



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.**

07-3384

54. **TÍTULO**

VACUNAS DE SUBUNIDADES PRRSV

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE**

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

DOMICILIO

ST. JOSEPH, MISSOURI 64506, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO**

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D. C.,**

(FORMA P-10)

1

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-003384-00000-0000
Fec: 2007-01-15 18:58:14 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE/II
Eve: 379 FASENACIONAL/II

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SOLICITUD DE:

1

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

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **BOEHRINGER INGELHEIM
VETMEDICA, INC.**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de Delaware, Estados
Unidos de América.

Dirección: 2621 N. Belt Highway,
St. Joseph, Missouri 64506,
Estados Unidos de América

Domicilio: St. Joseph,
Missouri 64506,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 38 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

1. **Eric M. VAUGHN**
509 Ash Avenue, Ames,
Iowa 50014-7067,
Estados Unidos de América

2. **Richard STAMMER**
5302 Thackery Drive, Ames,
Iowa 50014,
Estados Unidos de América

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2005/021973Fecha: 17 de junio de 2005Publicación Internacional No. WO 2006/002193 A2Fecha: 5 de enero de 2006

6

Título (54)**VACUNAS DE SUBUNIDADES PRRSV**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 39/12

8

PrioridadSI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US
US

(32) Fecha

17 de junio de 2004
16 de junio de 2005

(31) Número de Solicitud

60/581,350
11/154,617

9

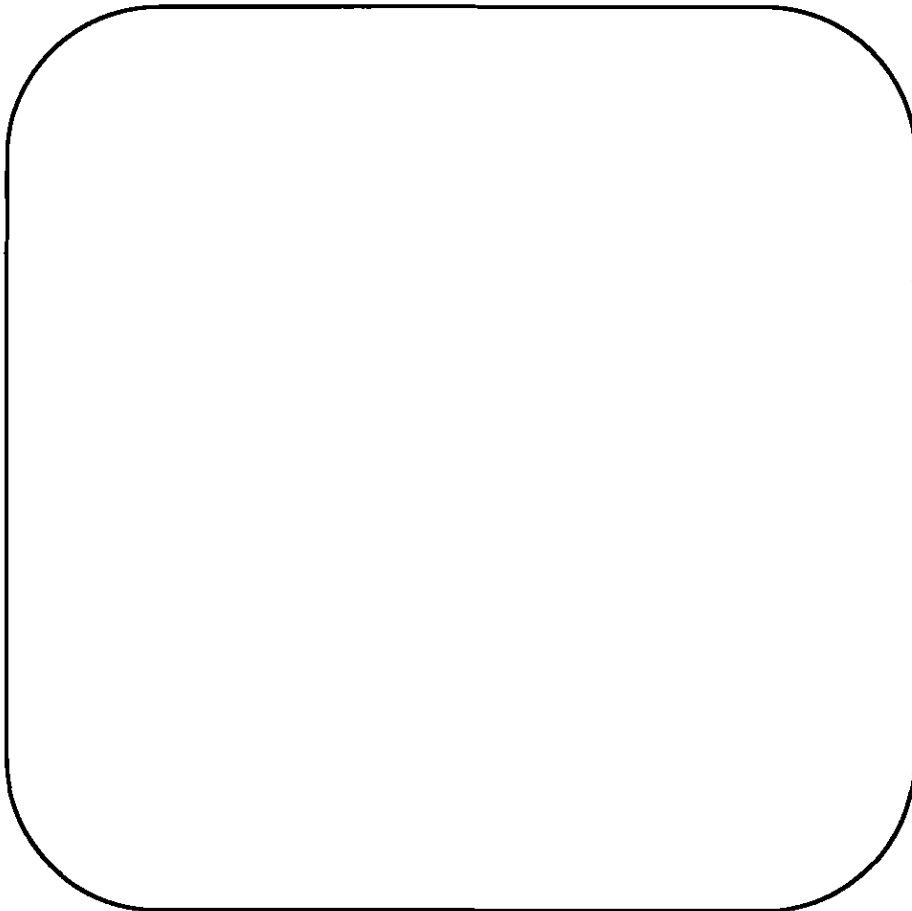
Comprobante de pago No.: 07- 1,778**Fecha: 10 de enero de 2007**

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 482.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ 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 efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar 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 12x12
- ☐ 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.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

JDF

266



DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2006/002193 A2
2. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN
FASE INTERNACIONAL**



4/4

1196

15149
0364

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: The United States of America

THIS PUBLIC DOCUMENT

2. has been signed by JEANNE E. ROGERS

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC

4. in the State of Connecticut for the term of November 26, 2001 to November 30, 2006

CERTIFIED

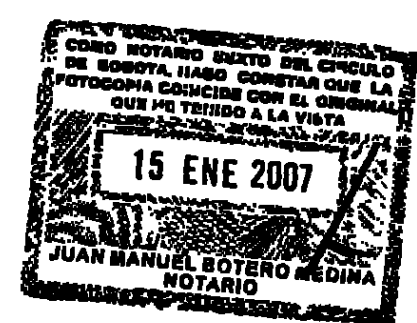
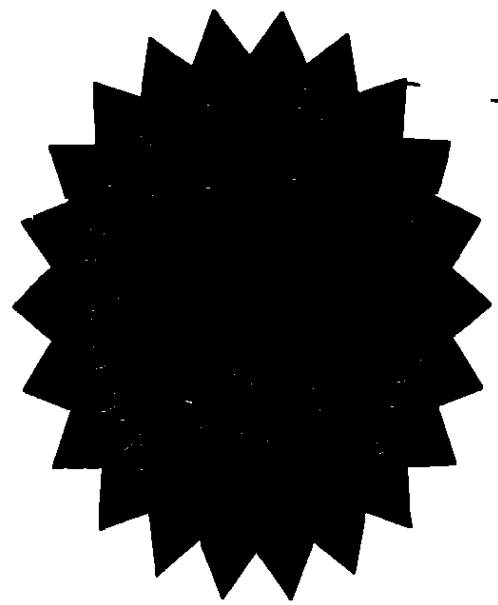
5. at Hartford, Connecticut

6. on March 13, 2006

7. by SUSAN BYSIEWICZ Secretary of the State of Connecticut

8. Number : 2006-3439

9. Seal :



10. Signature

Susan Bysiewicz

Secretary of the State

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

domiciliado (s)
en/of

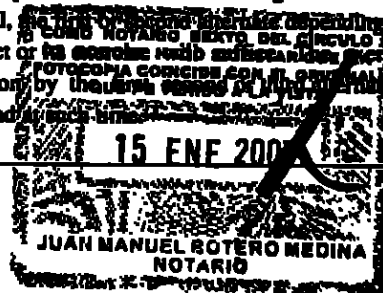
2621 North Belt Highway,

St. Joseph, MO 64506, Estados Unidos de América

hereby ratify the patent appl. No. 06.006.798 filed by Emilio Ferrero on Jan. 25, 2006, and

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, or the first or second alternate in their turn, or both of them, as the case may be, and the mere fact or its exercise shall constitute the exercise of the representation; by the first or second alternate in their turn shall end.



Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso- administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

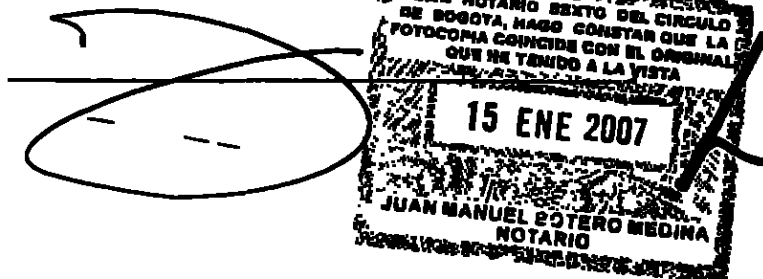
In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 9th Day of March, 2006

en/in Ridgefield, Connecticut USA

por/by Marla S. Persky, Secretary

Firma/Signature



CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____
de 200 _____ ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado de _____
compareció(eron) personalmente _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los _____ 9 _____ días del mes de _____ MARZO
de 200 _____ 6 _____ compareció(eron) ante mí,
_____ Maria S. Persky

Quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en
representación de la Sociedad/compañía denominada
_____ BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.,

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

NOMBRAMIENTO/RESOLUCION DE LA JUNTA
DIRECTIVA EN RIDGEFIELD, CONNECTICUT
FECHADO 2 MAYO 2005

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que _____ MARIA S. PERSKY ES SECRETARIA

DE BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de
acuerdo con las leyes de] _____ Estado de Delaware

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
_____ 2621 North Belt Highway

_____ St. Joseph, Missouri 64506 EUA

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) _____ Maria S. Persky

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad _____ Ridgefield

Estado _____ Connecticut

Hoy _____ 9 _____ Marzo _____ de 200 _____ 6 _____

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

© CAVELIER ABOGADOS
WFFODEDI-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____
200 _____ before me, a Notary Public or Attesting Official of _____
personally appeared _____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed
that foregoing document, and who has(have) legal capacity to
execute it.

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this _____ 9th _____ day of _____ March
2006 _____ appeared before me
_____ Maria S. Persky

who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named
_____ BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

I certify:

1. That I have seen the following documents:*

Appoint/Resolution by the Board of Directors in Ridgefield,
Connecticut dated May, 2, 2005.

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That _____ Maria S. Persky is Secretary to

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws _____ The State of Delaware

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
_____ 2621 North Belt Highway

_____ St. Joseph, Missouri 64506 USA

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of
Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set
forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) _____ Maria S. Persky

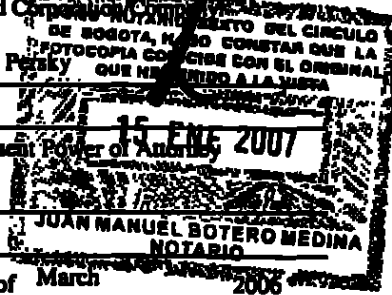
is(are) authorized to grant the present Power of Attorney

City _____ Ridgefield

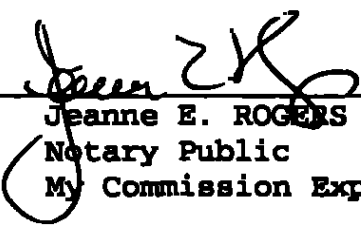
State _____ Connecticut

This _____ 9th _____ day of _____ March _____ 2006 _____

JEANNE E. R. GERS
NOTARY PUBLIC
MY COMMISSION EXPIRES NOV 30, 2008



Personally appeared, Marla S. Persky, signer and sealer of the foregoing instrument and acknowledged the same to be her free act and deed before me this 9th day of March, 2006.


Jeanne E. ROGERS

Notary Public

My Commission Expires: 11/30/2006

APOSTILLE

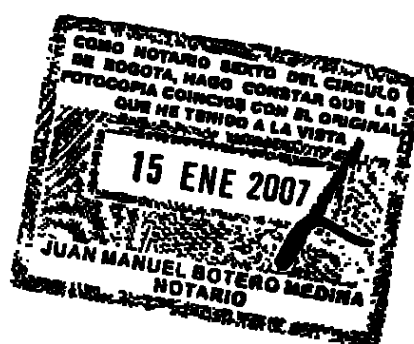
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:
- This public document
2. has been signed by
3. acting in the capacity of
4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at 6. the
7. by
8. No.
9. Seal/stamp 10. Signature

.....



109

TRADUCCIÓN OFICIAL N . 15/05.06 preparada por María Elvira Martelo, traductora oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante resolución 2879 de 1999 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de Poder en inglés y español, por el cual **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.**, sociedad domiciliada en 2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 6406, Estados Unidos de América, ratifica la solicitud de patente No. 06.006.798 presentada por Emilio Ferrero el 25 de enero de 2006 y otorga poder a **EMILIO FERRERO, GONZAL PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y GERMAN CAVELIER**.

Dado y firmado el 9 de marzo de 2006 en Ridgefield, Connecticut, E.U.A.

Por María S. Persky, Secretaria

Firma: (firma ilegible)

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia legal de **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.**, y a la capacidad legal de María S. Persky para otorgar poder.

Dado y firmado en la ciudad de Ridgefield

Estado de Connecticut

El 9 de marzo de 2006

(Firma), JEANNE E. ROGERS, Notario Público, Mi comisión expira el 30 de noviembre de 2006.

Al dorso:

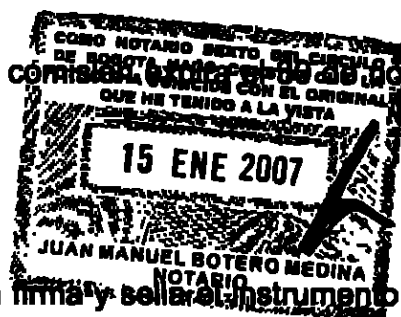
Compareció personalmente María S. Persky, quien firma y sella el instrumento anterior y reconoció a éste como un acto libre ante mí hoy 9 de marzo de 2006.

(Firmado)

JEANNE E. ROGERS

Notario Público

Mi comisión expira el 30 de noviembre de 2006



11/10

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

ESTE DOCUMENTO PÚBLICO

2. ha sido firmado por **JEANNE E. ROGERS**

3. actuando en su capacidad de **NOTARIO PÚBLICO**

4. del estado de Connecticut por el término 26 de noviembre de 2001 a 30 de noviembre de 2006

CERTIFICADO

5. en Hartford, Connecticut

6. el 13 de marzo de 2006

7. por **SUSAN BYSIEWICZ**, Secretario de Estado de Connecticut

8. Número: **2006-3439**

9. Sello: sello del Estado de Connecticut

10. Firma: (firmado), Susan Bysiewicz, Secretario de Estado

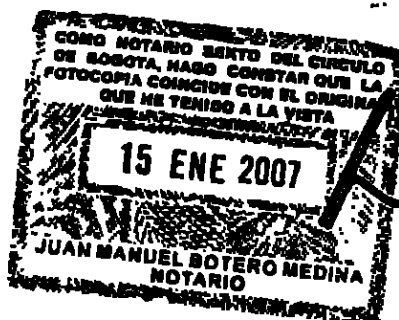
Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 15149-841-001-9

WPC 15149 - ID 12

MAR 31/06

Maria E. Martelo
TRADUCCIÓN No. 15/05.06
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

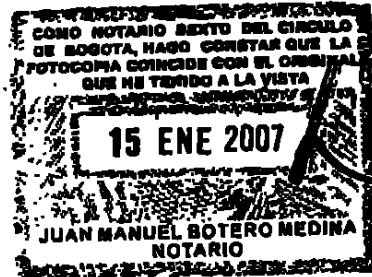
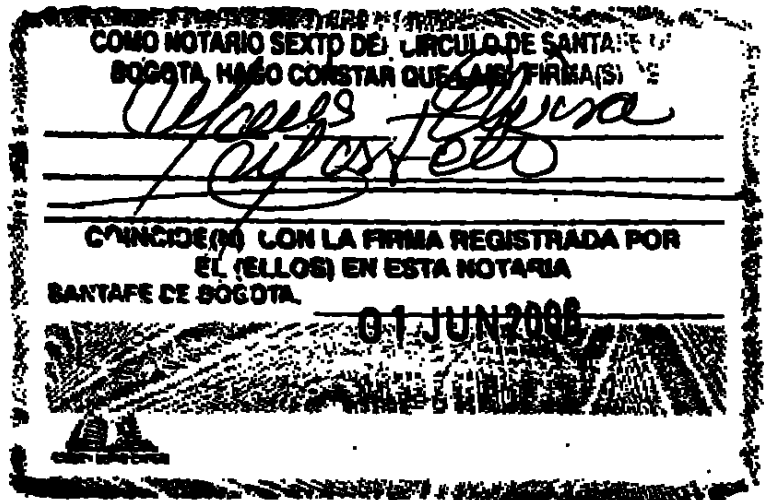


MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

451535
Marta Martelo
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

2006 MAY -1 A 11:56
Cmo
OFICINA DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
5 January 2006 (05.01.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/002193 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/12 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/021973

(22) International Filing Date: 17 June 2005 (17.06.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/581,350 17 June 2004 (17.06.2004) US
11/154,617 16 June 2005 (16.06.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
[US/US]; 2621 N. Belt Highway, St. Joseph, MO 64506
(US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): VAUGHN, Eric, M.
[US/US]; 509 Ash Avenue, Ames, IA 50014-7067 (US).
STAMMER, Richard [US/US]; 5302 Thackery Drive,
Ames, IA 50014 (US).

(74) Agent: TRUITT, Tracy, S.; Hovey Williams LLP, Suite
400, 2405 Grand Boulevard, Kansas City, MO 64108 (US).

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

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PRRSV SUBUNIT VACCINES

(57) Abstract: Vaccines effective against PRRSV include at least one portion of PRRSV ORF1. Such vaccines, upon administra-
tion, provoke an immune response in PRRSV-susceptible animals. Moreover, compositions in accordance with the present invention
provide immune response up to and including protective immunity against PRRSV as well as reduce the severity of PRRSV and/or
incidence of PRRSV. Selected portions of ORF1 can be used singularly, in combination with one another, in combination with other
PRRSV ORFs, and in combination with other PRRSV vaccines.

WO 2006/002193 A2

21
23
12**PRRSV SUBUNIT VACCINES****RELATED APPLICATIONS**

5 This application claims the benefit of Provisional Application Serial No. 60/581,350, filed on June 17, 2004, the teachings and content of which are expressly incorporated by reference herein.

SEQUENCE LISTING

10 A printed Sequence Listing accompanies this application, and has also been submitted with identical contents in the form of a computer readable ASCII file on a CD-ROM.

BACKGROUND OF THE INVENTION**Field of the Invention**

15 The present invention is broadly concerned with vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). More particularly, the invention is concerned with the prevention of PRRS in swine by the administration of a vaccine comprising DNA subunits of PRRS virus (PRRSV). Still more particularly, the invention pertains to the use of open reading frame 1 (ORF1) in a DNA subunit vaccine which provides protective immunity against PRRSV to swine.
20 Even more particularly, the invention pertains to the use of selected portions of ORF1 both alone and in combination with other portions of the PRRSV genome or in combination with other vaccines against PRRSV.

Description of the Prior Art

25 PRRS is a major disease in the swine industry worldwide. PRRS is caused by PRRSV infection. Currently, there are modified-live vaccines (MLV) available that, when used correctly, provide swine with protection against the clinical disease resulting from PRRSV infection. PRRS MLV vaccines require replication in the vaccinated animal in order to insure that an efficacious immune response is induced (for example, *see* Meng, X.J., Heterogeneity of Porcine
30 Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Implications for Current Vaccine Efficacy and Future Vaccine Development; 74 Vet. Micro., 309-329 (2000)). However, such replication presents problems in that the PRRS MLV can persist in the animal for several weeks after vaccination and can also be shed to other PRRSV-negative swine. The shedding of PRRS MLV

12
14
13

from vaccinated animals can be a problem in some swine herds that do not have good biosecurity measures in place to prevent shedding of PRRSV MLV from vaccinated animals to a PRRSV-naive population. Although millions of PRRS MLV doses have been used without issue, there are also sporadic reports in the literature as to the ability of the PRRS MLV to revert to a more virulent, wild-type strain of PRRSV. Attempts to solve the problems of PRRS MLV shed and possible reversion to virulence have also been tried by utilization of a vaccine comprised of inactivated PRRS virus (i.e. PRRS KV). However, research has shown that despite the fact that PRRS KV can induce a strong humoral response in vaccinated swine, it is not effective in preventing PRRS-associated disease.

Accordingly, what is needed in the art is a method of vaccination and vaccine that could induce the protective immune response, without the problems associated with PRRS MLV. Preferably, administration of the vaccine would not actively replicate in the vaccinated animal and would induce a strong humoral and cell-mediated immune response.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention solves the problems inherent and the prior art provides a distinct advance in the state of the art by providing PRRSV DNA vaccines. Theoretically, the DNA vaccine plasmid expressing the PRRS antigen serves as a template to synthesize PRRSV antigens (i.e. like a PRRS MLV), but also has the characteristic of not actively replicating in the animal (i.e. like a PRRS KV). The protective immunogens needed to induce a protective host response to PRRSV are not known. Since the PRRS MLV can induce a protective response in vaccinated swine, it is thought that the replication of the PRRS MLV in the vaccinated animal must induce both a strong humoral and cell-mediated immune response in the vaccinated animal.

ORF1 of PRRSV encodes for the replication machinery necessary for PRRSV replication and generation of new progeny. ORF1 has two regions, designated as ORF1a and ORF1b, that comprise the ORF1 replicase complex (Dea, et al., Current Knowledge on the Structural Proteins of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (Prrs) Virus: Comparison of the North American and European Isolates; 145 (4) Archives of Virology, 659-688 (2000)). The replicase-encoded proteins are thought to be key immunogens in other virus families (Leitner et al., DNA and RNA-Based Vaccines: Principles, Progress and Prospects; 18 Vaccine 765-777 (2000)). When a cell is infected with PRRSV, the activity of the viral replicase may provide a powerful

1423
15

adjuvant-effect as the replicase-associated antigens are expressed during infection of the cell. The replicase-associated antigens may serve as "danger signals" generated in transfected cells and induce strong host immune responses (i.e. IFN, HSP, apoptosis). Thus, replicase-associated "danger signals" could be a key factor in why PRRS MLV can induce protection whereas a non-replicating PRRS (i.e. inactivated antigen in PRRS KV) does not confer protection from challenge.

ORF1 is nearly 12,000 nucleotides in length which makes transfection and adequate expression in a eukaryotic cell difficult. Thus, ORF1 was sequentially and arbitrarily divided up into smaller sections using Expression Library Immunization (ELI) as a tool to determine the protective immunogens of various pathogens. ELI shears the genome of a particular pathogen into small fragments that are cloned into a DNA vaccine vector and thereafter administered to a host to determine if any fragment is capable of inducing an immune response (Johnston and Barry; Genetic to Genomic Vaccination; 15(8) Vaccine, 808-809 (1997)). Preferably, the immune response is protective. The invention is predicated on the hypothesis that host immune responses to ORF1-generated proteins are essential for protection from PRRSV challenge. It is relatively easy to place the regions encoding for PRRSV ORFs 2-7 in a DNA vaccine vector since these ORFs range from 317 -720 nucleotides in length. As noted above, the size of the ORF1 region of PRRSV is nearly 12,000 nucleotides in length. Placing a region of this size into a DNA vaccine vector would not be amenable to transfection and subsequent expression in a eukaryotic cell. Accordingly, it was essential to break the ORF1 region into smaller sections to better ensure adequate expression of all areas of ORF1. Expression Library Immunization (ELI) has been employed as a tool to determine the protective immunogens of various pathogens. ELI employs that shearing of the genome of a particular pathogen into small fragments. These small fragments are then cloned into a DNA vaccine vector and then administered to the host to determine if any fragment is capable of inducing a protective immune response. Herein, the ELI technique has been modified for development of a PRRSV DNA vaccine that is sequentially comprised of the ORF 1 encoding region of the PRRSV genome. This method has been designated as SELI (sequential expression library immunization). This is in contrast to Barfoed et al., (DNA Vaccination of Pigs with Open Reading Frame 1-7 of PRRS Virus; 22 Vaccine, 3628-3641 (2004)) that used the entire ORF1 region as a DNA vaccine.

15 24
26

Vaccines of the present invention comprise portions of PRRSV ORF1 alone, in combination with other portions of PRRSV ORF1, and together with other compositions effective at generating an immune response to PRRSV infection including other PRRSV vaccines. ORF1 portions useful for purposes of the present invention are of sufficient size to invoke an immune response in an animal receiving the vaccine. Preferably, the portion will include up to about 9,000 base pairs. More preferably, the ORF-1 portion will include between about 21-9,000 contiguous nucleotide base pairs, still more preferably between about 21-6,000 contiguous nucleotide base pairs, even more preferably between about 21-3,000 contiguous nucleotide base pairs, still more preferably between about 21-2,000 contiguous nucleotide base pairs, even more preferably between about 21-1,000 contiguous nucleotide base pairs, still more preferably between about 21-500 contiguous nucleotide base pairs, even more preferably between about 21-300 contiguous nucleotide base pairs, still more preferably between about 21-150 contiguous nucleotide base pairs, even more preferably between about 21-75 contiguous nucleotide base pairs, still more preferably between about 21-50 contiguous nucleotide base pairs, even more preferably between about 21-25 contiguous nucleotide base pairs, still more preferably between about 21-23, and most preferably at least about 21 contiguous nucleotide base pairs. The protein resulting from any one of these preferred portions is also a part of the present invention. Any ORF1 or portion thereof from any strain of PRRSV could be used for purposes of the present invention, however, it is preferred to use a strain that is virulent.

The selected portion(s) can be cloned into a suitable expression vector. Examples of suitable vectors include adenovirus vectors, *Shigella* vectors, pVC1650 (Valentis, Inc., Burlingame, California), WRG720 (W.R. Grace, New York, New York) and pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, California). Some preferred vectors contain the immediate early cytomegalovirus promoter, intron A, and a poly-a adenylation portion (e.g. Bovine growth hormone (BGH) or human growth hormone (HGH)). Additionally, purified PRRSV proteins could be expressed in insect cell culture using, for example, the baculovirus expression system. Such proteins could then be combined with an adjuvant and administered. Of course, those of skill in the art would be able to select suitable expression systems and vectors that can direct the expression of various PRRSV ORFs in eukaryotic cells. Preferably, after cloning the respective portions of ORF1 into a suitable expression vector, the orientation of the clone is verified.

In one example of the present invention, the PRRSV virus VR-2332 was selected for use

16 15
17

in accordance with the present invention. Genbank U87392 was used to generate 13 overlapping clones of ORF1. This ORF1 includes 12,071 nucleotide base pairs. The portions ranged in size from 773 bp to 975 bp. The clones were designated with the letters A-M with clone A (SEQ ID No. 2) being 939 bp, clone B (SEQ ID No. 3) being 957 bp, clone C (SEQ ID No. 4) being 976, clone D (SEQ ID No. 5) being 954 bp, clone E (SEQ ID No. 6) being 939 bp, clone F (SEQ ID No. 7) being 957 bp, clone G (SEQ ID No. 8) being 957 bp, clone H (SEQ ID No. 9) being 852 bp, clone I (SEQ ID No. 10) being 917 bp, clone J (SEQ ID No. 11) being 972 bp, clone K (SEQ ID No. 12) being 966 bp, clone L (SEQ ID No. 13) being 783 bp, and clone M (SEQ ID No. 14) being 774 bp. Clones A-H are from region 1a and clones I-M are from region 1b of ORF1. Clone A utilizes the authentic ORF1A ATG start codon. The remaining ORF1 clones had an inframe ATG start codon added to their five prime ends. Each of these clones were respectively cloned into the DNA expression vector pVC1650. This vector contains the immediate early cytomegalovirus promoter and intron A and directs the expression of the various PRRSV ORFs in eukaryotic cells. Table 1 provides information regarding each clone and which region of the nucleotide sequence each clone is derived from.

Table 1
BIV PRRSV ORF1a/1b Sequential Expression Library Immunization (SELI) Clones

SEQ ID	ORF1 SELI Clone	Size (base pairs)	Region of clone	Nucleotide span of clone (using Genbank U87392 as reference)	Status Cloned into expression vector pVC1650 and orientation verified	IFA reaction following transfection using procine anti-PRRSV convalescent sera
2	A	939	ORF 1a	190-1128	✓	●
3	B	957	ORF 1a	1126-2082	✓	●
4	C	976	ORF 1a	2082-3057	✓	●
5	D	954	ORF 1a	3037-3990	✓	●
6	E	939	ORF 1a	3985-4923	✓	●
7	F	957	ORF 1a	4924-5880	✓	-
8	G	957	ORF 1a	5863-6819	✓	-
9	H*	852	ORF 1a	6808-7659	✓	●

17/18

10	I*	917	ORF 1b	7735-8651	✓	-
11	J	972	ORF 1b	8634-9685	✓	weak e
12	K	966	ORF 1b	9588-10553	✓	-
13	L	783	ORF 1b	10536-11318	✓	-
14	M	774	ORF 1b	11298-12071	✓	-

* Note: Original H and I clones flank the ORF1a/1b minus 1 frameshift region and new primers were designed to give slightly smaller RT-PCR products.

