

VACUNAS DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS (VLP) CONTRA EL PARVOVIRUS CANINO (CPV) Y SUS USOS

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud invoca el beneficio de prioridad de USSN 62/234.196, presentada el 20 de septiembre, 2015, que se incorpora por completo en la presente a modo de referencia. De manera similar, todas las demás referencias citadas aquí se incorporan en su totalidad en la presente a modo de referencia.

INFORMACIÓN SOBRE EL LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] El Listado de secuencias asociado con esta solicitud se provee en formato de texto en lugar de una copia en papel, y como tal se incorpora en la descripción a modo de referencia. El nombre del archivo de texto que contiene al Listado de secuencias es MER 14-252P_ST25.txt. Es archivo de texto es de 82 KB; se creó el 13 de julio, 2015; y se presenta en formato electrónico a través de la red EFS, de manera concurrente con la presentación de la descripción.

CAMPO DE LA INVENCION

[0003] La presente invención se relaciona con el campo de la vacunología y, más particularmente, con el desafío de neutralizar los anticuerpos derivados por vía materna (MDA). Más particularmente, la invención se relaciona con neutralizar los MDA mediante la administración a animales, que incluyen perros, de una combinación de partículas tipo virus y virus vivos modificados (MLV), ya sea como una combinación simultánea, una administración sucesiva o según un régimen de administración de sensibilización-refuerzo. Aún más particularmente, la invención se relaciona

con composiciones para generar una inmunidad protectora contra el parvovirus (CPV) en perros y cachorros, ya sea si los CPV MDA están presentes, o no, en los perros y cachorros.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] El parvovirus canino (CPV) es primariamente un patógeno entérico que infecta a los perros, en especial a los perros jóvenes. Una infección por el parvovirus se caracteriza por diarrea aguda, fiebre y leucopenia en perros y cachorros de más de 4 a 5 semanas de vida, y en casos raros, por la enfermedad de miocardio en cachorros más jóvenes. El índice de mortalidad debido a la enfermedad en perros no vacunados es muy alto. Si bien existen varias vacunas contra el CPV, la presencia de anticuerpos derivados por vía materna (MDA) tiende a bloquear la capacidad de vacunas, por lo demás eficaces, para proporcionar una inmunidad protectora.

[0005] Los cachorros recién nacidos adquieren inmunidades pasivas contra enfermedades, tal como una infección por el CPV, cuando son amamantados por sus madres, en especial durante los primeros dos días de vida. Un cachorro que amamanta ingiere calostro con la primera leche producida y los (MDA) presentes en el calostro pasan al cachorro. En el caso de los perros—y muchos otros mamíferos—el nivel de inmunidad pasiva provista por el calostro disminuye gradualmente a medida que se catabolizan los MDA. Como tal, la edad a la cual un cachorro ya no está protegido por los MDA varía ampliamente, dependiendo de la ingesta de calostro por el cachorro, la cantidad de anticuerpos contenidos en el mismo y varios otros factores.

[0006] Un desafío particular con la vacunación de cachorros comprende administrar las vacunas de acuerdo con un marco de tiempo que les

proporcione protección que se superpone con la protección provista por los anticuerpos maternos y que comience a medida que vayan disminuyendo los anticuerpos maternos. Actualmente, los regímenes de vacunación para cachorros típicamente comienzan aproximadamente a las 6 semanas de vida y luego se administran refuerzos aproximadamente cada 3 semanas, por ejemplo a las 9, 12 y a veces 15 semanas. Sin embargo, para que este régimen proporcione una protección completa, la primera dosis de la vacuna debería generar inmediatamente una respuesta inmunológica protectora. Esta expectativa es completamente irreal debido, en parte, a la falta de madurez del sistema inmunológico del cachorro y al período de tiempo necesario para montar una respuesta inmunológica. Además, la situación se complica debido a que los MDA residuales, que pueden persistir hasta las seis semanas de vida aproximadamente, neutralizan las vacunas MLV. Actualmente, todas las vacunas contra el CPV disponible comercialmente son vacunas MLV.

[0007] Notablemente, aunque es posible que un cachorro con CPV MDA no responda a ninguna vacuna MLV CPV, aún puede ser infectado por una cepa de campo virulenta del CPV y desarrollar una parvovirus canina. Debido a la interferencia por los MDA, habitualmente no se desarrollará una protección completa hasta haber administrado todo el curso de vacunaciones. En consecuencia, la mortalidad basada en la edad debido a una infección por CPV alcanza su pico antes de completar los protocolos de vacunación. Por lo tanto, el desarrollo de una vacuna que pudiera inmunizar activamente a los cachorros después de la primera inyección—y en la presencia de MDA—constituye una de las necesidades incumplidas más importantes en la medicina de caninos.

[0008] Otro desafío en la medicina veterinaria es el tratamiento de

cáncer, por ejemplo, en perros. Hay muchas limitaciones en las herramientas existentes para las terapias de cáncer, en especial en los perros geriátricos. La administración de parvovirus oncolíticos para matar células cancerosas es muy promisorio como un tratamiento eficaz contra el cáncer (Rommelaere et al, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21: 185-195, 2010; y la Patente de los EE.UU. N°: 7.179.456 de Rommelaere et al, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia) y se podría aplicar a los caninos. Sin embargo, la existencia de anticuerpos contra parvovirus preexistentes (por ejemplo, como resultado de una vacunación) volvería ineficaz a este método, dado que el parvovirus sería neutralizado por los anticuerpos existentes. Además, hoy en día raramente se aplica la terapia genética en perros pero sería un método promisorio para el tratamiento de varios trastornos, si se pudieran identificar vectores de ácidos nucleicos adecuados. Por lo tanto, sería útil contar con métodos para neutralizar los anticuerpos existentes en otras aplicaciones además de la vacunación.

[0009] A la luz de todo lo anterior, existe la necesidad de vacunas con una seguridad mejorada y una buena eficacia, inclusive la capacidad para neutralizar los MDA, que incluyen vacunas capaces de ofrecer protección contra cepas heterólogas del CPV.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] La presente invención provee composiciones farmacéuticas que comprenden antígenos de partículas tipo virus (VLP) del CPV, vacunas de virus vivos modificados (MLV) del CPV, métodos de vacunación contra el CPV y conjuntos de elementos para usar con dichos métodos y composiciones.

[0011] Se proveen composiciones o vacunas que comprenden un

polipéptido antigénico del CPV y fragmentos y variantes del mismo. Los antígenos del CPV y fragmentos y variantes de los mismos tienen propiedades inmunogénicas y protectoras. Los antígenos del CPV se pueden producir mediante un vector de expresión de baculovirus en células de insecto, y se ensamblan en cápsides vacías del CPV o en VLP (partículas tipo virus) del CPV.

[0012] Los polipéptidos antigénicos y fragmentos y variantes de los mismos se pueden formular como vacunas con o sin virus vivos CPV modificados y/o composiciones farmacéuticas. Dichas vacunas o composiciones se pueden usar para vacunar a un animal y para proporcionar protección contra cepas homólogas y heterólogas del CPV.

[0013] Notablemente, los inventores han encontrado, de manera sorprendente e inesperada, que la administración de composiciones que comprenden tanto una MLV como una VLP (cada una de un antígeno correspondiente al mismo patógeno, pero que no necesariamente codifica o provee la misma porción o gen o subunidad del mismo), permite neutralizar los MDA para generar una inmunidad protectora contra un subsiguiente desafío virulento por dicho patógeno. Por lo tanto, en una forma de realización particular, la invención provee vacunas combinadas que comprenden tanto una MLV del CPV como una VLP del CPV, que generan una inmunidad protectora en cachorros ya sea si los cachorros tienen, o no, MDA contra el CPV en la circulación.

[0014] En otra forma de realización, la invención provee vacunas combinadas que comprenden tanto MLV como VLP correspondientes a otros patógenos, donde la interferencia de los MDA es un problema. Por ejemplo, los

bovinos, porcinos, felinos, caprinos, ovinos, equinos jóvenes y otros animales jóvenes tienen MDA en la circulación contra varios patógenos. En cada caso, la presencia de estos MDA puede interferir con la eficacia de las vacunas. Ahora que se cuenta con esta divulgación, los inventores prevén que la administración de una combinación de ambas MLV + VLP permitirá neutralizar los MDA independientemente del patógeno. Los patógenos pueden incluir, pero en un sentido no taxativo: el virus de la enfermedad de la fiebre aftosa (FMDV), el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV), el virus del moquillo canino (CDV), el virus de la panleucopenia felina FPL y el virus de la influenza equina (EIV). El especialista podrá apreciar que este abordaje, que provee MLV + VLP, se puede aplicar en cualquier caso en el cual la interferencia por MDA constituye un desafío.

[0015] También se proveen conjuntos de elementos que comprenden por lo menos un polipéptido antigénico o un fragmento o variante del mismo, e instrucciones para su uso.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[0016] La siguiente descripción detallada, que se ofrece a modo de ejemplo, y que no pretende limitar la invención tan solo a las realizaciones específicas descritas, se podrá comprender mejor con las figuras adjuntas, en donde:

[0017] La Figura 1 representa una tabla que resume las secuencias de ADN y de proteínas;

[0018] La Figura 2 representa el mapa de plásmido del pMEB072;

[0019] La Figura 3 representa el mapa de plásmido del pMEB073;

[0020] La Figura 4 es un micrografía electrónica de las VLP del CPV,

donde se muestra la forma y morfología correctas para viriones tipo parvovirus;

[0021] La Figura 5 es una transferencia Western que muestra los niveles de las VLP del CPV y datos adjuntos;

[0022] La Figura 6 es una transferencia Western que muestra los niveles de las VLP del CPV y datos adjuntos;

[0023] La Figura 7 es un gráfico donde se muestran los títulos del CPV determinados por ELISA después de la vacunación;

[0024] La Figura 8 es un gráfico donde se muestran los títulos del CPV determinados por ELISA después de la vacunación con las cepas Souriou y Bari (dosis baja, sin adyuvante) o con VLP del CPV producidas por el pMEB072. El comienzo es más rápido en el grupo que recibe VLP;

[0025] La Figura 9 es un gráfico donde se muestran los títulos del CPV determinados por ELISA después de la vacunación con las cepas Souriou y Bari (dosis intermedia, con adyuvante) o con VLP del CPV producidas por pMEB073 (con $\text{Al}(\text{OH})_3$ + saponina). El comienzo es aún más rápido en el grupo que recibe VLP;

[0026] La Figura 10 es un gráfico donde se muestran los títulos del CPV determinados por ELISA después de la vacunación con las cepas Souriou y Bari (dosis alta) o con VLP del CPV producidas por pMEB073 (con $\text{Al}(\text{OH})_3$ + saponina). El comienzo es rápido con los tres grupos;

[0027] La Figura 11 es un alineamiento con ClustalW de las SEQ ID N°: 1, 3, 4 y 6;

[0028] La Figura 12 es un gráfico donde se muestran los títulos de anticuerpo anti-CPV individuales (IHA) según el tratamiento (MLV o MLV + VLP el D0) y el día. Cada línea corresponde a un individuo, y el tamaño de los

puntos corresponde al número de valores a la combinación indicada de día y título. Solamente se muestran los datos de perros con un título IHA D0 ≥ 40 ;

[0029] La Figura 13 es un gráfico donde se muestran los títulos de anticuerpo anti-CPV promedio (IHA) según el tratamiento (MLV o MLV + VLP el D0) y el día. Los recuadros representan la mediana, los percentiles 25 y 75, y los extremos de los bigotes representan valores dentro de 1,5 veces el rango entre cuartiles; cada símbolo representa un valor;

[0030] La Figura 14 es un gráfico donde se muestran los títulos de anticuerpo anti-CPV promedio (determinados mediante un ELISA, $\log_{10} DO_{50}$) según el día de posvacunación y el grupo (Gr A: VLP SC 500 μ l; Gr D: VLP oral; Gr E: Ad5 CPV 8,64 $\log_{10}$; Gr G: Ad5 CDV). Los perros fueron vacunados el D0 y el D28. Los promedios se expresan como valores $\pm$ un error estándar de la media; cada punto representa un valor;

[0031] La Figura 15 es un gráfico donde se muestra el porcentaje de respondedores para el estudio divulgado en el Ejemplo 7;

[0032] La Figura 16 es un gráfico donde se muestran los títulos HAI;

[0033] La Figura 17 es un gráfico donde se muestra la media geométrica del título de anticuerpos neutralizantes del CPV

[0034] La Figura 18 es un gráfico donde se muestra el porcentaje de respondedores según grupo y día;

[0035] La Figura 19 es un gráfico donde se muestra la media geométrica del título de anticuerpos anti-CPV según grupo y día.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0036] Se proveen composiciones que comprenden un polipéptido del CPV, un antígeno y fragmentos y variantes del mismo que generan una

respuesta inmunogénica en un animal. Los polipéptidos antigénicos o fragmentos o variantes de los mismos se producen mediante un vector de expresión de baculovirus en células de insecto. Los polipéptidos antigénicos, o fragmentos o variantes, se pueden formular como vacunas con o sin virus de CPV vivos modificados o composiciones farmacéuticas y usar para generar o estimular una respuesta protectora en un animal. En una forma de realización, el antígeno polipeptídico es un polipéptido de la cápside del CPV o un fragmento o variante activo del mismo. Los antígenos del CPV se pueden ensamblar en cápsides vacías del CPV o en VLP (partículas tipo virus) del CPV.

[0037] Se considera que los polipéptidos antigénicos de la invención pueden ser polipéptidos de longitud completa o fragmentos o variantes activos de los mismos. Las frases “fragmentos activos” o “variantes activas” se refieren a los fragmentos o variantes que retienen la naturaleza antigénica del polipéptido. Por lo tanto, la presente invención abarca cualquier polipéptido, antígeno, epítopo o inmunógeno del CPV capaz de generar una respuesta inmunogénica en un animal. El polipéptido, antígeno, epítopo o inmunógeno del CPV puede ser cualquier polipéptido, antígeno, epítopo o inmunógeno del CPV como por ejemplo, pero en un sentido no taxativo, una proteína, un péptido o un fragmento o variante del mismo, capaz de generar, inducir o estimular una respuesta en un animal, tal como un ovino, bovino, caprino o porcino.

[0038] La presente invención se relaciona con vacunas o composiciones para felinos o caninos que pueden comprender una cantidad eficaz de un antígeno recombinante del CPV. La vacuna o las composiciones no comprenden adyuvantes y opcionalmente pueden comprender un vehículo,

excipiente o transportador farmacéuticamente o veterinariamente aceptable.

[0039] En algunas formas de realización, la respuesta en el animal es una respuesta inmunológica protectora.

[0040] El término “animal” comprende mamíferos, aves y semejantes. El animal o huésped incluye mamíferos y humanos. El animal se puede seleccionar del grupo que consiste en equinos (por ejemplo, caballos), caninos (por ejemplo, perros, lobos, zorros, coyotes, chacales), felinos (por ejemplo, leones, tigres, gatos domésticos, gatos salvajes, otros grandes felinos y otros felinos, incluyendo guepardos y lince), ovinos (por ejemplo, ovejas), bovinos (por ejemplo, ganado vacuno), porcinos (por ejemplo, cerdos), caprinos (por ejemplo, cabras), aves (por ejemplo, pollos, patos, gansos, pavos, codornices, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos, avestruces, emús y casuarios), primates (por ejemplo, prosimios, tarsios, monos, gibones, simios) y peces. El término “animal” también incluye un animal individual en todas las etapas del desarrollo, incluyendo las etapas embrionaria y fetal.

[0041] A menos que se los defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se emplean en la presente tienen el mismo significado que comúnmente les dan los especialistas en el arte de la invención. Los términos en singular “un”, “uno/una” y “el/la” incluyen las referencias en plural, a menos que del contexto surja claramente lo contrario. De manera similar, el término “o” incluirá “y”, a menos que el contexto claramente indique lo contrario.

[0042] Se debe tener en cuenta que en esta divulgación y en particular en las reivindicaciones y/o párrafos, los términos tales como “comprende”, “comprendido”, “que comprende” y semejantes pueden tener el significado que

se atribuye a los mismos bajo la Ley de Patentes de los EE.UU.; por ejemplo, pueden significar “incluye”, “incluido”, “incluyendo” y semejantes; y que los términos tales como “que consiste esencialmente en” y “consiste esencialmente en” tienen el significado que se atribuye a los mismos bajo la Ley de Patentes de los EE.UU., por ejemplo, permiten elementos no enumerados explícitamente, pero excluyen los elementos hallados en el arte anterior o que afectan una característica básica o novedosa de la invención.

[0043] Los polipéptidos antigénicos de la invención pueden proveer protección contra el CPV. Es decir, pueden estimular una respuesta inmunológica en un animal. Los términos “antígeno” o “inmunógeno” se refieren a una sustancia que induce una respuesta inmunológica específica en un animal huésped. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o porción de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; una porción o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmunológica luego de su presentación en un animal huésped; un polipéptido, un epítipo, un hapteno o cualquier combinación de los mismos. Como alternativa, el inmunógeno o antígeno puede comprender una toxina o una antitoxina.

[0044] El término “proteína, polipéptido o péptido inmunogénico” según se usa en la presente incluye polipéptidos que son inmunológicamente activos en el sentido que una vez administrados al pueden evocar una respuesta inmunológica de tipo humoral y/o celular dirigida contra la proteína. Preferiblemente el fragmento de proteína es tal que tiene sustancialmente la misma actividad inmunológica que la proteína total. Por consiguiente, un fragmento de proteína de acuerdo con la invención comprende o consiste

esencialmente en o consiste en por lo menos un epitope o determinante antigénico. Una proteína o polipéptido "inmunogénico", según se usa en la presente, incluye la secuencia completa de la proteína, sus análogos o fragmentos inmunogénicos de la misma. Un "fragmento inmunogénico" es refiere a un fragmento de una proteína que incluye uno o más epitopes y por consiguiente genera la respuesta inmunológica que se describió previamente. Dichos fragmentos se pueden identificar usando cualquier número de técnicas de mapeo de epitopes, bien conocidas en el arte. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols en *Methods in Molecular Biology*, volumen 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Por ejemplo, los epitopes lineales se pueden determinar, por ejemplo, mediante síntesis concurrente de grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, los péptidos correspondientes a porciones de la molécula de proteína, y reacción de los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos aún están unidos a los soportes. Dichas técnicas son conocidas en el arte y se describe, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N°: 4.708.871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. De manera similar, los epitopes conformacionales se identifican fácilmente mediante determinación de la conformación espacial de los aminoácidos tal como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, supra. Los métodos especialmente aplicables a las proteínas de T. parva se describen por completo en PCT/US2004/022605, incorporada por completo en la presente a modo de referencia.

[0045] Según se describió, la invención abarca fragmentos activos y variantes del polipéptido antigénico. Por consiguiente, el término "proteína,

polipéptido o péptido inmunogénico” también contempla supresiones, adiciones y sustituciones en la secuencia, siempre y cuando el polipéptido produzca una respuesta inmunológica como se define en la presente. El término “variación conservadora” hace referencia al reemplazo de un residuo de aminoácido por otro residuo similar desde el punto de vista biológico, o al reemplazo de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico, de modo que el residuo de aminoácido codificado no cambie o sea otro residuo similar desde el punto de vista biológico. En este sentido, las sustituciones particularmente preferidas generalmente serán conservadoras, es decir, serán sustituciones que tendrán lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se dividen en general en cuatro familias: (1) ácidos: aspartato y glutamato; (2) básicos: lisina, arginina, histidina; (3) no polares: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano; y (4) polares sin carga: glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Ocasionalmente, los aminoácidos fenilalanina, triptofano y tirosina se clasifican como aminoácidos aromáticos. Los ejemplos de variaciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo hidrofóbico, tales como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro residuo hidrofóbico, o la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar, tal como la sustitución de arginina por lisina, de ácido glutámico por ácido aspártico o de glutamina por asparagina y semejantes; o una sustitución conservadora similar de un aminoácido por un aminoácido relacionado desde el punto de vista estructural, que no tiene un efecto importante sobre la actividad biológica. Por consiguiente, las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia, pero que poseen sustituciones de aminoácidos

menores que no afectan de manera sustancial la inmunogenicidad de la proteína, se encuentran dentro de la definición del polipéptido de referencia. Todos los polipéptidos producidos con estas modificaciones están incluidos en la presente. El término "variación conservadora" también incluirá el uso de un aminoácido sustituido en lugar del aminoácido original no sustituido, siempre que los anticuerpos generados contra el polipéptido sustituido también generen una reacción inmunológica con el polipéptido no sustituido.

[0046] El término "epitope" se refiere al sitio sobre un antígeno o hapteno al cual responden células B y/o células T específicas. El término también se usa indistintamente con los términos "determinante antigénico" o "sitio de determinante antigénico". Los anticuerpos que reconocen al mismo epitope se pueden identificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno blanco.

[0047] Una "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmunológica celular y/o mediada por anticuerpos a una composición o vacuna de interés. Habitualmente, una "respuesta inmunológica" incluye, pero en un sentido no taxativo, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células T ayudantes y/o células T citotóxicas, dirigidas específicamente a uno o más antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped expresará una respuesta inmunológica ya sea terapéutica o protectora de manera tal que mejorará la resistencia a una nueva infección y/o se reducirá la severidad clínica de la enfermedad. Dicha protección se demostrará ya sea mediante una reducción o la falta de los síntomas que normalmente son expresados por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido

y/o un título viral disminuido en el huésped infectado.

[0048] Los antígenos sintéticos también están incluidos en la definición, por ejemplo, poliepitopes, epitopes flanqueadores y otros antígenos derivados mediante síntesis o recombinantes. Véase, por ejemplo, Bergmann et al., 1993; Bergmann et al., 1996; Suhrbier, 1997; Gardner et al., 1998. A los efectos de la presente invención, los fragmentos inmunogénicos habitualmente incluirán por lo menos aproximadamente 3 aminoácidos, por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos, por lo menos aproximadamente 10-15 aminoácidos o aproximadamente 15-25 aminoácidos o más aminoácidos, de la molécula. No hay un límite crítico superior en cuanto a la longitud del fragmento, que podría comprender casi la secuencia de longitud completa de la proteína, o aún una proteína de fusión que comprenda por lo menos un epitope de la proteína.

[0049] Por lo tanto, una estructura mínima de un polinucleótido que expresa un epitope es aquella que comprende o consiste esencialmente en o consiste en nucleótidos que codifican un epitope o determinante antigénico de un polipéptido CPV. Un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido CPV puede comprender o consistir esencialmente en o consistir en un mínimo de 15 nucleótidos, aproximadamente 30-45 nucleótidos, aproximadamente 45-75 o por lo menos 57, 87 ó 150 nucleótidos consecutivos o contiguos de la secuencia que codifica el polipéptido. En la práctica de la invención se pueden usar procedimientos de determinación de epitopes, tal como la generación de bibliotecas de péptido superpuestos (Hemmer et al., 1998), Pepscan (Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1985; Van der Zee R. et al., 1989; Geysen, 1990; Multipin. RTM. Peptide Synthesis Kits de Chiron) y algoritmos (De Groot et al., 1999; PCT/US2004/022605).

[0050] Los términos “ácido nucleico” y “polinucleótido” se refieren a un ARN o ADN que es lineal o ramificado, de hebra simple o doble, o un híbrido del mismo. El término también abarca híbridos de ARN/ADN. Los siguientes son ejemplos no taxativos de polinucleótidos: un gen o un fragmento de gen, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas y cebadores de ácidos nucleicos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros grupos de azúcares y conectores tales como fluororribosa y tiolato, y ramas de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente marcador. Otros tipos de modificaciones incluidos en esta definición son los caps, la sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, y la introducción de medios para unir el polinucleótido a proteínas, iones de metales, componentes de marcado, otros polinucleótidos o soportes sólidos. Los polinucleótidos se pueden obtener mediante síntesis química o pueden derivar de un microorganismo.

[0051] El término “gen” se usa en un sentido amplio para hacer referencia a cualquier segmento de polinucleótido asociado con una función biológica. Por consiguiente, los genes incluyen intrones y exones como en una secuencia genómica, o tan solo las secuencias de codificación o como en los ADNc y/o las secuencias reguladoras necesarias para su expresión. Por ejemplo, un gen también hace referencia a un fragmento de ácido nucleico a partir del cual se expresa ARNm o ARN funcional, o a un fragmento que

codifica una proteína específica, que incluye secuencias reguladoras.

[0052] La invención comprende además una hebra complementaria de un polinucleótido que codifica un antígeno, epítopo o inmunógeno del CPV. La hebra complementaria puede ser polimérica y de cualquier longitud, y puede contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y análogos en cualquier combinación.

[0053] Los términos “proteína”, “péptido”, “polipéptido” y “fragmento de polipéptido” se usan indistintamente en la presente para hacer referencia a polímeros de residuos de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados o análogos de aminoácidos y puede estar interrumpido por unidades químicas distintas de aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que ha sido modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, por formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado o bioactivo.

[0054] Un componente biológico “aislado” (tal como un ácido nucleico, una proteína o una organela) hace referencia a un componente que ha sido separado o purificado sustancialmente de los demás componentes biológicos en la célula del organismo en el cual el componente aparece naturalmente, por ejemplo, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, proteínas u organelas. Los ácidos nucleicos y las proteínas que fueron “aislados” incluyen ácidos nucleicos y proteínas que fueron purificados con métodos de purificación convencionales. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante tecnología recombinante, y también a partir de

una síntesis química.

[0055] El término “purificado”, según se utiliza en la presente, no implica una pureza absoluta; sino que más bien se considera un término relativo. Así, por ejemplo, una preparación de polipéptidos purificados es aquella en donde está más enriquecido el polipéptido de lo que estaría dicho polipéptido en su entorno natural. Es decir, el polipéptido está separado de los componentes celulares. El término “sustancialmente purificado” significa que en el polipéptido que representa varias formas de realización se ha eliminado por lo menos un 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o por lo menos un 98% o más de los componentes o materiales celulares. Asimismo, el polipéptido se puede purificar parcialmente. El término “parcialmente purificado” significa que se ha eliminado menos de un 60% de los componentes o materiales celulares. Lo mismo se aplica a los polinucleótidos. Los polipéptidos que se describen en la presente se pueden purificar mediante cualquier medio conocido en el arte.

[0056] Según se indicó previamente, los polipéptidos antigénicos, o fragmentos o variantes de los mismos, son polipéptidos antigénicos del CPV que son producidos por un vector de expresión de baculovirus en células de insecto. Los fragmentos y las variantes de los polinucleótidos y polipéptidos codificados por los mismos también están incluidos en la presente invención. El término "fragmento" significa una porción de la secuencia del polinucleótido o una porción de la secuencia de aminoácidos antigénica y por ende de la proteína codificada por el mismo. Los fragmentos del polinucleótido pueden codificar fragmentos de la proteína que retienen la actividad biológica de la proteína nativa, y que por ende, tienen actividad inmunogénica como se

indica en otra parte en la presente. Los fragmentos de la secuencia de polipéptidos retienen la capacidad para inducir una respuesta inmunológica protectora en un animal.

[0057] El término "variantes" significa secuencias sustancialmente similares. En el caso de los polinucleótidos, una variante comprende la supresión y/o adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios dentro del polinucleótido nativo y/o la sustitución de uno o más nucleótidos en uno o más sitios en dicho polinucleótido nativo. Según se utiliza en la presente, un polinucleótido o polipéptido "nativo" comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos natural, respectivamente. Las variantes de un polinucleótido particular de la invención (es decir, el polinucleótido de referencia) también se puede evaluar por comparación del porcentaje de identidad de secuencia entre el polipéptido codificado por una variante de polinucleótido y el polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Una "variante" de una proteína significa una proteína derivada de la proteína nativa por supresión o adición de uno o varios aminoácidos en uno o más sitios en la proteína nativa y/o la sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la proteína nativa. Las variantes de proteínas comprendidas en la presente invención son biológicamente activas, es decir, tienen la capacidad para generar una respuesta inmunológica.

