidades iguales de anhídrido maléico y etileno, que tiene un peso molecular promedio estimado de aproximadamente 75,000 a 100,000, disponible comercialmente de Monsanto, Co., St. Louis, MO) y una emulsión de copolímero de ácido acrílico tal como NEOCRYL[®] (un copolímero de ácido acrílico acuoso no coalescente de ácido acrílico y ácido metacrílico mezclado con estireno (emulsión de acrílico-estireno), disponible comercialmente de Polyvinyl Chemicals, Inc., Wilmington, MA):

La composición de vacuna recombinante de la presente invención también puede contener opcionalmente una mezcla con uno o más antígenos de porcino adicionales tal como, por ejemplo, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, bacteria leptospira, virus de la influenza porcina (SIV), parvovirus porcino, *Escherichia coli*, coronavirus respiratorio de porcino, rotavirus, un patógeno causante de la Enfermedad de Aujeszky, Gastroenteritis Porcina Transmisible, etc.

Cualquier método conocido por aquellos expertos en la técnica se puede utilizar para preparar las construcciones genéticas de la presente invención. Por ejemplo, se puede tomar ventaja de los sitios de restricción particulares para la inserción de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico deseadas dentro del vector de poxvirus de mapache utilizando metodologías estándar. Alternativamente, uno puede utilizar técnicas de recombinación homólogas cuando se desea la inserción de grandes secuencias, o cuando se desea insertar múltiples genes, como se describe aquí. En este método, las secuencias de plásmido que flanquean el sitio de inserción en el que se insertan múltiples genes, contienen secuencias que tienen suficiente homología con las secuencias actuales en el genoma de poxvirus de mapache para mediar la recombinación. Las secuencias de flaqueo deben ser homólogas a una región del poxvirus de mapache que no es esencial para el crecimiento y la propagación del poxvirus de mapache, tal como el sitio de hemaglutinina, o el sitio de timidina quinasa, o el sitio inhibidor de serina proteasa. Aunque se puede utilizar un promotor para dirigir la expresión de dos genes exógenos a ser recombinados, el uso de dos promotores en un vector de inserción, cada promotor ligado de manera operable a un gen individual también proporcionará expresión eficiente.

De manera general, el virus rRCNV-PRRS se puede construir mediante un método de placa azul a blanco, por ejemplo, al seguir cinco pasos clave: (1) Clonar el ORF5, ORF6, ORF7 u ORF3 de las cepas PRRSV ISU12 (Iowa) y Olot/91 (aislado español) en los plásmidos pFD2000A y/o pFD2003SEL; (2) Construir el plásmido pFD2000A PRRS ORF7 (P_{11})-ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL}) o el plásmido pFD2000A PRRS ORF3 (P_{11})-ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL}); (3) Crear clones de grupo mediante infección/transfección de tres vías: células COS7, plásmido en Etapa 2 y rRCNV-FeLV; (4) Selección de clon por dilución limitada y método de placa azul a blanco; y (5) Determinar la caracterización molecular de rRCNV-PRRS_{btw} por PCR, ELISA e Inmuno Transferencia. Alternativamente, un enfoque de placa azul a blanco se puede utilizar en el que se desarrollan las siguientes cinco etapas

- clave: (1) Clonar el ORF5 y ORF6 del PRRSV ISU12 y las cepas Olot/91, FeLV P27 en los plásmidos pFD2000A y/o pFD2003SEL; (2) Construir el plásmido pFD2000A FeLV P27 (P₁₁)-PRRS ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL}) o el plásmido pFD2000A PRRS ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5//IACz (P_{7.5});
- 5 (3) Crear clones agrupados por infección/transfección de tres vías; células COS7, plásmido en Etapa 2 y RCNV; (4) Selección de clon por dilución limitada y FeLV P27 ELISA o LacZ; y (5) Determinar la caracterización molecular del rRCNV-PRRS_{wtb} por PCR, ELISA e Inmuno Transferencia.
- 10 El rRCNV-PRRS-PCV de la presente invención se puede construir por vía de las siguientes cinco etapas clave: (1) Clonar ORF5, ORF6, ORF3 de las cepas PRRSV ISU12 y Olot/91 y PCV2 ORF2 (gen cápsido) en los plásmidos pFD2000A y/o pFD2003SEL; (2) Construir el plásmido pFD2000A PRRS ORF3 (P₁₁)-ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL})-PCV2 ORF2 (P₁₁ o P_{SEL}); (3)
- 15 Crea clones agrupados por infección/transfección de tres vías: células COS, plásmido en Etapa 2 y RCNV; (4) Selección de clon por dilución limitada y ELISA PCV2 (como marcador de selección); y (5) Determina la caracterización molecular del rRCNV-PRRS_{pcv} por PCR, ELISA e Inmuno Transferencia. Alternativamente, un método de placa azul a blanco se puede utilizar en el cual
- 20 se desarrollan las siguientes cuatro etapas clave: (1) Clonar PCV2 ORF2 en el plásmido pFD2001TK o pFD2006TK para generar el plásmido pFD2001TK PCV ORF2; (2) Crear clones agrupados mediante infección/transfección de tres vías: células COS7, plásmido en Etapa 1 y rRCNV-PRRS ORF3 (P₁₁)-ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL}); (3) Selección de clon por dilución limitada y
- 25 ELISA PCV2 o LacZ; y (5) Determinar la caracterización molecular de rRCNV-PRRS//PCV por PCR, ELISA e Inmuno Transferencia.

EJEMPLOS

- 30 Los siguientes ejemplos demuestran ciertos aspectos de la presente invención. Sin embargo, se entiende que estos ejemplos son solo para ilustración

y no tienen el propósito de ser completamente definitivos como condiciones y alcances de esta invención. Se debe apreciar que cuando las condiciones de reacción típicas se han dado (por ejemplo, temperatura, tiempos de reacción, etc.), las condiciones por encima y debajo de los rangos especificados también se pueden utilizar, aunque generalmente menos convenientemente. Los ejemplos se conducen a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C a aproximadamente 28°C) y a presión atmosférica. Todas las partes y porcentajes referidos aquí son sobre una base en peso y todas las temperaturas se expresan en grados centígrados a menos que se especifique otra cosa.

10

EJEMPLO 1: CONSTRUCCIÓN DE rRCNV-PRRS (MÉTODO DE PLACA AZUL A BLANCO)

El rRCNV-PRRS_{btw} se construye mediante las siguientes cinco etapas clave: (1) Clonar el ORF5, ORF6, ORF7 u ORF3 de las cepas PRRSV ISU12 (Iowa) y Olot/91 (aislado español) en los plásmidos pFD2000A y/o pFD2003SEL; (2) Construir el plásmido pFD2000A PRRS ORF7 o ORF3 (P₁₁)-ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL}); (3) Crear clones de grupo por infección/transfección de tres vías: células COS7, plásmido en Etapa 2 y rRCNV-FeLV; (4) Selección de clon por dilución limitada y método de placa azul a blanco; y (5) Determinar la caracterización molecular de rRCNV-PRRS_{btw} por PCR, ELISA e Inmuno Transferencia.

El método de selección de placa azul a blanco utiliza el virus pariente rRCNV-FeLV que lleva el fenotipo FeLV P27⁺ (color azul en ELISA FeLV P27). A través de la recombinación homóloga de la secuencia de flaqueo RCNV HA entre rRCNV-FeLV y pFD200A PRRS ORF7- ORF5 (Olot)-ORF6-ORF5, el fenotipo del rRCNV-PRRS cambiará de placa azul a blanca debido a que el PRRSV ORF se inserta en el sitio *ha* para reemplazar la secuencia del FeLV gag-env gp85 en la cepa pariente (rRCNV- FeLV-placa azul).

30

EJEMPLO 2: CONSTRUCCIÓN DE rRCNV-PRRS (MÉTODO DE PLACA BLANCO A AZUL)

El rRCNV-PRRS_{btw} se construye mediante las siguientes cinco etapas clave: (1) Clonar el ORF5 y el ORF6 de las cepas PRRSV ISU12 y Olot/91, FeLV P27 en los plásmidos pFD2000A y/o pFD2003SEL; (2) Construir el plásmido pFD2000A FeLV P27 (P₁₁)-PRRS ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL}); (3) Crear clones agrupados por infección/transfección de tres vías: células COS7, plásmido en Etapa 2 y RCNV; (4) Selección de clon por dilución limitada y ELISA FeLV P27 o LacZ; y (5) Determinar la caracterización molecular de rRCNV-PRRS_{wtb} por PCR, ELISA e Inmuno Transferencia.

El método de selección de placa blanco a azul utiliza el virus recombinante rRCNV-PRRS_{wtb} que lleva el fenotipo FeLV P27⁺ o LacZ (color azul en el ELISA FeLV P27 o fenotipo LacZ⁺) mientras que el RCNV tipo silvestre muestra color blanco en ELISA FeLV P27 o teñido LacZ.

EJEMPLO 3: CONSTRUCCIÓN DE rRCNV-PRRS-PCV

El rRCNV-PRRS_{pcv} se construye mediante las siguientes cinco etapas clave: (1) Clonar el ORF5, ORF6, ORF3 de las cepas PRRSV ISU12 y Olot/91 y PCV2 ORF2 (gen cápsido) en los plásmidos pFD2000A y/o pFD2003SEL; (2) Construir el plásmido pFD2000A PRRS ORF3 (P₁₁)-ORF5 (Olot) (P_{SEL})-ORF6 (P_{SEL})-ORF5 (P_{SEL})-PCV2 ORF2(P₁₁ o P_{SEL}); (3) Crear los clones de grupo por infección/transfección de tres vías: células COS7, plásmido en Etapa 2 y RCNV; (4) Selección de clon por dilución limitada y ELISA PCV2 (como marcador de selección); y (5) Determina la caracterización molecular de rRCNV-PRRS_{pcv} por PCR, ELISA e Inmuno Transferencia.

El método PCV2 utiliza el ELISA de cápsido PCV-2 como un único marcador para selección de clones, y para crear una nueva combinación de vacuna de rRCNV-PRRS/PCV en una construcción viral.

- 5 Alternativamente, el rRCNV-PRRS_{pcv} se construye mediante las siguientes cuatro etapas clave: (1) Clonar el PCV2 ORF2 (gen cápsido) en los plásmidos pFD2001TK y/o pFD2006TK para generar el plásmido pFD2002TK PCV2 ORF2 (P₁₁ o P_{SEL}); (2) Crear clones de grupo por infección/transfección de tres vías: células COS7, plásmido en Etapa 1 y rRCNV-PRRS; (3) Selección de clon por
10 dilución limitada y ELISA PCV2 (como marcador de selección); y (5) Determinar la caracterización molecular de rRCNV-PRRS//PCV por PCR, ELISA e Inmuno Transferencia.

15 **EJEMPLO 4: ESTUDIO DE EFICACIA DE VACUNA rRCNV-PRRS CANDIDATA EN CERDOS**

- Las anteriores construcciones (rRCNV-PRRS_{btw}, rRCNV-PRRS_{wtb}, y rRCNV-PRRS_{pcv}) se formulan con o sin un adyuvante para mejoramiento inmune y se evalúa para eficacia de vacuna en cerdos. Los resultados exitosos de los
20 estudios de exposición mostrarán la eficacia del PRRS recombinante, PCV o vacuna de combinación en cerdos.

EJEMPLO 5: CONSTRUCCIÓN DE rRCNV-PRRS

- 25 En resumen, el virus rRCNV-PRRSV se construye por la inserción del gen de glicoproteína de envoltura (orf 5) y el gen de proteína de matriz (orf 6) del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) ISU 12 (cepa US) y el gen de glicoproteína de envoltura (orf 5) del gen PRRSV Olot 91 (cepa EU) en el sitio de hemaglutinación (*ha*) del genoma RCNV, una cepa Herman avirulenta.
30

Los procesos de construcción del rRCNV-PRRSV se proporcionan a través de dos etapas principales. Primero, el orf5 603 bp amplificado por PCR y el orf6 525-bp de la cepa PRRSV ISU 12 y el orf 5 606-bp de la cepa PRRSV Olot 91 se subclonan en un vector pFD2003SEL de plásmido (que contiene un gen indicador lacZ bajo el control del promotor P11) para generar el plásmido pFD2003SEL-PRRSV Olot 91 orf5-(SEL)-ISU 12 orf 6 (SEL)-ISU 12 orf 5 (SEL). Los genes PRRSV ISU 12 orf 5 y orf6 y PRRSV Olo 91 orf 5 se co-expresan bajo el control del promotor P_{SEL}. Segundo, la co-infección/transfección de tres vías del rRCNV-FCV (2280-DD1) y el plásmido pFD2003SEL PRRSV Olot 91 orf5-(SEL)-ISU 12 orf 6 (SEL)-ISU 12 orf 5 (SEL) en células COS-7 se conduce para generar el rRCNV-PRRSV por intercambio alélico en el sitio *ha*. Las placas azules (Lac⁺) se clonan mediante cinco series sucesivas de purificación de placa en células Vero. Los clon candidatos se expanden adicionalmente dos veces más en células Vero utilizando Medio Esencial Mínimo (MEM) complementado con 0.05% de hidrolisato de lactalbúmina (LAH), 30 µg/mL de sulfato de gentamicina y 5% de suero bovino fetal, y después se confirma por PCR de gen específico. El séptimo pasaje se utiliza para preparar una semilla pre-maestra. La Semilla Maestra se establece por dilución 1:20,000 de la semilla pre-maestra, y designada rRCNV-PRRSV, en la cual el poxvirus de mapache como un vector vivo es capaz de expresar las glicoproteínas de envoltura PRRSV (orf5) y la proteína de matriz (M) de las cepas PRRSV ISU 12 y Olot 91 en el sitio *ha*, respectivamente. El virus de semilla maestra de la vacuna PRRSV, vector posvirus vivo de mapache (rRCNV-PRRSV) se identifica por PRRSV orf5 o ensayo PCR específico de gen orf6. Los estudios de inmunogenicidad de vacuna del virus del síndrome reproductivo y respiratorio de porcinos, vector del poxvirus vivo/inactivo de mapache solo o en combinación con Suvaxyn PCV2 One Dose y/o Suvaxyn MH-one, o cPCV1-2 quimérico vivo y/o *Mycoplasma hyopenumoniae* vivo modificado (por ejemplo, cepa J) se conducen en cerdas y lechones.

EJEMPLO 6: Estudio de Inmunogenicidad de Vacuna del Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio de Porcinos, Vector del Poxvirus Vivo de

Mapache Solo o en Combinación con Suvaxyn PCV2 One Dose, en Lechones

Para demostrar la eficacia de la fracción PRRSV, se administrará a los
5 cerdos la vacuna rRCNV-PRRSV (torta liofilizada) y agua estéril que contiene
adyuvante o Suvaxyn PCV2 One Dose como diluyente en régimen de dos dosis
en un intervalo de 2-3 semanas, seguido por exposición PRRSV virulenta o co-
exposición PRRSV/PCV2 2-3 semanas luego de la segunda vacunación. La
10 eficacia de la fracción rRCNV-PRRSV se evaluará con base en la reducción de
viremia de PRRSV y reducción de lesiones de pulmón originadas por PRRSV. El
Suvaxyn® PCV2 One contiene Quimera Tipo 1- Tipo 2 de Circovirus de Porcino
(cPCV1-2) formulada con adyuvante del propietario FDAH.

Materiales y Métodos

15

Animales de Ensayo

De 40 cerdos convencionales machos y hembra mezclados (20 vacunados
y 20 de control), de 3 semanas de edad o más, se utilizarán para este estudio.
20 Los cerdos para el estudio se comprarán de una granja comercial y se
identificarán utilizando una etiqueta de oreja. Los cerdos se obtendrán de una
única manada. Al momento de la primera vacunación los cerdos serán
seronegativos a PRRSV según se determina por el Kit ELISA IDEXX HerdCheck
(proporción S/P < 0.4).

25

Vacunas de Prueba

Composición de las Vacunas de Prueba

30

Fracción liofilizada: La vacuna consiste de rRCNV-PRRSV vivo. El título
del virus de la vacuna se titulará en cinco ensayos replicados con el fin de

establecer la dosis administrada en el estudio. Fracción líquida: El diluyente será Suvaxyn PCV2 One Dose o 20% de adyuvante SL-CD. La fracción liofilizada de rRCNV-PRRSV se rehidratará con la fracción líquida al momento de la vacunación.

5

Diseño del Estudio

Los estudios propuestos serán diseños de bloque completo aleatorizado (ensayo de superioridad). Las camadas se ubicarán en cada replica de estudio. Los lechones dentro de las camadas en cada estudio se dividirán en dos grupos como sigue:

10

15

20

25

Grupo	Vacuna	Número de Animales
Vacunas V1	rRCNV-PRRSV liofilizado (torta) + Suvaxyn PCV2 One Dose	≥20
Controles C1	Suvaxyn PCV2 One Dose (Diluyente)	≥20
Vacunas V2	rRCNV-PRRSV liofilizado (torta) + Agua-SL-CD Adyuvante (Diluyente)	≥20
Controles C2	Agua-SL-Adyuvante CD (Diluyente)	≥20

Vacunación

La ruta de vacunación será intramuscular en el costado derecho de la nuca.

30

Para cerdos en Estudio 1: al grupo V1 se le darán dos dosis de 2.0 mL de rRCNV-PRRSV + Suvaxyn PCV2 One Dose; a los cerdos en el grupo de control C1 se les darán dos dosis de 2.0 mL de Suvaxyn PCV2 One Dose.

- 5 Para cerdos en Estudio 2: al grupo V2 se le darán dos dosis de 2.0 mL de rRCNV-PRRSV + Agua/SL-CD; a los cerdos en el grupo de control C2 se les darán dos dosis de 2.0 mL de Agua-SL-Adyuvante CD.

- 10 La primera vacunación se administrará a las 3 semanas de edad, y se repetirá la vacunación 2-3 semanas después.

Exposición

- 15 Todos los animales serán expuestos virulentamente dos a tres semanas luego de la segunda vacunación.

- 20 Los cerdos en el grupo V1 y C1 se expondrán con por lo menos $2 \times 10^{4.8}$ FAID₅₀ de PCV2 patogénico tipo silvestre (cepa 40895) y con por lo menos $2 \times 10^{4.0}$ TCID₅₀ de PRRSV (ISU-12 o equivalente). Estos dos materiales de exposición se mezclarán durante por lo menos 30 minutos antes de exposición. La dosis de exposición será de 4 mL intranasalmente (2 mL por fosa nasal).

- 25 Los cerdos en los grupos V2 y C2 se expondrán con por lo menos $2 \times 10^{4.0}$ TCID₅₀ de PRRSV (ISU-12 o equivalente). La dosis de exposición será de 2 mL intranasalmente (1 mL por fosa nasal). Ver Anexo 2 para registro de exposición.

Los virus de exposición se titularán por ensayos de inmunofluorescencia directo específico de PCV2 y específico de PRRSV (IFA) en el día de exposición.

Observación

30

Todos los cerdos se observarán para temperatura y signos clínicos diariamente de 2 a 10 días post exposición (DPC). Cualquier observación anormal se reportará al director del estudio o veterinario de planta.

- 5 Los signos clínicos monitoreados pueden incluir, pero no se limitan a, inapetencia, letargo, depresión, diarrea, estornudo, tos, descarga nasal, descarga ocular, disnea y muerte. Si cualquier cerdo muere durante el período de observación post exposición, se practicará necropsia y el reporte de la necropsia se adjuntará al informe final.

10

Prueba y Recolección de Muestras

Recolección de Muestras

- 15 Hisopo Nasal

Se recolectarán hisopos nasales en el día 0 post vacunación (DPV1) para PRRSV y aislamiento de PCV2 para asegurar que no hay infección PRRSV o PCV2 en los animales ensayados antes de vacunación.

20

Las muestras de hisopo nasal se colocarán en tubos estériles individuales que contienen 3 mL de MEM con hidrolisato de lactalbúmina (LAH) y gentamicina (60 µg/mL), penicilina (00 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL), y se almacenan en o por debajo de -50°C hasta que se prueban.

25

Muestras de Suero

- 30 Se tomarán muestras de sangre a los cerdos (no mas de diez mL) en 0 DPV1, 0 DPV2, 7 DPV2, 14 DPV2, -1, 6, y 9 para prueba ELISA; y en -1, 3, 6, y 9 para prueba PCR.

Necropsia

Se les practicará necropsia a todos los animales en 10-11 DPC. Se recolectarán los pulmones para clasificación de lesión de pulmón.

5

Prueba de Muestra

Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA)

- 10 Se detectarán los anticuerpos en suero para PRRSV mediante el kit ELISA IDEXX® HerdCheck (Westbrook, ME). En resumen, se diluyen muestras de suero 1:40 en Diluyente de Muestra y 100 µl de cada muestra se agrega en duplicado (un pozo para antígeno PRRSV y un pozo para antígeno de célula anfitrión normal (NHC) a placas de 96 pozos cubiertas con antígeno. Después de un
- 15 período de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se decanta el líquido y se lavan las placas 3-5 veces con aproximadamente 300 µL de solución de lavado amortiguada con fosfato. Se agrega entonces 100 µL de Conjugado anti-Porcino-HPRO a todos los pozos. Las placas se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del período de incubación, las placas se lavan
- 20 de nuevo como se hizo anteriormente. Luego se agrega 100 µL de Solución de Sustrato TMB a cada pozo. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de 100 µL de Solución de Detención que se agrega a todos los pozos para detener la reacción. La densidad óptica (OD) se mide luego a 650 nm en un lector de microplaca. El título de suero arbitrario se reportará
- 25 como la proporción muestra/positivo (S/P) y se determina al tomar la cantidad de la muestra OD-PRRSV menos la muestra OD-NHC dividida por la cantidad de control positivo medio-PRRSV menos el control positivo medio-NHC.

Prueba PCR

30

Se utilizará la prueba RT-PCR específica de PRRSV para detectar la presencia de PRRSV en el suero. La extracción de ARN se desarrollará sobre las muestras de suero utilizando el Kit QIAamp® Viral RNA Mini (Valencia, CA).