Each portion was then utilized in various combinations as well as alone in vaccine preparations comprising other PRRSV ORFs.

In another example, clones A-M and clones of ORFs 2-6 were cloned into the pVC1650 expression vector and a clone for ORF7 was cloned into the WRG720 expression vector. Of course, those of skill in the art will be able to select suitable vectors. Additionally, the nucleic acid sequences of the present invention can be produced by standard techniques, including, without limitation, common molecular cloning, mutagenesis, and chemical nucleic acid synthesis techniques. For purposes of the present invention, DNA sequences having at least 75% sequence identity, more preferably at least 75%, even more preferably at least 80%, still more preferably at least 85%, even more preferably at least 90%, still more preferably at least 95%, even more preferably at least 98%, more preferably at least 99% and most preferably 100% sequence identity with any one of clones A-M would be covered by the present invention.

In one aspect of the present invention, each of the clones A-M are used individually as a vaccine component. Animals are immunized with the vaccine by administration by any conventional means. Examples of administration methods include oral, transdermal, intravenous, subcutaneous, intramuscular, intraocular, intraperitoneal, intrarectal, intravaginal, intranasal, intragastrical, intratracheal, intrapulmonarial, or any combination thereof. Preferred modes of administration are intramuscular, subcutaneous and intranasal. If desired or necessary, booster immunizations may be given once or several times at various intervals. After administration of such a vaccine, an immune response is elicited in the animal and clinical signs of PRRSV infection are reduced in incidence and/or severity after challenge with a virulent form of PRRSV.

In another aspect of the present invention, combinations of clones A-M are administered to animals as described above. Such combinations include two or more of the above-referenced clones. Because some of these clones (A, B, C, D, E, H, and J) elicited an IFA reaction following

18 19

transfection using porcine anti-PRRSV convalescent sera, combinations of these clones are preferred for purposes of the present invention.

In another aspect of the present invention, clones A-M, either individually or in combinations as described above, are used in combinations with other ORF(s) of PRRSV in vaccine preparations. Suitable ORFs include ORFs 2-7.

In another aspect of the present invention, PRRSV ORF DNA is combined with another PRRSV vaccine. Preferably the vaccine is effective at inducing an immune response prior to the addition of the PRRSV ORF1 DNA.

In yet another aspect of the present invention, a vector is provided. Vectors in accordance with the present invention have inserted therein foreign DNA (not derived from the vector) that comprises at least a portion of PRRSV ORF1 DNA. In preferred forms, the vector is a plasmid. Preferably, the portion of PRRSV ORF1 DNA will have at least 21 contiguous nucleotides from PRRSV ORF1 DNA. In some preferred forms, the portion will have at least 150 contiguous nucleotides from a sequence selected from the group consisting of sequences having at least 85% sequence identity with any one of SEQ ID Nos. 1-14, and combinations thereof. As with the composition itself, the percentage of sequence identity and length of sequence can vary as described above. In other preferred forms, the vector further comprises a second portion of PRRSV DNA. This second portion is selected from the group consisting of least 21 contiguous nucleotides from a PRRSV ORF other than ORF1, at least 21 contiguous nucleotides from ORF1, and combinations thereof. In embodiments having an additional 21 contiguous nucleotides from ORF1, these 21 nucleotides are distinct from the at least 21 nucleotides contained in the first portion of PRRSV ORF1 DNA. It is also preferred that the PRRSV DNA used to construct the vector is derived from a virulent strain of PRRSV.

Another aspect of the present invention encompasses host cells containing the plasmids of the invention. This would include the plasmids created by the introduction of the various ORF1 fragments noted above. Preferably, such a cell would contain a plasmid comprising at least 21 contiguous nucleotides from PRRSV ORF1 DNA. In other preferred forms, the cell will include a plasmid comprising at least 150 contiguous nucleotides from a sequence selected from the group consisting of sequences having at least 85% sequence identity with any one of SEQ ID Nos. 1-14, and combinations thereof. In still other preferred forms, the plasmid in the cell will comprise a second portion of PRRSV DNA selected from the group consisting of least 21

contiguous nucleotides from a PRRSV ORF other than ORF1, at least 21 contiguous nucleotides from ORF1, and combinations thereof. Preferably, the PRRSV DNA used to generate the plasmid contained in the cell is derived from a virulent strain of PRRSV.

In another aspect of the present invention, compositions of the present invention are useful in methods for the inducement of immune responses in animals as well as for the complete prevention or a reduction in the severity of conditions and symptoms caused by PRRSV infection.

The compositions of the present invention may include pharmaceutically acceptable adjuvants, carriers, and/or excipients.

As used herein, the following definitions will apply: "Sequence Identity" as it is known in the art refers to a relationship between two or more polypeptide sequences or two or more polynucleotide sequences, namely a reference sequence and a given sequence to be compared with the reference sequence. Sequence identity is determined by comparing the given sequence to the reference sequence after the sequences have been optimally aligned to produce the highest degree of sequence similarity, as determined by the match between strings of such sequences. Upon such alignment, sequence identity is ascertained on a position-by-position basis, e.g., the sequences are "identical" at a particular position if at that position, the nucleotides or amino acid residues are identical. The total number of such position identities is then divided by the total number of nucleotides or residues in the reference sequence to give % sequence identity. Sequence identity can be readily calculated by known methods, including but not limited to, those described in Computational Molecular Biology, Leak, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), the teachings of which are incorporated herein by reference. Preferred methods to determine the sequence identity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine sequence identity are codified in publicly available computer programs which determine sequence identity between given sequences. Examples of such programs include, but are not limited to, the GCG program package (Devereux, J., et al.,

20 29
24

Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN and FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990). The BLASTX program is publicly available from NCBI and other sources (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), the teachings of which are
5 incorporated herein by reference). These programs optimally align sequences using default gap weights in order to produce the highest level of sequence identity between the given and reference sequences. As an illustration, by a polynucleotide having a nucleotide sequence having at least, for example, 95% "sequence identity" to a reference nucleotide sequence, it is intended that the nucleotide sequence of the given polynucleotide is identical to the reference sequence
10 except that the given polynucleotide sequence may include up to 5 point mutations per each 100 nucleotides of the reference nucleotide sequence. In other words, in a polynucleotide having a nucleotide sequence having at least 95% identity relative to the reference nucleotide sequence, up to 5% of the nucleotides in the reference sequence may be deleted or substituted with another nucleotide, or a number of nucleotides up to 5% of the total nucleotides in the reference sequence
15 may be inserted into the reference sequence. These mutations of the reference sequence may occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference nucleotide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. Analogously, by a polypeptide having a given amino acid sequence having at least, for example, 95% sequence
20 identity to a reference amino acid sequence, it is intended that the given amino acid sequence of the polypeptide is identical to the reference sequence except that the given polypeptide sequence may include up to 5 amino acid alterations per each 100 amino acids of the reference amino acid sequence. In other words, to obtain a given polypeptide sequence having at least 95% sequence identity with a reference amino acid sequence, up to 5% of the amino acid residues in the
25 reference sequence may be deleted or substituted with another amino acid, or a number of amino acids up to 5% of the total number of amino acid residues in the reference sequence may be inserted into the reference sequence. These alterations of the reference sequence may occur at the amino or the carboxy terminal positions of the reference amino acid sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among residues in the reference
30 sequence or in the one or more contiguous groups within the reference sequence. Preferably, residue positions which are not identical differ by conservative amino acid substitutions.

However, conservative substitutions are not included as a match when determining sequence identity.

Similarly, "sequence homology", as used herein, also refers to a method of determining the relatedness of two sequences. To determine sequence homology, two or more sequences are optimally aligned as described above, and gaps are introduced if necessary. However, in contrast to "sequence identity", conservative amino acid substitutions are counted as a match when determining sequence homology. In other words, to obtain a polypeptide or polynucleotide having 95% sequence homology with a reference sequence, 95% of the amino acid residues or nucleotides in the reference sequence must match or comprise a conservative substitution with another amino acid or nucleotide, or a number of amino acids or nucleotides up to 5% of the total amino acid residues or nucleotides, not including conservative substitutions, in the reference sequence may be inserted into the reference sequence.

A "conservative substitution" refers to the substitution of an amino acid residue or nucleotide with another amino acid residue or nucleotide having similar characteristics or properties including size, hydrophobicity, etc., such that the overall functionality does not change significantly.

"Isolated" means altered "by the hand of man" from its natural state; i.e., if it occurs in nature, it has been changed or removed from its original environment, or both. For example, a polynucleotide or polypeptide naturally present in a living organism is not "isolated," but the same polynucleotide or polypeptide separated from the coexisting materials of its natural state is "isolated", as the term is employed herein.

"Nucleic acid" refers to polynucleotides such as deoxyribonucleic acid (DNA), and, where appropriate, ribonucleic acid (RNA). The term should also be understood to include, as equivalents, analogs of either RNA or DNA made from nucleotide analogs, and, as applicable to the embodiment being described, single (sense or antisense) and double-stranded polynucleotides.

"Promoter" means a DNA sequence that regulates expression of a selected DNA sequence operably linked to the promoter, and which effects expression of the selected DNA sequence in cells. The term encompasses "tissue specific" promoters, i.e. promoters, which effect expression of the selected DNA sequence only in specific cells (e.g. cells of a specific tissue). The term also covers so-called "leaky" promoters, which regulate expression of a selected DNA primarily in

27A
23

one tissue, but cause expression in other tissues as well. The term also encompasses non-tissue specific promoters and promoters that constitutively express or that are inducible (i.e. expression levels can be controlled).

"Transfection" means the introduction of a nucleic acid, e.g., via an expression vector, into a recipient cell by nucleic acid-mediated gene transfer. "Transformation", as used herein, refers to a process in which a cell's genotype is changed as a result of the cellular uptake of exogenous DNA or RNA, and, for example, the transformed cell expresses a recombinant form of a polypeptide or, in the case of anti-sense expression from the transferred gene, the expression of a naturally-occurring form of the protein is disrupted. Transfection may also use a chemical reagent (i.e. a lipid).

The term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of preferred vector is an episome, i.e., a nucleic acid capable of extra-chromosomal replication. Preferred vectors are those capable of autonomous replication and/or expression of nucleic acids to which they are linked. Vectors capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked are referred to herein as "expression vectors". In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of "plasmids" which refer generally to circular double stranded DNA loops which, in their vector form are not bound to the chromosome. In the present specification, "plasmid" and "vector" are used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. Vectors also include other replicons such as phages or comamids, into which another DNA segment may be inserted so as to bring about the replication of the inserted segment. The invention is intended to include such other forms of expression vectors which serve equivalent functions and which become known in the art subsequently hereto.

"Amplification" of nucleic acids or polynucleotides is any method that results in the formation of one or more copies of a nucleic acid or polynucleotide molecule (exponential amplification) or in the formation of one or more copies of only the complement of a nucleic acid or polynucleotide molecule (linear amplification). Methods of amplification include the polymerase chain reaction (PCR) based on repeated cycles of denaturation, oligonucleotide primer annealing, and primer extension by thermophilic template dependent polynucleotide polymerase, resulting in the exponential increase in copies of the desired sequence of the polynucleotide analyte flanked by the primers. The two different PCR primers, which anneal to

23/2/24

opposite strands of the DNA, are positioned so that the polymerase catalyzed extension product of one primer can serve as a template strand for the other, leading to the accumulation of a discrete double stranded fragment whose length is defined by the distance between the 5' ends of the oligonucleotide primers. The reagents for conducting such an amplification include oligonucleotide primers, a nucleotide polymerase and nucleoside triphosphates such as, e.g., deoxyadenosine triphosphate (dATP), deoxyguanosine triphosphate (dGTP), deoxycytidine triphosphate (dCTP) and deoxythymidine triphosphate (dTTP). Other methods for amplification include amplification of a single stranded polynucleotide using a single oligonucleotide primer, the ligase chain reaction (LCR), the nucleic acid sequence based amplification (NASBA), the Q-beta-replicase method, and 3SR.

The teachings and content of all references cited herein are expressly incorporated by reference.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENT

The following example sets forth a preferred embodiment of the present invention. It is to be understood, however, that this example is provided by way of illustration and nothing therein should be taken as a limitation upon the overall scope of the invention.

EXAMPLE 1

This example provides data as to the efficacy of DNA vaccines comprising various regions of the PRRSV genome. The example began with 40 PRRSV-negative mixed sex pigs from Spring Prairie Colony, Hawley, MN 56549. The pigs were 3-4 weeks of age at the initiation of the study. Throughout the study, the pigs were provided food sufficient for the size, age and condition of the animals. Water was provided ad libitum.

To generate PRRSV DNA vaccines, nineteen cDNA clones were generated from the PRRS virus. Thirteen cDNA clones were generated that sequentially represent the open reading

2A 7B
25

frame (ORF) 1a/1b region of the pRRSV genome. Clone A utilizes the authentic ORF1a ATG start codon. The remaining ORF1a/1b clones B through M had an ATG start codon added to their respective 5' ends. All of the above clones were respectively cloned into the DNA expression vector pVC1650. The pVC1650 vector contains the immediate early cytomegalovirus promoter and intron A to direct the expression of the various PRRSV ORFs in eukaryotic cells. The six additional cDNA clones represented the PRRSV structural protein ORFs 2, 3, 4, 5, 6 and 7. The ORF 2, 3, 4, 5, and 6 clones were also respectively cloned into the DNA expression vector pVC1650 described above. The ORF 7 gene was cloned into a similar expression vector designated WRG7020. The WRG7020 vector also contains the immediate early cytomegalovirus promoter and intron A to direct the expression of PRRSV ORF 7 in eukaryotic cells.

Two sets of vaccines were created, designated "A1-19" and "T1-19". For the A1-19 vaccines, the aforementioned clones were cloned into the Valentis, Inc. pVC1650 expression plasmid. Each plasmid construct was separately formulated with aluminum phosphate (Adju-Phos®) (Ulmer et al., Enhancement of DNA Vaccine Potency Using Conventional Aluminum Adjuvants; 18 Vaccine, 18-28 (1999) to yield 250µg of respective ORF clone with 1000 µg calculated aluminum in a 1 ml dose. The final vaccine consisted of a separate 1ml IM dose of each formulated ORF clone. For the T1-19 vaccines, the aforementioned clones were cloned into the Valentis, Inc. pVC1650 expression plasmid. Each plasmid construct was separately formulated with TGV200 PINC-polymer to yield 250 µg of respective ORF clone in a 1 ml dose. The final vaccine consisted of a separate 1 ml IM dose of each formulated ORF clone.

To generate a control, DNA vaccines consisting of cDNA clones of ORF PCV2 and the HA gene of SIV were created. Both ORFs were separately cloned into the Valentis, Inc. pVC1650 expression plasmid. Both the PCV2 ORF2 and the SIV HA gene plasmid constructs were separately formulated with aluminum phosphate (Adju-Phos®) to yield 250 µg of the

25 29
26

respective ORF clone with 1000 µg calculated aluminum in a 1 ml dose (called A20 and A21).

Additionally, both the PCV2 ORF2 and the SIV HA gene plasmid constructs were separately

formulated with TGV200 PINC-polymer to yield 250 µg of each respective clone in a 1 ml dose

(called T20 and T21). The final vaccine consisted of a four separate 1 ml IM doses of each

formulated clone. Table 2 shows all of the created vaccines, including the control vaccines.

Table 2

	Plasmid	Region of clone	Nucleotide span of clone (using Genbank U87392 as reference)
	1	ORF 1a	190-1128
10	2	ORF 1a	1126-2082
	3	ORF 1a	2082-3057
	4	ORF 1a	3037-3990
	5	ORF 1a	3985-4923
	6	ORF 1a	4924-5880
15	7	ORF 1a	5863-6819
	8	ORF 1a	6808-7659
	9	ORF 1b	7735-8651
	10	ORF 1b	8634-9605
	11	ORF 1b	9588-10553
20	12	ORF 1b	10536-11318
	13	ORF 1b	11298-12071
	14	ORF2	NA
	15	ORF3	NA
	16	ORF4	NA
25	17	ORF5	NA
	18	ORF6	NA
	19	ORF7	NA
	20	ORF2	NA
30	21	SIV HA	NA

The forty pigs were divided into four groups: Group 1 was administered 19 x 1 ml doses of A1-A19 Adju-Phos on Days 0, 21, and 42. Group 2 was administered 19 x 1 ml doses of T1-T19 TGV200 on Days 0, 21, and 42. Group 3 was administered 4 x 1 ml respective doses of A20, A21, T20, and T21 on Days 0, 21, and 42. Group 4, the negative control, had no treatment

25
26 27

administered at all.

On day 56 of the study, pigs in groups 1, 2, and 3 were all administered the virulent SDSU#73 strain of PRRSV. The virulent SDSU#73 strain of PRRSV was diluted 1:10 in MEM with 4% fetal bovine serum prior to administration to the pigs. A total of 2 ml of the diluted challenge virus was delivered intranasally to the appropriate pigs with 1 ml of the diluted virus administered to each nostril. The prechallenge and postchallenge titer of the PRRSV challenge virus was $10^{4.59}$ TCID₅₀/ml and $10^{4.65}$ TCID₅₀/ml, respectively.

The pigs were bled on days 0, 21, 42 and 56 of the trial to monitor seroconversion to vaccination. The pigs were also bled on days 57, 59, 61, 63, 66 and 70 of the trial to monitor seroconversion and viremia postchallenge. Clinical observations were recorded daily from day 54-70. On day 70, pigs were necropsied and gross lung lesions were recorded as percent lung involvement due to PRRSV. Pigs were weighed prior to the study start and on Days 56 and Days 70. A summary of the protocol in this example can be seen in Table 3.

Table 3

Group	Pigs/ group	First vaccination (Day = 0)	Second vaccination (Day = 21)	Third vaccination (Day = 42)	Challenge (Day = 56)	Sample collection and study termination (Day = 70)
5	1	10	A1-A19 Adju-Phos	A1-A19 Adju-Phos	A1-A19 Adju-Phos	2 ml of virulent SDSU#73 PRRSV administered intranasally. Evaluate clinical health, rectal temperature. Evaluate animals for lung lesions at necropsy and collect designated lung tissue.
	2	10	T1-T19 TGV200	T1-T19 TGV200	T1-T19 TGV200	Same as above
10	3	10	A20-A21 T20-T21	A20-A21 T20-T21	A20-A21 T20-T21	Same as above
	4	10	None	None	None	Same as above
15						

16

2/18

28 2/7/21

In order to evaluate the results of the example, the main criteria used to determine the efficacy of the test treatments was the development of lung lesions characteristic of PRRSV. Serological response, postchallenge ADG, and rectal temperatures were evaluated as supporting criteria. The results of the example are summarized in Table 4.

Table 4

	Group	Group average lung scores	Percent of pigs in each group with lung consolidation scores of ≥ 20%	Highest group avg. temp. post-challenge (°F)	Highest percentage of peak viremia postchallenge	Group average postchallenge ADG
10	1 (A1-A19 Adju-Phos)	19.84	37.5	105.9	100%	0.16
	2 (T1-T19 TGV200)	28.42	70.0	106.0	100%	0.43
15	3 (Chall. Ctrl)	37.68	70.0	106.1	100%	0.68
	(Neg. control)	0.0A	0.0	103.9	0%	1.48

There was no seroconversion to PRRSV as determined by the IDEXX PRRS ELISA in the any of the pigs receiving three doses of the respective A1-A19 Adju-Phos or T1-T19 TGV200 DNA vaccine prototypes. After virulent PRRSV challenge, there appeared to be a more rapid increase in the ELISA S/P ratios in the Group 2 than in the Group 1 pigs. Pigs in Group 3 (unvaccinated/challenged controls) had negative S/P ratios until exposed to virulent PRRSV challenge. The strict negative control pigs in Group 4 had negative S/P ratios throughout the study. The serology results are reported in Table 5.

Table 5

			Day 0	Day 21	Day 42	Day 56	(0 dpc)	Day 59	(3 dpc)	Day 61	(5 dpc)	Day 63	(7 dpc)	Day 66	(10 dpc)	Day 70	(14 dpc)
	Group	Pig	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	VI	ELISA	VI	ELISA	VI	ELISA	VI	ELISA	VI	ELISA	VI
5	1	802	0.14	-0.09	0.01	0.22	N	0.21	POS	0.97	POS	2.29	POS	2.66	N	2.69	N
	1	808	0.00	-0.01	-0.01	0.02	N	0.02	POS	0.08	POS	0.66	POS	1.01	N	1.22	N
	1	812	-0.02	0.01	-0.02	0.00	N	0.02	N	0.10	POS	0.60	POS	0.92	N	1.21	N
	1	814	-0.03	0.01	-0.03	0.02	N	0.02	N	0.13	POS	0.54	POS	1.15	N	1.80	N
	1	818	0.01	-0.01	0.36	0.23	N	0.18	POS	0.83	POS	2.74	POS	2.97	N	3.24	N
.0	1	826	0.00	0.00	-0.02	0.01	N	0.01	N	0.10	POS	0.37	POS	0.45	POS	ND	ND
	1	830	-0.01	0.00	0.04	0.02	N	-0.01	POS	0.06	POS	0.39	POS	0.97	POS	1.68	N
	1	832	-0.02	0.00	-0.02	0.03	N	0.04	N	0.18	POS	0.93	POS	1.39	POS	1.71	N
	1	839	0.01	-0.05	0.01	0.08	N	0.06	POS	0.13	POS	0.36	POS	0.72	N	1.13	POS
	1	842	0.02	-0.01	-0.01	0.17	N	0.19	N	0.92	POS	2.30	POS	2.48	N	ND	ND
.5		Mean	0.01	-0.02	0.03	0.08		0.07		0.35		1.12		1.47		1.84	
		n															
20	2	806	0.01	0.05	0.11	0.31	N	0.26	POS	0.58	POS	2.51	POS	3.22	N	3.34	N
	2	813	-0.02	0.00	-0.03	0.05	N	0.07	POS	0.22	POS	0.83	POS	1.47	POS	1.73	N
	2	821	0.00	0.05	0.04	0.07	N	0.10	POS	0.15	POS	1.12	POS	2.28	N	2.52	N
	2	822	-0.01	0.00	-0.01	0.03	N	0.05	POS	0.41	POS	1.78	POS	2.37	N	2.01	POS
	2	836	-0.02	0.05	0.12	0.22	N	0.23	POS	0.79	POS	2.93	POS	3.52	POS	3.62	N
25	2	844	0.00	-0.02	0.00	0.05	N	0.03	POS	0.31	POS	1.72	POS	2.33	POS	2.17	N
	2	845	0.04	0.01	0.06	0.32	N	0.19	POS	1.00	POS	2.80	POS	3.44	N	3.26	N
	2	846	-0.01	-0.02	-0.03	0.09	N	0.09	N	0.75	POS	2.57	POS	3.17	POS	3.06	N
	2	847	-0.01	0.01	0.02	0.04	N	0.02	POS	0.43	POS	2.05	POS	2.94	POS	2.96	N
	2	849	0.03	-0.02	-0.01	0.11	N	0.08	POS	0.45	POS	1.97	POS	2.48	N	2.56	N

18

28

		Mea n	0.00	0.01	0.03	0.13		0.11		0.51		2.03		2.72		2.72	
5	3	811	-0.03	-0.02	0.02	0.00	N	0.01	POS	0.05	POS	0.55	POS	1.44	POS	1.77	N
	3	815	0.00	-0.01	0.06	0.06	N	0.03	POS	0.07	POS	0.57	POS	1.32	POS	1.33	N
	3	819	-0.01	0.00	0.04	0.01	N	0.02	POS	0.08	POS	0.25	POS	0.87	POS	1.13	N
	3	823	0.00	-0.01	0.03	0.02	N	0.01	POS	0.04	N	0.44	POS	1.13	POS	1.61	N
	3	831	0.00	-0.02	0.00	0.01	N	0.01	POS	0.07	POS	0.78	POS	1.48	N	1.75	POS
10	3	833	-0.02	-0.02	0.00	0.01	N	0.01	POS	0.03	POS	0.15	POS	0.43	POS	0.90	N
	3	840	0.00	-0.02	0.01	0.05	N	0.12	POS	0.18	POS	0.41	POS	1.30	POS	2.15	POS
	3	841	-0.02	-0.01	-0.02	0.06	N	0.06	POS	0.14	POS	0.71	POS	1.33	POS	1.50	N
	3	843	0.00	-0.02	-0.01	0.02	N	0.02	N	0.11	POS	0.41	POS	0.84	N	0.80	N
	3	848	0.03	-0.02	0.00	0.05	N	0.05	POS	0.10	POS	0.30	POS	0.74	N	1.35	N
		Mea n	0.00	-0.02	0.01	0.03		0.03		0.09		0.46		1.09		1.43	
15	4	803	-0.03	0.00	0.04	0.04	N	0.04	N	0.04	N	0.02	N	0.01	N	-0.02	N
	4	804	0.01	-0.03	0.02	0.12	N	0.11	N	0.12	N	0.08	N	0.13	N	0.10	N
	4	805	0.03	-0.01	-0.03	0.00	N	-0.01	N	0.00	N	0.01	N	-0.01	N	-0.03	N
	4	810	0.01	-0.06	-0.03	0.08	N	0.08	N	0.06	N	0.02	N	0.02	N	0.02	N
	4	817	0.03	-0.02	-0.15	-0.02	N	-0.01	N	-0.01	N	-0.04	N	-0.04	N	-0.10	N
20	4	828	-0.02	-0.03	0.04	0.00	N	-0.01	N	0.01	N	-0.02	N	0.00	N	-0.01	N
	4	834	-0.01	-0.02	0.03	0.00	N	0.00	N	0.00	N	-0.17	N	-0.02	N	-0.01	N
	4	837	0.00	-0.03	0.01	0.03	N	0.03	N	0.05	N	0.02	N	0.03	N	-0.02	N
	4	838	0.00	-0.01	0.00	0.08	N	0.11	N	0.11	N	0.09	N	0.07	N	0.01	N
	4	850	0.04	-0.01	0.03	0.09	N	0.06	N	0.07	N	0.08	N	0.07	N	0.06	N
25		Mea n	0.01	-0.02	0.00	0.04		0.04		0.05		0.01		0.03		0.00	

[Handwritten signature]

31 30
32

The pig temperatures were monitored from two days prechallenge throughout fourteen days postchallenge. The baseline group average temperature throughout the challenge period for the Group 4 unvaccinated/unchallenged controls was 103.4 °F.

The group average temperatures among all PRRSV-challenged groups were elevated at some point following challenge, however there was a temporal difference in days post challenge in which the group average temperature peaked. The group average peak temperatures in all groups challenged with PRRSV ranged from 105.9 to 106.1 °F, whereas the negative controls group average peak temperature was 103.9. Group 3 showed a gradual increase in temperature postchallenge with a peak of 106.1°F at nine days postchallenge. Groups 1 and 2 displayed a sharp increase in temperatures at two days postchallenge with peak temperatures of 105.9°F and 105.6°F, respectively. Of note, the manner in which the postchallenge temperatures of the DNA vaccinated pigs in Group 1 and 2 rapidly increased, is similar to the manner in which PRRS KV vaccinated animals respond postchallenge. It has been observed that pigs vaccinated with experimental PRRS KV prototypes are usually "humorally-primed" (i.e. seropositive to PRRSV following vaccination). The animals vaccinated with these experimental PRRS KV prototypes also display a rapid increase in temperature soon after challenge, as was seen in this study with the DNA vaccinated pigs in Groups 1 and 2. This similarity in rapid temperature elevation following PRRSV challenge is an additional indication that the immune systems of the DNA vaccinated pigs were indeed primed to PRRSV antigen.