[0058] En un aspecto, la presente invención provee polipéptidos CPV de formas aisladas del CPV. En otro aspecto, la presente invención provee un polipéptido cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6, 8 a 10 y una variante o fragmento del mismo.

[0059] En otro aspecto, la invención se relaciona con cápsides vacías del

CPV o con VLP (partículas tipo virus) del CPV. Las cápsides pueden comprender, consistir esencialmente de o consistir de polipéptidos VP2 de CPV, o sus variantes, incluidas las versiones truncadas de los mismos.

[0060] Aún más, se considera que los homólogos de los polipéptidos CPV se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Según se utiliza en la presente, el término “homólogos” incluye ortólogos, análogos y parálogos. El término “análogos” hace referencia a dos polinucleótidos o polipéptidos que tienen una función idéntica o similar, pero que han evolucionado por separado en organismos no relacionados. El término “ortólogos” hace referencia a dos polinucleótidos o polipéptidos de especies diferentes, pero que han evolucionado a partir de un gen ancestral común por especiación. Normalmente, los ortólogos codifican polipéptidos que cumplen funciones idénticas o funciones similares. El término “parálogos” hace referencia a dos polinucleótidos o polipéptidos que están relacionados por duplicación dentro de un genoma. Los parálogos habitualmente cumplen funciones diferentes, pero estas funciones pueden estar relacionadas. Los análogos, ortólogos y parálogos de un polipéptido CPV de tipo salvaje pueden diferir del polipéptido CPV de tipo salvaje por modificaciones de post-traducción, por diferencias en la secuencia de aminoácidos o ambas. En particular, los homólogos de la invención en general tendrán por lo menos 80-85%, 85-90%, 90-95% o 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia, con todo o parte de las secuencias de polipéptidos o polinucleótidos CPV de tipo salvaje, y tendrán una función similar. Las variantes incluyen las variantes alélicas. El término “variante alélica” hace referencia a un polinucleótido o un polipéptido que contiene polimorfismos que dan como

resultado cambios en las secuencias de aminoácidos de una proteína y que existen dentro de una población natural (por ejemplo, una especie o una variedad de virus). Dichas variaciones alélicas naturales típicamente pueden dar como resultado una variación de 1-5% en un polinucleótido o un polipéptido. Las variantes alélicas se pueden identificar mediante secuenciación de la secuencia del ácido nucleico de interés en diversas especies, lo cual se puede efectuar fácilmente usando sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético del gen en dichas especies. Se considera que cualquiera y la totalidad de las variaciones de los ácidos nucleicos y de los polimorfismos o las variaciones de los aminoácidos resultantes, que son el resultado de una variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional del gen de interés, se encuentran dentro del alcance de la invención.

[0061] Según se utiliza en la presente, el término "derivado" o "variante" se refiere a un polipéptido, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que contiene una o más variaciones de aminoácidos conservadores u otras modificaciones menores de modo tal que (1) el correspondiente polipéptido tiene una función sustancialmente equivalente cuando se compara con el polipéptido de tipo salvaje o (2) un anticuerpo generado contra el polipéptido es inmunorreactivo con el polipéptido de tipo salvaje. Estas variantes o derivados incluyen polipéptidos que contienen modificaciones menores en las secuencias de aminoácidos primarias del polipéptido CPV que pueden dar como resultado péptidos que tienen una actividad sustancialmente equivalente en comparación con la contraparte del polipéptido no modificado. Dichas modificaciones pueden ser deliberadas, tal como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser

espontáneas. El término “variante” también abarca supresiones, adiciones y sustituciones de la secuencia, siempre y cuando el polipéptido genere una respuesta inmunológica como se define en la presente.

[0062] El término “variación conservadora” hace referencia al reemplazo de un residuo de aminoácido por otro residuo similar desde el punto de vista biológico, o al reemplazo de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico, de modo que el residuo de aminoácido codificado no cambie o sea otro residuo similar desde el punto de vista biológico. En este sentido, las sustituciones particularmente preferidas en general serán de naturaleza conservadora, como se describió previamente.

[0063] Los polinucleótidos de la invención incluyen secuencias que son degeneradas como resultado del código genético, por ejemplo, del uso de codones optimizado para un huésped específico. Según se utiliza en la presente, el término “optimizado” hace referencia a un polinucleótido que fue manipulado genéticamente para incrementar su expresión en una especie dada. Para proporcionar polinucleótidos optimizados que codifican polipéptidos CPV, se puede modificar la secuencia de ADN del gen de la proteína CPV para que 1) comprenda los codones preferidos por los genes de gran expresión en una especie particular; 2) comprenda un contenido de A+T o G+C en la composición de las bases de nucleótidos que sea sustancialmente el que se encuentra en dichas especies; 3) forme una secuencia de inicio en dichas especies; o 4) elimine las secuencias que causan desestabilización, poliadenilación inapropiada, degradación y terminación de ARN, o que forme horquillas en la estructura secundaria o sitios de procesamiento de ARN. Se puede lograr una mayor expresión de proteínas CPV en dichas especies

utilizando la frecuencia de distribución de utilización de codones en eucariotas y procariotas, o en una especie particular. El término “frecuencia de uso de los codones preferida” hace referencia a la preferencia que presenta una célula huésped específica en el uso de los codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Hay 20 aminoácidos naturales, y la mayoría de ellos es especificada por más de un codón. Por ello, todas las secuencias de nucleótidos degeneradas están incluidas en la divulgación siempre que la secuencia de aminoácidos del polipéptido CPV codificado por la secuencia de nucleótidos permanezca funcionalmente sin cambios.

[0064] La identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se puede establecer con el blast apareado y la matriz blosum62 de la NCBI (National Center for Biotechnology Information), usando los parámetros estándar (véase, por ejemplo, el algoritmo BLAST o BLASTX disponible en el servidor de la "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, Md., EE.UU.), así como en Altschul et al.; y por lo tanto, este documento menciona el uso del algoritmo o BLAST o BLASTX y de la matriz BLOSUM62 con el término “blasts”).

[0065] Con respecto a las secuencias, la “identidad” puede hacer referencia a la cantidad de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos, dividida por la cantidad de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las dos secuencias, donde el alineamiento de las dos secuencias se puede determinar de acuerdo con el algoritmo de Wilbur y Lipman (Wilbur y Lipman), por ejemplo, usando una ventana con un tamaño de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos y una penalidad por falta de coincidencia de 4, después de lo cual se podrá efectuar convenientemente el análisis y la

interpretación asistidos por computadora de los datos de la secuencia, lo que abarca el alineamiento, mediante el uso de programas disponibles comercialmente (por ejemplo, la Suite Intelligenetics™, Intelligenetics, Inc., CA). Cuando se dice que dos secuencias de ARN son similares o tienen un grado de identidad u homología de secuencia con secuencias de ADN, la timidina (T) en la secuencia de ADN se considera igual al uracilo (U) en la secuencia de ARN. Por lo tanto, las secuencias de ARN se encuentran dentro del alcance de la invención y pueden obtenerse de secuencias de ADN, si se tiene en cuenta que la timidina (T) en las secuencias de ADN es igual al uracilo (U) en las secuencias de ARN.

[0066] La identidad de secuencia o similitud de secuencia de dos secuencias de aminoácidos, o la identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el paquete de software Vector NTI (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA).

[0067] En los siguientes documentos se proveen algoritmos para comparar la identidad o la homología relativa entre las secuencias y, adicionalmente o como alternativa, con relación a lo anterior, las descripciones de estas referencias se pueden usar para determinar el porcentaje de homología o de identidad: Needleman SB y Wunsch CD; Smith TF y Waterman MS; Smith TF, Waterman MS y Sadler JR; Feng DF y Dolittle RF; Higgins DG y Sharp PM; Thompson JD, Higgins DG y Gibson TJ; y Devereux J, Haeberlie P y Smithies O. Y, sin una experimentación innecesaria, los especialistas en el arte podrán consultar muchos otros programas o referencias para determinar el porcentaje de homología.

[0068] Las reacciones de hibridación se pueden conducir bajo

condiciones de “severidad” diferentes. Las condiciones que aumentan la severidad de una reacción de hibridación son bien conocidas. Véase, por ejemplo, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, segunda edición (Sambrook et al., 1989).

[0069] La invención abarca además los polinucleótidos CPV contenidos en una molécula de vector o un vector de expresión y están ligados operativamente a un elemento promotor y opcionalmente a un potenciador.

[0070] Un “vector” se refiere a un plásmido o virus de ADN o ARN recombinante que comprende un polinucleótido heterólogo que será suministrado en una célula blanco, ya sea in vitro o in vivo. El polinucleótido heterólogo puede comprender una secuencia de interés con fines de prevención o terapia, y opcionalmente se puede encontrar en la forma de un casete de expresión. Según se usa en la presente, no es necesario que un vector se pueda replicar en la célula o sujeto blanco final. El término incluye vectores de clonación y vectores virales.

[0071] El término “recombinante” se refiere a un polinucleótido de origen semisintético o sintético que ya sea no existe en la naturaleza o está unido a otro polinucleótido en un ordenamiento que no existe en la naturaleza.

[0072] El término “heterólogo” significa que deriva de un elemento genéticamente distinto del resto del elemento con el cual se compara. Por ejemplo, un polinucleótido se puede ubicar mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector que deriva de una fuente diferente y es un polinucleótido heterólogo. Un promotor que fue separado de su secuencia codificante nativa y ligada operativamente a una secuencia codificante distinta de la secuencia nativa es un promotor heterólogo.

[0073] La presente invención se relaciona con vacunas para ovinos, bovinos, caprinos y porcinos o con composiciones farmacéuticas o inmunológicas que pueden comprender una cantidad eficaz de antígenos recombinantes del CPV y un transportador, adyuvante, excipiente o vehículo farmacéuticamente o veterinariamente aceptable.

[0074] El objeto que se describe en la presente está dirigido, en parte, a composiciones y métodos relacionados con el antígeno del CPV preparado en un sistema de expresión de baculovirus/célula de insecto que era altamente inmunogénico y protegieron a los animales contra desafíos por cepas del CPV homólogas y heterólogas.

Composiciones

[0075] La presente invención se relaciona con una vacuna o composición contra el CPV que puede comprender una cantidad eficaz de un antígeno recombinante del CPV y un vehículo, excipiente o transportador farmacéuticamente o veterinariamente aceptable. En una forma de realización, el antígeno recombinante del CPV se expresa mediante un vector de expresión de baculovirus en células de insecto.

[0076] Una forma de realización de la invención se relaciona con una vacuna o composición que comprende cápsides vacías del CPV o VLP (partículas tipo virus) del CPV. Las cápsides vacías del CPV o VLP (partículas tipo virus) del CPV se obtienen mediante expresión de la proteína de la cápside del CPV.

[0077] La presente invención también se relaciona con procesos para preparar estas vacunas, con el uso de antígenos para producir estas vacunas y con métodos de vacunación empleando las mismas.

[0078] La presente invención también se relaciona con secuencias de nucleótidos, en particular ADNc, y con secuencias de aminoácidos, que están modificados cuando se comparan con las secuencias naturales del virus. La invención también se relaciona con los productos de expresión de las secuencias de nucleótidos modificadas y con los antígenos y virus CPV que incorporan estas modificaciones.

[0079] La presente invención abarca cualquier polipéptido, antígeno, epítopo o inmunógeno del CPV capaz de generar una respuesta inmunogénica en un animal, tal como un ovino, bovino, caprino o porcino. El polipéptido, antígeno, epítopo o inmunógeno del CPV puede ser cualquier polipéptido, antígeno, epítopo o inmunógeno del CPV como por ejemplo, pero en un sentido no taxativo, una proteína, un péptido o un fragmento del mismo, capaz de generar, inducir o estimular una respuesta en un animal, tales como felinos o caninos.

[0080] En una forma de realización en donde la composición o vacuna inmunológica del CPV es una composición o vacuna inmunológica recombinante, dicha composición o vacuna comprende un vector recombinante y no tiene adyuvante, y opcionalmente puede comprender un excipiente, vehículo o transportador farmacéutico o veterinario aceptable; el vector recombinante es un vector de expresión de baculovirus que puede comprender un polinucleótido que codifica un polipéptido, antígeno, epítopo o inmunógeno del CPV. El polipéptido, antígeno, epítopo o inmunógeno del CPV puede ser una proteína de la cápside y cualquier fragmento de la misma.

[0081] En una forma de realización, la molécula de ácido nucleico que codifica uno o más antígenos CPV es un ADNc que codifica una proteína de la

cápside del CPV. En otra forma de realización, la molécula de ácido nucleico que codifica uno o más antígenos del CPV es un ADNc que codifica un fragmento de la proteína de la cápside del CPV.

[0082] En otra forma de realización, el antígeno del CPV puede derivar de las siguientes cepas del CPV, CPV 100869-1.

[0083] La presente invención se relaciona con una composición o vacuna contra el CPV que pueden comprender una cantidad eficaz de un antígeno recombinante del CPV. La composición o vacuna contra el CPV no contiene un adyuvante. La composición o vacuna contra el CPV puede contener opcionalmente un vehículo, excipiente o transportador farmacéuticamente o veterinariamente aceptable.

[0084] La invención abarca además los polinucleótidos CPV contenidos en una molécula de vector o un vector de expresión y están ligados operativamente a un elemento promotor y opcionalmente a un potenciador.

[0085] En un aspecto, la presente invención provee polipéptidos CPV cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6, o 8 a 10, y variantes o fragmentos de los mismos.

[0086] En otro aspecto, la presente invención provee un polipéptido que tiene por lo menos un 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido antigénico de la invención, en particular con los polipéptidos cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6, o 8 a 10.

[0087] En aún otro aspecto, la presente invención provee fragmentos y variantes de los polipéptidos CPV identificados previamente (SEQ ID N°: 1, 3,

4, 6, o 8 a 10) que un especialista en el arte puede preparar fácilmente usando técnicas de biología molecular bien conocidas.

[0088] Las variantes son polipéptidos homólogos que tienen una secuencia de aminoácidos con por lo menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6, o 8 a 10.

[0089] Un fragmento inmunogénico de un polipéptido CPV incluye por lo menos 8, 10, 15 ó 20 aminoácidos consecutivos, por lo menos 21 aminoácidos, por lo menos 23 aminoácidos, por lo menos 25 aminoácidos o por lo menos 30 aminoácidos de un polipéptido CPV que tiene una secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6, o 8 a 10, o variantes de la misma. En otra realización, un fragmento de un polipéptido CPV incluye un epítopo antigénico específico presente sobre un polipéptido CPV de longitud completa. Sin embargo, la persona entrenada en la técnica comprenderá que debe existir una cantidad suficiente del polipéptido CPV para permitir la formación de VLP de CPV.

[0090] En otro aspecto, la presente invención provee un polinucleótido que codifica un polipéptido CPV, tal como un polinucleótido que codifica un polipéptido CPV que tiene una secuencia indicada en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6, o 8 a 10. En aún otro aspecto, la presente invención provee un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene por lo menos un 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6, o 8 a 10, o una variante conservadora, una variante alélica, un homólogo o un fragmento inmunogénico que

comprende por lo menos ocho o por lo menos diez aminoácidos consecutivos de uno de estos polipéptidos, o una combinación de estos polipéptidos.

[0091] En otro aspecto, la presente invención provee un polinucleótido cuya secuencia de nucleótidos se muestra en la SEQ ID N°: 2, 5, 7, 11 o 12, o una variante de la misma. En aún otro aspecto, la presente invención provee un polinucleótido que tiene por lo menos un 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con uno de los polinucleótidos que tiene una secuencia indicada en la SEQ ID N°: 2, 5, 7, 11 o 12, o una variante de la misma.

[0092] Los polinucleótidos de la invención pueden comprender secuencias adicionales, tales como secuencias codificantes adicionales dentro de la misma unidad de transcripción, elementos de control tales como promotores, sitios de unión a ribosomas, UTR 5', UTR 3', terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, unidades de transcripción adicionales bajo el control del mismo promotor o de un promotor diferente, secuencias que permiten la clonación, expresión, recombinación homóloga y transformación de una célula huésped, y cualquier construcción tal que pueda ser deseable para proveer las formas de realización de esta invención.

[0093] Los elementos para la expresión de un polipéptido, antígeno, epítopo o inmunógeno del CPV ventajosamente están presentes en un vector de la invención. Mínimamente, esto comprende, consiste esencialmente en o consiste en un codón de inicio (ATG), un codón de terminación y un promotor y, opcionalmente, también una secuencia de poliadenilación para determinados vectores tales como plásmidos y determinados vectores virales, por ejemplo,

vectores virales distintos de poxvirus. Cuando el polinucleótido codifica un fragmento de una poliproteína, por ejemplo un péptido del CPV, ventajosamente se coloca en el vector un ATG en 5' del marco de lectura y se ubica un codón de terminación en 3'. Puede haber otros elementos para controlar la expresión, tales como secuencias potenciadoras, secuencias estabilizantes, tales como secuencias de intrones y de señal que permiten la secreción de la proteína.

[0094] La presente invención también se relaciona con preparaciones que comprenden vectores, tales como vectores de expresión, por ejemplo, composiciones terapéuticas. Las preparaciones pueden comprender uno o más vectores, por ejemplo, vectores de expresión, tales como vectores de expresión in vivo, que comprenden y expresan uno o más polipéptidos, antígenos, epitopes o inmunógenos del CPV. En una forma de realización, el vector contiene y expresa un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polinucleótido que codifica (y que ventajosamente expresa) un antígeno, epítopo o inmunógeno del CPV, en un vehículo, excipiente o transportador farmacéuticamente o veterinariamente aceptable. Por consiguiente, de acuerdo con una forma de realización de la invención, el otro vector o vectores presente en la preparación comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polinucleótido que codifica, y bajo las circunstancias apropiadas el vector expresa una o más proteínas adicionales de un polipéptido, antígeno, epítopo o inmunógeno del CPV, o un fragmento del mismo.

[0095] De acuerdo con otra forma de realización, el vector o los vectores presentes en la preparación comprenden o consisten esencialmente en o

consisten en polinucleótido(s) que codifica(n) una o más proteínas o fragmento(s) de las mismas de un polipéptido, antígeno, epítopo o inmunógeno del CPV, donde dicho uno o más vectores expresan dichos uno o más polinucleótidos. En otra forma de realización, la preparación comprende uno, dos o más vectores que comprenden polinucleótidos que codifican y expresan, ventajosamente in vivo, un polipéptido, antígeno, proteína de fusión o un epítopo del CPV.

[0096] De acuerdo con aún otra forma de realización de la invención, el vector de expresión es un vector de un plásmido o un vector de un plásmido de ADN, en particular un vector de expresión in vivo. En un ejemplo específico, no taxativo, el plásmido pVR1020 o 1012 (VICAL Inc.; Luke et al., 1997; Hartikka et al., 1996, véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N°: 5.846.946 y 6.451.769) se puede utilizar como un vector para la inserción de una secuencia de polinucleótidos. El plásmido pVR1020 deriva del pVR1012 y contiene la secuencia señal tPA humana. En una forma de realización, la señal tPA humana comprende del aminoácido M(1) al aminoácido S(23) en Genbank, con el N° de Acceso HUMTPA14. En otro ejemplo específico, no taxativo, el plásmido utilizado como un vector para la inserción de una secuencia de polinucleótidos puede contener la secuencia del péptido señal del IGF1 de equinos desde el aminoácido M(24) hasta el aminoácido A(48) en Genbank, bajo el N° de Acceso U28070. La información adicional sobre plásmidos de ADN que se puede consultar o emplear en la práctica se encuentra, por ejemplo, en la Patentes de los EE.UU. N°: 6.852.705; 6.818.628; 6.586.412; 6.576.243; 6.558.674; 6.464.984; 6.451.770; 6.376.473 y 6.221.362.

[0097] El término “plásmido” abarca cualquier unidad de transcripción de

ADN que comprenda un polinucleótido de acuerdo con la invención y los elementos necesarios para su expresión in vivo en una o más células del huésped o del blanco deseado, y en este sentido, vale destacar que se considera que un plásmido circular, superenrollado o no superenrollado, así como una forma lineal, se encuentra dentro del alcance de la invención.

[0098] Cada plásmido comprende o contiene o consiste esencialmente en, además del polinucleótido que codifica un antígeno, epítopo o inmunógeno del CPV, opcionalmente fusionado con una secuencia de péptidos heteróloga, una variante, un análogo o un fragmento, ligado a un promotor o bajo el control de un promotor o dependiente de un promotor. En general, resulta ventajoso emplear un promotor fuerte que funcional en las células eucariotas. El promotor fuerte puede ser, pero en un sentido no taxativo, el promotor de citomegalovirus temprano inmediato (CMV-IE) de origen humano o murino o pueden ser opcionalmente de otro origen, tal como de rata o cobayo, el promotor Super (Ni, M. et al., Plant J. 7, 661-676, 1995.). El promotor CMV-IE puede comprender la parte promotora real, que puede estar asociada con la parte potenciadora. Se hace referencia a EP-A-260 148, EP-A-323 597, las Patentes de los EE.UU. N°: 5.168.062, 5.385.839 y 4.968.615, así como a la Solicitud PCT N°: WO87/03905. El promotor CMV-IE es ventajosamente un CMV-IE humano (Boshart et al., 1985) o un CMV-IE de murino.

[0099] En términos más generales, el promotor es de origen viral, vegetal o celular. Un promotor viral fuerte distinto de CMV-IE que se puede emplear convenientemente en la práctica de la invención es el promotor temprano/tardío del virus SV40 o el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous. Un promotor celular fuerte que puede emplearse convenientemente en la

práctica de la invención es el promotor de un gen del citoesqueleto, tal como, por ejemplo, el promotor de la desmina (Kwissa M. et al., 2000) o el promotor de la actina (Miyazaki J. et al. 1989).

[00100] Los plásmidos pueden comprender otros elementos de control de la expresión. Será particularmente ventajoso incorporar una o más secuencias estabilizantes, por ejemplo, secuencias de intrones, por ejemplo, el intrón de la alcohol deshidrogenasa de maíz (Callis et al., Genes & Dev., 1(10): 1183-1200, diciembre, 1987), el primer intrón del hCMV-IE (Solicitud PCT N°: WO1989/01036), el intrón II del gen de la β -globina de conejo (van Ooyen et al., 1979). En otra forma de realización, los plásmidos pueden comprender una UTR 3'. La UTR 3' puede ser, pero en un sentido no taxativo, la UTR 3' de la nopalina sintasa (Nos) de *Agrobacterium* (Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence; Depicker, A. et al., J. Mol. Appl. Genet., 1982; Bevan, NAR, 1984, 12(22): 8711-8721).

[00101] Con relación a la señal de poliadenilación (poliA) para los vectores plasmídicos y virales diferentes de poxvirus, se puede emplear asimismo una señal de poli(A) del gen de la hormona de crecimiento bovina (bGH) (véase US 5122458), la señal de poli(A) del gen de la β -globina de conejo o la señal de poli(A) del virus SV40.

[00102] Una "célula huésped" se refiere a una célula procariota o eucariota que ha sido alterada genéticamente o que se puede alterar genéticamente mediante la administración de un polinucleótido exógeno, tal como un plásmido o vector recombinante. Cuando se hace referencia a células genéticamente alteradas, el término se refiere tanto a la célula originalmente alterada como a la progenie de la misma.

[00103] En una forma de realización, el antígeno recombinante del CPV se expresa en células de insecto. En una forma de realización particular, el antígeno CPV se expresa en células SF9.

Métodos de uso

[00104] En una forma de realización, el objeto divulgado en la presente está dirigida a un método de vacunación de un ovino, un bovino, un caprino o un porcino que comprende administrarle a dicho ovino, bovino, caprino o porcino una cantidad eficaz de una vacuna que puede comprender una cantidad eficaz de un antígeno recombinante del CPV y un vehículo, excipiente o transportador farmacéuticamente o veterinariamente aceptable.

[00105] En una forma de realización de la presente invención, el método comprende una sola administración de una composición de vacuna formulada con una emulsión de acuerdo con la invención. Por ejemplo, en una forma de realización, la vacuna o composición inmunológica comprende antígenos del CPV expresados en baculovirus, que incluyen polipéptidos y VLP (partículas tipo virus) o cápsides vacías. La microscopía electrónica indica las células de insecto que fueron transformadas con un vector de expresión de VLP del CPV o cápsides vacías del CPV producidas en baculovirus, y por ende las vacunas o composiciones inmunológicas de acuerdo con la presente invención abarcan las que comprenden VLP del CPV o cápsides vacías del CPV.

[00106] En una forma de realización, el objeto divulgado en la presente está dirigida a un método de vacunación de un ovino, bovino, caprino o porcino que comprende administrar a dicho ovino, bovino, caprino o porcino el antígeno del CPV producido mediante un vector de baculovirus en células de

insecto.

[00107] En una forma de realización, el objeto divulgado en la presente está dirigida a un método para generar una respuesta inmunológica que comprende administrar al ovino, bovino, caprino o porcino una vacuna que comprende el antígeno del CPV producido mediante un vector de baculovirus en células de insecto.

[00108] En una forma de realización, el objeto divulgado en la presente está dirigida a un método para preparar una vacuna o composición que comprende aislar un antígeno del CPV producido mediante un vector de baculovirus en células de insecto y opcionalmente en combinación con un vehículo, excipiente o transportador farmacéuticamente o veterinariamente aceptable.

[00109] Se usan cepas del CPV tanto homólogas como heterólogas en el desafío para evaluar la eficacia de la vacuna. La administración puede ser por vía subcutánea o intramuscular. La administración puede efectuarse sin aguja (por ejemplo, con Bioject).

[00110] En una forma de realización de la invención, se puede emplear un régimen de sensibilización/refuerzo, que comprende por lo menos una administración primaria y por lo menos una administración de refuerzo usando por lo menos un polipéptido, antígeno, epítopo o inmunógeno común. Típicamente, la composición o vacuna inmunológica usada en la administración primaria es de una naturaleza diferente de la usada como refuerzo. Sin embargo, vale destacar que se puede usar la misma composición como administración primaria y refuerzo. Este protocolo de administración se denomina de “sensibilización/refuerzo”.

[00111] Una sensibilización/refuerzo de acuerdo con la presente invención puede incluir un vector viral recombinante usado para expresar una secuencia de codificación del CPV o fragmentos de la misma que codifican un polipéptido antigénico o un fragmento o una variante del mismo. Específicamente, el vector viral puede expresar un gen del CPV o un fragmento del mismo que codifica un polipéptido antigénico. El vector viral contemplado en la presente incluye, pero en un sentido no taxativo, un poxvirus [por ejemplo, un virus vaccinia o un virus vaccinia atenuado, un virus avipox o un virus avipox atenuado (por ejemplo, canarypox, fowlpox, dovepox, pigeonpox, quailpox, ALVAC, TROVAC; véase por ejemplo, US 5.505.941, US 5.494.8070), un virus raccoonpox, un virus swinepox, etc.], un adenovirus (por ejemplo, un adenovirus humano, un adenovirus canino), un herpesvirus (por ejemplo, un herpesvirus canino, un herpesvirus de pavo, el virus de la enfermedad de Marek, el virus de la laringotraqueítis infecciosa, un herpesvirus felino, el virus de laringotraqueítis (ILTV), un herpesvirus bovino, un herpesvirus porcino), un baculovirus, un retrovirus, etc. En otra forma de realización, el vector de expresión de avipox puede ser un vector de canarypox, tal como, ALVAC. En aún otra forma de realización, el vector de expresión de avipox puede ser un vector de fowlpox, tal como, TROVAC. El antígeno del CPV de la invención a expresar se inserta bajo el control de un promotor de poxvirus específico, por ejemplo, el promotor 42K de Amsacta moorei del entomopoxvirus (Barcena, Lorenzo et al., 2000), el promotor de 7,5 kDa de vaccinia (Cochran et al., 1985), el promotor I3L de vaccinia (Riviere et al., 1992), el promotor HA de vaccinia (Shida, 1986), el promotor ATI de cowpox (Funahashi et al., 1988), el promotor H6 de vaccinia (Taylor et al., 1988b; Guo et al., 1989; Perkus et al., 1989),

entre otros.