5 Clasificación de Lesión de Pulmón

Los pulmones de cada cerdo individual se examinarán por dos clasificadores independientes para lesiones macroscópicas brutas basadas en la cantidad de parénquima de pulmón afectada por las lesiones. Los clasificadores de las lesiones estarán cegados a la identidad del tratamiento para cada cerdo. En resumen, la clasificación para las lesiones de pulmón en cada lóbulo se determinará al estimar el porcentaje del lóbulo que exhibe lesiones similares a PRRSV (basado en color y textura) y multiplicado por el número de puntos posibles para ese lóbulo. La clasificación máxima para cada lóbulo se determina mediante porcentaje relativo del volumen de pulmón total ocupado por el lóbulo. La clasificación de los aspectos dorsal y ventral de todos los lóbulos se agregarán luego para obtener la clasificación total para cada cerdo. La clasificación total máxima posible para cada animal es 100.

20 Resultado Principal

Para la reivindicación de la reducción de las lesiones de pulmón, las clasificaciones totales de las lesiones presentes en los pulmones se evaluarán.

Resultado Secundario

25

El resultado secundario será la ocurrencia de viremia PRRSV.

Análisis Estadístico

30 Estimador

Para la evaluación de la reducción en la severidad de las lesiones de pulmón, el estimador será la fracción estadística mitigada (MF). La fracción mitigada se calculará como:

$$MF = \frac{2W_1 - n_c(1 + n_c + n_v)}{n_c n_v}$$

donde: W_1 = Suma estadística de rango Wilcoxon
 n_c = Número de sujetos en el grupo de control
 n_b = Número de sujetos en cad grupo vacunado

*Nota: el MF estadístico se estimará para cada replica de estudio.

Declaración de Método para Calcular Estimados de Intervalo

El intervalo de confianza de 95% para la fracción mitigada para cada replica de estudio se calculará.

Declaración de Hipótesis

Para la reivindicación de severidad de reducción de lesiones de pulmon:

$$H_0: M_V = M_C$$

$$H_A: M_V \neq M_C$$

donde:

M_V = Media para el rango de clasificación de lesión de pulmón en el grupo vacunado

M_C = Media para el rango de clasificación de lesión de pulmón en el grupo de control

000124

Estos estudios probarán la hipótesis nula de que no hay diferencia en la severidad (rango) en lesiones de pulmón entre el grupo vacunado y el grupo de control de placebo para cada replica de estudio.

5 Otras Consideraciones Estadísticas

La distribución de la camada de cerdos se asignará aleatoriamente dentro de la camada.

10 Análisis Estadístico

Métodos Estadísticos

Resultado Principal

15

Repetibilidad de la prueba de la clasificación dentro del animal se evaluará por la correlación entre clases. Si la prueba de repetibilidad parece ser suficiente, la clasificación media de pulmón para cada cerdo se calculará al promediar las clasificaciones de pulmón de cada clasificador. Las clasificaciones de pulmón calculadas se compararán entre los dos grupos de tratamiento para cada replica de estudio por la Suma de Rango Wilcoxon con la clasificación de pulmón calculada como la variable dependiente y el tratamiento incluido como una variable independiente. Los análisis se estratificarán por camada si hay suficientes bloques completos. Se estimará el cambio HL. El MF se estimará a partir del análisis estadístico Wilcoxon.

25

Resultado Secundario

Se evaluará un resultado secundario para la ocurrencia de viremia. Una única ocurrencia de viremia categorizará al cerdo como positivo para viremia (Si o No). La viremia se comparará entre los grupos de tratamiento en un modelo lineal

30

000135

mezclado generalizado con la ocurrencia de viremia (Si o No) como la variable dependiente binomial y el tratamiento incluido como una variable independiente. Si hay suficientes bloques completos, la camada se incluirá como un efecto covariado aleatorio en el modelo.

5

Todos los análisis estadísticos se desarrollarán utilizando el sistema SAS (SAS Institute, Inc.). El nivel de significancia se establecerá en $p < 0.05$.

10 En lo anterior, se ha proporcionado una descripción detallada de las modalidades particulares de la presente invención para propósito de ilustración y no de limitación. Se entenderá que todas las otras modificaciones, ramificaciones y equivalencias obvias para aquellos expertos en la técnica basadas en esta descripción están destinadas a ser incluidas dentro del alcance de la invención según se reivindica.

15

REIVINDICACIONES

000126

Lo que se Reivindica es:

- 5 1. Un vector poxvirus recombinante de mapache (**rRCPV**) que comprende una o más moléculas de ácido nucleico exógenas que codifican una proteína del virus del síndrome reproductivo y respiratorio de porcinos (PRRSV), en donde:
- 10 (a) por lo menos una molécula de ácido nucleico se inserta en el sitio de la hemaglutinina o en el sitio de la timidina quinasa del genoma de poxvirus de mapache; o
- (b) por lo menos dos moléculas de ácido nucleico se insertan en el sitio de la hemaglutinina o en el sitio de la timidina quinasa del genoma del poxvirus de mapache; o
- 15 (c) por lo menos una molécula de ácido nucleico se inserta en el sitio de la hemaglutinina y por lo menos una molécula de ácido nucleico se inserta en el sitio de la timidina quinasa del genoma del poxvirus de mapache
- 20
2. El vector poxvirus recombinante de mapache de la reivindicación 1, en donde por lo menos dos moléculas de ácido nucleico se insertan en el sitio de hemaglutinina y por lo menos dos moléculas de ácido nucleico se insertan en el sitio de timidina quinasa del genoma de poxvirus de mapache.
- 25
3. El vector poxvirus recombinante de mapache de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína del virus del síndrome reproductivo y respiratorio de porcinos (PRRSV) que se inserta en un
- 30 tercer sitio no esencial del genoma de poxvirus de mapache en adición

a los sitios de timidina quinasa y hemaglutinina del genoma de poxvirus de mapache.

- 5 4. El vector poxvirus recombinante de mapache de la reivindicación 3, en donde el tercer sitio no esencial del genoma de poxvirus de mapache es el sitio del inhibidor de serina proteasa.
- 10 5. El vector poxvirus recombinante de mapache de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el vector de poxvirus codifica por lo menos dos copias de la misma proteína del virus del síndrome reproductivo y respiratorio de porcino.
- 15 6. El vector poxvirus recombinante de mapache de la reivindicación 5, en donde dichas dos copias de la misma proteína se codifican por dos moléculas de ácido nucleico diferentes.
- 20 7. El vector poxvirus recombinante de mapache de la reivindicación 5, en donde dichas dos copias de la misma proteína se codifican por la misma molécula de ácido nucleico.
- 25 8. El vector poxvirus recombinante de mapache de la reivindicación 7, en donde dichas dos copias de la misma proteína se ligan de manera operable a un promotor.
- 30 9. El vector poxvirus recombinante de mapache de una de las reivindicaciones 6 o 7, en donde dichas dos copias de la misma proteína se ligan de forma operable a promotores separados.
10. El vector poxvirus recombinante de mapache de cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 8 o 9, en donde dichas dos copias de la misma proteína se codifican por un cuadro de lectura abierto (ORF) del virus

del síndrome reproductivo y respiratorio de porcinos (PRRSV) seleccionado del grupo que consiste de ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 y una combinación de éstos.

- 5 11. El vector poxvirus recombinante de mapache de una de las reivindicaciones 1 o 2, en donde cada una de las moléculas de ácido nucleico exógenas codifica un PRRSV ORF.
- 10 12. El vector poxvirus recombinante de mapache de la reivindicación 11, en donde el ORF es uno o más seleccionado del grupo que consiste de ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7 y una combinación de éstos.
- 15 13. El vector poxvirus recombinante de mapache de la reivindicación 2, en donde dichas dos o más moléculas de ácido nucleico exógenas codifican dos o más del PRRSV ORF seleccionado del grupo que consiste de ORF5-ORF6, ORF5-ORF6-ORF7, ORF3-ORF5-ORF6, ORF3-ORF4-ORF7, ORF3-ORF4-ORF5-ORF7, ORF3-ORF4-ORF6-ORF7, y ORF3-ORF4-ORF5-ORF6-ORF7.
- 20 14. El vector poxvirus recombinante de mapache de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el virus del síndrome reproductivo y respiratorio de porcino es ISU12 (Iowa), Olot/91 (Español) o ambos.
- 25 15. El vector poxvirus recombinante de mapache de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde se insertan dos o más moléculas dentro del sitio de hemaglutinina del genoma del poxvirus de mapache.
- 30

- 5
- 16.El vector poxvirus recombinante de mapache de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica un cuadro de lectura abierto del circovirus de porcino tipo 2 (PCV2).
- 10
- 17.El vector poxvirus recombinante de mapache de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el cuadro de lectura abierto PCV2 es ORF2.
- 15
- 18.El vector poxvirus recombinante de mapache de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el PCV2 ORF2 se inserta de forma separada en el sitio de timidina quinasa del genoma de poxvirus de mapache.
- 20
- 19.El vector poxvirus recombinante de mapache de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-18, que comprende adicionalmente una secuencia de nucleótido que codifica una glicoproteína del virus de la leucemia felina del fenotipo P27⁺.
- 25
- 20.El vector poxvirus recombinante de mapache de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde el poxvirus de mapache está vivo y es replicable.
- 30
- 21.Una vacuna recombinante porcina que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva del vector poxvirus recombinante de mapache de una cualquiera de las reivindicaciones 1-20 y, opcionalmente, un portador, diluyente o adyuvante adecuado.
22. Una vacuna recombinante porcina que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de dos o más de los vectores poxvirus

recombinantes de mapache de una cualquiera de las reivindicaciones 1-20 y, opcionalmente, un portador o diluyente adecuado.

5 23. La vacuna recombinante porcina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 o 22, en donde el poxvirus de mapache es vivo y es replicable.

10 24. La vacuna recombinante porcina de acuerdo con la reivindicación 21 o 22, que comprende adicionalmente por lo menos un antígeno de porcino adicional.

15 25. La vacuna recombinante porcina de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el antígeno porcino adicional se selecciona del grupo que consiste de antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae*, antígeno de *aemophilus parasuis*, antígeno de *Pasteurella multocida*, antígeno de *Streptococcus suis*, antígeno de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, antígeno de *Bordetella bronchiseptica*, antígeno de *Salmonella choleraesuis*, antígeno de *Erysipelothrix rhusiopathiae*, antígeno de la bacteria leptospira, antígeno del virus de la influenza porcina, antígeno del parvovirus porcino, antígeno de *Escherichia coli*, antígeno del coronavirus respiratorio porcino, antígeno de rotavirus, un antígeno de un patógeno causante de la Enfermedad de Aujeszky, antígeno de la Gastroenteritis Transmisible Porcina y una combinación de éstos.

25 26. Un método para inducir una respuesta inmune contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio de porcinos, que comprende administrar a un animal porcino una cantidad inmunológicamente efectiva de una vacuna recombinante de porcino de una cualquiera de las reivindicaciones 21-25.

30

27. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en donde la vacuna recombinante de porcino comprende un vector recombinante del poxvirus de mapache vivo y replicable.
- 5 28. Un método para prevenir el síndrome reproductivo y respiratorio de porcino y el Síndrome de Desmedro Multisistémico post-destete, que comprende administrar a un animal porcino en necesidad de protección una vacuna recombinante de porcino que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva del vector poxvirus recombinante de mapache de una cualquiera de las reivindicaciones 16-19 y, opcionalmente, un portador, diluyente o adyuvante adecuado.
- 10 29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el vector poxvirus recombinante de mapache es vivo y replicable.
- 15 30. El método de la reivindicación 26, en donde la cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna varía de aproximadamente $4.5 \text{ Log}_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ a aproximadamente $7.5 \text{ Log}_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$.
- 20 31. El método de la reivindicación 26, en donde la vacuna se administra como una dosis única o como dosis repetidas.
- 25 32. La vacuna recombinante porcina de cualquiera de las reivindicaciones 21-25, en donde la vacuna está libre de adyuvante.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con una nueva vacuna del vector poxvirus recombinante de mapache en el que el vector expresa una o más
5 proteínas antigénicas codificadas por múltiples cuadros de lectura abiertos, preferiblemente el ORF5, ORF6, y/o ORF3/ORF4/ORF7, de una o más de las cepas del virus del síndrome reproductivo y respiratorio de porcino solo o en combinación con un cuadro de lectura abierto del circovirus porcino tipo 2 (PCV-
2), preferiblemente ORF2, en los sitios de la hemaglutinina (*ha*) y/o timidina
10 quinasa (*tk*).

Solicitud No. N/N Figura 1 de 12
 Inventor Stephen Qitu WU, et al Cliente No. 25291
 Registro de Abogado No: Am102713
 Titulo: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

Figura 1

plásmido pFD2000A-FDAH-Seq
 Secuencia de ADN completa de pFD2000A 6872 bp 29-May-2007

CARACTERÍSTICAS	Localización/calificadores
insertion_seq	1..557
	/note= "Izquierda HA"
insertion_seq	4031..4622
	/note= "Derecha HA"
CDS	968..4024
	/note= "lacZ ORF"
misc_feature	558..595
	/note= "sitios de clonación múltiples"
CDS	5065..5925
	/note= "ORF ampicilina"
promotor	596..973
	/note= "Promotores < P11 and P7.5 >"

CONTEO BASE 1790 A 1654 C 1707 G 1721 T 0 OTRO

ORIGEN

```

1 TTATTGGACA CTAGATAATC ATCACAATGT ACCACAAAAT TATATAATGT ATAAATGCGA
61 AATTATTAAA CGCAAATATC CATGGGAAAA CGCGCAGTAT ACAGACGATT TTTTACAGTA
121 TTTGGAGAGT TTTATAGGAA GTATATAGAG TAGAACCAGA ATTTTGTAAG AATAAATCAC
181 ATTTTATATC TAATATGAAA CAACTATCGA TAGTTATATT GCTACTATCG ATAGTATATA
241 CAACCAAACC TCATCCTACA CAGATATCAA AAAAAGTAGG CGATGATGCT ACTCTATCGT
301 GTAATAGAAA CAATACACAT GGATATCTTG TCATGAGTTC TTGGTATAAG AAACCAGACT
361 CCATTATTCT CTTAGCAGCC AAAAAGCATG TCGTATACTT TGATGATTAT ACAGCGGATA
421 AAGTATCATA CGATTACCGG TATGATACTE TAGCTACAAT TATTACAATT AAATCATTGA
481 CATCTGGAGA TGCAGGTAAT TATATATGCG CATTCTTTAT AACATCAACA AATGATACGG
541 ATAAATAGA TTATGAAGAA TTCGTCGACG CGGCCGCTG CAGAAGCTTG GTACCATTTA
601 TAGCATAGAA AAAAACAAAA TGAAATTTCTA CTATATTTT ACATACATAT ATTCTAAATA
661 TGAAAGTGGT GATTGTGACT AGCGTAGCAT CGCTTCTAGA CATCTATATA CTATATAGTA
721 ATACCAATAC TCAAGACTAC GAAACTGATA CAATCTCTTA TCATGTGGGT AATGTTCTCG
781 ATGTCGATAG CCATATGCCG GGTAGTTGCG ATATACATAA ACTGATCACT AATTCCAAAC
841 CCACCCGCTT TTTATAGTAA GTTTTTCACC CATAAATAAT AAATACAATA ATTAATTTCT
901 CGTAAAGATA GAAATATAT TCTAATTTAT TGCACGGTAA GGAAGTAGAA TCATAAAGAA
961 CAGTGACATG GATCCCGTCG TTTTACAAAG TCGTGACTGG GAAACCCCTG GCGTTACCCA
1021 ACTTAATCGC CTTGCAGCAC ATCCCCCTT CGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCCG
1081 CACCGATCGC CTTCCCAAC AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGGCGCT TTGCCTGGTT
1141 TCCGGCACCA GAAGCGGTGC CGGAAAGCTG CTTGGAGTGC GATCTTCTG AGGCCGATAC
1201 TGTCGTCGTC CCCTCAAAT GGCAGATGCA CGGTTACGAT GCGCCCATCT ACACCAACGT
1261 AACCTATCCC ATTACGGTCA ATCCGCGCTT TGTTCACAG GAGAATCCGA CGGGTTGTTA
1321 CTGCTCACA TTTAATGTTG ATGAAAGCTG GCTACAGGAA GGCCAGACGC GAATTATTTT
1381 TGATGGCGTT AACTCGGCGT TTCTCTCTG GTGCAACGGG CGCTGGGTCT GTTACGGCCA
1441 GGACAGTCGT TTGCGGCTG AATTGACTT GAGCGCATTT TTACGCGCCG GAGAAAACCG
1501 CCTCGCGGTG ATGGTGCTGC GTTGGAGTGA CGGCAGTTAT CTGGAAGATC AGGATATGTG
1561 GCGGATGAGC GGCATTTTCC GTGACGCTCT GTTGCTGCAT AAACCGACTA CACAAATCAG
1621 CGATTTCCAT GTTGCCACTC GCTTTAATGA TGATTTTCA GCCTGTGTAC TGGAGGCTGA
1681 AGTTCAGATG TGCGGCGAGT TGCGTGAATA CCTACGGGTA ACAGTTTCTT TATGGCAGGG
1741 TGAAACGCGA GTCGCCAGCG GCACCGGCTT TTTCGGCGGT GAAATTATCG ATGAGCGTGG
1801 TGGTTATGCC GATCGCGTCA CACTACGCTT CAAGGTCGAA AACCCGAAAC TGTGGAGCGC
1861 CGAAATCCCG AATCTCTATC GTGCGGTGCT TGAAGTGCAC ACCGCCGACG GCACGCTGAT
1921 TGAAGCAGAA GCCTGCGATG TCGGTTTCTG CGAGGTGCGG ATTGAAAATG GTCTGTGCT
1981 GCTGAACGGC AAGCCGTTGC TGATTGAGGG CGTTAACCGT CACGAGCATC ATCTCTGCA
2041 TGGTCAGGTC ATGGATGAGC AGACGATGCT GCAGGATATC CTGCTGATGA AGCAGAACAA
2101 CTTTAACGCC GTGCGCTGTT CGCATTATCC GAACCATCCG CTGTGGTACA CGCTGTGCGA
2161 CCGCTACGGC CTGTATGTGG TGGATGAAGC CAATATTGAA ACCCAGCGCA TGGTGCCAA
2221 CAATCGTCTG ACCGATGATC CGCGCTGGCT ACCGGCGATG AGCGAACGCG TAACGCGAAT
2281 GGTGACGGC GATCGTAATC ACCCGAGTGT GATCATCTGG TCGCTGGGGA ATGAATCAGG
2341 CCACGGCGCT AATCAGGAG CGCTGTATCG CTGGATCAAA TCTGTGCATC CTTCCCGCCC
2401 GGTGCAGTAT GAAGGCGGCG GAGCCGACAC CACGGCCACC GATATTTATT GCCCGATGTA
2461 CGCGCGCGTG GATGAAGACC AGCCCTTCCC CCGTGTGCGG AAATGGTCCA TCAAAAAATG
2521 GCTTTCGCTA CCTGGAGAGA CGCGCCGCT GATCCTTTGC GAATACGCCC ACGCGATGGG
2581 TAACAGTCTT GGCGGTTTCG CTAATAACTG GCAGGCGTTT CTTAGTATC CCCGTTTACA