The Group 3 pigs displayed lung lesions characteristically found in a successful PRRSV challenge. The Group 4 pigs had no lung lesions at necropsy. The Group 1 and 2 pigs had group average lung lesions of 19.84 and 28.42, respectively. The lung scores for the individual pigs are reported in Table 6.

3231
33

Table 6

	Group	Animal	Lung Scores
5	1	802	2.00
	1	808	0.90
	1	812	55.00
	1	814	0.20
	1	818	1.00
	1	826	ND
	1	830	70.00
10	1	832	2.90
	1	839	26.75
	1	842	ND
		Mean	19.84
15	2	806	23.00
	2	813	32.50
	2	821	4.00
	2	822	28.95
	2	836	37.50
	2	844	67.00
	2	845	16.70
	2	846	52.50
	2	847	14.00
20	2	849	8.00
		Mean	28.42
25	3	811	2.75
	3	815	33.50
	3	819	51.00
	3	823	72.00
	3	831	75.00
	3	833	15.50
	3	840	39.00
	3	841	37.50
	3	843	9.50
30	3	848	41.00
		Mean	37.68
35	4	803	0.00
	4	804	0.00
	4	805	0.00
	4	810	0.00
	4	817	0.00

33 32
34

22

5

4	828	0.00
4	834	0.00
4	837	0.00
4	838	0.00
4	850	0.00
	Mean	0.00

From these results, it is clear that DNA vaccines comprising various regions of the PRRSV genome can induce protection from virulent challenge in the respiratory model

34 ~~35~~**I/We Claim:**

1. A vaccine capable of inducing an immune response against PRRSV comprising:

a first portion of PRRSV ORF1 DNA, said portion having at least 21 contiguous
5 nucleotides from said PRRSV ORF1 DNA; and
a suitable pharmacological carrier.

2. The vaccine of claim 1, said portion having at least 150 contiguous
nucleotides from a sequence selected from the group consisting of sequences having at least 85%
10 sequence identity with any one of SEQ ID Nos. 1-14, and combinations thereof.

3. The vaccine of claim 2, said portion being selected from the group
consisting of sequences having at least 85% sequence identity with any of SEQ ID Nos. 1-6, 9,
10, and combinations thereof.

4. The vaccine of claim 1, further comprising a portion of DNA from PRRSV
selected from the group consisting of at least 21 contiguous nucleotides from a PRRSV ORF
other than ORF1, at least 21 contiguous nucleotides from PRRSV ORF1, and combinations
thereof.

20

5. The vaccine of claim 1, further comprising another composition effective
at inducing an immune response against PRRSV infection.

35 34

6. The vaccine of claim 1, said PRRSV ORF1 being derived from a virulent strain of PRRSV.

7. The vaccine of claim 1, further comprising an ingredient selected from the group consisting of adjuvants, excipients, and combinations thereof.

5 8. A method of inducing an immune response against PRRSV in an animal susceptible to PRRSV infection, said method comprising the steps of:

administering a composition to the animal, said composition comprising at least

21 contiguous nucleotides from a portion of PRRSV ORF1 DNA; and

10 causing said inducement of said immune response.

9. The method of claim 8, further comprising the step of providing a second administration of said composition.

15 10. The method of claim 8, said portion comprising at least 150 contiguous nucleotides from a sequence selected from the group consisting of sequences having at least 85% sequence identity with any one of SEQ ID Nos. 1-14, and combinations thereof.

20 11. The method of claim 10, said portion being selected from the group consisting of sequences having at least 85% sequence identity with any of SEQ ID Nos. 1-6, 9, 10, and combinations thereof.

11. The method of claim 9, said composition further comprising a second DNA portion selected from the group consisting of at least 21 contiguous nucleotides from a

35
36 37

PRRSV ORF other than ORF1, at least 21 contiguous nucleotides from ORF1, and combinations thereof.

13. The method of claim 9, said composition further comprising a second
5 composition effective at inducing an immune response against PRRSV infection.

14. The method of claim 9, said composition further comprising an ingredient
selected from the group consisting of adjuvants, excipients, and combinations thereof.

10 15. A vector comprising at least a portion of PRRSV ORF1 DNA.

16. The vector of claim 15, said vector being a plasmid.

17. The vector of claim 15, said portion of PRRSV ORF1 DNA comprising
15 at least 21 contiguous nucleotides from PRRSV ORF1 DNA.

18. The vector of claim 17, said portion of PRRSV ORF1 DNA having at least
150 contiguous nucleotides from a sequence selected from the group consisting of sequences
having at least 85% sequence identity with any one of SEQ ID Nos. 1-14, and combinations
20 thereof.

19. The vector of claim 1, said vector further comprising a second portion of
PRRSV DNA selected from the group consisting of least 21 contiguous nucleotides from a
PRRSV ORF other than ORF1, at least 21 contiguous nucleotides from ORF1, and combinations

36
37

thereof.

20. The vector of claim 15, said PRRSV DNA being derived from a virulent strain of PRRSV.

5

21. A cell containing a plasmid comprising at least 21 contiguous nucleotides from PRRSV ORF1 DNA.

22. The cell of claim 21, said plasmid further comprising at least 150
10 contiguous nucleotides from a sequence selected from the group consisting of sequences having at least 85% sequence identity with any one of SEQ ID Nos. 1-14, and combinations thereof.

23. The cell of claim 21, said plasmid further comprising a second portion of PRRSV DNA selected from the group consisting of least 21 contiguous nucleotides from a
15 PRRSV ORF other than ORF1, at least 21 contiguous nucleotides from ORF1, and combinations thereof.

24. The cell of claim 21, said PRRSV DNA being derived from a virulent strain of PRRSV.

20

Sequence Listing.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.
VAUGHN, Eric M.
STAMMER, Richard

<120> PRRSV SUBUNIT VACCINES

<130> 35072-PRO

<160> 14

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 15411

<212> DNA

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 1

atgacgtata ggtgttggct ctatgccttg gcatttgtat tgtcaggagc tgtgaccatt 60
ggcacagccc aaaacttgct gcacagaaac acccttctgt gatagcctcc ttcagggggag 120
cttaggggttt gtccctagca ccttgcttcc ggagttgcac tgctttacgg tctctccacc 180
cctttaacca tgtctgggat acttgatcgg tgcacgtgta cccccaatgc cagggtgttt 240
atggcggagg gccaaagtcta ctgcacacga tgcctcagtg cacggtctct cttccccctg 300
aacctccaag tttctgagct cgggggtgcta ggcctattct acaggcccgga agagccactc 360
cggtggacgt tgccacgtgc attccccact gttgagtgtc cccccgccgg ggcctgctgg 420
ctttctgcaa tctttccaat cgcacgaatg accagtggaa acctgaactt ccaacaaaga 480
atggtacggg tcgcagctga gctttacaga gccggccagc tcaccctgc agtcttgaag 540
gctctacaag tttatgaacg gggttgccgc tggtagccca ttgttggacc tgtccctgga 600
gtggccggtt tcgccaattc cctacatgtg agtgataaac ctttccgggg agcaactcac 660
gtgttgacca acctgccgct cccgcagaga cccaagcctg aagacttttg cccctttgag 720
tgtgctatgg ctactgtcta tgacattggt catgacgccg tcatgtatgt ggccgaaagg 780
aaagtctcct gggcccctcg tggcggggat gaagtgaat ttgaagctgt ccccggggag 840
ttgaagttga ttgcgaaccg gctccgcacc tccttcccgc cccaccacac agtggacatg 900
tctaagttcg ccttcacagc ccctgggtgt ggtgtttcta tgcgggtcga acgccaacac 960
ggctgccttc ccgctgacac tgtccctgaa ggcaactgct ggtggagctt gtttgacttg 1020
cttccactgg aagttcagaa caaagaaatt cgccatgcta accaatttgg ctaccagacc 1080
aagcatggtg tctctggcaa gtacctacag cggaggctgc aagttaatgg tctccgagca 1140
gtaactgacc taaacggacc tatcgtcgta cagtacttct ccgttaagga gagttggatc 1200
cgccatttga aactggcggg agaaccacgc tactctgggt ttgaggacct cctcagaata 1260
agggttgagc ctaacacgtc gccattggct gacaaggaag aaaaaatttt ccggtttggc 1320

38
39 40

Sequence Listing.ST25.txt

```

agtcacaagt ggtacggcgc tggaaagaga gcaagaaaag cagcgtcttg tgcgactgct 1380
acagtcgctg gccgcgcttt gtccgttcgt gaaacccggc aggccaagga gcacgaggtt 1440
gccggcgcca acaaggctga gcacctcaaa cactactccc cgctgcca aggggaattgt 1500
ggttggcact gcatttcgc catcgccaac cggatggtga attccaaatt tgaaaccacc 1560
cttcccgaag gagtgagacc tccagatgac tgggctactg acgaggatct tgtgaatgcc 1620
atccaaatcc tcagactccc tgcggcctta gacaggaacg gtgcttgac tagcgccaag 1680
tacgtactta agctggaagg tgagcattgg actgtcactg tgaccctgg gatgtccct 1740
tctttgctcc ctcttgatg tgttcagggc tgttggtggc acaaggcgcg tcttggttcc 1800
ccagatgcag tcgaggtctc cggatttgac cctgcctgcc ttgaccggct ggctgaggtg 1860
atgcacctgc ctacagtgac tatccagcc gctctggccg aaatgtctgg cgattccgat 1920
cgttcggctt ctccggtcac caccgtgtgg actgtttcgc agttctttgc ccgtcacagc 1980
ggaggggaatc accctgacca agtgcgctta gggaaaatta tcagccttg tcaggtgatt 2040
gaggactgct gctgttccca gaacaaaacc aaccgggtca ccccgagga ggtcgagca 2100
aagattgacc tgtacctcg tggtgcaaca aatcttgaag aatgcttggc caggcttgag 2160
aaagcgcgcc cgccagcgt aatcgacacc tcctttgatt gggatgtgt gctccctggg 2220
gttgaggcgg caaccagac gatcaagctg cccaggtca accagtgtc tgctctggc 2280
cctgttgta ctcaaaagtc cttggacaac aactcggctc ccctgaccgc cttttcactg 2340
gctaactact actaccgtgc gcaagggtgac gaagttcgtc accgtgaaag actaaccgcc 2400
gtgctctcca agttggaaa ggttgttcga gaagaatat ggctcatgcc aaccgagcct 2460
ggtcacggc ccacactgcc acgcggtc gacgaactca aagaccagat ggaggaggac 2520
ttgctgaaac tggctaacgc ccagacgact tcggacatga tggcctggg agtcgagcag 2580
gttgacctaa aaacttggg caagaactac ccgcggtgga caccaccacc cctccgcca 2640
aaagttcagc ctgaaaaaac gaagcctgtc aagagcttgc cggagagaaa gcctgtcccc 2700
gccccgcgca ggaagggttg gtccgattgt ggcagcccgg ttctattagg cggcgatgtc 2760
cctaacagtt ggaagattt ggctgttagt agccccttg atctcccgac cccacctgag 2820
ccggcaacac cttcaagtga gctggtgatt gtgtcctcac cgcaatgcat cttcaggccg 2880
gcgacacct tgagttagcc ggctccaatt cccgcacctc gcggaactgt gtctcgaccg 2940
gtgacacct tgagttagcc gatccctgtg cccgcaccgc ggcgtaagtt tcagcaggtg 3000
aaaagattga gttcggcggc ggcaatcca ccgtaccagg acgagcccct ggatttgtct 3060
gcttctcac agactgaata tgaggcctct ccccgagcac cgccgagag cggggcggtt 3120
ctgggagtag aggggcatga agctgaggaa accctgagtg aaatctcgga catgtcgggt 3180

```

40 39 A

Sequence Listing.ST25.txt

aacattaaac ctgctgccgt gtcacaaagc agctccttgt ccagcgtgag aatcacacgc 3240
ccaaaatact cagctcaagc catcatcgac tcgggcgggc cctgcagtgg gcatctccaa 3300
gaggtahagg aaacatgcct tagtgtcatg cgcgaggcat gtgatgacac taagcttgat 3360
gaccctgcta cgcaggaatg gctttctcgc atgtgggacg ggggtggacat gctgacttgg 3420
cgcaacacgt ctgtttacca ggcgatttgc accttagatg gcaggttaaa gttcctccca 3480
aaaatgatac tcgagacacc gccgccctat ccgtgtgagt ttgtgatgat gcctcacacg 3540
cctgcacctt ccgtagggtg ggagagcgac cttaccattg gctcagttgc tactgaagat 3600
gttcacgca tcctcgagaa aatagaaaat gtcggcgaga tggccaacca gggacccttg 3660
gccttctccg aggataaacc ggtagatgac caacttgtca acgacccccg gatatcgctg 3720
cggaggcctg acgagagcac atcagctccg tccgcaggca cagggtggcg cggctctttt 3780
accgatttgc cgccttcaga tggcgcggtat gcggacgggg gggggccgtt tcggacggta 3840
aaaagaaaag ctgaaaggct ctttgaccaa ctgagccgtc aggtttttga cctcgtctcc 3900
catctccctg ttttcttctc acgccttttc taccctggcg gtggttattc tccgggtgat 3960
tggggttttg cagcttttac tctattgtgc ctctttttat gttacagtta cccagccttt 4020
gggtattgctc ccctcttggg tgtgttttct gggctcttctc ggcgcgttcg aatgggggtt 4080
tttggctgct ggttggcctt tgctgttggg ctgttcaagc ctgtgtccga cccagtcggc 4140
gctgcttgat agtttgactc gccagagtgt agaaacatcc ttcattcttt tgagcttctc 4200
aaaccttggg accctgttcg cagccttggt gtgggccccg tcggtctcgg tcttgccatt 4260
cttggcaggt tactgggcgg ggcacgctgc atctggcact ttttgcttag gcttggcatt 4320
gttgacagct gtatcttggc tggagcttac gtgcttctc aaggtaggtg taaaaagtgc 4380
tggggatctt gtataagaac tgctcctaag gaggtcgctt ttaacgtgtt tcctttcaca 4440
cgtgcgacca ggtcgtcact tatcgacctg tgcgatcggg tttgtgcgcc aaaaggaatg 4500
gaccctattt ttctcgccac tgggtggcg ggggtgctgg cggccgaag cccattgag 4560
caaccctctg aaaaacccat cgcgtttgcc caattggatg aaaagaagat tacggctagg 4620
actgtggtcg cccagcctta tgaccccaac caagccgtaa agtgcttgcg ggtattgcag 4680
tcgggtgggg cgatggtggc taaggcggc ccaaagtgg tcaaggtttc cgctgttcca 4740
ttccgagccc ctttctttcc cactggagtg aaagttgacc ctgattgcag ggtcgtggtt 4800
gaccctgaca ctttactgc agctctccgg tctggctact ccaccacaaa cctcgtcctt 4860
gggtgtaggg actttgcccc gctgaatgga ttaaaaatca ggcaaatttc caagccttca 4920
gggggaggcc cacatctcat ggctgccctg catgttcct gctcgatggc tctgcacatg 4980
cttgctggga tttatgtgac tgcggtgggt tcttgcgga cggcaccaa cgaccctgg 5040
tgcgctaacc cgtttgccgt ccctggctac ggacctggct ctctctgcac gtccaggttg 5100

41 70

Sequence Listing.ST25.txt

tgcatTTccc aacacggcct taccctgccc ttgacagcac ttgtggcggg attcgggtatt 5160
caagaaattg ccttggtcgt ttgattttt gttccatcg gaggcattggc tcataggttg 5220
agctgtaagg ctgacatgct gtgtgttttg cttgcaattg ccagctatgt ttgggtacct 5280
cttacctggg tgctttgtgt gtttccttgc tggttgcgct gtttttctt gcaccccctc 5340
accatcctat ggttggtgtt tttcttgatt tctgtgaata tgccttcagg aatcttgggc 5400
atggtgttgt tggtttctct ttggcttctt ggtcgttata ctaatgttgc tggccttgtc 5460
acccctacg acattcatca ttacaccagt gggccccgcg gtgttgccgc cttggctacc 5520
gcaccagatg ggacctactt ggccgctgtc cggcgcgctg cgttgactgg ccgcaccatg 5580
ctgtttaccc cgtcccagct tgggtctctt cttgaggggtg ctttcagaac tcgaaagccc 5640
tactgaaca ccgtcaatgt gatcgggtcc tccatgggct ctggcggggg gtttaccatc 5700
gacgggaaag tcaagtgcgt aactgccgca catgtcctta cgggcaattc agctcgggtt 5760
tccggggctg gcttcaatca aatgcttgac ttgacgtaa agggagattt cgtatatgct 5820
gattgcccga attggcaagg ggctgcccc aagaccaat tctgcacgga tggatggact 5880
ggcgtgcct attggctaac atcctctggc gtcgaacccg gcgtcattgg aaaaggattc 5940
gccttctgct tcaccgcatg tggcgattcc gggctcccag tgatcaccga ggccggtgag 6000
cttgtcggcg ttcacacggg atcgaataaa caaggggggg gcattgttac gcgcccctca 6060
ggccagtttt gtaatgtggc acccatcaag ctaagcgaat taagtgaatt ctttgcggg 6120
cctaagggtc cgctcgggtga tgtgaaggc ggcagccaca taattaaaga cataagcgag 6180
gtgccttcag atctttgtgc cttgcttgct gccaaacctg aactggaagg aggcctctcc 6240
accgtccaac ttctttgtgt gtttttctc ctgtggagaa tgatgggaca tgcctggacg 6300
cccttggttg ctgtgagttt ctttattttg aatgaggttc tcccagccgt cctgggtccgg 6360
agtgttttct ctttgggaat gtttgtgcta tcttgggtca cgccatggtc tgcgcaagtt 6420
ctgatgatca ggcttctgac agcagctctt aacaggaaca gatggtcact tgccttttct 6480
agcctcggtg cagtgaaccg ttttgcgca gatcttgcg ccactcaggg gcattcgttg 6540
caggcagtga tgaatttgag cacctatgca ttctgcctc ggatgatggg tgtgacctca 6600
ccagtcccag tgatcacgtg tgggtgcgtg cacctacttg ccatcatttt gtacttgttt 6660
aagtaccgtg gcccgcacca tatccttgtt ggcgatggag tgttctctgc ggctttcttc 6720
ttgagatact ttgccgaggg aaagtggagg gaaggggtgt cgcaatcctg cggaatgaat 6780
catgagtctc tgactgggtg cctcgtatg agactcaatg acgaggactt ggatttcctt 6840
atgaaatgga ctgattttta gtgctttgtt tctgcgtcca acatgaggaa tgcagcgggt 6900
caatttatcg aggctgccta tgctaaagca cttagagtag aactggccca gttggtgcag 6960

Sequence Listing.ST25.txt

gttgataaag ttcgagggtac ttggccaaa cttgaagctt ttgctgatac cgtggcacct 7020
caactctcgc ccggtgacat tgttgtcgt ctcggccaca cgcctgttgg cagtatcttc 7080
gacctaaagg ttggtagcac caagcatacc ctccaagcca ttgagaccag agtccttgct 7140
gggtccaaaa tgaccgtggc gcgcgtcgtc gacccgaccc ccacgcccc acccgaccc 7200
gtgcccattc cctcccacc gaaagttctg gagaatggcc ccaacgcttg gggggatgag 7260
gaccgtttga ataagaagaa gaggcgcagg atggaagccc tcggcatcta tgttatgggc 7320
gggaaaaagt accagaaatt ttgggacaag aattccggtg atgtgtttta tgaggaggtc 7380
cataataaca cagatgagtg ggagtgtctc agagtgtggc accctgccga ctttgaccct 7440
gagaagggaa ctctgtgtgg acatgtcacc attgaaaaca aggcttacca tgtttacacc 7500
tccccatctg gtaagaagtt cttggtcccc gtcaaccag agaatggaag agttcaatgg 7560
gaagctgcaa agctttccgt ggagcaggcc ctaggtatga tgaatgtcga cggcgaactg 7620
actgccaaag aactggagaa actgaaaaga ataattgaca aactccaggg cctgactaag 7680
gagcagtgtt taaactgcta gccgccagcg acttgaccgg ctgtggtcgc ggcggcttgg 7740
ttgttactga aacagcggta aaaatagtca aatttcacaa ccggaccttc accctgggac 7800
ctgtgaattt aaaagtggcc agtgaggttg agctaaaaga cgcggttgag cacaaccaac 7860
acccggttgc gagaccgatc gatggtggag ttgtgtcct gcgttccgcg gttccttcgc 7920
ttatagacgt ctgatctcc ggtgctgat catctccaa gttacttgcc catcacgggc 7980
cgggaaacac tgggatcgat ggcacgtct gggattttga gtccgaagcc actaaagagg 8040
aagtcgcact cagtgcgcaa ataatacagg ctgtgacat taggcgcggc gacgtcctg 8100
aaattggtct ccttacaag ctgtaccctg ttaggggtaa ccctgagcgg gtgaaaggag 8160
ttctgcagaa tacaaggttt ggagacatac cttaaaaa cccagtgac actggaagcc 8220
cagtgcacgc ggctgcctgc cttacgcca acgccactcc ggtgactgat gggcgctccg 8280
tcttggcag gaccatgccc tccgggtttg agttatatgt accgaccata ccagcgtctg 8340
tccttgatta ccttgactct aggcctgact gccctaaca gctgacagag cacggctgcg 8400
aagatgccgc actgaaagac ctctctaat atgacttgtc cacccaaggc tttgttttac 8460
ctggagttct tcgccttggtg cggaaatacc tgtttgcca ttaggtaag tgcccacccg 8520
ttcatcggcc ttctacttac cctgctaaga attctatggc tggaataaat gggaacagg 8580
tccaaccaa ggacattcag agcgtccctg aaatcgacgt tctgtgcgca caggctgtgc 8640
gagaaaactg gcaaaactgtc accccttgta ctcttaagaa acagtattgc gggaagaaga 8700
agactaggac catactcggc accaataact tcatcgact agcccaccga gcagtgttga 8760
gtggtgttac ccagggttc atgaaaaagg cgtttaactc gcccatcgcc ctcggaagaa 8820
acaagtttaa ggagctacag actccggtcc tgggcagggt cttgaagct gatctcgcat 8880

Sequence Listing.ST25.txt

43 42 14

cctgcgatcg atccacgcct gcaattgtcc gctgggttgc cgccaacctt ctttatgaac 8940
ttgcctgtgc tgaagagcat ctaccgtcgt acgtgctgaa ctgctgccac gacttactgg 9000
tcacgcagtc cggcgcagtg actaagagag gtggcctgtc gtctggcgac ccgatcacct 9060
ctgtgtctaa caccatttat agtttggtga tctatgcaca gcatatggtg cttagttact 9120
tcaaaagtgg tcacccccat ggccttctgt tcttacaaga ccagctaaag tttgaggaca 9180
tgctcaagggt tcaaccctg atcgtctatt cggacgacct cgtgctgtat gccgagttc 9240
ccaccatgcc aaactatcac tgggtgggtg aacatctgaa tttgatgctg gggtttcaga 9300
cggacccaaa gaagacagca ataacagact cgccatcatt tctaggctgt agaataataa 9360
atgggcgcca gctagtcccc aaccgtgaca ggatcctcgc ggccctcgcc tatcacatga 9420
aggcgagtaa tgtttctgaa tactatgcct cagcggctgc aatactcatg gacagctgtg 9480
cttgtttggg gtatgatcct gaatggttg aagaacttgt agttggaata gcgcagtgcg 9540
cccgaagga cggctacagc tttccggca cggcgttctt catgtccatg tgggaaaaac 9600
tcaggctcaa ttatgagggg aagaagtcga gagtgtgcgg gtactgcggg gccccggccc 9660
cgtacgctac tgctgtggc ctgcagctct gcatttacca caccacttc caccagcatt 9720
gtccagtcac aatctgggtg ggccatccag cgggttctgg ttcttgtagt gagtgcaaat 9780
ccctgtagg gaaaggcaca agcccttag acgaggtgct ggaacaagtc ccgtataagc 9840
ccccacggac cgttatcatg catgtggagc agggctcgc ccccttgat ccaggtagat 9900
accaaactcg ccgcggatta gtctctgtca ggctggaat taggggaaat gaagtggac 9960
taccagacgg tgattatgct agcaccgcct tgctccctac ctgcaaagag atcaacatgg 10020
tcgctgtcgc ttccaatgta ttgcgcagca ggttcacat cggcccacc ggtgctggga 10080
aaacatactg gtccttcaa caggtccagg atggtgatgt tatttacaca ccaactcacc 10140
agaccatgct tgacatgatt agggctttgg ggacgtgccc gttcaacgtc ccggcaggca 10200
caacgctgca attccccgtc cctccccga cgggtccgtg ggttcgcac ctagccggcg 10260
gttggtgtcc tggcaagaat tccttcctag atgaagcagc gtattgcaat caccttgatg 10320
tttgaggct tcttagtaaa actaccctca cctgtctagg agacttcaag caactccacc 10380
cagtgggttt tgattctcat tgctatgttt ttgacatcat gcctcaaact caactgaaga 10440
ccatctggag gtttggacag aatatctgtg atgccattca gccagattac agggacaaac 10500
tcatgtccat ggtcaacaca acccgtgtga cctacgtgga aaaacctgtc aggtatgggc 10560
aggccctcac cccctaccac agggaccgag aggacgacgc catcactatt gactccagtc 10620
aaggcgccac attcgaatgt gttacattgc atttggccac taaagattca ctcaacaggc 10680
aaagagccct tgttgctatc accagggcaa gacacgctat ctttgtgtat gaccacaca 10740

Sequente Listing.ST25.txt

ggcagctgca .gggcttgttt .gatcttcctg caaaaggcac gcccgtaac ctgcagtg 10800
 actgcgacgg gcagctgac gtgctggata gaaataacaa agaatgcacg gttgctcagg 10860
 ctctaggcaa cggggataaa tttagggcca cagacaagcg tgtttagat tctctccgcg 10920
 ccatttgtgc tgatctagaa gggctgagct ctccgctccc caaggctcga cacaacttgg 10980
 gattttatatt ctacactgat ttaacacagt ttgctaaact ccagtagaa cttgcacctc 11040
 actggcccggt ggtgtcaacc cagaacaatg aaaagtggcc ggatcggctg gttgccagcc 11100
 ttgcacctat ccataaatac agccgcgcgt gcatcggctg cggctatatg gtgggccctt 11160
 cgggtgttct aggcactcct ggggtcgtgt catactatct cacaaaattt gttaagggcg 11220
 gggctcaagt gcttccggag acggttttca gcaccggccg aattgaggta gactgccggg 11280
 aatatcttga tgatcgggag cgagaagttg ctgcgtccct ccacacgggt ttcattggcg 11340
 acgtcaaagg cactaccgtt ggaggatgtc atcatgtcac ctccagatac ctccgcgcg 11400
 tccttcccaa ggaatcagtt gcggtagtcg gggtttcaag .ccccggaaaa gccgcgaag 11460
 cattgtcac actgacagat gtgtacctc cagatcttga agcctatctc caccggaga 11520
 ccagttcaa gtgctggaaa atgatgttg acttcaaaga agttcgacta atggtctgga 11580
 aagacaaaac agcctatttc caacttgaag gtcgctattt cacctggtat cagcttgcca 11640
 gctatgcctc gtacatccgt gttccgtca actctacgggt gtacttgac ccctgcatgg 11700
 gccccgccct ttgcaacagg agagtcgtcg ggtccacca ctggggggct gacctcgcg 11760
 tcacccctta tgattacggc gctaaaatta tcctgtctag cgcgtaccat ggtgaaatgc 11820
 cccccggata caaaattctg gcgtgcgcgg agttctcgtt ggatgacca gttaagtaca 11880
 aacatacctg ggggtttgaa tcggatacag cgtatctgta tgagttcacc ggaaacgggtg 11940
 aggactggga ggattacaat gatgcgtttc gtgcgcgcca ggaagggaaa atttataagg 12000
 ccactgccac cagcttgaag ttttattttc ccccgggccc tgtcattgaa ccaactttag 12060
 gcctgaattg aaatgaaatg gggccatgc aaagcctttt tgacaaaatt ggccaacttt 12120
 ttgtggatgc ttacacggag ttcttgggtt ccattgttga tatcattata tttttggcca 12180
 ttttgtttgg ctacaccatc gccggttggc tgggtgtctt ttgcatcaga ttggtttgct 12240
 ccgcgatact ccgtacgcgc cctgccattc actctgagca attacagaag atcttatgag 12300
 .gcctttcttt .cccagtgcga agtggacatt ccacctggg gaactaaaca tcctttgggg 12360
 atgctttggc accataaggt gtcaaccctg attgatgaaa tgggtgcgcg tcgaatgtac 12420
 .cgcatcatgg aaaaagcagg gcaggctgcc tggaaacagg tggtgagcga ggctacgctg 12480
 tctcgcatta gtagtttggg tgtggtggct ctttttcagc atctagccgc cattgaagcc 12540
 gagacctgta aatatattggc ctcccgctg cccatgctac acaacctgcg catgacaggg 12600
 tcaaatgtaa ccatagtgta taatagcact ttgaatcagg tgtttgctat tttccaacc 12660