[00112] En otro aspecto del protocolo de sensibilización/refuerzo de la invención, se administra una composición que comprende el antígeno del CPV de la invención seguido por la administración de una vacuna o composición que comprende un vector viral recombinante que contiene y expresa el antígeno del CPV in vivo, o una vacuna viral inactivada o una composición que comprende el antígeno del CPV, o una vacuna o una composición de un plásmido de ADN que contiene o expresa el antígeno del CPV. Asimismo, un protocolo de sensibilización/refuerzo puede comprender la administración de una vacuna o composición que comprende un vector viral recombinante que contiene y expresa un antígeno del CPV in vivo, o una vacuna viral inactivada o una composición que comprende un antígeno del CPV, o una vacuna o composición de un plásmido de ADN que contiene o expresa un antígeno del CPV, seguido por la administración de una composición que comprende el antígeno del CPV de la invención. Se describe además que ambas administraciones primaria y secundaria pueden comprender la composición que comprende el antígeno del CPV de la invención.

[00113] Un protocolo de sensibilización/refuerzo comprende por lo menos una administración primaria y por lo menos una administración de refuerzo con por lo menos un polipéptido común y/o con variantes o fragmentos del mismo. La vacuna usada en administración de sensibilización puede ser de una naturaleza diferente de las usadas como una vacuna de refuerzo posterior. La administración primaria puede comprender una o más administraciones. De manera similar, la administración de refuerzo puede comprender una o más

administraciones.

[00114] El volumen de la dosis de las composiciones para las especies blanco que son mamíferos, basadas en vectores virales, por ejemplo, composiciones basadas en un vector viral que no es un poxvirus, en general es de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5,0 ml, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 3,0 ml y entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 2,5 ml.

[00115] La eficacia de la vacunas se puede evaluar aproximadamente entre 2 y 4 semanas después de la última inmunización mediante desafío en animales, tales como felinos o caninos, con una cepa virulenta del CPV.

[00116] Otros detalles sobre estas cepas del CPV se pueden consultar en las páginas de internet de la European Bioinformatics Information (EMBL-EBI), y todas las secuencias de nucleótidos asociadas se incorporan en la presente a modo de referencia. Los inventores contemplan que todas las cepas del CPV, tanto las enumeradas en la presente como aquellas que aún falta identificar, se podrían expresar de acuerdo con las descripciones de la presente divulgación para producir, por ejemplo, composiciones de vacunas eficaces. Se usan cepas tanto homólogas como heterólogas en el desafío para evaluar la eficacia de las vacunas. El animal se puede desafiar por vía intradérmica, subcutánea, mediante rociado, por vía intranasal, intraocular, intratraqueal y/u oral.

[00117] Las administraciones de sensibilización-refuerzo se pueden llevar a cabo ventajosamente con intervalos de 2 a 6 semanas entre sí, por ejemplo, con un intervalo de 4 semanas aproximadamente. De acuerdo con

una forma de realización, también se prevé un refuerzo semi-anual o un refuerzo anual, usando ventajosamente una vacuna basada en el vector viral. Los animales tienen ventajosamente por lo menos de 6 a 8 semanas de vida en el momento de la primera administración.

[00118] Las composiciones que comprenden los polipéptidos antigénicos recombinantes de la invención utilizados en los protocolos de sensibilización/refuerzo no contienen adyuvante, y opcionalmente puede estar incluidos en un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente o veterinario aceptable. Los protocolos de la invención protegen al animal contra el CPV y/o previenen el progreso de la enfermedad en un animal infectado.

[00119] Un especialista en el arte comprenderá que lo divulgado en la presente se provee a modo de ejemplo y la presente invención no se limita a ello. Con la divulgación de la presente y el conocimiento en el arte, el especialista puede determinar el número de administraciones, la ruta de administración y las dosis a usar para cada protocolo de inyección, sin una experimentación innecesaria.

[00120] La presente invención contempla por lo menos una administración a un animal de una cantidad eficaz de la composición terapéutica elaborada de acuerdo con la invención. El animal puede ser un macho, una hembra, una hembra preñada y un recién nacido. Esta administración puede efectuarse por varias rutas que incluyen, pero en un sentido no taxativo, una inyección intramuscular (IM), intradérmica (ID) o subcutánea (SC) o por vía intranasal o una administración oral. La composición terapéutica de acuerdo con la invención también se puede administrar mediante un aparato sin aguja (por ejemplo, con un Pigjet, Dermojet, Biojector,

Avijet (Merial, GA, EE.UU.), un aparato Vetjet o Vitajet (Bioject, Oregon, EE.UU.)). Otro abordaje para administrar las composiciones de plásmido consiste en usar electroporación (véase, por ejemplo, Tollefsen et al., 2002; Tollefsen et al., 2003; Babiuk et al., 2002; Solicitud PCT N°: WO99/01158). En otra forma de realización, la composición terapéutica es suministrada al animal mediante bombardeo con una pistola de genes o bombardeo de partículas de oro.

[00121] En una forma de realización, la invención provee la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación para el suministro y la expresión de un antígeno del CPV o de un epítopo en una célula blanco. La determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz es de experimentación rutinaria para un especialista en el arte. En una forma de realización, la formulación comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que expresa un antígeno o un epítopo del CPV y un transportador, vehículo o excipiente farmacéuticamente o veterinariamente aceptable. En otra forma de realización, el transportador, vehículo o excipiente farmacéuticamente o veterinariamente aceptable facilita la transfección u otros medios para transferir polinucleótidos a un animal huésped y/o mejora la preservación del vector o la proteína en un huésped.

[00122] En una forma de realización, el objeto divulgado en la presente provee un método de detección para diferenciar los animales infectados de los vacunados (DIVA).

[00123] En la presente se divulga que el uso de la vacuna o composición de la presente invención permite detectar una infección por CPV en un animal. En la presente se divulga que el uso de la vacuna o composición

de la presente invención permite detectar una infección por CPV en animales mediante la diferenciación entre animales infectados y vacunados (DIVA).

Artículos manufacturados

[00124] En una forma de realización, el objeto divulgado en la presente está dirigido a un conjunto de elementos para aplicar el método para generar o inducir una respuesta inmunológica, que puede comprender cualquiera entre las composiciones o vacunas inmunológicas recombinantes del CPV o composiciones o vacunas inmunológicas inactivadas del CPV, composiciones o vacunas virales recombinantes del CPV y las instrucciones para aplicar el método.

[00125] Otra forma de realización de la invención es un conjunto de elementos para emplear un método para inducir una respuesta inmunológica o protectora contra el CPV en un animal que comprende una composición o vacuna que comprende un antígeno del CPV de la invención y una composición o vacuna inmunológica viral recombinante del CPV e instrucciones para emplear el método de suministro en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunológica en el animal.

[00126] Otra forma de realización de la invención es un conjunto de elementos para emplear un método para inducir una respuesta inmunológica o protectora contra el CPV en un animal que comprende una composición o vacuna que comprende un antígeno del CPV de la invención y una composición o vacuna inmunológica recombinante inactivada del CPV e instrucciones para emplear el método de suministro en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunológica en el animal.

[00127] Aun otro aspecto de la presente invención se relaciona con

un conjunto de elementos para la vacunación de sensibilización-refuerzo de acuerdo con la presente invención como se describió anteriormente. El conjunto de elementos puede comprender por lo menos dos viales: un primer vial que contiene una vacuna o composición para la sensibilización-vacunación de acuerdo con la presente invención, y un segundo vial que contiene una vacuna o composición para el refuerzo de vacunación de acuerdo con la presente invención. El conjunto de elementos puede contener ventajosamente otros viales además del primero o segundo para una sensibilización-vacunación adicional o para refuerzos de vacunación adicionales.

[00128] Las siguientes formas de realización están comprendidas en la invención: En una forma de realización, se divulga una composición que comprende un antígeno del CPV o un fragmento o variante del mismo y un transportador, excipiente o vehículo farmacéuticamente o veterinariamente aceptable. En otra forma de realización, la composición descrita previamente, en donde el antígeno del CPV o un fragmento o una variante del mismo comprende un fragmento inmunogénico que comprende por lo menos 15 aminoácidos de un antígeno del CPV se divulga. En una forma de realización, se divulgan composiciones anteriores en donde el antígeno del CPV, o un fragmento o una variante del mismo, está parcialmente purificado. En una forma de realización, se divulgan composiciones anteriores en donde el antígeno del CPV o un fragmento o una variante del mismo está sustancialmente purificado.

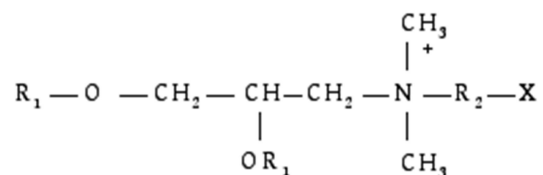
[00129] En una forma de realización, se divulgan composiciones anteriores en donde el antígeno del CPV o un fragmento o una variante del mismo es un polipéptido del CPV. En una forma de realización, se divulgan las

composiciones anteriores en donde el polipéptido CPV es una proteína de la cápside o un fragmento de la misma. En una forma de realización, se divulgan las composiciones anteriores en donde el antígeno del CPV o un fragmento o una variante del mismo tiene por lo menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6, o 8 a 10. En una forma de realización, se divulgan las composiciones anteriores en donde el antígeno del CPV está codificado por un polinucleótido que tiene por lo menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 2, 5, 7, 11 o 12. En otra forma de realización, se divulga un método para vacunar un animal susceptible al CPV que comprende administrar las composiciones anteriores al animal. En una forma de realización, se divulga un método para vacunar un animal susceptible al CPV que comprende un régimen de sensibilización/refuerzo. En una forma de realización, se divulga un polipéptido antigénico sustancialmente purificado expresado en células de insecto, en donde el polipéptido comprende: una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 80% de identidad de secuencia con un polipéptido cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6, o 8 a 10. En cualquier forma de realización, el animal es preferiblemente un felino o un canino. En una forma de realización, se divulga un método de diagnóstico de una infección por el CPV en un animal. En aún otra forma de realización, se divulga un conjunto de elementos para una vacunación de sensibilización/refuerzo que comprende por lo menos dos viales, en donde un primer vial contiene la composición de la presente invención y un segundo vial contiene una composición para el refuerzo-vacunación que comprende una composición que comprende un vector viral recombinante o una composición que comprende una composición

viral inactivada o una composición de un plásmido de ADN que contiene o expresa el antígeno del CPV.

[00130] Los transportadores o vehículos o excipientes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables son bien conocidas por un especialista en el arte. Por ejemplo, un transportador o vehículo o excipiente farmacéuticamente o veterinariamente aceptable puede ser una solución al 0,9% de NaCl (por ejemplo, salina) o una solución amortiguadora de fosfato. Otros transportadores o vehículos o excipientes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables que se pueden usar para los métodos de esta invención incluyen, pero en un sentido no taxativo, poli-(L-glutamato) o polivinilpirrolidona. Los transportadores o vehículos o excipientes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables pueden comprender cualquier compuesto o combinación de compuestos que facilitan la administración del vector (o proteína expresada a partir de un vector de la invención in vitro); ventajosamente, dicho transportador, vehículo o excipiente puede facilitar la transfección y/o mejorar la preservación del vector (o de la proteína). Las dosis y los volúmenes de dosis se describen en la presente en la descripción general y también pueden ser determinados por el especialista a partir de esta divulgación conjuntamente con el conocimiento en el arte, sin una experimentación innecesaria.

[00131] Los lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario que son ventajosamente pero no exclusivamente adecuados para plásmidos, son ventajosamente aquellos que tienen la siguiente fórmula:



en los cuales R1 es un radical alifático de cadena lineal saturada o insaturada que tiene 12 a 18 átomos de carbono, R2 es otro radical alifático que contiene 2 o 3 átomos de carbono y X es un grupo amina o hidroxilo, por ejemplo, el DMRIE. En otra forma de realización, el lípido catiónico puede asociarse con un lípido neutro, por ejemplo, el DOPE.

[00132] Entre estos lípidos catiónicos, se da preferencia a DMRIE (N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-propanamonio; WO96 / 34109), asociado ventajosamente con un lípido neutro, ventajosamente DOPE (dioleoil-amina fosfatidil-etanol; Behr, 1994), para formar DMRIE-DOPE.

[00133] Ventajosamente, la mezcla de plásmido con el adyuvante se forma extemporánea y en forma contemporánea ventajosamente con la administración de la preparación o poco antes de la administración de la preparación; Por ejemplo, poco antes o previo a la administración, se forma la mezcla de plásmido adyuvante, ventajosamente a fin de dar tiempo suficiente antes de la administración de la mezcla para formar un complejo, por ejemplo, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60 minutos antes de la administración, tales como aproximadamente 30 minutos antes de la administración.

[00134] Cuando DOPE está presente, la relación molar DMRIE:DOPE es ventajosamente aproximadamente 95:aproximadamente 5, de aproximadamente 5:aproximadamente 95, más ventajosamente de aproximadamente 1:aproximadamente 1, por ejemplo, 1:1.

[00135] La relación de peso de adyuvante DMRIE o DMRIE-DOPE:plásmido puede ser de entre aproximadamente 50:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 10, tal como entre aproximadamente 10:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 5, y entre aproximadamente 1:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 2, por ejemplo, 1:1 y 1: 2.

[00136] En otra forma de realización, el transportador, excipiente, adyuvante, o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable pueden ser una emulsión de agua-en-aceite. Los ejemplos de las emulsiones adecuadas de agua-en-aceite incluyen emulsiones de vacuna de agua-en-aceite que son estables y fluidas a 4°C contienen: entre 6 y 50%v/v de una fase acuosa que contiene antígeno, preferiblemente entre 12 y 25%v/v, entre 50 y 94%v/v de una fase de aceite que contiene en total o en parte, un aceite no metabolizable (por ejemplo, aceite mineral tal como aceite de parafina) y/o un aceite metabolizable (por ejemplo, aceite vegetal, o ácido graso, ésteres de poliol o alcohol), entre 0,2 y 20%p/v de agentes tensioactivos, preferiblemente entre 3 y 8%p/v, estando este último en su totalidad o en parte, o en una mezcla, ya sea de poliglicerol ésteres, tales ésteres de poliglicerol que son preferiblemente poliglicerol (poli) ricinoleatos, o aceite de ricino polioxietileno o de lo contrario aceites de ricino polioxietileno hidrogenados. Los ejemplos de tensioactivos que se pueden utilizar en una emulsión de agua-en-aceite incluyen ésteres de sorbitán etoxilados (por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxietileno (20) (TWEEN 80®), disponible de AppliChem, Inc., Cheshire, CT) y ésteres de sorbitán (por ejemplo, monooleato de sorbitán (SPAN 80®), disponible de Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Además, con respecto a una emulsión de agua-

en-aceite, véase también la Patente de los EE.UU. N°: 6.919.084, por ejemplo, el Ejemplo 8 de la misma, que se incorpora aquí por referencia. En algunas formas de realización, la fase acuosa que contiene el antígeno comprende una solución salina que comprende uno o más agentes amortiguadores. Un ejemplo de una solución amortiguadora adecuada es solución amortiguadora salina con fosfato. En una forma de realización ventajosa, la emulsión de agua-en-aceite puede ser una emulsión triple de agua/aceite/agua (W/O/W) (Patente de los EE.UU. N°: 6.358.500). Ejemplos de otras emulsiones adecuadas se describen en la Patente de los EE.UU. N°: 7.371.395.

[00137] Las composiciones y vacunas inmunológicas de acuerdo a la invención pueden comprender o consistir esencialmente en uno o más adyuvantes. Los adyuvantes adecuados para el uso en la práctica de la presente invención son (1) polímeros de ácido acrílico o metacrílico, anhídrido maleico y polímeros de derivados de alqueno, (2) secuencias inmunoestimulantes (ISS), tales como secuencias de oligodesoxirribonucleótidos que tienen una o más unidades CpG no metiladas (Klinman et al, 1996, WO98/16247), (3) una emulsión de aceite en agua, tal como la emulsión SPT descrita en la página 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach", publicado por M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de la misma obra, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, por ejemplo, DDA (5) citoquinas, (6) hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, (7) saponina o (8) otros adyuvantes descritos en cualquier documento citado e incorporado por referencia en la presente solicitud, o (9) cualesquiera combinaciones o mezclas de los mismos.

[00138] La emulsión aceite en agua (3), que es especialmente apropiada para vectores virales, puede basarse en: aceite de parafina de líquido ligero (tipo farmacopea europea), aceite de isoprenoide tal como escualano, escualeno, aceite resultante de la oligomerización de alquenos, por ejemplo, isobuteno o deceno, ésteres de ácidos o alcoholes que tienen un grupo alquilo de cadena lineal, tales como aceites vegetales, oleato de etilo, propilenglicol, di (caprilato/caprato), tri glicerol (caprilato/caprato) y dioleato de propilenglicol, o de alcoholes o ácidos grasos, ramificados, especialmente ésteres de ácido isoesteárico.

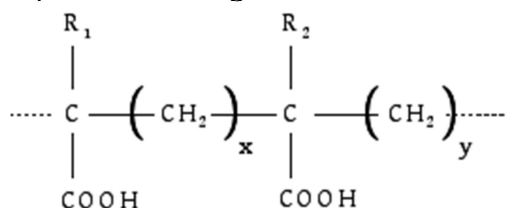
[00139] El aceite se utiliza en combinación con emulsionantes para formar una emulsión. Los emulsionantes pueden ser tensioactivos no iónicos, tales como: ésteres por un lado sorbitán, manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), glicerol, poliglicerol o propilenglicol y, por otro lado ácidos oleicos, isoesteáricos, ricinoleicos o hidroxiesteáricos, los ésteres que se etoxilan opcionalmente o bloques de copolímeros de polioxipropileno-polioxietileno, tales como Pluronic, por ejemplo, L121.

[00140] Entre los adyuvantes de polímeros de tipo (1), se da preferencia a polímeros de acrílico o ácido metacrílico entrecruzado, especialmente entrecruzados con éteres de polialqueno de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos bajo el nombre carbómero (Pharmeuropa, vol. 8, no. 2, junio de 1996). Un experto en la técnica también puede hacer referencia a la Patente de los EE.UU. N°: 2.909.462, que proporcionan tales polímeros acrílicos entrecruzados con un compuesto polihidroxílico que tiene al menos tres grupos hidroxilo, preferiblemente no más de ocho de tales grupos, los átomos de hidrógeno de al menos tres grupos

hidroxilo sustituidos por radicales alifáticos insaturados, que tienen al menos dos átomos de carbono. Los radicales preferidos son aquellos que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados también pueden contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos vendidos bajo el nombre Carbopol (BF Goodrich, Ohio, EE.UU.) son especialmente adecuados. Se entrecruzan con sacarosa de alilo o pentaeritritol de alilo. Entre ellos, se hace referencia a Carbopol 974P, 934P y 971P.

[00141] En cuanto a los copolímeros derivados de anhídrido maleico-alqueno, se da preferencia a EMA (Monsanto), que son de cadena lineal o copolímeros de anhídrido maleico-etileno entrecruzados y son, por ejemplo, entrecruzados por divinil éter. También se hace referencia a J. Fields et al., 1960.

[00142] Con respecto a la estructura, los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y EMA están formados preferentemente por unidades básicas que tienen la siguiente fórmula:



en donde:

- R₁ y R₂, que pueden ser iguales o diferentes, representan H o CH₃
- X = 0 ó 1, preferiblemente x = 1
- Y = 1 ó 2, con x + y = 2.

Para EMA, x = 0 y y = 2 y para carbómeros x = y = 1.

[00143] Estos polímeros son solubles en agua o solución salina

fisiológica (20 g/l de NaCl) y el pH puede ajustarse de 7,3 a 7,4, por ejemplo, con hidróxido de sodio (NaOH), para proporcionar la solución adyuvante en la que el vector(es) de expresión puede incorporarse. La concentración de polímero en la composición inmunológica o de vacuna final puede variar entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1,5% p/v, entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 1% p/v, y entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,4% p/v.

[00144] La citoquina o citoquinas (5) pueden estar en la forma de proteínas en la composición inmunológica o de vacuna, o pueden coexpresarse en el huésped con el inmunógeno o inmunógenos o epitope(s) de los mismos. Se da preferencia a la co-expresión de la citoquina o citoquinas, ya sea por el mismo vector que expresa el inmunógeno o inmunógenos o epitope(s) del mismo, o por un vector separado del mismo.

[00145] La invención comprende la preparación de tales composiciones combinadas; por ejemplo mezclando los componentes activos, de forma ventajosa entre sí y con un transportador, citoquinas, y/o diluyente.

[00146] Las citoquinas que pueden utilizar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), interferón α (IFN α), interferón β (IFN β), interferón γ , (IFN γ), interleuquina-1 α (IL-1 α), interleuquina-1 β (IL-1 β), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-5 (IL-5), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-7 (IL-7), interleuquina-8 (IL-8), interleuquina-9 (IL-9) , interleuquina-10 (IL-10), interleuquina-11 (IL-11), interleuquina-12 (IL-12), factor de necrosis tumoral α (TNF α), factor de necrosis tumoral β (TNF) ácido

poliinosínico y policitidílico, oligodesoxinucleótidos citidina-fosfato-guanosina (CpG ODN), y el factor de crecimiento de transformación β (TGF β). Se entiende que las citoquinas pueden coadministrarse y/o administrarse secuencialmente con la composición inmunológica o vacuna de la presente invención. Así, por ejemplo, la vacuna de la presente invención puede contener también una molécula de ácido nucleico exógeno que expresa in vivo una citoquina adecuada, por ejemplo, una citoquina adaptada al huésped a vacunar o en la cual una respuesta inmunológica puede provocarse (por ejemplo, una citoquina bovina para preparaciones para administrarse a bovinos).

[00147]

[00148] En el caso de una composición y/o vacuna inmunológica basada en polipéptidos expresados en baculovirus/células de insecto, una dosis puede incluir entre aproximadamente 1 μ g y aproximadamente 2000 μ g, entre aproximadamente 50 μ g y aproximadamente 1000 μ g y entre aproximadamente 100 μ g y aproximadamente 500 μ g de antígeno, epítipo o inmunógeno del CPV. La dosis puede incluir entre aproximadamente 10² y aproximadamente 10²⁰, entre aproximadamente 10³ y aproximadamente 10²⁰, entre aproximadamente 10⁴ y aproximadamente 10²⁰ VLP. Los volúmenes de dosis pueden ser de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 ml, entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 5 ml. En general, el especialista tendrá en cuenta las numerosas estrategias de dosificación y podrá optimizar la dosificación sin realizar trabajos que no fueran de rutina.

[00149] En un aspecto, la invención provee una vacuna combinada que comprende un componente de una partícula tipo virus (VLP) y un componente de un virus vivo modificado (MLV), en donde ambos VLP y MLV

están dirigidos contra el mismo patógeno o enfermedad, y en donde dicha vacuna combinada permite neutralizar los anticuerpos derivados por vía materna (MDA).

[00150] En algunas formas de realización, la vacuna combinada provee una inmunidad protectora con una sola dosis.

[00151] En algunas formas de realización, el patógeno o la enfermedad es el parvovirus canino (CPV).

[00152] En algunas formas de realización, el patógeno o la enfermedad es el virus de la enfermedad de fiebre aftosa (FMDV).

[00153] En algunas formas de realización, el componente VLP de la combinación comprende por lo menos un 10% de VLP del CPV (p/p) en función del contenido total de proteínas.

[00154] En algunas formas de realización, el componente VLP comprende por lo menos un 20% VLP del CPV (p/p).

[00155] En algunas formas de realización, la VLP del CPV es expresada mediante un vector de baculovirus en células de insecto.

[00156] En algunas formas de realización, la VLP del CPV comprende por lo menos una proteína de la cápside del CPV.

[00157] En algunas formas de realización, la VLP del CPV comprende un polipéptido del CPV cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6, 8, 9 ó 10; o la VLP del CPV comprende un polipéptido del CPV que presenta por lo menos un 90% de identidad con una secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6, 8, 9 ó 10.

[00158] En algunas formas de realización, la VLP del CPV comprende un polipéptido del CPV codificado por un polinucleótido cuya

secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 2, 5 ó 7; o la VLP del CPV comprende un polipéptido del CPV codificado por un polinucleótido que presenta por lo menos un 90% de identidad con una secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 2, 5 ó 7.

[00159] En algunas formas de realización, la vacuna combinada no comprende un adyuvante y opcionalmente comprende un transportador, excipiente o vehículo farmacéuticamente o veterinariamente aceptable.

[00160] En otro aspecto, la invención provee un plásmido de utilidad para producir VLP del CPV, que comprende un polinucleótido que codifica un antígeno del CPV cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6 ú 8-10, o una secuencia de polinucleótidos que presenta por lo menos un 90% de identidad con una secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6 ú 8-10.

[00161] En algunas formas de realización, el polinucleótido comprende o consiste en la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 2, 5, 7, 11 ó 12.

[00162] En algunas formas de realización, el plásmido consiste en la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 11 ó 12.

[00163] En algunas formas de realización, el plásmido se transforma de manera estable en una célula de insecto que expresa los VLP del CPV.

[00164] En otro aspecto, la invención provee una cápside vacía del CPV o una VLP del CPV sustancialmente purificada expresada en células de insecto, en donde dicha cápside vacía o VLP del CPV comprende un polipéptido cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6 ú 8-10; o, la

cápside vacía o VLP del CPV comprende un polipéptido que presenta por lo menos un 90% de identidad con una secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6 ú 8-10.

[00165] En algunas formas de realización, la cápside vacía o VLP del CPV consiste en un polipéptido cuya secuencia se muestra en la SEQ ID N°: 1, 3, 4, 6 ú 8-10.

[00166] En otro aspecto, la invención provee un método para generar una respuesta inmunológica en un animal contra el CPV que comprende administrar al animal las composiciones, vacunas, vacunas combinadas y VLP que se divulgan en la presente.

[00167] En algunas formas de realización, la respuesta inmunológica protege a los vacunados contra una exposición subsiguiente a un CPV virulento. La exposición puede ser natural o experimental.

[00168] En algunas formas de realización, la respuesta inmunológica se genera en los animales vacunados independientemente de la presencia en dichos animales de niveles altos de anticuerpos derivados por vía materna (MDA) contra el CPV. El término “niveles altos” tiene el significado habitual y en general se refiere a niveles de MDA que impide la capacidad de las vacunas del arte anterior para generar una respuesta protectora fuerte en animales MDA-positivos.

[00169] A continuación la presente invención se describirá con referencia a los siguientes ejemplos no taxativos.