```

Figura 1 (continuación)

plásmido pFDZ100A-FDAH-Seq							
2641	GGGCGGCTTC	GTCTGGGACT	GGGTGGATCA	GTCGCTGATT	AAATATGATG	AAAACGGCAA	
2701	CCCGTGGTCG	GCTTACGGCG	GTGATTTTGG	CGATACGCCG	AACGATCGCC	AGTTCTGTAT	
2761	GAACGGTCTG	GTCTTTGCCG	ACCGCACGCC	GCATCCAGCG	CTGACCGGAAG	CAAAACACCA	
2821	GCAGCAGTTT	TTCCAGTTCC	GTTTATCCGG	GCAAACCATC	GAAGTGACCA	GCGAATACCT	
2881	GTTCCGTCAT	AGCGATAACG	AGCTCCTGCA	CTGGATGGTG	GCGCTGGATG	GTAAGCCGCT	
2941	GGCAAGCGGT	GAAGTGCTCT	TGGATGTCCG	TCCACAAGGT	AAACAGTTGA	TTGAACTGCC	
3001	TGAACTACCG	CAGCCGGAGA	GCGCCGGGCA	ACTCTGGCTC	ACAGTACGCG	TAGTGCAACC	
3061	GAACGCGACC	GCATGGTCAG	AAGCCGGGCA	CATCAGCGCC	TGGCAGCAGT	GGCGTCTGGC	
3121	GGAAAACCTC	AGTGTGACGC	TCCCCGCCCG	GTCCACGCCG	ATCCCGCATC	TGACCACCAG	
3181	CGAAATGGAT	TTTTGCATCG	AGCTGGGTAA	TAAGCGTTGG	CAATTTAACC	GCCAGTCAGG	
3241	CTTTCTTTCA	CAGATGTGGA	TTGGCGATAA	AAAACAACCTG	CTGACGCCCG	TGCGCGATCA	
3301	GTTCAACCGT	GCACCGCTGG	ATAACGACAT	TGGCGTAAAT	GAAGCGACCC	GCATTGACCC	
3361	TAACGCCTGG	GTCGAACGCT	GGAAGGCGGG	GGGCCATTAC	CAGGCCGAAG	CAGCGTTGTT	
3421	GCAGTGACAG	GCAGATACAC	TTGCTGATGC	GGTGCTGATT	ACGACCGGTC	ACGCGTGGCA	
3481	GCATCAGGGG	AAAACCTTAT	TTATCAGCCG	GAAAACCTAC	CGGATTGATG	GTAGTGGTCA	
3541	AATGGCGATT	ACCGTYGATG	TTGAAGTGGC	GAGCGATACA	CCGCATCCGG	CGCGGATTGG	
3601	CCTGAACTGC	CAGCTGGCGC	AGGTAGCAGA	GCGGGTAAAC	TGGCTCGGAT	TAGGGCCGCA	
3661	AGAAAACCTAT	CCCGACCGCC	TTACTGCCCG	CTGTTTGGAC	CGCTGGGATC	TGCCATTGTC	
3721	AGACATGTAT	ACCCCGTACG	TCTTCCCGAG	CGAAAACGGT	CTGCGCTGCG	GGACGCGCGA	
3781	ATTGAATTAT	GGCCACACCC	AGTGGCGCGG	CGACTTCCAG	TTCAACATCA	GCCGCTACAG	
3841	TCAACAGCAA	CTGATGGAAA	CCAGCCATCG	CCATCTGCTG	CACGCGGAAG	AAGGCACATG	
3901	GCTGAATATC	GACGGTTTCC	ATATGGGGAT	TGGTGGCGAC	GACTCCTGGA	GCCCGTCAGT	
3961	ATCGGCGGAA	TTCCAGCTGA	GCGCGTTTCC	CTACCATTAC	CAGTTGGTCT	GGTGTCAAAA	
4021	ATAAGGATCC	TCGATACCAA	CAACGGTAGA	AAGTGTTACA	ATATCTACTA	CAAAATATAC	
4081	AACTAGTGAC	TTTATAGAGA	TATTTGGCAT	TGTTTCACTA	ATTTTATTAT	TGGCGTGGC	
4141	GATTTTCTGT	ATTATATATT	ATTTCTGTAG	TGGACGGTCT	CGTAAACAAG	AAACAAATAT	
4201	ATTATAGATT	TTAACTCAGA	TAAATGTCTG	GAATAATTAA	ATCTATCGTT	TTGAGCGGAC	
4261	CATCTGGTTC	CGGCAAGACA	GCTATAGTCA	GGAGACTCTT	ACAAGATTAT	GGAAATATAT	
4321	TTGGATTGTG	GGTATCCCAT	ACCATAGAT	TTCTCTGCTC	TATGGAACGA	GAAGGTGTCT	
4381	TCTACCATTA	CGTTAACAGA	GAGGCCATTT	GGAAGGGAAT	AGCCGCTGGA	AACCTGTCTAG	
4441	AACATACAGA	GTTTTTGGA	AATATTTATG	GGACTTCTAA	AACATCCATG	AACACAGCTG	
4501	CTATTAATAA	TCGTATATGT	GTTATGGATT	TAAACATTGA	CGGAGTTAGG	AGTCTTAAAA	
4561	ACACATACTT	GATGCCCTTAC	TCTGTTTATA	TAAGACCTAC	ATCTCTTAAA	ATGGTAGAAA	
4621	CTGCATGCCC	TGATCGGGTA	TTTTCTCCTT	ACGCATCTGT	GCGGTATTTT	ACACCGCATA	
4681	TGGTGCACCT	TCAGTACAAT	CTGCTCTGAT	GCCGCATAGT	TAAGCCAGCC	CCGACACCCG	
4741	CCAACACCCG	CTGACGCGCC	CTGACGGGCT	TGTCTGCTCC	CGGCATCCGC	TTACAGACAA	
4801	GCTGTGACCG	TCTCCGGGAG	CTGCATGTGT	CAGAGGTTTT	CACCGTCATC	ACCGAAACGC	
4861	GCGAGACGAA	AGGGCCTCGT	GATACGCCTA	TTTTTATAGG	TTAATGTCT	GATAATAATG	
4921	GTTTCTTAGA	CGTCAGGTGG	CACTTTTCGG	GGAAATGTGC	GCGGAAACCC	TATTTGTTTA	
4981	TTTTTCTAAA	TACATTCAAA	TATGTATCCG	CTCATGAGAC	AATAACCCCTG	ATAAATGCTT	
5041	CAATAATATT	GAAAAAGGAA	GAGTATGAGT	ATTCAACATT	TCCGTGTCCG	CCTTATTTCC	
5101	TTTTTTGCGG	CATTTTGCCT	TCCTGTTTTT	GCTCACCAG	AAACGCTGGT	AAAGGTAAAA	
5161	GATGCTGAAG	ATCAGTTGGG	TGCACGAGTG	GGTTACATCG	AACTGGATCT	CAACAGCGGT	
5221	AAGATCCTTG	AGAGTTTTTC	CCCCGAAAGAA	CGTTTTCCAA	TGATGAGCAC	TTTTAAAGTT	
5281	CTGCTATGTG	GCGCGGTATT	ATCCCGTATT	GACGCGGGGC	AAGAGCAACT	CGGTCCGCGC	
5341	ATACACTATT	CTCAGAAATGA	CTTGTTTGAG	TACTCACCAG	TCACAGAAAA	GCATCTTACG	
5401	GATGGCATGA	CAGTAAGAGA	ATTATGCAGT	GCTGCCATAA	CCATGAGTGA	TAACACTGCG	
5461	GCCAACTTAC	TTCTGACAAC	GATCGGAGGA	CCGAAGGAGC	TAACCGCTTT	TTTGACAAC	
5521	ATGGGGGATC	ATGTAACCTG	CCTTGATCGT	TGGGAACCGG	AGCTGAATGA	AGCCATACCA	
5581	AACGACGAGC	GTGACACCAC	GATGCCTGTA	GCAATGGCAA	CAACGTTGCG	CAAACTATTA	
5641	ACTGGCGAAC	TACTTACTCT	AGCTTCCCAG	CTTCCGGCTG	GCTGGTTTAT	TGCTGATAAA	
5701	AAAGTTGCAG	GACCACTTCT	GCGCTCGGCT	ATCATTGCAG	CACTGGGGCC	AGATGGTAAG	
5761	TCTGGAGCCG	GTGAGCGTGG	GTCTCGCGCT	GGGAGTCAGG	CAACTATGGA	TGAACGAAAT	
5821	CCCTCCCGTA	TCGTAGTTAT	CTACACGACG	ATTAAGCATT	GGTAACTGTC	AGACCAAGTT	
5881	AGACAGATCG	CTGAGATAGG	TGCCTCACAG	CITTCATTTT	AATTTAAAG	GATCTAGGTG	
5941	TACTCATATA	TACTTTAGAT	TGATTTAAJA	ATCCCTTAAC	GTGAGTTTTT	GTTCCACTGA	
6001	AAGATCCITT	TTGATAATCT	CATGACCAJA	TCTTCTTGAG	ATCCTTTTTT	TCTGCGCGTA	
6061	GCGTCAGACC	CCGTAGAAAA	AAAACCACCG	TACCAGCGG	TGGTTTGTGT	GCCGGATCAA	
6121	ATCTGCTGCT	TGCAAAACAA	GAAGGTAAC	GGCTTCAGCA	GAGCGCAGAT	ACCAATACT	
6181	GAGCTACCAA	CTCTTTTTCC	GTTAGGCCAC	CACCTCAAGA	ACTCTGTAGC	ACCGCTACA	
6241	GTTCTTCTAG	TGTAGCCGTA	GTTACCAGTG	GCTGCTGCCA	GTGGCGATAA	GTCGTGTCTT	
6301	TACCTCGCTC	TGCTAATCCT	ATAGTTACCG	GATAAGGCGC	AGCGTCCGGG	CTGAACGGGG	
6361	ACCGGTTTGG	ACTCAAGACG					

Solicitud No. N/N Figura 1 (continuación) de 12
Inventor Stephen Qitu WU, et al Cliente No. 25291
Registro de Abogado No: Am102713
Título: POXVIRUS DE MAMÍFERO QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

plásmido pFD2000A-FAH-Seq

6421	GGTTCGTGCA	CACAGCCCAG	CTTGGAGCGA	ACGACCTACA	CCGAACTGAG	ATACCTACAG
6481	CGTGAGCTAT	GAGAAAGCGC	CACGCTTCCC	GAAGGGAGAA	AGGCGGACAG	GTATCCGGTA
6541	AGCGGCAGGG	TCGGAACAGG	AGAGCGCAGG	AGGGAGCTTC	CAGGGGGAAA	CGCCTGGTAT
6601	CTTTATAGTC	CTGTCCGGTT	TCGCCACCTC	TGACTTGAGC	GTGATTTTTT	GTGATGCTCG
6661	TCAGGGGGGC	GGAGCCTATG	GAAAAACGCC	AGCAACCGCG	CCTTTTTACG	GTTCTCTGGCC
6721	TTTGTCTGGC	CTTTTGCTCA	CATGTTCTTT	CCTGCGTTAT	CCCCTGATTG	TGTGGATAAC
6781	CGTATTACCG	CCTTTGAGTG	AGCTGATACC	GCTCGCCGCA	GCCGAACGAC	CGAGCGCAGC
6841	GAGTCAGTGA	GCGAGGAAGC	GGAAGAGAGC	TC		

000136

Solicitud No. N/N Figura 2 de 12
Inventor Stephen Qitu WU, et al Cliente No. 25291
Registro de Abogado No: Am102713
Titulo: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

Figura 2

Secuencia de ADN completa de **plásmido pFD2001TK-FDAH-seq** **5508 bp** **29-MAY-2007**

CARACTERÍSTICAS Localización/calificadores

insertion_seq 1..538
 /note= "Izquierda TK"

insertion_seq 2767..3270
 /note= "Derecha TK"

CDS 943..2760
 /note= "gus ORF"

CDS 3707..4567
 /note= "ORF ampicilina"

misc_feature 539..576
 /note= "sitios de clonación múltiples"

promotor 577..675
 /note= "promotor SE/L "

promotor 676..942
 /note= "promotor P7.5"

CONTEO BASE 1540 A 1206 C 1335 G 1427 T 0 OTRO

ORIGEN

```
1 GAGCTCATAA ATAGTAAACC GATAGTGTAT AAAGATTGTG CAATGCTTTT GCGATCAATA
61 AATGGATCAC AACCAGTATC TGTTCACGAT GTTCTTCGCA GATGATGATT CATTITTTTAA
121 ATATTTAGCT AGTCAAGACG ATGAATCTTC ATTATCCGAT ATATTGCAAA TTACCCAATA
181 TCTTGATTTT TTATTGTTGT TATTGATACA GTCAAAAAAT AAAGTAGAGG CTGTAGGTCA
241 TTGTTATGAA TCTCTTCGG AGGAATATAG ACAATTGGCG AAATTTACAG AACTTAATAA
301 GTTTAAAAAA CTATTTAATA AGGTTCCCTAT TGCTACAGAC GGACGCGTTA AACTTAATAA
361 AGGGTATTTA TTTGACTTTG TTGTCAGTAT GATGAGATTT AAAAAAGAGT CATCTATAAT
421 ACCAAACATA GATCCGGTTC GATACATAGA TCCTCGTCGA GATATAGTAT TTTCTAACGT
481 AATGGATATA TTAAAGTCTA ATAAAGTGAA CAATAATTAA ATTTTTATTG TCACCTAGGA
541 ATTCGTCGAC GCGGCCGCTT GCAGAAGCTT GGTACCATTT ATATTCCTAA AAAAAAAAT
601 AAAATTTCAA TTTTACATA CATATATTCT AAATATGAAA GTGGTGATTG TGACTAGCGT
661 AGCATCGCTT CTAGACATCT ATATACTATA TAGTAATACC AATACTCAAG ACTACGAAAC
721 TGATACAATC TCTTATCATG TGGGTAAATG TCTCGATGTC GATAGCCATA TGCCCGGTAG
781 TTGCGATATA CATAAACTGA TCACTAATTC CAAACCCACC CGCTTTTATAT AGTAAGTTTT
841 TTACCCATAA ATAATAAATA CAATAATTAA TTTCTCGTAA AAGTAGAAAA TATATTCTAA
901 TTTATTGCAC GGTAAGGAAG TAGAATCATA AAGAACAGTG ACATGGATCC GGTCCGTCTT
961 GTAGAAACCC CAACCCGTGA AATCAAAAAA CTCGACGGCC TGTGGGCATT CAGTCTGGAT
1021 CGCGAAACT GTGGAATTGA TCAGCGTTGG TGGGAAAGCG CGTTACAAGA AAGCCGGGCA
1081 ATTGCTGTGC CAGGCAGTTT TAACGATCAG TTECGCCGAT CAGATATTCG TAATTATGCG
1141 GGCAACGCTT GGTATCAGCG CGAAGTCTTT ATACCGAAAG GTTGGGCAGG CCAGCGTATC
1201 GTGCTGCGTT TCGATGCGGT CACTCATTAC GGCAAAAGTG GGGTCAATAA TCAAGGATG
1261 ATGGAGCATC AGGGCGGCTA TACGCCATTT GAAGCCGATG TCACGCGGTA TGTATTGCC
1321 GGGAAAAGTG TACGTATCAC CGTTTGTGTG AACAACGAAC TGAAGTGGCA GACTATCCCG
1381 CCGGGAATGG TGATTACCGA CGAAAACGGC AAGAAAAGC AGTCTTACTT CCATGATTTT
1441 TTTAACTATG CCGGAATCCA TCGCAGCGTA ATGCTCTACA CCACGCCGAA CACCTGGGTG
1501 GACGATATCA CCGTGGTGAC GCATGTGCGG CAAGACTGTA ACCACGCGTC TGTGACTGG
1561 CAGGTGGTGG CCAATGGTGA TGTACGCGTT GAACTGCGTG ATGCGGATCA ACAGGTGGTT
1621 GCAACTGGAC AAGGCACTAG CGGGACTTTG CAAGTGGTGA ATCCGCACCT CTGGCAACCG
1681 GGTGAAGGTT ATCTCTATGA ACTGTGCGTC ACAGCCAAA GGCAGACAGA GTGTGATATC
1741 TACCCGCTTC GCGTCGGCAT CCGGTCAGTG GCAGTGAAGG GCCAACAGT CCTGATTAAC
1801 CACAAACCGT TCTACTTTAC TGGCTTTGGT CGTCATGAAG ATGCGGACTT ACGTGGCAAA
1861 GGATTCGATA ACGTGCTGAT GGTGCACGAC CACGCATTAA TGGACTGGAT TGGGGCCAAC
1921 TCCTACCGTA CCTCGCATT CCCTTACGCT GAAGAGATGC TCGACTGGGC AGATGAACAT
1981 GGCATCGTGG TGATTGATGA AACTGCTGCT GTCGGCTTTT CGCTCTCTTT AGGCATTGGT
2041 TTCGAAGCGG GCAACAAGCC GAAAGAACTG TACAGCGAAG AGGCAGTCAA CGGGGAAACT
2101 CAGCAAGCGC ACTTACAGGC GATTAAAGAG CTGATAGCGC GTGACAAAA CCACCCAAGC
2161 GTGGTGATGT GGAGTATTGC CAACGAACCG GATACCCGTC CGCAAGGTGC ACGGGAATAT
2221 TTGCGGCCAC TGGCGGAAGC AACGEGTAAJ CTCGACCCGA CGCGTCCGAT CACTGCGTC
2281 AATGTAATGT TCTGCGACGC TCACACCGAT ACCATCAGCG ATCTCTTTGA TGTGCTGTGC
2341 CTGAACCGTT ATTACGGATG GTATGTCCAA AGCGGCGATT TGGAAACGGC AGAGAAGGTA
2401 CTGGAAGGAG AACTTCTGGC CTGGCAGGAG AAAGTGCATC AGCCGATTAT CATACCGAA
2461 TACGGCGTGG ATACGTTAGC CGGGCTGCAC TCAATGTACA CCGACATGTG GAGTGAAGAG
```

Figura 2 (continuación)

plásmido pFD2001TK-FDAH-seq							
2521	TATCAGTGTG	CATGGCTGGA	TATGTATCAC	CGCGTCTTTG	ATCGCGTCAG	CGCCGTCGTC	
2581	GGTGAACAGG	TATGGAATTT	CGCCGATTTT	GCGACCTCGC	AAGGCATATT	GCGCGTTGGC	
2641	GGTAACAAGA	AAGGGATCTT	CACTCGCGAC	CGCAAACCGA	AGTCGGCGGC	TTTTCTGCTG	
2701	CAAAAACGCT	GGACTGGCAT	GAACTTCGGT	GAAAAACCGC	AGCAGGGAGG	CAAACAATGA	
2761	GGATCCGGAA	ATGGTAGTAA	AACTGACAGC	GGTATGTATG	AAATGCTTTA	AAGAGGCGTC	
2821	GTTTTCTAAA	CGTTTGGGAA	CGGAAACCGA	GATCGAAATA	ATTGGTGGTG	AAGATATGTA	
2881	TCAATCCGTA	TGCAGAAAGT	GTTACATCAA	CGAATGATAA	TTTTCTATA	AAAAACTAAA	
2941	AATAAACATT	GATTAATTTT	TAATATAATA	CTTAAAAATG	GATGTTGTGT	CACTGGATAA	
3001	ACCGTTTATG	TATTTTGAGG	AAATAGATAA	TGAACTAGAA	TACGAACCAG	AAAGTGCAAA	
3061	TGAGGTTGCT	AAAAAACTTC	CATATCAGGG	ACAATTAAAA	CTATTACTAG	GAGAATTGTT	
3121	TTTTCTTAGT	AAGCTACAGA	GACACGGTAT	ATTGGACGGT	GCCACTGTAG	TGTATATAGG	
3181	ATCGGCTCCT	GGTACACACA	TACGTTATCT	ACGTGATCAT	TTCTATAATT	TAGGGGTAAT	
3241	CATCAAATGG	ATGCTAATTG	ACGGGCATGC	CCTGATGCGG	TATTTTCTCC	TTACGCATCT	
3301	GTGCGGTATT	TCACACCGCA	TATGGTGCAC	TCTCAGTACA	ATCTGCTCTG	ATGCCGCATA	
3361	GTTAAGCCAG	CCCCGACACC	CGCCAACACC	CGCTGACGCG	CCCTGACGGG	CTTGTCTGCT	
3421	CCCGGCATCC	GCTTACAGAC	AAGCTGTGAC	CGTCTCCGGG	AGCTGCATGT	GTCAGAGGTT	
3481	TTACCCGTC	TCACCGAAAC	GCGCGAGACG	AAAGGGCCTC	GTGATACGCC	TATTTTATA	
3541	GGTTAATGTC	ATGATAATAA	TGGTTTCTTA	GACGTCAGGT	GGCACTTTTC	GGGGAAATGT	
3601	AGTCAGGAAC	CCTATTTGTT	TATTTTCTA	AATACATTCA	AATATGTATC	CGCTCATGAG	
3661	ACAATAACCC	TGATAAATGC	TTCAATAATA	TTGAAAAAGG	AAGAGTATGA	GTATTCAACA	
3721	TTTCCGTGTC	GCCCTTATTC	CTTTTTTTC	GGCATTTTGC	CTTCTGTGTT	TTGCTCACCC	
3781	AGAAACGCTG	GTGAAAGTAA	AAGATGCTGA	AGATCAGTTG	GGTGACAGAG	TGGGTTACAT	
3841	CGAACTGGAT	CTCAACAGCG	GTAAGATCCT	TGAGAGTTTT	CGCCCCGAAG	AACGTTTTC	
3901	AATGATGAGC	ACTTTTAAAG	TTCTGCTATG	TGGCGCGGTA	TTATCCCGTA	TTGACGCCGG	
3961	GCAAGAGCAA	CTCGGTCCGC	GCATACACTA	TTCTCAGAA	GACTTGGTTG	AGTACTCACC	
4021	AGTCACAGAA	AAGCATCTTA	CGGATGGCAT	GACAGTAAGA	GAATTATGCA	GTGCTGCCAT	
4081	AACCATGAGT	GATAACACTG	CGGCCAACTT	ACTTCTGACA	ACGATCGGAG	GACCGAAGGA	
4141	GCTAACCGCT	TTTTTGACAA	ACATGGGGGA	TCTGTAACT	CGCCTTGATC	GTTGGGAACC	
4201	GGAGCTGAAT	GAAGCCATAC	CAAACGACGA	GCGTGACACC	ACGATGCCCT	TAGCAATTGGC	
4261	AACAACGTTG	CGCAAACAT	TAAGTGGCGA	ACTACTTACT	CTAGCTTCCC	GGCAACAATT	
4321	AATAGACTGG	ATGGAGGCGG	ATAAAGTTGC	AGGACCACTT	CTGCGCTCGG	CCCTTCCGGC	
4381	TGGCTGGTTT	ATTGCTGATA	AATCTGGAGC	CGGTGAGCGT	GGGTCTCGCG	GTATCATTGC	
4441	AGCACTGGGG	CCAGATGGTA	AGCCCTCCCG	TATCGTAGTT	ATCTACACGA	CGGGGAGTCA	
4501	GGCAACTATG	GATGAACGAA	ATAGACAGAT	CGCTGAGATA	GGTGCCTCAC	TGATTAAGCA	
4561	TYGGTAACTG	TCAGACCAAG	TTTACTCATA	TATACTTTAG	ATTGATTTAA	AACTTCATT	
4621	TTAATTTAAA	AGGATCTAGG	TGAAGATCCT	TTTTGATAAT	CTCATGACCA	AAATCCCTTA	
4681	ACGTGAGTTT	TCGTTCCACT	GAGCGTCAGA	CCCCGTAGAA	AAGATCAAAG	GATCTTCTTG	
4741	AGATCCTTTT	TTTCTGCGCG	TAATCTGCTG	CTTGCAAACA	AAAAAACCAC	CGCTACCAGC	
4801	GGTGGTTTGT	TTGCCGGATC	AAGAGCTACC	AATCTTTTTT	CCGAAGGTAA	CTGGCTTCAG	
4861	CAGAGCGCAG	ATACCAAATA	CTGTTCTTCT	AGTGTAGCCG	TAGTTAGGCC	ACCACTTCAA	
4921	GAACTCTGTA	GCACCGCCTA	CATACCTCGC	TCTGCTAATC	CTGTTACCAG	TGGCTGCTGC	
4981	CAGTGGCGAT	AAGTCGTGTC	TTACCGGGTT	GGACTCAAGA	CGATAGTTAC	CGGATAAGGC	
5041	GCAGCGGTCTG	GGCTGAACGG	GGGGTTCGTG	CACACAGCCC	AGCTTGGAGC	GAACGACCTA	
5101	CACCGAACTG	AGATACCTAC	AGCGTGAGCT	ATGAGAAAGC	GCCACGCTTC	CCGAAGGGAG	
5161	AAAGGCGGAC	AGGTATCCGG	TAAGCGGCAG	GGTCGGAACA	GGAGAGCGCA	CGAGGGAGCT	
5221	TCCAGGGGGA	AACGCCTGGT	ATCTTTATAG	TCCTGTCCGG	TTTCGCCACC	TCTGACTTGA	
5281	GCGTCGATTT	TTGTGATGCT	CGTCAGGGGG	GCGGAGCCTA	TGGAAAAACG	CCAGCAACGC	
5341	GGCCTTTTTA	CGGTTCTTGG	CTTTTGTCTG	GCCTTTTGCT	CACATGTTCT	TTCTGCGTT	
5401	ATCCCTTGAT	TCTGTGGATA	ACCGTATTAC	CGCCTTTGAG	TGAGCTGATA	CCGCTCGCCG	
5461	CAGCCGAACG	ACCGAGCGCA	GCGAGTCAGT	GAGCGAGGAA	GCGGAAGA		