43

19

Sequence Listing.ST25.txt

94
95 46

```
cctggttccc ggccaaagct tcatgatttt cagcaatggt taatagctgt acattcctcc 12720
atattttcct ctgttgcagc ttcttgact ctttttggtg tgctgtggtt gcgggtcca 12780
atactacgta ctgtttttgg ttccgctgg ttaggggcaa tttttcttc gaactcacag 12840
tgaattacac ggtgtgtcca ccttgctca cccggcaagc agccacagag atctacgaac 12900
ccggtaggtc tctttggtgc aggatagggt atgaccgatg tggggaggac gatcatgacg 12960
agctagggtt tatgataccg cctggcctct ccagcgaagg ccacttgact ggtgtttacg 13020
cctggttggc gttcttgctc ttcagctaca cggcccagtt ccatcccag atattcggga 13080
tagggaatgt gagtcgagtt tatgttgaca tcaaacaatca actcatctgc gccgaacatg 13140
acgggcagaa caccaccttg cctcgtcatg acaacatttc agccgtgttt cagacctatt 13200
accaacatca agtcgacggc ggcaattggt ttcacctaga atggcttcgt cccttctttt 13260
cctcgtggtt ggttttaaat gtctcttggg ttctcaggcg ttcgcctgca aaccatgttt 13320
cagttcgagt ctgacagata ttaagacca caccaccgca gcggcaagct ttgctgtcct 13380
ccaagacatc agttgcctta ggcacgcga ctcggcctct gaggcgattc gcaaaatccc 13440
tcagtgccgt acggcgatag ggacaccctg gtatgttacc atcacagcca atgtgacaga 13500
tgagaattat ttacattctt ctgatctcct catgctttct tcttgctttt tctatgcttc 13560
tgagatgagt gaaaagggat ttaagggtgt atttggcaat gtgtcaggca tcgtggctgt 13620
gtgtgtcaat ttaccagct acgtccaaca tgtcaaggag ttaccacaac gctccctggt 13680
ggtcgaccat gtgcggttgc tccatttcat gacacctgag accatgaggt gggcaactgt 13740
tttagcctgt ctttttgcca ttctgttggc aatttgaatg tttaaagtat ttggagaaat 13800
gcttgaccgc gggctgttgc tcgcgattgc tttctttgtg gtgtatctg ccgttctgtt 13860
ttgctgtgct cgccaacgcc agcaacgaca gcagctcca tctacagctg atttacaact 13920
tgacgctatg tgagctgaat ggcacagatt ggctagctaa caaatttgat tgggcagtgg 13980
agagttttgt catctttccc gttttgactc acattgtctc ctatggtgcc ctactacca 14040
gccatttcct tgacacagtc gctttagtca ctgtgtctac cgccgggttt gttcacgggc 14100
ggtatgtcct aagtagcatc tacgcgtct gtgccctggc tgcttgact tgcttcgtca 14160
ttaggtttgc aaagaattgc atgtcctggc gctacgcgtg taccagatat accaactttc 14220
ttctggacac taagggcaga ctctatcgtt ggcggtcgcc tgtcatcata gagaaaagg 14280
gcaaagttga ggtcgaagggt catctgatcg acctcaaaag agttgtgctt gatggttccg 14340
tggcaacccc tataaccaga gtttcagcgg aacaatgggg tcgtccttag atgacttctg 14400
tcatgatagc acggctccac aaaagggtgt tttggcgttt tctattacct acacgccagt 14460
gatgatatat gccctaaagg tgagtcgagg ccgactgcta gggcttctgc accttttgat 14520
```

48
46

Sequence Listing.ST25.txt

cttcctgaat tgtgctttca ccttcgggta catgactttc gcgcactttc agagtacaaa 14580
 taagggtcgcg ctactatgg gagcagtagt tgcactcctt tggggggtgt actcagccat 14640
 agaaacctgg aaattcatca cctccagatg ccgtttgtgc ttgctaggcc gcaagtacat 14700
 tctggccctt gccaccacg ttgaaagtgc cgcacggttt catccgattg cggcaaatga 14760
 taaccacgca tttgtcgtcc ggcgctcccg ctccactacg gtcaacggca cattggtgcc 14820
 cgggttaaaa agcctcgtgt tgggtggcag aaaagctgtt aaacagggag tggtaaactt 14880
 tgtcaaatat gccaaataac aacggcaagc agcagaagag aaagaagggg gatggccagc 14940
 cagtcaatca gctgtgccag atgctgggta agatcatcgc tcagcaaac cagtccagag 15000
 gcaagggacc ggpaaagaaa aataagaaga aaaacccgga gaagcccat tttcctctag 15060
 cgactgaaga tgatgtcaga catcacttta cccctagtga gcggcaattg tgtctgtcgt 15120
 caatccagac cgcctttaat caaggcgctg ggacttgac cctgtcagat tcaggaggga 15180
 taagttaac tgtggagttt agtttgcta cgcatacatc tgtgcgctg atccgcgtca 15240
 cagcatcacc ctacagcatga tgggctggca ttcttgaggc atctcagtg ttgaattgga 15300
 agaatgtgtg gtgaatggca ctgattgaca ttgtgcctct aagtcaccta ttcaattagg 15360
 gcgaccgtgt gggggtgaga ttaattggc gagaaccatg cggccgaaat t 15411

<210> 2
 <211> 939
 <212> DNA
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 2
 atgtctggga tacttgatcg gtgcacgtgt accccaatg ccagggtgtt tatggcggag 60
 ggccaagtct actgcacacg atgcctcagt gcacggtctc tccttcccct gaacctccaa 120
 gtttctgagc tcggggtgct aggcctattc tacaggcccg aagagccact ccgggtggacg 180
 ttgccacgtg cattccccac tgttgagtgc tccccgcg gggcctgctg gctttctgca 240
 atctttccaa tcgcacgaat gaccagtga aacctgaact tccaacaaag aatggtacgg 300
 gtcgcagctg agctttacag agccggccag ctacccctg cagtcttgaa ggctctacaa 360
 gtttatgaac ggggttgccg ctggtacccc attgttgga ctgtccctgg agtggccgtt 420
 ttcccaatt ccctacatgt gagtataaa ctttcccgg gagcaactca cgtgttgacc 480
 aacctgccgc tccgcagag acccaagcct gaagactttt gcccctttga gtgtgctatg 540
 gctactgtct atpacattgg tcatgacgcc gtcattgtat tggccgaaag gaaagtctcc 600
 tgggcccctc gtggcgggga tgaagtga tttgaagctg tccccgggga gttgaagttg 660
 attgcgaacc ggctccgcac ctcttccc cccaccaca cagtggacat gtctaagttc 720
 gccttcacag cccctgggtg tgggttttct atgcgggtcg aacgccaaca cggctgcctt 780

Sequence Listing.ST25.txt

cccgcgtgaca ctgtccctga aggcaactgc tgggtggagct tgtttgactt gcttccactg 840
 gaagttcaga acaaagaaat tcgccatgct aaccaatttg gctaccagac caagcatggt 900
 gtctctggca agtacctaca gcggaggctg caagttaat 939

<210> 3
 <211> 957
 <212> DNA
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 3
 aatggtctcc gagcagtaac tgacctaac ggacctatcg tcgtacagta cttctccggt 60
 aaggagagtt ggatccgcca ttgaaactg gcgggagaac ccagctactc tgggtttgag 120
 gacctcctca gaataagggt tgagcctaac acgtcgccat tggctgacaa ggaagaaaaa 180
 attttccggt ttggcagtc caagtggtag ggcgctggaa agagagcaag aaaagcacgc 240
 tcttgtgcga ctgtacagt cgctggccgc gctttgtccg ttcgtgaaac ccggcaggcc 300
 aaggagcacg aggttgccgg cgccaacaag gctgagcacc tcaaacacta ctccccgcct 360
 gccgaaggga attgtggttg gcactgcatt tccgccatcg ccaaccggat ggtgaattcc 420
 aaatttgaaa ccacccttcc cgaaagagt agacctccag atgactgggc tactgacgag 480
 gatcttgtga atgccatcca aatcctcaga ctccctgcgg ccttagacag gaacggtgct 540
 tgtactagcg ccaagtacgt acttaagctg gaaggtagc attggactgt cactgtgacc 600
 cctgggatgt ccccttcttt gctccctctt gaatgtgttc agggctgttg tgggcacaag 660
 ggcggtcttg gttcccaga tgcagtcgag gtctccggat ttgaccctgc ctgccttgac 720
 cggttggtg aggtgatgca cctgcctagc agtgctatcc cagccgctct ggccgaaatg 780
 tctggcgatt ccgatcgttc ggcttctccg gtcaccaccg tgtggactgt ttcgcagttc 840
 ttgccccgtc acagcggagg gaatcaccct gaccaagtgc gcttagggaa aattatcagc 900
 ctttgtcagg tgattgagga ctgctgctgt tcccagaaca aaaccaaccg ggtcacc 957

<210> 4
 <211> 976
 <212> DNA
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 4
 cccggaggag gtcgcagcaa agattgacct gtacctccgt ggtgcaacaa atcttgaaga 60
 atgcttggcc aggcttgaga aagcgcgccc gccacgcgta atcgacacct cttttgattg 120
 ggatgttgtg ctccctgggg ttgaggcggc aaccagacg atcaagctgc ccaggtcaa 180
 ccagtgtcgt gctctgggtc ctgttgtgac tcaaagtc tggacaaca actcgggtccc 240
 cctgaccgcc ttttcaactg ctaactacta ctaccgtgcg caaggtagc aagttcgtca 300
 ccgtgaaaga ctaaccgccc tgctctccaa gttggaaaag gttgttcgag aagaatatgg 360

Sequence Listing.ST25.txt

gctcatgcc aaccgagcctg gtccacggcc cacttgcca cgcgggctcg acgaactcaa 420
agaccagatg gaggaggact tgctgaaact ggctaacgcc cagacgactt cggacatgat 480
ggcctgggca gtcgagcagg ttgacctaaa aacttgggtc aagaactacc cgcggtggac 540
accaccaccc cctccgcca aagttcagcc tcgaaaaacg aagcctgtca agagcttgcc 600
ggagagaaag cctgtccccg ccccgcgag gaaggttggg tccgattgtg gcagcccggt 660
ttcattaggc ggcgatgtcc ctaacagttg ggaagatttg gctgttagta gcccctttga 720
tctcccgacc ccacctgagc cggcaacacc ttcaagttag ctggtgattg tgcctcacc 780
gcaatgcac ttcaggccgg cgacaccctt gagttagccg gctccaattc ccgacctcg 840
cggaaactgtg tctcgaccgg tgacaccctt gagttagccg atccctgtgc ccgaccgcg 900
gcgtaagttt cagcaggtga aaagattgag ttcggcgggc gcaatccac cgtaccagga 960
cgagcccctg gatttg 976

<210> 5

<211> 954

<212> DNA

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 5

caggacgagc ccctggattt gtctgcttcc tcacagactg aatatgaggc ctctcccca 60
gcaccgccc agagcggggg cgttctggga gtagaggggc atgaagctga ggaaccctg 120
agtgaatct cggacatgtc gggtaacatt aaacctgcgt ccgtgtcatc aagcagctcc 180
ttgtccagcg tgagaatcac acgccccaaa tactcagctc aagccatcat cgactcgggc 240
gggccctgca gtgggcatct ccaagaggtg aaggaaacat gccttagtgt catgcgcgag 300
gcatgtgatg cgactaagct tgatgaecct gctacgcagg aatggcttcc tcgcatgtgg 360
gatcgggtgg acatgctgac ttggcgcaac acgtctgttt accaggcgat ttgcacctta 420
gatggcaggt taaagttcct cccaaaaatg atactcgaga caccgcccgc ctatccgtgt 480
gagtttgtga tgatgcctca cagcctgca cttccgtag gtgcggagag cgaccttacc 540
attggctcag ttgtactga agatgttcca cgcacctcg agaaaataga aaatgtcggc 600
gagatggcca accagggacc cttggccttc tccgaggata aaccggtaga tgaccaactt 660
gtcaacgacc cccggatatc gtcgcgagg cctgacgaga gcacatcagc tccgtccgca 720
ggcacagggt gcgcgggctc ttttaccgat ttgcccctt cagatggcgc ggatgcggac 780
gggggggggc cgtttcggac ggtaaaaaga aaagctgaaa ggctctttga ccaactgagc 840
cgtcaggttt ttgacctcgt ctccatctc cctgttttct tctcacgcct tttctaccct 900
ggcgggtggt attctccggg tgattgggtt ttgcagctt ttactctatt gtgc 954

Sequence Listing.ST25.txt

<210> 6
<211> 939
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 6
ttgtgacctt ttttatgtta cagttaccca gcctttggta ttgctcccct ctggggtgtg 60
ttttctgggt cttctcggcg cgttcgaatg ggggtttttg gctgctgggt ggcttttgct 120
gttggctctgt tcaagcctgt gtccgaccca gtcggcgctg cttgtgagtt tgactcgcca 180
gagtgtagaa acatccttca ttcttttgag cttctcaaac cttgggaccc tgttcgagc 240
cttgtttgtg gccccgctcg tctcggctct gccattcttg gcagggtact gggcggggca 300
cgctgcatct ggcacttttt gcttaggctt ggcattgttg cagactgtat cttggctgga 360
gcttacgtgc tttctcaagg taggtgtaaa aagtgtgtgg gatcttgat aagaactgct 420
cctaataagg tcgcttttaa cgtgtttcct ttcacacgtg cgaccagggt gtcacttatc 480
gacctgtgcg atcgggttttg tgcgcaaaa ggaatggacc ccatttttct cgccactggg 540
tggcgcggggt gctggggccgg ccgaagcccc attgagcaac cctctgaaaa acccatcgcg 600
tttgcccaat tggatgaaaa gaagattacg gctaggactg tggtcgcccc gccttatgac 660
cccaaccaag ccgtaaagtg cttgcgggta ttgcagtcgg gtggggcgat ggtggctaag 720
gcgggtcccaa aagtgggtcaa gggttccgct gttccattcc gagccccctt ctttccact 780
ggagtgaag ttgaccctga ttgcagggtc gtggttgacc ctgacacttt cactgcagct 840
ctccggtctg gctactccac cacaacctc gtccttggtg taggggactt tgccagctg 900
aatggattaa aaatcaggca aattccaag ctttcaggg 939

<210> 7
<211> 957
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 7
ggagggccac atctcatggc tgccctgcat gttgcctgct cgatggctct gcacatgctt 60
gctgggattt atgtgactgc ggtgggttct tgcggcaccg gcaccaacga cccgtggtgc 120
gctaaccctt ttgccgtccc tggtacgga cctggctctc tctgcacgtc caggttgtgc 180
atttcccaac acggccttac cctgcccttg acagcacttg tggcgggatt cggattcaa 240
gaaattgcct tggtcgtttt gatttttggt tccatcggag gcatggctca taggttgagc 300
tgtaaggctg acatgctgtg tgttttgctt gcaattgcca gctatgtttg ggtacctctt 360
acctggttgc tttgtgtgtt tccttgctgg ttgcgctgtt tttctttgca cccctcacc 420
atcctatggt tgggtgtttt cttgatttct gtgaatatgc cttcaggaat cttggccatg 480
gtgttggttg tttctctttg gcttcttggt cgttatacta atgttgctgg cttgtcacc 540

Sequence Listing.ST25.txt

ccctacgaca ttcatcatta caccagtggc ccccgcggtg ttgccgcctt ggctaccgca 600
 ccagatggga cctacttggc cgctgtccgc cgcgtgctg tgactggccg caccatgctg 660
 ttatccccgt cccagcttgg gtctcttctt gaggggtgctt tcagaactcg aaagccctca 720
 ctgaacaccg tcaatgtgat cgggtcctcc atgggctctg gcgggggtgtt taccatcgac 780
 gggaaagtca agtgcgtaac tgccgcacat gtccttacgg gcaattcagc tcgggtttcc 840
 ggggtcggct tcaatcaa at gcttgacttt gacgtaaagg gagatttcgc tatagctgat 900
 tgcccgaatt ggcaaggggc tgccccaag acccaattct gcacggatgg atggact 957

<210> 8

<211> 957

<212> DNA

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 8

tgacaggatg gatggactgg ccgtgcctat tggctaacat cctctggcgt cgaacccggc 60
 gtcatggaa aaggattcgc cttctgcttc accgcatgtg gcgattccgg gtccccagtg 120
 atcaccgagg ccggtgagct tgtcggcgctt cacacgggat cgaataaaca aggggggggc 180
 attgttacgc gccctcagg ccagttttgt aatgtggcac ccatcaagct aagcgaatta 240
 agtgaattct ttgctgggccc taagggtccc ctcggtgatg tgaaggctcg cagccacata 300
 attaaagaca taagcgaggt gccctcagat ctttgtgcct tgcttgctgc caaacctgaa 360
 ctggaaggag gcctctccac cgtccaactt ctttgtgtgt tttttctctt gtggagaatg 420
 atgggacatg cctggacgcc cttggttgct gtgagtttct ttattttgaa tgaggttctc 480
 ccagccgtcc tgggtccggag tgttttctcc tttggaatgt ttgtgctatc ctggctcacg 540
 ccatggtctg cgcaagttct gatgatcagg cttctgacag cagctcttaa caggaacaga 600
 tggtaacttg cttttttcag cctcggtgca gtgaccggtt ttgtcgaga tcttgcggcc 660
 actcaggggc atccgttgca ggcagtgatg aatttgagca cctatgcatt cctgcctcgg 720
 atgatggttg tgacctcacc agtcccagtg atcacgtgtg gtgtcgtgca cctacttgcc 780
 atcattttgt acttgtttaa gtaccgtggc ccgcaccata tccttgttgg cgatggagtg 840
 ttctctgcgg ctttcttctt gagatacttt gccgagggaa agttgagga aggggtgtcg 900
 caatcctgcg gaatgaatca tgagtctctg actggtgcc tcgctatgag actcaat 957

<210> 9

<211> 852

<212> DNA

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 9

atgagactca atgacgagga cttggatttc cttatgaaat ggactgattt taagtgttt 60
 gtttctgcgt ccaacatgag gaatgcagcg ggtcaattta tcgaggctgc ctatgctaaa 120

Sequence Listing.ST25.txt

gcacttagag tagaactggc ccagttggtg caggttgata aagttcgagg tactttggcc 180
aaacttgaag cttttgctga taccgtggca cctcaactct cgcccgggtga cattgttgtc 240
gctctcgggc acacgcctgt tggcagtatc ttcgacctaa aggttggttag caccaagcat 300
accctccaag ccattgagac cagagtcctt gctgggtcca aaatgaccgt ggcgcgcgtc 360
gtcgacccga ccccccacgcc cccacccgca cccgtgcca tccccctccc accgaaagtt 420
ctggagaatg gcccacaacgc ttggggggat gaggaccgtt tgaataagaa gaagaggcgc 480
aggatggaag ccctcggcat ctatgttatg ggcgggaaaa agtaccagaa attttgggac 540
aagaattccg gtgatgtgtt ttatgaggag gtccataata acacagatga gtgggagtgt 600
ctcagagtgt gcgacctgtc cgactttgac cctgagaagg gaactctgtg tggacatgtc 660
accattgaaa acaaggctta ccattgtttac acctccccat ctggtaagaa gttcttggtc 720
cccgtaacc cagagaatgg aagagttcaa tgggaagctg caaagcttcc cgtggagcag 780
gccctaggta tgatgaatgt cgacggcgaa ctgactgcca aagaactgga gaaactgaaa 840
agaataattg ac 852

<210> 10

<211> 917

<212> DNA

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

<400> 10

gcttggttgt tactgaaaca gcggtaaaaa tagtcaaatt tcacaaccgg accttcaccc 60
tgggacctgt gaatttaaaa gtggccagtg aggttgagct aaaagacgcg gttgagcaca 120
accaacaccc ggttgcgaga ccgatcgatg gtggagtgtg gtcctgcgt tccgcggttc 180
cttcgttat agacgtcttg atctccggtg ctgatgcac tccaagtta cttgcccac 240
acgggcccgg aaacactggg atcgatggca cgctctggga ttttgagtcc gaagccacta 300
aagaggaagt cgcaactcagt gcgcaaataa tacaggcttg tgacattagg cgcggcgacg 360
ctcctgaaat tggctctccct tacaagctgt accctgttag gggtaaccct gagcgggtga 420
aaggagtctt gcagaataca aggtttggag acatacctta caaaaccccc agtgacactg 480
gaagcccagt gcacgcggct gcctgcctta cgccaacgc cactccggtg actgatgggc 540
gtccctctt ggccacgacc atgccccccg ggtttgagtt atatgtaccg accataccag 600
cgtctgtcct tgattacctt gactctaggc ctgactgccc taaacagctg acagagcacg 660
gctgcgaaga tgccgcactg aaagacctct ctaaataatga cttgtccacc caaggctttg 720
ttttacctgg agttcttcgc cttgtgcgga aatacctgtt tgcccatgta ggtaagtgcc 780
caccggttca tcggccttct acttaccctg ctaagaattc tatggctgga ataaatggga 840
acaggttccc aaccaaggac attcagagcg tccctgaaat cgacgttctg tgccgacagg 900

Sequence Listing.ST25.txt

57
52 53

ctgtgcgaga aaactgg

917

<210> 11

<211> 972

<212> DNA

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 11

gctgtgcgag aaaactggca aactgtcacc ccttgtactc ttaagaaaca gtattgcggg 60
aagaagaaga ctaggaccat actcggcacc aataacttca tcgcactagc ccaccgagca 120
gtgttgagtgt gtgtttaccca gggcttcattg aaaaaggcgt ttaactcgcc catcgccctc 180
ggaaagaaca agtttaagga gctacagact ccggtcctgg gcaggtgcct tgaagctgat 240
ctcgcattcct gcgatcgatc cacgcctgca attgtccgct ggtttgccgc caaccttctt 300
tatgaacttg cctgtgctga agagcatcta ccgtcgtacg tgctgaactg ctgccacgac 360
ttactggtca cgcagtccgg cgcagtgact aagagagggtg gcctgtcgtc tggcgacccg 420
atcacctctg tgtctaaccac catttatagt ttggtgatct atgcacagca tatggtgctt 480
agttacttca aaagtgggtca ccccatggc cttctgttct tacaagacca gctaaagttt 540
gaggacatgc tcaagggtca acccctgacg gtctattcgg acgacctcgt gctgtatgcc 600
gagtctccca ccatgccaaa ctatcactgg tgggttgaac atctgaattt gatgctgggg 660
tttcagacgg acccaaagaa gacagcaata acagactcgc catcatttct aggctgtaga 720
ataataaatg ggcgccagct agtccccaac cgtgacagga tcctcgcggc cctcgccat 780
cacatgaagg cgagtaatgt ttctgaatac tatgcctcag cggctgcaat actcatggac 840
agctgtgctt gtttggagta tgatcctgaa tggtttgaag aacttgtagt tggaatagcg 900
cagtgcgcc gcaaggacgg ctacagcttt cccggcacgc cgttcttcat gtccatgtgg 960
gaaaaactca gg 972

<210> 12

<211> 966

<212> DNA

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 12

atgtgggaaa aactcaggtc caattatgag ggaagaagt cgagagtgtg cgggtactgc 60
ggggccccgg ccccgtagc tactgcctgt ggcctcgacg tctgcattta ccacaccac 120
ttccaccagc attgtccagt cacaatctgg tgtggccatc cagcgggttc tggttcttgt 180
agtgagtgc aatcccctgt agggaaaggc acaagccctt tagacgaggt gctggaacaa 240
gtcccgtata agccccacg gaccgttatc atgcatgtgg agcagggctc cacccttctt 300
gatccaggta gataccaaac tcgccgcgga ttagtctctg tcaggcgtgg aattagggga 360

52
53/54

Sequence Listing.ST25.txt

```

aatgaagttg gactaccaga cggtagattat gctagcaccg ccttgcctcc tacctgcaaa 420
gagatcaaca tggtcgctgt cgcttccaat gtattgcgca gcaggttcat catcggccca 480
cccggtgctg ggaaaacata ctggctcctt caacagggtcc aggatggtga tgttatttac 540
acaccaactc accagaccat gcttgacatg attagggctt tggggacgtg ccggttcaac 600
gtcccggcag gcacaacgct gcaattcccc gtcccctccc gcaccggtcc gtgggttcgc 660
atcctagccg gcggttggtg tcctggcaag aattccttcc tagatgaagc agcgtattgc 720
aatcaccttg atgttttgag gcttcttagt aaaactaccc tcacctgtct aggagacttc 780
aagcaactcc acccagtggg ttttgattct cattgctatg tttttgacat catgcctcaa 840
actcaactga agaccatctg gaggtttgga cagaatatct gtgatgcatc tcagccagat 900
tacagggaca aactcatgtc catggtcaac acaaccgtg tgacctacgt ggaaaaacct 960
gtcagg 966

```

<210> 13
 <211> 783
 <212> DNA
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

```

<400> 13
gtggaaaaac ctgtcaggtg tgggcaggtc ctacccccct accacagggg ccgagaggac 60
gacgccatca ctattgactc cagtcaaggc gccacattcg atgtggttac attgcatttg 120
cccactaaag attcactcaa caggcaaaga gcccttggtg ctatcaccag ggcaagacac 180
gctatctttg tgtatgaccc acacaggcag ctgcagggct tgtttgatct tcctgcaaaa 240
ggcacgcccc tcaacctcgc agtgcactgc gacgggcagc tgatcgtgct ggatagaaat 300
aacaagaat gcacggttgc tcaggctcta ggcaacgggg ataaatttag ggccacagac 360
aagcgtggtg tagattctct ccgcgccatt tgtgctgac tagaagggtc gagctctccg 420
ctccccagg tcgcacacaa cttgggattt tatttctcac ctgatttaac acagtttgct 480
aaactcccag tagaacttgc acctcactgg ccctggtgt caaccagaa caatgaaaag 540
tggccggatc ggctggttgc cagccttcgc cctatccata aatacagccg cgcgtgcatc 600
ggtgccggct atatggtggg cccttcggtg tttctaggca ctctgggggt cgtgtcatac 660
tatctcacia aatttggtta gggcggggct caagtgttc cggagacggt tttcagcacc 720
ggccgaattg aggtagactg ccgggaatat cttgatgac gggagcgaga agttgctgcg 780
tcc 783

```

<210> 14
 <211> 774
 <212> DNA
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

53
59

Sequence Listing.ST25.txt

<400> 14

gagcgagaag ttgctgcgtc cctccacac ggtttcattg gcgacgtcaa aggcactacc	60
gttggaggat gtcatcatgt caccctccaga tacctcccgc gcgtccttcc caaggaatca	120
gttgcggtag tcgggggttc aagccccgga aaagccgcga aagcattgtg cacactgaca	180
gatgtgtacc tccagatct tgaagcctat ctccaccgg agaccagtc caagtgttg	240
aaaatgatgt tggacttcaa agaagttcga ctaatggtct ggaaagacaa aacagcctat	300
ttccaacttg aaggctcgcta ttccacctgg tatcagcttg ccagctatgc ctctacatc	360
cgtgttcccc tcaactctac ggtgtacttg gacccctgca tgggccccgc cttttgcaac	420
aggagagtcg tcgggtccac ccactggggg gctgacctcg cggtcacccc ttatgattac	480
ggcgctaaaa ttatcctgtc tagcgcgtag catggtgaaa tgccccccgg atacaaaatt	540
ctggcggtcg cggagtcttc gttggatgac ccagttaagt acaaacatac ctgggggttt	600
gaatcggata cagcgtatct gtatgagttc accggaaacg gtgaggactg ggaggattac	660
aatgatgcgt ttcgtgcgcg ccaggaaggg aaaatttata aggccactgc caccagcttg	720
aagttttatt ttccccggg ccctgtcatt gaaccaactt taggcctgaa ttga	774

33
55

VACUNAS DE SUBUNIDADES PRRSV

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional Serie No. 60/581,350, presentada en Junio 17, 2004, cuyas enseñanzas y contenido se incorporan expresamente aquí como referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

Un listado de secuencias impreso acompaña a esta solicitud, y también ha sido presentado con contenido idéntico en la forma de archivo ASCII legible por computadora en un CD-ROM.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la Invención

La presente invención se relaciona ampliamente con vacunas para el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS). Más particularmente, la invención se relaciona con la prevención del PRRS en cerdos mediante la administración de una vacuna que comprende subunidades de ADN del virus PRRS (PRRSV). Todavía más particularmente, la invención pertenece al uso del cuadro de lectura abierto 1 (ORF1) en una vacuna de subunidad de ADN que suministra inmunidad protectora contra el PRRSV a los cerdos. Aún más particularmente, la invención pertenece al uso de porciones seleccionadas de

SS
56/57

ORF1 tanto solas y en combinación con otras porciones del genoma PRRSV o en combinación con otras vacunas contra el PRRSV.