EJEMPLOS

[00170] A menos que se indique lo contrario, la construcción de insertos, plásmidos y vectores virales o de baculovirus recombinantes de ADN

se llevó a cabo usando las técnicas estándar de biología molecular descritas por J. Sambrook *et al.*, (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

Ejemplo 1: Construcción y expresión de antígenos de la cápside del CPV en un sistema de baculovirus/células de insecto

[00171] Objetivo: Generar un plásmido de transferencia basado en el pVL1393 que codifica la proteína de la cápside CPV del CPV (parvovirus canino, cepa *Souriou*, serotipo 2c) optimizado para células de insecto y posterior generación del baculovirus recombinante BacMEB072 con el fin de expresar partículas tipo virus (VLP). La secuencia de referencia era la cepa *Souriou* 2c (Merial), con la denominación en Genbank BAD34656/Swissprot P61826 (SEQ ID N°: 1).

[00172] El gen de la cápside del CPV (1755 bp) codifica un polipéptido de 584 aminoácidos (que no contiene un péptido señal). Se clonó la secuencia que codifica la proteína VP2 del CPV (SEQ ID N°: 1) y se optimizaron los codones de la correspondiente secuencia de ADN (SEQ ID N°: 5) para células de insecto. Los potenciales dominios funcionales se muestran en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: Dominios funcionales potenciales (de acuerdo con la anotación de Swiss-Prot para P61826)

Dominios putativos	De-A (o posición)	Longitud
Secuencia señal	no	
Cadena madura de VP2	1-584	584
N-glicosilación	25-47-64-180-443-505-517	
Sitios de N-glicosilación	490-494	

[00173] Generación del plásmido pMEB072: La cápside del CPV optimizada para su expresión en insectos (SEQ ID N°: 1) se clonó en el

plásmido comercial pVL1393 (Pharmlngen) usando los sitios XbaI y Bam HI tanto del vector como del inserto para generar el plásmido de expresión pMEB072.

[00174] Generación del baculovirus recombinante BacMEB072: El vector de baculovirus usado fue el AcNPV modificado mediante una supresión letal que solamente se rescata por medio de recombinación homóloga (BaculoGold DNA, Pharmlngen). Se usó el plásmido pMEB072 para generar un baculovirus recombinante, que codifica al gen de la cápside del CPV de la cepa *Souriou* serotipo 2c bajo el control del promotor de la polihedrina, mediante recombinación homóloga. Se cotransfectaron células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (Sf)9 con el plásmido pMEB072 y el ADN del AcNPV linealizado con corte triple con Bsu36I, de acuerdo con el protocolo del proveedor (Baculogold, Pharmlngen). El baculovirus recombinante del sobrenadante de cotransfección se purificó en placa dos veces. Se amplificaron cinco clones (pasaje 1) a 28 °C a una escala en frasco con monocapa de 25 cm². Las células y los sobrenadantes infectados fueron analizados por la expresión de la cápside del CPV mediante transferencia puntual usando anticuerpos monoclonales específicos del antígeno de la cápside del CPV (CPV103B10A). El clon 1 mostró un perfil de transferencia puntual correcto. Este clon se amplificó adicionalmente (pasaje 2) a 28 °C a una escala de 50 ml en un Erlenmeyer (suspensión) a 105 rpm. Se realizó un tercer pasaje (pasaje 3) a una escala de 200 ml para obtener una solución madre del virus utilizada para la expresión de proteínas. Esta solución madre del virus se tituló luego mediante un ensayo en placa. La solución madre del virus se obtuvo usando el medio SF900II, suplementado con 2% de FCS. Después de la titulación, se usó la solución

madre del baculovirus recombinante (Pasaje 3) para producir la proteína en un medio libre de suero.

Análisis de la expresión del baculovirus BacMEB072

Tabla 2

Plásmido	Tamaño (AA)	PM (kDa)	Péptido señal	Marca	N-glicosilación	Puente disulfuro	Ubicación
pMEB062	545	59,2	no	no	10 sitios potenciales	No	secreción

[00175] Se infectaron células de insecto (Sf9) con el BacMEB072 a una Multiplicidad De Infección (MOI) de 1 pfu/ml. Las células de insecto se cultivaron a 105 rpm en medio Sf900II sin FCS por 4 días a 28 °C. La producción de proteínas se analizó sometiendo los lisados de células Sf9 completas y sobrenadante de cultivo a SDS-PAGE (4-20%, Invitrogen), seguido por una transferencia puntual con anticuerpos monoclonales (CPV103B10A). La solubilidad de las proteínas expresadas se estudió mediante lisado de los pélets celulares en solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl + anti-proteasa 500 mM), sonicación 3X (15 seg a un 20% de potencia, 30 seg de espera, 15 seg a un 20% de potencia; 5 min de lisis sobre hielo). Las proteínas solubles se separaron del material insoluble mediante centrifugación (30 min a 11.000 rcf a 4 °C).

[00176] Se expresó una banda del tamaño esperado en el pélet celular de las células infectadas lisadas y clarificada y se observó mediante tinción con Coomassie. La proteína se acumuló en las células, pero también se detectó en la fracción soluble después de la lisis. La identidad de la proteína VP2 se confirmó mediante transferencia puntual usando un anticuerpo monoclonal específico contra la cápside del CPV (CPV103B10A).

[00177] El análisis microscopía electrónica (EM) confirmó el

autoensamblaje correcto de la proteína de la cápside en VLP, que tenían un diámetro de 25-30 nm y una morfología de viriones tipo parvovirus correcta (Figura 4). Las condiciones óptimas para la producción de las VLP incluían usar una MOI = 0,1 y la cosecha a los 5 días de postinfección. Si bien se prevén otras condiciones, estas condiciones particulares permitieron obtener una concentración de aproximadamente 10^{11} VLP por ml.

Ejemplo 2: Producción del BacMEB073 que contiene la VP2 truncada del CPV

[00178] El objetivo fue generar un plásmido de transferencia basado en el pVL1393 que codifica la proteína VP2 truncada de la cápside del CPV (parvovirus canino, cepa Souriou, serotipo 2c) optimizado para mamíferos y luego generar el correspondiente baculovirus BacMEB073 recombinante, que expresa las VLP. Se suprimieron los 9 aminoácidos N-terminales (-9AA) en un esfuerzo por mejorar la expresión de VP2 sin impedir la formación de las VLP (Hurtado et al., *Journal of Virology*, agosto de 1996). Además, se agregaron tres aminoácidos (M, L y K) en un esfuerzo por mejorar la estructura y formación de la cápside (Gilbert et al., *Journal of Nanobiotechnology*, 2006). Antes de esta divulgación, se desconocía el efecto que tendría la introducción de supresiones así como de inserciones sobre la expresión del VP2 del CPV y la subsiguiente formación de la cápside.

[00179] El gen de la VP2 truncada (supresión de 9 aminoácidos en el extremo N-terminal reemplazados por los aminoácidos adicionales MLK) y optimizada para mamíferos (Geneart) también se clonó en el plásmido pVL1393 usando los sitios Bam HI y Xba I tanto del vector como del inserto.

[00180] Generación del vector de baculovirus y expresión de

proteínas. Vector de baculovirus: AcNPV, modificado mediante una supresión letal que solamente se rescata por medio de recombinación homóloga (BaculoGold DNA, Pharmingen).

[00181] Generación del baculovirus recombinante BacMEB073: Se usó el plásmido pMEB073 para generar un baculovirus recombinante, que codifica al gen de la cápside truncada del CPV de la cepa *Souriou* serotipo 2c bajo el control del promotor de la polihedrina, mediante recombinación homóloga. Se cotransfectaron células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (Sf)9 con el plásmido pMEB073 y el AcNPV ADN linealizado con corte triple con Bsu36I, de acuerdo con el protocolo del proveedor (Baculogold, Pharmingen). El baculovirus recombinante del sobrenadante de cotransfección se purificó en placa dos veces. Se amplificaron cinco clones (pasaje 1) a 28 °C a una escala en frasco con monocapa de 25 cm². Las células y los sobrenadantes infectados fueron analizados por la expresión de la cápside del CPV mediante transferencia puntual usando anticuerpos monoclonales específicos del antígeno de la cápside del CPV (CPV103B10A). El clon 1 mostró un perfil de transferencia puntual correcto. Este clon se amplificó adicionalmente (pasaje 2) a 28 °C a una escala de 50 ml en un Erlenmeyer (suspensión) a 105 rpm. Se realizó un tercer pasaje (pasaje 3) a una escala de 200 ml para obtener una solución madre del virus utilizada para la expresión de proteínas. Esta solución madre del virus se tituló luego mediante un ensayo en placa. La solución madre del virus se obtuvo usando el medio SF900II, suplementado con 2% de FCS.

[00182] Después de la titulación, se usó la solución madre del baculovirus recombinante (Pasaje 3) para producir la proteína en un medio libre

de suero.

Análisis de la expresión

Tabla 3: Recombinantes esperados

Plásmido	Tamaño (AA)	PM (kDa)	péptido señal	Sitio de glicosilación	N-Puente disulfuro	Ubicación subcelular
pMEB073	578	64,1	no	11, 19, 40, 50, 58, 66, 72, 79, 80, 511	no	secretado

[00183] Se infectaron células de insecto (Sf9) con el BacMEB073 a una MOI = 1 pfu/ml. Las células de insecto se cultivaron a 105 rpm en medio Sf900II sin FCS durante 4 días a 28 °C. La producción de proteínas se analizó sometiendo los lisados de células Sf9 completas y el sobrenadante de cultivo a SDS-PAGE (4-20%, Invitrogen), seguido por una transferencia puntual con anticuerpos monoclonales (CPV103B10A).

[00184] La solubilidad de las proteínas expresadas se estudió mediante lisado de los pélets celulares en solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl + anti-proteasa 500 mM), sonicación 3X (15" a un 20% de potencia, 30" de espera, 15" a un 20% de potencia; 5 min de ruptura sobre hielo). Las proteínas solubles se separaron del material insoluble mediante centrifugación (30 min a 11.000 rcf a 4 °C).

[00185] Resultados y conclusiones: Se expresa una banda del tamaño esperado de 64 kDa en el pélet celular de las células infectadas lisadas y clarificada y se observó mediante tinción con Coomassie. La proteína se acumuló en las células, pero era detectable en la fracción soluble después de la lisis. La identidad de la proteína VP2 se confirmó mediante transferencia puntual usando un mAb específico de la cápside del CPV (CPV103B10A).

[00186] El análisis por EM confirmó el autoensamblaje de la

proteína de la cápside en VLP con un diámetro de 25-30 nm, así como una morfología correcta de los viriones tipo parvovirus a una concentración de 10^{12} VLP por ml (Figura 4). La producción de VLP era óptima a una MOI = 0,1 con cosecha 5 días de postinfección, si bien también es posible que otras condiciones proporcionen niveles altos de VLP.

Ejemplo 3: Vacunación de caninos con la proteína de la cápside del CPV expresada en baculovirus

[00187] El objetivo primario del estudio fue evaluar y comparar la seguridad y la inmunogenicidad de las partículas tipo virus (VLP) 2 de la cepa CPV2c Souriou en cachorros (es decir, BacMEB072 y BacMEB073, descritos en los Ejemplos 1 y 2). Un objetivo secundario fue evaluar los efectos de adyuvante del hidróxido de aluminio/saponina o Iscomatrix sobre la inmunogenicidad de la VLP producidas por BacMEB072 y BacMEB073. Se vacunaron cachorros de ocho semanas de vida y se estudiaron como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4: Diseño experimental para el estudio de la VP2 truncada de la VLP del CPV versus la VP2 de longitud completa de la MLV del CPV

Grupo	Antígeno: VLP CPV2	Adyuvante	Vacunación	Monitoreo clínico	Sueros	Sangre completa (heparina sódica)
A (n = 6)	BacME073 (truncado)	No contiene	D0 y D28 por SC con 1 ml que contiene 25 µg de ingrediente activo	D0, D0+4-6 h, D1, D2, D28, D28+4-6 h, D29, D30	D-7, D0*, D7, D28, D35, D42, D70	D35, D42
B (n = 6)	BacME073 (truncado)	Gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (1,7 mg) + saponina (12 unidades hemolíticas)				
C (n = 6)	BacME072 (no truncado)	No contiene				

D (n = 6)	BacME072 (no truncado)	Gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (1,7 mg) + saponina (12 unidades hemolíticas)				
E (n = 6)	BacME072 (no truncado)	Iscomatrix (75 µg)				
F (n = 5)	Control		Control			

* antes de la vacunación

[00188] En términos de seguridad, la combinación de $\text{Al}(\text{OH})_3$ /saponina no indujo reacciones generales o ningún otro signo excepto calor e hinchazones locales. Se observó una hinchazón leve por 3 a 4 días después de cada vacunación en la mayoría de los perros. Iscomatrix parece ser un adyuvante muy seguro. En términos de inmunogenicidad, la vacunación de los cachorros con las VLP CPV2 permitió inducir una respuesta inmunológica tanto humoral como celular sin grandes diferencias entre las VP2 truncada o de longitud completa asociadas en las VLP. Notablemente, la persistencia de la respuesta inmunológica humoral aumentaba cuando las VLP se aplicaban con adyuvante, ya sea con $\text{Al}(\text{OH})_3$ /Saponina o con Iscomatrix, sin una diferencia significativa entre los dos adyuvantes investigados. Aún más, el adyuvante Iscomatrix aumentó la magnitud de la respuesta gamma-IFN no solo en comparación con el grupo sin adyuvante sino también con el grupo de $\text{Al}(\text{OH})_3$ y saponina.

Ejemplo 4: Vacunación de caninos con VLP del CPV o MLV del CPV (cepas Souriou o Bari) expresadas en baculovirus

[00189] El objetivo del estudio fue comparar la respuesta inmunológica en cachorros vacunados con las VLP del CPV, la MLV Souriou

del CPV o la MLV Bari del CPV. En el primer experimento se comparó 1,52 log₁₀ TCID 50/ml (IFI) de Souriou; 1,0 log₁₀ TCID 50/ml (HA) de Bari; y la VLP del pMEB072 (los resultados se muestran en la Figura 8). En el segundo experimento se comparó 2,21 log₁₀ TCID 50/ml (IFI) de Souriou; 2,0 log₁₀ TCID 50/ml (HA) de Bari; y VLP producidas en el pMEB073 en adyuvante de Al(OH)₃ + saponina (los resultados se muestran en la Figura 9). Finalmente, en el tercer experimento se comparó 3,81 log₁₀ TCID 50/ml (IFI) de Souriou; 3,0 log₁₀ TCID 50/ml (HA) de Bari; y VLP producidas en el pMEB072 en el adyuvante de Al(OH)₃ + saponina (los resultados se muestran en la Figura 10). Tomados en conjunto, estos resultados mostraron que las VLP del CPV, elaboradas de acuerdo con la presente divulgación, proporcionó una respuesta inmunológica comparable en comparación con el ejemplo de MLV del CPV. Más importante aún, las VLP pudieron inducir una respuesta inmunológica más rápida en comparación con las dosis bajas e intermedias de cualquiera de las cepas de MLV.

[00190] Ejemplo 5: Vacunación de caninos con la MLV del CPV o con la proteína de la cápside del CPV + MLV CPV expresados en baculovirus

[00191] El objetivo del estudio fue evaluar la inmunogenicidad de diferentes candidatos de vacuna administrados a diferentes dosis y por vía subcutánea en cachorros con anticuerpos maternos. Antes de este estudio, no se sabía si las VLP del CPV podían neutralizar los anticuerpos maternos para inducir una inmunidad protectora en cachorros.

Tabla 5: Diseño experimental para el estudio de VLP del CPV versus MLV del CPV

Grupo	Vacuna administrada,	Muestra de	Análisis
-------	----------------------	------------	----------

		SC, el Día 0	sangre (6 ml /cachorro)	
A	MLV del CPV (n = 9)	MLV del CPV2 5,5 log ₁₀ (1 ml)	D0*, D7, D14, D21, D28, D34, D42, D56	Determinación del anticuerpo anti-CPV (Inhibición de hemaglutinación y/o ELISA)
B	VLP del CPV + MLV del CPV (n = 10)	VLP del CPV <i>Dosis blanco:</i> 500 µg (1 ml) + MLV del CPV2 5,5 log ₁₀ (1 ml)		

[00192] Según se indica en la Figura 11, la Figura 12 y la Tabla 6, los títulos del anticuerpo anti-CPV eran significativamente más altos en el grupo de MLV + VLP. Estos datos indican que la adición de las VLP del CPV a la formulación de vacuna era suficiente para neutralizar los anticuerpos maternos, un resultado que fue sorpresivo e inesperado. Los inventores prevén que las VLP capturan una proporción significativa de los MDA del CPV en la circulación lo cual a su vez permite que las VLP y MLV del CPV inmunicen activamente a los cachorros.

[00193] **Tabla 6: Títulos del anticuerpo anti-CPV (IHA) según los días de posvacunación**

Grupo	ID	0	7	14	21
MLV	2252826	10	<5	2560	320
MLV	2253001	10	<5	1280	<5
MLV	2284928	80	<5	<5	<5
MLV	2284973	80	20	<5	20
MLV	2284975	80	20	<5	10
MLV	2285160	<5	<5	<5	5
MLV	2285360	160	40	<5	20
MLV	2285367	40	<5	<5	20
MLV	2285387	10	5	<5	<5
MLV+VLP	2252827	80	640	1280	320
MLV+VLP	2252828	5	160	5120	2560
MLV+VLP	2284818	10	640	2560	2560
MLV+VLP	2284843	10	640	2560	1280
MLV+VLP	2284861	20	1280	1280	1280
MLV+VLP	2284935	40	640	1280	320
MLV+VLP	2284941	80	640	1280	640

MLV+VLP	2284943	20	320	1280	1280
MLV+VLP	2284978	40	1280	1280	1280
MLV+VLP	2285000	80	320	640	640

MLV: vacuna viva modificada (PRIMODOG® 5,5 log10/ml)

VLP: partícula tipo virus, 500 µg

Ejemplo 6: Vacunación de caninos con proteínas de la cápside del CPV expresada en baculovirus, MLV del CPV o CDV en vector de adenovirus

[00194] El objetivo del estudio fue evaluar la inmunogenicidad de varias dosis de los diferentes candidatos de vacuna administrados por distintas rutas. Los distintos candidatos comprendían VLP del CPV y adenovirus recombinantes que expresan los genes ya sea del CPV o del CDV (moquillo canino).

Tabla 7: Diseño experimental para el estudio de VLP del CPV versus Adeno CPV versus Adeno CDV

Grupo		Vacuna administrada el D0 y el D28** Dosis y ruta	Muestras tomadas	Análisis	
A	VLP+_1 (n = 6)	VLP CPV <i>Dosis alta</i> (500 µl de solución madre/dosis) SC (1 ml)	<u>Viales de sangre:</u> D0, D7, D14, D21, D28, D35, D42, D56 y D63	Determinación de los anticuerpos anti-CDV (ELISA y/o inhibición de hemaglutinación)	Respuesta inmunológica celular y/o de células B de memoria
B	VLP+_2 (n = 6)				
C	VLP-** (n = 6)	VLP CPV <i>Dosis baja</i> (50 µl de solución madre/dosis) SC (1 ml)	<u>Viales de sangre</u>		
D	VLP_Oral (n = 6)	VLP CPV 2 ml de solución madre no diluida Oral	<u>heparinizados:</u> D7, D31, D35, D56		

E	Ad5_CPV+ (n = 6)	Adeno CPV vAD3032 <i>dosis alta</i> dosis blanco (8,64 log 10 TCID 50/ml*) SC (1 ml)			
F	Ad5_CPV (n = 6)	Adeno CPV vAD3032 <i>dosis baja</i> (dosis blanco 7,64 log 10 TCID 50/ml*) SC (1 ml)			
G	Ad5_CDV- (n = 6)	Adeno CDV vAD3031 <i>dosis baja</i> (dosis blanco 7,34 log 10 TCID 50/ml*) SC (1 ml)		Determinación de los anticuerpos anti-CDV (seroneutralización)	
H	Ad5_CDV+ (n = 6)	Adeno CDV vAD3031 <i>dosis alta</i> (dosis blanco 8,34 log 10 TCID 50/ml*) SC (1 ml)			

[00195] Según se indica en la Figura 13, los Grupos A y E indujeron niveles protectores de títulos de anticuerpo anti-CPV en los cachorros.

Ejemplo 7: Vacunación de caninos con la proteína de la cápside del CPV (VLP) expresada en baculovirus, VLP + RECOMBITEK® C4, RECOMBITEK® C4 solo o NOBIVAC® 3

[00196] El objetivo del estudio fue evaluar la respuesta de anticuerpos después de la administración de varias formulaciones de vacunas multivalentes experimentales que contiene una MLV del CPV-2 convencional o una vacuna de partículas tipo virus (VLP) recombinante del CPV-2c, expresada

en baculovirus y una vacuna competidora/comercial en perros con MDA del CPV.

[00197] Se asignaron aleatoriamente cuarenta perros de la raza Beagle de 6-7 semanas de vida, positivos para anticuerpos derivados por vía materna (MDA) de hembras inmunizadas previamente contra el CPV durante la preñez, a cuatro grupos de tratamiento (n = 10 perros) según camada y título de anticuerpo. Se usaron los títulos de las muestras de sangre recolectadas el Día -27 para la randomización. Todos los perros fueron vacunados dos veces, con un intervalo de 21 días, con la vacuna asignada de acuerdo con siguiente Tabla 8. Los cachorros tienen Ab derivados por vía materna (MDA) contra el CPV al D0.

Tabla 8: Diseño experimental para el estudio con VLP del CPV versus RECOMBITEK® C4 y NOBIVAC®

Grupos	Vacunación el Día 0 y el Día 21	Títulos	N° perros
1	VLP del CPV Vacuna de prueba N° 4 (1 ml) *VLP del CPV-2c	273,5 µg de proteínas totales Título de 7,1 Log HA	10
2	VLP del CPV N° 4 (0,5 ml) *VLP CPV-2c + RECOMBITEK® C4 N° 1 (CDV- CAV-CPi, CPV2)*** (1 ml)	273,5 µg de proteínas totales Título de 7,1 Log HA CPV: 6,9 TCID 50/ml CDV: 7,1 TCID 50/ml CPi: 5,8 TCID 50/ml CAV2: 6,0 TCID 50/ml	10
3	RECOMBITEK® C4 N° 1 (CDV- CAV-CPi, CPV2)*** (1 ml)	CPV: 6,9 TCID 50/ml CDV: 7,1 TCID 50/ml CPi: 5,8 TCID 50/ml CAV2: 6,0 TCID 50/ml	10
4	NOBIVAC® 3 (CDV- CAV2-CPV2) (1 ml)	Desconocido	10

*Partículas tipo virus del parvovirus canino VP2: VLP del CPV-2c

**Administrada del mismo lado que la vacuna concurrente

aproximadamente a una distancia de 3 cm

*** la vacuna CDV-CAV-CPI-CPV2 se denomina C4

HA: Hemaglutinación en 0,5 ml

[00198] Se recolectó sangre de todos los perros los Días 0, 7, 15, 21, 28, 35 y 42 y los sueros se evaluaron según los anticuerpos anti-CPV con los ensayos HAI y anticuerpos de neutralización de suero(SNA).

[00199] Los títulos del CPV HAI se informaron como la inversa de la dilución más alta que impide la hemaglutinación y un valor <20 era considerado negativo.

[0200] Excepto por 2 perros en el grupo 3 (C4), todos los perros de cada grupo dieron positivo para CPV en el ensayo HAI el Día 0, antes de la vacunación. La seroconversión después de la vacunación se definió como un aumento del título en 4 veces o más desde el Día 0. Después de la primera vacunación, 6 de los 10 perros vacunados con las VLP-CPV2c (Grupo 1) y 6 de los 10 perros vacunados con las VLP-CPV2c- C4 (Grupo 2) habían seroconvertido para el Día 7. No hubo respondedores en los grupos 3 y 4 (es decir, los grupos no contienen VLP) para el Día 7. Para el Día 21, 5 de los 10 perros del Grupo 2 (VLP-CPV2c-C4), 4 de 10 del Grupo 1 (VLP-CPV2c), 3 de 10 del Grupo 4 (NOBIVAC3[®]) y 2 de 10 del Grupo 3 (C4) habían seroconvertido (Figura 15).

[0201] Después de la segunda vacunación, para el Día 35 (2 semanas de post-vax) se observó seroconversión en todos los perros de los Grupos 2 (VLP-CPV2c- C4) y 4 (NOBIVAC3[®]) seguido por 9 en el Grupo 3 (C4) y 8 en el Grupo 1 (VLP-CPV2c). El tratamiento con las VLP + C4 (Grupo 2) indujo la media geométrica más alta de título de anticuerpos durante todo el estudio.

Véase la Figura 17. Siete días después de V2, el Día 28, la GMT de este grupo era -7,5 veces más alta que con la VLP solamente (GMT = 520), -9 veces más alta que C4 solamente (GMT = 422) y -28 veces más alta que el valor del grupo con NOBIVAC3® (GMT = 139).