Figura 3

Secuencia de ADN completa de		plásmido pFD2003SEL-FDAH-Seq	6820 bp	29-May-2007
CARACTERÍSTICAS		Localización/calificadores		
insertion_seq	1..557	/note="Izquierda HA"		
insertion_seq	3979..4570	/note="Derecha HA"		
CDS	916..3972	/note="1x2 ORF"		
misc_feature	558..589	/note="sitios de clonación múltiples"		
CDS	5013..5873	/note="ORF ampicilina"		
promotor	<649..921	/note="Promotores < P11 and P7.5 >"		
frag	590..648	/note="1 a 59 de secuencia SEL"		
CONTEO BASE	1772 A	1646 C	1697 G	1705 T 0 OTRO

ORIGEN

1	TTATTGGACA	CTAGATAATC	ATCACATGTT	ACCACAAAAT	TATATAATGT	ATAAATGCGA
61	AATTATTAAA	CGCAAAATATC	CATGGGAAJA	CGCGCAGTAT	ACAGACGATT	TTTTACAGTA
121	TTTGGAGAGT	TTTATAGGAA	GTATATAGAG	TAGAACCAGA	ATTTTGTAAA	AATAAATCAC
181	ATTTTTATAC	TAATATGAAA	CAACTATGSA	TAGTTATATT	GCTACTATCG	ATAGTATATA
241	CAACCAAACC	TCATCCTACA	CAGATATCAA	AAAAACTAGG	CGATGATGCT	ACTCTATCGT
301	GTAATAGAAA	CAATACACAT	GGATATCTTG	TCATGAGTTC	TTGGTATAAG	AAACCAGACT
361	CCATTATTCT	CTTAGCAGCC	AAAAACGATG	TCGTATACTT	TGATGATTAT	ACAGCGGATA
421	AAGTATCATA	CGATTACCCG	TATGATACTC	TAGCTACAAT	TATTACAATT	AAATCATTGA
481	CATCTGGAGA	TGCAGGTACT	TATATATGCG	CATTCTTTAT	AACATCAACA	ATGATACGGG
541	ATAAAATAGA	TTATGAAGAA	TTCGTCGACG	CGGCCGCTG	CAGAAGCTTG	GTACCATGGG
601	TATTTATATT	CCAAAAAATA	AAAAATAAAT	TTCAATTTTT	GCTCTAGACA	TCTATATACT
661	ATATAGTAAT	ACCAATACTC	AAGACTACGA	AACGATACA	ATCTCTTATC	ATGTGGGTAA
721	TGTTCTCGAT	GTCGATAGCC	ATATGCCCGG	TAGTTGCGAT	ATACATAAAC	TGATCACTAA
781	TTCCAAACCC	ACCCGCTTTT	TATAGTAAGT	TTTTCACCCA	TAAATAATAA	ATACAATAAT
841	TAATTTCTCG	TAAAAGTAGA	AAATATATTTC	TAATTTATTG	CACGGTAAGG	AAGTAGAATC
901	ATAAAGAACA	GTGACATGGA	TCCCGTCGTT	TTACAACGTC	GTGACTGGGA	AAACCTGGC
961	GTTACCCAAC	TTAATCGCCT	TGCAGCACAT	CCCCCTTTCG	CCAGCTGGCG	TAATAGCGAA
1021	GAGGCCCGCA	CCGATCGCCC	TTCCCAACAG	TTGCGCAGCC	TGAATGGCGA	ATGGCGCTTT
1081	GCCTGGTTTC	CGGCACCAGA	AGCGGTGCCG	GAAAGCTGGC	TGGAGTGCGA	TCTTCCTGAG
1141	GCCGATACTG	TCGTGCTCCC	CTCAAACTGG	CAGATGCACG	GTTACGATGC	GCCCATCTAC
1201	ACCAACGTAA	CCTATCCCAT	CCGCGGTTTG	TTCCACGGA	GAATCCGACG	CCAGACGCGA
1261	GGTTGTTACT	CGCTCACATT	TAATGTTGAT	GAAAGCTGGC	TACAGGAAGG	CTGGGTGGT
1321	ATTATTTTTC	ATGGCGTTAA	CTCGGCGTTT	CATCTGTGGT	GCAACGGGCG	ACGCGCCGGA
1381	TACGGCCAGG	ACAGTCGTTT	GCCGTCTGAA	TTTGACCTGA	GCGCATTTTT	GGAAGATCAG
1441	GAAAACCGCC	TCGCGGTGAT	GGTGCTGCGT	TGGAGTGACG	GCAGTTATCT	ACCGACTACA
1501	GATATGTGGC	GGATGAGCGG	CATTTTCCGT	GACGTCTCGT	TGCTGCATAA	CGCTGTACTG
1561	CAAATCAGCG	ATTTCATGT	TGCCACTCGC	TTTAATGATG	ATTTAGCCCG	AGTTTCTTTA
1621	GAGGCTGAAG	TTCAGATGTG	CGGCGAGTTG	CGTGACTACC	TACGGGTAAC	AGTTTCTTTA
1681	TGGCAGGGTG	AAACGCAGGT	CGCCAGCGGC	ACCGCGCCTT	TCGGCGGTGA	AATTATCGAT
1741	GAGCGTGGTG	GTTATGCCGA	TGCGCTCACA	CTACGTCTCA	AGGTGCAAAA	CCCGAAACTG
1801	TGGAGCGCCG	AAATCCCGAA	TCTCTATCGT	GCGGTGGTTG	AAGTGCACAC	CGCCGACGGC
1861	ACGCTGATTG	AAGCAGAAGC	CTGCGATGTC	GGTTTCCGCG	AGGTGCGGAT	TGAAAATGGT
1921	CTGCTGCTGC	TGAACGGCAA	GCCGTTGCTG	ATTTCGAGCG	TTAACCGTCA	CGAGCATCAT
1981	CCTCTGCATG	GTCAGGTCAT	GGATGAGCAG	ACGATGGTGC	AGGATATCCT	GCTGATGAAG
2041	CAGAACAAC	TTAACGCCGT	GCGCTGTTTC	CATTATCCGA	ACCATCCGCT	GTGGTACACG
2101	CTGTGCGACC	GCTACGGCCT	GTATGTGGTG	GATGAAGCCA	ATATTGAAAC	CCACGGCATG
2161	GTGCCAATCA	ATCGTCTGAC	CGATGATCCG	CGCTGGCTAC	CGGCGATGAG	CGAACGCGTA
2221	ACGCGAATGG	TGCAGCGCGA	TCGTAATCAC	CCGAGTGTGA	TCATCTGGTC	GCTGGGGAAT
2281	GAATCAGGCC	ACGGCGCTAA	TCACGACGCG	CTGTATCGCT	GGATCAAATC	TGTCGATCCT
2341	TCCCGCCCGG	TGCAGTATGA	AGGCGGCGGA	GCCGACACCA	CGGCCACCGA	TATTATTTGC
2401	CCGATGTACG	CGCGCGTGGA	TGAAGACGAG	CCCTTCCCGG	CTGTGCCGAA	ATGGTCCATC
2461	AAAAAATGGC	TTTCGCTACC	TGGAGAGACG	CGCCCGCTGA	TCCTTTGCGA	ATACGCCAC

000139

Solicitud No. N/N Figura 3 (continuación) de 12
Inventor Stephen Qitu WU, et al Cliente No. 25291
Registro de Abogado No: Am102713
Titulo: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

Figura 3 (continuación)

plásmido pFD2003SEL-FDAH-Seq

2521	GCGATGGGTA	ACAGTCTTGG	CGGTTTCGCT	AAATACTGGC	AGGCGTTTCG	TCAGTATCCC
2581	CGTTTACAGG	GCGGCTTCGT	CTGGGACTGG	GTGGATCAGT	CGCTGATTAA	ATATGATGAA
2641	AACGGCAACC	CGTGGTCGGC	TTACGGCGGT	GATTTTGGCG	ATACGCCGAA	CGATCGCCAG
2701	TTCTGTATGA	ACGGTCTGGT	CTTTGCCGAC	CGCACGCCGC	ATCCAGCGCT	GACGGAAGCA
2761	AAACACCAGC	AGCAGTTTTT	CCAGTTCGGT	TTATCCGGGC	AAACCATCGA	AGTGACCAGC
2821	GAATACCTGT	TCCGTCATAG	CGATAACGAG	CTCCTGCACT	GGATGGTGGC	GCTGGATGGT
2881	AAGCCGCTGG	CAAGCGGTGA	AGTGCCCTCG	GATGTCGCTC	CACAAGGTAA	ACAGTTGATT
2941	GAAGTGCCTG	AACTACCGCA	GCCGGAGAGC	GCCGGGCAAC	TCTGGCTCAC	AGTACGCGTA
3001	GTGCAACCGA	ACGCGACCGC	ATGGTCAGAA	GCCGGGCACA	TCAGCGCCTG	GCAGCAGTGG
3061	CGTCTGGCGG	AAAACCTCAG	TGTGACGCTC	CCCGCCGCGT	CCCACGCCAT	CCCGCATCTG
3121	ACCACCAGCG	AAATGGATTT	TTGCATCGAG	CTGGGTAATA	AGCGTTGGCA	ATTTAACCGC
3181	CAGTCAGGCT	TTCTTTTACA	GATGTGGATT	GGCGATAAAA	AACAACCTGT	GACGCCGCTG
3241	CGCGATCAGT	TCACCCGTGC	ACCGCTGGAT	AACGACATTG	GCGTAAGTGA	AGCGACCCGC
3301	ATTGACCTTA	ACGCTCTGGT	CGAACGCTGG	AAGGCGGCGG	GCCATTACCA	GGCCGAAGCA
3361	GCGTTGTTGC	AGTGACCGGC	AGATACACTT	GCTGATGCGG	TGCTGATTAC	GACCGGTCA
3421	GCGTGGCAGC	ATCAGGGGAA	AACTTTATT	ATCAGCCGGA	AAACCTACCG	GATTGATGGT
3481	AGTGGTCAAA	TGGCGATTAC	CGTTGATGTT	GAAGTGGCGA	GCGATACACC	GCATCCGGCG
3541	CGGATTGGCC	TGAACTGCCA	GCTGGCGCAG	GTAGCAGAGC	GGGTAAACTG	GCTCGGATTA
3601	GGGCCGCAAG	AAAACCTATC	CGACCGCCTT	ACTGCCGCTT	GTTTTGACCG	CTGGGATCTG
3661	CCATTGTGAG	ACATGTATAC	CCCGTACGTC	TTCCCGAGCG	AAAACGGTCT	GCGCTGCGGG
3721	ACGCGCGAAT	TGAATTATGG	CCCACACCAK	TGGCGCGCGG	ACTTCCAGTT	CAACATCAGC
3781	CGCTACAGTC	AACAGCAACT	GATGGAAACC	AGCCATCGCC	ATCTGCTGCA	CGCGGAAGAA
3841	GGCACATGGC	TGAATATCGA	CGGTTTCCAT	ATGGGGATTG	GTGGCGACGA	CTCCTGGAGC
3901	CCGTCAGTAT	CGGCGGAATT	CCAGCTGAGC	GCCGTTTCGT	ACCATTACCA	GTTGGTCTGG
3961	TGTCAAAAAT	AAGGATCCTC	GATACCAACA	ACGGTAGAAA	GTGTTACAAT	ATCTACTACA
4021	AAATATACAA	CTAGTGACTT	TATAGAGATA	TTTGGCATTG	TTTCACTAAT	TTTATTATTG
4081	GCCGTGGCGA	TTTTCTGTAT	TATATATTAT	TTCTGTAGTG	GACGGTCTCG	TAAACAAGAA
4141	ACAAATATAT	TATAGATTTT	AACTCAGATA	AATGTCTGGA	ATAATTAAAT	CTATCGTTTT
4201	GAGCGGACCA	TCTGGTTCCG	GCAAGACAGC	TATAGTCAGG	AGACTCTTAC	AAGATTATGG
4261	AAATATATTT	GGATTTGTGG	TATCCCATAC	CACTAGATTT	CCTCGTCTTA	TGGAACGAGA
4321	AGGTGTCGTC	TACCATTACG	TTAACAGAGA	GGCCATTGGG	AAGGGAATAG	CCGCTGGAAA
4381	CTTGCTAGAA	CATACAGAGT	TTTTGGGAA	TATTTATGGG	ACTTCTAAAA	CATCCATGAA
4441	CACAGCTGCT	ATTAATAATC	GTATATGTGT	TATGGATTTA	AACATTGACG	GAGTTAGGAG
4501	YCTTAAAAAC	ACATACTTGA	TGCCTTACTC	TGTTTTATATA	AGACCTACAT	CTCTTAAAT
4561	GGTAGAAACT	GCATGCCCTG	ATGCGGTATT	TTCTCCTTAC	GCATCTGTGC	GATATTTTAC
4621	ACCGCATATG	GTGCACTCTC	AGTACAATCT	GCTCTGATGC	CGCATAGTTA	AGCCAGCCCC
4681	GACACCCGCC	AACACCCGCT	GACGCGCCCT	GACGGGCTTG	TCTGCTCCCG	GCATCCGCTT
4741	ACAGACAAGC	TGTGACCGTC	TCCGGGAGCT	GCATGTGTCA	GAGGTTTTCA	CCGTCAATCAC
4801	CGAAACGCGC	GAGACGAAAG	GCCCTCGTGA	TACGCCTATT	TTTATAGGTT	AATGTCATGA
4861	TAATAATGGT	TTCTTAGACG	TCAGGTGGCA	CTTTTCGGGG	AAATGTGCGC	GGAAACCCCTA
4921	TTTGTTTATT	TTTCTAAATA	CATTCAAATA	TGTATCCGCT	CATGAGACAA	TAACCCGTAT
4981	AAATGCTTCA	ATAATATTGA	AAAAGGAAGA	GTATGAGTAT	TCAACATTTT	CGTTTCGCCC
5041	TTATTCCTTT	TTTTGCGGCA	TTTTGCCTTC	CTGTTTTTGC	TCACCCAGAA	ACGCTGGTGA
5101	AAGTAAAGAA	TGCTGAAGAT	CAGTTGGGTG	CACGAGTGGG	TTACATCGAA	CTGGATCTCA
5161	ACAGCGGTAA	GATCCTTGAG	AGTTTTCGCC	CCGAAGAACG	TTTTCCAATG	ATGAGCACTT
5221	TTAAAGTTCT	GCTATGTGGC	GCGGTATTAT	CCCGTATTGA	CGCCGGGCAA	GAGCAACTCG
5281	GTGCGCGCAT	ACACTATTCT	CAGAATGACT	TGGTTGAGTA	CTCACCAGTC	ACAGAAAAGC
5341	ATCTTACGGA	TGGCATGACA	GTAAGAGAAT	TATGCAGTGC	TGCCATAACC	ATGAGTGATA
5401	CACTGCGGCG	CAACTTACTT	CTGACAACGA	TCGGAGGACC	GAAGGAGCTA	ACCGCTTTTT
5461	TGCACAACAT	GGGGGATCAT	GTAACCTCGC	TTGATCGTTG	GGAACCGGAG	CTGAATGAAG
5521	CCATACCAAA	CGACGAGCGT	GACACCACGA	TGCCTGTAGC	AATGGCAACA	ACGTTGCGCA
5581	AACTATTAAC	TGGCGAACTA	CTTACTCTAG	CTTCCCGGCA	ACAATTAATA	GACTGGATGG
5641	AGGCGGATAA	AGTTGCAGGA	CCACTTCTGC	GCTCGGCCCT	TCCGGCTGGC	TGGTTTATTG
5701	CTGATAAATC	TGGAGCCGGT	GAGCGTGGGT	CTCGCGGTAT	CATTGCAGCA	CTGGGGCCAG
5761	ATGGTAAGCC	CTCCCGTATC	GTAGTTATCT	ACACGACGGG	GAGTCAGGCA	ACTATGGATG
5821	AACGAAATAG	ACAGATCGCT	GAGATAGGTG	CCTCACTGAT	TAAGCATTGG	TAAGTGTGAT
5881	ACCAAGTTTA	CTCATATATA	CTTTAGATTG	ATTTAAAACT	TCATTTTTTAA	TTTAAAGGGA
5941	TCTAGGTGAA	GATCCTTTTT	GATAATCTCA	TGACCAAAAT	CCCTTAACGT	GAGTTTTTCGT
6001	TCCACTGAGC	GTCAGACCCC	GTAGAAAAGA	TCAAAGGATC	TTCTTGAGAT	CTTTTTTTTT
6061	TGCGCGTAAT	CTGCTGCTTG	CAACAAAAAA	AACCAACCGT	ACCAGCGGTG	GTTTGTGTTG
6121	CGGATCAAGA	GCTACCAACT	CTTTTTCCGA	AGGTAACCTG	CTTCAGCAGA	GCGCAGATAC
6181	CAAATACTGT	TCTTCTAGTG	TAGCCGTAGT	TAGGCCACCA	CTTCAAGAAC	TCTGTAGCAC
6241	CGCCTACATA	CCTCGCTCTG	CTAATCCTGT	TACCAGTGGC	TGCTGCCAGT	GGCGATAAGT

000140

Solicitud No. N/N Figura 3 (continuación) de 12
 Inventor Stephen Qitu WU, et al Cliente No. 25291
 Registro de Abogado No: Am102713
 Título: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

Figura 3 (continuación)

plásmido pFD2003SEL-FDAH-Seq

6301	CGTGTCTTAC	CGGGTTGGAC	TCAAGACGAT	AGTTACCGGA	TAAGGCGCAG	CGGTCGGGCT
6361	GAACGGGGGG	TTCGTGCACA	CAGCCAGCT	TGGAGCGAAC	GACCTACACC	GAAGTGAAGT
6421	ACCTACAGCG	TGAGCTATGA	GAAAGCGCCA	CGCTTCCCGA	AGGGAGAAAG	GCGGACAGGT
6481	ATCCGGTAAG	CGGCAGGGTC	GGAACAGGAG	AGCGCACGAG	GGAGCTTCCA	GGGGGAAACG
6541	CCTGGTATCT	TTATAGTCCT	GTCGGGTTTC	GCCACCTCTG	ACTTGAGCGT	CGATTTTTGT
6601	GATGCTCGTC	AGGGGGGCGG	AGCCTATGGA	AAAACGCCAG	CAACGCGGCC	TTTTTACGGT
6661	TCCTGGCCTT	TTGCTGGCCT	TTTGCTCACA	TGTTCTTTCC	TGCGTTATCC	CCTGATTCTG
6721	TGGATAACCG	TATTACCGCC	TTTGAGTGAG	CTGATACCGC	TCGCCGCAGC	CGAACGACCG
6781	AGCGCAGCGA	GTCACTGAGC	GAGGAAGCGG	AAGAGAGCTC		

000141

Solicitud No. N/N Figura 4 de 12
Inventor Stephen Qitu WU, et al Cliente No. 25291
Registro de Abogado No: Am102713
Titulo: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

Figura 4

Secuencia de ADN completa de plásmido pFD2003SEL-GPV-PV-FDAH-Seq 8373 bp May-29-2007

CARACTERÍSTICAS	Localización/calificadores
insertion_seq	1..557
	/note="Izquierda HA"
insertion_seq	5532..6123
	/note="Derecha HA"
CDS	2469..5525
	/note="LacZ ORF"
misc_feature	558..569
	/note="sitios de clonación múltiples"
CDS	6566..7426
	/note="ORF ampicilina"
promotor	2202..2468
	/note="v P7.5 promotor"
promotor	complement(2153..2195)
	/note="PSEL promotor"
CDS	complement(570..2150)
	/note="G Paris Rabias"
CONTEO BASE	2164 A 2028 C 2053 G 2128 T 0 OTRO