Descripción de la Técnica Anterior

El PRRS es una enfermedad importante o principal en la industria porcina a nivel mundial. El PRRS es causado por la infección del PRRSV. Actualmente, hay vacunas vivas modificadas (MLV) disponibles que, cuando son usadas correctamente, suministran a los cerdos la protección contra la enfermedad clínica resultante de la infección con el PRRSV. Las vacunas PRRS MLV requieren la replicación en el animal vacunado para poder asegurar que una respuesta inmune eficaz es inducida (por ejemplo, ver Meng, XJ., Heterogeneity of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Implications for Current Vaccine Efficacy and Future Vaccine Development; 74 Vet. Micro., 309-329 (2000)). Sin embargo, tal replicación presenta problemas en que el PRRS MLV puede persistir en el animal durante varias semanas después de la vacunación y también puede esparcirse a otros cerdos que muestran estado negativo del PRRSV. El esparcimiento del PRRS MLV de los animales vacunados puede ser un problema en algunos grupos de cerdos que no tienen buenas medidas de bioseguridad en lugar de prevenir el esparcimiento del PRRSV MLV de los animales vacunados a una población libre de PRRSV. Aunque millones de dosis de PRRS MLV han sido usadas sin emisión, hay reportes esporádicos en la literatura en cuanto a la habilidad del PRRS MLV para revertir a una cepa tipo silvestre del PRRSV más virulenta. Los inventos para resolver los problemas del esparcimiento del PRRS MLV y la posible reversión a virulencia han sido tratados mediante la utilización de una vacuna que comprende el virus PRRS inactivado (es decir PRRS KV). Sin embargo, la investigación ha mostrado que a pesar del hecho de que el PRRS KV

57 58

puede inducir una respuesta humoral fuerte en el puerco vacunado, no es efectiva para prevenir la enfermedad asociada con el PRRS.

De acuerdo a lo anterior, lo que se necesita en la técnica es un método de vacuna y la vacuna que podría inducir la respuesta inmune protectora, sin los problemas asociados con el PRRS MLV. Preferiblemente, la administración de la vacuna no replica activamente en el animal vacunado e induce una respuesta inmune humoral fuerte y mediada por células.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención resuelve los problemas inherentes y el estado de la técnica suministra un avance distinto en el estado del arte para suministrar vacunas de ADN de PRRSV. Teóricamente, el plásmido de la vacuna de AND que expresa en antígeno PRRS sirve como una plantilla para sintetizar antígenos de PRRSV (es decir similares al PRRS MLV), pero también tiene la característica de no replicar activamente en el animal (es decir similar al PRRS KV). Los inmunogenes protectores requeridos para inducir una respuesta en el anfitrión protectora contra el PRRSV no son conocidos. Ya que el PRRS MV puede inducir una respuesta protectora en cerdos vacunados, resultó que la replicación del PRRS MLV del animal vacunado debe inducir tanto una respuesta humoral fuerte como una respuesta inmune mediada por células en el animal vacunado.

El ORF1 del PRRSV codifica para la maquinaria de replicación necesaria para la replicación del PRRSV y la generación de nueva progenie. La ORF1 tiene dos regiones, designadas como ORF1a y ORF1b, que comprenden el complejo de replicación del ORF1, (Dea, et al., Current Knowledge on the Structural Proteins of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (Prrs) Virus: Comparison of the

North American and European Isolates; 145 (4) Archives of Virology, 659-688 (2000)). Las proteínas codificadas por el replicador se piensa que son inmunogenes clave en otras familias de virus (Leitner et al., DAN y RNA-Based Vaccines: Principles, Progress and Prospects; 18 Vaccine 765-777 (2000)). Cuando una célula es infectada con el PRRSV, la actividad del replicado viral puede suministrar un efecto adyuvante poderoso a medida que los antígenos asociados al replicado son expresados durante la infección de la célula. Los antígenos asociados al replicado pueden servir como "señales de peligro" generadas en células transfectadas e inducir unas respuestas fuertes inmunes en el anfitrión (es decir IFN, HSP, apoptosis). Así, las "señales de peligro" asociadas con el replicado podrían ser una factor clave en porque el PRRS MLV puede inducir la protección mientras que un PRRS no replicante (es decir antígeno inactivado en el PRRS KV) no confiere protección de la infección.

El ORF1 es de cerca de 12000 nucleótidos en longitud lo que hace la transfección y la expresión adecuada es una célula eucariótica difícil. Así, el ORF1 fue dividido secuencial y arbitrariamente en secciones más pequeñas usando la Expression Library Immunization (ELI) como una herramienta para determinar los inmunogenes protectores de los diversos patógenos. El ELI divide el genoma de un patógeno particular en fragmentos pequeños que son clonados en un vector de vacuna de ADN y de ahí en adelante administrados a un anfitrión para determinar si cualquier fragmento es capaz de inducir una respuesta inmune (Johnston and Barry; Genetic to Genomic Vaccination; 15(8) Vaccine, 808-809 (1997)). Preferiblemente, la respuesta inmune es protectora. La invención es predicada bajo la hipótesis de que las respuestas inmunes en anfitriones a las proteínas generadas por el ORF1 son esenciales para la protección contra la infección PRRSV. Es relativamente fácil colocar las regiones que codifican para el PRRSV

58
59

ORF2-7 en un vector de vacuna de ADN ya que el rango de los ORF es de 317 a 720 nucleótidos en longitud. Como se anotó anteriormente, el tamaño de la región ORF1 del PRRSV es de cerca de 12000 nucleótidos en longitud. Colocar una región de este tamaño en un vector de vacuna de ADN no sería manejable para en cuanto a la transfección y la subsecuente expresión en una célula eucariótica. De acuerdo a lo anterior, fue esencial romper la región ORF1 en secciones más pequeñas para asegurar mejor una expresión adecuada de todas las áreas del ORF1. La Expression Library Immunization (ELI) ha sido empleada como una herramienta para determinar los inmunogenes protectores de los diversos patógenos. La ELI emplea que romper el genoma de un patógeno particular en fragmentos pequeños. Estos fragmentos pequeños son entonces clonados en un vector de vacuna de ADN luego administrados al anfitrión para determinar si cualquier fragmento es capaz de inducir una respuesta inmune protectora. Aquí, en la técnica del ELI ha sido modificada para desarrollar una vacuna de ADN contra el PRRSV que secuencialmente comprendida de la región codificadora del ORF1 del genoma PRRSV. Este método ha sido designado como SELI (inmunización de la librería de expresión secuencial). Esto es en contraste a Barfoed et al., (DNA Vaccination of Pigs with Open Reading Frame 1-7 of PRRS Virus; 22 Vaccine, 3628-3641 (2004)) que usó la región ORF1 completa como una vacuna de ADN.

Las vacunas de la presente invención comprenden porciones del PRRSV ORF1 solo, en combinación con otras porciones del PRRSV ORF1, y juntas con otras composiciones efectivas para generar una respuesta inmune contra la infección PRRSV incluyendo otras vacunas de PRRSV. Las porciones ORF1 útiles para los propósitos de la presente invención son de tamaño suficiente para invocar una respuesta inmune en un animal que recibe la vacuna. Preferiblemente, la

60

porción incluirá hasta cerca de 9000 pares base, más preferiblemente, la porción ORF1 incluirá entre cerca de 21 a 9000 pares base de nucleótidos contiguos, y todavía más preferiblemente entre cerca de 21 a 6000 pares base de nucleótidos contiguos, y aún más preferiblemente entre 21 a 3000 pares base de nucleótidos contiguos, y todavía más preferiblemente entre cerca de 21 a 2000 pares base de nucleótidos contiguos, aún más preferiblemente entre cerca de 21 a 1000 pares base de nucleótidos contiguos, todavía aún más preferido entre 21 a 500 pares base de nucleótidos contiguos, y aún más preferiblemente entre cerca de 21 a 300 pares base de nucleótidos contiguos, y aún más preferiblemente entre cerca de 21 a 300 pares base de nucleótidos contiguos, y aún más preferiblemente entre cerca de 21 a 150 pares base de nucleótidos contiguos, y aún más preferiblemente entre cerca de 21 a 75 pares base de nucleótidos contiguos, y todavía más preferiblemente entre cerca de 21 a 50 pares base de nucleótidos contiguos, y aún más preferiblemente entre cerca de 21 a 25 pares base de nucleótidos contiguos, todavía más preferiblemente entre cerca de 21 a 23, y todavía mucho más preferiblemente cerca de 21 pares base de nucleótidos contiguos. La proteína resultante de cualquiera de estas porciones preferidas es también una parte de la presente invención. Cualquier ORF1 o porción de él de cualquier cepa de PRRSV podría ser usada para propósitos de la presente invención, sin embargo, se prefiere usar una cepa que sea virulenta.

La porción o porciones seleccionadas pueden ser clonadas en vectores de expresión adecuados. Ejemplos de vectores adecuados incluyen los vectores de adenovirus, los vectores de *Shigella*, el pVC1650 (Valentis, Inc., Burlingame, California), WRG720 (W.R. Grace, New York, New York) y el pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, California). Algunos vectores preferidos contienen el promotor del citomegalovirus temprano inmediato, el intrón A, y una porción de adenilación poli-

a (por ejemplo la hormona de crecimiento bovino (BGH) o la hormona de crecimiento humano (HGH)). Adicionalmente, las proteínas de PRRSV purificadas podrían ser expresadas en cultivos de células de insectos usando, por ejemplo, el sistema de expresión de báculo virus. Tales proteínas podrían entonces ser combinadas con un adyuvante y administrada. Por su puesto, aquellos versados en la técnica podrían ser capaces de seleccionar sistemas de expresión adecuados y vectores adecuados que puedan dirigir la expresión de diversos ORF de los PRRSV en células eucarióticas. Preferiblemente, después de clonar las porciones respectivas del ORF1 en un vector de expresión adecuado, la orientación del clon es verificada.

En un ejemplo de la presente invención, el virus VR-2332 del PRRSV fue seleccionado para el uso de acuerdo con la presente invención. El Genbank U87392 fue usado para generar 13 clones sobrepuestos de ORF1. Este ORF1 incluye 12,071 pares base de nucleótidos. Las porciones varían en tamaño entre 773 bp a 975 bp. Los clones fueron designados con las letras A-M con clon A (SEQ ID No. 2) siendo de 939 bp, clon B (SEQ ID No. 3) es de 957 bp, el clon C (SEQ ID No. 4) es de 976, el clon D (SEQ ID No. 5) es de 954 bp, el clon E (SEQ ID No. 6) es de 939 bp, el clon F (SEQ ID No. 7) es de 957 bp, el clon G (SEQ ID No. 8) es de 957 bp, el clon H (SEQ ED No. 9) es de 852 bp, el clon I (SEQ ID No. 10) es de 917 bp, el clon J (SEQ ID No. 11) es de 972 bp, el clon K (SEQ ID No. 12) es de 966 bp, el clon L (SEQ ID No. 13) es de 783 bp, y el clon M (SEQ ID No. 14) es de 774 bp. Los clones A hasta H son de la región 1a y los clones I hasta M son de la región 1b de ORF1. El clon A utiliza el codón de inicio auténtico ORF1A ATG. Los clones de ORF1 restantes tienen un codón de partida de estructura ATG agregado a sus cinco extremos primarios. Cada uno de estos clones fueron clonados respectivamente en el vector de expresión de ADN

62 \$

pVC1650. Este vector contiene el promotor y el intrón de citomegalovirus temprano inmediato y dirige la expresión de los diversos ORFs del PRRSV en las células eucarióticas. La Tabla 1 suministra la información con respecto a cada clon y a cada región de la secuencia de nucleótidos de la cual cada clon es derivado.

Tabla 1
BIV PRRSV ORF1a/1b Clones de Inmunización de Librería de Expresión
Secuencial (SELI)

SEQ ID	Clon ORF1 SELI	Tamaño (pares base)	Región del clon	Espacio del nucleótido del clon (usando el Genbank U87392 como referencia)	Estatus clonado en el vector de expresión pVC1650 y orientación verificada	Reacción IFA luego de la trasfección usando el suero porcino convaleciente del anti-PRRSV
2	A	939	ORF 1a	190-1128	✓	⊕
3	B	957	ORF 1a	1126-2082	✓	⊕
4	C	976	ORF 1a	2082-3057	✓	⊕
5	D	954	ORF 1a	3037-3990	✓	⊕
6	E	939	ORF 1a	3985-4923	✓	⊕
7	F	957	ORF 1a	4924-5880	✓	-
8	G	957	ORF 1a	5863-6819	✓	-
9	H*	852	ORF 1a	6808-7659	✓	⊕
10	I*	917	ORF 1b	7735-8651	✓	-
11	J	972	ORF 1b	8634-9605	✓	débil ⊕
12	K	966	ORF 1b	9588-10553	✓	-
13	L	783	ORF 1b	10536-11318	✓	-
14	M	774	ORF 1b	11298-12071	✓	-

*Nota: Clones H e I originales planteados por el ORF1a/1b menos una región de cambio de estructura 1 y nuevos imprimadores o cebadores nuevos cebadores fueron designados para dar unos productos RT-PCR ligeramente más pequeños.

Cada porción fue entonces utilizada en varias combinaciones lo mismo que solas en preparaciones de vacuna que comprenden otros ORFs de PRRSV.

En otro ejemplo, los clones A-M y los clones del 2 al 6 del ORF fueron clonados en el vector de expresión pVC1650 y un clon para el ORF7 fue clonado en el vector de expresión WRG720. Por su puesto, aquellos versados en la técnica serán capaces de seleccionar vectores adecuados. Adicionalmente, las secuencias de ácido nucleico en la presente invención pueden ser producidas por las técnicas estándar, incluyendo, sin limitación, clonación molecular común, mutagénesis, y técnicas de síntesis química de ácido nucleico. Para propósitos de la presente invención, las secuencias de ADN tienen por lo menos 75% de identidad de secuencia, más preferiblemente por lo menos 75%, aún más preferiblemente por lo menos 80%, y todavía más preferible por lo menos 85%, aún más preferible por lo menos 90%, y todavía aún más preferible por lo menos 95%, y aún más preferible por lo menos 98%, más preferible por lo menos 99% y más preferible 100% de identidad de secuencia con cualquiera de los clones A a M que son cubiertas por la presente invención.

En un aspecto de la presente invención, cada uno de los clones A a M son usados individualmente como un componente de vacuna. Los animales son inmunizados con la vacuna mediante la administración por cualquiera de los medios convencionales. Ejemplos de métodos de administración incluyen oral, transdérmica, intravenosa, subcutáneo, intramuscular, intraocular, intraperitoneal, intrarectal, intravaginal, intranasal, intragástrico, intratraqueal, intrapulmonar, o en cualquier combinación de ellos. Los modos preferidos de administración son intramuscular, subcutáneo, e intranasal. Si se desea o si es necesario, inmunizaciones potencializadas pueden ser dadas una vez o varias veces a

64 63

diversos intervalos. Después de la administración de tal vacuna, una respuesta inmune es producida en el animal y los signos clínicos de la infección del PRRSV son reducidos en su incidencia y/o severidad después de la infección con una forma virulenta del PRRSV.

En otro aspecto de la presente invención, las combinaciones de los clones A a M son administrados a animales como se describió anteriormente. Tales combinaciones incluyen dos o más de los clones anteriormente referenciados. Debido a que algunos de estos clones (A, B, C, D, E, H, y J) produjeron una reacción IFA luego de la transfección usando suero convaleciente anti-PRRSV porcino, las combinaciones de estos clones son preferidos para propósitos de la presente invención.

En otro aspecto de la presente invención, los clones A a M, sea individualmente o en combinaciones como se describió anteriormente, son usados en combinaciones con otros ORF del PRRSV en preparaciones de vacunas. ORFs adecuados incluyen los ORFs 2 a 7.

En otro aspecto de la presente invención, el ADN del ORF del PRRSV es combinado con otra vacuna PRRSV. Preferiblemente la vacuna es efectiva al inducir una respuesta inmune antes de la adición del ADN del ORF1 del PRRSV.

En todavía otro aspecto de la presente invención, suministra un vector. Los vectores de acuerdo con la presente invención tienen insertados en ellos ADN extraño (no derivado de vector) que comprende por lo menos una porción de ADN del ORF1 del PRRSV. En formas preferidas, el vector es un plásmido. Preferiblemente, la porción de ADN del ORF1 del PRRSV tendrá por lo menos 21

64
65
66

nucleótidos contiguos del ADN del ORF1 del PRRSV. En algunas formas preferidas, la porción tendrá por lo menos 150 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las secuencias que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con cualquiera una de las secuencias y de números 1 a 14, y combinaciones de ellas. Tal como con la composición misma, el porcentaje de identidad de secuencia y la longitud de la secuencia puede variar como se describió anteriormente. En otras formas preferidas, el vector comprende adicionalmente una segunda porción de ADN del PRRSV. Esta segunda porción es seleccionada del grupo que consiste de por lo menos 21 nucleótidos contiguos del ORF del PRRSV diferentes al ORF1, por lo menos 21 nucleótidos contiguos del ORF1, y combinaciones de ellos. En modalidades que tienen unos 21 nucleótidos contiguos adicionales del ORF1, estos 21 nucleótidos son distintos de los por lo menos 21 nucleótidos contenidos en la primera porción del ADN del ORF1 del PRRSV. También es preferido que el ADN del PRRSV usado para construir el vector sea derivado de una cepa virulenta del PRRSV.

Otro aspecto de la presente invención involucra células anfitrionas que contienen los plásmidos de la invención. Esto podría incluir los plásmidos creados mediante la introducción de diversos fragmentos de ORF1 anotados anteriormente. Preferiblemente, tal célula podría contener un plásmido que comprende por lo menos 21 nucleótidos contiguos del ADN del ORF1 del PRRSV. En otras formas preferidas, la célula incluirá un plásmido que comprende por los menos 150 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 85% de identidad de secuencia con cualquiera una de las SEQ ID Nos. 1 a 14, y combinaciones de ellos. En todavía otras formas preferidas, el plásmido en la célula comprenderá una segunda porción de ADN del PRRSV seleccionada del grupo que consiste de por

lo menos 21 nucleótidos contiguos de un ORF del PRRSV diferente al ORF1, por lo menos 21 nucleótidos contiguos del ORF1, y combinaciones de ellos. Preferiblemente, el ADN del PRRSV usado para generar el plásmido contenido en la célula es derivado de una cepa virulenta del PRRSV.

En otro aspecto de la presente invención, composiciones de la presente invención son útiles en métodos para inducir las respuestas inmunes en animales lo mismo que para la prevención completa o una reducción en la severidad de las condiciones y síntomas causados por la infección del PRRSV.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir adyuvantes, portadores, y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Como se usa aquí, las siguientes definiciones aplicarán: "Identidad de Secuencia" como es conocido en la técnica se refiere a una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, particularmente una secuencia de referencia y una secuencia dada que es comparada con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia determinada mediante comparar la secuencia dada con la secuencia dada con la secuencia de referencia después que las secuencias han sido alineadas óptimamente para producir el grado más alto de similitud de secuencia, según se determinó por el apareamiento entre las hebras de tales secuencias. Luego de tal alineación, la identidad de secuencia es determinada sobre una base posición por posición, por ejemplo, las secuencias son "idénticas" en una posición particular, y en esa posición, los nucleótidos o residuos de aminoácidos son idénticos. El número total de tales identidades de posición es entonces dividido por el número total de nucleótidos o residuos en la secuencia de referencia para dar el porcentaje de identidad de secuencia. La identidad de secuencia puede ser

68
67 66

calculada fácilmente por métodos conocidos, incluyendo pero no limitarse a, aquellos descritos en la Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); y Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), cuyas enseñanzas se incorporan aquí como referencia. Los métodos preferidos para determinar la identidad de secuencias son designados para dar el apareamiento más grande entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad de secuencia son codificados en programas de computador disponibles al público que determinan la identidad de secuencia entre las secuencias dadas. Ejemplos de tales programas incluyen, pero sin limitarse a, el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol, 215:403-410 (1990). El programa BLASTX está disponible públicamente de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NEH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990), cuyas enseñanzas se incorporan aquí como referencia). Estos programas alinean de manera óptima las secuencias usando pesos de espacios por defecto para poder producir el nivel más alto de identidad de secuencia entre la secuencia dada y la de referencia. Como una ilustración, por un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótido que tiene por lo menos, por ejemplo, 95% "de identidad de secuencia" a una secuencia de nucleótido de referencia, se tiene el propósito de que la secuencia de nucleótido del polinucleótido dado es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la

68 67 69

secuencia de polinucleótido dado puede incluir hasta 5 puntos de mutaciones por cada gen nucleótido de la secuencia de nucleótido de referencia. En otras palabras, en un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótido que tiene por lo menos 95% de identidad relativa a la secuencia de nucleótido de referencia, hasta el 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden ser eliminados o sustituidos con otro nucleótido, o un número de nucleótidos hasta el 5% del total de nucleótidos en la secuencia de referencia puede ser insertados dentro de la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótido de referencia o en cualquier parte entre aquellas dos posiciones, interespaciados sea individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Análogamente, mediante un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácido dada que tenga por lo menos, por ejemplo, 95% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia, es el propósito que la secuencia de aminoácido dada del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polipéptido dada puede incluir hasta 5 alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia de polipéptido dada que tenga por lo menos 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta 5% de los residuos de aminoácido en la secuencia de referencia pueden ser eliminados o sustituidos con otro aminoácido, o un número de aminoácidos hasta del 5% del número total de residuos de aminoácido en la secuencia de referencia pueden ser insertados dentro de la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones amino o terminal de carboxi de la secuencia de aminoácido de referencia o en cualquier parte entre aquellas

68
69

posiciones terminales, interespaciadas sea individualmente entre los residuos en la secuencia de referencia o en la uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferiblemente las posiciones de residuo que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas.

Sin embargo, las sustituciones conservativas no son incluidas como un apareamiento cuando se determina la identidad de secuencia.

De manera similar, "homología de secuencia", como se usa aquí, también se refiere a un método para determinar la relación de dos secuencias. Para determinar la homología de secuencia, dos o más secuencias son alineadas óptimamente como se describió anteriormente, y los espacios son introducidos si es necesario. Sin embargo, en contraste con "identidad de secuencia", la sustituciones de aminoácidos conservativas son contadas como un apareamiento cuando se determina la homología de secuencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido o polinucleótido que tenga 95% de homología de secuencia con una secuencia de referencia, 95% de los residuos de aminoácidos o nucleótidos en la secuencia de referencia deben casar o comprender una sustitución conservativa con otro aminoácido o nucleótido, o un número de aminoácidos o nucleótidos hasta del 5% del total de los residuos de aminoácidos o nucleótidos, sin incluir las sustituciones conservativas, en la secuencia de referencia pueden ser insertados en la secuencia de referencia.

Una "sustitución conservativa" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido o nucleótido con otro residuo de aminoácido o nucleótido que tenga características similares o propiedades incluyendo tamaño, hidrofobicidad, etc.; tal que la funcionalidad general no cambia significativamente.

69
20
A

"Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" de su estado natural., es decir, si este ocurre en la naturaleza, este ha sido cambiado o removido de su ambiente original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido presente naturalmente en un organismo viviente no es "aislado", sino que el mismo polinucleótido o polipéptido es separado del material coexistente de su estado natural es "aislado", según se emplea el término aquí.

"Ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos tales como el ácido desoxiribonucleico (ADN), y en donde sea apropiado, el ácido ribonucleico (ARN). El término también debería entenderse como que incluye, como equivalentes, análogos del ARN o del ADN hechos de análogos nucleótidos, y, según es aplicable a la modalidad descrita, polinucleótidos de cadena única o de doble cadena (en sentido o antisentido).

"Promotor" significa una secuencia de ADN que regula la expresión de una secuencia de ADN seleccionada operativamente ligada al promotor, y que efectúa la expresión de la secuencia de ADN seleccionada en las células. El término que involucra los promotores de "específicos a tejidos", es decir promotores, cuyo efecto de expresión de la secuencia de ADN seleccionada solamente en estas células específicas (por ejemplo células de un tejido específico). El término también cubre los llamados promotores "derramadores", que regulan la expresión de un ADN seleccionado principalmente en un tejido, pero causan la expresión en otros tejidos también. El término también involucra los promotores específicos de no tejido y los promotores que expresan constitutivamente o que son inducibles (es decir los niveles de expresión pueden ser controlada).

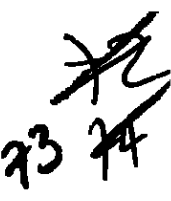
"Transfección" significa la introducción de un ácido nucleico, por ejemplo, mediante un vector de expresión, en una célula recipiente mediante una

transferencia de gen mediada por ácido nucleico. "Transformación", como se usa aquí, se refiere a un proceso en el cual un genotipo de la célula es cambiado como un resultado de una toma celular de ADN o ARN exógeno, y, por ejemplo, la célula transformada expresa una forma recombinante de un polipéptido o, en el caso de la expresión antisentido desde el ser transferido, la expresión de una forma de ocurrencia natural de la proteína es interrumpida. La transfección puede también usar un reactivo químico (es decir un lípido).