Tabla 9: Estudio de los títulos IHA por ID y Día para las VLP del CPV versus RECOMBITEK® C4 y NOBIVAC®

			Día						
			0	7	15	21	28	35	42
Grupo	Vacuna	ID del perro							
1	VLP CPV-2c	LCR-5	80	40	<20	<20	40	40	40
		LGR-5	40	40	<20	<20	640	1280	1280
		LRR-5	20	160	160	160	10240	1280	1280
		LVQ-5	20	80	80	80	2560	640	640
		QQR-5	20	320	40	20	160	160	160
		RCR-5	40	320	80	20	640	640	640
		RDR-5	20	160	320	640	2560	1280	640
		RGQ-5	20	320	320	320	1280	640	320
		RLQ-5	80	80	40	<20	80	160	320
		RRR-5	80	40	20	<20	80	320	160
2	VLP CPV-2c+ rDAPPI	LDR-5	20	160	160	40	5120	1280	640
		LHR-5	40	40	<20	<20	1280	640	640
		LSQ-5	20	1280	1280	640	20480	5120	2560
		LWQ-5	40	160	5120	2560	20480	5120	5120
		PKR-5	40	20	<20	<20	1280	1280	1280
		PLQ-5	40	80	1280	640	20480	5120	5120
		QRR-5	20	160	1280	1280	5120	2560	2560
		RHQ-5	20	320	640	1280	5120	2560	1280
		ROQ-5	40	40	20	<20	320	640	640
		RSQ-5	40	160	40	40	1280	640	320
3	rDAPPI	LPR-5	20	<20	160	160	1280	640	640
		LQR-5	20	<20	160	160	640	640	320
		LTQ-5	20	<20	<20	<20	640	320	640
		PIR-5	20	<20	<20	<20	160	320	640
		POQ-5	<20	<20	<20	<20	1280	640	1280
		QSR-5	40	20	20	<20	160	320	160
		RER-5	<20	<20	<20	<20	640	320	640
		RIQ-5	20	<20	<20	<20	1280	320	640
		RPQ-5	80	40	20	20	<20	<20	<20
		RTQ-5	20	20	<20	<20	640	320	320
4	Nobivac	LER-5	40	20	<20	<20	<20	640	640

		LFR-5	20	<20	<20	<20	640	1280	1280
		LUQ-5	40	20	<20	<20	40	1280	1280
		PJR-5	20	<20	<20	<20	<20	640	640
		QTR-5	40	20	<20	<20	160	2560	1280
		RFR-5	20	<20	1280	640	1280	1280	1280
		RJQ-5	20	<20	80	640	1280	2560	1280
		RKR-5	40	20	20	<20	40	1280	1280
		RQR-5	40	20	<20	<20	160	320	320
		RUQ-5	40	20	20	640	160	320	640

Tabla 10: Estadística general para el estudio de las VLP del CPV versus RECOMBITEK® C4 y NOBIVAC®

Día	Grupo	Vacuna	N	Media geométrica	Media aritmética	Mediana	Mín.	Máx.
0	1	VLP CPV-2c	10	34,82	42,00	30	20,0	80,0
	2	VLP CPV-2c+ rDAPPI	10	30,31	32,00	40	20,0	40,0
	3	rDAPPI	10	24,62	28,00	20	20,0	80,0
	4	Nobivac	10	30,31	32,00	40	20,0	40,0
7	1	VLP CPV-2c	10	113,14	156,00	120	40,0	320,0
	2	VLP CPV-2c+ rDAPPI	10	121,26	242,00	160	20,0	1280,0
	3	rDAPPI	10	21,44	22,00	20	20,0	40,0
	4	Nobivac	10	20,00	20,00	20	20,0	20,0
15	1	VLP CPV-2c	10	64,98	110,00	60	20,0	320,0
	2	VLP CPV-2c+ rDAPPI	10	226,27	986,00	400	20,0	5120,0
	3	rDAPPI	10	30,31	48,00	20	20,0	160,0
	4	Nobivac	10	34,82	152,00	20	20,0	1280,0
21	1	VLP CPV-2c	10	52,78	132,00	20	20,0	640,0
	2	VLP CPV-2c+ rDAPPI	10	171,48	654,00	340	20,0	2560,0
	3	rDAPPI	10	30,31	48,00	20	20,0	160,0
	4	Nobivac	10	56,57	206,00	20	20,0	640,0
28	1	VLP CPV-2c	10	519,84	1828,00	640	40,0	10240,0
	2	VLP CPV-2c+ rDAPPI	10	3880,23	8096,00	5120	320,0	20480,0
	3	rDAPPI	10	422,24	674,00	640	20,0	1280,0
	4	Nobivac	10	139,29	380,00	160	20,0	1280,0
35	1	VLP CPV-2c	10	422,24	644,00	640	40,0	1280,0
	2	VLP CPV-2c+ rDAPPI	10	1810,19	2496,00	1920	640,0	5120,0
	3	rDAPPI	10	298,57	386,00	320	20,0	640,0
	4	Nobivac	10	970,06	1216,00	1280	320,0	2560,0
42	1	VLP CPV-2c	10	367,58	548,00	480	40,0	1280,0
	2	VLP CPV-2c+	10	1371,87	2016,00	1280	320,0	5120,0

		rDAPPI						
	3	rDAPPI	10	367,58	530,00	640	20,0	1280,0
	4	Nobivac	10	905,10	992,00	1280	320,0	1280,0

* Los signos '<' se eliminaron de los valores con el fin de calcular la estadística general.

Ejemplo 8: Vacunación de caninos con la proteína de la cápside del CPV (VLP) expresada en baculovirus, VLP + RECOMBITEK® C4, RECOMBITEK® C4 solo o NOBIVAC® 3

[0202] El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta de anticuerpos anti-CPV después de la administración de las partículas tipo virus experimentales conformadas por la proteína VP2 de la cápside de parvovirus canino tipo 2c (VLP del CPV-2c) a diferentes títulos en combinación con una formulación de vacuna multivalente MLV del CPV-2 y una vacuna comercial en perros con MDA del CPV.

[0203] Se asignaron aleatoriamente cincuenta perros de la raza Beagle de 6-7 semanas de vida, positivos para anticuerpos derivados por vía materna (MDA) de hembras inmunizadas previamente contra el CPV durante la preñez, a cinco grupos de tratamiento (n = 10 perros por grupo) según camada y título de anticuerpo. Se usaron los títulos de las muestras de sangre recolectadas el Día -15 para la randomización.

[0204] Las vacunas se prepararon mediante rehidratación de un componente liofilizado con un componente diluyente. La serie liofilizada usada para las vacunas de prueba N° 1, N° 2, N° 3 y N° 5 era la misma vacuna experimental de 4 vías (C4). Los títulos de cada componente eran: CPV: 6,1 Log TCID 50/ml (~0,2 ml de cultivo 1X), CDV: 7,3 Log TCID 50/ml, CPi: 5,5 Log TCID 50/ml y CAV2: 6,0 Log TCID 50/ml. Todos los perros fueron vacunados dos veces, con un intervalo de 21 días, con la vacuna asignada de acuerdo con

siguiente Tabla 11.

Tabla 11: Diseño experimental para el estudio con VLP del CPV versus RECOMBITEK® C4 y NOBIVAC®

GRUPO (n = 10)	Componente liofilizado de la vacuna	Componente diluyente de la vacuna
1 C4 + dosis alta de VLP-CPV2c	CDV-CAV2-CPi-CPV	VLP del CPV-2c; N° de lote: 14 dic 15 No diluido 7,0 Log aHA/ml ~10 ml de cultivo 1X
2 C4 + dosis mediana de VLP-CPV2c	CDV-CAV2-CPi-CPV	VLP del CPV-2c; N° de lote: 14 dic 15 Diluido 1:5 en agua 6,3 Log aHA/ml ~2 ml de cultivo 1X
3 C4 + dosis baja de VLP-CPV2c	CDV-CAV2-CPi-CPV	VLP del CPV-2c; N° de lote: 14 dic 15 Diluido 1:25 en agua 5,7 Log aHA/ml ~0,4 ml de cultivo 1X
4 Nobivac® 3 DAPv	Nobivac® Canino 3 (CDV- CAV2-CPV2) (1 ml)	Desconocido
5 C4 sin VLP- CPV2c	CDV-CAV2-CPi-CPV	Agua

[0205] Se recolectó sangre de todos los perros los Días 0, 7, 15, 21, 28, 34 y 42 y los sueros se evaluaron según los anticuerpos anti-CPV mediante el ensayo HAI.

[0206] Los títulos del CPV HAI se informaron como la inversa de la dilución más alta que impide la hemaglutinación y un valor <20 era considerado negativo. Todos los perros de cada grupo fueron positivos para el CPV según HAI el Día 0, antes de la vacunación (títulos GMT promedio para todos los grupos de entre 42,87 y 80). La seroconversión después de la vacunación se definió como un aumento del título en 4 veces o más desde el Día 0. Los perros que seroconvirtieron se clasificaron como respondedores (Figura 18). Siete

días después de la primera vacunación, 5 de los 10 perros vacunados con la dosis alta de VLP-CPV2c-C4 (Grupo 1) y 1 de los 10 perros vacunados con la dosis mediana de VLP-CPV2c-C4 (Grupo 2) seroconvirtieron. No hubo respondedores en los grupos 3, 4 y 5 (es decir, los grupos contienen pocas o ninguna VLP) para el Día 7. A los 21 días después de la primera vacunación, todos los perros del Grupo 1 (dosis alta de VLP-CPV2c-C4), 3 de 10 del Grupo 2 (dosis mediana de VLP-CPV2c-C4), 1 de 10 del Grupo 3 (dosis baja de VLP-CPV2c-C4). No hubo respondedores en los grupos 4 y 5 (es decir, los grupos no contienen VLP) (Figura 18).

[0207] El Día 34, a los 13 días después de la segunda vacunación, se observó seroconversión en todos los perros de los Grupos 1 (dosis alta de VLP-CPV2c-C4) y 4 (NOBIVAC3®), seguido por 9 en el Grupo 2 (dosis mediana de VLP-CPV2c-C4), 6 en el Grupo 3 (dosis baja VLP-CPV2c-C4) y 1 en el Grupo 5 (C4 sin VLP).

[0208] Según se muestra en la Figura 19, el tratamiento con la dosis alta de VLP + C4 (Grupo 1) indujo la media geométrica más alta de título de anticuerpos durante todo el estudio. A los 113 días después de V2, el Día 34, el GMT de este grupo era de 4457,22, seguido por la dosis mediana de VLP-CPV2c-C4 y los grupos con NOBIVAC3®; (GMT = 1470,33), la dosis baja de VLP-CPV2c-C4 (GMT = 298,57) y C4 solo (GMT = 45,95).

Tabla 12: Resultados HI por grupo, ID y día para el segundo estudio de VLP del CPV versus RECOMBITEK® C4 y NOBIVAC®

			Día						
			0	7	15	21	28	34	42
Grupo	*Vacuna	ID							
1	Vacuna de prueba N° 1	PFE6	40	320	640	1280	5120	5120	2560

	(rDAPP; C4) + VLP del CPV- 2c 7,1 Log HA								
		PRD6	40	5120	5120	2560	5120	5120	2560
		QFC6	40	5120	5120	5120	10240	10240	5120
		QOE6	20	160	2560	2560	10240	5120	5120
		RIE6	80	80	40	20	1280	2560	2560
		RKD6	80	320	1280	640	10240	5120	2560
		SPF6	160	80	2560	1280	10240	10240	5120
		TAF6	80	160	1280	640	10240	5120	5120
		VAF6	80	160	80	80	640	1280	1280
		VCE6	40	80	80	40	5120	2560	2560
		GMT	56,57	298,57	735,17	519,84	5120,00	4457,22	3151,73
2	Vacuna de prueba N° 2 (rDAPP; C4) + VLP del CPV- 2c 6,4 Log HA	PWF6	40	160	320	160	2560	2560	1280
		QBF6	160	160	80	40	640	640	320
		QLE6	40	80	1280	2560	10240	10240	5120
		RJD6	80	80	320	160	2560	1280	1280
		RWE6	80	80	20	<20	80	2560	1280
		RXE6	40	80	20	20	320	640	640
		STE6	80	40	20	20	40	640	320
		SUF6	40	40	40	20	160	5120	2560
		TBF6	80	40	40	40	320	2560	1280
		VDE6	80	40	40	20	40	160	160
		GMT	64,98	69,64	74,64	56,57	393,97	1470,33	905,10
3	Vacuna de prueba N° 3 (rDAPP; C4) + VLP del CPV- 2c 5,7 Log HA	QDE6	80	40	20	20	40	80	80
		QED6	40	40	320	320	2560	2560	1280
		QKE6	40	20	<20	<20	40	160	160
		RGF6	40	80	40	20	40	1280	640
		RPD6	40	40	20	20	40	1280	640
		RTF6	40	40	20	<20	80	1280	1280
		SCE6	20	20	<20	<20	1280	1280	1280

		SQF6	80	40	40	20	40	160	160
		UOE6	40	20	20	<20	40	20	<20
		UXF6	40	40	20	20	20	<20	<20
		GMT	42,87	34,82	30,31	26,39	85,74	298,57	242,51
4	Nobivac® Canino 3- DAPv	PCE6	20	<20	<20	<20	40	640	640
		QCF6	80	40	20	<20	<20	2560	640
		RFF6	160	40	20	20	20	1280	640
		RLD6	160	160	20	<20	<20	2560	1280
		ROD6	160	40	20	<20	<20	1280	1280
		SDE6	40	40	20	<20	40	1280	1280
		SWE6	40	20	<20	<20	<20	640	320
		SXE6	40	20	20	<20	<20	1280	1280
		TCE6	160	40	<20	20	<20	2560	1280
		UYF6	160	160	40	40	<20	2560	1280
		GMT	80,00	42,87	21,44	21,44	22,97	1470,33	905,10
5	Vacuna de prueba N° 5 (rDAPP; C4)	PBE6	20	<20	<20	<20	80	1280	640
		REF6	80	40	20	<20	<20	<20	<20
		RHE6	160	20	<20	<20	<20	<20	<20
		RUE6	80	80	40	20	<20	<20	<20
		SVF6	160	<20	<20	<20	<20	<20	<20
		TDE6	160	160	40	<20	<20	<20	<20
		ULF6	20	20	<20	<20	<20	320	320
		UPE6	80	20	<20	<20	<20	80	320
		UZF6	160	160	40	20	20	<20	<20
		VPF6	80	20	20	20	<20	<20	<20
		GMT	80,00	37,32	24,62	20,00	22,97	45,95	49,25

* Para el Ejemplo 8, se utilizarán los siguientes nombres en las tablas y los gráficos que se describen a continuación.

* C4 + dosis alta de VLP-CPV2c = Vacuna de prueba N° 1

* C4 + dosis mediana de VLP-CPV2c = Vacuna de prueba N° 2

* C4 + dosis baja de VLP-CPV2c = Vacuna de prueba N° 3

* C4, sin VLP-CPV2c = Vacuna de prueba N° 5

Tabla 13: Estadística general* por grupo para el segundo estudio de VLP del CPV versus RECOMBITEK® C4 y NOBIVAC®

Día	Grupo	Vacuna	N	Media geométrica	Media aritmética	Mediana	Mín.	Máx.
0	1	C4 + dosis alta de VLP-CPV2c	10	56,57	66,00	60	20,0	160,0

	2	C4 + dosis mediana de VLP-CPV2c	10	64,98	72,00	80	40,0	160,0
	3	C4 + dosis baja de VLP-CPV2c	10	42,87	46,00	40	20,0	80,0
	4	Nobivac® Canino 3-DAPv	10	80,00	102,00	120	20,0	160,0
	5	C4, sin VLP-CPV2c	10	80,00	100,00	80	20,0	160,0
7	1	C4 + dosis alta de VLP-CPV2c	10	298,57	1160,00	160	80,0	5120,0
	2	C4 + dosis mediana de VLP-CPV2c	10	69,64	80,00	80	40,0	160,0
	3	C4 + dosis baja de VLP-CPV2c	10	34,82	38,00	40	20,0	80,0
	4	Nobivac® Canino 3-DAPv	10	42,87	58,00	40	20,0	160,0
	5	C4, sin VLP-CPV2c	10	37,32	56,00	20	20,0	160,0
15	1	C4 + dosis alta de VLP-CPV2c	10	735,17	1876,00	1280	40,0	5120,0
	2	C4 + dosis mediana de VLP-CPV2c	10	74,64	218,00	40	20,0	1280,0
	3	C4 + dosis baja de VLP-CPV2c	10	30,31	54,00	20	20,0	320,0
	4	Nobivac® Canino 3-DAPv	10	21,44	22,00	20	20,0	40,0
	5	C4, sin VLP-CPV2c	10	24,62	26,00	20	20,0	40,0
21	1	C4 + dosis alta de VLP-CPV2c	10	519,84	1422,00	960	20,0	5120,0
	2	C4 + dosis mediana de VLP-CPV2c	10	56,57	306,00	30	20,0	2560,0
	3	C4 + dosis baja de VLP-CPV2c	10	26,39	50,00	20	20,0	320,0
	4	Nobivac® Canino 3-DAPv	10	21,44	22,00	20	20,0	40,0
	5	C4, sin VLP-CPV2c	10	20,00	20,00	20	20,0	20,0
28	1	C4 + dosis alta de VLP-CPV2c	10	5120,00	6848,00	7680	640,0	10240,0
	2	C4 + dosis mediana de VLP-CPV2c	10	393,97	1696,00	320	40,0	10240,0
	3	C4 + dosis baja de VLP-CPV2c	10	85,74	418,00	40	20,0	2560,0
	4	Nobivac® Canino 3-DAPv	10	22,97	24,00	20	20,0	40,0
	5	C4, sin VLP-CPV2c	10	22,97	26,00	20	20,0	80,0

34	1	C4 + dosis alta de VLP-CPV2c	10	4457,22	5248,00	5120	1280,0	10240,0
	2	C4 + dosis mediana de VLP-CPV2c	10	1470,33	2640,00	1920	160,0	10240,0
	3	C4 + dosis baja de VLP-CPV2c	10	298,57	812,00	720	20,0	2560,0
	4	Nobivac® Canino 3-DAPv	10	1470,33	1664,00	1280	640,0	2560,0
	5	C4, sin VLP-CPV2c	10	45,95	182,00	20	20,0	1280,0
42	1	C4 + dosis alta de VLP-CPV2c	10	3151,73	3456,00	2560	1280,0	5120,0
	2	C4 + dosis mediana de VLP-CPV2c	10	905,10	1424,00	1280	160,0	5120,0
	3	C4 + dosis baja de VLP-CPV2c	10	242,51	556,00	400	20,0	1280,0
	4	Nobivac® Canino 3-DAPv	10	905,10	992,00	1280	320,0	1280,0
	5	C4, sin VLP-CPV2c	10	49,25	142,00	20	20,0	640,0

Tabla 14: Número de respondedores (seroconversión) por grupo y día; 1 = Sí, 0 = No; la seroconversión se define como un aumento de 4 veces o más del título con respecto al nivel basal.

			Día						
			0	7	15	21	28	34	42
Grupo	Vacuna	ID							
1	C4 + dosis alta de VLP-CPV2c	PFE6	0	1	1	1	1	1	1
		PRD6	0	1	1	1	1	1	1
		QFC6	0	1	1	1	1	1	1
		QOE6	0	1	1	1	1	1	1
		RIE6	0	0	0	0	1	1	1
		RKD6	0	1	1	1	1	1	1
		SPF6	0	0	1	1	1	1	1
		TAF6	0	0	1	1	1	1	1
		VAF6	0	0	0	0	1	1	1
		VCE6	0	0	0	0	1	1	1
		Total	0	5	7	7	10	10	10
2	C4 + dosis media de VLP-CPV2c	ID	0	1	1	1	1	1	1
		PWF6	0	0	0	0	1	1	1
		QBF6	0	0	1	1	1	1	1
		QLE6	0	0	1	1	1	1	1
		RJD6	0	0	1	1	1	1	1
		RWE6	0	0	0	0	0	1	1
		RXE6	0	0	0	0	1	1	1

		STE6	0	0	0	0	0	1	1
		SUF6	0	0	0	0	1	1	1
		TBF6	0	0	0	0	1	1	1
		VDE6	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	1	3	3	7	9	9
3	C4 + dosis baja de VLP-CPV2c	ID	0	0	0	0	0	0	0
		QDE6	0	0	1	1	1	1	1
		QED6	0	0	0	0	0	1	1
		QKE6	0	0	0	0	0	1	1
		RGF6	0	0	0	0	0	1	1
		RPD6	0	0	0	0	0	1	1
		RTF6	0	0	0	0	0	1	1
		SCE6	0	0	0	0	1	1	1
		SQF6	0	0	0	0	0	0	0
		UOE6	0	0	0	0	0	0	0
		UXF6	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	1	1	2	6	6
4	Nobivac® Canino 3-DAPv	ID	0	0	0	0	0	1	1
		PCE6	0	0	0	0	0	1	1
		QCF6	0	0	0	0	0	1	1
		RFF6	0	0	0	0	0	1	1
		RLD6	0	0	0	0	0	1	1
		ROD6	0	0	0	0	0	1	1
		SDE6	0	0	0	0	0	1	1
		SWE6	0	0	0	0	0	1	1
		SXE6	0	0	0	0	0	1	1
		TCE6	0	0	0	0	0	1	1
		UYF6	0	0	0	0	0	1	1
		Total	0	0	0	0	0	10	10
5	C4, sin VLP-CPV2c	ID	0	0	0	0	1	1	1
		PBE6	0	0	0	0	0	0	0
		REF6	0	0	0	0	0	0	0
		RHE6	0	0	0	0	0	0	0
		RUE6	0	0	0	0	0	0	0
		SVF6	0	0	0	0	0	0	0
		TDE6	0	0	0	0	0	0	0
		ULF6	0	0	0	0	0	1	1
		UPE6	0	0	0	0	0	0	1
		UZF6	0	0	0	0	0	0	0
		VBF6	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	1	2	3

[0209] Por lo tanto, las VLP del CPV promovieron un comienzo más temprano de inmunidad (OOI) que la MLV sola en cachorros MDA+ y las VLP del CPV actúan de manera sinérgica con la MLV C4 en los cachorros MDA+. El

Solicitante sostiene que estos resultados fueron inesperados y extremadamente favorables. La neutralización de los anticuerpos derivados por vía materna ha sido un desafío para los biólogos dedicados a las vacunas por mucho tiempo, y estos datos indican que el abordaje de VLP + MLV que se divulga en la presente se puede aplicar en general al problema de proveer una inmunidad protectora a la descendencia MDA+.

LISTADO DE SECUENCIA

<110> Merial, Inc.
 David, Frederic
 Hannas-Djebbara , Zahia
 Poulet, Herve
 Minke, Jules

<120> VACUNAS DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS (VLP) CONTRA EL PARVOVIRUS CANINO
 (CPV) Y SUS USOS

<130> MER 14-252

<150> 62/234,196
 <151> 2015-09-29

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 584
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VP2 del parvovirus canino - GenBank BAD34656.1

<400> 1

Met Ser Asp Gly Ala Val Gln Pro Asp Gly Gly Gln Pro Ala Val Arg
 1 5 10 15

Asn Glu Arg Ala Thr Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Val Gly Ile Ser Thr Gly Thr Phe Asn Asn Gln
 35 40 45

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

Ser Ser Arg Leu Val His Leu Asn Met Pro Glu Ser Glu Asn Tyr Arg
 65 70 75 80

Arg Val Val Val Asn Asn Leu Asp Lys Thr Ala Val Asn Gly Asn Met
 85 90 95

Ala Leu Asp Asp Thr His Ala Gln Ile Val Thr Pro Trp Ser Leu Val
 100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Gly Asp Trp Gln Leu
 115 120 125

Ile Val Asn Thr Met Ser Glu Leu His Leu Val Ser Phe Glu Gln Glu
 130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Val Ser Glu Ser Ala Thr Gln Pro
 145 150 155 160

Pro Thr Lys Val Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
 165 170 175

Leu Asp Ser Asn Asn Thr Met Pro Phe Thr Pro Ala Ala Met Arg Ser
 180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Lys Pro Thr Ile Pro Thr Pro Trp
 195 200 205

Arg Tyr Tyr Phe Gln Trp Asp Arg Thr Leu Ile Pro Ser His Thr Gly
 210 215 220

Thr Ser Gly Thr Pro Thr Asn Ile Tyr His Gly Thr Asp Pro Asp Asp
 225 230 235 240

Val Gln Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ser Val Pro Val His Leu Leu Arg
 245 250 255

Thr Gly Asp Glu Phe Ala Thr Gly Thr Phe Phe Phe Asp Cys Lys Pro
 260 265 270

Cys Arg Leu Thr His Thr Trp Gln Thr Asn Arg Ala Leu Gly Leu Pro
 275 280 285

Pro Phe Leu Asn Ser Leu Pro Gln Ala Glu Gly Gly Thr Asn Phe Gly
 290 295 300

Tyr Ile Gly Val Gln Gln Asp Lys Arg Arg Gly Val Thr Gln Met Gly
 305 310 315 320

Asn Thr Asn Tyr Ile Thr Glu Ala Thr Ile Met Arg Pro Ala Glu Val
 325 330 335

Gly Tyr Ser Ala Pro Tyr Tyr Ser Phe Glu Ala Ser Thr Gln Gly Pro
 340 345 350

Phe Lys Thr Pro Ile Ala Ala Gly Arg Gly Gly Ala Gln Thr Asp Glu
 355 360 365

Asn Gln Ala Ala Asp Gly Asp Pro Arg Tyr Ala Phe Gly Arg Gln His
 370 375 380

Gly Gln Lys Thr Thr Thr Thr Gly Glu Thr Pro Glu Arg Phe Thr Tyr
 385 390 395 400

Ile Ala His Gln Asp Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Gly Asp Trp Ile Gln
 405 410 415

Asn Ile Asn Phe Asn Leu Pro Val Thr Glu Asp Asn Val Leu Leu Pro
 420 425 430

Thr Asp Pro Ile Gly Gly Lys Thr Gly Ile Asn Tyr Thr Asn Ile Phe
 435 440 445

Asn Thr Tyr Gly Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Val Pro Pro Val Tyr
 450 455 460

Pro Asn Gly Gln Ile Trp Asp Lys Glu Phe Asp Thr Asp Leu Lys Pro
 465 470 475 480

Arg Leu His Val Asn Ala Pro Phe Val Cys Gln Asn Asn Cys Pro Gly
 485 490 495

Gln Leu Phe Val Lys Val Ala Pro Asn Leu Thr Asn Glu Tyr Asp Pro
 500 505 510

Asp Ala Ser Ala Asn Met Ser Arg Ile Val Thr Tyr Ser Asp Phe Trp
 515 520 525

Trp Lys Gly Lys Leu Val Phe Lys Ala Lys Leu Arg Ala Ser His Thr
 530 535 540

Trp Asn Pro Ile Gln Gln Met Ser Ile Asn Val Asp Asn Gln Phe Asn
 545 550 555 560

Tyr Val Pro Ser Asn Ile Gly Gly Met Lys Ile Val Tyr Glu Lys Ser
 565 570 575

Gln Leu Ala Pro Arg Lys Leu Tyr
 580

<210> 2
 <211> 9632
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pVL1393 - vector de transferencia de baculovirus de 9632 bp de
 Invitrogen