ORIGEN

```
1 TTATTGGACA CTAGATAATC ATCACATGTT ACCACAAAT TATATAATGT ATAAATGCGA
61 AATTATTAAA CGCAAATATC CATGGGAAAA CGCGCAGTAT ACAGACGATT TTFTACAGTA
121 TTTGGAGAGT TTTATAG3AA GTATATAGAG TAGAACCAGA ATTTTGTAAG AATAAATCAC
181 ATTTTATAC TAATATGAAA CAACTATCGA TAGTTATATT GCTACTATCG ATAGTATATA
241 CAACCAAACC TCATCTACA CAGATATCAA AAAAACTAGG CGATGATGCT ACTCTATCGT
301 GTAATAGAAA CAATACACAT GGATATCTTG TCATGAGTTC TTGGTATAAG AAACCAGACT
361 CCATTATTCT CTTAGCAGCC AAAAAAGTAT TCGTATACTT TGATGATTAT ACAGCGGATA
421 AAGTATCATA CGATTACCGG TATGATATCT TAGCTACAAT TATTACAATT AAATCATTGA
481 CATCTGGAGA TGCAGGTACT TATATATGCG CATCTTTTAT AACATCAACA AATGATACGG
541 ATAAATAGTA TTATGAAGAA TTCGTCGACT CACAGTCCGG TCTACCCCTC GCTCTTGTAT
601 GATTCCCATG AAGATATGAT CTTCCCGATT TGGGGAGTGA CTGACACCTC CCTCCCTGTC
661 CCTCTGAGAT TGTGTTGTGT AGGTTCCGAT CGATTGACTC TTCTCCAGCA TGTCTACAGG
721 AAAATTATCA ACATCAAGGC AGTCAGGACC CCGTCACTCA GTAATACATA CTCCCCCAG
781 TTCGGGAGAC CCAAGTCAAC TCCTGAGATC CGTTCGTGCA CATCGGGAAG GTGAACCTCA
841 ACAAAATCCT CAGCCTCGTC ACCGTTCTTG AAAACGGTAG ACGGGTCTGC CAGGGGGTGC
901 ATAAGGGGGA TAACCGAGGA TACCAACIAC TCCATATGTT GCTGGAGGAG GGATGATTGC
961 ATCTCTGGGA TTAAGACATT GCCGTCAGGT CCTAATATTA TACCATTGAA AAATACCCCG
1021 TTACATGAG GATGACACCT CCCCCCAACT CTAAACACC CTTTTGAAGG GATGATCTCA
1081 TTCCAAGTTC TGACTGACTT GTAGTGAGCA TCGGCTTCCA TCAAGGCTCT GTTGAATATG
1141 GTATATGCTT TTCCAAACCC AGGGACAAGT TTTCTTAAAT GACTGAGACG TCTGAAACTC
1201 ACTGACTTGG TGGTCATGAT GGACTCTAGT GCATCCAGAC ACTCCTCTCT CTTCTTGACC
1261 AACTCCTCTA CAACAAGGTG CTCAATTTCT GATGTTTGCA AGTCGTGCAA ATTGATCAAC
1321 TGACCGGGAG GGCACCATTT GTTTCAATTG TAGTCTTCTG TCGAGACCCA TGTTCATCC
1381 ATAAGTCTAA GTCCGAGAAC TCCACATIAC TGGAGTTTGC ATGCTCCTTT TAAAGACTTA
1441 TATAGGCCTC TTTCTCTAC AAAGCCGIAA GTCTCACTCC CTTTGGATGC TCTCTCCCT
1501 CTACTATTGG TAAAAATGTC ACAAGACATC CCTAGTCTCG GATTCTCGGG CATCCAAATG
1561 GTGTAATCGT GGTAGTGGGA GCAGTAGTGA GAAGACACCG CTACTCCTGA GCACTTCCCG
1621 CCAGGGGAAG CCCTCGAGTG AAGGATCTGT TCATATGGGT CCAAATCTGC CACACTTGG
1681 GATATGATAA CGAGAGACTC CTTGGTGATT TTTACAGTTC GAAGCCAGTG GTAGTCAGGG
1741 TACGGATTGT GTAGAGACTC TTCATATCTG GGGTCACCGG CCATCTTCCA GTTGTACCGG
1801 GCTCTACATG CATCTGGTGT TGGGCGGAAA TGCTTTCTTT TGAACGTGGT TGTGACATAA
1861 CCAACGAAGT TAGTGTAGGT TTCAGCCTCC GTCACAACCG CTGTGCAAGT GAACCCGTTT
1921 ATTTTATGG CTGAGATGTA TCCAACCTTA AGTTCATGT AGGAGAACCC TGACAGGTTG
1981 GTGCATCCTT CGTCTCCAC TACCAAAITG TTTGGGCAGC TGAGGTGATG TATGTCAATC
2041 GGGCTCCAGG GACCAAGCTT GTCTGGTATC GTGTAAATAG GGAATTTCCC AAAACACAAT
2101 GGAAAAACCA GAAGGGGTAC AAACAGGIGA GCCTGAGGAA CCGGTACCAT GGGTATTAT
2161 ATTCCAAAAA AAAAAATAA AATTTCAATT TTGCTCTAG ACATCTATAT ACTATATAGT
2221 AATACCAATA CTCAAGACTA CGAAACTCAT ACAATCTCT ATCATGTGGG TAATGTTCTC
2281 GATGTCGATA GCCATATGCC CGGTAGTTGC GATATACATA AACTGATCAC TAATTCAAA
2341 CCCACCCGCT TTTTATAGTA AGTTTTCAC CCATAAATAA TAAATACAAT AATTAATTTT
```

Solicitud No. N/N
 Inventor Stephen Qitu WU, et al
 Registro de Abogado No: Am102713
 Título: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

Figura 4 (continuación) de 12
 Cliente No. 25291

Figura 4 (continuación)

plásmido pFD2003SEL-GPV-PV-FDAH-Seq

2401	TCGTAAGT	AGAAAATATA	TTCTAATTTA	TTGCACGGTA	AGGAAGTAGA	ATCATAAAG
2461	ACAGTGACAT	GGATCCCGTC	GTTTACAAC	GTCGTGACTG	GGAAAACCTT	GGCGTTACC
2521	AACTTAATCG	CCTTGACGCA	CATCCCCCTT	TCGCCAGCTG	GCGTAATAGC	GAAGAGGCC
2581	GCACCGATCG	CCCTTCCCAA	CAGTTGCGCA	GCCTGAATGG	CGAATGGCGC	TTTGCCCTGG
2641	TTCCGGCACC	AGAAGCGGTG	CCGGAAAGCT	GGCTGGAGTG	CGATCTTCTT	GAGGCCGAT
2701	CTGTCGTCTG	CCCCTCAAAC	TGGCAGATGC	ACGGTTACGA	TGCGCCCATC	TACACCAAC
2761	TAACTATCC	CATTACGGTC	AATCCGCCGT	TTGTTCCAC	GGAGAATCCG	ACGGGTTGT
2821	ACTCGCTCAC	ATTTAATGTT	GATGAAAGCT	GGCTACAGGA	AGGCCAGACG	CGAATTATT
2881	TTGATGGCGT	TAACTCGGCG	TTTCATCTGT	GGTGCAACGG	GCGCTGGGTC	GGTTACGGC
2941	AGGACAGTCG	TTTGCCGTCT	GAATTTGACC	TGAGCGCATT	TTTACGCGCC	GGAGAAAAC
3001	GCCTCGCGGT	GATGGTGCTG	CGTTGGAGTG	ACGGCAGTTA	TCTGGAAGAT	CAGGATATG
3061	GGCGGATGAG	CGGCATTTTC	CGTGACGTCT	CGTTGCTGCA	TAAACCGACT	ACACAAATC
3121	GCGATTTCCA	TGTTGCCACT	CGCTTTAATG	ATGATTTTCA	CCGCGCTGTA	CTGGAGGCT
3181	AAGTTTCAGAT	GTGCGGCGAG	TTGCGTGACT	ACCTACGGGT	AACAGTTTCT	TTATGGCAG
3241	GTGAAACGCA	GGTCCGCGG	GGCACCGCGC	CTTTCCGGCG	TGAAATTATC	GATGAGCGT
3301	GTGGTTATGC	CGATCGCGTC	ACACTACGTC	TCAAGGTCTA	AAACCCGAAA	CTGTGGAGC
3361	CCGAAATCCC	GAATCTCTAT	CGTGCGGTGG	TTGAACTGCA	CACCGCGGAC	GGCAGCGTG
3421	TTGAAGCAGA	AGCCTCGCAT	GTCCGTTTCC	GCGAGGTGCG	GATTGAAAAT	GGTCTGCTG
3481	TGCTGAACGG	CAAGCCGTTG	CTGATTCGAG	GCGTTAACCG	TCACGAGCAT	CATCCTCTG
3541	ATGGTCAGGT	CATGGATGAG	CAGACGATGG	TGCAGGATAT	CCTGCTGATG	AAGCAGAAC
3601	ACTTTAACGC	CGTGCGCTGT	TCCGATTATC	CGAACCATCC	GCTGTGGTAC	ACCGTGTGCI
3661	ACCGCTACGG	CCTGTATGTG	GTGGATGAAG	CCAATATTGA	AACCCACGGC	ATGGTGCCA
3721	TCAATCGTCT	GACCGATGAT	CCGCGCTGGC	TACCGGCGAT	GAGCGAACGC	GTAAACGCA
3781	TGGTGACGCG	CGATCGTAAT	CACCCGAGTG	TGATCATCTG	GTGCTGGGGG	AATGAATCA
3841	GCCACGGCGC	TAATCACGAC	GCGCTGTATC	GCTGGATCAA	ATCTGTGATG	CCCTCCCGCI
3901	CGCTGCAGTA	TGAAGCGGCG	GGAGCCGACA	CCACGGCCAC	CGATTTTATT	TGCCCGATG
3961	ACGCGCGCGT	GGATGAAGAC	CAGCCCTTCC	CGGCTGTGCC	GAAATGGTCC	ATCAAAAAAT
4021	GGCTTTCCGT	ACCTGGAGAG	ACGCGCCCGC	TGATCCTTTG	CGAATACGCC	CACGCGATG
4081	GTAAACAGTCT	TGGCGGTTTC	GCTAAATACI	GGCAGGCGTT	TCGTCAGTAT	CCCCGTTTAC
4141	AGGCGCGGCT	CGTCTGGGAC	TGGTGGATCT	AGTCCGCTGAT	TAAATATGAT	GAAACCGGC
4201	ACCGCTGGTC	GGCTTACGCG	GGTGATTTTG	GCGATACGCC	GAACCTCTGC	GATGCTGTG
4261	TGAACGGTCT	GGTCTTTGCC	GACCGCACGC	CGCATCCAGC	GCTGACGGAA	GCAAAACACC
4321	AGCAGCAGTT	TTTCCAGTTT	CGTTTATCCG	GGCAAACCAT	CGAAGTGACC	AGCGAATACC
4381	TGTTCCGTCA	TAGCGATAAC	GAGCTCTGCG	ACTGGATGGT	GGCGCTGGAT	GGTAAGCCCG
4441	TGGCAAGCGG	TGAAGTGCTT	CTGGATGTGG	CTCCACAAGG	TAAACAGTTG	ATTGAAGTGC
4501	CTGAACTACC	GCAGCCGGAG	AGCGCCGGGC	AACTCTGGCT	CACAGTACGC	GTAGTGCAAC
4561	CGAACCGGAC	CGCATGGTCA	GAAGCCGGGC	ACATCAGCGC	CTGGCAGCAG	TGGCGTCTGC
4621	CGGAAAACCT	CAGTGTGACG	CTCCCCGCGC	CGTCCACGCG	CATCCCGCAT	CTGACCACCA
4681	GCGAAATGGA	TTTTTGCAAT	GAGCTGGGTA	ATAAGCGTTG	GCAATTTAAC	CGCCAGTCAG
4741	CGTTTCTTTC	ACAGATGTGG	ATTGGCGATA	AAAAACAAC	GCTGACGCGC	CTGCGCGATC
4801	AGTTACCCCG	TGCACCGCTG	GATAACGACA	TTGGCGTAAG	TGAAGCGACC	CGCATTGACC
4861	CTAACGCTTG	GGTCAACGCG	TGGAAGGCGG	CGGGCCATTA	CCAGGCCGAA	GCAGCGTTGT
4921	TGCAGTGAC	GGCAGATACA	CTTGCTGATG	CGGTGCTGAT	TACGACCGGT	CACGCGTGGC
4981	AGCATCAGGG	GAAAACCTTA	TTTATCAGGC	GGAAAACCTA	CCGGATTGAT	GGTAGTGGTC
5041	AAATGGCGAT	TACCGTTGAT	GTGGAAGTGG	CGAGCGATAC	ACCGCATCCG	GCGCGGATTG
5101	GCCTGAACTG	CCAGCTGGCG	CAGGTAGCAG	AGCGGGTAAA	CTGGCTCGGA	TTAGGGCCGC
5161	AAGAAAACCTA	TCCCGACCGC	CTTACTGCCG	CCTGTTTTGA	CCGCTGGGAT	CTGCCATTGT
5221	CAGACATGTA	TACCCCGTAC	GTCTTCCCGA	GCGAAAACGG	TCTGCGCTGC	GGGACGCGCG
5281	AATTGAATTA	TGGCCACAC	CAGTGGCGCG	GCGACTTCCA	GTTCAACATC	AGCCGCTACA
5341	GTCAACAGCA	ACTGATGGTA	ACCAGCCATC	GCCATCTGCT	GCACCGGGAA	GAAGGCACAT
5401	GGCTGAATAT	CGACGGTTTC	CATATGGGGA	TTGGTGGCGA	CGACTCTTGC	AGCCGTCAG
5461	TATCGGCGGA	ATTCCAGCTG	AGCGCCGTTT	GCTACCATTA	CCAGTTGGTG	TGGTCTCAAA
5521	AATAAGGATC	CTCGATACCA	ACAACGGTAG	AAAGTGTTAC	AATATCTACT	ACAAAATATA
5581	CAACTAGTGA	CTTTATAGAG	ATATTTGGCA	TTGTTTCACT	AATTTTATTA	TTGGCCGTGG
5641	CGATTTTCTG	TATTATATAT	TATTTCTGTA	GTGGACGGTC	TCGTAACAA	GAAACAAATA
5701	TATTATAGAT	TTTAACTCAG	ATAAATGTCT	GGAAATAATTA	AATCTATCGT	TTTGAGCGGA
5761	CCATCTGGTT	CCGGCAAGAC	AGCTATAGTC	AGGAGACTCT	TACAAGATTA	TGGAATATA
5821	TTTGGAATTTG	TGGTATCCCA	TACCACTAGA	TTTCTCTGTC	CTATGGAACG	AGAAGGTGTC
5881	GTCTACCAT	ACGTTAACAG	AGAGGCCATT	TGGAAGGGAA	TAGCCGCTGG	AAACTTGCTA
5941	GAACATACAG	AGTTTTTGCG	AAATATTTAT	GGGACTTCTA	AAACATCCAT	GAACACAGCT
6001	GCTAATAATA	ATCGTATATG	TGTTATGGAT	TTAAACATTG	ACGGAGTTAG	GAGTCTTAAA
6061	AACACATACT	TGATGCGCTTA	CTCTGTTTAT	ATAAGACCTA	CATCTCTTAA	AATGGTAGAA
6121	ACTGCATGCC	CTGATGCGGT	ATTTTCTCTT	TACGCATCTG	TGCGGTATTY	CACACCGCAT

000143

Solicitud No. N/N Figura 4 (continuación) de 12
Inventor Stéphen Qitu WU, et al Cliente No. 25291
Registro de Abogado No: Am102713
Título: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

Figura 4 (continuación)

plásmido pFD2003SEL-GPV-PV-FDAH-Seq

6181	ATGGTGCAC	CTCAGTACAA	TCTGCTCTGA	TGCCGCATAG	TTAAGCCAGC	CCCGACACCC
6241	GCCAAACACC	GCTGACGCGC	CCTGACGGGC	TTGTCTGCTC	CCGGCATECC	CTTACAGACA
6301	AGCTGTGACC	GTCTCCGGGA	GCTGTCATGT	TCAGAGGTTT	TCACCGTCAT	CACCGAAACG
6361	CGCGAGACGA	AAGGGCCTCG	TGATACGCCT	ATTTTTATAG	GTTAATGTCA	TGATAATAAT
6421	GGTTTCTTAG	ACGTCAGGTG	GCACTTTTCG	GGGAAATGTG	CGCGGAACCC	CTATTTGTTT
6481	ATTTTTCTAA	ATACATTCAA	ATATGTATCC	GCTCATGAGA	CAATAACCTT	GATAAATGCT
6541	TCAATAATAT	TGAAAAAGGA	AGAGTATGAG	TATTCAACAT	TTCCTGTGCG	CCCTTATTCC
6601	CTTTTTTGCG	GCATTTTGCC	TTCTGTGTTT	TGCTCACCCA	GAAACGCTGG	TGAAAGTAAA
6661	AGATGCTGAA	GATCAGTTGG	GTGCACGAGT	GGGTTACATC	GAACCTGGATC	TCAACAGCEG
6721	TAAGATCCTT	GAGAGTTTTC	GCCCCGAAGA	ACGTTTTCCT	ATGATGAGCA	CTTTTAAAGT
6781	TCTGCTATGT	GGCGCGGTAT	TATCCCGTAT	TGACGCCCGG	CAAGAGCAAC	TGGAGCGCGG
6841	CATACACTAT	TCTCAGAATG	ACTTGCTTGA	GTACTCACCA	GTCACAGAAA	AGCATCTTAC
6901	GGATGGCATG	ACAGTAAGAG	AATTATGCAG	TGCTGCCATA	ACCATGAGTG	ATAACACTGC
6961	GGCCAACTTA	CTTCTGACAA	CGATCGGAGG	ACCGAAGGAG	CTAACCGCTT	TTTTGCACAA
7021	CATGGGGGAT	CATGTAACCT	GCCTTGATCG	TTGGGAACCG	GAGCTGAATG	AAGCCATACC
7081	AAACGACGAG	CGTGACACCA	CGATGCCCTGT	AGCAATGGCA	ACAACGTTGC	GCAAACCTATT
7141	AACTGGCGAA	CTACTTACTC	TAGCTTCCCG	GCAACAATTA	ATAGACTGGA	TGGAGCGCGA
7201	TAAAGTTGCA	GGACCACTTC	TGCGCTCGCG	CCTTCCGGCT	GGCTGGTTTA	TTGCTGATAA
7261	ATCTGGAGCC	GGTGAGCGTG	GGTCTCGCGG	TATCATTGCA	GCACTGGGGC	CAGATGGTAA
7321	GCCCTCCCGT	ATCGTAGTTA	TCTACACGAC	GGGGAGTCAG	GCAACTATGG	ATGAACGAAA
7381	TAGACAGATC	GCTGAGATAG	GTGCCCTCACT	GATTAAGCAT	TGGTAAGTGT	CAGACCAAGT
7441	TTACTCATAT	ATACTTTAGA	TTGATTTAAA	ACTTCATTTT	TAATTTAAAA	GGATCTAGGT
7501	GAAGATCCTT	TTTGATAATC	TCATGACCAA	AATCCCTTAA	CGTGAGTTTT	CGTTCCACTG
7561	AGCGTCAGAC	CCCCTAGAAA	AGATCAAAGG	ATCTTCTTGA	GATCCTTTTT	TTCTGCGCGT
7621	AATCTGCTGC	TTGCAAACAA	AAAAACCACC	GCTACCAGCG	GTGGTTTGTT	TGCCGGATCA
7681	AGAGCTACCA	ACTGTTTTTC	CGAAGGTAAC	TGGCTTCAGC	AGAGCGCAGA	TACCAAATAC
7741	TGTTCTTCTA	GTGTAGCCGT	AGTTAGGCCA	CCACTTCAAG	AACTCTGTAG	CACCGCTTAC
7801	ATACCTCGCT	CTGCTAATCC	TGTTACCAGT	GGCTGCTGCC	AGTGGCGATA	AGTCGTGTCT
7861	TACCGGGTTG	GACTCAAGAC	GATAGTTACC	GGATAAGGCG	CAGCGGTCCG	GCTGAACGGG
7921	GGGTTCTGTC	ACACAGCCCA	GCTTGGAGCG	AACGACCTAC	ACCGAAGTGA	GATACCTACA
7981	GCGTGAGCTA	TGAGAAAGCG	CCACGCTTCC	CGAAGGGAGA	AAGGCGGACA	GGTATCCGGT
8041	AAGCGGCAGG	GTCGGAACAG	GAGAGCGCAC	GAGGGAGCTT	CCAGGGGGAA	ACGCTTGTTA
8101	TCTTTATAGT	CCTGTCGGGT	TTCCGCCACCT	CTGACTTGAG	CGTCGATTTT	TGTGATGCTC
8161	GTCAGGGGGG	CGGAGCCTAT	GGAAAAACGC	CAGCAACGCG	GCCTTTTTAC	GGTTCTGCGC
8221	CTTTTGCTGG	CCTTTTGCTC	ACATGTTCTT	TCCTGCGTTA	TCCCCTGATT	CTGTGGATAA
8281	CCGTATTACC	GCTTTTGAGT	GAGCTGATAC	CGCTCGCCGC	AGCCGAACGA	CCGAGCGCAG
8341	CGAGTCAGTG	AGCGAGGAAG	CGGAAGAGAG	CTC		

000144

Solicitud No. N/N
Inventor Stephen Qitu WU, et al
Registro de Abogado No: Am102713
Titulo: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

Figura 5 de 12
Cliente No. 25291

Figura 5

Secuencia de ADN completa de		PCV2a orf2-FDAH-Seq		29-MAY-2007		
		ORF2	702 bp			
CONTEO BASE	196 A	218 C	134 G	154 T	0 OTRO	
ORIGEN	-					
1	ATGACGTATC	CAAGGAGGGCG	TTACCGCAGA	AGAAGACACC	GCCCCCGCAG	CCATCTTGGC
61	CAGATCCTCC	GCCGCCGCCC	CTGGCTCGTC	CACCCCCGCC	ACCGCTACCG	TTGGAGAAGG
121	AAAAATGGCA	TCTTCAACAC	CCGCCTCTCC	CGCACCTTCG	GATATACTGT	CAAGGCTACC
181	ACAGTCAGAA	CGCCCTCCTG	GGCGGTGGAC	ATGATGAGAT	TTAATATTGA	CGACTTTGTT
241	CCCCCGGGAG	GGGGGACCAA	CAAAATCTCT	ATACCCTTTG	AATACTACAG	AATAAGAAAG
301	GTAAAGGTTG	AATTCTGGCC	CTGCTCCCCC	ATCACCAGG	GTGATAGGGG	AGTGGGCTCC
361	ACTGCTGTTA	TTCTAGATGA	TAACCTTTGT	ACAAAGGCCA	CAGCCCTAAC	CTATGACCCA
421	TATGTAAACT	ACTCCTCCCG	CCATACAATC	CCCCAACCTT	TCTCCTACCA	CTCCCGTTAC
481	TTCAACCCCA	AACCTGTTCT	TGACTCCACG	ATTGATTACT	TCCAACCAAA	TAACAAAAGG
541	AATCAGCTTT	GGATGAGGCT	ACAAACCTCT	AGAAATGTGG	ACCACGTAGG	CCTCGGCACT
601	GCGTTCGAAA	ACAGTATATA	CGACCAGGAC	TACAATATCC	GTGTAACCAT	GTATGTACAA
661	TCAGAGAAT	TTAATCTTAA	AGACCCCCCA	CTTAAACCCT	AA	

000145

Solicitud No. N/N Figura 6 de 12
Inventor Stephen Qitu WU, et al Cliente No. 25291
Registro de Abogado No: Am102713
Título: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

Figura 6

Secuencia de ADN completa de PCV2b ORF2 702 bp 29-May-2007
CONTEO BASE 193 A 221 C 137 G 151 T 0 OTRO