El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual este se ha ligado. Un tipo de vector preferido es un episomo, es decir, un ácido nucleico capaz de replicación extracromosomal. Los vectores preferidos son aquellos capaces de replicación autónoma y /expresión de ácidos nucleicos en los cuales ellos se ligan. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales ellos se ligan operativamente se refieren aquí o se llaman aquí como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinantes están frecuentemente en la forma de "plásmidos" que se refiere generalmente a anillos o lazos de ADN de doble cadena circulares que, en su forma de vector no se ligan al cromosoma. En la presente especificación, el "plásmido" y el "vector" se usan de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Los vectores también incluyen otros replicadores tales como fagos y cósmidos, en los cuales otro segmento de ADN puede ser insertado de modo que se lleva cerca de la replicación del segmento insertado. La invención tiene el propósito de incluir tales otras formas de vectores de expresión que sirven de funciones equivalentes y que son conocidas en la técnica subsiguiente a la presente.

"Amplificación" de ácidos nucleicos o polinucleótidos es cualquier método que resulta en la formación de una o más copias de un ácido nucleico o de una molécula de polinucleótido (amplificación exponencial) o en la forma de una o más copias de solamente el complemento de un ácido nucleico o de una molécula de polinucleótido (amplificación lineal). Los métodos de amplificación incluyen la reacción de cadena de polimerasa (PCR) basada en ciclos repetidos de desnaturalización, templados del cebador de oligonucleótido, y extensión del cebador mediante el templado termofilico dependiente de la polimerasa del polinucleótido, resultando en el incremento exponencial en copias de la secuencia deseada del polinucleótido analizado flanqueado por los cebadores. Los dos cebadores PCR diferentes, que templan a cadenas opuestas de ADN, son posicionados de modo que el producto de extensión de polimerasa catalizado de un cebador puede servir como una plantilla de cadena para otro llevando a la acumulación de un fragmento de doble cadena discreto cuya longitud esta definida por la distancia entre los extremos 5' de los cebadores de oligonucleótido. Los reactivos para conducir tal amplificación incluyen cebadores de oligonucleótido, una polimerasa de nucleótido y trifosfatos de nucleósidos tales como, por ejemplo, trifosfato de desoxiadenosina (dATP), trifosfato de desoxiguanosina (dGTP), trifosfato desoxicitidina (dCTP) y trifosfato desoxitimidina (dTTP). Otros métodos para amplificación incluyen la amplificación de un polinucleótido de cadena única usando un cebador único de oligonucleótido, la reacción de cadena de ligaza (LCR), la amplificación con base en secuencia de ácido nucleico (NASBA), el método Q-beta-replicasa, y 3SR.

Las enseñanzas y contenidos de todas las referencias citadas aquí se incorporan expresamente con referencia.



DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA MODALIDAD PREFERIDA

El siguiente ejemplo establece una modalidad preferida de la presente invención. Debe entenderse, sin embargo, que este ejemplo esta suministrado solo para ilustración y nunca debería tomarse como limitativo del alcance general de la invención.

EJEMPLO 1

Este ejemplo suministra datos en cuanto a la eficacia de las vacunas de ADN que comprenden diversas regiones del genoma PRRSV. El ejemplo se inicia con 40 marranos de cualquier sexo que son negativos al PRRS V de Spring Prairie Colony, Hawley, MN 56549. Los marranos tenían 3-4 semanas de nacidos en la iniciación del estudio. Durante el estudio, los marranos se les suministran suficiente comida para su tamaño, edad y condición de los animales. El agua se suministró ad libitum.

Para generar las vacunas de ADN del PRRSV, diecinueve clones de cADN fueron generados del virus de PRRS. Trece clones de cADN fueron generados de manera que representan secuencialmente los cuadros de lectura abierta (ORF) de las regiones 1a/1b del genoma del pRRSV. El clon A utiliza codón de partida ATG del ORF1a autentico. Los ORF1a/1b clones B restantes a M tenían un codón de partida ATG agregado a sus extremos 5' respectivos. Todos los anteriores clones fueron clonados respectivamente en el vector de expresión de ADN p VC 1650. el vector p VC 1650 contiene promotor de citomegalovirus temprano inmediato y el intrón A para dirigir la expresión de los diversos ORFs del PRRSV en las células eucarióticas. Seis clones de cADN adicionales representados por las proteínas de ORFs 2, 3, 4, 5, 6 y 7 del PRRSV estructural. Los clones de ORF 2, 3, 4, 5, y 6

fueron también clonados respectivamente dentro del vector de expresión de ADN pVC1650 descrito anteriormente. El gen ORF 7 fue clonado en un vector de expresión similar designados WRG7020. El vector WRG7020 también contiene el promotor del citomegalovirus temprano inmediato y el intrón A para dirigir la expresión del ORF 7 del PRRSV en las células eucarióticas.

Dos conjuntos de vacunas fueron creadas, designadas "A1-19" y "T1-19". Para las vacunas A1-19, los clones anteriormente mencionados fueron clonados dentro del plásmido de expresión pVC1650 de Valentis, Inc. Cada construcción de plásmido fue formulada separadamente con fosfato de aluminio (Adyu-fos®) (Ulmer et al., Enhancement of DNA Vaccine Potency Using Conventional Aluminum Adjuvants; 18 Vaccine, 18-28 (1999) para proporcionar 250µg del clon de ORF respectivo con 1000 µg de aluminio calculado en una dosis de 1 ml. La vacuna final consistió de una dosis IM de 1 ml separada de cada clon de ORF formulado. Para las vacunas T1-19 los clones anteriormente mencionados fueron clonados en el plásmido de expresión pVC1650 de Valentis, Inc. Cada construcción de plásmido fue formulada separadamente con el plímero TGV200 PINC para proporcionar 250 µg del clon ORF respectivo en una dosis de 1 ml. La vacuna final consistió de una dosis IM de 1 ml de cada clon ORF formulado.

Para generar un control, las vacunas de ADN consistieron de clones de cADN del ORF PCV2 y el gen HA del SIV fueron creadas. Tanto los ORF fueron clonados separadamente en el plásmido de expresión pVC1650 de Valentis, Inc. Ambas construcciones de plásmidos de los genes PCV2 ORF2 y el SIV HA fueron formulados separadamente con fosfato de aluminio (Adyu-fos®) para proporcionar 250 µg del clon de ORF respectivo con 1000 µg de aluminio calculado en una dosis de 1 ml (llamada A20 y A21). Adicionalmente, ambas construcciones de plásmidos de genes PCV2 ORF2 y SIV HA fueron formuladas separadamente con

74
75

el polímero TGV200 PINC para proporcionar 250 µg de cada clon respectivo en una dosis de 1 ml (llamada T20 y T21). La vacuna final consistió de cuatro dosis separadas IM de 1 ml de cada clon formulado. La tabla 2 muestra todas las vacunas creadas, incluyendo las vacunas de control.

Tabla 2

Plásmido	Región de clon	Espacio de nucleótido de clon (usando Genbank U87392 como referencia)
1	ORF 1a	190-1128
2	ORF 1a	1126-2082
3	ORF 1a	2082-3057
4	ORF 1a	3037-3990
5	ORF 1a	3985-4923
6	ORF 1a	4924-5880
7	ORF 1a	5863-6819
8	ORF 1a	6808-7659
9	ORF 1b	7735-8651
10	ORF 1b	8634-9605
11	ORF 1b	9588-10553
12	ORF 1b	10536-11318
13	ORF 1b	11298-12071
14	ORF2	NA
15	ORF3	NA
16	ORF4	NA
17	ORF5	NA
18	ORF6	NA
19	ORF7	NA
20	ORF2	NA
21	SIV HA	NA

Los cuarenta marranos fueron divididos en cuatro grupos: Grupo 1 se le administro 19 x 1 ml dosis de A1-A19 Adyu-fos en los Días 0, 21, y 42. El grupo 2

75
76

se le administro 19 x 1 ml dosis de T1-T19 TGV200 en los Días 0, 21, y 42. El grupo 3 se le administro 4 x 1 ml dosis respectivas de A20, A21, T20, y T21 en los Días 0, 21, y 42. El grupo 4, el control negativo, no tuvo ningún tratamiento administrado.

En el día 56 del estudio, los marranos de los grupos 1, 2, y 3 se les administró la cepa virulenta SDSU#73 del PRRSV. La cepa virulenta SDSU#73 del PRRSV fue diluida 1:10 en EMEM con 4% de suero bovino fetal antes de la administración a los marranos. Un total de 2 ml del virus de la infección diluida fue suministrado intranasalmente a los marranos apropiados con 1 ml del virus diluido administrado a cada nariz. El título de preinfección y de postinfección del virus de infección del PRRSV fue de $10^{4.59}$ TCID₅₀/ml y $10^{4.65}$ TCID₅₀/ml, respectivamente.

Los marranos se les sacaron sangre en los días 0, 21, 42 y 56 del ensayo para monitorear la seroconversión a la vacunación. Los marranos fueron también se les toma sangre en los días 57, 59, 61, 63, 66 y 70 del ensayo para monitorear la seroconversión y la viremia postinfección. Las observaciones clínicas fueron registradas diariamente entre los días 54-70. En el día 70, a los marranos se les hizo necrosis y las selecciones grandes de pulmón fueron registradas como porcentaje de involucramiento de pulmón debido al PRRSV. Los marranos fueron pesados antes de iniciar el estudio y en el día 56 y en el Día 70. Un resumen del protocolo en este ejemplo puede verse en la tabla 3.

77

Tabla 3

Grupo	Grupo/marranos	Primera vacunación (día = 0)	Segunda vacunación (día = 21)	Tercera vacunación (día = 42)	Infección (día = 56)	Recolección de muestra y terminación del estudio (día = 70)
1	10	A1-A19 Adu-Fos	A1-A19 Adu-Fos	A1-A19 Adu-Fos	2 ml del SDSU#73 virulenta del PRRSV administrado intranasalmente	Evaluación clínica de salud, temperatura rectal. Evaluar animales en cuanto a lesiones de pulmones en la necropsia y recolección de tejido de pulmón designado
2	10	T1-T19 TGV200	T1-T19 TGV200	T1-T19 TGV200	Igual a lo anterior	Igual a lo anterior
3	10	A20-A21 T20-T21	A20-A21 T20-T21	A20-A21 T20-T21	Igual a lo anterior	Igual a lo anterior
4	10	Nada	Nada	Nada	Nada	Igual a lo anterior

77
26 21

Para poder evaluar los resultados del ejemplo, el criterio principal usado para determinar la eficacia de los tratamientos del ensayo fue desarrollado de las características de las lesiones de los pulmones del PRRSV. La respuesta serológica, el ADG post infección, y las temperaturas rectales fueron evaluadas como criterio de soporte. Los resultados del ejemplo se resumen en la tabla 4.

Tabla 4

Grupo	Registro de pulmones promedio del grupo	Porcentaje de marranos en cada grupo con registro de consolidación de pulmones de mayor o igual al ≥20%	Temperatura más lata promedio del grupo post infección (°F)	Porcentaje más alto del pico de viremia post infección	Promedio del grupo post infección en ADG
1(A1-A19 Adyu-fos)	19.84	37.5	105.9	100%	0.18
2(T1-T19 TGV200)	28.42	70.0	106.0	100%	0.43
3(Chall. Ctrl.)	37.68	70.0	106.1	100%	0.68
(Neg. Control)	0.0A	0.0	103.9	0%	1.48

No hubo seroconversión al PRRSV según IDEXX PRRS ELISA en ninguno de los marranos que recibieron las tres dosis de los respectivos A1-A19 Adyu-fos o T1-T 19 TGV200 como prototipos de vacuna de ADN. Después de la infección con el PRRSV virulento, apareció un incremento más rápido en las proporciones S/P del ELISA en el grupo 2 que en el Grupo 1 de marranos. Los marranos en el Grupo 3 (no vacunado / controles de infectados) tuvieron proporciones S/P negativas hasta que se expusieron a la infección PRRSV virulenta. El control estricto negativo de los marranos en el Grupo 4 dio proporciones S/P negativas durante el estudio. Los resultados de la serología se reportan en la tabla 5.

79

Tabla 5

		Día 0	Día 21	Día 42	Día 56	(O dpc)	Día 59	(3 dpc)	Día 61	(5 dpc)	Día 63	(7 dpc)	Día 66	(10 dpc)	Día 70	(14 dpc)
Grupo	Mamano	ELISA	ELISA	ELISA	BLISA	VI	ELISA	VI	ELISA	VI	ELISA	VI	EUSA	VI	ELISA	VI
1	802	0.14	-0.09	0.01	0.22	N	0.21	POS	0.97	POS	2.29	POS	2.68	N	2.69	N
1	808	0.00	-0.01	-0.01	0.02	N	0.92	POS	0.08	POS	0.68	POS	1.01	N	1.22	N
1	812	-0.02	0.01	-0.02	0.00	N	0.02	N	0.10	POS	0.60	POS	0.92	N	1.21	N
1	814	-0.03	0.01	-0.03	0.02	N	0.02	N	0.13	POS	0.54	POS	1.15	N	1.80	N
1	818	0.01	-0.01	0.36	0.23	N	0.18	POS	0.83	POS	2.74	POS	2.97	N	3.24	N
1	826	0.00	0.00	-0.02	0.01	N	0.01	N	0.10	POS	0.37	POS	0.45	POS	ND	ND
1	830	-0.01	0.00	0.04	0.02	N	-0.01	POS	0.06	POS	0.39	POS	0.97	POS	1.68	N
1	832	-0.02	0.00	-0.02	0.03	N	0.04	N	0.18	POS	0.93	POS	1.39	POS	1.71	N
1	839	0.01	-0.05	0.01	0.08	N	0.06	POS	0.13	POS	0.36	POS	0.72	N	1.13	POS
1	842	0.02	-0.01	-0.01	0.17	N	0.19	N	0.92	POS	2.30	POS	2.48	N	ND	ND
	Promedio	0.01	-0.02	0.03	0.08		0.07		0.35		1.12		1.47		1.84	
2	808	0.01	0.05	0.11	0.31	N	0.26	POS	0.58	POS	2.51	POS	3.22	N	3.34	N

2

2	813	-0.02	:0.00	-0.03	0.05	N	0.07	POS	0.22	POS	0.83	POS	1.47	POS	1.73	N
2	821	0.00	0.05	0.04	0.07	N	0.10	POS	0.15	POS	1.12	POS	2.28	N	2.52	N
2	822	-0.01	0.00	-0.01	0.03	N	0.05	POS	0.41	POS	1.78	POS	2.37	N	2.01	POS
2	836	-0.02	0.05	0.12	0.22	N	0.23	POS	0.79	POS	2.83	POS	3.52	POS	3.62	N
2.	844	0.00	-0.02	0.00	0.05	N	0.03	POS	0.31	POS	1.72	POS	2.33	POS	2.17	N
2	845	0.04	0.01	0.06	0.32	N	0.19	POS	1.00	POS	2.80	POS	3.44	N	3.26	N
2	846	-0.01	-0.02	-0.03	0.09	N	0.09	N	0.75	POS	2.57	POS	3.17	POS	3.06	N
2	847	-0.01	0.01	0.02	0.04	N	0.02	POS	0.43	POS	2.05	POS	2.94	POS	2.96	N
2	849	0.03	-0.02	-0.01	0.11	N	0.08	POS	0.45	POS	1.97	POS	2.48	N	2.56	N
	Promedio	0.00	0.01	0.03	0.13		.0.11		0.51		2.03		2.72		2.72	
3	811	-0.03	-0.02	0.02	0.00	N	0.01	POS	0.05	POS	0.55	POS	1.44	POS	1.77	N
3	815	0.00	-0.01	0.06	0.06	N	0.03	POS	0.07	POS	0.57	POS	1.32	POS	1.33	N
3	819	-0.01	0.00	0.04	0.01	N	0.02	POS	0.08	POS	0.25	POS	0.87	POS	1.13	N
3	823	0.00	-0.01	0.03	0.02	N	0.01	POS	0.04	N	0.44	POS	1.13	POS	1.81	N
3	831	0.00	-0.02	0.00	0.01	N	0.01	POS	0.07	POS	0.78	POS	1.48	N	1.75	POS
3	833	-0.02	-0.02	0.00	0.01	N	0.01	POS	0.03	POS	0.15	POS	0.43	POS	0.90	N
3	840	0.00	-0.02	0.01	0.05	N	0.12	POS	0.18	POS	0.41	POS	1.30	POS	2.15	POS
3	841	-0.02	-0.01	-0.02	0.06	N	0.06	POS	0.14	POS	0.71	POS	1.33	POS	1.50	N

19/16

8/

3	843	0.00	-0.02	-0.01	0.02	N	0.02	N	0.11	POS	0.41	POS	0.84	N	0.80	N
3	848	0.03	-0.02	0.00	0.05	N	0.05	POS	0.10	POS	0.30	POS	0.74	N	1.35	N
	Promedio	0.00	-0.02	0.01	0.03		0.03		0.09		0.48		1.09		1.43	
4	803	-0.03	0.00	0.04	0.04	N	0.04	N	0.04	N	0.02	N	0.01	N	-0.02	N
4	804	0.01	-0.03	0.02	0.12	N	.0.11	N	0.12	N	0.08	N	0.13	N	0.10	N
4	805	0.03	-0.01	-0.03	0.00	N	-0.01	N	0.00	N	0.01	N	-0.01	N	-0.03	N
4	810	0.01	-0.06	-0.03	0.08	N	0.08	N	0.06	N	0.02	N	0.02	N	0.02	N
4	817	0.03	-0.02	-0.15	-0.02	N	-0.01	N	-0.01	N	-0.04	N	-0.04	N	-0.10	N
4	828	-0.02	-0.03	0.04	0.00	N	-0.01	N	0.01	N	-0.02	N	0.00	N	-0.01	N
4	834	-0.01	-0.02	0.03	0.00	N	0.00	N	0.00	N	-0.17	N	-0.02	N	-0.01	N
4	837	0.00	-0.03	0.01	0.03	N	0.03	N	0.05	N	0.02	N	0.03	N	-0.02	N
4	838	0.00	-0.01	0.00	0.08	N	0.11	N	0.11	N	0.08	N	0.07	N	0.01	N
4	850	0.04	-0.01	0.03	0.09	N	0.06	N	0.07	N	0.08	N	0.07	N	0.06	N
	Promedio	0.01	-0.02	0.00	0.04		0.04		0.05		0.01		0.03		0.00	

8/

BT
42 82

La temperatura de los marranos fue monitoreada durante dos días antes de la infección durante los 14 días después de la infección. La temperatura promedio del grupo de la línea base durante el periodo de infección para el grupo 4 no vacunado /controles no infectados fue de 103.4 °F.

Las temperaturas promedio del grupo entre todos los grupos infectados con PRRS V fueron elevadas en algún punto después de la infección, sin embargo hubo una diferencia temporal en días post infección en el cual la temperatura promedio del grupo dio picos. Las temperaturas picos promedio del grupo en todos los grupos infectados con PRRSV variaron entre 105.9 y 106.1 °F, mientras que los grupos de controles negativos sus temperaturas pico promedio fueron de 103.9. El Grupo 3 mostró un incremento gradual en temperaturas post infección con un pico de 106.1°F en los nueve días post infección. Los Grupos 1 y 2 mostraron un incremento agudo en temperaturas a los dos días después de la infección con temperaturas pico de 105.9°F y 105.6°F, respectivamente. De notarse, la manera en la cual las temperaturas post infección de los marranos vacunados con el ADN en los Grupos 1 y 2 se incremento rápidamente, es similar a la manera en la cual los animales vacunados con PRRS KV respondes después de la infección. Se ha observado que los marranos vacunados con los prototipos PRRS KV experimentales son usualmente "amortiguados humoralmente" (es decir seropositivos la PRRSV luego de la vacunación). Los animales vacunados con estos prototipos PRRS KV experimentales también muestran un incremento rápido en las temperaturas pronto después de la infección, como se vio en este estudio con los marranos vacunados con ADN en los grupos 1 y 2. Esta similitud en la rápida elevación en la temperatura luego de la infección con el PRRSV es una indicación adicional que los sistemas inmunes de los marranos vacunados con el ADN fueron así amortiguados con respecto al antígeno PRRSV.

82
83
84

El Grupo 3 de marranos mostró lesiones en los pulmones característicamente encontradas en una infección PRRSV exitosa. El Grupo 4 de marranos no tuvo lesiones en pulmón en la necrosis. El Grupo 1 y 2 de marrano tuvo lesiones de pulmón promedio de grupo de 19.84 y 28.42, respectivamente. El registro de pulmones para los marranos individuales se reporta en la tabla 6.

Tabla 6

Grupo	Animal	Registros de pulmón
1	802	2.00
1	808	0.90
1	812	55.00
1	814	0.20
1	818	1.00
1	826	ND
1	830	70.00
1	832	2.90
1	839	26.75
1	842	ND .
	Promedio	19.84
2	806	23.00
2	813.	32.50
2	821	4.00
2	822	. 28.95
2	836	37.50
2	. 844	67.00
2	845	16.70
2	846	52.50
2	847.	14.00
2	849	8.00
	Promedio.	28.42
3	811	2.75
3	815	33.50

43
84-85

3	819	51.00
3	823	72.00
3	831	75.00
3	833	15.50
3	840	39.00
3	841	37.50
3	843	9.50
3	848	41.00
	Promedio	37.68
4	803	0.00
4	804	0.00
4	805	0.00
4	810	0.00
4	817	0.00
4	828	0.00
4	834	0.00
4	837	0.00
4	838	0.00
4	850	0.00
	Promedio	0.00

De estos resultados es claro que las vacunas de ADN que comprenden varias regiones del genoma PRRSV pueden inducir la protección de la infección virulenta en el modelo respiratorio.



VACUNAS DE SUBUNIDADES PRRSV

RESUMEN:

Las vacunas efectivas contra el PRRSV incluyen por lo menos una porción en PRRSV ORF 1. Tales vacunas, luego de la administración, provocan una respuesta inmune en animales susceptibles al PRRSV. Más aún, las composiciones de acuerdo con la presente invención suministran una respuesta inmune hasta e incluyen inmunidad protectora contra el PRRSV I, o mismo que reducen la severidad del PRRSV y/o la incidencia del PRRSV. Las porciones seleccionadas del ORF1 pueden ser usadas singularmente, en combinación con otro PRRSV ORF y en combinación con otras vacunas de PRRSV.

46 85 81

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna capaz de inducir una respuesta inmune contra el PRRSV comprende:

una primera porción de ADN de ORF1 del PRRSV, dicha porción tiene por lo menos 21 nucleótidos contiguos de dicho ADN del ORF1 del PRRSV; y
un portador farmacológicamente adecuado.
2. La vacuna de la reivindicación 1, dicha porción tiene por lo menos 150 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 85% de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID Nos. 1-14, y las combinaciones de ellas.
3. La vacuna de la reivindicación 2, dicha porción es seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 85% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID Nos. 1-6, 9, 10, y las combinaciones de ellas.
4. La vacuna de la reivindicación 1, comprende adicionalmente una porción de ADN del PRRSV seleccionada del grupo que consiste de secuencias de por lo menos 21 nucleótidos contiguos de un ORF PRRSV diferente al ORF1, por lo menos 21 nucleótidos contiguos del ORF1 PRRSV, y las combinaciones de ellas.



5. La vacuna de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente otra composición efectiva para inducir una respuesta inmune contra la infección PRRSV.
6. La vacuna de la reivindicación 1, dicho ORF1 del PRRSV es derivado de una cepa virulenta del PRRSV.
7. La vacuna de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un ingrediente seleccionado del grupo que consiste de secuencias de adyuvantes, excipientes, y las combinaciones de ellas.
8. Un método para inducir una respuesta inmune contra el PRRSV en un animal susceptible a la infección del PRRSV, dicho método comprende las etapas de:

administrar una composición al animal, dicha composición comprende por lo menos 21 nucleótidos contiguos de una porción del ADN del ORF1 del PRRSV; y

causar dicha inducción de dicha respuesta inmune.
9. El método de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente la etapa de suministrar una segunda administración de dicha composición.
10. El método de la reivindicación 8, dicha porción comprende por lo menos 150 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 85% de identidad de

secuencia con cualquiera una de las SEQ ID Nos. 1-14, y las combinaciones de ellas.

11. El método de la reivindicación 10, dicha porción es seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 85% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID Nos. 1-6, 9, 10, y las combinaciones de ellas.
11. El método de la reivindicación 9, dicha composición que comprende adicionalmente un segunda porción de ADN seleccionada del grupo que consiste de secuencias de por lo menos 21 nucleótidos contiguos de un ORF del PRRSV diferente al ORF1, por lo menos 21 nucleótidos contiguos del ORF1, y las combinaciones de ellas.
13. El método de la reivindicación 9, dicha composición que comprende adicionalmente una segunda composición efectiva para inducir una respuesta inmune contra la infección del PRRSV.
14. El método de la reivindicación 9, dicha composición que comprende adicionalmente un ingrediente seleccionado del grupo que consiste de secuencias de adyuvantes, excipientes, y las combinaciones de ellas.
15. un vector que comprende por lo menos una porción de ADN del ORF1 del PRRSV.
16. El vector de la reivindicación 15, dicho vector es un plásmido.

28
40
69

17. El vector de la reivindicación 15, dicha porción del ADN del ORF1 del PRRSV comprende por lo menos 21 nucleótidos contiguos del ADN del ORF1 del PRRSV.
18. El vector de la reivindicación 17, dicha porción del ADN del ORF1 del PRRSV tiene por lo menos 150 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 85% de identidad de secuencia con cualquiera una de las SEQ ID Nos. 1-14, y las combinaciones de ellas.
19. El vector de la reivindicación 1, dicho vector que comprende adicionalmente una segunda porción de ADN del PRRSV seleccionada del grupo que consiste de por lo menos 21 nucleótidos contiguos de un ORF PRRSV diferente al ORF1, por lo menos 21 nucleótidos contiguos de ORF1, y las combinaciones de ellas.
20. El vector de la reivindicación 15, dicho ADN DEL PRRSV es derivado de una cepa virulenta del PRRSV.
21. Una célula que contiene un plásmido que comprende por lo menos 21 nucleótidos contiguos del ADN del ORF1 del PRRSV.
22. la célula de la reivindicación 21, dicho plásmido que comprende adicionalmente por lo menos 150 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 85% identidad de secuencia con cualquiera una de las SEQ ID Nos. 1-14, y las combinaciones de ellas.

89
90

23. La célula de la reivindicación 21, dicho plásmido que comprende adicionalmente una segunda porción de ADN del PRRSV seleccionada del grupo que consiste de por lo menos 21 nucleótidos contiguos de un ORF PRRSV diferente al ORF1, por lo menos 21 nucleótidos contiguos del ORF1, y las combinaciones de ellas.
24. La célula de la reivindicación 21, dicho ADN del PRRSV es derivado de una cepa virulenta del PRRSV.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.
VAUGHN, Eric M.
STAMMER, Richard

<120> VACUNAS DE SUBUNIDADES PRRSV

<130> 35072-PRO

<160> 14

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 15411

<212> DNA

<213> VIRUS DEL SINDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO.