<400> 2
 aagctttact cgtaaagcga gttgaaggat catatttagt tgcgtttatg agataagatt 60
 gaaagcacgt gtaaaatggt tcccgcgcgt tggcacaact atttacaatg cggccaagtt 120
 ataaaagatt ctaatctgat atgtttttaa acacctttgc ggcccagatt gtttgcgtac 180
 gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag taaaacaaaa ccctagtatt 240
 ggagcaataa tcgatttaac caacacgtct aaatattatg atgggtgtgca ttttttgcgg 300
 gcggggcctgt tatacaaaaa aattcaagta cctggccaga ctttgccgcc tgaaagcata 360
 gttcaagaat ttattgacac ggtaaaagaa ttacagaaa agtgtcccgg catgttggtg 420
 ggcgtgcact gcacacacgg tattaatcgc accggttaca tgggtgtgcag atatttaatg 480
 cacaccctgg gtattgcgcc gcaggaagcc atagatagat tcgaaaaagc cagaggtcac 540
 aaaattgaaa gacaaaatta cgttcaagat ttattaatth aattaatatt atttgcattc 600
 tttacaaaat actttatcct attttcaa atgttgcgctt cttccagcga accaaaacta 660
 tgcttcgctt gctccgttta gctttagacc gatcagtggc gttgttccaa tcgacggtag 720
 gattaggccg gatattctcc accacaatgt tggcaacggt gatgttacgt ttatgctttt 780
 ggttttccac gtacgtcttt tggccggtaa tagccgtaaa cgtagtgccg tcgcgcgtca 840

cgcacaaacac	cggatgtttg	cgcttggtccg	cggggtattg	aaccgcgcga	tccgacaaat	900
ccaccacttt	ggcaactaaa	tcggtgacct	gcgcgtcttt	tttctgcatt	atctcgtctt	960
tcttttgcat	ggtttcctgg	aagccggtgt	acatgcggtt	tagatcagtc	atgacgcgcg	1020
tgacctgcaa	atctttggcc	tcgatctgct	tgtccttgat	ggcaacgatg	cgttcaataa	1080
actcttgttt	tttaacaagt	tcctcggttt	tttgcgccac	caccgcttgc	agcgcgtttg	1140
tgtgctcggt	gaatgtcgca	atcagcttag	tcaccaactg	tttgctctcc	tcctcccgtt	1200
gtttgatcgc	gggatcgtac	ttgccggtgc	agagcacttg	aggaattact	tcttctaaaa	1260
gccattcttg	taattctatg	gcgtaaggca	atctggactt	cataatcagc	tgaatcacgc	1320
cggatttagt	aatgagcact	gtatgcggct	gcaaatacag	cggtcgccc	cttttcacga	1380
cgctgttaga	ggtagggccc	ccattttgga	tggctctctc	aaataacgat	ttgtatttat	1440
tgtctacatg	aacacgtata	gctttatcac	aaactgtata	ttttaaactg	ttagcgacgt	1500
ccttggccac	gaaccggacc	tgttggtcgc	gctctagcac	gtaccgcagg	ttgaacgtat	1560
cttctccaaa	tttaaatctt	ccaattttta	cgcgagccat	tttgatacac	gtgtgtcgat	1620
tttgcaacaa	ctattgtttt	ttaacgcaaa	ctaaacttat	tgtggtaagc	aataattaaa	1680
tatgggggaa	catgcgccgc	tacaacactc	gtcgttatga	acgcagacgg	cgccggtctc	1740
ggcgcaagcg	gctaaaacgt	gttgcgcgtt	caacgcggca	aacatcgcaa	aagccaatag	1800
tacagttttg	atctgcata	taacggcgat	tttttaaatt	atcttattta	ataaatagtt	1860
atgacgccta	caactccccg	cccgcgttga	ctcgtgcac	ctcgagcagt	tcgttgacgc	1920
cttcctccgt	gtggccgaac	acgtcgagcg	ggtggtcgat	gaccagcggc	gtgccgcacg	1980
cgacgcacaa	gtatctgtac	accgaatgat	cgtcgggcga	aggcacgtcg	gcctccaagt	2040
ggcaatattg	gcaaattcga	aaatatatac	agttgggttg	tttgcgcata	tctatcgtgg	2100
cgttgggcat	gtacgtccga	acgttgattt	gcatgcaagc	cgaaattaaa	tcattgcgat	2160
tagtgcgatt	aaaacgttgt	acatcctcgc	ttttaatcat	gccgtcgatt	aaatcgcgca	2220
atcgagtcaa	gtgatcaaag	tgtggaataa	tgttttcttt	gtattcccga	gtcaagcgca	2280
gcgcgtat	taacaaacta	gccatcttgt	aagttagttt	catttaatgc	aactttatcc	2340
aataatatat	tatgtatcgc	acgtcaagaa	ttaacaatgc	gcccgttgtc	gcatctcaac	2400
acgactatga	tagagatcaa	ataaagcgcg	aattaaatag	cttgcgacgc	aacgtgcacg	2460

atctgtgcac gcgttccggc acgagctttg attgtaataa gtttttacga agcgatgaca	2520
tgacccccgt agtgacaacg atcacgccca aaagaactgc cgactacaaa attaccgagt	2580
atgtcgggtga cgttaaaact attaagccat ccaatcgacc gttagtcgaa tcaggaccgc	2640
tggtgcgaga agccgcgaag tatggcgaat gcatcgtata acgtgtggag tccgctcatt	2700
agagcgtcat gtttagacaa gaaagctaca tatttaattg atcccgatga ttttattgat	2760
aaattgaccc taactccata cacgggtattc tacaatggcg gggttttggt caaaatttcc	2820
ggactgcgat tgtacatgct gttaacggct ccgcccacta ttaatgaaat taaaaattcc	2880
aattttaaaa aacgcagcaa gagaaacatt tgtatgaaag aatgcgtaga aggaaagaaa	2940
aatgtcgtcg acatgctgaa caacaagatt aatatgcctc cgtgtataaa aaaaatattg	3000
aacgatttga aagaaaacaa tgtaccgcgc ggcggtatgt acaggaagag gtttatacta	3060
aactgttaca ttgcaaacgt ggtttcgtgt gccaaagtgtg aaaaccgatg tttaatcaag	3120
gctctgacgc atttctacaa ccacgactcc aagtgtgtgg gtgaagtcac gcatctttta	3180
atcaaatccc aagatgtgta taaaccacca aactgccaaa aaatgaaaac tgtcgacaag	3240
ctctgtccgt ttgctggcaa ctgcaagggt ctcaatccta tttgtaatta ttgaataata	3300
aaacaattat aaatgctaaa tttgtttttt attaacgata caaaccaaac gcaacaagaa	3360
cattttagtg attatctata attgaaaacg cgtagttata atcgctgagg taatatTTaa	3420
aatcatTTtc aaatgattca cagttaattt gcgacaatat aattttattt tcacataaac	3480
tagacgcctt gtcgtcttct tcttcgtatt ccttctcttt ttcatttttc tctcataaa	3540
aattaacata gttattatcg tatccatata tgtatctatc gtatagagta aattttttgt	3600
tgtcataaat atatatgtct tttttaatgg ggtgtatagt accgctgcgc atagtTTttc	3660
tgtaatttac aacagtgcta ttttctggta gttcttcgga gtgtgttgct ttaattatta	3720
aatttatata atcaatgaat ttgggatcgt cggttttgta caatatgttg ccggcatagt	3780
acgcagcttc ttctagttca attacaccat ttttagcag caccggatta acataacttt	3840
ccaaaatggt gtacgaaccg ttaaacaata acagttcacc tcccttttct atactattgt	3900
ctgcgagcag ttgtttgttg ttaaaaataa cagccattgt aatgagacgc aaaaactaat	3960
atcacaaact ggaaatgtct atcaatatat agttgctgat atcatggaga taattaaaa	4020
gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc gtaacagttt tgtaataaaa	4080

aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca tcgggcgcgg atcccgggta	4140
ccttctagaa ttccggagcg gccgctgcag atctgacctc ttccctgggac ccggcaagaa	4200
ccaaaaactc actctcttca aggaaatccg taatgttaaa cccgacacga tgaagcttgt	4260
cgttgatgg aaaggaaaag agttctacag ggaaacttgg acccgcttca tggaagacag	4320
cttccccatt gttaacgacc aagaagtgat ggatgttttc cttgttgtca acatgcgtcc	4380
cactagaccc aaccgttggt acaaattcct ggcccaacac gctctgcgtt gcgacccga	4440
ctatgtacct catgacgtga ttaggatcgt cgagccttca tgggtgggca gcaacaacga	4500
gtaccgcac agcctggcta agaagggcgg cggctgcca ataatgaacc ttcactctga	4560
gtacaccaac tcgttcgaac agttcatcga tcgtgtcatc tgggagaact tctacaagcc	4620
catcgtttac atcgggtaccg actctgctga agaggaggaa attctccttg aagtttcctt	4680
ggtgttcaaa gttaaaggagt ttgcaccaga cgcacctctg ttcactggtc cggcgatta	4740
aaacacgata cattgttatt agtacattta ttaagcgcta gattctgtgc gttgttgatt	4800
tacagacaat tgttgtacgt attttaataa ttcattaaat ttataatctt tagggtggt	4860
tgtagagcg aaaatcaa atgatttcagc gtctttatat ctgaatttaa atattaaatc	4920
ctcaatagat ttgtaaaata ggtttcgatt agtttcaaac aagggttggt tttccgaacc	4980
gatggctgga ctatcta atg gattttcgct caacgccaca aaacttgcca aatcttgtag	5040
cagcaatcta gctttgtcga tattcgtttg tgtttgttt tgtaataaag gttcgacgtc	5100
gttcaaaata ttatgcgctt ttgtatttct ttcactactg tcgttagtgt acaattgact	5160
cgacgtaaac acgttaaata aagcttgac atatttaaca tcgggcgtgt tagctttatt	5220
aggccgatta tcgtcgtcgt cccaaccctc gtcgttagaa gttgcttccg aagacgattt	5280
tgccatagcc acacgacgcc tattaattgt gtcggctaac acgtccgca tcaaatttgt	5340
agttgagctt tttggaatta tttctgattg cgggcgtttt tgggcgggtt tcaatctaac	5400
tgtgcccgat ttaattcag acaacacgtt agaaagcgat ggtgcaggcg gtggtaacat	5460
ttcagacggc aaatctacta atggcggcgg tgggtggagct gatgataaat ctaccatcgg	5520
tggagcgca ggcggggctg gcggcgagg cgaggcgga ggtgggtggcg gtgatgcaga	5580
cggcggttta ggctcaaatg tctctttagg caacacagtc ggcacctcaa ctattgtact	5640
ggtttcgggc gccgtttttg gtttgaccgg tctgagacga gtgcgatttt ttcgtttct	5700

aatagcttcc aacaattggt gtctgtctgc taaaggtgca gcggggttgag gttccgtcgg	5760
cattggtgga gcgggcgga attcagacat cgatggtggt ggtggtggtg gaggcgtgg	5820
aatgttaggc acgggagaag gtggtggcgg cggtgccgcc ggtataattt gttctggttt	5880
agtttggtcg cgcacgattg tgggcaccgg cgcaggcgcc gctggctgca caacggaagg	5940
tcgtctgctt cgaggcagcg cttgggggtg tggcaattca atattataat tggaatacaa	6000
atcgtaaaaa tctgctataa gcattgtaat ttcgctatcg tttaccgtgc cgatatttaa	6060
caaccgctca atgtaagcaa ttgtattgta aagagattgt ctcaagctcg ccgcacgccg	6120
ataacaagcc ttttcatttt tactacagca ttgtagtggc gagacacttc gctgtctcgc	6180
acgtacatgt atgctttggt gtcaaaaacg tcgttggtcaa gctttaaaat atttaaaaga	6240
acatctctgt tcagcaccac tgtgttctgc taaatgttgt ttttgataat ttgcgcttcc	6300
gcagtatcga cacgttcaaa aaattgatgc gcatcaattt tggtgttcct attattgaat	6360
aaataagatt gtacagattc atatctacga ttcgtcatgg ccaccacaaa tgctacgctg	6420
caaacgctgg tacaatttta cgaaaactgc aaaaacgtca aaactcggta taaaataatc	6480
aacgggcgct ttggcaaaat atctatttta tcgcacaagc ccactagcaa attgtatttg	6540
cagaaaaaaa tttcggcgca caattttaac gctgacgaaa taaaagttca ccagttaatg	6600
agcgaccacc caaattttat aaaaatctat tttaatcacg gttccatcaa caaccaagtg	6660
atcgtgatgg actacattga ctgtcccgat ttatttgaaa cactacaaat taaaggcgag	6720
ctttcgtacc aacttgtag caatattatt agacagctgt gtgaagcgct caacgatttg	6780
cacaagcaca atttcataca caacgacata aaactcgaaa atgtcttata tttcgaagca	6840
cttgatcgcg tgtatgtttg cgattacgga ttgtgcaaac acgaaaactc acttagcgtg	6900
cacgacggca cgttggagta ttttagtccg gaaaaaatc gacacacaac tatgcacgtt	6960
tcgtttgact ggtacgcggc gtgttaacat acaagttgct aacgtaatca tggcatagc	7020
tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca	7080
taaagtgtaa agcctggggt gcctaattgag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct	7140
cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac	7200
gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc	7260
tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg	7320

tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg	7380
ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg	7440
agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat	7500
accaggcggtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgtta	7560
ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct	7620
gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc gtcceaagct gggctgtgtg cacgaacccc	7680
ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa	7740
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggatatg	7800
taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggctaacta cggctacact agaaggacag	7860
tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttacctcgg aaaaagagtt ggtagctctt	7920
gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta	7980
cgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc	8040
agtggaacga aaactcacgt taagggatth tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca	8100
cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat cttaaagtata tatgagtaaa	8160
cttggtctga cagttaccaaa tgcttaataca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat	8220
ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct	8280
taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt	8340
tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgagc aagtggtcct gcaactttat	8400
ccgcctccat ccagtctatt aattggtgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta	8460
atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg	8520
gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt	8580
tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg	8640
cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataatc tcttactgtc atgccatccg	8700
taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc	8760
ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtaaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa	8820
ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac	8880
cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt	8940

```

ttactttcac cagcgtttct gggtagagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg 9000
gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa 9060
gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata 9120
aaciaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca 9180
ttattatcat gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtctcgcgc 9240
gtttcgggtga tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt 9300
gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg 9360
ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata 9420
tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgccattcgc 9480
cattcagggt ggcgaactgt tgggaagggc gatcgggtgcg ggctctctcg ctattacgcc 9540
agctggcgaa aggggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc 9600
agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg cc 9632

```

```

<210> 3
<211> 584
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CPV Souriou (serotipo 2c)

<400> 3

```

```

Met Ser Asp Gly Ala Val Gln Pro Asp Gly Gly Gln Pro Ala Val Arg
1           5           10           15

```

```

Asn Glu Arg Ala Thr Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
          20           25           30

```

```

Gly Gly Ser Gly Gly Val Gly Ile Ser Thr Gly Thr Phe Asn Asn Gln
35           40           45

```

```

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

```

```

Ser Ser Arg Leu Val His Leu Asn Met Pro Glu Ser Glu Asn Tyr Arg
65           70           75           80

```

Arg Val Val Val Asn Asn Leu Asp Lys Thr Ala Val Asn Gly Asn Met
 85 90 95

Ala Leu Asp Asp Thr His Ala Gln Ile Val Thr Pro Trp Ser Leu Val
 100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Gly Asp Trp Gln Leu
 115 120 125

Ile Val Asn Thr Met Ser Glu Leu His Leu Val Ser Phe Glu Gln Glu
 130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Val Ser Glu Ser Ala Thr Gln Pro
 145 150 155 160

Pro Thr Lys Val Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
 165 170 175

Leu Asp Ser Asn Asn Thr Met Pro Phe Thr Pro Ala Ala Met Arg Ser
 180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Lys Pro Thr Ile Pro Thr Pro Trp
 195 200 205

Arg Tyr Tyr Phe Gln Trp Asp Arg Thr Leu Ile Pro Ser His Thr Gly
 210 215 220

Thr Ser Gly Thr Pro Thr Asn Ile Tyr His Gly Thr Asp Pro Asp Asp
 225 230 235 240

Val Gln Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ser Val Pro Val His Leu Leu Arg
 245 250 255

Thr Gly Asp Glu Phe Ala Thr Gly Thr Phe Phe Phe Asp Cys Lys Pro
 260 265 270

Cys Arg Leu Thr His Thr Trp Gln Thr Asn Arg Ala Leu Gly Leu Pro
 275 280 285

Pro Phe Leu Asn Ser Leu Pro Gln Ala Glu Gly Gly Thr Asn Phe Gly

290		295		300
Tyr Ile Gly Val Gln Gln Asp Lys Arg Arg Gly Val Thr Gln Met Gly				
305		310		315 320
Asn Thr Asn Tyr Ile Thr Glu Ala Thr Ile Met Arg Pro Ala Glu Val				
	325		330	335
Gly Tyr Ser Ala Pro Tyr Tyr Ser Phe Glu Ala Ser Thr Gln Gly Pro				
	340		345	350
Phe Lys Thr Pro Ile Ala Ala Gly Arg Gly Gly Ala Gln Thr Asp Glu				
	355		360	365
Asn Gln Ala Ala Asp Gly Asp Pro Arg Tyr Ala Phe Gly Arg Gln His				
	370		375	380
Gly Gln Lys Thr Thr Thr Thr Gly Glu Thr Pro Glu Arg Phe Thr Tyr				
385		390		395 400
Ile Ala His Gln Asp Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Gly Asp Trp Ile Gln				
	405		410	415
Asn Ile Asn Phe Asn Leu Pro Val Thr Glu Asp Asn Val Leu Leu Pro				
	420		425	430
Thr Asp Pro Ile Gly Gly Lys Thr Gly Ile Asn Tyr Thr Asn Ile Phe				
	435		440	445
Asn Thr Tyr Gly Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Val Pro Pro Val Tyr				
	450		455	460
Pro Asn Gly Gln Ile Trp Asp Lys Glu Phe Asp Thr Asp Leu Lys Pro				
465		470		475 480
Arg Leu His Val Asn Ala Pro Phe Val Cys Gln Asn Asn Cys Pro Gly				
	485		490	495
Gln Leu Phe Val Lys Val Ala Pro Asn Leu Thr Asn Glu Tyr Asp Pro				
	500		505	510

Asp Ala Ser Ala Asn Met Ser Arg Ile Val Thr Tyr Ser Asp Phe Trp
 515 520 525

Trp Lys Gly Lys Leu Val Phe Lys Ala Lys Leu Arg Ala Ser His Thr
 530 535 540

Trp Asn Pro Ile Gln Gln Met Ser Ile Asn Val Asp Asn Gln Phe Asn
 545 550 555 560

Tyr Val Pro Ser Asn Ile Gly Gly Met Lys Ile Val Tyr Glu Lys Ser
 565 570 575

Gln Leu Ala Pro Arg Lys Leu Tyr
 580

<210> 4
 <211> 584
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VP2 del CPV no truncado en el pMEB072

<400> 4

Met Ser Asp Gly Ala Val Gln Pro Asp Gly Gly Gln Pro Ala Val Arg
 1 5 10 15

Asn Glu Arg Ala Thr Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Val Gly Ile Ser Thr Gly Thr Phe Asn Asn Gln
 35 40 45

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

Ser Ser Arg Leu Val His Leu Asn Met Pro Glu Ser Glu Asn Tyr Arg
 65 70 75 80

Arg Val Val Val Asn Asn Leu Asp Lys Thr Ala Val Asn Gly Asn Met
 85 90 95

Ala Leu Asp Asp Thr His Ala Gln Ile Val Thr Pro Trp Ser Leu Val
 100 105 110

Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Phe Asn Pro Gly Asp Trp Gln Leu
 115 120 125

Ile Val Asn Thr Met Ser Glu Leu His Leu Val Ser Phe Glu Gln Glu
 130 135 140

Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Val Ser Glu Ser Ala Thr Gln Pro
 145 150 155 160

Pro Thr Lys Val Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala
 165 170 175

Leu Asp Ser Asn Asn Thr Met Pro Phe Thr Pro Ala Ala Met Arg Ser
 180 185 190

Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Lys Pro Thr Ile Pro Thr Pro Trp
 195 200 205

Arg Tyr Tyr Phe Gln Trp Asp Arg Thr Leu Ile Pro Ser His Thr Gly
 210 215 220

Thr Ser Gly Thr Pro Thr Asn Ile Tyr His Gly Thr Asp Pro Asp Asp
 225 230 235 240

Val Gln Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ser Val Pro Val His Leu Leu Arg
 245 250 255

Thr Gly Asp Glu Phe Ala Thr Gly Thr Phe Phe Phe Asp Cys Lys Pro
 260 265 270

Cys Arg Leu Thr His Thr Trp Gln Thr Asn Arg Ala Leu Gly Leu Pro
 275 280 285

Pro Phe Leu Asn Ser Leu Pro Gln Ala Glu Gly Gly Thr Asn Phe Gly
 290 295 300

Tyr Ile Gly Val Gln Gln Asp Lys Arg Arg Gly Val Thr Gln Met Gly

305		310		315		320
Asn Thr Asn Tyr	Ile Thr Glu Ala Thr	Ile Met Arg Pro Ala Glu Val				
	325	330		335		
Gly Tyr Ser Ala Pro Tyr Tyr Ser	Phe Glu Ala Ser Thr Gln Gly Pro					
	340	345		350		
Phe Lys Thr Pro Ile Ala Ala Gly Arg Gly Gly Ala Gln Thr Asp Glu						
	355	360		365		
Asn Gln Ala Ala Asp Gly Asp Pro Arg Tyr Ala Phe Gly Arg Gln His						
	370	375		380		
Gly Gln Lys Thr Thr Thr Thr Gly Glu Thr Pro Glu Arg Phe Thr Tyr						
	385	390		395		400
Ile Ala His Gln Asp Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Gly Asp Trp Ile Gln						
	405	410		415		
Asn Ile Asn Phe Asn Leu Pro Val Thr Glu Asp Asn Val Leu Leu Pro						
	420	425		430		
Thr Asp Pro Ile Gly Gly Lys Thr Gly Ile Asn Tyr Thr Asn Ile Phe						
	435	440		445		
Asn Thr Tyr Gly Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Val Pro Pro Val Tyr						
	450	455		460		
Pro Asn Gly Gln Ile Trp Asp Lys Glu Phe Asp Thr Asp Leu Lys Pro						
	465	470		475		480
Arg Leu His Val Asn Ala Pro Phe Val Cys Gln Asn Asn Cys Pro Gly						
	485	490		495		
Gln Leu Phe Val Lys Val Ala Pro Asn Leu Thr Asn Glu Tyr Asp Pro						
	500	505		510		
Asp Ala Ser Ala Asn Met Ser Arg Ile Val Thr Tyr Ser Asp Phe Trp						
	515	520		525		

Trp Lys Gly Lys Leu Val Phe Lys Ala Lys Leu Arg Ala Ser His Thr
 530 535 540

Trp Asn Pro Ile Gln Gln Met Ser Ile Asn Val Asp Asn Gln Phe Asn
 545 550 555 560

Tyr Val Pro Ser Asn Ile Gly Gly Met Lys Ile Val Tyr Glu Lys Ser
 565 570 575

Gln Leu Ala Pro Arg Lys Leu Tyr
 580

<210> 5
 <211> 1752
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Ácidos nucleicos de codones optimizados del pMEB072 que codifica la
 VP2 del CPV (SEQ ID N°: 4)

<400> 5
 atgtccgacg gtgctgtgca gcccgacggt ggccagcccg ctgtgcgtaa cgagcgtgct 60
 accggttccg gtaacgggtc aggcggaggt ggaggtggtg gttccggcgg tgtgggcatc 120
 tccaccggca ccttcaacaa ccagaccgag ttcaagttcc tcgagaacgg ttgggtggag 180
 atcaccgcta actcctcccg tctggtgcac ctgaacatgc ccgagtccga gaactaccgt 240
 cgtgtggtgg tgaacaacct ggacaagacc gctgtgaacg gtaacatggc tctggacgac 300
 acccagctc agatcgtgac cccctggtcc ctggtggacg ctaacgcttg gggcgtgtgg 360
 ttcaaccccg gtgactggca gctgatcgtg aacaccatgt ccgagctgca cctggtgtcc 420
 ttcgagcaag agatcttcaa cgtcgtcctc aagaccgtgt ccgagtccgc taccagccc 480
 cccaccaagg tgtacaacaa cgacctgacc gcttcctga tggtcgctct ggactccaac 540
 aacaccatgc ccttcacccc cgctgctatg cgttccgaga ccctgggctt ctaccctgg 600
 aagcccacca tccccacccc ctggcggttac tacttccagt gggaccgtac cctgatcccc 660
 tcccacaccg gtacttccgg cccccacc aacatctacc acggcaccga ccccgacgac 720
 gtgcagttct acaccatcga gaactccgtg cccgtgcacc tgctgcgtac cggtgacgag 780
 ttcgctaccg gaaccttctt cttcgactgc aagccctgcc gtctgaccca cacctggcag 840

```

accaaccgtg ctctgggtct gcctcccttc ctgaactccc tgccccaggc tgaggggtggc      900
accaacttcg gttacatcgg tgtgcagcag gacaagcgtc gtgggtgtgac ccagatgggt      960
aacaccaact acatcaccga ggctaccatc atgcgtcccc ctgaggtcgg ctactccgct      1020
ccctactact ccttcgaggc ttccaccag ggccccctca agacccccat cgctgctggt      1080
cgtgggtggtg ctcagaccga cgagaaccag gctgctgacg gtgacccccg ttacgttttc      1140
ggtcgtcagc acggccaaaa gaccaccacc accggcgaga cccccgagcg tttcacctac      1200
atcgtcacc aggacaccgg tcgttaccct gagggcgact ggattcagaa catcaacttc      1260
aacctgcccc tgaccgagga caacgtgctg ctgcccaccg accccatcgg tggcaagacc      1320
ggtatcaact aactaacat cttcaacacc tacggtcctc tgaccgctct gaacaacgtg      1380
cccccggtgt accccaacgg ccagatctgg gacaaggagt tcgacaccga cctgaagccc      1440
cgtctgcacg tgaacgctcc cttcgtgtgc cagaacaact gccctggcca gctgttcgtc      1500
aaggtggccc ccaacctgac caacgagtac gaccctgacg cttccgctaa catgtcccgt      1560
atcgtgacct actccgactt ctggtggaag ggcaagctgg tgttcaaggc caagctgcgt      1620
gcttctcaca cctggaacct catccagcag atgtccatca acgtggacaa ccagttcaac      1680
tacgtgccct ccaacatcgg tggaatgaag atcgtgtacg agaagtccca gctggctccc      1740
cgtaagctgt ac      1752

```

```

<210> 6
<211> 578
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> VP2 del CPV truncada en el pMEB073

```

```

<400> 6

```

```

Met Leu Lys Gly Gly Gln Pro Ala Val Arg Asn Glu Arg Ala Thr Gly
1           5           10           15

```

```

Ser Gly Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Val
          20           25           30

```

```

Gly Ile Ser Thr Gly Thr Phe Asn Asn Gln Thr Glu Phe Lys Phe Leu
          35           40           45

```

Glu Asn Gly Trp Val Glu Ile Thr Ala Asn Ser Ser Arg Leu Val His
 50 55 60

Leu Asn Met Pro Glu Ser Glu Asn Tyr Arg Arg Val Val Val Asn Asn
 65 70 75 80

Leu Asp Lys Thr Ala Val Asn Gly Asn Met Ala Leu Asp Asp Thr His
 85 90 95

Ala Gln Ile Val Thr Pro Trp Ser Leu Val Asp Ala Asn Ala Trp Gly
 100 105 110

Val Trp Phe Asn Pro Gly Asp Trp Gln Leu Ile Val Asn Thr Met Ser
 115 120 125

Glu Leu His Leu Val Ser Phe Glu Gln Glu Ile Phe Asn Val Val Leu
 130 135 140

Lys Thr Val Ser Glu Ser Ala Thr Gln Pro Pro Thr Lys Val Tyr Asn
 145 150 155 160

Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala Leu Asp Ser Asn Asn Thr
 165 170 175

Met Pro Phe Thr Pro Ala Ala Met Arg Ser Glu Thr Leu Gly Phe Tyr
 180 185 190

Pro Trp Lys Pro Thr Ile Pro Thr Pro Trp Arg Tyr Tyr Phe Gln Trp
 195 200 205

Asp Arg Thr Leu Ile Pro Ser His Thr Gly Thr Ser Gly Thr Pro Thr
 210 215 220

Asn Ile Tyr His Gly Thr Asp Pro Asp Asp Val Gln Phe Tyr Thr Ile
 225 230 235 240

Glu Asn Ser Val Pro Val His Leu Leu Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ala
 245 250 255

Thr Gly Thr Phe Phe Phe Asp Cys Lys Pro Cys Arg Leu Thr His Thr
 260 265 270

Trp Gln Thr Asn Arg Ala Leu Gly Leu Pro Pro Phe Leu Asn Ser Leu
 275 280 285

Pro Gln Ala Glu Gly Gly Thr Asn Phe Gly Tyr Ile Gly Val Gln Gln
 290 295 300

Asp Lys Arg Arg Gly Val Thr Gln Met Gly Asn Thr Asn Tyr Ile Thr
 305 310 315 320

Glu Ala Thr Ile Met Arg Pro Ala Glu Val Gly Tyr Ser Ala Pro Tyr
 325 330 335

Tyr Ser Phe Glu Ala Ser Thr Gln Gly Pro Phe Lys Thr Pro Ile Ala
 340 345 350

Ala Gly Arg Gly Gly Ala Gln Thr Asp Glu Asn Gln Ala Ala Asp Gly
 355 360 365

Asp Pro Arg Tyr Ala Phe Gly Arg Gln His Gly Gln Lys Thr Thr Thr
 370 375 380

Thr Gly Glu Thr Pro Glu Arg Phe Thr Tyr Ile Ala His Gln Asp Thr
 385 390 395 400

Gly Arg Tyr Pro Glu Gly Asp Trp Ile Gln Asn Ile Asn Phe Asn Leu
 405 410 415

Pro Val Thr Glu Asp Asn Val Leu Leu Pro Thr Asp Pro Ile Gly Gly
 420 425 430

Lys Thr Gly Ile Asn Tyr Thr Asn Ile Phe Asn Thr Tyr Gly Pro Leu
 435 440 445

Thr Ala Leu Asn Asn Val Pro Pro Val Tyr Pro Asn Gly Gln Ile Trp
 450 455 460

Asp Lys Glu Phe Asp Thr Asp Leu Lys Pro Arg Leu His Val Asn Ala
 465 470 475 480

Pro Phe Val Cys Gln Asn Asn Cys Pro Gly Gln Leu Phe Val Lys Val
485 490 495

Ala Pro Asn Leu Thr Asn Glu Tyr Asp Pro Asp Ala Ser Ala Asn Met
500 505 510

Ser Arg Ile Val Thr Tyr Ser Asp Phe Trp Trp Lys Gly Lys Leu Val
515 520 525

Phe Lys Ala Lys Leu Arg Ala Ser His Thr Trp Asn Pro Ile Gln Gln
530 535 540

Met Ser Ile Asn Val Asp Asn Gln Phe Asn Tyr Val Pro Ser Asn Ile
545 550 555 560

Gly Gly Met Lys Ile Val Tyr Glu Lys Ser Gln Leu Ala Pro Arg Lys
565 570 575

Leu Tyr

<210> 7
<211> 1536
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de ácidos nucleicos de codones optimizados del pMEB073 que codifica la VP2 del CPV (SEQ ID N°: 6)