ORIGEN

1	ATGACGTATC	CAAGGAGGCG	TTACCGAAGA	AGAAGACACC	GCCCCCGCAG	CCATCTTGGC
61	CAGATCCTCC	GCCGCCGCC	CTGGCTCGTC	CACCCCCGCC	ACCGTTACCG	CTGGAGAAGG
121	AAAAATGGCA	TCTTCAACAC	CCGCCTCTCC	CGCACCTTCG	GATATACTGT	CAAGCGAACC
181	ACAGTCAGAA	CGCCCTCCTG	GGCGGTGGAC	ATGATGAGAT	TCAATATTAA	TGACTTTCTT
241	CCCCCAGGAG	GGGGCTCAAA	CCCCCGCTCT	GTGCCCTTTG	AATACTACAG	AATAAGAAAG
301	GTTAAGGTTG	AATTCTGGCC	CTGCTCCCCG	ATCACCCAGG	GTGACAGGGG	AGTGGGCTCC
361	AGTGCTGTTA	TTCTAGATGA	TAACCTTTGT	ACAAAGGCCA	CAGCCCTCAC	CTATGACCCC
421	TATGTAAACT	ACTCCTCCCG	CCATACCATA	ACCCAGCCCT	TCTCTACCA	CTCCCGGTAC
481	TTTACCCCCA	AACCTGTCCT	AGATTCCACT	ATTGATTACT	TCCAACCAAA	CAACAAAAGA
541	AACCAGCTGT	GGCTGAGACT	ACAAACTGCT	GGAAATGTAG	ACCACGTAGG	CCTCGGCACT
601	GCGTTCGAAA	ACAGTATATA	CGACCAGGAA	TACAATATCC	GTGTAACCAT	GTATGTACAA
661	TTCAGAGAAT	TTAATTTTAA	AGACCCCCCA	CTTAACCCCT	AA	

000146

Solicitud No. N/N Figura 7 de 12
Inventor Stephen Qitu WU, et al Cliente No. 25291
Registro de Abogado No: Am102713
Titulo: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

Figura 7

Secuencia de ADN completa de PRRSV ISU12-Orf3-FDAH-Seq
PRRSV ISU12 ORF3 765 bp 29-May-2007

CONTEO BASE 145 A 209 C 194 G 217 T 0 OTRO

ORIGEN

```
1 ATGGCTAATA GCTGTACATT CCTCCATATT TTCTCTGTG GCAGCTTCTT GTACTCTTTT
61 TGTGTGTCTG TGGTTGCGGG TTCCAATGCT ACGTACTGTT TTTGGTTTCC GCTGGTTAGG
121 GGCAATTTTT CTTTCGAAC CACGGTGAAC TACACGGTGT GCCCGCCTTG CCTCACCCGG
181 CAAGCAGCCG CAGAGGCTA CGAACCCTGT AGGTCCCTTT GGTGCAGGAT AGGGCATGAT
241 CGATGTGGGG AGGACGATCA TGATGAACTA GGGTTTGTGG TGCCGCCTGG CCTCTCCAGC
301 GAAGGCCACT TGACCACTGC TTACGCCTGG TTGGCGTTCC TGTCCTTCAG CTATACGGCC
361 CAGTTCCATC CCGAGATATT CGGGATAGGG AATGTGAGTC GAGTCTATGT TGACATCAAG
421 CACCAATTCA TTTGCGCTGT TCATGATGGG CAGAACACCA CCTTGCCCCA CCATGACAAC
481 ATTTTCAGCCG TGTTCAGAAC CTATTACCA GATCAGGTGG ACGGCGGCAA TTGGTTTCAC
541 CTAGAATGGC TGGTCCCTT CTTTCTCTT TGGTTGGTTT TAAATGTCTC TTGGTTTCTC
601 AGGCGTTCCG CTGCAAGCCA TGTTTCAGT CGAGTCTTTC AGACATCAAG ACCAACACCA
661 CCGCAGCGGC AGGCTTTGCT GTCTCTCAAG ACATCAGTTG CCTTAGGCAT CGCAACTCGG
721 CCTCTGAGGC GATTCGCAAA GTCCCTCAGT GCCGCACGGC GATAG
```

000147

Solicitud No. N/N Figura 8 de 12
Inventor Stephen Qitu WU, et al Cliente No. 25291
Registro de Abogado No: Am102713
Titulo: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

Figura 8

Secuencia de ADN completa de PRRSV ISU12-orf4-FDAH-Seq 29-May-2007
CONTEO BASE 107 A 138 C 125 G 167 T 0 OTRO
ORIGEN -
1 ATGGCTGCGT CCCTTCTTTT CCTCTTGGTT GGTTTTAAAT GTCTCTTGGT TTCTCAGGCG
61 TTCGCCTGCA AGCCATGTTT CAGTTCGAGT CTTTCAGACA TCAAGACCAA CACCACCGCA
121 GCGGCAGGCT TTGCTGYCCT CCAAGACATC AGTTGCCTTA GGCATCGCAA CTCGGCCTCT
181 GAGGCGATTG GCAAAGTCCC TCAGTGCCGC ACGGCGATAG GGACACCCGT GTATATCACT
241 GTCACAGCCA ATGTTACCGA TGAGAATTAT TTGCATTCTT CTGATCTTCT CATGCTTTCT
301 TCTTGCCTTT TCTATGCTTC TGAGATGAGT GAAAAGGGAT TTAAGGTGGT ATTTGGCAAT
361 GTGTCAGGCA TCGTGGCAGT GTGCGTCAAC TTCACCAGTT ACGTCCAACA TGTCAAGGAA
421 TTTACCCAAC GTTCCTTGGT AGTTGACCAT GTGCGGCTGC TCCATTTTAT GACGCCGAG
481 ACCATGAGGT GGGCAACTGT TTAGCCTGT CTTTTTGCCA TTCTGTTGGC AATTTGA

Solicitud No. N/N Figura 9 de 12
Inventor Stephen Qitu WU, et al Cliente No. 25291
Registro de Abogado No: Am102713
Título: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

Secuencia de ADN completa de		PRRSV-ISU12-ORF5-FDAH-Seq				
		PRRSV	ISU12	ORF5	603 bp	29-May-2007
CONTEO BASE	119 A	137 C	162 G	185 T	0 OTRO	

1	ATGTTGGGGA	AATGCTTGAC	CGCGGGCTGT	TGCTCGCAAT	TGCTTTTTTT	GTGGTGTATC
61	GTGCCGTCCT	GTTTTGTTGC	GCTCGTCAGC	GCCAAACGGGA	ACAGCAGCTC	AAATTTACAG
121	CTGATTTACA	ACTTGACGCT	ATGTGAGCTG	AATGGCACAG	ATTGGCTAGC	TAATAAATTT
181	GACTGGGCAG	TGGAGTGTTT	TGTCATTTTT	CCTGTGTTGA	CTCACAATGT	CTCTATGGT
241	GCCCTCACTA	CTAGCCATTT	CCTTGACACA	GTCCGTCTGG	TCACTGTGTC	TACCCGCTGGG
301	TTTGTTCAAG	GCGCGTATGT	TCTGAGTAGC	ATCTACGCGG	TCTGTGCCCT	GGCTGCGTTG
361	AATTGCTTCG	TCATTAGGCT	TGCGAAGAA	TGCATGTCT	GGCGCTACTC	ATGTACCAGA
421	TATACCAACT	TTCTTCTGGA	CACTAAGGGC	AGACTCTATC	GTTGGCGGTC	GCCTGTCATC
481	ATAGAGAAAA	GGGGCAAAGT	TGAGGTGGA	GGTCACCTGA	TGCACCTCAA	AAGAGTTGTG
541	CTTGATGGTT	CCGCGGCTAC	CCCTGTAAC	AGAGTTTCAG	CGGAACAATG	GGGTGCTCT
601	TAG					

000149

Solicitud No. N/N Figura 10/12
Inventor Stephen Qitu WU, et al Cliente No. 25291
Registro de Abogado No: Am102713
Titulo: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

Figura 10

Secuencia de ADN completa de PRRSV ISU 12 ORF6 525 bp 29-May-2007

CONTEO BASE 120 A 135 C 132 G 138 T 0 OTRO

ORIGEN

1	ATGGGGT	CGT	CCTTAGATGA	CTTCTGTCAT	GATAGCACGG	CTCCACAAAA	GGTGCTCTTG
61	GCGTTTTCTA	TTACCTACAC	GCCAGTGATG	ATATATGCCC	TAAAGGTGAG	TGCGGGCCGA	
121	CTGCTAGGGC	TTCTGCACCT	TTTGATCTTC	CTGAATTGTG	CTTTCACCTT	CGGGTACATG	
181	ACATTCTGTC	ACTTTCAGAG	TACAAATAAG	GTGCGGCTCA	CTATGGGAGC	AGTAGTTGCA	
241	CTCCTTTGGG	GGGTGTACTC	AGCCATAGAA	ACCTGGAAAT	TCATCACCTC	CAGATGCCGT	
301	TTGTGCTTGC	TAGGCCGCAA	GTACATTCTG	GCCCCTGCCC	ACCACGTTGA	AAGTGCCGCA	
361	GGCTTTCATC	CGATTGCGGC	AAATGATAAC	CACGCATTTC	TCGTCCGGCG	TCCCGGCTCC	
421	ACTACGGTCA	ACGGCACATT	GGTGCCCGGG	TTAAAAAGCC	TCGTGTTGGG	TGGCAGAAAA	
481	GCTGTAAAC	AGGGAGTGGT	AAACCTTGTC	AAATATGCCA	AATAA		

Solicitud No. N/N Figura 11/12
Inventor Stephen Qitu WU, et al Cliente No. 25291
Registro de Abogado No: Am102713
Título: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

Secuencia de ADN completa de		PRRSV ISU12 ORF7		PRRSV-ISU12-Orf7-FDAH-Seq		372 bp		29-May-2007	
CONTEO BASE	112 A	94 C	95 G	71 T	0	OTRO			
ORIGEN									
1	ATGCCAAATA	ACAACGGCAA	GCAGCAGAAG	AGAAAGAAGG	GGGATGGCCA	GCCAGTCAAT			
61	CAGCTGTGCC	AGATGCTGGG	TAAGATCATC	GCTCAGCAAA	ACCAGTCCAG	AGGCAAGGGA			
121	CCGGGAAAGA	AAAATAAGAA	GAAAAACCCG	GAGAAGCCCC	ATTTCCCTCT	AGCGACTGAA			
181	GATGATGTCA	GACATCACTT	TACCCCTAGT	GAGCGGCAAT	TGTGTCTGTC	GTCAATCCAG			
241	ACCGCCTTTA	ATCAAGGCGC	TGGGACTTGC	ACCCGTGTCAG	ATTACGGGAG	ATTAAAGTTAC			
301	ACTGTGGAGT	TTAGTTTGCC	TACGCATCAT	ACTGTGCGCC	TGATCCGCGT	CACAGCATCA			
361	CCCTCAGCAT	GA							

Solicitud No. N/N Figura 12/12
Inventor Stephen Qitu WU, et al Cliente No. 25291
Registro de Abogado No: Am102713
Título: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

Secuencia de ADN completa de **PRRSV-01ot91-orf5-FDAH-seq** **PRRSV 01ot91 ORF5** **606 bp** **29-May-2007**

CONTEO BASE **121 A** **151 C** **160 G** **174 T** **0 OTRO**

Página 1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Wyeth

000152

<120> Poxivirus de Mapache que expresa Genes de Virus Porcino

<130> AM102713

<150> 60/932421

<151> 2007-05-30

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 6872

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> plásmido

<400> 1

ttattggaca ctagataatc atcacatgtt accacaaaat tatataatgt ataaatgcga 60
aattattaaa cgcaaatac catgggaaaa cgcgcagtat acagacgatt ttttacagta 120
tttgagagt tttataggaa gtatatagag tagaaccaga atttgtaaa aataaatcac 180
atttttatc taatatgaaa caactatcga tagttatatt gctactatcg atagtatata 240
caaccaaacc tcactctaca cagatatcaa aaaaactagg cgatgatgct actctatcgt 300
gtaatagaaa caatacacat ggatatcttg tcatgagttc ttggataag aaaccagact 360
ccattattct cttagcagcc aaaaacgatg tctgtatactt tgatgattat acagcggata 420
aagtatcata cgattcaccg tatgatctc tagctacaat tattacaatt aaatcattga 480
catctggaga tgcaggtaact tatatatgcg cattctttat aacatcaaca aatgatacgg 540
ataaaataga ttatgaagaa ttcgtcgacg cggccgcctg cagaagcttg gtaccattta 600
tagcatagaa aaaaacaaaa tgaaattcta ctatatttt acatacatat attctaaata 660
tgaaagtggg gattgtgact agcgtagcat cgcttctaga catctatata ctatatagta 720
ataccaatac tcaagactac gaaactgata caatctctta tcatgtgggt aatgttctcg 780

atgtcgatag ccataatgccc ggtagttgcg atatacataa actgatcact aattccaaac 840
ccacccgctt ttatagtaa gttttcacc cataaataat aaatacaata attaatttct 900
cgtaaaagta gaaaatatat tctaatttat tgcacggtaa ggaagtagaa tcataaagaa 960
cagtgcacatg gatcccgctg tttacaacg tegtactgg gaaaaccctg gcgttaccca 1020
acttaatgc cttgcagcac atccccctt cgcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg 1080
caccgatgc ctttccaac agttgcgag cctgaatggc gaatggcgt ttgcctggtt 1140
tccggcacca gaagcggcgc cggaaagctg gctggagtgc gatcttctg aggccgatac 1200
tgtcgtcgtc cctcaaact ggcagatgca cggttacgat gcgccatct acaccaacgt 1260
aacctatccc attacggcga atccgcccgtt tgtcccacg gagaatccga cgggttgta 1320
ctcgtcaca ttaattgtg atgaaagctg gctacaggaa ggccgacgc gaattattt 1380
tgatggcgtt aactcggcgt ttatctgtg gtgcaacggg cgctggctg gttacggcca 1440
ggacagtcgt ttgccgtctg aattgacct gagcgcattt ttacgcgccg gagaaaaccg 1500
cctcgcgggtg atggtgctgc gttggagtga cggcagttat ctggaagatc aggatatgtg 1560
gcggatgagc ggcatcttc gtgacgtctc gttgtgcat aaaccgacta cacaatcag 1620
cgatttccat gttgccactc gcttaatga tgattcagc cgcgtgtac tggaggctga 1680
agttcagatg tgcggcgagt tgcgtgacta cctacgggta acagtttctt tatggcaggg 1740
tgaaacgcag gtcgccagcg gcaccgcgc ttcggcggt gaaattatcg atgagcgtgg 1800
tggttatgcc gatcgcgtca cactacgtct caaggtcgaa aaccgaaac tgtggagcgc 1860
cgaaatcccg aatctctatc gtgcgggtgtg tgaactgcac accgccgacg gcacgtgat 1920
tgaagcagaa gcctgcgatg tcggtttccg cgaggcggc attgaaaatg gtctgtgct 1980
gctgaacggc aagccgttgc tgattcagg cgtaaccgt cagagcatc atcctctgca 2040
tggtcaggtc atggatgagc agacgatggt gcaggatc ctgctgatga agcagaaca 2100
cttaacgcc gtgcgtgtt cgcattatcc gaaccatccg ctgtgtgaca cgctgtgca 2160
ccgtacggc ctgtatgtg tgatgaage caatattga acccagggca tggcgcaat 2220
caatcgtctg accgatgac cgcgtggct accggcgatg agcgaacgc taacgcgaat 2280

000153

ggtgcagcgc gatcgtaatc acccgagtgt gatcatctgg tcgctgggga atgaatcagg 2340
ccacggcgct aatcacgacg cgctgtatcg ctggatcaaa tctgtcgatc ctccccgcc 2400
ggtgcagtat gaaggcggcg gagccgacac cacggccacc gatattattt gcccgatgta 2460
cgcgcgcgtg gatgaagacc agcccttccc ggctgtgccg aaatggcca tcaaaaaatg 2520
gctttcgcta cctggagaga cgcgcccgtg gatcctttgc gaatacgccc acgcgatggg 2580
taacagtctt ggcggtttcg ctaaatactg gcaggcggtt cgtcagtatc cccgtttaca 2640
ggcgggcttc gtctgggact ggggtggatca gtcgctgatt aaatatgatg aaaacggcaa 2700
cccgtggctg gcttacggcg gtgattttgg cgatacgccg aacgacgcc agttctgtat 2760
gaacggctg gtctttgccg accgcacgcc gcacccagcg ctgacggaag caaacacca 2820
gcagcagttt ttccagttcc gtttatccgg gcaaaccatc gaagtgaaca gcgaatacct 2880
gttcgctcat agcgataacg agctcctgca ctggatggcg gcgctggatg gtaagccgct 2940
ggcaagcggg gaagtgcctc tggatgtcgc tccacaaggt aaacagttga ttgaactgcc 3000
tgaactaccg cagccggaga gcgccgggca actctggctc acagtacgcg tagtgcaacc 3060
gaacgcgacc gcattggtag aagccgggca catcagcgcc tggcagcagt ggcgtctggc 3120
ggaaaacctc agtgtgacgc tccccgccgc gtcccacgcc atcccgcac tgaccaccag 3180
cgaaatggat tttgcatcg agctgggtaa taagcgttgg caatttaacc gccagtcagg 3240
cttttttca cagatgtgga ttggcgataa aaaacaactg ctgacgccgc tgcgcgatca 3300
gttccccgt gcaccgctgg ataacgacat tggcgtaagt gaagcgacc gcattgacce 3360
taacgcctgg gtcgaacgct ggaaggcggc gggccattac caggccgaag cagcgttgtt 3420
gcagtgcacg gcagatacac ttgctgatgc ggtgctgatt acgaccggtc acgcgtggca 3480
gcacagggg aaaaccttat ttatcagccg gaaaacctac cggattgatg gtagtggtca 3540
aatggcgatt accgttgatg ttgaagtggc gagcgataca ccgcatccgg cgcggattgg 3600
cctgaactgc cagctggcgc aggtagcaga gcgggtaaac tggctcgat tagggccgca 3660
agaaaactat cccgaccgcc ttactgccgc ctgttttgac cgctgggatc tgccattgtc 3720
agacatgtat acccgtacg tcttcccgag cgaaaacggg ctgcgctgcg ggacgcgcga 3780

000154

attgaattat ggcccacacc agtggcgcg cgacttcag ttcaacatca gccgctacag 3840
tcaacagcaa ctgatggaaa ccagccatcg ccatctgctg cacgcggaag aaggcacatg 3900
gctgaatatc gacggtttcc atatgggat tggtggcgac gactcctgga gcccgctagt 3960
atcggcggaa ttccagctga gcgccgttcg ctaccattac cagtttgtct ggtgtcaaaa 4020
ataaggatcc tcgataccaa caacggtaga aagtgttaca atatctacta caaaatatac 4080
aactagtac tttatagaga tatttggcat tgtttacta attttattat tggccgtggc 4140
gattttctgt attatatatt atttctgtag tggacggtct cgtaaacaag aaacaaatat 4200
attatagatt ttaactcaga taaatgtctg gaataattaa atctatcgt ttgagcggac 4260
catctgggtc cggcaagaca gctatagtc ggagactctt acaagattat ggaaatatac 4320
ttggattgt ggtatcccat accactagat ttctctgctc tatggaacga gaaggtgtcg 4380
tctaccatta cgtaacaga gaggccattt ggaagggaat agccgctgga aacttgctag 4440
aacatacaga gttttggga aatatttatg ggacttctaa aacatccatg aacacagctg 4500
ctattaataa tcgtatatgt gttatggatt taaacattga cggagttagg agtcttaaaa 4560
acacatact gatgccttac tctgtttata taagacctac atctcttaaa atggtagaaa 4620
ctgcatgcc tgatgcggt ttttctctt acgcatctgt gcggtattc acaccgata 4680
tggtgactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcatagt taagccagcc ccgacaccg 4740
ccaacaccg ctgacgcgc ctgacgggt tgtctgctc cgcatccgc ttacagaaa 4800
gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggttt caccgtcct accgaaacgc 4860
gcgagacgaa agggcctcgt gatacgcta ttttatagg ttaa:gtcat gataataatg 4920
gtttctaga cgtcaggtgg cactttcgg ggaatgtgc gcggaacccc tattgttta 4980
ttttctaaa tacattcaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt 5040
caataatatt gaaaaaggaa gattatgagt attcaacatt tccgtgtcgc cttattccc 5100
tttttgcgg cattttgcct tctgtttt gtcaccag aaacgtggt gaaagtaaaa 5160
gatgtgaag atcagttggg tgcacgagt ggttacctg aactggatct caacagcgt 5220
aagatcctg agagtttgc cccgaagaa cgtttccaa tgatgagcac ttttaaagtt 5280

000155

ctgctatgtg gcgcggtatt atcccggtatt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc 5340
atacactatt ctcaaatga cttggtgag tactcaccag tcacagaaa gcattttacg 5400
gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacctgcg 5460
gccaaactac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt ttgcacaac 5520
atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaa ga agccatacca 5580
aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta 5640
actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat 5700
aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc ctccggctg gctggittat tgctgataa 5760
tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag 5820
ccctcccgta tcgtagtat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat 5880
agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgc agaccaagt 5940
tactcatata tactttagat tgattaaaa ctctatttt aatttaaaag gatctagtg 6000
aagatccttt ttgataatct catgacaaa atccctaac gtgagtttc gttccactga 6060
gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttctgag atccttttt tctgcgcgta 6120
atctgctgct tgcaaaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggttgttt gccggatcaa 6180
gagctaccaa ctcttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 6240
gttcttctag ttagccgta gtagggcac cactcaaga actctgagc accgcctaca 6300
tacctcgtc tgctaatect gttaccagt gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgttt 6360
accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 6420
ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 6480
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccgga 6540
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat 6600
ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgactgagc gtcgatttt gtgatgctc 6660
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc 6720
ttttgctgc ctttgccta catgttttt cctgcgttat cccctgattc tgttgataac 6780