<400> 1

```

atgacgtata ggtgttggct ctatgccttg gcatttgtat tgtcaggagc tgtgaccatt      60
ggcacagccc aaaacttgct gcacagaaac acccttctgt gatagcctcc ttcaggggag      120
cttagggttt gtccctagca ccttgcttcc ggagttgcac tgccttacgg tctctccacc      180
cctttaacca tgtctgggat acttgatcgg tgcacgtgta cccccaatgc caggggtgtt      240
atggcggagg gccaaagtcta ctgcacacga tgcctcagtg cacggtctct cttccccctg      300
aacctccaag tttctgagct cgggggtgcta ggcctattct acaggcccga agagccactc      360
cggtggacgt tgccacgtgc attccccact gttgagtgtc cccccgccgg ggcctgctgg      420
ctttctgcaa tctttccaat cgcacgaatg accagtggaa acctgaactt ccaacaaaga      480
atggtacggg tcgcagctga gctttacaga gccggccagc tcaccctgc agtcttgaag      540
gctctacaag tttatgaacg ggggtgcccgc tgggtaccca ttgttgacc tgtccctgga      600
gtggccgttt tcgccaattc cctacatgtg agtgataaac ctttccgggg agcaactcac      660
gtgttgacca acctgccgtc ccgcagaga cccaagcctg aagacttttg cccctttgag      720
tgtgctatgg ctactgtcta tgacattggt catgacgccg tcatgtatgt ggccgaaagg      780
aaagtctcct gggcccctcg tggcggggat gaagtgaat ttgaagctgt ccccggggag      840
ttgaagttga ttgcgaaccg gctccgcacc tccttcccgc cccaccacac agtggacatg      900
tctaagttcg cttcacagc ccctgggtgt ggtgtttcta tgcgggtcga acgccaacac      960
ggctgccttc ccgtgacac tgtccctgaa ggcaactgct ggtggagctt gtttgacttg      1020
cttccactgg aagttcagaa caaagaaatt cgccatgcta accaatttgg ctaccagacc      1080
aagcatggtg tctctggcaa gtacctacag cggaggctgc aagttaatgg tctccgagca      1140
gtaactgacc taaacggacc tatcgtcgta cagtacttct ccgttaagga gagttggatc      1200
cgccatttga aactggcggg agaaccagc tactctgggt ttgaggacct cctcagaata      1260
agggttgagc ctaacacgtc gccattggct gacaaggaag aaaaaatttt ccggtttggc      1320

```

92 45

LISTADO DE SECUENCIAS

agtcacaagt ggtacggcgc tggaaagaga gcaagaaaag cagctcttg tgcgactgct 1380
 acagtcgctg gccgcgcttt gtccgttcgt gaaacccggc aggccaagga gcacgagggt 1440
 gccggcgcca acaaggctga gcacctcaaa cactactccc cgcctgccga agggaaattgt 1500
 ggttggcact gcatttccgc catcgccaac cggatgggga attccaaatt tgaaaccacc 1560
 cttccgaaa gagtgaagacc tccagatgac tgggctactg acgaggatct tgtgaatgcc 1620
 atccaaatcc tcagactccc tgcggcctta gacaggaacg gtgcttgtag tagcgccaag 1680
 tacgtactta agctggaagg tgagcattgg actgtcactg tgaccctgg gatgtccctt 1740
 tctttgctcc ctcttgaatg tgttcagggc tgttggtggc acaagggcgg tcttggttcc 1800
 ccagatgcag tcgaggcttc cggatttgac cctgcctgcc ttgaccggct ggctgagggtg 1860
 atgcacctgc ctagcagtgc tatccagcc gctctggccg aaatgtctgg cgattccgat 1920
 cgttcggctt ctccggtcac caccgtgtgg actgtttcgc agttctttgc ccgtcacagc 1980
 ggaggggaatc accctgacca agtgcgctta gggaaaatta tcagcctttg tcaggtgatt 2040
 gaggactgct gctgttccca gaacaaaacc aaccgggtca ccccgaggga ggctgcagca 2100
 aagattgacc tgtacctccg tggtgcaaca aatcttgaag aatgcttggc caggcttgag 2160
 aaagcgcgcc cgccacgcgt aatcgacacc tcctttgatt gggatgttgt gctccctggg 2220
 gttgaggcgg caaccagac gatcaagctg cccaggtca accagtgtcg tgctctggtc 2280
 cctgttgtag ctcaaaagtc cttggacaac aactcgggtc ccctgaccgc cttttcactg 2340
 gctaactact actaccgtgc gcaagggtgac gaagttcgtc accgtgaaag actaaccgcc 2400
 gtgctctcca agttggaaa ggttggtcga gaagaatatg ggctcatgcc aaccgagcct 2460
 ggtccacggc ccacactgcc acgcggtc gacgaactca aagaccagat ggaggaggac 2520
 ttgctgaaac tggctaaccg ccagacgact tcggacatga tggcctgggc agtcgagcag 2580
 gttgacctaa aaacttgggt caagaactac ccgcggtgga caccaccacc ccctccgcca 2640
 aaagttcagc ctgaaaaaac gaagcctgtc aagagcttgc cggagagaaa gcctgtcccc 2700
 gccccgcga ggaagggttg gtccgattgt ggcagcccg tttcattagg cggcgatgtc 2760
 cctaacagtt ggaagattt ggctgttagt agcccccttg atctccgac ccacactgag 2820
 ccggcaacac cttcaagtga gctggtgatt gtgtcctcac cgcaatgcat cttcaggccg 2880
 gcgacacct tgagtgaagc ggctccaatt cccgcacctc gcggaactgt gtctcgaccg 2940
 gtgacacct tgagtgaagc gatccctgtg cccgcaccgc ggcgtaagtt tcagcagggtg 3000
 aaaagattga gttcggcggc ggcaatccca ccgtaccagg acgagcccct ggatttgtct 3060
 gcttcctcac agactgaata tgaggcctct cccccagcac cgccgcagag cgggggcgtt 3120
 ctgggagtag aggggcatga agctgaggaa accctgagtg aaatctcgga catgtcgggt 3180

LISTADO DE SECUENCIAS

aacattaaac ctgcgtccgt gtcacaaagc agctccttgt ccagcgtgag aatcacacgc 3240
 ccaaaataact cagctcaagc catcatcgac tcgggcgggc cctgcagtgg gcatctccaa 3300
 gaggtaaagg aaacatgcct tagtgatcatg cgcgaggcat gtgatgcgac taagcttgat 3360
 gaccctgcta cgcaggaatg gctttctcgc atgtgggacg gggaggacat gctgacttgg 3420
 cgcaacacgt ctgtttacca ggcgatttgc accttagatg gcagggttaa gttcctccca 3480
 aaaatgatac tcgagacacc gccgccctat ccgtgtgagt ttgtgatgat gcctcacacg 3540
 cctgcacctt ccgtagggtgc ggagagcgac cttaccattg gctcagttgc tactgaagat 3600
 gtccacgca tcctcgagaa aatagaaaat gtcggcgaga tggccaacca gggacccttg 3660
 gccttctccg aggataaacc ggtagatgac caacttgtca acgacccccg gatatcgctg 3720
 cggaggcctg acgagagcac atcagctccg tccgcaggca cagggtggcg cggctctttt 3780
 accgatttgc cgccttcaga tggcgcgat gccgacgggg gggggccgtt tcggacggta 3840
 aaaagaaaag ctgaaaggct ctttgaccaa ctgagcgtc aggtttttga cctcgtctcc 3900
 catctccctg ttttcttctc acgccttttc taccctggcg gtggttattc tccgggtgat 3960
 tggggttttg cagcttttac tctattgtgc ctctttttat gttacagtta ccagccttt 4020
 ggtattgctc cctctctggg tgtgttttct gggctctctc ggcgcgttcg aatgggggtt 4080
 tttggctgct ggttggtttt tgcgttggt ctgttcaagc ctgtgtccga ccagtcggc 4140
 gctgcttggt agtttgactc gccagagtgt agaaacatcc ttcattcttt tgagcttctc 4200
 aaaccttggg accctgttcg cagccttgtt gtgggccccg tcggtctcgg tcttgccatt 4260
 cttggcaggt tactgggcgg ggcacgctgc atctggcact tttgcttag gcttggcatt 4320
 gttgcagact gtatcttggc tggagcttac gtgcttctc aaggtagggt taaaaagtgc 4380
 tggggatctt gtataagaac tgctcctaag gaggtcgctt ttaacgtgtt tcctttcaca 4440
 cgtgcgacca ggtcgtcact tatcgacctg tgcgatcgtt tttgtgcgc aaaaggaatg 4500
 gaccctattt ttctcgccac tgggtggcg ggggtcgtgg ccggccgaag cccattgag 4560
 caacctctg aaaaaccat cgcgtttgac caattggatg aaaagaagat tacggctagg 4620
 actgtggtcg ccagcctta tgaccccaac caagccgtaa agtgcttgcg ggtattgcag 4680
 tcgggtgggg cgatggtggc taaggcggtc caaaagtgg tcaaggtttc cgctgttcca 4740
 ttccgagccc cttcttttcc cactggagtg aaagtggacc ctgattgcag ggtcgtggtt 4800
 gaccctgaca cttcactgc agctctccg tctggctact ccaccacaaa cctcgtcctt 4860
 ggtgtagggg actttgcca gctgaatgga ttaaaaatca ggcaaatttc caagccttca 4920
 gggggaggcc cacatctcat ggctgccctg catgttgctt gctcgatggc tctgcacatg 4980
 cttgctggga ttatgtgac tgcgggtgggt tcttgcggca ccggcaccaa cgaccctgg 5040
 tgcgctaacc cgtttgccgt ccctggctac ggacctggct ctctctgcac gtccaggttg 5100

93
99

LISTADO DE SECUENCIAS

tgcatTTccc aacacggcct taccctgccc ttgacagcac ttgtggcggg attcggtatt	5160
caagaaattg ccttggctgt tttgattttt gtttccatcg gaggcattggc tcataggttg	5220
agctgtaagg ctgacatgct gtgtgttttg cttgcaattg ccagctatgt ttgggtacct	5280
cttacctggg tgcttttgtg gtttccttgc tgggtgcgct gtttttcttt gcacccctc	5340
accatcctat ggttgggtgt tttcttgatt tctgtgaata tgccttcagg aatcttggcc	5400
atgggtgttg tggtttctct ttggcttctt ggtcggtata ctaatgttgc tggccttgct	5460
acccctacg acattcatca ttacaccagt ggcccccgcg gtgttgccgc cttggctacc	5520
gcaccagatg ggacctactt ggccgctgtc cgccgcgctg cgttgactgg ccgcaccatg	5580
ctgtttaccc cgtcccagct tgggtctctt cttgaggggtg ctttcagaac tcgaaagccc	5640
tactgaaca ccgtcaatgt gatcgggtcc tccatgggct ctggcggggt gtttaccatc	5700
gacgggaaag tcaagtgcgt aactgccgca catgtcctta cgggcaattc agctcgggtt	5760
tccggggctg gcttcaatca aatgcttgac tttgacgtaa agggagattt cgctatagct	5820
gattgcccga attggcaagg ggctgcccc aagacccaat tctgcacgga tggatggact	5880
ggccgtgcct attggctaac atcctctggc gtcgaacccg gcgtcattgg aaaaggattc	5940
gccttctgct tcacggcatg tggcgattcc ggggtccccag tgatcaccga ggccggtgag	6000
cttgctggcg ttcacacggg atcgaataaa caaggggggg gcattgttac gcgccccca	6060
ggccagtttt gtaatgtggc acccatcaag ctaagcgaat taagtgaatt ctttgctggg	6120
cctaagggtc cgctcgggtga tgtgaagggtc ggcagccaca taattaaaga cataagcgag	6180
gtgccttcag atcttttgtc cttgcttgct gccaaacctg aactggaagg aggcctctcc	6240
accgtccaac ttcttttgtg gtttttctc ctgtggagaa tgatgggaca tgcctggacg	6300
cccttggttg ctgtgagttt ctttattttg aatgaggttc tcccagccgt cctgggtccgg	6360
agtgttttct cttttggaat gtttgtgcta tcctggctca cgccatggct tgcgcaagtt	6420
ctgatgatca ggcttctgac agcagctctt aacaggaaca gatgggtact tgccttttc	6480
agcctcggtg cagtgaccgg ttttgtcgca gatcttgctg ccactcaggg gcatccgttg	6540
caggcagtga tgaatttgag cacctatgca ttcctgcctc ggatgatggg tgtgacctca	6600
ccagtcccag tgatcacgtg tgggtgctgt cacctacttg ccatcatttt gtacttgttt	6660
aagtaccgtg gcccgcacca tatccttggt ggcgatggag tgttctctgc ggctttcttc	6720
ttgagatact ttgccgaggg aaagttaggg gaaggggtgt cgcaatcctg cggaatgaat	6780
catgagtctc tgactgggtgc cctcgtatg agactcaatg acgaggactt ggatttcctt	6840
atgaaatgga ctgattttaa gtgctttgtt tctgcgtcca acatgaggaa tgcagcgggt	6900
caatttatcg aggcTgccta tgctaaagca cttagagtag aactggccca gttgggtgag	6960

LISTADO DE SECUENCIAS

gttgataaag ttggagggtac ttggccaaa ctggaagctt ttgctgatal cgtggcacct 7020
 caactctcgc ccggtgacat tgttgtcgtc ctggccaca cgctgttgg cagtatcttc 7080
 gacctaaagg ttggtagcac caagcatacc ctccaagcca ttgagaccag agtccttgc 7140
 ggggtccaaa tgaccgtggc gcgctcgtc gacccgaccc ccacgcccc acccgaccc 7200
 gtgcccattc cctcccacc gaaagtctg gagaatggcc ccaacgctt gggggatgag 7260
 gaccgtttga ataagaaga gaggcgcagg atggaagccc tcggcatcta tgttatggc 7320
 gggaaaaagt accagaaatt ttgggacaag aattccggtg atgtgtttta tgaggaggtc 7380
 cataataaca cagatgagtg ggagtgtctc agagtggcg accctgccga ctttgacct 7440
 gagaagggaa ctctgtgtgg acatgtcacc attgaaaaca aggcttacca tgtttacacc 7500
 tccccattc gtaagaagtt cttggtcccc gtcaaccag agaatggaag agttcaatgg 7560
 gaagctgcaa agctttccgt ggagcaggcc ctaggtatga tgaatgtcga cggcgaactg 7620
 actgccaaag aactggagaa actgaaaaga ataattgaca aactccaggg cctgactaag 7680
 gagcagtgtt taaactgcta gccgccagcg acttgacccg ctgtggtcgc ggcggcttgg 7740
 ttgttactga aacagcggta aaaatagtca aatttcacaa ccggaccttc accctgggac 7800
 ctgtgaattt aaaagtggcc agtgaggtt agctaaaaga cgcggttgag cacaaccaac 7860
 acccggttgc gagaccgatc gatggtggag ttgtgtcct gcgttccgc gttccttcgc 7920
 ttatagacgt ctgactctcc ggtgctgat catctccaa gttacttgcc catcacgggc 7980
 cgggaaacac tgggatcgat ggcacgctc gggattttga gtccgaagcc actaaagagg 8040
 aagtcgcact cagtgcgcaa ataatacagg ctgtgacat taggcgcggc gacgtcctg 8100
 aaattggtct ccttacaag ctgtaccctg ttaggggtaa ccctgagcgg gtgaaaggag 8160
 ttctgcagaa tacaaggttt ggagacatac cttaaaaac cccagtgac actggaagcc 8220
 cagtgcacgc ggctgcctgc cttacgcca acgacctcc ggtgactgat gggcgctccg 8280
 tcttggccac gaccatgccc cccgggtttg agttatatgt accgaccata ccagcgtctg 8340
 tccttgatta ccttgactct aggcctgact gccctaaaca gctgacagag cacggctgcg 8400
 aagatgccgc actgaaagac ctctctaaat atgacttgtc cacccaaggc tttgttttac 8460
 ctggagtctc tcgccttgtg cggaataacc tgtttgcca ttaggtaag tgcccacccg 8520
 ttcatcggcc ttctacttac cctgctaaga attctatggc tggaataaat gggaaacagg 8580
 tcccaacca ggaattcag agcgtccctg aaatcgacgt tctgtgcgca caggctgtgc 8640
 gagaaaactg gcaaactgtc accccttgta ctcttaagaa acagtattgc gggaagaaga 8700
 agactaggac catactcggc accaataact tcatcgact agcccaccga gcagtgttga 8760
 gtggtgttac ccagggttc atgaaaaagg cgtttaactc gcccatcgcc ctcggaaga 8820
 acaagtttaa ggagctacag actccggtcc tgggcagggt cttgaagct gatctcgcat 8880

94
95

LISTADO DE SECUENCIAS

cctgcgatcg atccacgcct gcaattgtcc gctgggttgc cgccaacctt ctttatgaac 8940
ttgcctgtgc tgaagagcat ctaccgtcgt acgtgctgaa ctgctgccac gacttactgg 9000
tcacgcagtc cggcgcagtg actaagagag gtggcctgtc gtctggcgac ccgatcacct 9060
ctgtgtctaa caccatttat agtttgggtga tctatgcaca gcatatggtg cttagt tact 9120
tcaaaagtgg tcacccccat ggcttctgt tcttacaaga ccagctaaag tttgaggaca 9180
tgctcaagggt tcaaccctg atcgtctatt cggacgacct cgtgctgtat gccgagctc 9240
ccaccatgcc aaactatcac tgggtgggtg aacatctgaa tttgatgctg gggtttcaga 9300
cggacccaaa gaagacagca ataacagact cgccatcatt tctaggctgt agaataataa 9360
atgggcgcca gctagtcccc aaccgtgaca ggatcctcgc ggccctcgcc tatcacatga 9420
aggcgagtaa tgtttctgaa tactatgcct cagcggctgc aatactcatg gacagctgtg 9480
cttgtttgga gtatgatcct gaatgggtt gagaacttgt agttggaata gcgcagtgcg 9540
cccgaagga cggctacagc tttcccgga cggcgttctt catgtccatg tgggaaaaac 9600
tcaggtccaa ttatgagggg aagaagtcga gagtgtgcgg gtactgcggg gccccggccc 9660
cgtacgtac tgctgtggc ctgcagctc gcatttacca caccacttc caccagcatt 9720
gtccagtcac aatctgggtg ggccatccag cgggttctg tcttgtagt gagtgcaaat 9780
cccctgtagg gaaaggcaca agccctttag acgaggtgct ggaacaagtc ccgtataagc 9840
ccccacggac cgttatcatg catgtggagc aggggtctac ccccttgat ccaggtagat 9900
accaactcg ccgcggatta gtctctgtca ggctggaat taggggaaat gaagtggac 9960
taccagacgg tgattatgct agcaccgcct tgctccctac ctgcaaagag atcaacatgg 10020
tcgtgtcgc ttccaatgta ttgcgcagca ggttcacat cggcccacc ggtgctggga 10080
aaacatactg gctccttcaa caggctccagg atggtgatgt tatttacaca ccaactcacc 10140
agaccatgct tgacatgatt agggctttgg ggacgtgccc gttcaacgtc ccggcaggca 10200
caacgctgca attccccgtc cctcccgca ccggctccgtg ggttcgcac ctagccggcg 10260
gttgggtgcc tggcaagaat tccttcttag atgaagcagc gtattgcaat cacttgatg 10320
tttgaggct tcttagtaaa actaccctca cctgtctagg agacttcaag caactccacc 10380
cagtgggttt tgattctcat tgctatgttt ttgacatcat gcctcaaact caactgaaga 10440
ccatctggag gtttggacag aatatctgtg atgccattca gccagattac agggacaaac 10500
tcatgtccat ggtcaacaca acccgtgtga cctacgtgga aaaacctgtc aggtatgggc 10560
aggtcctcac cccctaccac agggaccgag aggcagcgc catcactatt gactccagtc 10620
aaggcgccac attcgtatgtg gttacattgc atttgccac taaagattca ctcaacaggc 10680
aaagagccct tgttgctatc accagggcaa gacacgtat ctttgtgtat gaccacaca 10740

LISTADO DE SECUENCIAS

ggcagctgca .gggcttggtt .gatcttcctg caaaaggcac gcccgtaac ctgcagtg 10800
 actgcgacgg gcagctgac gtgctggata gaaataacaa agaatgcacg gttgctcagg 10860
 ctctaggcaa cggggataaa tttagggcca cagacaagcg tgtttagat tctctccgcg 10920
 ccatttggtc tgatctagaa gggtcgagct ctccgctccc caaggtcga cacaacttgg 10980
 gattttattt ctacactgat ttaacacagt ttgctaaact ccagtagaa cttgcacctc 11040
 actggcccggt ggtgtcaacc cagaacaatg aaaagtggcc ggatcggctg gttgccagcc 11100
 ttgcacctat ccataaatac agccgcgctg gcatcggtgc cggctatatg gtgggccctt 11160
 cgggtgttct aggcactcct ggggtcgtgt catactatct cacaaaattt gttaagggcg 11220
 gggctcaagt gcttccggag acggttttca gcaccggccg aattgaggta gactgccggg 11280
 aatatcttga tgatcgggag cgagaagttg ctgcgtccct ccacacggt ttcatggcg 11340
 acgtcaaagg cactaccgtt ggaggatgtc atcatgtcac ctccagatac ctccgcgcg 11400
 tccttcccaa ggaatcagtt gcggtagtcg gggtttcaag ccccgzaaa gccgcgaag 11460
 cattgtgcac actgacagat gtgtacctc cagatcttga agcctatctc caccggaga 11520
 ccagtccaa gtgctggaaa atgatgttg acttcaaaga agttcgacta atggtctgga 11580
 aagacaaaac agcctatttc caacttgaag gtcgctattt cacctggtat cagcttgcca 11640
 gctatgcctc gtacatccgt gttcccgta actctacggt gtacttgac ccctgcatgg 11700
 gccccgcct ttgcaacagg agagtcgtc ggtccacca ctggggggct gacctcgcg 11760
 tcacctta tgattacggc gctaaaatta tcctgtctag cgcgtaccat ggtgaaatgc 11820
 cccccgata caaattctg gcgtgcgcg agttctcgtt ggatgacca gttaagtaca 11880
 aacatacctg ggggtttgaa tcggatacag cgtatctgta tgagttcacc ggaaacggtg 11940
 aggactggga ggattacaat gatgcgtttc gtgcgcgcca ggaagggaaa atttataagg 12000
 cactgccac cagcttgaag ttttatttcc cccggggccc tgtcattgaa ccaactttag 12060
 gcctgaattg aatgaaatg ggtccatgc aaagcctttt tgacaaaatt ggccaacttt 12120
 ttgtggatgc tttcacggag ttcttggtgt ccattgttga tatcattata tttttggcca 12180
 ttttgtttgg cttcaccatc gccggttggc tgggtgtctt ttgcatcaga ttggtttgct 12240
 ccgcgatact ccgtacgcgc cctgccattc actctgagca attacagaag atcttatgag 12300
 .gcctttcttt .cccagtgcga .agtggacatt .ccacctggg .gaactaaaca .tcctttgggg 12360
 atgctttggc accataagggt gtcaaccctg attgatgaaa tgggtgtcgcg tcgaatgtac 12420
 .cgcatcatgg aaaaagcagg gcaggctgcc tggaaacagg tggtgagcga ggctacgctg 12480
 tctcgcatta gtagtttggg tgtgggtggc cattttcagc atctagccgc cattgaagcc 12540
 gagacctgta aatattttggc ctcccgctg cccatgctac acaacctgcg catgacaggg 12600
 tcaaagttaa ccatagtgtg taatagcact ttgaatcagg tgtttgctat tttccaacc 12660

95
 97 98

LISTADO DE SECUENCIAS

cctggttccc ggccaaagct tcatgatttt cagcaatggt taatagctgt acattcctcc 12720
 atattttcct ctgttgcagc ttcttgtact ctttttgttg tgctgtggtt gcgggttcca 12780
 atactacgta ctgttttttg tttccgctgg ttaggggcaa tttttcttc gaactcacag 12840
 tgaattacac ggtgtgtcca ccttgctca cccggcaagc agccacagag atctacgaac 12900
 ccggtaggtc tctttggtgc aggataggt atgaccgatg tggggaggac gatcatgacg 12960
 agctagggtt tatgataccg cctggcctct ccagcgaagg ccacttgact ggtgtttacg 13020
 cctggttggc gttcttgttc ttcagctaca cggcccagtt ccatcccag atattcggga 13080
 tagggaatgt gagtcgagtt tatgttgaca tcaaactca actcatctgc gccgaacatg 13140
 acgggcagaa caccaccttg cctcgtcatg .acaacatttc agccgtgttt cagacctatt 13200
 accaactca agtcgacggc ggcaattggt ttcacctaga atggcttcgt cccttctttt 13260
 cctcgtggtt ggttttaaat gtctcttgggt ttctcaggcg ttcgcctgca aaccatgttt 13320
 cagttcgagt cttgcagata ttaagaccaa caccaccgca gcggeaagct ttgctgtcct 13380
 ccaagacatc agttgcctta ggcacgcga ctcggcctct gaggcgattc gcaaaatccc 13440
 tcagtgccgt acggcgatag ggacacctgt gtatgttacc atcacagcca atgtgacaga 13500
 tgagaattat ttacattcct ctgatctcct catgctttct tcttgccttt tctatgcttc 13560
 tgagatgagt gaaaagggat ttaagggtgt atttggcaat gtgtcaggca tcgtggctgt 13620
 gtgtgtcaat ttaccagct acgtccaaca tgtcaaggag tttaaccaac gctccctggt 13680
 ggtcgaccat gtgcggttgc tccatttcat gacacctgag accatgaggt gggcaactgt 13740
 tttagcctgt ctttttgcca ttctgttggc aatttgaatg ttttaagtatg ttggagaaat 13800
 gcttgaccgc gggctgttgc tcgcgattgc tttcttgtg gtgtatcgtg ccgttctgtt 13860
 ttgctgtgct cgccaacgcc agcaacgaca gcagctccca tctacagctg atttacaact 13920
 tgacgctatg tgagctgaat ggcacagatt ggctagctaa caaatttgat tgggcagtgg 13980
 agagttttgt catctttccc gttttgactc acattgtctc ctatggtgcc ctactacca 14040
 gccatttctt tgacacagtc gctttagtca ctgtgtctac cgccgggttt gttcacgggc 14100
 ggtatgtcct aagtagcatc tacgcggtct gtgccctggc tgcgttgact tgcttcgtca 14160
 ttaggtttgc aaagaattgc atgtcctggc gctacgcgtg taccagatat accaactttc 14220
 ttctggacac taagggcaga ctctatcgtt ggcggtcgcc tgtcatcata gagaaaagg 14280
 gcaaagttga ggtcgaaggc catctgatcg acctcaaaag agttgtgctt gatggttccg 14340
 tggcaacccc tataaccaga gtttcagcgg aacaatgggg tcgtccttag atgacttctg 14400
 tcatgatagc acggtccac aaaagggtgt tttggcgttt tctattacct acacgccagt 14460
 gatgatatat gccctaaagg tgagtcgcgg ccgactgcta gggcttctgc accttttgat 14520

LISTADO DE SECUENCIAS

cccgtgaca ctgtccctga aggcaactgc tggaggagct tgtttgactt gcttccactg 840
gaagttcaga acaaagaaat tcgcatgct aaccaatttg gctaccagac caagcatggt 900
gtctctggca agtacctaca gcggaggctg caagttaat 939

<210> 3
<211> 957
<212> DNA

/ <213> VIRUS DEL SINDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO.