<400> 7
atgcccgaga gcgagaacta ccggagagtg gtggtgaaca acctggacaa gaccgccgtg 60
aacggcaata tggccctgga tgacacccac gcccagatcg tgacccctg gagcctggtg 120
gacgccaaacg cctggggagt gtggttcaac cctggcgact ggcagctgat cgtgaacacc 180
atgagcgagc tgcacctggt gtccttcgag caggagattt tcaacgtggt gctgaaaacc 240
gtgtccgaga ggcgccacca gccccccacc aaagtgtaca acaacgacct gaccgcctcc 300
ctgatggtgg ccctggacag caacaacacc atgcccttca ccctgcccgc catgagaagc 360
gagaccctgg gcttctaccc ttggaagccc accatcccca ccccttgccg gtactacttc 420

```

cagtgggaca ggaccctgat cccagccac accggcacca ggggcacccc taccaatata 480
taccacggca cgcaccctga tgacgtgcag ttctacacca tcgagaacag cgtgcctgtg 540
cacctgctga gaaccggcga cgagttcgcc accggcacat ttttcttcga ctgcaagccc 600
tgacgactga cccacacctg gcagaccaac agagccctgg gcctgcctcc tttcctgaac 660
agcctgcccc aggccgaggg cggcaccaac ttcggttaca tcggcgtgca gcaggacaag 720
agaagaggcg tgaccagat gggcaacacc aactacatca ccgaggccac catcatgaga 780
cccgccgaag tgggctacag cgccccctac tacagcttcg aggccagcac ccagggcccc 840
ttcaagaccc ccatcgccgc tggcagaggc ggagcccaga ccgacgagaa ccaggccgcc 900
gacggcgacc ccagatacgc cttcggcaga cagcacggcc agaaaaccac caccaccggc 960
gagacccccg agagattcac ctacatcgcc caccaggaca ccggcagata ccccgagggc 1020
gactggattc agaacatcaa cttcaacctg cccgtgaccg aggataatgt gctgctgccc 1080
accgacccca tcggcggcaa gaccggcatc aactacacca acatcttcaa cacctacggc 1140
cccctgaccg ccctgaataa cgtgcccccc gtgtacccca acggccagat ttgggacaag 1200
gagttcgaca ccgacctgaa gcctaggctg cacgtgaatg ccccttcgt gtgtcagaac 1260
aactgccctg gccagctgtt tgtgaaagtg gcccccaacc tgaccaacga gtacgatcct 1320
gacgccagcg ccaacatgag ccgcatcgtg acctacagcg acttctggtg gaagggcaag 1380
ctggtgttca aggccaaagt gagagccagc cacacatgga acccatcca gcagatgagc 1440
atcaacgtgg acaaccagtt caactacgtg cccagcaata tcggcgggcat gaagatcgtg 1500
tacgagaaga gccagctggc cccagaaaag ctgtac 1536

```

```

<210> 8
<211> 584
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> GenBank: AHW47988.1

```

```

<400> 8

```

```

Met Ser Asp Gly Ala Val Gln Pro Asp Gly Gly Gln Pro Ala Val Arg
1           5           10          15

```

```

Asn Glu Arg Ala Thr Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly

```

			20					25						30			
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Val	Gly	Ile	Ser	Thr	Gly	Thr	Phe	Asn	Asn	Gln		
		35					40					45					
Thr	Glu	Phe	Lys	Phe	Leu	Glu	Asn	Gly	Trp	Val	Glu	Ile	Thr	Ala	Asn		
	50					55					60						
Ser	Ser	Arg	Leu	Val	His	Leu	Asn	Met	Pro	Glu	Ser	Glu	Asn	Tyr	Lys		
65					70					75					80		
Arg	Val	Val	Val	Asn	Asn	Met	Asp	Lys	Thr	Ala	Val	Lys	Gly	Asn	Met		
				85					90					95			
Ala	Leu	Asp	Asp	Thr	His	Val	Gln	Ile	Val	Thr	Pro	Trp	Ser	Leu	Val		
			100					105					110				
Asp	Ala	Asn	Ala	Trp	Gly	Val	Trp	Phe	Asn	Pro	Gly	Asp	Trp	Gln	Leu		
		115					120					125					
Ile	Val	Asn	Thr	Met	Ser	Glu	Leu	His	Leu	Val	Ser	Phe	Glu	Arg	Glu		
	130					135					140						
Ile	Phe	Asn	Val	Val	Leu	Lys	Thr	Val	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Gln	Pro		
145					150					155					160		
Pro	Thr	Lys	Val	Tyr	Asn	Asn	Asp	Leu	Thr	Ala	Ser	Leu	Met	Val	Ala		
				165					170					175			
Leu	Asp	Ser	Asn	Asn	Thr	Met	Pro	Phe	Thr	Pro	Ala	Ala	Met	Arg	Ser		
			180					185					190				
Glu	Thr	Leu	Gly	Phe	Tyr	Pro	Trp	Lys	Pro	Thr	Ile	Pro	Thr	Pro	Trp		
		195					200					205					
Arg	Tyr	Tyr	Phe	Gln	Trp	Asp	Arg	Thr	Leu	Ile	Pro	Ser	His	Thr	Gly		
	210					215					220						
Thr	Ser	Gly	Thr	Pro	Thr	Asn	Val	Tyr	His	Gly	Ser	Asp	Pro	Asp	Asp		
225					230					235					240		

Val Gln Phe Tyr Thr Ile Glu Asn Ser Val Pro Val His Leu Leu Arg
 245 250 255

Thr Gly Asp Glu Phe Ala Thr Gly Thr Phe Phe Phe Asp Cys Lys Pro
 260 265 270

Cys Arg Leu Thr His Thr Trp Gln Thr Asn Arg Ala Leu Gly Leu Pro
 275 280 285

Pro Phe Leu Asn Ser Leu Pro Gln Ser Glu Gly Ile Thr Asn Phe Gly
 290 295 300

Asp Ile Gly Val Gln Gln Asp Lys Arg Arg Gly Val Thr Gln Met Gly
 305 310 315 320

Asn Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Ala Thr Ile Met Arg Pro Ala Glu Val
 325 330 335

Gly Tyr Ser Ala Pro Tyr Tyr Ser Phe Glu Ala Ser Thr Gln Gly Pro
 340 345 350

Phe Lys Thr Pro Ile Ala Ala Gly Arg Gly Gly Ala Gln Thr Asp Glu
 355 360 365

Asn Gln Ala Ala Asp Gly Asp Pro Lys Tyr Ala Phe Gly Arg Gln His
 370 375 380

Gly Gln Lys Thr Thr Thr Thr Gly Glu Thr Pro Glu Arg Phe Thr Tyr
 385 390 395 400

Ile Ala His Gln Asp Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Gly Asp Trp Ile Gln
 405 410 415

Asn Ile Asn Phe Asn Leu Pro Val Thr Lys Asp Asn Val Leu Leu Pro
 420 425 430

Thr Asp Pro Ile Gly Gly Lys Thr Gly Ile Asn Tyr Thr Asn Ile Phe
 435 440 445

Asn Thr Tyr Gly Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Val Pro Pro Val Tyr

450 455 460
 Pro Asn Gly Gln Ile Trp Asp Lys Glu Phe Asp Thr Asp Leu Lys Pro
 465 470 475 480
 Arg Leu His Val Asn Ala Pro Phe Val Cys Gln Asn Asn Cys Pro Gly
 485 490 495
 Gln Leu Phe Val Lys Val Ala Pro Asn Leu Thr Asn Glu Tyr Asp Pro
 500 505 510
 Asp Ala Ser Ala Asn Met Ser Arg Ile Val Thr Tyr Ser Asp Phe Trp
 515 520 525
 Trp Lys Gly Lys Leu Val Phe Lys Ala Lys Leu Arg Ala Ser His Thr
 530 535 540
 Trp Asn Pro Ile Gln Gln Met Ser Ile Asn Val Asp Asn Gln Phe Asn
 545 550 555 560
 Tyr Val Pro Asn Asn Ile Gly Ala Met Lys Ile Val Tyr Glu Lys Ser
 565 570 575
 Gln Leu Ala Pro Arg Lys Leu Tyr
 580
 <210> 9
 <211> 584
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> GenBank: AHW47989.1
 <400> 9
 Met Ser Asp Gly Ala Val Gln Pro Asp Gly Gly Gln Pro Ala Val Arg
 1 5 10 15
 Asn Glu Arg Ala Thr Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser Gly Gly Val Gly Ile Ser Thr Gly Thr Phe Asn Asn Gln

35	40	45																	
Thr	Glu	Phe	Lys	Phe	Leu	Glu	Asn	Gly	Trp	Val	Glu	Ile	Thr	Ala	Asn				
50						55					60								
Ser	Ser	Arg	Leu	Val	His	Leu	Asn	Met	Pro	Glu	Ser	Glu	Asn	Tyr	Lys				
65					70					75					80				
Arg	Val	Val	Val	Asn	Asn	Met	Asp	Lys	Thr	Ala	Val	Lys	Gly	Asn	Met				
				85					90					95					
Ala	Leu	Asp	Asp	Thr	His	Val	Gln	Ile	Val	Thr	Pro	Trp	Ser	Leu	Val				
			100					105					110						
Asp	Ala	Asn	Ala	Trp	Gly	Val	Trp	Phe	Asn	Pro	Gly	Asp	Trp	Gln	Leu				
		115					120					125							
Ile	Val	Asn	Thr	Met	Ser	Glu	Leu	His	Leu	Val	Ser	Phe	Glu	Gln	Glu				
	130					135					140								
Ile	Phe	Asn	Val	Val	Leu	Lys	Thr	Val	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Gln	Pro				
145					150					155					160				
Pro	Thr	Lys	Val	Tyr	Asn	Asn	Asp	Leu	Thr	Ala	Ser	Leu	Met	Val	Ala				
				165					170					175					
Leu	Asp	Ser	Asn	Asn	Thr	Met	Pro	Phe	Thr	Pro	Ala	Ala	Met	Arg	Ser				
			180					185					190						
Glu	Thr	Leu	Gly	Phe	Tyr	Pro	Trp	Lys	Pro	Thr	Ile	Pro	Thr	Pro	Trp				
		195					200					205							
Arg	Tyr	Tyr	Phe	Gln	Trp	Asp	Arg	Thr	Leu	Ile	Pro	Ser	His	Thr	Gly				
	210					215					220								
Thr	Ser	Gly	Thr	Pro	Thr	Asn	Val	Tyr	His	Gly	Ser	Asp	Pro	Asp	Asp				
225					230					235				240					
Val	Gln	Phe	Tyr	Thr	Ile	Glu	Asn	Ser	Val	Pro	Val	His	Leu	Leu	Arg				
				245					250					255					

Thr Gly Asp Glu Phe Ala Thr Gly Thr Phe Phe Phe Asp Cys Lys Pro
 260 265 270

Cys Arg Leu Thr His Thr Trp Gln Thr Asn Arg Ala Leu Gly Leu Pro
 275 280 285

Pro Phe Leu Asn Ser Leu Pro Gln Ser Glu Gly Ile Thr Asn Phe Gly
 290 295 300

Asp Ile Gly Val Gln Gln Asp Lys Arg Arg Gly Val Thr Gln Met Gly
 305 310 315 320

Asn Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Ala Thr Ile Met Arg Pro Ala Glu Val
 325 330 335

Gly Tyr Ser Ala Pro Tyr Tyr Ser Phe Glu Ala Ser Thr Gln Gly Pro
 340 345 350

Phe Lys Thr Pro Ile Ala Ala Gly Arg Gly Gly Ala Gln Thr Asp Glu
 355 360 365

Asn Gln Ala Ala Asp Gly Asp Pro Lys Tyr Ala Phe Gly Arg Gln His
 370 375 380

Gly Gln Lys Thr Thr Thr Thr Gly Glu Thr Pro Glu Arg Phe Thr Tyr
 385 390 395 400

Ile Ser His Gln Asp Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Gly Asp Trp Ile Gln
 405 410 415

Asn Ile Asn Phe Asn Leu Pro Val Thr Lys Asp Asn Val Leu Leu Pro
 420 425 430

Thr Asp Pro Ile Gly Gly Lys Thr Gly Ile Asn Tyr Thr Asn Ile Phe
 435 440 445

Asn Thr Tyr Gly Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Val Pro Pro Val Tyr
 450 455 460

Pro Asn Gly Gln Ile Trp Asp Lys Glu Phe Asp Thr Asp Leu Lys Pro

465 470 475 480
 Arg Leu His Val Asn Ala Pro Phe Val Cys Gln Asn Asn Cys Pro Gly
 485 490 495
 Gln Leu Phe Val Lys Val Ala Pro Asn Leu Thr Asn Glu Tyr Asp Pro
 500 505 510
 Asp Ala Ser Ala Asn Met Ser Arg Ile Val Thr Tyr Ser Asp Phe Trp
 515 520 525
 Trp Lys Gly Lys Leu Val Phe Lys Ala Lys Leu Arg Ala Ser His Thr
 530 535 540
 Trp Asn Pro Ile Gln Gln Met Ser Ile Asn Val Asp Asn Gln Phe Asn
 545 550 555 560
 Tyr Val Pro Asn Asn Ile Gly Ala Met Lys Ile Val Tyr Glu Lys Ser
 565 570 575
 Gln Leu Ala Pro Arg Lys Leu Tyr
 580

 <210> 10
 <211> 584
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> GenBank: ADA61118.1

 <400> 10
 Met Ser Asp Gly Ala Val Gln Pro Asp Gly Gly Gln Pro Ala Val Arg
 1 5 10 15
 Asn Glu Arg Ala Thr Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Ser Thr Gly Ala Phe Asn Asn Gln
 35 40 45
 Thr Glu Phe Lys Phe Leu Glu Asn Gly Trp Val Glu Ile Thr Ala Asn

50						55									60
Ser	Ser	Arg	Leu	Val	His	Leu	Asn	Met	Pro	Glu	Ser	Glu	Asn	Tyr	Arg
65					70					75					80
Arg	Val	Val	Val	Asn	Asn	Met	Asp	Lys	Thr	Ala	Val	Asn	Gly	Asn	Met
				85					90					95	
Ala	Leu	Asp	Asp	Ile	His	Ala	Gln	Ile	Val	Thr	Pro	Trp	Ser	Leu	Val
			100					105					110		
Asp	Ala	Asn	Ala	Trp	Gly	Val	Trp	Phe	Asn	Pro	Gly	Asp	Trp	Gln	Leu
		115					120					125			
Ile	Val	Asn	Thr	Met	Ser	Glu	Leu	His	Leu	Val	Ser	Phe	Glu	Gln	Glu
	130					135					140				
Ile	Phe	Asn	Val	Val	Leu	Lys	Thr	Val	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Gln	Pro
145					150					155					160
Pro	Thr	Lys	Val	Tyr	Asn	Asn	Asp	Leu	Thr	Ala	Ser	Leu	Met	Val	Ala
				165					170					175	
Leu	Asp	Ser	Asn	Asn	Thr	Met	Pro	Phe	Thr	Pro	Ala	Ala	Met	Arg	Ser
			180					185					190		
Glu	Thr	Leu	Gly	Phe	Tyr	Pro	Trp	Lys	Pro	Thr	Ile	Pro	Thr	Pro	Trp
		195					200					205			
Arg	Tyr	His	Phe	Gln	Trp	Asp	Arg	Thr	Leu	Ile	Pro	Ser	His	Thr	Gly
	210					215					220				
Thr	Ser	Gly	Thr	Pro	Thr	Asn	Ile	Tyr	His	Gly	Thr	Asp	Pro	Asp	Asp
225					230					235					240
Val	Gln	Phe	Tyr	Thr	Ile	Glu	Asn	Ser	Val	Pro	Val	His	Leu	Leu	Arg
				245					250					255	
Thr	Gly	Asp	Glu	Phe	Ala	Thr	Gly	Thr	Phe	Phe	Phe	Asp	Cys	Thr	Pro
			260					265					270		

Cys Arg Leu Thr His Thr Trp Gln Thr Asn Arg Ala Leu Gly Leu Pro
 275 280 285

Pro Phe Leu Asn Ser Leu Pro Gln Ser Glu Gly Ala Thr Asn Phe Gly
 290 295 300

Asp Ile Gly Val Gln Gln Asp Lys Arg Arg Gly Val Thr Gln Met Gly
 305 310 315 320

Asn Thr Asn Tyr Ile Thr Glu Ala Thr Ile Met Arg Pro Ala Glu Val
 325 330 335

Gly Tyr Ser Ala Pro Tyr Tyr Ser Phe Glu Ala Ser Thr Gln Gly Pro
 340 345 350

Phe Lys Thr Pro Ile Ala Ala Gly Arg Gly Gly Ala Gln Thr Asp Glu
 355 360 365

Asn Gln Ala Ala Asp Gly Glu Pro Arg Tyr Ala Phe Gly Arg Gln His
 370 375 380

Gly Gln Lys Thr Thr Thr Thr Gly Glu Thr Pro Glu Arg Phe Thr Tyr
 385 390 395 400

Ile Ala His Gln Asp Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Gly Asp Trp Ile Gln
 405 410 415

Asn Ile Asn Phe Asn Leu Pro Val Thr Asn Asp Asn Val Leu Leu Pro
 420 425 430

Thr Asp Pro Ile Gly Gly Lys Thr Gly Ile Asn Tyr Thr Asn Ile Phe
 435 440 445

Asn Thr Tyr Gly Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Val Pro Pro Val Tyr
 450 455 460

Pro Asn Gly Gln Ile Trp Asp Lys Glu Phe Asp Thr Asp Leu Lys Pro
 465 470 475 480

Arg Leu His Val Asn Ala Pro Phe Val Cys Gln Asn Asn Cys Pro Gly

	485		490		495										
Gln	Leu	Phe	Val	Lys	Val	Ala	Pro	Asn	Leu	Thr	Asn	Glu	Tyr	Asp	Pro
			500					505					510		
Asp	Ala	Ser	Ala	Asn	Met	Ser	Arg	Ile	Val	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Trp
		515					520					525			
Trp	Lys	Gly	Lys	Leu	Val	Phe	Lys	Ala	Lys	Leu	Arg	Ala	Ser	His	Thr
	530					535					540				
Trp	Asn	Pro	Ile	Gln	Gln	Met	Ser	Ile	Asn	Val	Asp	Asn	Gln	Phe	Asn
545					550					555					560
Tyr	Val	Pro	Ser	Asn	Ile	Gly	Gly	Met	Lys	Ile	Val	Phe	Glu	Lys	Ser
				565					570					575	
Gln	Leu	Ala	Pro	Arg	Lys	Leu	Tyr								
			580												

<210> 11
 <211> 11387
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pMEB072

<400> 11	
aagcttttact cgtaaagcga gttgaaggat catatttagt tgcgttttatg agataagatt	60
gaaagcacgt gtaaaatggt tcccgcgcgt tggcacaact atttacaatg cggccaagtt	120
ataaaagatt ctaatctgat atgtttttaa acacctttgc ggcccgagtt gtttgcgtag	180
gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag taaaacaaaa ccctagtatt	240
ggagcaataa tcgatttaac caacacgtct aaatattatg atggtgtgca ttttttgagg	300
gcgggcctgt tatacaaaaa aattcaagta cctggccaga ctttgccgcc tgaaagcata	360
gttcaagaat ttattgacac ggtaaaagaa ttacagaaa agtgtcccg catgttggtg	420
ggcgtgcact gcacacacgg tattaatcgc accggttaca tgggtgtgcag atatttaatg	480
cacaccctgg gtattgcgcc gcaggaagcc atagatagat tcgaaaaagc cagagggtcac	540

aaaattgaaa gacaaaatta cgttcaagat ttattaattht aattaatatt atttgcatthc	600
tttaacaaat actttatcct atthttcaaht tgthgcgctt cttccagcga accaaaacta	660
tgcttcgctt gctccgttht gcttgtagcc gatcagtggc gthgttccaa tcgacggtag	720
gattaggccg gatattctcc accacaatgt tggcaacgth gatgttacgt ttatgcttht	780
ggtthttccac gtacgtctth tggccggtaa tagccgtaaa cgtagtgccg tcgcgcgtca	840
cgcacaacac cggatgttht cgcttgthccg cggggtattg aaccgcgcga tccgacaaat	900
ccaccacttht ggcaactaaa tcggtgacct gcgcgtctth tthctgcatt atttgcgtct	960
tctthttgcat ggtthtctgg aagccggtht acatgcgtht tagatcagtc atgacgcgcg	1020
tgacctgcaa atctthtggc tcgatctgct tgccttgat ggcaacgatg cgttcaataa	1080
actctgttht tttaacaagt tcctcggtth tthgcgccac caccgctthc agcgcgttht	1140
tgtgctcggt gaatgtcgca atcagcttag tcaccaactg tthgctctcc tcctcccgtt	1200
gthtgatcgc gggatcgtac thgcggthc agagcactth aggaattact tcttctaaaa	1260
gccattcttht taattctatg gcgtaaggca atttggaactt cataatcagc tgaatcacgc	1320
cggatthtagt aatgagcact gtatgcggct gcaatacag cgggtcgccc cthttcacga	1380
cgctgttaga ggtagggcc ccatthtggg tggthctgth aaataacgat thgtattht	1440
tgtctacatg aacacgtata gctthtacc aaactgtata tthtaactg ttagcgacgt	1500
ccttgccac gaaccggacc tgttggtcgc gctctagcac gtaccgcagg thgaacgtat	1560
cttctccaaa tthaaattct ccaatthttaa cgcgagccat tthgatacac gtgtgtcgat	1620
thtgcaacaa ctattgttht ttaacgcaa ctaacttht tgtggtaagc aataattaaa	1680
tatgggggaa catgcgccgc tacaacactc gthgttatga acgcagacgg cgcggthctc	1740
ggcgcaagcg gctaaaacgt gthgcgtht caacgcggca aacatcgcaa aagccaatag	1800
tacagththt atttgcatat taacggcgat tthttaaatt atcttattta ataaatagth	1860
atgacgccta caactccccg cccgcgthtga cthgctgcac cthgagcagt tcgthgacgc	1920
cttctccgt gtggccgaac acgthgagcg gthgthgcat gaccagcggc gthccgcacg	1980
cgcgcacaa gtatctgtac accgaatgat cthcgggcga aggcacgthc gcctccaagt	2040
ggcaatattg gcaaattcga aaatatatac agthgggtht tthgcgcata tctatcgthg	2100
cgttgggcat gtacgtccga acgthgattt gcatgcaagc cgaaattaaa tcattgcat	2160

tagtgcgatt	aaaacgttgt	acatcctcgc	ttttaatcat	gccgtcgatt	aaatcgcgca	2220
atcgagtcaa	gtgatcaaag	tgtggaataa	tgttttcttt	gtattcccga	gtcaagcgca	2280
gcgcgatatt	taacaaacta	gccatcttgt	aagttagttt	catttaatgc	aactttatcc	2340
aataatatat	tatgtatcgc	acgtcaagaa	ttaacaatgc	gcccgttgtc	gcatctcaac	2400
acgactatga	tagagatcaa	ataaagcgcg	aattaaatag	cttgcgacgc	aacgtgcacg	2460
atctgtgcac	gcgttccggc	acgagctttg	attgtaataa	gtttttacga	agcgatgaca	2520
tgacccccgt	agtgacaacg	atcacgccca	aaagaactgc	cgactacaaa	attaccgagt	2580
atgtcgggtga	cgttaaaaact	attaagccat	ccaatcgacc	gttagtcgaa	tcaggaccgc	2640
tggtgcgaga	agccgcgaag	tatggcgaat	gcatcgtata	acgtgtggag	tccgctcatt	2700
agagcgtcat	gttttagacaa	gaaagctaca	tatttaattg	atcccgatga	ttttattgat	2760
aaattgaccc	taactccata	cacggtattc	tacaatggcg	gggttttggg	caaaatttcc	2820
ggactgcgat	tgtacatgct	gttaacggct	ccgccacta	ttaatgaaat	taaaaattcc	2880
aattttaaaa	aacgcagcaa	gagaaacatt	tgtatgaaag	aatgcgtaga	aggaaagaaa	2940
aatgtcgtcg	acatgctgaa	caacaagatt	aatatgcctc	cgtgtataaa	aaaaatattg	3000
aacgatttga	aagaaaacaa	tgtaccgcgc	ggcggtatgt	acaggaagag	gtttatacta	3060
aactgttaca	ttgcaaacgt	ggtttcgtgt	gccaaagtgtg	aaaaccgatg	tttaatcaag	3120
gctctgacgc	atttctacaa	ccacgactcc	aagtgtgtgg	gtgaagtcac	gcatctttta	3180
atcaaattccc	aagatgtgta	taaaccacca	aactgccaaa	aaatgaaaac	tgtcgacaag	3240
ctctgtccgt	ttgctggcaa	ctgcaagggg	ctcaatccta	tttgtaatta	ttgaataata	3300
aaacaattat	aaatgctaaa	tttggttttt	attaacgata	caaaccaaac	gcaacaagaa	3360
catttgtagt	attatctata	attgaaaacg	cgtagttata	atcgctgagg	taatatttaa	3420
aatcattttc	aaatgattca	cagttaattt	gcgacaatat	aattttattt	tcacataaac	3480
tagacgcctt	gtcgtcttct	tcttcgtatt	ccttctcttt	ttcatttttc	tcctcataaa	3540
aattaacata	gttattatcg	tatccatata	tgtatctatc	gtatagagta	aattttttgt	3600
tgtcataaat	atatatgtct	tttttaatgg	gggtgatagt	accgctgcgc	atagtttttc	3660
tgtaattttac	aacagtgcta	ttttctggta	gttcttcgga	gtgtgttgct	ttaattatta	3720
aatttatata	atcaatgaat	ttgggatcgt	cggttttgta	caatatgttg	ccggcatagt	3780

acgcagcttc ttctagttca attacacccat tttttagcag caccggatta acataacttt	3840
ccaaaatggt gtacgaaccg ttaaacaataa acagttcacc tcccttttct atactattgt	3900
ctgcgagcag ttgtttgttg ttaaaaataa cagccattgt aatgagacgc aaaaactaat	3960
atcacaaact ggaaatgtct atcaatatat agttgctgat atcatggaga taattaaaat	4020
gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc gtaacagttt tgtaataaaa	4080
aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca tcggggcgcg atccgccacc	4140
atgtccgacg gtgctgtgca gcccgacggt ggccagcccg ctgtgcgtaa cgagcgtgct	4200
accggttccg gtaacggttc aggcggaggt ggaggtggtg gttccggcgg tgtgggcac	4260
tccaccggca ccttcaacaa ccagaccgag ttcaagttcc tcgagaacgg ttgggtggag	4320
atcaccgcta actcctcccg tctggtgcac ctgaacatgc ccgagtccga gaactaccgt	4380
cgtgtggtgg tgaacaacct ggacaagacc gctgtgaacg gtaacatggc tctggacgac	4440
accacgctc agatcgtgac cccctggtcc ctggtggacg ctaacgcttg gggcgtgtgg	4500
ttcaaccccg gtgactggca gctgatcgtg aacaccatgt ccgagctgca cctggtgtcc	4560
ttcgagcaag agatcttcaa cgtcgtcctc aagaccgtgt ccgagtccgc taccagccc	4620
cccaccaagg tgtacaacaa cgacctgacc gttccctga tggtcgctct ggactccaac	4680
aacaccatgc ccttcacccc cgctgctatg cgttccgaga ccctgggctt ctaccctgg	4740
aagcccacca tccccacccc ctggcggttac tacttccagt gggaccgtac cctgatcccc	4800
tcccacaccg gtacttccgg caccocccacc aacatctacc acggcaccga ccccgacgac	4860
gtgcagttct acaccatcga gaactccgtg cccgtgcacc tgctgcgtac cggtgacgag	4920
ttcgctaccg gaaccttctt ctctgactgc aagccctgcc gtctgacca cacctggcag	4980
accaaccgtg ctctgggtct gcctcccttc ctgaactccc tgccccaggc tgaggggtggc	5040
accaacttcg gttacatcgg tgtgcagcag gacaagcgtc gtggtgtgac ccagatgggt	5100
aacaccaact acatcaccga ggctaccatc atgcgtcccg ctgaggtcgg ctactccgct	5160
ccctactact ccttcgaggc ttccaccag ggccccttca agaccccat cgctgctggt	5220
cgtggtggtg ctgagaccga cgagaaccag gctgctgacg gtgacccccg ttacgctttc	5280
ggtcgtcagc acggccaaaa gaccaccacc accggcgaga cccccgagc tttcacctac	5340
atcgctcacc aggacaccgg tcgttaccac gagggcgact ggattcagaa catcaacttc	5400

aacctgcccg tgaccgagga caacgtgctg ctgccaccg accccatcgg tggcaagacc	5460
ggtatcaact acactaacat cttcaacacc tacggtcctc tgaccgctct gaacaacgtg	5520
ccccccgtgt accccaacgg ccagatctgg gacaaggagt tcgacaccga cctgaagccc	5580
cgtctgcacg tgaacgctcc cttcgtgtgc cagaacaact gccctggcca gctgttcgtc	5640
aaggtggccc ccaacctgac caacgagtac gaccctgacg cttccgctaa catgtcccgt	5700
atcgtgacct actccgactt ctggtggaag ggcaagctgg tgttcaaggc caagctgcgt	5760
gcttctcaca cctggaaccc catccagcag atgtccatca acgtggacaa ccagttcaac	5820
tacgtgccct ccaacatcgg tggaatgaag atcgtgtacg agaagtccca gctggctccc	5880
cgtaagctgt actaataatc tagaattccg gagcggccgc tgcagatctg atcctttcct	5940
gggacccggc aagaaccaa aactcactct cttcaaggaa atccgtaatg ttaaaccgga	6000
cacgatgaag cttgtcgttg gatggaaagg aaaagagttc tacagggaaa cttggacccg	6060
cttcatggaa gacagcttcc ccattgttaa cgaccaagaa gtgatggatg ttttccttgt	6120
tgtcaacatg cgtcccacta gacccaaccg ttgttacaaa ttcctggccc aacacgctct	6180
gcgttgcgac cccgactatg tacctcatga cgtgattagg atcgtcgagc cttcatgggt	6240
gggcagcaac aacgagtacc gcatcagcct ggctaagaag ggcgggcggt gcccaataat	6300
gaaccttcac tctgagtaca ccaactcggt cgaacagttc atcgatcgtg tcatctggga	6360
gaacttctac aagcccatcg ttacatcgg taccgactct gctgaagagg aggaaattct	6420
ccttgaagtt tccctggtgt tcaaagtaaa ggagtttgca ccagacgcac ctctgttcac	6480
tggtccggcg tattaataca cgatacattg ttattagtag atttattaag cgctagattc	6540
tgtgcgttgt tgatttacag acaattgttg tacgtatttt aataattcat taaatttata	6600
atcttttaggg tggatatgta gagcgaaaat caaatgattt tcagcgtctt tataatctgaa	6660
tttaaatatt aaatcctcaa tagatttgta aaataggttt cgattagttt caaacaaggg	6720
ttgtttttcc gaaccgatgg ctggactatc taatggattt tcgctcaacg ccacaaaact	6780
tgccaaatct tgtagcagca atctagcttt gtcgatattc gtttgtgttt tgttttgtaa	6840
taaaggttcg acgtcgttca aaatattatg cgcttttgta tttctttcat cactgtcggt	6900
agtgtacaat tgactcgacg taaacacgtt aaataaagct tggacatatt taacatcggg	6960
cgtgttagct ttattaggcc gattatcgtc gtcgtcccaa ccctcgtcgt tagaagttgc	7020

ttccgaagac gatttttgcca tagccacacg acgcctatta attgtgtcgg ctaacacgtc	7080
cgcgatcaaa tttgtagttg agcttttttg aattatttct gattgcgggc gtttttgggc	7140
gggtttcaat ctaactgtgc ccgattttta ttcagacaac acgttagaaa gcgatggtgc	7200
aggcgtggt aacatttcag acggcaaadc tactaatggc ggcggtggtg gagctgatga	7260
taaatctacc atcgggtggag gcgcaggcgg ggctggcggc ggaggcggag gcggaggtgg	7320
tggcgtgat gcagacggcg gtttaggctc aaatgtctct ttaggcaaca cagtcggcac	7380
ctcaactatt gtactggttt cgggcgccgt ttttggtttg accggtctga gacgagtgcg	7440
atTTTTTTCG tttctaatag cttccaacaa ttgttgtctg tcgtctaaag gtgcagcggg	7500
ttgaggttcc gtcggcattg gtggagcggg cggcaattca gacatcgatg gtggtggtgg	7560
tggtggaggc gctggaatgt taggcacggg agaagtggtt ggcggcgggt ccgccggtat	7620
aatttgttct ggtttagttt gttcgcgcac gattgtgggc accggcgcag gcgccgtgg	7680
ctgcacaacg gaaggtcgtc tgcttcgagg cagcgttgg ggtggtggca attcaatatt	7740
ataattggaa tacaatcgt aaaaatctgc tataagcatt gtaatttcgc tatcgtttac	7800
cgtgccgata ttaacaacc gctcaatgta agcaattgta ttgtaaagag attgtctcaa	7860
gctcgccgca cgccgataac aagccttttc atttttacta cagcattgta gtggcgagac	7920
acttcgctgt cgtcgacgta catgtatgct ttgttgtcaa aaacgtcgtt ggcaagcttt	7980
aaaatatTTA aaagaacatc tctgttcagc accactgtgt tgtcgtaaatt gttgtttttg	8040
ataattttgcg cttccgcagt atcgacacgt tcaaaaaatt gatgcgcac aattttgttg	8100
ttcctattat tgaataaata agattgtaca gattcatatc tacgattcgt catggccacc	8160
acaaatgcta cgctgcaaac gctggtacaa ttttacgaaa actgcaaaaa cgtcaaaact	8220
cggataaaaa taatcaacgg gcgctttggc aaaatatcta ttttatcgca caagcccact	8280
agcaaattgt atttgcagaa aacaatttcg gcgcacaatt ttaacgctga cgaaataaaa	8340
gttcaccagt taatgagcga ccacccaaat tttataaaaa tctatTTTAA tcacggttcc	8400
atcaacaacc aagtgatcgt gatggactac attgactgtc ccgatttatt tgaaacacta	8460
caaattaaag gcgagctttc gtaccaactt gttagcaata ttattagaca gctgtgtgaa	8520
gcgctcaacg atttgcacaa gcacaatttc atacacaacg acataaaaact cgaaaatgtc	8580
ttatatttcg aagcacttga tcgcgtgtat gtttgcgatt acggattgtg caaacacgaa	8640

aactcactta gcggtgcacga cggcacggtg gagtatTTTta gtccggaaaa aattcgacac	8700
acaactatgc acgttttcgtt tgactggtac gcggcggtgtt aacatacaag ttgctaacgt	8760
aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca	8820
tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat	8880
taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt	8940
aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcc	9000
cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa	9060
aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa	9120
aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc	9180
tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccgga	9240
caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgctgcgc tctcctgttc	9300
cgacctgcc gcttacgga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt	9360
ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct	9420
gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg	9480
agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta	9540
gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct	9600
acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa	9660
gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcggtggt ttttttgttt	9720
gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta	9780
cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gatTTTtggc atgagattat	9840
caaaaaggat cttcacctag atcctTTTaa attaaaaatg aagTTTTaaa tcaatctaaa	9900
gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct	9960
cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtg tagataacta	10020
cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct	10080
caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg	10140
gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa	10200
gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtgggtg	10260

cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta 10320
 catgatcccc catgttggtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcggtgtca 10380
 gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta 10440
 ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct 10500
 gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg 10560
 cgccacatag cagaacttta aaagtgtctc tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac 10620
 tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact 10680
 gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa 10740
 atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt 10800
 ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat 10860
 gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg 10920
 acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc 10980
 cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg 11040
 agacggtcac agcttgctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgctg 11100
 cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcacagag cagattgtac 11160
 tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca 11220
 tcaggcgcca ttcgccattc aggtgcgca actgttgga agggcgatcg gtgcgggcct 11280
 cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa 11340
 cgccaggggtt ttcccagtca cgacgttgta aaacgacggc cagtgcc 11387

<210> 12
 <211> 11385
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pMEB073

<400> 12
 ctagaattcc ggagcggccg ctgcagatct gatcctttcc tgggaccgg caagaaccaa 60
 aaactcactc tcttcaagga aatccgtaat gttaaaccgg acacgatgaa gcttgctggt 120
 ggatggaaaag gaaaagagtt ctacagggaa acttggaacc gcttcattga agacagcttc 180

cccattgtta acgaccaaga agtgatggat gttttccttg ttgtcaacat gcgtcccact	240
agaccaacc gttgttataa attcctggcc caacacgctc tgcgttgcca ccccgactat	300
gtacctcatg acgtgattag gatcgctgag ccttcatggg tgggcagcaa caacgagtac	360
cgcatacagc tggctaagaa gggcggcggc tgccaataa tgaaccttca ctctgagtac	420
accaactcgt tcgaacagtt catcgatcgt gtcactctgg agaacttcta caagcccatc	480
gtttacatcg gtaccgactc tgctgaagag gaggaattc tccttgaagt ttccctggtg	540
ttcaaagtaa aggagtttgc accagacgca cctctgttca ctgggtccggc gtattaaaac	600
acgatacatt gttattagta catattataa gcgctagatt ctgtgcgttg ttgatttaca	660
gacaattggt gtacgtatgt taataattca ttaaatttat aatctttagg gtggtatggt	720
agagcgaaaa tcaaatgatt ttcagcgtct ttatatctga atttaaatat taaatcctca	780
atagatttgt aaaatagggt tcgattaggt tcaacaagg gttgtttttc cgaaccgatg	840
gctggactat ctaatggatt ttcgctcaac gccacaaaac ttgccaaatc ttgtagcagc	900
aatctagctt tgtcgatatt cgtttgtgtt ttgttttgta ataaagggtc gacgtcgttc	960
aaaatattat gcgcttttgt atttctttca tcaactgtcg tagtgtaca ttgactcgac	1020
gtaaacacgt taaataaagc ttggacatat ttaacatcgg gcgtgttagc tttattaggc	1080
cgattatcgt cgtcgtccca accctcgtcg ttagaagttg cttccgaaga cgattttgcc	1140
atagccacac gacgcctatt aattgtgtcg gctaacacgt ccgcatcaa atttgtagtt	1200
gagctttttg gaattatttc tgattgcggg cgtttttggg cgggtttcaa tctaactgtg	1260
cccgatttta attcagacaa cacgttagaa agcgatgggt caggcggtgg taacatttca	1320
gacggcaaat ctactaatgg cggcgggtgt ggagctgatg ataaatctac catcgggtga	1380
ggcgagggcg gggctggcgg cggaggcgga ggcggagggt gtggcggtga tgcagacggc	1440
ggtttaggct caaatgtctc tttaggcaac acagtcggca cctcaactat tgtactgggt	1500
tcgggcgcgg tttttggttt gaccggtctg agacgagtgc gatttttttc gtttctaata	1560
gcttccaaca attgttgtct gtcgtctaaa ggtgcagcgg gttgaggttc cgtcggcatt	1620
ggtggagcgg gcggaattc agacatcgat ggtggtgggt gtgggtggagg cgctggaatg	1680
ttaggcacgg gagaagggtg tggcggcggg gccgccggtg taatttggtc tggtttagtt	1740
tgttcgcgca cgattgtggg caccggcgca ggcgccgctg gctgcacaac ggaaggctcg	1800

ctgcttcgag gcagcgcttg ggggtggtggc aattcaatat tataattgga atacaaatcg	1860
taaaaatctg ctataagcat tgtaatttcg ctatcgttta ccgtgccgat atttaacaac	1920
cgctcaatgt aagcaattgt attgtaaaga gattgtctca agctccgcac gccgataaca	1980
agccttttca tttttactac agcattgtag tggcgagaca cttcgctgtc gtcgacgtac	2040
atgtatgctt tgttgtcaaa aacgtcgttg gcaagcttta aaatatttaa aagaacatct	2100
ctgttcagca ccactgtgtt gtcgtaaattg ttgtttttga taatttgcg cttccgcagta	2160
tcgacacggt caaaaaattg atgcgcatca attttggtgt tcctattatt gaataaataa	2220
gattgtacag attcatatct acgattcgtc atggccacca caaatgctac gctgcaaacg	2280
ctggtacaat tttagcaaaa ctgcaaaaac gtcaaaactc ggtataaaat aatcaacggg	2340
cgcttttgca aaatatctat tttatcgcac aagccacta gcaaattgta tttgcagaaa	2400
acaatttcgg cgcacaattt taacgctgac gaaataaaag ttcaccagtt aatgagcgac	2460
cacccaaatt ttataaaaat ctattttaat cacggttcca tcaacaacca agtgatcgtg	2520
atggactaca ttgactgtcc cgatttattt gaaacactac aaattaaagg cgagctttcg	2580
taccaacttg ttagcaatat tattagacag ctgtgtgaag cgctcaacga tttgcacaag	2640
cacaatttca tacacaacga cataaaactc gaaaatgtct tatatttcga agcacttgat	2700
cgcggtgatg tttgcgatta cggattgtgc aaacacgaaa actcacttag cgtgcacgac	2760
ggcacgttgg agtatttttag tccggaaaaa attcgacaca caactatgca cgtttcgttt	2820
gactggtacg cggcgtgtta acatacaagt tgctaaccgg cggttcgtaa tcatggtcac	2880
agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa	2940
gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta attgogttgc	3000
gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcc gctgcattaa tgaatcggcc	3060
aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctactgact	3120
cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactaaag gcggtataac	3180
ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa	3240
aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg	3300
acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa	3360
gataaccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc	3420

ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac	3480
gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac	3540
ccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaaacta tcgtcttgag tccaaccggg	3600
taagacacga cttatcgcca ctggcagcag cactggtaa caggattagc agagcgaggt	3660
atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga	3720
cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct	3780
cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga	3840
ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg	3900
ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct	3960
tcacctagat ctttttaa ataaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt	4020
aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc	4080
tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg	4140
gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag	4200
atztatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt	4260
tatccgcctc catccagtct attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag	4320
ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgtca cgctcgtcgt	4380
ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca	4440
tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtccctccgat cgttgtcaga agtaagtgg	4500
ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat	4560
ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgt	4620
tgccggcacc gagttgctct tgccccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca	4680
gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct	4740
taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac cactcgtgc acccaactga tcttcagcat	4800
cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa	4860
aggaataaag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt caatattatt	4920
gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa	4980
ataaacaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa	5040

ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat cacgaggccc tttcgtctcg	5100
cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccggag acggtcacag	5160
cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgta gggcgcgta gcgggtgttg	5220
gcgggtgtcg gggctggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc	5280
atatgcggtg tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatc aggcgccatt	5340
cgccattcag gctgcgcaac tgttgggaag ggcgatcggg gcgggcctct tcgctattac	5400
gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt	5460
cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca gtgccaagct ttactcgtaa agcgagttga	5520
aggatcatat ttagttgcgt ttatgagata agattgaaag cacgtgtaaa atgtttcccg	5580
cgcgttggca caactattta caatgcgggc aagttataaa agattccta ctgatattgt	5640
ttaaaacacc tttgcggccc gagttgtttg cgtacgtgac tagcgaagaa gatgtgtgga	5700
ccgcagaaca gatagtaaaa caaaacctta gtattggagc aataatcgat ttaaccaaca	5760
cgtctaaata ttatgatggt gtgcattttt tgcgggcggg cctgttatac aaaaaattc	5820
aagtacctgg ccagactttg ccgcctgaaa gcatagttca agaatttatt gacacggtaa	5880
aagaatttac agaaaagtgt cccggcatgt tgggtggcgt gactgcaca cacggtatta	5940
atcgacccgg ttacatggtg tgcagatatt taatgcacac cctgggtatt gcgccgcagg	6000
aagccataga tagattcgaa aaagccagag gtcacaaaat tgaaagacaa aattacgttc	6060
aagatttatt aatttaatta atattatttg cattctttaa caaatacttt atcctatttt	6120
caaattgttg cgcttcttcc agcgaaccaa aactatgctt cgcttgctcc gtttagcttg	6180
tagccgatca gtggcgttgt tccaatcgac ggtaggatta ggccgatat tctccaccac	6240
aatgttggca acgttgatgt tacgtttatg cttttggttt tccacgtacg tcttttggcc	6300
ggtaatagcc gtaaacgtag tgccgtcgcg cgtcacgcac aacaccggat gtttgcgctt	6360
gtccgcgggg tattgaaccg cgcgatccga caaatccacc actttggcaa ctaaatcggt	6420
gacctgcgcg tcttttttct gcattatttc gtctttcttt tgcattggtt cctggaagcc	6480
ggtgtacatg cggttttagat cagtcatgac gcgcgtgacc tgcaaactct tggcctcgat	6540
ctgcttgctc ttgatggcaa cgatgcgttc aataaactct tgttttttta caagttcctc	6600
ggttttttgc gccaccaccg cttgcagcgc gtttgtgtgc tcggtgaatg tcgcaatcag	6660

cttagtcacc aactgtttgc tctcctctc cegtgtttg atcgcgggat cgtacttgcc	6720
ggtgcagagc acttgaggaa ttacttcttc taaaagccat tcttgtaatt ctatggcgta	6780
aggcaatttg gacttcataa tcagctgaat cacgccggat ttagtaatga gcactgtatg	6840
cggctgcaaa tacagcgggt cgcccccttt cagcagctg ttagaggtag ggccccatt	6900
ttggatggtc tgctcaaata acgatttgta tttattgtct acatgaacac gtatagcttt	6960
atcacaaact gtatatattta aactgttagc gacgtccttg gccacgaacc ggacctgttg	7020
gtcgcgctct agcacgtacc gcaggttgaa cgtatcttct ccaaatttaa attctccaat	7080
tttaacgcga gccattttga tacacgtgtg tcgattttgc aacaactatt gttttttaac	7140
gcaaactaaa cttattgtgg taagcaataa ttaaatatgg gggaacatgc gccgctacaa	7200
cactcgtcgt tatgaacgca gacggcgccg gtctcggcgc aagcggctaa aacgtgttgc	7260
gcgttcaacg cggcaaacat cgcaaaagcc aatagtacag ttttgatttg catattaacg	7320
gcgatttttt aaattatctt atttaataaa tagttatgac gcctacaact ccccgccgc	7380
gttgactcgc tgcacctga gcagttcgtt gacgccttc tccgtgtggc cgaacacgtc	7440
gagcgggtgg tcgatgacca gcggcgtgcc gcacgcgacg cacaagtatc tgtacaccga	7500
atgatcgtcg ggcgaaggca cgtcggcctc caagtggcaa tattggcaaa ttcgaaaata	7560
tatacagttg gggtgtttgc gcatatctat cgtggcgttg ggcatgtacg tccgaacgtt	7620
gatttgcatt caagccgaaa ttaaatcatt gcgattagtgc cgattaaaac gttgtacatc	7680
ctcgctttta atcatgccgt cgattaaatc gcgcaatcga gtcaagtgat caaagtgtgg	7740
aataatgttt tctttgtatt cccgagtcaa gcgcagcgcg tatttttaaca aactagccat	7800
cttgtaagtt agtttcattt aatgcaactt tatccaataa tatattatgt atcgcacgtc	7860
aagaattaac aatgcgcccg ttgtcgcac tcaacacgac tatgatagag atcaaataaa	7920
gcgcgaatta aatagcttgc gacgcaacgt gcacgatctg tgcacgcgtt ccggcacgag	7980
ctttgattgt aataagtttt tacgaagcga tgacatgacc cccgtagtga caacgatcac	8040
gccccaaaga actgccgact acaaaattac cgagtatgtc ggtgacgtta aaactattaa	8100
gccatccaat cgaccgttag tcgaatcagg accgctggtg cgagaagccg cgaagtatgg	8160
cgaatgcac gtataacgtg tggagtccgc tcattagagc gtcattgtta gacaagaaag	8220
ctacatatatt aattgatccc gatgatttta ttgataaatt gaccctaact ccatacacgg	8280

tattctacaa tggcggggtt ttggtcaaaa tttccggact gcgattgtac atgctgttaa	8340
cggctccgcc cactattaat gaaattaaaa attccaattht taaaaaacgc agcaagagaa	8400
acatttgtat gaaagaatgc gtagaaggaa agaaaaatgt cgtcgacatg ctgaacaaca	8460
agattaatat gcctccgtgt ataaaaaaaa tattgaacga tttgaaagaa aacaatgtac	8520
cgcgcggcgg tatgtacagg aagaggttta tactaaactg ttacattgca aacgtggtht	8580
cgtgtgccaa gtgtgaaaac cgatgtthta tcaaggctct gacgcatttc tacaaccacg	8640
actccaagtg tgtgggtgaa gtcatgcac ttttaataca atcccaagat gtgtataaac	8700
caccaaactg ccaaaaaatg aaaactgtcg acaagctctg tccgtttgct ggcaactgca	8760
agggtctcaa tcctatttgt aattattgaa taataaaaca attataaatg ctaaaattgt	8820
tttttattaa cgatacaaac caaacgcaac aagaacattht gtagtattat ctataattga	8880
aaacgcgtag ttataatcgc tgaggtaata tttaaaatca ttttcaaag attcacagtht	8940
aatttgcgac aatataattht tattttcaca taaactagac gccttgctgt cttcttcttc	9000
gtattccttc tctttttcat ttttctctc ataaaaatta acatagttat tatcgatatcc	9060
atatatgtat ctatcgata gagtaaattt tttgttgtca taaatatata tgtctttttt	9120
aatgggggtg atagtaccgc tgcgcatagt tttctgttaa tttacaacag tgctattttc	9180
tggtagttht tcggagtgtg ttgctthaat tattaaattt atataatcaa tgaatttggg	9240
atcgtcggtt ttgtacaata tgttgccggc atagtacgca gcttcttcta gttcaattac	9300
accatttttt agcagcaccg gattaacata actttccaaa atgttgtacg aaccgttaaa	9360
caaaaacagt tcacctcct tttctatact attgtctgag agcagttgtt tgttgthtaa	9420
aataacagcc attgtaatga gacgcacaaa ctaatatcac aaactggaaa tgtctatcaa	9480
tatatagttg ctgatatcat ggagataatt aaaatgataa ccatctcgca aataaataag	9540
tattttactg ttttcgtaac agttttgtaa taaaaaaccc tataaatatt ccggattatt	9600
cataccgtcc caccatcggg cgcggatccc gggcgcagc caccatgctg aaggggggcc	9660
agcctgctgt gagaaacgag agagccaccg gcagcggcaa tggcagcggc ggagggggcg	9720
gaggaggatc tggcggagtg ggcacagca ccggcacctt caacaaccag accgagttca	9780
agttcctgga gaacggctgg gtggagatca ccgccaacag cagcagactg gtgcacctga	9840
acatgcccga gagcgagaac taccggagag tgggtgtgaa caacctggac aagaccgccg	9900

tgaacggcaa tatggccctg gatgacaccc acgccagat cgtgaccccc tggagcctgg	9960
tggacgcaa cgctgggga gtgtggttca accctggcga ctggcagctg atcgtgaaca	10020
ccatgagcga gctgcacctg gtgtccttcg agcaggagat tttcaacgtg gtgctgaaaa	10080
ccgtgtccga gagcgccacc cagcccccca ccaaagtgtg caacaacgac ctgaccgcct	10140
ccctgatggg ggccctggac agcaacaaca ccatgccctt caccctgcc gccatgagaa	10200
gcgagaccct gggcttctac ccttgaagc ccaccatccc cacccttgg cggtactact	10260
tccagtggga caggaccctg atccccagcc acaccggcac cagcggcacc cctaccaata	10320
tctaccacgg caccgacct gatgacgtgc agttctacac catcgagaac agcgtgcctg	10380
tgcacctgct gagaaccggc gacgagttcg ccaccggcac attcttcttc gactgcaagc	10440
cctgcagact gaccacacc tggcagacca acagagccct gggcctgcct ctttctctga	10500
acagcctgcc ccaggccgag ggcggcacca acttcggcta catcggcgtg cagcaggaca	10560
agagaagagg cgtgaccag atgggcaaca ccaactacat caccgaggcc accatcatga	10620
gaccgccga agtgggctac agcggccct actacagctt cgaggccagc acccagggcc	10680
ccttcaagac ccccatgcc gctggcagag gcgagccca gaccgacgag aaccaggccg	10740
ccgacggcga cccagatac gccttcggca gacagcacgg ccagaaaacc accaccaccg	10800
gcgagacccc cgagagattc acctacatcg cccaccagga caccggcaga taccocgagg	10860
gcgactggat tcagaacatc aacttcaacc tgcccgtgac cgaggataat gtgctgctgc	10920
ccaccgaccc catcggcggc aagaccggca tcaactacac caacatcttc aacacctacg	10980
gccccctgac cgccctgaat aacgtgcccc ccgtgtaccc caacggccag atttgggaca	11040
aggagtgcga caccgacctg aagcctaggc tgcacgtgaa tgcccccttc gtgtgtcaga	11100
acaactgccc tggccagctg tttgtgaaag tggcccccaa cctgaccaac gagtacgac	11160
ctgacgccag cgccaacatg agccggatcg tgacctacag cgacttcttg tggaagggca	11220
agctggtgtt caaggccaag ctgagagcca gccacacatg gaaccccatc cagcagatga	11280
gcatcaacgt ggacaaccag ttcaactacg tgcccagcaa tatcggcggc atgaagatcg	11340
tgtacgagaa gagccagctg gccccagaa agctgtactg ataata	11385