000156

cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc 6840

gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagagc tc

6872

000157

<210> 2

<211> 5508

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> plásmido

<400> 2

gagtcataa atagtaaacc gatagtgtat aaagattgtg caatgctttt gcatcaata 60

aatggatcac aaccagtatc tgttgacgat gttcttcgca gatgatgatt cattttttaa 120

atatttagct agtcaagacg atgaatcttc attatccgat atattgcaaa ttacccaata 180

tcttgatttt ttattgttgt tattgataca gtcaaaaaat aaactagagg ctgtaggta 240

ttgttatgaa tctctttcgg aggaatatag acaattggcg aaatttacag aactcaaga 300

gtttaaaaa ctatttaata aggttcctat tgctacagac ggacgcgta aacttaataa 360

agggtattta ttgactttg ttgtcagtat gatgagattt aaaaaagagt catctataat 420

accaaacata gatccggttc gatacataga tctctgctga gatatagtat ttctaacgt 480

aatggatata ttaaagtcta ataaagtga caataattaa atttttattg tcacctagga 540

attcgtcgac gcggccgcct gcagaagctt ggtaccattt atattccaaa aaaaaaaaaat 600

aaaatttcaa ttttacata catatattct aaatatgaaa gtggtga:tg tgactagcgt 660

agcatcgctt ctagacatct atatactata tagtaatacc aatactcaag actacgaaac 720

tgatacaatc tcttatcatg tgggtaatgt tctcgatgtc gatagccata tgcccggtag 780

ttcgatata cataaactga tctaattc caaacccacc cgcttttat agtaagtttt 840

tcaccataa ataataaata caataattaa ttctcgtaa aagtagaaaa tatattctaa 900

tttattgcac ggtaaggaag tagaatcata aagaacagtg acatggatcc ggtccgtcct 960

gtagaaaccc caaccggtga aatcaaaaaa ctcgacggcc tgtgggcatt cagtctggat 1020

cgcgaaaact gtggaattga tcagcgttgg tgggaaagcg cgttacaaga aagccgggca 1080

attgctgtgc caggcagttt taacgatcag ttcgccgatg cagataatcg taattatgcg 1140
ggcaacgtct ggtatcagcg cgaagtcttt ataccgaaag gttgggcagg ccagcgatc 1200
gtgctgcgtt tcatgcggt cactcattac ggcaaagtgt gggtaataa tcaggaaagt 1260
atggagcatc agggcggcta tacgccattt gaagccgatg tcacgccgta tgtattgcc 1320
gggaaaagtg tacgtatcac cgtttgtgtg aacaacgaac tgaactggca gactatcccg 1380
ccgggaatgg tgattaccga cgaacacggc aagaaaaagc agtcttactt ccatgatttc 1440
tttaactatg ccggaatcca tcgcagcgta atgctctaca ccacgccgaa cacctgggtg 1500
gacgatalca ccgtgggtgac gcatgtcgcg caagactgta accacgcgtc tgttgactgg 1560
caggtgggtg ccaatgggtga tgcagcggtt gaactgcgtg atgcggatca acaggtgggt 1620
gcaactggac aaggcactag cgggactttg caagtgggtga atccgcacct ctggcaaccg 1680
ggtgaagggt atctctatga actgtgcgtc acagccaaaa gccagacaga gtgtgatata 1740
taccgcgttc gcgtcggcat ccgtcagtg gcagtgaagg gccaacagtt cctgattaac 1800
cacaaccgt tctactttac tggctttggt cgtcatgaag atgcggactt acgtggcaaa 1860
ggattcgata acgtgctgat ggtgcacgac cacgcattaa tggactggat tggggccaac 1920
tcctaccgta cctcgcatta cccttacgt gaagagatgc tcgactgggc agatgaacat 1980
ggcatcgtgg tgattgatga aactgctgct gtcggctttt cgctctcttt aggcattggt 2040
ttcgaagcgg gcaacaagcc gaaagaactg tacagcgaag aggcagtcaa cggggaaact 2100
cagcaagcgc acttacaggc gattaaagag ctgatagcgc gtgacaaaaa ccaccaagc 2160
gtggtgatgt ggagtattgc caacgaaccg gataccgctc cgcaagggtc acgggaatat 2220
ttcgcgccac tggcggaagc aacgcgtaaa ctcgaccega cgcgtccgat cacctgcgtc 2280
aatgtaatgt tctgcgacgc tcacaccgat accatcagcg atctctttga tgtgctgtgc 2340
ctgaaccgtt attacggatg gtatgtcaa agcggcgatt tggaaacggc agagaaggta 2400
ctggaaaaag aacttctggc ctggcaggag aaactgcac agccgattat catcacgaa 2460
tacggcgtgg atacgttagc cgggctgcac tcaatgtaca ccgacatgtg gagtgaagag 2520
tatcagtgtg catggctgga tatgtatcac cgcgtctttg atcgcgtcag cgcgcgctc 2580

000158

ggtgaacagg tatggaattt cgccgatttt gcgacctcgc aaggcatatt gcgcgttggc 2640
ggtacaaga aagggatctt cactcgcgac cgcaaaccga agtcggcggc tttctgctg 2700
caaaaacgct ggactggcat gaacttcggt gaaaaaccgc agcagggagg caaacaatga 2760
ggatccggaa atggtagtaa aactgacagc ggtatgtatg aaatgcttta aagaggcgtc 2820
gttttctaaa cgtttgggaa cggaaccga gatcgaaata attggtggg aagatatgta 2880
tcaatccgta tgcagaaagt gttacatcaa cgaatgataa ttttctata aaaactaaa 2940
aataaacatt gattaaattt taatataata cttaaaaatg gatgtgtgt cactggataa 3000
accgtttatg tattttgagg aaatagataa tgaactagaa tacgaaccag aaagtcaaa 3060
tgaggttgct aaaaaacttc catatcaggg acaattaaaa ctattactag gagaattgtt 3120
ttttctagt aagctacaga gacacgggt attggacggt gccactgtag tgtatatagg 3180
atcggctcct ggtacacaca tacgttatct acgtgatcat ttctataatt taggggtaat 3240
catcaaatgg atgctaattg acgggcatgc cctgatgcgg tattttctcc ttacgatct 3300
gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 3360
gttaagccag ccccgacacc cgccaacacc cgctgacgcg cctgacggg ctgtctgct 3420
cccggcatcc gtttacagac aagctgtgac cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt 3480
ttaccgtca tcaccgaaac gcgcgagacg aaagggcctc gtgatacgcc tattttata 3540
ggttaatgtc atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcactttc ggggaaatgt 3600
gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aataattca aatatgtac cgctcatgag 3660
acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca 3720
ttccgtgtc gcccttattc cttttttgc ggcattttgc ctctctgtt ttgctcacc 3780
agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat 3840
cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cggccgaag aacgttttcc 3900
aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgta ttgacgccgg 3960
gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc 4020
agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat 4080

000159

aaccatgagt gataaactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga 4140
gctaaccgct ttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc 4200
ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc 4260
aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt 4320
aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg ccttccggc 4380
tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctcgcg gtatcattgc 4440
agcactgggg ccagatggta agccctcccg tategtagtt atctacacga cggggagtca 4500
ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca 4560
ttggttaactg tcagaccaag ttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt 4620
ttaatttaa aggatctagg tgaagatcct tttgataat ctcatgacca aaatccctta 4680
acgtgagttt tcgtccact gagcgcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg 4740
agatcctttt ttctgcgcg taatctgctg ctgcaaaca aaaaaccac cgctaccagc 4800
ggtggtttgt ttcccgatc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggcttcag 4860
cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa 4920
gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggtgctgc 4980
cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc 5040
gcagcggctg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta 5100
caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag 5160
aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgca cgagggagct 5220
tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg ttccgccacc tctgacttga 5280
gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc 5340
ggccttttta cggttcctgg ccttttctg gccttttct cactgttct ttctgcgtt 5400
atcccctgat tctgttgata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctgccg 5460
cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaaga 5508

<211> 6820
<212> ADN
<213> Artificial

000161

<220>
<223> plásmido

<400> 3

ttattggaca ctagataatc atcacatggt accacaaaat tatataatgt ataaatgcga 60
aattattaaa cgcaaatac catgggaaaa cgcgcagtat acagacgatt tttacagta 120
tttggagagt tttagaggaa gtatatagag tagaaccaga attttgtaaa aataaatcac 180
atttttatc taatatgaaa caactatcga tagttatatt gctactatcg atagtatata 240
caaccaaacc tcactatca cagatatcaa aaaaactagg cgatgatgct actctatcgt 300
gtaatagaaa caatacacat ggatatcttg tcatgagttc ttggataag aaaccagact 360
ccattattct cttagcagcc aaaaacgatg tcgtatactt tgatgattat acagcggata 420
aagtatcata cgattcaccg tatgatactc tagctacaat tattacaatt aatcattga 480
catctggaga tgcaggtact tatatatgcg cattctttat aacatcaaca aatgatacgg 540
ataaaataga ttatgaagaa ttcgtcgacg cggccgcctg cagaagcttg gtacatggg 600
tatttatatt ccaaaaaaaaa aaaataaaat ttcaattttt gctctagaca tctatatact 660
atatagtaat accaatactc aagactacga aactgataca atctcttacc atgtgggtaa 720
tgttctcgat gtcgatagcc atatgcccgg tagttgcgat atacataaac tgatcactaa 780
ttccaaacce acccgctttt tatagtaagt tttcaccca taaataataa atacaataat 840
taatttctcg taaaagtaga aaatatattc taatttattg cacggttaagg aagtagaatc 900
ataaagaaca gtgacatgga tcccgctggt ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc 960
gttaccacac ttaatcgctt tgcagcacat cccctttcgc ccagctggcg taatagcgaa 1020
gaggccccga ccgatcgccc ttccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atggcgcttt 1080
gcctgggttc cggcaccaga agcgggtgccg gaaagctggc tggagtgcga tcttctgag 1140
gccgatactg tcgtcgtccc ctcaaactgg cagatgcacg gttacgatgc gcccatctac 1200
accaacgtaa cctatcccat tacgggtcaat ccgccgttg ttccacgga gaatccgacg 1260

ggttggtact cgctcacatt taatgttgat gaaagctggc tacaggaagg ccagacgcga 1320
attattttg atggcgtaa ctggcggtt catctgtgtt gcaacgggcg ctgggtcgtt 1380
tacggccagg acagtcggtt gccgtctgaa ttgacctga gcgcatttt acgcgccga 1440
gaaaaccgcc tcgcggtgat ggtgctgcgt tggagtgcg gcagttatct ggaagatcag 1500
gatatgtggc ggatgagcgg catttccgt gacgtctcgt tgctgcataa accgactaca 1560
caaatcagcg atttcatgt tgccactgc ttaatatg atttcagccg cgctgtactg 1620
gaggctgaag ttcagatgt cggcgagttg cgtgactacc tacgggtaac agtttctta 1680
tggcaggggtg aaacgcaggt cgccagcggc accgcgcctt tcggcggtga aattatcgt 1740
gagcgtggtg gttatgccga tcgcgtcaca ctacgtctca aggtcgaaaa cccgaaactg 1800
tggagcgccg aaatcccgaa tctctatcgt gcggtggtg aactgcacac cgccgacggc 1860
acgctgattg aagcagaagc ctgcgatgtc ggttccgcg aggtgcggat tgaaaatggt 1920
ctgctgctgc tgaacggcaa gccgttctg attcagggcg ttaaccgtca cgagcatcat 1980
cctctgcatg gtcaggtcat ggatgagcag acgatggtgc aggatatact gctgatgaag 2040
cagaacaact ttaacgccg gcgctgttcg cattatccga accatccgct gtggtacacg 2100
ctgtgcgacc gctacggcct gtatgtggtg gatgaagcca atattgaaac ccacggcatg 2160
gtgccaatca atcgtctgac cgatgatccg cgctggctac cggcgatgag cgaacgcgta 2220
acgcgaatgg tgcagcgca tcgtaatcac ccgagtgtga tcatctggtc gctggggaat 2280
gaatcaggcc acggcgctaa tcacgacgcg ctgtatcgt ggatcaaate tctgatect 2340
tcccggcgg tgcagtatga aggcggcgga gccgacacca cggccaccga tattatttgc 2400
ccgatgtacg cgcgcgtgga tgaagaccag ccttcccg ctgtgccgaa atggtccatc 2460
aaaaaatggc ttctgtacc tggagagacg cgcccgctga tctttgcga atacgccac 2520
gcgatgggta acagtcttg cggttctgt aaatactggc aggcgttcg tcagtatccc 2580
cgttacagg gcggcttct ctgggactgg gtggatcagt cgctgattaa atatgatgaa 2640
aacggcaacc cgtggtcggc ttacggcgtt gattttggcg atacgccgaa cgatgccag 2700
ttctgtatga acggtctggt ctttccgac cgcacggcg atccagcgt gacggaagca 2760

000162

aaacaccagc agcagttttt ccagttccgt ttatccgggc aaaccatcga agtgaccagc 2820
gaatacctgt tccgtcatag cgataacgag ctctgcact ggatggtggc gctggatggt 2880
aagccgctgg caagcgggtga agtgcctctg gatgtcgctc cacaaggtaa acagttgatt 2940
gaactgcctg aactaccgca gccggagagc gccgggcaac tcgggtcac agtacgcgta 3000
gtgcaaccga acgcgaccgc atggtcagaa gccgggcaca tcagcgctg gcagcagtgg 3060
cgtctggcgg aaaacctcag tgtgacgctc cccgccgct cccacgcat cccgcatctg 3120
accaccagcg aaatggattt ttgcatcgag ctgggtaata agcgttgga atttaaccgc 3180
cagtcagget ttcttcaca gatgtggatt ggcgataaaa aacaactgct gacgccgctg 3240
cgcgatcagt tcaccctgc accgctggat aacgacattg gcgtaagtga agcgaccgc 3300
attgacccta acgcctgggt cgaacgctgg aaggcggcgg gccattacca ggccgaagca 3360
gcgttgttg agtgacggc agatacatt gctgatcgg tgctgattac gaccggtcac 3420
gcgtggcagc atcaggggaa aacctattt atcagccgga aaacctaccg gattgatggt 3480
agtgtcaaa tggcgattac cgttgatgt gaagtggcga gcgatacacc gcatccggcg 3540
cggattggcc tgaactgcca gctggcgag gtagcagagc gggtaaactg gctcggatta 3600
gggccgcaag aaaactatcc cgaccgcctt actgccgcct gtttgaccg ctgggatctg 3660
ccattgtcag acatgtatac cccgtacgtc ttccgagcg aaaacgggtc gcgctcggg 3720
acgcgcgaat tgaattatgg cccacaccag tggcgcggcg acttcagtt caacatcagc 3780
cgctacagtc aacagcaact gatggaaacc agccatgcc atctgtgca cgcggaagaa 3840
ggcacatggc tgaatatcga cggtttccat atggggattg gtggcgacga ctctggagc 3900
ccgtcagtat cggcggaatt ccagctgagc gccgttcgt accattacca gttggtctgg 3960
tgtcaaaaat aaggatcctc gataccaaca acggtagaaa gtgttacaat atctactaca 4020
aaatatacaa ctagtactt tatagagata ttggcattg ttactaat ttattattg 4080
gccgtggcga tttctgtat tatatattt ttctgtagt gacggtctcg taaacaagaa 4140
acaatatat tatagattt aactcagata aatgtctgga ataattaa ctatcgtttt 4200
gagcggacca tctggttcg gcaagacagc tatagtcagg agactcttac aagattatgg 4260

000163

aaatatattt ggatttgtgg tatcccatat cactagattt cctcgtccta tggaacgaga 4320
agggtgcgtc taccattacg ttaacagaga ggccatttgg aagggaatag ccgctggaaa 4380
cttgctagaa catacagagt ttttgggaaa tatttatggg acttctazaa catccatgaa 4440
cacagctgct attaataatc gtatatgtgt tatggattta aacattgacg gagttaggag 4500
tcttaaaaac acatacttga tgccttactc tgtttatata agacctacat ctcttaaaat 4560
ggtagaaaact gcatgccctg atgcggtatt ttctccctac gcatctgtgc ggtatttcac 4620
accgcatatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc 4680
gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct gacgggcttg tctgtcccg gcatccgctt 4740
acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggtttca ccgtcatcac 4800
cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttatagggt aatgtcatga 4860
taataatggt ttcttagacg tcagggtggca ctttcggggg aaatgtgcgc ggaacccta 4920
ttgtttatt ttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat 4980
aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcggcc 5040
ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgttttgc tcaccagaa acgctggtga 5100
aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cagcagtggtg ttacatcgaa ctggatctca 5160
acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg tttccaatg atgagcactt 5220
ttaagtctt gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg 5280
gtcgcgcgat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc 5340
atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata 5400
acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt 5460
tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag 5520
ccatacaaaa cgacgagcgt gacaccacga tgctgtagc aatggcaaca acgttgcgca 5580
aactattaac tggcgaacta ctactctag ctccccggca acaattaata gactggatgg 5640
aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg 5700
ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat catgcagca ctggggccag 5760

000164

atggttaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg 5820
aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag 5880
accaagttta ctcatatafa ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaagga 5940
tctaggtgaa gatcctttt gataatctca tgacaaaaat ccettaacgt gagtttctg 6000
tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc 6060
tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaacaa aaccaccgct accagcgggtg gttgtttgc 6120
cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 6180
caaatactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca ctcaagaac tctgtagcac 6240
cgctacata cctcgctctg ctaatctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 6300
cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct 6360
gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 6420
acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgctcccgaggaggagaaag gcggacaggt 6480
atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg 6540
cctggtatct ttatagtct gtcgggttc gccacctctg acttgagcgt cgattttgt 6600
gatgctctc agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc ttttacggt 6660
tctggcctt ttgtggcct ttgttcaca tgttttcc tgcgttatcc cctgattctg 6720
tgataaccg tattaccgcc ttgagttag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg 6780
agcgcagcga gtcagttagc gaggaagcgg aagagagctc 6820

<210> 4
<211> 8373
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> plásmido

<400> 4
ttattggaca ctagataatc atcacatgtt accacaaaat tatataatgt ataaatgcga 60
aattattaaa cgcaaatac catgggaaaa cgcgcagtat acagacgatt ttttacagta 120

tttgagagt ttataggaa gtatatagag tagaaccaga atttgtaaa aataaatcac 180
atthttatatac taatatgaaa caactatcga tagttatatt gctactatcg atagtatata 240
caaccaaacc tcatctaca cagatatcaa aaaaactagg cgatgatgct actctatcgt 300
gtaatagaaa caatacacat ggatatcttg tcatgagttc ttgtataag aaaccagact 360
ccattattct cttagcagcc aaaaacgatg tctgtatactt tgatgattat acagcggata 420
aagtatcata cgattcacgg tatgatactc tagctacaat tattacaatt aatcattga 480
catctggaga tgcagggtact tatatatgag cattctttat aacatcaaca aatgatacgg 540
ataaaataga ttatgaagaa ttctgcgact cacagtcagg tctcaacccc gctcttgat 600
gattcccatg aagatatgat ctcccgctt tggggagtga ctgacacctc cctccctgtc 660
cctctgagat tgtgtgtgt aggttccgat cgattgactc ttctccagca tgtcatcagg 720
aaaattatca acatcaaggc agtcagggcc cctgcactca gtaatacata ctcccccag 780
ttcgggagac ccaagtcaac tctgagatc cgctcgtgca catcgggaag gtgaactca 840
acaaaatcct cagcctcgtc accgttcttg aaaacggtag acgggtctgc caggggggtgc 900
ataaggggga taaccgagga taccaacaac tccatatgtt gctggaggag ggaatgattgc 960
atctctggga ttaagacatt gccgtcaggt cctaataatta taccattgaa aaataccccc 1020
tttatcatgag gatgacacct cccccaaact cttaaacacc cttttgaagg gatgatctca 1080
ttccaagttc tgactgactt gtagtgagca tcggcttcca tcaaggctt gttgaatatg 1140
gtatatgctt ttccaaacc agggaagaat ttcttaaat gactgagacg tctgaaactc 1200
actgactgg tggatcatg ggactctagt gcacccagac actcctctct cttcttgacc 1260
aactcctcta caacaagggt ctcaatttcg tctgagcgaa agtcgtgcaa attgatcaac 1320
tgaccgggag ggcaccattt ggttcattt gatgtttgca tcgagacca tgttccatcc 1380
ataagtctaa gtccgagaac tccacataac tggagtttg atgccttt taaagactta 1440
tataggcctc ttcatctac aaagccgcaa gtctcactcc ctttgatgc tctctccct 1500
ctactattgg taaaaatgc acaagacatc cctagtctcg gattctggg catccaaatg 1560
gtgtaatcgt ggtagtgga gcagtaggta gaagacaccg ctactcctga gcattcccg 1620

ccagggaaga ccctcgagtg aagggatctg tcatatgggt ccaaatctgc cacacttga 1680
gatatgataa cgagagactc cttggtggtt tttacagttc gaagccagtg gtagtcaggg 1740
tacggattgt gtagagactc ttcatactg gggtcaccgg ccatcttcca gttgtacgcg 1800
gctctacatg catctggtgt tgggcggaaa tgctttctt tgaacgtggt tgtgacataa 1860
ccaacgaagt tagttaggt ttcagcctcc gtcacaacgc ctgtgcaagt gaacccgttc 1920
attttatgg ctgagatgta tccaacttta agttccatgt aggagaaccc tgacaggttg 1980
gtgcatcctt cgtcctccac taccaaattg ttgggcagc tgagggtatg tatgtcaatc 2040
gggctccagg gaccaagctt gtctggtatc gtgtaaatag ggaatttccc aaaacacaat 2100
ggaaaaacca gaaggggtac aaacaggaga gcctgaggaa ccggtaccat gggtatttat 2160
attccaaaaa aaaaaataa aattcaatt ttgctctag acatctatat actatatagt 2220
aataccaata ctcaagacta cgaaactgat acaatctctt atcatgtggg taatgttctc 2280
gatgtcgata gccatagcc cggtagtgc gatatacata aactgatcac taattccaaa 2340
cccaccgct tttatagta agttttcac ccataaataa taaatacaat aattaatttc 2400
tcgtaaaagt agaaaatata ttctaattta ttgcacggta aggaagtaga atcataaaga 2460
acagtacat ggatcccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacc 2520
aacttaatcg ccttcagca catccccctt tgcagctg gcgtaatagc gaagaggccc 2580
gcaccgatcg ccttcccaa cagtgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc ttgcctggt 2640
ttccggcacc agaagcgggtg ccggaaagct ggctggagtg cgatcttctt gaggccgata 2700
ctgtcgtcgt cccctcaaac tggcagatgc acggttacga tgcgccatc tacaccaacg 2760
taacctatcc cattacggtc aatccgccgt ttgtccac ggagaatccg acgggttggt 2820
actcgtcac attaatgtt gatgaaagct ggctacagga aggccagacg cgaattattt 2880
ttgatggcgt taactggcg tttcatctgt ggtgcaacgg gcgctgggtc ggttacggcc 2940
aggacagtcg ttgccgtct gaatttgacc tgagcgcatt tttacgcgc ggagaaaacc 3000
gcctcgcgt gatggtgctg cgttgagtgc acggcagtta tctggaagat caggatatgt 3060
ggcggatgag cggcatttc cgtgacgtct cgttgctgca taaaccgact acacaaatca 3120