<400> 3
aatggtctcc gagcagtaac tgacctaac ggacctatcg tcgtacagta cttctccgtt 60
aaggagagtt ggatccgcca ttgaaactg gcgggagaac ccagctactc tgggtttgag 120
gacctctca gaataagggt tgagcctaac acgtcgccat tggctgacaa ggaagaaaaa 180
attttccggt ttggcagtc caagtggtag ggcgctggaa agagagcaag aaaagcacgc 240
tcttgtcga ctgtacagt cgtggccgc gctttgtccg ttcgtgaaac ccggcaggcc 300
aaggagcacg aggttgccgg cgccaacaag gctgagcacc tcaaacacta ctccccgcct 360
gccgaaggga attgtggttg gcactgcatt tccgccatcg ccaaccggat ggtgaattcc 420
aaatttgaaa ccacccttcc cgaaagagt agacctccag atgactgggc tactgacgag 480
gatcttgtga atgccatcca aatcctcaga ctccctgcgg ccttagacag gaacggtgct 540
tgtactagcg ccaagtacgt acttaagctg gaaggtagc attggactgt cactgtgacc 600
cctgggatgt ccccttcttt gctccctctt gaatgtgttc agggctgttg tgggcacaag 660
ggcggctctg gttcccaga tgcagtcgag gtctccggat ttgaccctgc ctgccttgac 720
cggctggctg aggtgatgca cctgcctagc agtgcctatcc cagccgctct ggccgaaatg 780
tctggcgatt ccgacgttc ggttctccg gtcaccaccg tgtggactgt ttcgcagttc 840
tttggccgtc acagcggagg gaatcaccct gaccaagtgc gcttagggaa aattatcagc 900
ctttgtcagg tgattgagga ctgctgctgt tcccagaaca aaaccaaccg ggtcacc 957

<210> 4
<211> 976
<212> DNA

/ <213> VIRUS DEL SINDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO

<400> 4
cccggaggag gtcgcagcaa agattgacct gtacctccgt ggtgcaacaa atcttgaaga 60
atgcttggcc aggcctgaga aagcgcgcc gccacgcgta atcgacacct cctttgattg 120
ggatgttgtg ctccctgggg ttgaggcggc aaccagacg atcaagctgc ccagggtcaa 180
ccagtgtcgt gctctgggtc ctgttgtgac tcaaaagtcc ttggacaaca actcgggtccc 240
cctgaccgcc ttttcaactgg ctaactacta ctaccgtgcg caaggtagc aagttcgtca 300
ccgtgaaaga ctaaccgccg tgctctcaa gttggaaaag gttgttcgag aagaatatgg 360

48
49 700

LISTADO DE SECUENCIAS

cttcctgaat tgtgctttca ctttcgggta catgactttc gcgactttc agagtacaaa 14580
 taaggctcgc ctcactatgg gagcagtagt tgcactcctt tggggggtgt actcagccat 14640
 agaaacctgg aaattcatca cctccagatg ccgtttgtgc ttgctaggcc gcaagtacat 14700
 tctggccccct gccaccacg ttgaaagtgc cgcacggttt catccgattg cggcaaatga 14760
 taaccacgca tttgtcgtcc ggcgtcccgg ctccactacg gtcaacggca cattgggtgcc 14820
 cgggttaaaa agcctcgtgt tgggtggcag aaaagctgtt aaacagggag tggtaaacct 14880
 tgtcaaatat gccaaataac aacggcaagc agcagaagag aaagaagggg gatggccagc 14940
 cagtcaatca gctgtgccag atgctgggta agatcatcgc tcagcaaac cagtccagag 15000
 gcaagggacc gggaaagaaa aataagaaga aaaacccgga gaagcccat tttcctctag 15060
 cgactgaaga tgatgtcaga catcacttta cccctagtga gcggcaattg tgtctgtcgt 15120
 caatccagac cgcctttaat caaggcgctg ggacttgac cctgtcagat tcagggagga 15180
 taagtacac tgtggagttt agtttgccta cgcatac tgtgcgctg atccgcgtca 15240
 cagcatcac ctcagcatga tgggtggca ttcttgaggc atctcagtgt ttgaattgga 15300
 agaatgtgtg gtgaatggca ctgattgaca ttgtgcctct aagtcaccta ttcaattagg 15360
 gcgaccgtgt gggggtgaga ttaattggc gagaaccatg cggccgaaat t 15411

<210> 2

<211> 939

<212> DNA

<213> VIRUS DEL SINDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO

<400> 2

atgtctggga tacttgatcg gtgcacgtgt accccaatg ccagggtgtt tatggcggag 60
 ggccaagtct actgcacacg atgcctcagt gcacggctc tcttccccct gaacctccaa 120
 gtttctgagc tcggggtgct aggcctattc tacaggcccc aagagccact ccggtggacg 180
 ttgccacgtg cattccccac tgttgagtgc tccccgccg gggcctgctg gctttctgca 240
 atctttccaa tcgcacgaat gaccagtga aacctgaact tccaacaaag aatggtacgg 300
 gtcgcagctg agctttacag agccggccag ctcaccctg cagtcttgaa ggctctacaa 360
 gtttatgaac ggggttgccg ctggtacccc attgttgga ctgtccctgg agtggccgtt 420
 ttccccaatt ccctacatgt gagtataaa ctttccccg gagcaactca cgtgttgacc 480
 aacctgccgc tcccgagag acccaagcct gaagactttt gcccctttga gtgtgctatg 540
 gctactgtct atgacattgg tcatgacgcc gtcagtgtat tggccgaaag gaaagtctcc 600
 tgggcccctc gtggcgggga tgaagtgaat tttgaagctg tccccgggga gttgaagttg 660
 attgcgaacc ggctccgcac ctcttcccg cccaccaca cagtggacat gtctaagttc 720
 gccttcacag cccctgggtg tgggttttct atgcgggtcg aacgccaaca cggctgcctt 780

LISTADO DE SECUENCIAS

gctcatgcca accgagcctg gtccacggcc cacactgcca cgcgggctcg acgaactcaa 420
 agaccagatg gaggaggact tgctgaaact ggctaacgcc cagacgactt cggacatgat 480
 ggccctgggca gtcgagcagg ttgacctaaa aacttgggtc aagaactacc cgcggtggac 540
 accaccaccc cctccgcca aagttcagcc tcgaaaaacg aagcctgtca agagcttgcc 600
 ggagagaaag cctgtccccg ccccgcgag gaaggttggg tccgattgtg gcagccccgt 660
 ttcattaggc ggcgatgtcc ctaacagttg ggaagatttg gctgttagta gcccctttga 720
 tctcccgacc ccacctgagc cggcaacacc ttcaagttag ctggtgattg tgtcctcacc 780
 gcaatgcatt ttcaggcccg cgacaccctt gagttagccg gctccaattc ccgcacctcg 840
 cggaactgtg tctcgaccgg tgacaccctt gagttagccg atccctgtgc ccgcaccgag 900
 gcgtaagttt cagcaggtga aaagattgag ttcggcgggc gcaatccac cgtaccagga 960
 cgagcccctg gatttg 976

<210> 5

<211> 954

<212> DNA

<213> VIRUS DEL SINDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO.

<400> 5

caggacgagc ccctggattt gtctgcttcc tcacagactg aatatgaggc ctctccccc 60
 gcaccgccc agagcgggg cggttctggga gtagaggggc atgaagctga ggaaaccctg 120
 agtgaaatct cggacatgtc gggtaacatt aaacctgcgt ccgtgtcatt aagcagctcc 180
 ttgtccagcg tgagaatcac acgccccaaa tactcagctc aagccatcat cgactcgggc 240
 gggccctgca gtgggcatct ccaagaggta aaggaaacat gccttagtgt catgcgcgag 300
 gcatgtgatg cgactaagct tgatgaacct gctacgcagg aatggcttcc tcgcatgtgg 360
 gatcgggtgg acatgctgac ttggcgcaac acgtctgttt accaggcgaat ttgcacctta 420
 gatggcaggt taaagttcct cccaaaaatg atactcgaga caccgcccgc ctatccgtgt 480
 gagtttgtga tgatgcctca cacgcctgca cttccgtag gtgcggagag cgaccttacc 540
 attggctcag ttgctactga agatgttcca cgcctcctcg agaaaataga aaatgtcggc 600
 gagatggcca accaggggacc cttggccttc tccgaggata aaccggtaga tgaccaactt 660
 gtcaacgacc cccggatatt gtcgaggagg cctgacgaga gcacatcagc ttcgtccgca 720
 ggcacaggtg gcgccggctc ttttaccgat ttgccgctt cagatggcgc ggatgcggac 780
 gggggggggc cgtttcggac ggtaaaaaga aaagctgaaa ggctctttga ccaactgagc 840
 cgtcaggttt ttgacctcgt ctccatctc cctgttttct tctcacgct tttctaccct 900
 ggcgggtggtt attctccggg tgattgggtt ttgcagctt ttactctatt gtgc 954

LISTADO DE SECUENCIAS

<210> 6
 <211> 939
 <212> DNA
 <213> VIRUS DEL SINDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO.

<400> 6
 ttgtgcctct ttttatgtta cagttaccca gcctttggta ttgctcccct cttgggtgtg 60
 ttttctgggt cttctcggcg cgttcgaatg ggggtttttg gctgctgggt ggcttttgct 120
 gttggtctgt tcaagcctgt gtccgaccca gtcggcgctg cttgtgagtt tgactcgcca 180
 gagtgtagaa acatccttca ttcttttgag cttctcaaac cttgggaccc tgttcgcagc 240
 cttgttgtgg gccccgtcgg tctcggctct gccattcttg gcagggttact gggcggggca 300
 cgctgcatct ggcacttttt gcttaggctt ggcattgttg cagactgtat cttggctgga 360
 gcttacgtgc tttctcaagg taggtgtaaa aagtgtggg gatcttgtat aagaactgct 420
 cctaattagg tcgcttttaa cgtgtttcct ttcacacgtg cgaccaggtc gtcacttatc 480
 gacctgtgcg atcgggttttg tgcgccaaaa ggaatggacc ccatttttct cgccactggg 540
 tggcgcgggg gctggggccgg ccgaagcccc attgagcaac cctctgaaaa acccatcgcg 600
 tttgccaat tggatgaaaa gaagattacg gctaggactg tggtcgcccc gccttatgac 660
 cccaaccaag ccgtaaagtg cttgcgggta ttgcagtcgg gtggggcgat ggtggctaag 720
 gcggtcccaa aagtgggtcaa gggttccgct gttccattcc gagccccctt ctttccact 780
 ggagtgaag ttgaccctga ttgcagggtc gtggttgacc ctgacacttt cactgcagct 840
 ctccggtctg gctactccac cacaacctc gtccttggtg taggggactt tgcccagctg 900
 aatggattaa aaatcaggca aatttccaag ccttcaggg 939

<210> 7
 <211> 957
 <212> DNA
 <213> VIRUS DEL SINDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO

<400> 7
 ggaggccac atctcatggc tgccctgcat gttgcctgct cgatggctct gcacatgctt 60
 gctgggattt atgtgactgc ggtgggttct tgcggcaccg gcaccaacga cccgtgggtc 120
 gctaaccgt ttgccgtccc tggtacgga cctggctctc tctgcacgtc caggttgtgc 180
 atttcccaac acggccttac cctgcccttg acagcacttg tggcgggatt cggatttcaa 240
 gaaattgcct tggtcgtttt gatttttgtt tccatcggag gcattggctca taggttgagc 300
 tgtaaggctg acatgctgtg tgttttgctt gcaattgcca gctatgtttg ggtacctctt 360
 acctggttgc tttgtgtgtt tccttgctgg ttgcgctgtt tttctttgca cccctcacc 420
 atcctatggt tgggtgtttt cttgatttct gtgaatatgc cttcaggaat cttggccatg 480
 gtgttgttgg tttctctttg gcttcttggg cgttatacta atgttgctgg ccttgtcacc 540

LISTADO DE SECUENCIAS

ccctacgaca ttcattcatta caccagtggc cctcgcggtg ttgccgccc ttgctaccgca 600
 ccagatggga cctacttggc cgctgtccgc cgcgtgcgt tgactggccg caccatgctg 660
 tttaccccgt cccagcttgg gtctcttctt gagggtgctt tcagaactcg aaagccctca 720
 ctgaacaccg tcaatgtgat cgggtcctcc atgggctctg gcgggggtgtt taccatcgac 780
 gggaaagtca agtgcgtaac tpcgcacat gtccttacgg gcaattcagc tcgggtttcc 840
 ggggtcggct tcaatcaaatt gcttgacttt gacgtaaagg gagatttcgc tatagctgat 900
 tgccccgaatt ggcaaggggc tgcccccaag acccaattct gcacggatgg atggact 957

<210> 8

<211> 957

<212> DNA

<213> VIRUS DEL SINDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO.

<400> 8

tgacggatg gatggactgg ccgtgcctat tggctaacat cctctggcgt cgaacccggc 60
 gtcattggaa aaggattcgc cttctgcttc accgcatgtg gcgattccgg gtccccagtg 120
 atcaccgagg ccggtgagct tgtcggcggt cacacgggat cgaataaaca agggggggggc 180
 attgttacgc gccctcagg ccagttttgt aatgtggcac ccatcaagct aagcgaatta 240
 agtgaattct ttgctgggccc taagggtccc ctcggtgatg tgaagggtcgg cagccacata 300
 attaaagaca taagcgaggt gccttcagat ctttgtgcct tgcttgctgc caaacctgaa 360
 ctggaaggag gcctctccac cgtccaactt ctttgtgtgt tttttctcct gtggagaatg 420
 atgggacatg cctggacgcc cttggttgct gtgagtttct ttattttgaa tgaggttctc 480
 ccagccgtcc tgggtccggag tgttttctcc tttggaatgt ttgtgctatc ctggctcacg 540
 ccatggtctg cgcaagtct gatgatcagg cttctgacag cagctcttaa caggaacaga 600
 tggtcacttg cctttttcag cctcggtgca gtgaccggtt ttgtcgcaga tcttgcgccc 660
 actcaggggc atccgttgca ggcagtgatg aatttgagca cctatgcatt cctgcctcgg 720
 atgatggttg tgacctcacc agtcccagtg atcacgtgtg gtgtcgtgca cctacttgcc 780
 atcattttgt acttgtttaa gtaccgtggc ccgcaccata tccttgttgg cgatggagtg 840
 ttctctgcgg ctttcttctt gagatacttt gccgagggaa agttgagga aggggtgtcg 900
 caatcctgcg gaatgaatca tgagtctctg actggtgccc tcgctatgag actcaat 957

<210> 9

<211> 852

<212> DNA

<213> VIRUS DEL SINDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO.

<400> 9

atgagactca atgacgagga cttggatttc cttatgaaat ggactgattt taagtgtttt 60
 gtttctgcgt ccaacatgag gaatgcagcg ggtcaattta tcgaggctgc ctatgctaaa 120

LISTADO DE SECUENCIAS

gcacttagag tagaactggc ccagttggtg caggttgata aagttcgagg tactttggcc 180
 aaacttgaag cttttgctga taccgtggca cctcaactct cgcccgggtga cattgttgtc 240
 gctctcggcc acacgcctgt tggcagtatc ttcgacctaa aggttggttag caccaagcat 300
 accctccaag ccattgagac cagagtcctt gctgggtcca aaatgaccgt ggcgcgcgtc 360
 gtcgacccga ccccccacgcc cccacccgca cccgtgccca tccccctccc accgaaagtt 420
 ctggagaatg gcccacacgc ttggggggat gaggaccgtt tgaataagaa gaagaggcgc 480
 aggatggaag ccctcggcat ctatgttatg ggcgggaaaa agtaccagaa attttgggac 540
 aagaattccg gtgatgtgtt ttatgaggag gtccataata acacagatga gtgggagtgt 600
 ctgagagttg gcgacctgc cgactttgac cctgagaagg gaactctgtg tggacatgtc 660
 accattgaaa acaaggctta ccatgtttac acctcccat ctggtaagaa gttcttggtc 720
 cccgtcaacc cagagaatgg aagagttcaa tgggaagctg caaagctttc cgtggagcag 780
 gccctaggta tgatgaatgt cgacggcgaa ctgactgcc aagaactgga gaaactgaaa 840
 agaataattg ac 852

<210> 10

<211> 917

<212> DNA

<213> VIRUS DEL SINDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PROCINO.

<400> 10

gcttggttgt tactgaaaca gcggtaaaaa tagtcaaatt tcacaaccgg accttcaccc 60
 tgggacctgt gaatttaaaa gtggccagtg aggttgagct aaaagacgcg gttgagcaca 120
 accaacaccc ggttgcgaga ccgatcgatg gtggagtgtg gctcctgcgt tccgcggttc 180
 cttcgcttat agacgtcttg atctccggtg ctgatgcac tcccaagtta cttgcccatc 240
 acggggccggg aaacactggg atcgatggca cgctctggga ttttgagtcc gaagccacta 300
 aagaggaagt cgcactcagt gcgcaaataa tacaggcttg tgacattagg cgcggcgacg 360
 ctctgaaat tggctctccct tacaagctgt accctgttag gggtaaccct gagcgggtga 420
 aaggagtct gcagaataca aggtttggag acatacctta caaaaccccc agtgacactg 480
 gaagcccagt gcacgcggct gcctgcctta cgcaccaacgc cactccggtg actgatgggc 540
 gctccgtctt ggccacgacc atgccccccg ggtttgagtt atatgtaccg accataccag 600
 cgtctgtcct tgattacctt gactctaggc ctgactgcc taaacagctg acagagcacg 660
 gctgcgaaga tgccgcactg aaagacctct ctaaatatga cttgtccacc caaggctttg 720
 tttacctgg agttcttcgc cttgtgcgga aatacctgtt tgcccatgta ggtaagtgcc 780
 caccggttca tcggccttct acttaccctg ctaagaattc tatggctgga ataaatggga 840
 acaggttccc aaccaaggac attcagagcg tccctgaaat cgacgttctg tgcgcacagg 900

LISTADO DE SECUENCIAS

ctgtgcgaga aaactgg

917

<210> 11
 <211> 972
 <212> DNA

/ <213> VIRUS DEL SINDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO

<400> 11
 gctgtgcgag aaaactggca aactgtcacc ccttgtactc ttaagaaaca gtattgcggg 60
 aagaagaaga ctaggaccat actcggcacc aataacttca tcgcactagc ccaccgagca 120
 gtgttgagtgt gtgttaccca gggcttcattg aaaaaggcgt ttaactcggc catcgccctc 180
 ggaaagaaca agtttaagga gctacagact ccggctcctgg gcagggtgcct tgaagctgat 240
 ctgcgcatcct gcgactgatc cagcctgca attgtccgct ggtttgccgc caaccttctt 300
 tatgaacttg cctgtgctga agagcatcta ccgtcgtacg tgcgaactg ctgccacgac 360
 ttactgggtca cgcagtcagg cgcagtgact aagagagggtg gcctgtcgtc tggcgacccg 420
 atcacctctg tgtctaacac catttatagt ttggtgatct atgcacagca tatggtgctt 480
 agttacttca aaagtgggtca ccccatggc cttctgttct tacaagacca gctaaagtgt 540
 gaggacatgc tcaagggtca acccctgacg gtctattcgg acgacctcgt gctgtatgcc 600
 gagtctccca ccatgccaaa ctatcactgg tgggttgaac atctgaattt gatgctgggg 660
 ttccagacgg acccaaagaa gacagcaata acagactcgc catcatttct aggctgtaga 720
 ataataaatg ggcgccagct agtccccaac cgtgacagga tcctcgccgc cctcgccctat 780
 cacatgaagg cgagtaatgt ttctgaatac tatgcctcag cggctgcaat actcatggac 840
 agctgtgctt gtttgaggta tgatcctgaa tggtttgaag aactttagt tggaaatagcg 900
 cagtgcgccc gcaaggacgg ctacagcttt cccggcacgc cgttcttcat gtccatgtgg 960
 gaaaaactca gg 972

<210> 12
 <211> 966
 <212> DNA

/ <213> VIRUS DEL SINDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO

<400> 12
 atgtgggaaa aactcaggtc caattatgag ggaagaagt cgagagtgtg cgggtactgc 60
 ggggccccgg ccccgtagc tactgcctgt ggcctcgacg tctgcattta ccacaccac 120
 ttccaccagc attgtccagt cacaatctgg tgtggccatc cagcgggttc tggttcttgt 180
 agtgagtga aatcccctgt agggaaaggc acaagccctt tagacgaggt gctggaacaa 240
 gtcccgtata agccccacg gaccgttatc atgcatgtgg agcagggtct cccccctt 300
 gatccaggta gataccaac tcgcccgga ttagtctctg tcaggcgtgg aattagggga 360

105
 105

105
106

LISTADO DE SECUENCIAS

aatgaagttg gactaccaga cggtgattat gctagcaccg ccttgctccc tacctgcaaa	420
gagatcaaca tggtcgctgt cgcttccaat gtattgcgca gcaggttcat catcggccca	480
cccgggtgctg ggaaaacata ctggctcctt caacaggtcc aggatggtga tgttatttac	540
acaccaactc accagaccat gcttgacatg attagggctt tggggacgtg ccggttcaac	600
gtcccggcag gcacaacgct gcaattcccc gtcccctccc gcacgggtcc gtgggttcgc	660
atcctagccg gcggttggtg tcctggcaag aattccttcc tagatgaagc agcgtattgc	720
aatcaccttg atgttttgag gcttcttagt aaaactaccc tcacctgtct aggagacttc	780
aagcaactcc acccagtggtg ttttgattct cattgctatg tttttgacat catgcctcaa	840
actcaactga agaccatctg gaggtttgga cagaatatct gtgatgccat tcagccagat	900
tacagggaca aactcatgtc catggtcaac acaaccctg tgacctacgt ggaaaaacct	960
gtcagg	966

<210> 13
<211> 783
<212> DNA
<213>

VIRUS DEL SINDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO

<400> 13	
gtggaaaaac ctgtcaggta tgggcaggtc ctcaccccct accacaggga ccgagaggac	60
gacgccatca ctattgactc cagtcaaggc gccacattcg atgtggttac attgcatttg	120
cccactaaag attcactcaa caggcaaaga gcccttggtg ctatcaccag ggcaagacac	180
gctatctttg tgtatgacct acacaggcag ctgcagggtc tgtttgatct tcctgcaaaa	240
ggcacgcccc tcaacctcgc agtgcactgc gacgggcagc tgatcgtgct ggatagaaat	300
aacaaagaat gcacgggtgc tcaggctcta ggcaacgggg ataaatttag ggccacagac	360
aagcgtgttg tagattctct ccgcgccatt tgtgctgac tagaagggtc gagctctccg	420
ctccccagg tcgcacacaa cttgggattt tttttctcac ctgatttaac acagtttgct	480
aaactcccag tagaacttgc acctcactgg cccgtggtgt caaccagaa caatgaaaag	540
tggccggatc ggctgggtgc cagccttcgc cctatccata aatacagccg gcggtgcac	600
ggtgccggct atatggtggg cccttcggtg tttctaggca ctctgggggt cgtgtcatac	660
tatctcacia aatttggtta gggcggggct caagtgttc cggagacggt tttcagcacc	720
ggccgaattg aggtagactg ccgggaatat cttgatgac gggagcgaga agttgctgcg	780
tcc	783

<210> 14
<211> 774
<212> DNA
<213>

VIRUS DEL SINDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO.

LISTADO DE SECUENCIAS

<400> 14
gagcgagaag ttgctgctgc cctccacac ggtttcattg gcgacgtcaa aggcactacc 60
gttggaggat gtcacatgt cactccaga tacctccgc gcgtccttcc caaggaatca 120
gttgcggtag tcgggggttc aagccccgga aaagccgcga aagcattgtg cactgtaca 180
gatgtgtacc tccagatct tgaagcctat ctccaccgg agaccagtc caagtgtgg 240
aaaatgatgt tggacttcaa agaagttcga ctaatggtct ggaaagaca aacagcctat 300
ttccaacttg aaggtcgcta ttccacctg tatcagcttg ccagctatgc ctgtacatc 360
cgtgttcccg tcaactctac ggtgtacttg gaccttgca tgggccccgc cttttgcaac 420
aggagagtcg tcgggtccac ccactggggg gctgacctg cggtcacccc ttatgattac 480
ggcgctaaaa ttatcctgtc tagcgctac catggtgaaa tgcccccg atacaaaatt 540
ctggcgtgcg cggagtcttc gttggatgac ccagttaagt acaaacata ctgggggttt 600
gaatcggata cagcgtatct gtatgagtc accggaaacg gtgaggactg ggaggattac 660
aatgatgctt ttcgtgcgcg ccaggaaggg aaaatttata aggcactgc caccagcttg 720
aagttttatt ttccccggg ccctgtcatt gaaccaact taggcctgaa ttga 774

100 107 101

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) 60/581,350 (32) 17/06/2004 (33) US 11/154,817 18/06/2005 US		(51) Int Cl: A61K 39/12 (71) Solicitante(s) BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC. (72) Inventor(es) ERIC M. VAUGHN RICHARD STAMMER (74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 17/01/2006 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 17/06/2005 No. de solicitud PCT/US2005/021873		(87) Publicación internacional Fecha: 05/01/2006 N° publicación: WO 2006/002193 A2	
(54) Título: VACUNAS DE SUBUNIDADES PRRSV			

Reivindicación(es):

- Una vacuna capaz de inducir una respuesta inmune contra el PRRSV comprende:

una primera porción de ADN de ORF1 del PRRSV, dicha porción tiene por lo menos 21 nucleótidos contiguos de dicho ADN del ORF1 del PRRSV; y un portador farmacológicamente adecuado.
- La vacuna de la reivindicación 1, dicha porción tiene por lo menos 150 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 85% de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID Nos. 1-14, y las combinaciones de ellas.
- La vacuna de la reivindicación 2, dicha porción es seleccionada del grupo que consiste de secuencias que tienen por lo menos 85% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID Nos. 1-6, 9, 10, y las combinaciones de ellas.

- La vacuna de la reivindicación 1, comprende adicionalmente una porción de ADN del PRRSV seleccionada del grupo que consiste de secuencias de por lo menos 21 nucleótidos contiguos de un ORF PRRSV diferente al ORF1, por lo menos 21 nucleótidos contiguos del ORF1 PRRSV, y las combinaciones de ellas.
- La vacuna de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente otra composición efectiva para inducir una respuesta inmune contra la infección PRRSV.
- La vacuna de la reivindicación 1, dicho ORF1 del PRRSV es derivado de una cepa virulenta del PRRSV.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 1,778
FECHA : ENERO 10 DE 2007

109 108 110

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-003384-00000-0000
Fec: 2007-01-15 10:58:14 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tm: 11 PATENTEIYII
Eve: 378 FASENACIONALI

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	49368288	10/01/2007	57,744,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO 15149 841 003 5

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION 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 _____

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

///

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

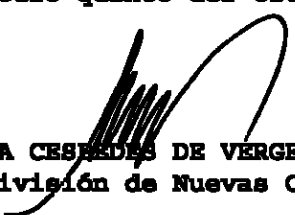
REFERENCIA	Radicación No.	07 3384
	Solicitud internacional	PCT/US2005/021973
	Fecha inicio fase nacional	17/01/2007
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	1966

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. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
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. (Art. 26-k) Decisión 486.

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 Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 09 FEB 2007
adpa10

20
112

RECAUDO NACIONAL No. 1560889				13	
Cta. Rec. 10. T. H. de Pagos		CU 18	MES 12	ANO 96	CTA. CTE. No. 050000249
NOMBRE DEL DEPOSITANTE Ezequiel Rodriguez		CIBERCA 181226			UBICACION DE LA CUENTA
DIRECCION DEL DEPOSITANTE Calle 96 9-71		848688827-480			UBICACION DE LA CUENTA
TELEFONO 356011	CODIGO DEL DEPOSITANTE 5160242		CIBERCA 181226		
NOMBRE DEL BANCO	C.A. DE CREDITO		VALOR		
RELACION DE PAGOS					
VAL FACTIVA		VALOR			
Indigo 5005		29.480=			
FIRMA: 18-11-127 H.F. L.G.					ESTO RECIBO NO ES VALIDO SIN LA ANOTACION DE LA PAGADURA ATRIBUIDA, EN SU DEFECTO SERA NECESARIO LA MARCA DEL PROTECTOR PARA LA FIRMA Y SELLO DEL CAJERO.
NOMBRE DEL DEPOSITANTE: EZEQUIEL RODRIGUEZ					
DIRECCION DEL DEPOSITANTE: CALLE 96 9-71					
TELEFONO: 356011					
CIBERCA 181226					DEPOSITANTE
CIBERCA 181226					
CIBERCA 181226					
CIBERCA 181226					