gagatttcca tgttgccact cgtttaatg atgatttcag ccgcgctgta ctggaggctg 3180
aagttcagat gtgcggcgag ttgcgtgact acctacgggt aacagtttct ttatggcagg 3240
gtgaaacgca ggtcgccagc ggcaccgcgc ctttcggcgg tgaaattatc gatgagcgtg 3300
gtggttatgc cgatcgctc acactacgtc tcaaggctga aaaccggaaa ctgtggagcg 3360
ccgaaatccc gaatctctat cgtgcggtgg ttgaactgca caccgcccgc ggcacgctga 3420
ttgaagcaga agcctgcgat gtgcgttcc gcgagggtgcg gattgaaaat ggtctgctgc 3480
tgctgaacgg caagccgttg ctgattcgag gcgttaaccg tcacgagcat catcctctgc 3540
atggtcagggt catggatgag cagacgatgg tgcaggatat cctgctgatg aagcagaaca 3600
actttaacgc cgtgcgctgt tcgattatc cgaacctcc gctgtggtac acgctgtgcg 3660
accgctacgg cctgtatgtg gtggatgaag ccaatattga aaccacggc atggtgcaa 3720
tcaatcgtct gaccgatgat ccgcgctggc taccggcgat gagcgaacgc gtaacgcgaa 3780
tggtgcagcg cgatcgtaat caccgagtg tgatcatctg gtcgctgggg aatgaatcag 3840
gccacggcgc taatcacgac gcgctgtatc gctggatcaa atctgtcgat cctccccgc 3900
cgggtgcagta tgaaggcggc ggagccgaca ccacggccac cgatattatt tgcccgatgt 3960
acgcgcgcgt ggatgaagac cagcccttc cggtgtgcc gaaatggcc atcaaaaaat 4020
ggcttctgct acctggagag acgcgcccgc tgatccttg cgaatacgcc caccgatgg 4080
gtaacagtct tggcggtttc gctaaatact ggcaggcgtt tcgtcagtat ccccgttac 4140
agggcggcgt cgtctgggac tgggtggatc agtcgctgat taaatatgat gaaaacggca 4200
accggtggtc ggcttacggc ggtgatttg gcgatacgcc gaacgatcgc cagttctgta 4260
tgaacggtct ggtctttgcc gaccgcacgc cgcattcagc gctgacggaa gcaaacacc 4320
agcagcagtt ttccagttc cgtttatccg ggcaaaccat cgaagtgacc agcgaatacc 4380
tgttccgtca tagcgataac gagctcctgc actggatggt ggcgctggat ggtaagccgc 4440
tggcaagcgg tgaagtgcct ctggatgtcg ctccacaagg taaacagttg attgaactgc 4500
ctgaactacc gcagccggag agcggcgggc aactctggct ccagctacgc gtagtgcaac 4560
cgaacgcgac cgcatggta gaagccgggc acatcagcgc ctggcagcag tggcgtctgg 4620

000158

cggaaaacct cagtgtgacg ctccccgccg cgtcccacgc catcccgc atgaccacca 4680
gcgaaatgga ttttgcacg gagctgggta ataagcgttg gcaatttaac cgccagtcag 4740
gctttcttc acagatgtgg attggcgata aaaaacaact gctgacgccg ctgcgcgac 4800
agttcacccg tgcaccgctg gataacgaca ttggcgtaag tgaagcgacc cgcattgacc 4860
ctaacgcctg ggtcgaacgc tggaaggcgg cgggccatta ccaggccgaa gcagcgttgt 4920
tgcaagtgcac ggcagataca cttgctgatg cgggtctgat tacgaccggt cacgcgtggc 4980
agcatcaggg gaaaacctta ttatcagcc ggaaaaccta ccggattgat ggtagtggtc 5040
aatggcgat taccgttgat gttgaagtgg cgagcgatac accgcacccg gcgcggattg 5100
gcctgaactg ccagctggcg caggtagcag agcgggtaaa ctggctcgga ttagggccgc 5160
aagaaaacta tcccagccgc cttactgccg cctgtttga ccgctgggat ctgccattgt 5220
cagacatgta taccgcgtac gtctccga gcgaaaacgg tctgcgtgc gggacgcgcg 5280
aattgaatta tggccacac cagtggcgcg gcgacttcca gttcaacac agccgctaca 5340
gtcaacagca actgatggaa accagccac gccatctgt gcacgcggaa gaaggcacat 5400
ggctgaatat cgacggttc catatgggga ttggtggcga cgactcctgg agcccgtcag 5460
tatcggcgga attccagctg agcgccgttc gctaccatta ccagtggtc tgggtgcaaa 5520
aataaggatc ctgatacca acaacggtag aaagtgttac aatactact aaaaatata 5580
caactagtga cttatagag atatttgca ttgttact aatttatta ttggccgtgg 5640
cgattttctg tattatata ttttctgta gtggacggtc tcgtaaaca gaaacaata 5700
tattatagat ttaactcag ataatgtct ggaataatta aatctatct tttgagcgga 5760
ccatctgggt ccggcaagac agctatagtc aggagactct tacaagatta tggaatatata 5820
tttgatttg tggatccca taccactaga ttctctgtc ctatggaacg agaaggtgtc 5880
gtctaccatt acgttaacag agaggccatt tggaaggga tagccgctgg aaacttgcta 5940
gaacatacag agttttggg aatatattat gggacttcta aaacatccat gaacacagct 6000
gctattaata atcgtatatg tggtatgat ttaaacattg acggagttag gactcttaa 6060
aacacatact tgatgcctta ctctgttat ataagaccta catctctaa aatggtagaa 6120

actgcatgcc ctgatgcggg atttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat 6180
atggtgcaact ctcaagtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc 6240
gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccgcatccg cttacagaca 6300
agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg 6360
cgcgagacga aagggcctcg tgatagcct attttatag gttaatgtca tgataataat 6420
ggttcttag acgtcagggt gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctattgttt 6480
attttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 6540
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 6600
ctttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 6660
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 6720
taagatcctt gagagtttc gccccgaaga acgtttcca atgatgagca cttttaaagt 6780
tctgctatgt ggcgcgggtat tatcccgat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg 6840
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 6900
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactgc 6960
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt tttgcacaa 7020
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 7080
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 7140
aactggcgaa ctacttact tagcttccc gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 7200
taaagttgca ggaccacttc tgcgtcggc cttccggct ggctggttta ttgtgataa 7260
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcg tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa 7320
gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 7380
tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tgtaactgt cagaccaagt 7440
ttactcatat atactttaga ttgatttaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 7500
gaagatcctt ttgataatc tcatgaccaa aatccctaa cgtgagtttt cgttcactg 7560
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atctcttga gatcctttt ttctgcgct 7620

000170

aatctgctgc ttgcaaaca aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 7680
 agagctacca actctttt cgaaggtaac tggttcagc agagcgaga taccaatac 7740
 tggtcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 7800
 atacctcgt ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 7860
 taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 7920
 gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gatactaca 7980
 gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccgtg 8040
 aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggtg 8100
 tctttatagt cctgtcgggt ttgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 8160
 gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 8220
 ctttctgctg ccttttctc acatgttctt tctgcgtta tccctgatt ctgtggataa 8280
 ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgag 8340
 cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagag etc 8373

000171

<210> 5
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Circovirus porcino

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(702)
 <223> Circovirus porcino tipo 2A ORF2

<400> 5
 atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttgge 60
 cagatctcc gccgcgcgc ctggtctgct cccccgcgc accgtaccg ttggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcacctcg gatatactgt caaggctacc 180
 acagtcagaa cgccctctg ggcgggtggac atgatgagat ttaatttga cgactttgtt 240
 cccccgggag gggggacca caaaatctct atacccttg aatfactacg aataagaaag 300
 gtttaagggtg aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgatagggg agtgggctcc 360

actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgacca 420
tatgtaaact actcctcccg ccatacaate cccaaccct tctctacca ctcccggtac 480
ttcacacca aacctgttct tgactccacc attgattact tccaaccaa taacaaaagg 540
aatcagcttt ggatgagget acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaattttaa agacccccca cttaaccct aa 702

<210> 6
<211> 702
<212> ADN
<213> Circovirus porcino

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(702)
<223> Circovirus porcino tipo 2B ORF2

<400> 6
atgacgtatc caaggaggcg ttaccgaaga agaagacacc gccccgcag ccatcttgcc 60
cagatcctcc gccgcgccc ctggctcgte ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttaacac ccgcctctcc cgcacctcg gatatactgt caagcgaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat tcaatattaa tgactttctt 240
ccccaggag ggggctcaaa cccccgtct gtgcccttg aatactacag aataagaaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctccccg atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
agtgtgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctcac ctatgacccc 420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagcct tctctacca ctcccggtac 480
ttacccccca aacctgtct agattccact attgattact tccaaccaa caacaaaaga 540
aaccagctgt ggctgagact acaaactgct ggaaatgtag accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaattttaa agacccccca cttaaccct aa 702

<210> 7
<211> 765
<212> ADN
<213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(765)
<223> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino strain ISU12 ORF3

<400> 7
atggctaata gctgtacatt cctccatatt ttctctgtt gcagcttctt gtactctttt 60

tgttgtctg tgggtgcggg ttccaatget acgtactgtt ttggtttcc gctggtagg 120

ggcaattttt ctttgaact cacggtgaac tacacggtgt gcccgcttg cctcaccgg 180

caagcagccg cagaggccta cgaaccgggt aggtccctt ggtgcaggat agggcatgat 240

cgatgtgggg aggacgatca tgatgaacta gggtttggtg tgccgcttg cctctccagc 300

gaaggccact tgaccagtgc ttacgcctgg ttggcgttcc tgccttcag ctatacgcc 360

cagttccatc ccgagatatt cgggataggg aatgtgagtc gagtctatgt tgacatcaag 420

caccaattca ttgcgctgt tcatgatggg cagaacacca cctgcccc ccatgacaac 480

atttcagccg tgttcagac ctattaccag catcaggtcg acggcggcaa ttggtttcac 540

ctagaatggc tgcgtccctt ctttctctt tgggtggtt taaatgtctc ttggtttctc 600

aggcgttcgc ctgaagcca tgttcagtt cgagtcttc agacatcaag accaacacca 660

ccgcagcggc aggcttggc gtccccaag acatcagttg ccttaggcac cgcaactcgg 720

cctctgaggc gattcgcaaa gtccctcagt gccgcacggc gatag 765

<210> 8
<211> 537
<212> ADN
<213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(537)

<223> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino strain ISU12
ORF4

000174

<400> 8

atggctgcgt cccttctttt cctcttggtt gggtttaaatt gtctcttggt ttctcaggcg 60
ttcgctgca agccatgttt cagttcgagt ctttcagaca tcaagaccaa caccaccgca 120
gcggcaggct ttgctgtcct ccaagacatc agttgcctta ggcatcgcaa ctggcctct 180
gaggcgattc gcaaagtccc tcagtgcgcg acggcgatag ggacacccgt gtatatcact 240
gtcacagcca atgttaccga tgagaattat ttgcattcct ctgattctct catgctttct 300
tcttgctttt tctatgcttc tgagatgagt gaaaagggat ttaagggtgt atttggaat 360
gtgtcaggca tcgtggcagt gtgcgtcaac ttcaccagtt acgtccaaca tgtaaggaa 420
ttaccaaac gtctcttggt agttgacat gtgcggctgc tccatttcat gacgcccag 480
accatgaggt gggcaactgt tttagcctgt ctttttgcca ttctgttggc aatttga 537

<210> 9

<211> 603

<212> ADN

<213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)..(603)

<223> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino strain ISU12
ORF5

<400> 9

atgttgggga aatgcttgac cgcgggctgt tgctcgcaat tgctttttt gtggtgtatc 60
gtgccgtctt gttttgtgc gctcgtcagc gccaacggga acagcagctc aaatttacag 120
ctgatttaca acttgacgct atgtgagctg aatggcacag attggctagc taataaattt 180
gactgggcag tggagtgttt tgcattttt cctgtgttga ctcacatgt ctcttatggt 240
gccctcacta ctagccattt ccttgacaca gtcggtctgg tcaactgtgc taccgctggg 300
tttgttcaag ggcggtatgt tctgagtagc atctacgcgg tctgtgccct ggctgcgttg 360
atttgcttcg tcattaggct tgcgaagaat tgcattgtcct ggcgtactc atgtaccaga 420

tataccaact ttcttctgga cactaagggc agactctatc gttggcggtc gcctgtcatc 480
atagagaaaa ggggcaaagt tgaggtcgaa ggtcacctga tcgacctcaa aagagttgtg 540
cttgatgggt ccgcgggtac ccctgtaacc agagtttcag cggaacaatg gggtcgtcct 600
tag 603

<210> 10
<211> 525
<212> ADN
<213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(525)
<223> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino starin ISU12 ORF6

<400> 10
atggggctgt ccttagatga cttctgtcat gatagcacgg ctccacaaaa ggtgctcttg 60
gcgttttcta ttacctacac gccagtgatg atatatgcc taaaggag tcgcggccga 120
ctgctagggc ttctgcacct ttgatcttc ctgaattgtg ctttcacctt cgggtacatg 180
acattcgtgc actttcagag tacaataag gtcgcgtca ctatgggagc agtagttgca 240
ctcctttggg ggggtgtact agccatagaa acctggaaat tcacacctc cagatgccgt 300
tttgcttgc taggccgcaa gtacattctg gccctgccc accacgttga aagtgccgca 360
ggctttcatc cgattcggc aatgataac cagcatttg tcgtccggcg tcccggctcc 420
actacggtca acggcacatt ggtgcccggg ttaaaaagcc tcgtgttggg tggcagaaaa 480
gctgttaaac agggagtggg aaacctgtc aaatatgcca aataa 525

<210> 11
<211> 372
<212> ADN
<213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

<220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(372)

<223> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino strain ISU12 ORF7

000176

<400> 11

atgccaaata acaacggcaa gcagcagaag agaaagaagg gggatggcca gccagtcaat 60
cagctgtgcc agatgctggg taagatcatc gctcagcaaa accagtccag aggcaaggga 120
ccgggaaaga aaaataagaa gaaaaacccg gagaagcccc attccctct agcgactgaa 180
gatgatgtca gacatcaatt taccctagt gagcggcaat tgtgtctgtc gtcaatccag 240
accgccttta atcaaggcgc tgggacttgc accctgtcag attcaggag gataagttac 300
actgtggagt ttagtttggc tacgcatcat actgtgcgc tgatccgct cacagcatca 360
ccctcagcat ga 372

<210> 12

<211> 606

<212> ADN

<213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)..(606)

<223> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino strain Olot91 ORF5

<400> 12

atgagatgtt ctcacaaatt ggggcgttc ttgactctc actcttgctt ctggtgctt 60
ttttgctgt gtaccggctt gtcttggtcc ttgtcgtg gcagcggcag cagctcgaca 120
taccaataca tatataactt aacgatatgc gagctgaatg ggaccgactg gttgtccaac 180
cattttgatt gggcagtcga gacctttgtg cttaccggg ttgccactca tatectctca 240
ctgggttttc tcacaacaag ccatttttt gagcgctcg gtctcggcgc tgtgtccact 300
acaggatttg ttggcgggcg gtatgtactc agcagcgtgt acggcgcttg tgctttcgca 360
gcgctcgat gttttgtcat ccgtgctgtt aaaaattgca tggcttgccg ctatgccac 420
accgggtta ccaacttcat tgtggacgac cgggggagaa tccatcggtg gaagtctcca 480
atagtggtag agaaattggg caaagctgaa gtcggtggcg acctgtcac catcaaaca 540

gtcgtcctcg aaggggttaa agtcaaccc ttgacgagga ctcggctga gcaatgggaa 600

gcctag

606

000177

(21) N° de solicitud:				(5°) Int Cl: C12N 15/86	
22) Fecha de solicitud:				(7°) Solicitante(s) WYETH LLC	
(30) Prioridad	(31) No.	32) Fecha	(33) País	(72) Inventor(es) WU, Stephen, Qitu; GILL, Michael, A.; Y OTRO	
	60/932,421	30.05.2007	US	(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 30.12.2009				(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 05.03.2009	
Fecha de presentación de la solicitud: 28.05.2008				N° publicación: WO/2009/029130	
No. de solicitud PCT/US2008/006735					
(54) Titulo: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO					

Reivindicación(es):

1. Un vector poxvirus recombinante de mapache (rRCPV) que comprende una o más moléculas de ácido nucleico exógenas que codifican una proteína del virus del síndrome reproductivo y respiratorio de porcinos (PRRSV), en donde:

- (a) por lo menos una molécula de ácido nucleico se inserta en el sitio de la hemaglutinina o en el sitio de la timidina quinasa del genoma de poxvirus de mapache; o
- (b) por lo menos dos moléculas de ácido nucleico se insertan en el sitio de la hemaglutinina o en el sitio de la timidina quinasa del genoma del poxvirus de mapache; o
- (c) por lo menos una molécula de ácido nucleico se inserta en el sitio de la hemaglutinina y por lo menos una molécula de ácido nucleico se inserta en el sitio de la timidina quinasa del genoma del poxvirus de mapache

000179


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS
SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION PCT X MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional : C12N 15/86

(71) Solicitante(s) WYETH LLC

(72) Inventor(es) WU, Stephen, Qitu; GILL, Michael, A.; CHU, Hsien-Jue.

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad

(31) *No. Prioridad*

(32)

Fecha

(33)

País

60/932,421

30.05.2007

JS

(85) Fecha inicio fase nacional : 30.12.2009

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 05.03.2009

Fecha de presentación de la solicitud: 28.05.2008

N° publicación: WO/2009/029130

No. de solicitud PCT/US2008/006735

(54) Título: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION _____ **PCT** **X** **MODELO DE UTILIDAD** _____ **DISEÑO INDUSTRIAL** _____

(21) N° de solicitud:	(22) Fecha de solicitud:
-----------------------	--------------------------

(51) Clasificación Internacional : C12N 15/86

(71)Solicitante(s) WYETH LLC

(72) Inventor(es) WU, Stephen, Qitu; GILL, Michael, A.; CHU, Hsien-Jue.

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 60/932,421	(32) Fecha 30.05.2007	(33) País US
----------------	---	---------------------------------	------------------------

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 30.12.2009

(87) **Publicación internacional:**

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 28.05.2008
No. de solicitud PCT/US2008/006735

Fecha: 05.03.2009

No. Publicación : WO/2009/029130

(54) Titulo: POXVIRUS DE MAPACHE QUE EXPRESA GENES DE VIRUS PORCINO

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con una nueva vacuna del vector poxvirus recombinante de mapache en el que el vector expresa una o más proteínas antigénicas codificadas por múltiples cuadros de lectura abiertos, preferiblemente el ORF5, ORF6, y/o ORF3/ORF4/ORF7, de una o más de las cepas del virus del síndrome reproductivo y respiratorio de porcino solo o en combinación con un cuadro de lectura abierto del circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), preferiblemente ORF2, en los sitios de la hemaglutinina (ha) y/o timidina quinasa (tk).

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

2009/014

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,948
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-134464- -00000-0000

Fecha: 2009-11-25 16:21:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 186

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SOM: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

1911



000182

2009/01/11

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 57,145
FECHA : AGOSTO 3 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-134464-00000-0000

Fecha: 2009-11-25 16:21:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 186

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	55003255	03/08/2009	26,579,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 208,000.00

SON: DOSCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

281 13

2009/011 000183

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 57,146
FECHA : AGOSTO 3 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-134464-00000-0000

Fecha: 2009-11-25 16:21:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 186

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	55003255	03/08/2009	26,579,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 208,000.00

SUN: DOSCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

00189

2009/015

000184

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 80,272

FECHA : OCTUBRE 26 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-134464-00000-0000

Fecha: 2009-11-25 16:21:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 186

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	121953904	26/10/2009	54,821,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
99		OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	8,000.00
TOTAL :			\$ 8,000.00

SON: OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

000185
2009/014

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 72,696
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-134464- -00000-0000

Fecha: 2009-11-25 16:21:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 186

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	4507B143	28/09/2009	97,587,500.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
99		OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.00
		TOTAL :	\$ 500.00

SON: QUINIENTOS PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

00000



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

000186
2009/014

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 72,697
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-134464-00000-0000

Fecha: 2009-11-25 16:21:51

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 186

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	45078143	28/09/2009	97,587,500.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
99		OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	500.00
TOTAL :			\$ 500.00

SON: QUINIENTOS PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

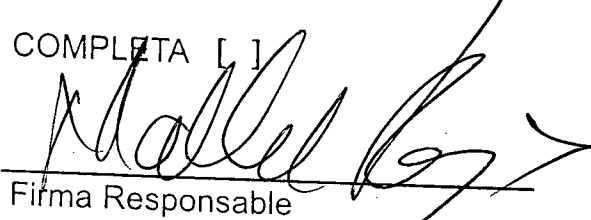
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha.



No. 09-134464- -00000-0000

Fecha: 2009-11-25 16:21:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 186

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10

Conmutador: 3 82 0840

Fax: 3505220

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá D.C. - Colombia



Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO

REFERENCIA	Radicación No.	9 134464
	Solicitud internacional	PCT/US2008/006735
	Fecha inicio fase nacional	30/12/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

254

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...



Radicación No.: 9 134464

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

JESUS FERNEL GARCIA GARCIA
Director de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha _____
adpall **08 ENE. 2010**

Al contestar favor indique el número
de radicación consignado en el rótulo

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia