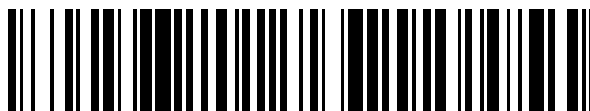


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 716**

51 Int. Cl.:

C12N 15/40

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2007** **E 07718768 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014** **EP 2013346**

54 Título: **Especies de pestivirus**

30 Prioridad:

21.04.2006 AU 2006902089

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.03.2015

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)

Wim de Körverstraat 31

5831 AN Boxmeer , NL

72 Inventor/es:

FROST, MELINDA, JANE;

KIRKLAND, PETER, DANIEL y

FINLAISON, DEBORAH, SUSAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 530 716 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Especies de pestivirus

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo pestivirus, y secuencias génicas derivadas del mismo. La invención se refiere además a métodos de detección, vacunas, agentes terapéuticos, y métodos de diagnóstico que usan las secuencias de la presente invención.

10 Técnica antecedente

Los pestivirus causan enfermedades altamente contagiosas y a menudo fatales de cerdos, vacas y ovejas, que se caracterizan por el daño a las vías respiratorias y gastrointestinales y del sistema inmune y pueden llevar un curso agudo o crónico. La infección del sistema reproductor puede causar muerte embrionaria y fetal, defectos congénitos y el nacimiento de animales persistentemente infectados. Los brotes de las enfermedades asociadas con infecciones por pestivirus se producen en muchos países y pueden causar grandes pérdidas económicas.

El género Pestivirus de los Flaviviridae comprende tres especies miembros estructural, antigénica y genéticamente muy relacionadas: fiebre porcina clásica (CSF) o cólera porcino (Francki et al. 1991. Flaviviridae, en el Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Archiv. Virol. Supl. 2, Springer Verlag, Viena pág. 223-233.); virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) que afecta principalmente al ganado vacuno, y el virus de la enfermedad de Border (BDV), que afecta principalmente a las ovejas (Moennig y Plagemann (1992) Adv. Virus Res. 41: 53-98; Moormann et al., (1990) Virology 177: 184-198; Becher et al. (1994) Virology 198: 542-551). Estudios recientes indican que puede haber varios virus menos reconocidos que justifican la clasificación taxonómica separada, quizás como especies separadas (Avalos-Ramirez et al. (2001) Virology 286: 456-465).

Los genomas de los pestivirus consisten en una molécula de ARN de hebra positiva de aproximadamente 12,5 kb (Renard et al. (1985) DNA 4: 429-438; Moormann y Hulst (1988) Virus Res. 11: 281-291; Becher et al. (1994) Virology 198: 542-551). Sin embargo, los genomas de ARN de cadena positiva de varias cepas de BVDV citopatogénicas pueden ser considerablemente más grande (Meyers et al. (1991) Virology 180: 602-616; Meyers et al. (1992) Virology 191: 368-386; Qi et al. (1992) Virology 189: 285-292).

Una propiedad inherente de virus con un genoma de ARN de cadena positiva es que su ARN genómico es infeccioso, es decir, después de la transfección de este ARN en células que soportan la replicación viral, se produce virus infeccioso. Como era de esperar, el ARN genómico (viral) de pestivirus también es infeccioso (Moennig y Plagemann, (1992) Adv. Virus Res. 41: 53-98).

En 2003 se produjo un brote de muertes fatales y pre-destete de lechones en dos granjas en Nueva Gales del Sur, Australia (McOrist et al., (2004) Aust Vet J. 82: 509-511). Las principales características de los hallazgos de presentación y patología clínica sugirieron que este brote de la enfermedad era nuevo y probablemente debido a un virus. Numerosos ensayos en busca de virus conocidos y algunas bacterias no lograron identificar un agente etiológico. Para evitar confusión con otras enfermedades importantes en cerdos, se atribuyó la expresión "síndrome de miocarditis porcina" (abreviado como "PMC") a la enfermedad, y se dio la expresión "virus PMC" dado al presunto agente. Posteriormente, el agente causante se identificó como un nuevo pestivirus. Se propone el nombre Bungowannah para este nuevo virus.

La presente invención aborda la necesidad en la técnica de métodos para detectar y/o tratar infecciones causadas por el nuevo virus PMC.

50 Sumario de la invención

La invención proporciona una secuencia de nucleótidos aislada de ARN correspondiente a la secuencia de nucleótidos del virus PMC representada en la SEC ID N° 1, o secuencias sustancialmente homólogas a la SEC ID N° 1, o fragmentos de la misma.

La invención también proporciona la secuencia de nucleótidos aislada de ADN del virus PMC de la SEC ID N° 1, o secuencias sustancialmente homólogas a la SEC ID N° 1, o fragmentos de la misma.

La invención proporciona además polipéptidos codificados por las secuencias de nucleótidos de ARN y ADN anteriores y fragmentos de las mismas, y/o una secuencia de aminoácidos aislada del virus PMC que se muestra en SEC ID N° 2 y fragmentos de la misma.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para detectar la presencia de una secuencia de aminoácidos del virus PMC en una muestra, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener una secuencia de aminoácidos del virus PMC con un anticuerpo que se une específicamente a la secuencia de aminoácidos del virus PMC en condiciones que permitan la formación de complejos de reacción que comprenden el anticuerpo y la secuencia de aminoácidos del virus PMC; y

b) detectar la formación de complejos de reacción que comprenden el anticuerpo y la secuencia de aminoácidos del virus PMC en la muestra, donde la detección de la formación de complejos de reacción indica la presencia de secuencia de aminoácidos del virus PMC en la muestra.

La invención también proporciona métodos para detectar la presencia de un anticuerpo contra el virus PMC en una muestra, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un anticuerpo contra el virus PMC con una secuencia de aminoácidos en condiciones que permitan la formación de complejos de reacción que comprenden el anticuerpo contra el virus PMC y la secuencia de aminoácidos; y

b) detectar la formación de complejos de reacción que comprenden el anticuerpo y la secuencia de aminoácidos en la muestra, donde la detección de la formación de complejos de reacción indica la presencia de anticuerpos contra el virus PMC en la muestra.

Adicionalmente, la invención proporciona un método in vitro para evaluar el nivel de anticuerpos contra el virus PMC en una muestra biológica que comprende las etapas de:

a) detectar la formación de complejos de reacción en una muestra biológica de acuerdo con el método indicado anteriormente; y

b) evaluar la cantidad de complejos de reacción formados, correspondiendo dicha cantidad de complejos de reacción al nivel de anticuerpos contra el virus PMC en la muestra biológica.

La invención también proporciona un método in vitro para evaluar el nivel de polipéptidos de virus PMC en una muestra biológica que comprende las etapas de:

a) detectar la formación de complejos de reacción en una muestra biológica de acuerdo con el método indicado anteriormente; y

b) evaluar la cantidad de complejos de reacción formados, correspondiendo la cantidad de complejos de reacción al nivel de polipéptido de virus PMC en la muestra biológica.

La presente invención proporciona además métodos para detectar la presencia o ausencia de virus PMC en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

a) poner la muestra biológica en contacto con una sonda o cebador polinucleotídico que comprende un polinucleótido de virus PMC de la invención en condiciones adecuadas de hibridación; y

b) detectar cualquier dúplex formado entre la sonda o cebador y el ácido nucleico en la muestra.

La presente invención también se refiere a un método para la detección de ácidos nucleicos del virus PMC presentes en una muestra biológica, que comprende:

a) amplificar el ácido nucleico con al menos un cebador como se ha definido anteriormente,

b) detectar los ácidos nucleicos amplificados.

La presente invención también se refiere a un método para la detección de ácidos nucleicos del virus PMC presentes en una muestra biológica, que comprende:

a) hibridar los ácidos nucleicos de la muestra biológica en condiciones apropiadas con una o más sondas como se ha definido anteriormente,

b) lavar en condiciones apropiadas, y

c) detectar los híbridos formados.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para la generación de anticuerpos que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una secuencia de polipeptídica de virus PMC a un sujeto; y
- b) recoger los anticuerpos generados en el sujeto contra el polipéptido.

5 En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición de vacuna que comprende un polipéptido de virus PMC o fragmento del mismo. La invención también proporciona una composición de vacuna que comprende un nucleótido del virus PMC o fragmento del mismo que codifica para un polipéptido del virus PMC.

10 Se proporcionan adicionalmente por la invención composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido del virus PMC que potencia la inmunocompetencia del individuo hospedador y provoca inmunidad específica contra el virus PMC.

15 La presente invención también proporciona composiciones terapéuticas que comprenden secuencias polinucleotídicas y/o anticuerpos preparados contra los polipéptidos de la invención. La presente invención proporciona además composiciones terapéuticas que comprenden secuencias de ácido nucleico del virus PMC, así como secuencias polinucleotídicas antisentido y de ribozima que puede hibridar con una secuencia polinucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos del virus PMC de acuerdo con la invención.

20 La presente invención proporciona el uso de secuencias de aminoácidos del virus PMC y/o anticuerpos de acuerdo con la invención, para la fabricación de un medicamento para la modulación de una enfermedad asociada con el virus PMC. La presente invención proporciona adicionalmente el uso de secuencias polinucleotídicas de la invención, así como secuencias polinucleotídicas antisentido y de ribozima que pueden hibridar con una secuencia polinucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos del virus PMC de acuerdo con la invención, para la fabricación de un medicamento para la modulación de una enfermedad asociada con el virus PMC.

25 La presente invención proporciona además un método de inducir una respuesta inmune protectora en un animal o ser humano contra el virus PMC que comprende las etapas de:

- a) administrar a dicho animal o ser humano una cantidad eficaz de una composición de la invención.

30 La presente invención también proporciona métodos para potenciar la inmunocompetencia de un animal y la actividad de sus células efectoras inmunes contra un virus PMC que comprende la etapa de:

- a) administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido o polipéptido del virus PMC.

Además, la presente invención proporciona un vector vivo que comprende el virus PMC y un polinucleótido heterólogo.

40 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para seleccionar fármacos que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto un agente con una secuencia de aminoácidos del virus PMC o fragmento de la misma y
- b) ensayar la presencia de un complejo entre el agente y la secuencia de aminoácidos del virus PMC o fragmento de la misma.

La presente invención también proporciona un método para seleccionar ligandos de las proteínas del virus PMC que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto un ligando con una secuencia de aminoácidos del virus PMC o fragmento de la misma y
- b) ensayar la presencia de un complejo entre la secuencia de aminoácidos del virus PMC o fragmento de la misma y un ligando.

55 En un aspecto adicional de la invención, puede prepararse un kit de ensayo para la demostración de la presencia de virus PMC que comprende:

- (a) una cantidad predeterminada de al menos un componente inmunoquímicamente reactivo marcado obtenido por la unión directa o indirecta de la presente secuencia de aminoácidos del virus PMC o un compañero de unión específico para la misma, a un marcador detectable;
- (b) otros reactivos; y
- (c) instrucciones para usar dicho kit.

Adicionalmente, la invención proporciona un kit de ensayo para la demostración de la presencia de virus PMC que comprende:

- (a) una cantidad predeterminada de al menos un anticuerpo marcado contra el virus PMC;
- (b) otros reactivos; y
- (c) instrucciones para usar dicho kit.

La invención también proporciona un kit de ensayo para la demostración de la presencia de virus PMC que comprende:

- (a) una cantidad predeterminada de al menos un polipéptido marcado derivado del virus PMC;
- (b) otros reactivos; y
- (c) instrucciones para usar dicho kit.

Además, la presente invención proporciona un kit de ensayo preparado para la demostración de la presencia de virus PMC que comprende:

- (a) una cantidad predeterminada de al menos una secuencia marcada de ácido nucleico derivada del virus PMC;
- (b) otros reactivos; y
- (c) instrucciones para usar dicho kit.

La presente invención también proporciona un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico del virus PMC o una parte de la misma como se ha definido anteriormente, unida de forma funcional a elementos de control de la transcripción y la traducción procariotas, eucariotas o virales.

La invención se refiere además a los hospedadores (células procariotas o eucariotas) que se transforman por los vectores y recombinantes mencionados anteriormente y que son capaces de expresar dichos fragmentos de ARN y/o ADN.

La presente invención también se refiere a un método para la producción de un polipéptido de virus PMC recombinante, que comprende las etapas de:

- a) transformar un hospedador celular apropiado con un vector recombinante, en que una secuencia polinucleotídica del virus PMC o una parte de la misma se ha insertado bajo el control de elementos reguladores apropiados,
- b) cultivar dicho hospedador celular transformado en condiciones que posibiliten la expresión de dicho inserto, y,
- c) recoger dicho polipéptido.

De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona métodos para preparar una secuencia de aminoácidos del virus PMC, que comprende las etapas de:

- (a) cultivar una célula que contiene un vector como se ha descrito anteriormente en condiciones que proporcionan la expresión de la secuencia de aminoácidos del virus PMC; y
- (b) recuperar la secuencia expresada del virus PMC.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra la secuencia de ADN del virus PMC de la presente invención;

la **Figura 2** muestra la secuencia de proteína del virus PMC de la presente invención;

la **Figura 3** muestra un mapa de la localización de los cebadores usados para secuenciar el virus completo, las líneas de puntos por debajo son la longitud de los productos de PCR producidos y secuenciados;

la **Figura 4** muestra un gel al 0,8 % teñido con bromuro de etidio de SISPA aplicado a ADN y ARN de PCR adaptadora (procesada en máquinas cicladoras Corbett y Eppendorf). Las flechas indican el lugar donde se cortó el gel para recoger las bandas para purificación y clonación (por ejemplo, ER1 = máquina de PCR Eppendorf,

preparación de ARN, posición de gel 1). Carril 1 de la máquina Eppendorf ARN SISPA 10 ul de producto de PCR; carril 2 de la máquina Eppendorf ADN SISPA 10 ul de producto de PCR; carril 3 de la máquina Eppendorf ARN SISPA 40 ul de producto de PCR; carril 4 de la máquina Eppendorf ADN SISPA 40 ul de producto de PCR; carril 5 de la máquina Eppendorf blanco 40 ul de control de PCR; carril 6 de la máquina Corbett ARN SISPA 40 ul de producto de PCR; carril 7 de la máquina Corbett ADN SISPA 40 ul de producto de PCR; carril 8 de la máquina Corbett blanco 40 ul de producto de PCR; carril 9 marcador de 100 pb.

la **Figura 5** muestra un gel al 1 % teñido con bromuro de etidio de SISPA aplicado a ADN y ARN simultáneamente para seleccionar colonias para los insertos (por ejemplo, ER3 1 = máquina de PCR Eppendorf, posición 3 de la muestra de ARN colonia 1). Carril 1 ER3 1; carril 2 ER3 2; carril 3 ER3 3; carril 4 ER3 4; carril 5 ER3 5; carril 6 ER3 6; carril 7 ER3 7; carril 8 ER3 8; carril 9 ER3 9; carril 10 ER3 10; carril 11 ER3 11; carril 12 ER3 12; carril 13 marcador de 100 pb; carril 14 ER4 1; carril 15 ER4 2; carril 16 ER4 3; carril 17 ER4 4; carril 18 ER4 5; carril 19 ER4 6; carril 20 ER4 7; carril 21 ER4 8; carril 22 ER4 9; carril 23 ER4 10; carril 24 ER4 11; carril 25 ER4 12; carril 26 ER5 1; carril 27 ER5 2; carril 28 ER5 3; carril 29 ER5 4; carril 30 ER5 5; carril 31 ER5 6; carril 32 ER5 7; carril 33 marcador de 100 pb; carril 34 ER5 8; carril 35 ER5 9; carril 36 ER5 10; carril 37 ER5 11; carril 38 ER5 12; carril 39 ER6 1; carril 40 ER6 2; carril 41 ER6 3; carril 42 ER6 4; carril 43 ER6 5; carril 44 ER6 6; carril 45 ER6 7; carril 46 ER6 8; carril 47 ER6 9; carril 48 ER6 10; carril 49 ER6 11; carril 50 ER6 12; carril 51 ER7 1; carril 52 ER7 2; carril 53 marcador de 100 pb; carril 54 ER7 3; carril 55 ER7 4; carril 56 ER7 5; carril 57 ER7 6; carril 58 ER7 7; carril 59 ER7 8; carril 60 ER7 10; carril 61 ER7 11; carril 62 ER7 12; carril 63 ER8 1; carril 64 ER8 2; carril 65 ER8 3; carril 66 ER8 4; carril 67 ER8 5; carril 68 ER8 6; carril 69 ER8 7; carril 70 ER8 8; carril 71 ER8 9; carril 72 ER8 10; carril 73 marcador de 100 pb; carril 74 ER8 11; carril 75 ER8 12; carril 76 ER9 1; carril 77 ER9 2; carril 78 ER9 3; carril 79 ER9 4; carril 80 ER9 5; carril 81 marcador de 100 pb; carril 82 ER9 6; carril 83 ER9 7; carril 84 ER9 8; carril 85 ER9 9; carril 86 ER9 10; carril 87 ER9 11; carril 88; carril 89 ER10 2; carril 90 ER10 3; carril 91 ER10 4; carril 92 ER10 5; carril 93 ER10 6; carril 94 ER10 7; carril 95 ER10 8; carril 96 ER10 9; carril 97 ER10 10; carril 98 ER10 11; carril 99 ER10 12.

la **Figura 6** muestra un gel al 1 % teñido con bromuro de etidio de PCR realizada para seleccionar colonias para el ADN (ciclador Eppendorf). Carril 1 ED2 1 = máquina Eppendorf, gel de ADN cortado 2, colonia 1; carril 2 ED2 2; carril 3 ED2 3; carril 4 ED2 4; carril 5 ED2 5; carril 6 ED2 6; carril 7 ED2 7; carril 8 ED2 8; carril 9 ED2 9; carril 10 ED2 10; carril 11 ED2 11; carril 12 ED2 12; carril 13 marcador de 100 pb; carril 14 ED3 1; carril 15 ED3 2; carril 16 ED3 3; carril 17 ED3 4; carril 18 ED3 5; carril 19 ED3 6; carril 20 ED3 7; carril 21 ED3 8; carril 22 ED3 9; carril 23 ED3 10; carril 24 ED3 11; carril 25 ED3 12; carril 26 ED4 1; carril 27 ED4 2; carril 28 ED4 3; carril 29 ED4 4; carril 30 ED4 5; carril 31 ED4 6; carril 32 ED4 7; carril 33 marcador de 100 pb; carril 34 ED4 8; carril 35 ED4 9; carril 36 ED4 10; carril 37 ED4 11; carril 38 ED4 12; carril 39 ED5 1; carril 40 ED5 2; carril 41 ED5 3; carril 42 ED5 4; carril 43 ED5 5; carril 44 ED5 6; carril 45 ED5 7; carril 46 ED5 8; carril 47 ED5 9; carril 48 ED5 10; carril 49 ED5 11; carril 50 ED5 12; carril 51 ED6 1; carril 52 ED6 2; carril 53 ED6 3; carril 54 ED6 4; carril 55 ED6 5; carril 56 ED6 6; carril 57 ED6 7; carril 58 ED6 8; carril 59 ED6 9; carril 60 marcador de 100 pb; carril 61 ED6 10; carril 62 ED6 11; carril 63 ED6 12; carril 64 ED7 1; carril 65 ED7 2; carril 66 ED7 3; carril 67 ED7 4; carril 68 ED7 5; carril 69 ED7 6; carril 70 ED7 7; carril 71 ED7 8; carril 72 ED7 9; carril 73 ED7 10; carril 74 ED7 11; carril 75 ED7 12; carril 76 ED8 1; carril 77 ED8 2; carril 78 ED8 3; carril 79 ED8 4; carril 80 ED8 5; carril 81 ED8 6; carril 82 ED8 7; carril 83 ED8 8; carril 84 ED8 9; carril 85 ED8 10; carril 86 ED8 11; carril 87 ED8 12.

la **Figura 7** muestra un gel al 1 % teñido con bromuro de etidio de PCR realizada para seleccionar colonias para insertos de ARN (ciclador Corbett). Carril 1 CR2 1 = máquina Corbett, posición de gel de ARN 2, colonia 1; carril 2 CR2 2; carril 3 CR2 3; carril 4 CR2 4; carril 5 CR2 5; carril 6 CR2 6; carril 7 marcador de 100 pb; carril 8 de marcador de 100 pb; carril 9 CR2 7; carril 10 CR2 8; carril 11 CR2 9; carril 12 CR2 10; carril 13 CR2 11; carril 14 CR2 12; carril 15 CR3 1; carril 16 CR3 2; carril 17 CR3 3; carril 18 CR3 4; carril 19 CR3 5; carril 20 CR3 6; carril 21 CR3 7; carril 22 CR3 8; carril 23 CR3 9; carril 24 CR3 10; carril 25 CR3 11; carril 26 CR3 12; carril 27 marcador de 100 pb; carril 28 marcador de 100 pb; carril 29 CR4 1; carril 30 CR4 2; carril 31 CR4 3; carril 32 CR4 4; carril 33 CR4 5; carril 34 CR4 6; carril 35 CR4 7; carril 36 CR4 8; carril 37; CR4 9; carril 38 CR4 10; carril 39 CR4 11; carril 40 CR4 12; carril 41 marcador de 100 pb; carril 42 marcador de 100 pb; carril 43 CR5 1; carril 44 CR5 2; carril 45 CR5 3; carril 46 CR5 4; carril 47 CR5 5; carril 48 CR5 6; carril 49 CR5 7; carril 50 CR5 8; carril 51 CR5 9; carril 52 CR5 10; carril 53 CR5 11; carril 54 control blanco de PCR; carril 55 marcador de 100 pb.

la **Figura 8** muestra un gel al 1 % teñido con bromuro de etidio de PCR realizada para seleccionar colonias para el ADN (ciclador Corbett). Carril 1 marcador de 100 pb; carril 1 CD3 2 = máquina Corbett, gel de ADN cortado 3, colonia 1; carril 3 CD3 2; carril 4 CD3 3; carril 5 CD3 4; carril 6 CD3 5; carril 7 CD3 6; carril 8 CD3 7; carril 9 CD3 8; carril 10 CD3 9; carril 11 10 CD3; carril 12 11 CD3; carril 13 12 CD3; carril 14 CD4 1; carril 15 CD42; carril 16 CD4 3; carril 17 CD44; carril 18 CD4 5; carril 19 CD4 6; carril 20 marcador de 100 pb; carril 21 marcador de 100 pb; carril 22 CD4 7; carril 23 CD4 8; carril 24 CD4 9; carril 25 10 CD4; carril 26 11 CD4; carril 27 12 CD4; carril 28 CD5 1; carril 29 CD5 2; carril 30 CD5 3; carril 31 CD5 4; carril 32 CD5 5; carril 33 CD5 6; carril 34 CD5 7; carril 35 CD5 8; carril 36 CD5 9; carril 37 CD5 10; carril 38 CD5 11; carril 39 CD5 12; carril 40 marcador de 100 pb; carril 41 marcador de 100 pb; carril 42 CD6 1; carril 43 CD6 2; carril 44 CD6 3; carril 45 CD6 4; carril 46 CD6 5; carril 47 CD6 6; carril 48 CD6 7; carril 49 CD6 8; carril 50 CD6 9; carril 51 CD6 10; carril 52 CD6 11; carril 53 CD6 12.

la **Figura 9** muestra un gel al 1,5 % teñido con bromuro de etidio de PCR realizada para confirmar la autenticidad de la secuencia viral para la confirmación del virus por nRT-PCR. Los resultados de la PCR confirmaron la presencia de pestivirus en muestras clínicas (carriles 3, 8 y 23), mientras que no estaba presente EMCV (carril 28) (carriles marcados + son PCR positivos). Carril 1 marcador de 100 pb; carril 2 cebadores CR39 blanco; carril 3 cebadores CR39 de sueros SISPA; carril 4 cebadores CR39 de control +vo NADL; carril 5 cebadores CR39 de control -vo EMCV; carril 6; carril 7 cebadores ER510 blanco; carril 8 cebadores ER510 de sueros SISPA; carril 9 cebadores ER510 de control +vo NADL; carril 10 cebadores ER510 de control -vo EMCV; carril 11; carril 12 cebadores ER55 blanco; carril 13 cebadores ER55 de sueros SISPA; carril 14 cebadores ER55 de control +vo NADL; carril 15 cebadores ER55 de control -vo EMCV; carril 16; carril 17; carril 18; carril 19; carril 20 marcador de 100 pb; carril 21 marcador de 100 pb; carril 22 cebadores ER62 blanco; carril 23 cebadores ER62 de sueros SISPA; carril 24 cebadores ER62 de control +vo NADL; carril 25 cebadores ER62 de control -vo EMCV; carril 26; carril 27 cebadores ER41 blanco; carril 28 cebadores ER41 de sueros SISPA; carril 29 cebadores ER41 de control +vo NADL; carril 30 cebadores ER41 de control -vo EMCV; carril 31; carril 32; carril 33; carril 34; carril 35; carril 36; carril 37; carril 38; carril 39; carril 40 marcador de 100 pb.

la **Figura 10** muestra un gráfico de hidrofobicidad de la secuencia de proteína del virus PMC.

Descripción detallada de la invención

Nuevo pestivirus

De acuerdo con esta invención, se ha descubierto un nuevo pestivirus que difiere genéticamente de pestivirus conocidos. El nuevo virus se caracteriza por la secuencia de ARN correspondiente a la mostrada en la SEC ID N° 1. La secuencia se ha depositado como la referencia EF100713 de Genbank.

El nuevo virus se menciona en lo sucesivo generalmente como virus PMC y la afección causada por la infección con el virus PMC es PMC.

El genoma del virus PMC comprende una única fase de lectura abierta (ORF), que codifica varios genes. Los genes codificados por la ORF de PMC corresponden a aquellos de otros pestivirus, que son los genes Npro, de la cápsida, E0, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B.

El virus PMC es aproximadamente un 40 % similar a otros pestivirus a nivel de secuencia de ácido nucleico. A nivel de proteínas, el virus PMC tiene un 46-71 % de identidad y un 63-83 % de similitud con otros pestivirus. Un análisis comparativo de secuencias tanto de ácido nucleico como de aminoácidos deducidas sugeriría que el virus PMC es suficientemente original para merecer consideración para su clasificación como una nueva especie dentro del género pestivirus.

Fases de lectura abierta, genes codificados, características del genoma de ARN

La secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 1 codifica una única ORF que codifica varios genes diferentes. Los genes codificados por la SEC ID N° 1 corresponden a los genes Npro, de la cápsida, E0, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B de otros pestivirus.

La localización aproximada de los genes de PMC, basándose en la comparación de secuencias con gi12657941, se indica en la Tabla 1.

Tabla 1: Localización de proteínas dentro de la fase de lectura abierta del ácido nucleico de PMC.

PROTEÍNA	POSICIÓN APROXIMADA DEL ADN
NPro	419-922
Cápsida	923-1219
E0	1220-1885
E1	1886-2473
E2	2474-3604
P7	3605-3820
NS2	3821-5224
NS3	5225-7252
NS4A	7253-7441
NS4B	7442-8482
NS5A	8483-9997
NS5B	9998-12077

Tabla 2: Localización de proteínas dentro de la fase de lectura abierta de las proteínas de PMC.

PROTEÍNA	POSICIÓN APROXIMADA DE AMINOÁCIDOS
NPro	1-167
Cápsida	168-267
E0	268-489
E1	490-685
E2	686-1062
P7	1063-1134
NS2	1135-1602
NS3	1603-2278
NS4A	2279-2341
NS4B	2342-2688
NS5A	2689-3193
NS5B	3194-3886

Secuencias de ácido nucleico

5 ARN

La invención proporciona una secuencia de nucleótidos aislada de ARN correspondiente a la secuencia de nucleótidos del virus PMC representada en la SEC ID N° 1, o secuencias sustancialmente homólogas a la SEC ID N° 1, o fragmentos de la misma. La invención proporciona además una secuencia de ARN que comprende el complemento del genoma de ARN del virus PMC, o fragmentos del mismo.

La secuencia de ARN también puede corresponder a un fragmento de la SEC ID N° 1. Preferiblemente, el fragmento se selecciona entre las siguientes localizaciones de la SEC ID N° 1: posición 419-922, 923-1219, 1220-1885, 1886-2473, 2474-3604, 3605-3820, 3821-5224, 5225-7252, 7253-7441, 7442-8482, 8483-9997, 9998-12077. Como alternativa, el fragmento se puede seleccionar entre una cualquiera de las SEC ID N° 3 - 15.

Existe homología o identidad sustancial cuando una secuencia polinucleotídica del virus PMC o fragmento de la misma hibrida con otro polinucleótido del virus PMC (o una hebra complementaria del mismo) en condiciones selectivas de hibridación. La hibridación selectiva puede ser en condiciones de rigurosidad baja, moderada o elevada, pero preferiblemente es en condiciones de rigurosidad elevada.

Normalmente, sucederá hibridación selectiva cuando haya al menos aproximadamente un 55 % de identidad sobre un tramo de al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente al menos aproximadamente un 65 %, más preferiblemente al menos aproximadamente un 75 % y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 %. La longitud de la comparación de homología, como se describe, puede ser sobre tramos más largos y en ciertas realizaciones será a menudo sobre un tramo de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, habitualmente al menos aproximadamente 20 nucleótidos, más habitualmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más normalmente al menos aproximadamente 32 nucleótidos y preferiblemente al menos aproximadamente 36 o más nucleótidos.

Por tanto, las secuencias polinucleotídicas de la invención tienen preferiblemente al menos un 75 %, más preferiblemente al menos un 85 %, más preferiblemente al menos un 90 % de homología con las secuencias mostradas en las listas de secuencias de este documento. Más preferiblemente, hay al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 98 % de homología. Las comparaciones de homología de nucleótidos pueden realizarse como se describe a continuación para polipéptidos. Un programa de comparación de secuencia preferido es el programa GCG Wisconsin Bestfit.

En el contexto de la presente invención, se acepta que una secuencia homóloga incluye una secuencia de nucleótidos que es al menos un 90 % idéntica, preferiblemente al menos un 95 ó 98 % idéntica a nivel de ácido nucleico sobre al menos 100, 200, 300, 500 u 819 nucleótidos con las correspondientes secuencias de nucleótidos expuestas en la SEC ID N° 1. En particular, normalmente la homología debe considerarse con respecto a esas regiones de la secuencia que codifican secuencias de aminoácidos contiguos que se sabe que son esenciales para la función de una o más proteínas del virus PMC, en lugar de secuencias vecinas no esenciales.

Los fragmentos de la secuencia polinucleotídica del virus PMC de la invención serán preferiblemente de al menos 100 ó 200 nucleótidos de longitud. Generalmente, cuanto más corta sea la longitud de la secuencia polinucleotídica, mayor será la homología necesaria para obtener hibridación selectiva. Las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que son homólogas a las secuencias representadas por una SEC ID N° 1 puede caracterizarse y aislarse de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica, tales como amplificación mediante cebadores específicos de secuencia, hibridación con sondas específicas de secuencia en condiciones

más o menos rigurosas, métodos de selección serológica o mediante el sistema de tipificación LiPA.

ADN

5 También se proporciona el ADN del nuevo virus PMC. La secuencia de ADN se obtiene preferiblemente de las secuencias de ARN descritas anteriormente. Más preferiblemente, la secuencia de ADN es la mostrada en la SEC ID N° 1 o fragmentos de la misma.

10 La invención también proporciona fragmentos de ADN que pueden hibridar con el ARN genómico de PMC. La secuencia de ADN o fragmento de ADN puede obtenerse de la secuencia de ADNc del virus PMC o fragmentos de la misma. El ADN, ADNc o fragmentos del mismo puede estar en forma de ADN recombinantes.

15 La secuencia de ADN también puede ser un fragmento de la SEC ID N° 1. Preferiblemente, el fragmento se selecciona entre las siguientes localizaciones de la SEC ID N° 1: posición 419-922, 923-1219, 1220-1885, 1886-2473, 2474-3604, 3605-3820, 3821-5224, 5225-7252, 7253-7441, 7442-8482, 8483-9997, 9998-12077.

Ácidos nucleicos variantes

20 También se proporcionan por la presente invención secuencias y fragmentos de ácido nucleico, que incluirían algunas delecciones o mutaciones que no alterarían sustancialmente su capacidad para hibridar con el genoma del virus PMC. Debe considerarse que dichas variantes forman equivalentes obvios del ARN, ADN o fragmentos mencionados anteriormente.

25 Otras secuencias de ácido nucleico variantes preferidas de la presente invención incluyen secuencias que son redundantes como resultado de la degeneración del código genético en comparación con cualquiera de las secuencias de ácido nucleico dadas anteriormente de la presente invención. Estas secuencias de ácido nucleico variantes por tanto codificarán las mismas secuencias de aminoácidos que las secuencias de ácido nucleico de la cuales derivan. Preferiblemente, los ARN de estas variantes, y los ADNc relacionados derivados de dichos ARN, pueden hibridar con partes correspondientes del ARN y ADNc del virus PMC.

30 También se incluyen dentro de la presente invención variantes de secuencia de la secuencia de ADN de la SEC ID N° 1 o la correspondiente secuencia de ARN o fragmentos de las mismas, que contienen delecciones y/o inserciones de uno o más nucleótidos, especialmente inserciones o delecciones de 1 o más codones.

35 También se incluyen sustituciones de algunos nucleótidos no esenciales por otros (incluyendo nucleótidos modificados y/o inosina).

40 Polinucleótidos variantes particularmente preferidos de la presente invención también incluyen secuencias que hibridan en condiciones rigurosas con cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de la presente invención. Por tanto, se prefieren secuencias que muestran un alto grado de homología (similitud) con cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de la invención como se ha descrito anteriormente. Particularmente preferidas son secuencias que son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más homólogas a dichas secuencias de ácido nucleico de la invención. Preferiblemente, dichas secuencias tendrán menos de un 20 %, 15 %, 10 %, o 5 % de variación de los nucleótidos originales de dichas secuencias de ácido nucleico.

45

Sondas y cebadores

50 Adicionalmente se proporcionan cebadores y sondas, que puede ser prepararse partiendo de cualquier secuencia o fragmento de secuencia de ARN o ADN de acuerdo con la invención. Preferiblemente, dichas sondas o dichos cebadores son de aproximadamente 5 a 50 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 10 a 25 nucleótidos. Las sondas y cebadores de la presente invención pueden usarse en PCR, reacciones de secuenciación, reacciones de hibridación y otras aplicaciones conocidas para los especialistas en la técnica.

55 La presente invención también se refiere a un cebador oligonucleotídico que comprende parte de la SEC ID N° 1, siendo capaz dicho cebador de actuar como cebador para amplificar específicamente el ácido nucleico del virus PMC. Preferiblemente, el cebador es una secuencia oligonucleotídica de ADN monocatenario capaz de actuar como un punto de inicio para la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a la hebra de ácido nucleico a copiar. La longitud específica y secuencia del cebador usado dependerán de la complejidad de las dianas de ADN o ARN requeridas, así como de las condiciones de uso del cebador, tales como la temperatura y fuerza iónica. El hecho de que los cebadores de amplificación no tengan que aparear exactamente con la secuencia molde correspondiente para garantizar una amplificación apropiada está ampliamente documentado en la bibliografía (Kwok et al., 1990).

60

65 El método de amplificación usado puede ser la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki et al., 1988), reacción en cadena de la ligasa (LCR; Landgren et al., 1988; Wu y Wallace, 1989; Barnay, 1991), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA; Guatelli et al., 1990; Compton, 1991), sistema de amplificación

basado en transcripción (TAS; Kwoh et al., 1989), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA; Duck, 1990; Walker et al., 1992) o amplificación mediante Q β replicasa (Lizardi et al., 1988 Lomeli et al., 1989) o cualquier otro método adecuado para amplificar moléculas de ácido nucleico usando extensión de cebador. Durante la amplificación, los productos amplificados pueden marcarse convenientemente usando cebadores marcados o incorporando nucleótidos marcados. Los marcadores pueden ser isotópicos (^{32}P , ^{35}S , etc.) o no isotópicos (biotina, digoxigenina, etc.). La reacción de amplificación se repite entre 20 y 70 veces, ventajosamente entre 25 y 45 veces.

La presente invención también se refiere a una sonda oligonucleotídica que comprende parte de la SEC ID N° 1, siendo capaz dicha sonda de actuar como sonda de hibridación para el virus PMC. Preferiblemente, la sonda se puede usar para la detección y/o clasificación específica en tipos y/o subtipos de virus PMC. Preferiblemente, la sonda es una secuencia oligonucleotídica específica de secuencia monocatenaria que tiene una secuencia que es complementaria a la secuencia diana del virus PMC a detectar.

Los especialistas en la técnica reconocerán que la rigurosidad de la hibridación se verá afectada por condiciones tales como la concentración salina, temperatura, o disolventes orgánicos, además de la composición de bases, longitud de las cadenas complementarias y la cantidad de desapareamientos de bases nucleotídicas entre los ácidos nucleicos en hibridación. Las condiciones rigurosas de temperatura generalmente incluirán temperaturas en exceso de 30 °C, normalmente en exceso de 37 °C, y preferiblemente en exceso de 45 °C. Las condiciones rigurosas de salinidad serán habitualmente de menos de 1000 mM, normalmente menos de 500 mM, y preferiblemente menos de 200 mM. Sin embargo, la combinación de parámetros es mucho más importante que la medida de cualquier parámetro individual. Un ejemplo de condiciones rigurosas de hibridación es 65 °C y SSC 0,1 x (SSC 1 x = NaCl 0,15 M, citrato sódico 0,015 M pH 7,0).

Opcionalmente, la sonda de la invención está marcada y/o unida a un sustrato sólido. El sustrato sólido puede referirse a cualquier sustrato al cual pueda acoplarse una sonda oligonucleotídica, siempre que conserve sus características de hibridación y siempre que el nivel de fondo de hibridación se mantenga bajo. Habitualmente el sustrato sólido será una placa de microtitulación, una membrana (por ejemplo, nylon o nitrocelulosa) o una microesfera (perla). Antes de la aplicación a la membrana o fijación puede ser conveniente modificar la sonda de ácido nucleico para facilitar la fijación o mejorar la eficacia de hibridación. Dichas modificaciones pueden abarcar adición de una cola homopolimérica, acoplamiento con diferentes grupos reactivos tales como grupos alifáticos, grupos NH₂, grupos SH, grupos carboxílicos, o acoplamiento con biotina o haptenos.

Las sondas de la invención pueden incluir también un polinucleótido aislado unido a una molécula marcadora o indicadora y pueden usarse para aislar otras secuencias polinucleotídicas, que tienen similitud de secuencia por métodos convencionales. Para las técnicas de preparación y marcaje de sondas véase, por ejemplo, Sambrook et al., (1989) o Ausubel et al., (2001).

Los oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención y usados como cebadores o sondas también pueden contener o consistir en análogos de nucleótidos tales como fosforotioatos (Matsukura et al., 1987), alquilfosforotioatos (Miller et al., 1979) o ácidos péptido nucleicos (Nielsen et al., 1991; Nielsen et al., 1993) o pueden contener agentes intercalantes (Asseline et al., 1984). La introducción de estas modificaciones puede ser ventajosa para influir positivamente en características tales como la cinética de hibridación, la reversibilidad de la formación de híbridos, la estabilidad biológica de las moléculas oligonucleotídicas, etc.

También se proporcionan ADN recombinantes que contienen fragmentos de la secuencia de ADN del virus PMC por la presente invención, y pueden usarse como, por ejemplo, sondas. Preferentemente, el plásmido usado para generar el ADN recombinante es un plásmido amplificable en células procariotas o eucariotas y que porta dichos fragmentos. Por ejemplo, usando ADN clonado que contiene un fragmento de ADN del virus PMC como sonda de hibridación molecular, por marcaje con radionucleótidos o con reactivos fluorescentes, puede detectarse directamente el ARN del virus PMC, por ejemplo, en sangre, fluidos corporales y productos sanguíneos.

Series de ácidos nucleicos

Las secuencias polinucleotídicas de virus PMC (preferiblemente en forma de sondas) también se pueden inmovilizar en un soporte en fase sólida para la detección del virus PMC. Como alternativa, las secuencias polinucleotídicas de virus PMC formarán parte de una biblioteca de moléculas de ADN que puede usarse para detectar simultáneamente varios genes diferentes del virus PMC. En una forma alternativa adicional de la invención, las secuencias polinucleotídicas de virus PMC junto con otras secuencias polinucleotídicas (tales como de otras bacterias o virus) se pueden inmovilizar en un soporte sólido en tal manera que permita la identificación de la presencia del virus PMC y/o cualquiera de las otras secuencias polinucleotídicas unidas al soporte sólido.

Las técnicas para producir bibliotecas de moléculas inmovilizadas de ADN se han descrito en la técnica. Generalmente, la mayoría de los métodos de la técnica anterior describen la síntesis de bibliotecas de moléculas de ácido nucleico monocatenario, usando por ejemplo técnicas de enmascaramiento para construir diversas permutaciones de secuencias en las diversas posiciones discretas sobre el sustrato sólido. La patente de Estados Unidos N° 5.837.832 describe un método mejorado para la producir series de ADN inmovilizadas en sustratos de

silicio basado en la tecnología de integración a escala muy grande. En particular, la patente de Estados Unidos N° 5.837.832 describe una estrategia llamada "mosaico" para sintetizar conjuntos específicos de sondas en localizaciones espacialmente definidas en un sustrato que puede usarse para producir las bibliotecas de ADN inmovilizado de la presente invención. La patente de Estados Unidos N° 5.837.832 también proporciona referencias para técnicas anteriores que también pueden usarse. Por tanto, las sondas de secuencias polinucleotídicas pueden sintetizarse *in situ* sobre la superficie del sustrato.

Como alternativa, las moléculas monocatenarias pueden sintetizarse sin el sustrato sólido y cada secuencia de pre-formada puede aplicarse a una posición discreta sobre el sustrato sólido. Por ejemplo, las secuencias polinucleotídicas se pueden imprimir directamente sobre el sustrato usando dispositivos robóticos equipados con pasadores o dispositivos piezoeléctricos.

Las secuencias de la biblioteca normalmente se inmovilizan sobre o en regiones discretas de un sustrato sólido. El sustrato puede ser poroso para permitir la inmovilización dentro del sustrato o sustancialmente no poroso, en cuyo caso las secuencias de la biblioteca normalmente se inmovilizan sobre la superficie del sustrato. El sustrato sólido puede estar hecho de cualquier material al cual puedan unirse los polipéptidos, directa o indirectamente. Ejemplos de sustratos sólidos adecuados incluyen vidrio plano, obleas de silicio, mica, cerámica y polímeros orgánicos tales como plásticos, incluyendo poliestireno y polimetacrilato. También puede ser posible usar membranas semipermeables, tales como membranas de nitrocelulosa o nylon, que están ampliamente disponibles. Las membranas semipermeables se pueden montar sobre una superficie sólida más robusta, tal como vidrio. Las superficies pueden opcionalmente recubrirse con una capa de metal, tal como oro, platino u otro metal de transición. Un ejemplo particular de un sustrato sólido adecuado es el chip BiaCore™ disponible en el mercado (Pharmacia Biosensors).

Preferiblemente, el sustrato sólido es generalmente un material que tiene una superficie rígida o semi-rígida. En realizaciones preferidas, al menos una superficie del sustrato será sustancialmente plana, aunque en algunas realizaciones puede ser deseable separar físicamente regiones para diferentes polímeros con, por ejemplo, regiones elevadas o zanjas grabadas. También se prefiere que el sustrato sólido sea adecuado para la aplicación de alta densidad de secuencias de ADN en áreas discretas de normalmente 50 a 100 µm, dando una densidad de 10000 a 40000 puntos/cm².

El sustrato sólido está convenientemente dividido en secciones. Esto puede conseguirse por técnicas tales como fotograbado, o por la aplicación de tintas hidrófobas, por ejemplo tintas con base de teflón (Cel-line, EE.UU.).

Las posiciones discretas, en que cada miembro diferente de la biblioteca está localizado pueden tener cualquier forma conveniente, por ejemplo, circular, rectangular, elíptica, en forma de cuña, etc.

La unión de las secuencias polinucleotídicas al sustrato puede ser por medios covalentes o no covalentes. Las secuencias polinucleotídicas pueden unirse al sustrato mediante una capa de moléculas a las que se unen las secuencias de la biblioteca. Por ejemplo, las secuencias polinucleotídicas pueden marcarse con biotina y el sustrato recubrirse con avidina y/o estreptavidina. Una característica conveniente de usar secuencias polinucleotídicas biotiniladas es que la eficacia de acoplamiento al sustrato sólido puede determinarse fácilmente. Como las secuencias polinucleotídicas pueden unirse sólo escasamente a algunos sustratos sólidos, a menudo es necesario para proporcionar una superficie de contacto químico entre el sustrato sólido (tal como en el caso de vidrio) y las secuencias de ácido nucleico. Ejemplos de superficies de contacto químico adecuadas incluyen hexaetilenglicol. Otro ejemplo es el uso de vidrio recubierto con polilisina, modificándose entonces la polilisina químicamente usando procedimientos convencionales para introducir un ligando de afinidad. Otros métodos para unir moléculas a las superficies de sustrato sólido mediante el uso de agentes de acoplamiento son conocidos en la técnica, véase por ejemplo el documento WO98/49557.

La unión de secuencias polinucleotídicas complementarias a la biblioteca de ácidos nucleicos inmovilizados puede determinarse mediante diversos medios tales como cambios en las características ópticas de la secuencia polinucleotídica unida (es decir, por el uso de bromuro de etidio) o por el uso de ácidos nucleicos marcados, tales como polipéptidos marcados con fluoróforos. Otras técnicas de detección que no requieren el uso de marcadores incluyen técnicas ópticas tales como optoacústica, reflectometría, elipsometría y resonancia de plasmón superficial (véase el documento WO97/49989).

Por tanto, la presente invención proporciona un sustrato sólido que tiene inmovilizado sobre el mismo al menos un polinucleótido de la presente invención, preferiblemente dos o más secuencias polinucleotídicas diferentes de la presente invención. En una realización preferida, el sustrato sólido comprende además secuencias polinucleotídicas derivadas de genes diferentes de la secuencia polinucleotídica del virus PMC.

Ácidos nucleicos antisentido y ribozimas

La presente invención también se extiende a la preparación de nucleótidos antisentido y ribozimas que pueden usarse para interferir con la expresión de secuencias de aminoácidos del virus PMC a nivel traduccional. Este

enfoque utiliza ácido nucleico antisentido y ribozimas para bloquear la traducción de un ARNm específico, ya sea enmascarando ese ARNm con un ácido nucleico antisentido o escindiéndolo con una ribozima.

Los ácidos nucleicos antisentido son moléculas de ADN o ARN que son complementarias a al menos una parte de una molécula de ARNm específica [véase: Weintraub, (1990) Sci. Am., 262: 40-46; Marcus-Sekura, (1988) Anal. Biochem., 172: 289-295]. En la célula, hibridan con ese ARNm, formando una molécula bicatenaria. La célula no traduce un ARNm en complejo en esta forma de doble cadena. Por lo tanto, los ácidos nucleicos antisentido interfieren con la expresión de ARNm en proteína. Serán particularmente eficaces oligómeros de aproximadamente quince nucleótidos y moléculas que hibridan con el codón de inicio AUG, ya que son fáciles de sintetizar y probablemente presentan menos problemas que moléculas más grandes cuando se introducen en células infectadas. Se han usado métodos antisentido para inhibir la expresión de muchos genes *in vitro* [Hambor et al., (1988) J. Exp. Med., 168: 1237-1245].

Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad de escindir específicamente otras moléculas de ARN monocatenario de una manera algo análoga a las endonucleasas de restricción de ADN. Las ribozimas se descubrieron a partir de la observación de que ciertos ARNm tienen la capacidad de escindir sus propios intrones. Modificando la secuencia de nucleótidos de estos ARN, los investigadores han sido capaces de diseñar moléculas que reconocen secuencias de nucleótidos específicas en una molécula de ARN y las escinden [Cech, (1988) J. Am. Med. Assoc., 260: 3030-3034]. Como son específicos de secuencia, sólo los ARNm con secuencias particulares se inactivan. Los investigadores han identificado dos tipos de ribozimas, tipo *Tetrahymena* y tipo "cabeza de martillo". Las ribozimas de tipo *Tetrahymena* reconocen secuencias de cuatro bases, mientras que las de tipo "cabeza de martillo" reconocen secuencias de once a dieciocho bases. Cuanto más larga es la secuencia de reconocimiento, mayor probabilidad existirá de que se produzca exclusivamente en las especies de ARNm diana. Por lo tanto, las ribozimas de tipo cabeza de martillo son preferibles a las ribozimas de tipo *Tetrahymena* para inactivar una especie de ARNm específico y son preferibles secuencias de reconocimiento de dieciocho bases a secuencias de reconocimiento más cortas.

Las secuencias polinucleotídicas de PMC descritas en este documento por tanto pueden usarse para preparar moléculas antisentido contra, y ribozimas que escindan, ARNm para secuencias de aminoácidos del virus PMC, inhibiendo de este modo la expresión de las secuencias polinucleotídicas de virus PMC.

Secuencia polipeptídica

Polipéptidos

La invención también cubre polipéptidos codificados por las secuencias anteriores de nucleótidos de ARN y ADN y fragmentos de las mismas. La invención proporciona además una secuencia aislada de aminoácidos del virus PMC como se muestra en SEC ID N° 2 y fragmentos de la misma. De forma más deseable, la secuencia de aminoácidos del virus PMC se proporciona en forma sustancialmente purificada. Además se proporcionan fragmentos polipeptídicos que tienen pesos moleculares más bajos y que tienen secuencias o fragmentos peptídicos en común con aquellos mostrados en la SEC ID N° 2.

El término "aislado" se usa para describir una secuencia de aminoácidos del virus PMC que se ha separado de componentes que lo acompañan en su estado natural. Además, una secuencia de aminoácidos del virus PMC está "sustancialmente purificada" cuando al menos aproximadamente del 60 al 75 % de una muestra presenta una única secuencia de aminoácidos del virus PMC. Una secuencia de aminoácidos sustancialmente purificada del virus PMC comprenderá normalmente de aproximadamente el 60 al 90 % p/p de una muestra de secuencia de aminoácidos del virus PMC, más habitualmente aproximadamente el 95 %, y preferiblemente será más de aproximadamente el 99 % pura. La pureza u homogeneidad de la proteína pueden indicarse por varios medios bien conocidos en la técnica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido por visualizar una única banda de secuencia de aminoácidos del virus PMC al teñir el gel. Para ciertos propósitos, puede proporcionarse una mayor resolución usando HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica que se utilizan para la aplicación.

La invención contempla además fragmentos de la secuencia de aminoácidos del virus PMC. Un fragmento de la secuencia de aminoácidos del virus PMC es un tramo de restos de aminoácido de al menos aproximadamente cinco a siete aminoácidos contiguos, a menudo al menos aproximadamente siete a nueve aminoácidos contiguos, normalmente al menos aproximadamente nueve a 13 aminoácidos contiguos y, más preferiblemente, al menos aproximadamente 20 a 30 o más aminoácidos contiguos.

En una forma muy preferida de la invención, los fragmentos muestran unión a ligando, actividad inmunológica y/u otras actividades biológicas características de secuencias de aminoácidos del virus PMC. Más preferiblemente, los fragmentos poseen epítomos inmunológicos consistentes con los presentes en secuencias nativas de aminoácidos de virus PMC.

Como se usa en este documento, "epítomo" se refiere a un determinante antigénico de un polipéptido. Un epítomo podría comprender tres aminoácidos en una conformación espacial que es única para el epítomo. Generalmente, un

epítopo consiste en al menos cinco aminoácidos, y más habitualmente consiste en al menos 8-10 aminoácidos. Se conocen en la técnica métodos de determinar la conformación espacial de dichos aminoácidos.

Las secuencias de aminoácidos del virus PMC preferidas de la invención tendrán una o más propiedades biológicas (por ejemplo, propiedades *in vivo*, *in vitro* o inmunológicas) de la secuencia de aminoácidos del virus PMC nativa de longitud completa. Como alternativa, los fragmentos de la secuencia de aminoácidos del virus PMC de longitud completa pueden tener una o más propiedades biológicas de uno o más de los genes que la secuencia de aminoácidos de longitud completa codifican.

Preferiblemente, los fragmentos de la secuencia de aminoácidos del virus PMC de longitud completa SEC ID N° 2 se eligen entre las siguientes localizaciones en la SEC ID N° 2: 1-167, 168-267, 268-489, 490-685, 686-1062, 1063-1134, 1135-1602, 1603-2278, 2279-2341, 2342-2688, 2689-3193, 3194 a 3886. Como alternativa, el fragmento se puede seleccionar entre una cualquiera de las SEC ID N° 16-27.

También se incluyen secuencias de aminoácidos no funcionales del virus PMC dentro del alcance de la invención ya que pueden ser útiles, por ejemplo, como antagonistas de genes del virus PMC. Las propiedades biológicas de análogos, fragmentos, o derivados respecto al tipo silvestre pueden determinarse, por ejemplo, mediante ensayos biológicos.

Las secuencias de aminoácidos del virus PMC, incluyendo análogos, fragmentos y derivados, se pueden preparar sintéticamente (por ejemplo, usando las técnicas bien conocidas de síntesis de péptidos en fase sólida o en fase de solución). Preferiblemente, se emplean técnicas sintéticas en fase sólida. Como alternativa, las secuencias de aminoácidos del virus PMC de la invención pueden prepararse usando técnicas de ingeniería genética bien conocidas, como se describe *infra*. En otra realización más, las secuencias de aminoácidos del virus PMC se pueden purificar (por ejemplo, mediante purificación por inmunoafinidad) a partir de un fluido biológico, tal como, aunque sin limitación, sangre completa, plasma, heces, suero u orina de animales, incluyendo cerdos, ganado vacuno, ovejas, gallinas, seres humanos, perros, caballos y peces.

Polipéptidos variantes

Los análogos de secuencia de aminoácidos del virus PMC incluyen preferiblemente aquellos que tienen una secuencia de aminoácidos donde uno o más de los aminoácidos están sustituidos con otro aminoácido, no alterando sustancialmente dichas sustituciones la actividad biológica de la molécula.

En el contexto de la invención, se acepta que una secuencia análoga incluye una secuencia de aminoácidos del virus PMC que es al menos un 60, 70, 80 ó 90 % homóloga, preferiblemente al menos un 95 ó 98 % homóloga a nivel de aminoácidos sobre al menos 20, 50, 100 ó 200 aminoácidos, con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 1. En particular, normalmente la homología debe considerarse con respecto a aquellas regiones de la secuencia que se sabe que son esenciales para la función de la proteína o proteínas codificadas por el ARN del virus PMC, en lugar de las secuencias vecinas no esenciales.

Aunque la homología puede considerarse en términos de similitud (es decir, restos de aminoácido que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia. Las expresiones "homología sustancial" o "identidad sustancial", cuando se refieren a secuencias de aminoácidos del virus PMC, indican que la secuencia de aminoácidos del virus PMC en cuestión muestra al menos aproximadamente un 70 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de PMC de origen natural completa o una parte de la misma, habitualmente al menos aproximadamente un 80 % de identidad y preferiblemente al menos aproximadamente un 90 ó 95 % de identidad.

En una forma muy preferida de la invención, un análogo de secuencia de aminoácidos del virus PMC tendrá un 80 % o mayor identidad de secuencia de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos del virus PMC expuesta en la SEC ID N° 2. Ejemplos de análogos de secuencia de aminoácidos del virus PMC dentro del alcance de la invención incluyen la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 donde: (a) uno o más restos de ácido aspártico están sustituidos con ácido glutámico; (b) uno o más restos de isoleucina están sustituidos con leucina; (c) uno o más restos de glicina o valina están sustituidos con alanina; (d) uno o más restos de arginina están sustituidos con histidina; o (e) uno o más restos de tirosina o fenilalanina están sustituidos con triptófano.

También se proporcionan derivados de secuencia de aminoácidos del virus PMC por la invención e incluyen secuencias de aminoácidos del virus PMC, análogos o fragmentos de las mismas que son sustancialmente homólogas en estructura primaria pero que incluyen modificaciones químicas y/o bioquímicas o aminoácidos inusuales. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación, glucosilación, ubiquitinación, marcaje (por ejemplo, con radionucleótidos), y diversas modificaciones enzimáticas, como apreciarán fácilmente los especialistas en la técnica.

En una forma de la invención, los restos químicos adecuados para derivatización se seleccionan entre polímeros solubles en agua. El polímero seleccionado debe ser soluble en agua de modo que la proteína a la que está unido

no precipite en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. Preferiblemente, para uso terapéutico de la preparación de producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable. Un especialista en la técnica será capaz de seleccionar el polímero deseado basándose en consideraciones tales como si el conjugado de polímero/proteína se usará terapéuticamente, y si es así, la dosificación deseada, el tiempo en circulación, la resistencia a la proteólisis y otras consideraciones. Para las presentes proteínas y péptidos, éstas pueden determinarse usando los ensayos proporcionados en este documento.

El polímero soluble en agua puede seleccionarse entre el grupo que consiste en, por ejemplo, polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli (n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados y alcohol polivinílico. El polietilenglicol propionaldehído puede proporcionar ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua.

En otra forma de la invención las secuencias de aminoácidos se pueden modificar para producir una semivida más larga en un hospedador animal, por ejemplo, fusionando uno o más fragmentos de anticuerpo (tal como un fragmento Fc) al extremo amino o carboxilo de una secuencia de aminoácidos del virus PMC.

Cuando la secuencia de aminoácidos del virus PMC debe proporcionarse en una forma marcada, son bien conocidos diversos métodos para marcar secuencias de aminoácidos en la técnica e incluyen isótopos radiactivos tales como ³²P, ligandos que se unen a antilíngandos marcados (por ejemplo, anticuerpos), fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas y antilíngandos que pueden servir como miembros de pares de unión específicos para un ligando marcado. La elección del marcador depende de la sensibilidad requerida, los requisitos de estabilidad, y la instrumentación disponible. Los métodos para marcar secuencias de aminoácidos son bien conocidos en la técnica [véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989); y Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates/Wiley Intersciences, Nueva York (2001)].

Las secuencias de aminoácidos del virus PMC de la invención, si son solubles, pueden acoplarse a un soporte en fase sólida, por ejemplo, nitrocelulosa, nylon, materiales de compactación de columnas (por ejemplo, perlas de Sepharose), perlas magnéticas, lana de vidrio, plástico, metal, geles poliméricos, células, u otros sustratos. Dichos soportes pueden adoptar la forma, por ejemplo, de perlas, pocillos, tiras reactivas, o membranas.

La invención también proporciona polipéptidos de fusión, que comprenden secuencias de aminoácidos del virus PMC y fragmentos de las mismas. Por tanto, las secuencias de aminoácidos del virus PMC pueden ser fusiones entre dos o más secuencias de aminoácidos del virus PMC o entre una secuencia de aminoácidos del virus PMC y una proteína relacionada. Asimismo, pueden construirse fusiones heterólogas que mostrarían una combinación de propiedades o actividades de las proteínas derivadas. Por ejemplo, pueden "intercambiarse" dominio de unión a ligando u otros dominios entre diferentes polipéptidos de fusión o fragmentos. Dichos polipéptidos de fusión homólogos o heterólogos pueden presentar, por ejemplo, fuerza o especificidad de unión alterada. Los compañeros de fusión incluyen inmunoglobulinas, beta-galactosidasa bacteriana, trpE, proteína A, beta-lactamasa, alfa amilasa, alcohol deshidrogenasa y factor de acoplamiento alfa de levadura.

Pueden sintetizarse secuencias de aminoácidos del virus PMC modificadas usando técnicas convencionales, o pueden codificarse por una secuencia polinucleotídica modificada y producirse usando métodos recombinantes de ácido nucleico. La secuencia polinucleotídica modificado también puede prepararse por técnicas convencionales. Las proteínas de fusión normalmente se prepararán por cualquier método recombinante de ácido nucleico o pueden sintetizarse químicamente.

Diagnóstico

De acuerdo con otra realización, la invención proporciona métodos de diagnóstico y pronóstico para detectar la presencia de virus PMC usando glucoproteínas, proteínas y otros péptidos y polipéptidos de virus PMC (se obtengan en un estado purificado a partir de preparaciones de virus PMC, o por síntesis química) y/o anticuerpos derivados de los mismos y/o secuencias polinucleotídicas de virus PMC. Los métodos de diagnóstico y pronóstico generalmente se realizarán usando una muestra biológica obtenida de un animal, tal como un cerdo. Una "muestra" se refiere a una muestra de tejido o fluido sospechoso de contener un polinucleótido o polipéptido PMC de un animal, aunque sin limitación, por ejemplo, sangre completa, células sanguíneas, plasma, suero, leche, muestras fecales, tejidos y muestras de constituyentes de cultivos celulares *in vitro*.

Diagnóstico basado en polipéptido/anticuerpo

Se proporcionan medios para la detección de proteínas de virus PMC, en particular para el diagnóstico de PMC o para la detección de anticuerpos contra el virus PMC o de sus proteínas, particularmente en sujetos que sufren PMC o más generalmente en portadores asintomáticos y en productos derivados de animales tales como carne. Dichos

métodos también se mencionan como inmunoensayos.

La invención proporciona por tanto un método para detectar la presencia de una secuencia de aminoácidos del virus PMC en una muestra, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener una secuencia de aminoácidos del virus PMC con un anticuerpo que se une específicamente a la secuencia de aminoácidos del virus PMC en condiciones que permitan la formación de complejos de reacción que comprenden el anticuerpo y la secuencia de aminoácidos del virus PMC; y

b) detectar la formación de complejos de reacción que comprenden el anticuerpo y la secuencia de aminoácidos del virus PMC en la muestra, donde la detección de la formación de complejos de reacción indica la presencia de secuencia de aminoácidos del virus PMC en la muestra.

En particular, la invención se refiere a un proceso de diagnóstico in vitro que hace uso de una secuencia de aminoácidos que codifica una glucoproteína de envuelta o de un polipéptido que alberga un epítipo de una glucoproteína del virus PMC o cualquier otra proteína viral (estructural o no estructural) para la detección de anticuerpos anti-virus PMC en suero, leche o fluidos corporales. Preferiblemente, el anticuerpo usado en los métodos anteriores se une a las proteínas E0, E1, E2, NS2, NS3, NS4A, NS4B y/o NS5A, NS5B del virus PMC.

La invención también proporciona un método para detectar la presencia de un anticuerpo contra el virus PMC en una muestra, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un anticuerpo contra el virus PMC con una secuencia de aminoácidos en condiciones que permitan la formación de complejos de reacción que comprenden el anticuerpo contra el virus PMC y la secuencia de aminoácidos; y

b) detectar la formación de complejos de reacción que comprenden el anticuerpo y la secuencia de aminoácidos en la muestra, donde la detección de la formación de complejos de reacción indica la presencia de anticuerpos contra el virus PMC en la muestra.

También se proporciona un método para la detección de anticuerpos anti-virus PMC, que comprende las etapas de:

a) depositar una cantidad predeterminada de uno o varios antígenos del virus PMC sobre un soporte sólido tal como una microplaca;

b) introducir diluciones crecientes de un fluido biológico (por ejemplo, suero o plasma de la sangre, leche, fluido cefalorraquídeo, fluido linfático u otros fluidos corporales) en los antígenos e incubar;

c) lavar el soporte sólido con un tampón apropiado;

d) añadir anticuerpos marcados específicos dirigidos contra los anticuerpos del sujeto; y

e) detectar el complejo antígeno-anticuerpo-anticuerpo formado, que entonces es indicativo de la presencia de anticuerpos contra el virus PMC en el fluido biológico.

Preferiblemente, el anticuerpo usado en estos métodos se deriva de un anticuerpo policlonal purificado por afinidad, y más preferiblemente un mAb. Además, es preferible que las moléculas de anticuerpo usadas en este documento estén en forma de porciones Fab, Fab', F(ab')₂ o F(v) o moléculas de anticuerpo completas.

Métodos particularmente preferidos para detectar virus PMC basados en los métodos anteriores incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas, radioinmunoensayos, ensayos inmunoradiométricos y ensayos inmunoenzimáticos, incluyendo ensayos tipo sándwich usando anticuerpos monoclonales y/o policlonales.

Tres de estos procedimientos que son especialmente útiles utilizan secuencias de aminoácidos del PMC virus (o fragmentos de las mismas) marcadas con un marcador detectable, anticuerpo Ab₁ marcado con un marcador detectable, o anticuerpo Ab₂ marcado con un marcador detectable. Los procedimientos pueden resumirse mediante las siguientes ecuaciones donde el asterisco indica que la partícula está marcada y "AA" representa la secuencia de aminoácidos del virus PMC:

A. AA* + Ab₁ = AA*Ab₁

B. AA + Ab*₁ = AA Ab*₁

C. AA + Ab₁ + Ab*₂ = Ab₁ AA Ab*₂

Los procedimientos y su aplicación son todos familiares para los especialistas en la técnica y en consecuencia puede utilizarse dentro del alcance de la presente invención. El procedimiento "competitivo" o "de bloqueo", Procedimiento A, se describe en las patentes de Estados Unidos N° 3.654.090 y 3.850.752. El Procedimiento B es representativo de técnicas de ensayo competitivo conocidos. El Procedimiento C, el procedimiento tipo "sándwich", se describe en las patentes de Estados Unidos N° RE 31.006 y 4.016.043. Otros procedimientos más son conocidos, tales como el procedimiento de "doble anticuerpo" o "DASP".

En cada caso, las secuencias de aminoácidos del virus PMC forman complejos con uno o más anticuerpos o compañeros de unión y un miembro del complejo está marcado con un marcador detectable. El hecho de que se haya formado un complejo y, si se desea, la cantidad del mismo, puede determinarse por métodos conocidos aplicables a la detección de marcadores.

Se observará a partir de lo anterior que una propiedad característica de Ab₂ es que reaccionará con Ab₁. Esto se debe a que Ab₁, creado en una especie de mamífero, se ha usado en otras especies como antígeno para producir el anticuerpo, Ab₂. Por ejemplo, Ab₂ puede crearse en cabras usando anticuerpos de conejo como antígenos. Ab₂, por lo tanto, sería anticuerpo anti-conejo producido en cabras. Para los propósitos de esta descripción y las reivindicaciones, Ab₁ se mencionará como anticuerpo primario, y Ab₂ se mencionará como anticuerpo secundario o anti-Ab₁.

Los marcadores más comúnmente empleados para estos estudios son elementos radiactivos, enzimas, agentes químicos que emiten fluorescencia cuando se exponen a luz ultravioleta, y otros.

Se conocen varios materiales fluorescentes y pueden utilizarse como marcadores. Éstos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina y auramina. Un material de detección particular es anticuerpo anti-conejo preparado en cabras y conjugado con fluoresceína a través de un isotiocianato.

Las secuencias de aminoácidos del virus PMC o sus compañeros de unión también pueden marcarse con un elemento radiactivo o con una enzima. El marcador radiactivo puede detectarse por cualquiera de los procedimientos de recuento actualmente disponibles. El isótopo preferido puede seleccionarse entre ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, y ¹⁸⁶Re.

Asimismo son útiles los marcadores enzimáticos, y pueden detectarse por cualquiera de las técnicas colorimétrica, espectrofotométrica, fluoroespectrofotométrica, amperométricas o gasométrica actualmente utilizadas. La enzima se conjuga con la partícula seleccionada por reacción con moléculas puente tales como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldehído y similares. Muchas enzimas, que pueden usarse en estos procedimientos, son conocidas y pueden utilizarse. Las enzimas preferidas son peroxidasa, β-glucuronidasa, β-D-glucosidasa, β-D-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa más peroxidasa y fosfatasa alcalina. Las patentes de Estados Unidos N° 3.654.090, 3.850.752 y 4.016.043 se mencionan a modo de ejemplo por su descripción de material y métodos de marcaje alternativo.

En otra realización de la invención, se proporcionan métodos in vitro para evaluar el nivel de anticuerpos contra el virus PMC en una muestra biológica que comprende las etapas de:

a) detectar la formación de complejos de reacción en una muestra biológica de acuerdo con el método indicado anteriormente; y

b) evaluar la cantidad de complejos de reacción formados, correspondiendo dicha cantidad de complejos de reacción al nivel de anticuerpos contra el virus PMC en la muestra biológica.

Preferiblemente, el anticuerpo usado en los métodos anteriores se une a las proteínas E0, E1, E2, NS2, NS3, NS4A, NS4B y/o NS5A, NS5B del virus PMC.

En otra realización de la invención, se proporcionan métodos in vitro para evaluar el nivel de polipéptidos de virus PMC en una muestra biológica que comprende las etapas de:

a) detectar la formación de complejos de reacción en una muestra biológica de acuerdo con el método indicado anteriormente; y

b) evaluar la cantidad de complejos de reacción formados, correspondiendo dicha cantidad de complejos de reacción al nivel de polipéptido de virus PMC en la muestra biológica.

Preferiblemente, el polipéptido usado en los métodos anteriores codifica las proteínas E0, E1, E2, NS2, NS3, NS4A, NS4B y/o NS5A, NS5B del virus PMC.

Además, se proporcionan métodos in vitro para controlar el tratamiento terapéutico de una enfermedad asociada con el virus PMC en un hospedador animal, que comprende evaluar, como se ha descrito anteriormente, los niveles de anticuerpos contra el virus PMC en una serie de muestras biológicas obtenidas en diferentes puntos temporales de

un hospedador animal que experimenta dicho tratamiento terapéutico.

Los métodos para detectar polipéptidos usando anticuerpos, o inmunoensayos, de acuerdo con la presente invención pueden utilizar antígenos de los diferentes dominios de las secuencias polipeptídicas nuevas y únicas de la presente invención que mantienen epítomos lineales (en el caso de péptidos) y conformacionales (en el caso de polipéptidos) reconocidos por anticuerpos en los sueros de sujetos infectados con el virus PMC.

Está dentro del alcance de la invención usar, por ejemplo, antígenos oligoméricos individuales o específicos, antígenos diméricos, así como combinaciones de antígenos oligoméricos individuales o específicos.

Los antígenos del virus PMC de la presente invención pueden emplearse en casi cualquier formato de ensayo que emplee un antígeno conocido para detectar anticuerpos. Por supuesto, debe evitarse o adaptarse un formato que desnaturalice el epítomo conformacional del virus PMC.

Una característica común de todos estos métodos de detección es que el antígeno se pone en contacto con la muestra de ensayo sospechosa de contener anticuerpos contra el virus PMC en condiciones que permitan al antígeno unirse a cualquier anticuerpo presente en el componente. Dichas condiciones serán normalmente la temperatura fisiológica, el pH y la fuerza iónica, usando una cantidad apropiada predeterminada de antígeno. La incubación del antígeno con la muestra va seguida por la detección de complejos inmunes compuestos del antígeno y anticuerpos derivados de la muestra normalmente usando un segundo anticuerpo marcado que está dirigido contra las inmunoglobulinas de la especie de animal de ensayo.

El diseño de los inmunoensayos está sujeto a una gran cantidad de variación, y se conocen muchos formatos en la técnica. Los protocolos pueden usar, por ejemplo, soportes sólidos, o inmunoprecipitación. También se conocen ensayos que amplifican las señales del complejo inmune; ejemplos de los cuales son ensayos que utilizan biotina y avidina o estreptavidina, e inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tales como ensayos ELISA. Además, el inmunoensayo puede estar, sin limitación, en un formato heterogéneo o en uno homogéneo, y de un tipo convencional o competitivo.

En un formato heterogéneo, el polipéptido está normalmente unido a una matriz o soporte sólido para facilitar la separación de la muestra del polipéptido después de la incubación. Ejemplos de soportes sólidos que pueden usarse son nitrocelulosa (por ejemplo, en membrana o forma de pocillo de microtitulación), cloruro de polivinilo (por ejemplo, en láminas o pocillos de microtitulación), látex de poliestireno (por ejemplo, en perlas o placas de microtitulación), fluoruro de polivinilideno (conocido como Immunolon™), papel diazotizado, membranas de nylon, perlas activadas, y perlas de Proteína A. Por ejemplo, pueden usarse placas de microtitulación Dynatech Immunolon™ 1 o Immunolon™ 2 o perlas de poliestireno de 6,35 mm (0,25 pulgadas) (Precision Plastic Ball) en el formato heterogéneo. El soporte sólido que contiene los polipéptidos antigénicos se lava normalmente después de separarlos de la muestra de ensayo, y antes de la detección de anticuerpos unidos. Ambos formatos convencional y competitivo son conocidos en la técnica.

En un formato homogéneo, la muestra de ensayo se incuba con la combinación de antígenos en solución. Por ejemplo, puede ser en condiciones que precipitarán cualquier complejo antígeno-anticuerpo que se forme. Ambos formatos convencional y competitivo para esos ensayos son conocidos en la técnica.

En un formato convencional, la cantidad de anticuerpos contra el virus PMC en los complejos antígeno-anticuerpo se controla directamente. Esto puede conseguirse determinando si los anticuerpos anti-xenogénicos marcados (por ejemplo, anti-cerdo) que reconocen un epítomo en anticuerpos anti-virus PMC se unirán debido a la formación de complejos. En un formato competitivo, la cantidad de anticuerpos contra el virus PMC en la muestra se deduce controlando el efecto competitivo sobre la unión de una cantidad conocida de anticuerpo marcado (u otro ligando de competición) en el complejo.

Los complejos formados que comprenden anticuerpo anti-virus PMC (o en el caso de ensayos competitivos, la cantidad de anticuerpo de competición) se detectan por cualquiera de varias técnicas conocidas, dependiendo del formato. Por ejemplo, los anticuerpos no marcados contra el virus PMC en el complejo pueden detectarse usando un conjugado de Ig anti-xenogénica en complejo con un marcador (por ejemplo, un marcador enzimático).

En un formato de ensayo de inmunoprecipitación o aglutinación, la reacción entre los antígenos del virus PMC y el anticuerpo forma una red que precipita en la solución o suspensión y forma una capa o película visible de precipitado. Si no está presente ningún anticuerpo anti-PMC en la muestra de ensayo, no se formará precipitado visible.

Actualmente existen tres tipos específicos de ensayos de aglutinación de partículas (PA). Estos ensayos se usan para la detección de anticuerpos contra diversos antígenos cuando se recubren sobre un soporte. Un tipo de este ensayo es el ensayo de hemaglutinación que usa glóbulos rojos (RBC) que están sensibilizados por absorción pasiva del antígeno (o anticuerpo) a la RBC. La adición de anticuerpos específicos de antígeno presentes en el componente corporal, si lo hay, provoca que las RBC recubiertas con el antígeno purificado se aglutinen.

Para eliminar potenciales reacciones no específicas en el ensayo de hemaglutinación, pueden usarse dos vehículos artificiales en lugar de RBC en la PA. El más común de éstos son partículas de látex. Sin embargo, también pueden usarse partículas de gelatina. Los ensayos que utilizan cualquiera de estos vehículos están basados en la aglutinación pasiva de las partículas recubiertas con antígenos purificados.

5 **Diagnóstico basado en ácido nucleico**

La presente invención proporciona además métodos para detectar la presencia o ausencia del virus PMC en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

10 c) poner la muestra biológica en contacto con una sonda o cebador polinucleotídico que comprende un polinucleótido del virus PMC de la invención en condiciones adecuadas de hibridación; y

15 d) detectar cualquier dúplex formado entre la sonda o cebador y las secuencias de ácido nucleico en la muestra.

De acuerdo con una realización de la invención, la detección del virus PMC puede conseguirse amplificando directamente secuencias polinucleotídicas del virus PMC procedentes de la muestra biológica, usando técnicas conocidas y después detectando la presencia de secuencias polinucleotídicas del virus PMC.

20 La presente invención por tanto también se refiere a un método para la detección de ácidos nucleicos del virus PMC presentes en una muestra biológica, que comprende:

c) amplificar el ácido nucleico con al menos un cebador como se ha definido anteriormente,

25 d) detectar los ácidos nucleicos amplificados.

Preferiblemente, el ácido nucleico se extrae y/o purifica (por ejemplo, a partir de una de una muestra tisular) antes de la amplificación.

30 La presente invención también se refiere a un método para la detección de ácidos nucleicos del virus PMC presentes en una muestra biológica, que comprende:

d) hibridar los ácidos nucleicos de la muestra biológica en condiciones apropiadas con una o más sondas como se ha definido anteriormente,

35 e) lavar en condiciones apropiadas, y

f) detectar los híbridos formados.

40 Preferiblemente, las condiciones de hibridación son condiciones desnaturalizadas.

Preferiblemente, el ácido nucleico se extrae y/o purifica (por ejemplo, a partir de una de una muestra tisular) antes de la hibridación. Más preferiblemente, la muestra de ácido nucleico se amplifica con al menos un cebador como se ha definido anteriormente, después de la extracción o al menos antes de la hibridación. Preferiblemente, dichas sondas se unen a un sustrato sólido o se detectan en una fase líquida por detección fotométrica o fluorogénica o por otros métodos de visualización, tal como por electroforesis en gel de agarosa.

La presente invención también se refiere a un método como se ha definido anteriormente, donde dichos ácidos nucleicos se marcan durante o después de la amplificación.

50 Los métodos de ensayo adecuados para los propósitos de la presente invención para detectar híbridos formados entre las sondas oligonucleotídicas y las secuencias de ácido nucleico en una muestra pueden comprender cualquiera de los formatos de ensayo conocidos en la técnica, tales como el formato dot-blot convencional, la hibridación tipo sándwich o la hibridación inversa. Por ejemplo, la detección puede conseguirse usando un formato dot-blot, uniéndose la muestra amplificada no marcada a una membrana, incorporándose la membrana con al menos una sonda marcada en condiciones adecuadas de hibridación y lavado, y controlándose la presencia de sonda unida.

60 Un método alternativo y preferido es un formato de dot-blot "inverso", en que la secuencia amplificada contiene un marcador. En este formato, las sondas oligonucleotídicas no marcadas se unen a un soporte sólido y se exponen a la muestra marcada en condiciones apropiadas de hibridación rigurosa y posterior lavado. Debe entenderse que también puede usarse cualquier otro método de ensayo que se base en la formación de un híbrido entre los ácidos nucleicos de la muestra y las sondas oligonucleotídicas de acuerdo con la presente invención.

65 En una forma de la invención, la secuencia de ácido nucleico diana se amplifica por PCR y después se detecta usando cualquiera de los métodos específicos mencionados anteriormente. Otras técnicas de diagnóstico útiles para

detectar la presencia de secuencias polinucleotídicas del virus PMC incluyen, aunque sin limitación: 1) PCR específica de alelo; 2) análisis de conformación monocatenaria; 3) electroforesis en gel con gradiente desnaturizante; 4) ensayos de protección contra RNasa; 5) el uso de proteínas que reconocen desapareamientos de nucleótidos, tal como la proteína mutS de *E. coli*; 6) oligonucleótidos específicos de alelo; y 7) hibridación fluorescente *in situ*.

Además de los métodos anteriores, las secuencias polinucleotídicas del virus PMC se pueden detectar usando tecnología convencional de sondas. Cuando se usan sondas para detectar la presencia de las secuencias polinucleotídicas del virus PMC, la muestra biológica a analizar, tal como sangre o suero, puede tratarse, si se desea, para extraer los ácidos nucleicos. Las secuencias polinucleotídicas de la muestra pueden prepararse de varias maneras para facilitar la detección de la secuencia diana; por ejemplo desnaturización, digestión de restricción, electroforesis o dot-blot. La región específica de la secuencia polinucleotídica de la muestra habitualmente debe ser al menos parcialmente monocatenaria para formar híbridos con la secuencia diana de la sonda. Si la secuencia es monocatenaria de forma natural, no se requerirá desnaturización. Sin embargo, si la secuencia es bicatenaria, probablemente tendrá que desnaturizarse la secuencia. La desnaturización puede realizarse por diversas técnicas conocidas en la técnica.

Las secuencias polinucleotídicas de muestra y las sondas se incuban en condiciones que promueven la formación de híbridos estables de la secuencia diana en la sonda con la secuencia polinucleotídica putativa del virus PMC en la muestra. Preferiblemente, se usan condiciones de rigurosidad elevada para prevenir falsos positivos.

La detección, si la hay, del híbrido resultante se consigue habitualmente por el uso de sondas marcadas. Como alternativa, la sonda puede estar sin marcar, pero puede ser detectable mediante unión específica con un ligando que está marcado, directa o indirectamente. Los marcadores adecuados y los métodos para marcar sondas y ligandos son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, marcadores radiactivos que pueden incorporarse por métodos conocidos (por ejemplo, traslado de mella, cebado aleatorio o tratamiento con quinasa), biotina, grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes (por ejemplo, dioxetanos, particularmente dioxetanos activados), enzimas, anticuerpos y similares. Se conocen en la técnica variaciones de este esquema básico, e incluyen aquellas variaciones que facilitan la separación de los híbridos a detectar de materiales extraños y/o que amplifican la señal del resto marcado.

También se contempla dentro del alcance de esta invención que los ensayos de sondas de ácido nucleico de esta invención pueden emplear un cóctel de sondas y/o cebadores de ácido nucleico capaces de detectar secuencias polinucleotídicas del virus PMC. Por tanto, en un ejemplo para detectar la presencia de secuencias polinucleotídicas del virus PMC en una muestra celular, se emplea más de una sonda complementaria a secuencias polinucleotídicas del virus PMC y en particular el número de sondas diferentes es alternativamente 2, 3, ó 5 secuencias diferentes de sonda de ácido nucleico.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para detectar ARN o ADN viral que comprende las etapas de:

- a) inmovilizar virus PMC sobre un soporte (por ejemplo, un filtro de nitrocelulosa);
- b) alterar el virión; y
- c) hibridar con una sonda.

Preferiblemente, la sonda está marcada. Más preferiblemente, la sonda está radiomarcada o marcada de forma fluorescente o con enzima. Dicho enfoque para la detección de virus ya se ha desarrollado para el virus de la hepatitis B en sangre periférica (Scotto J. et al. Hepatology (1983), 3, 379-384).

La presente invención también proporciona un método para la exploración rápida de ADN genómico derivado del tejido de sujetos con síntomas relacionados con virus PMC para detectar el ADN o ARN relacionado con el virus PMC proviral presente en los tejidos. Por tanto, la presente invención también proporciona un método para explorar el tejido de sujetos que comprende las etapas de:

- a) extraer ADN de tejido;
- b) escindir con enzimas de restricción dicho ADN;
- c) electroforesis de los fragmentos; y
- d) transferencia de Southern de ADN genómico de los tejidos y posterior hibridación con ADN del virus PMC clonado marcado.

También puede usarse hibridación *in situ*.

PRODUCCIÓN DE POLIPÉPTIDO ANTIGÉNICO

5 Puede usarse ARN y ADN viral de acuerdo con la invención para expresar antígenos virales PMC con fines de diagnóstico, así como para la producción de una vacuna contra el virus PMC. Los métodos que pueden usarse para conseguir la expresión de polipéptidos antigénicos son múltiples:

10 a) puede transfectarse ADN en células de mamífero con marcadores de selección apropiados por diversas técnicas, tales como precipitación con fosfato cálcico, polietilenglicol, fusión de protoplastos, etc. y purificarse las proteínas resultantes.

15 b) pueden clonarse fragmentos de ADN correspondientes a genes en vectores de expresión para células de *E. coli*, levadura o mamífero y purificarse las proteínas resultantes.

c) puede "dispararse" (fragmentarse) el ARN o ADN proviral en vectores de expresión procariotas para generar polipéptidos de fusión. Los recombinantes, que producen proteínas de fusión antigénicamente competentes, pueden identificarse simplemente explorando los recombinantes con anticuerpos contra antígenos del virus PMC.

20 Se hace referencia particular a este respecto a aquellas partes del genoma del virus PMC que, en las figuras, se muestra que pertenecen a fases de lectura abierta y que codifican los productos que tienen las secuencias polipeptídicas mostradas. Preferiblemente, las secuencias de ácido nucleico usadas en los métodos anteriores codifican las proteínas E0, E1, E2, NS2, NS3, NS4A, NS4B y/o NS5A, NS5B de PMC. Preferiblemente, se proporcionan polipéptidos que contienen secuencias en común con polipéptidos que comprenden determinantes antigénicos incluidos en las proteínas codificadas y expresadas por el genoma del virus PMC.

ANTICUERPOS

Anticuerpos contra proteínas PMC

30 Los diferentes péptidos de acuerdo con esta invención también pueden usarse en sí mismos para la producción de anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales específicos para los respectivos péptidos diferentes. Por tanto, de acuerdo con la invención, las secuencias de aminoácidos del virus PMC producidas de forma recombinante o por síntesis química y fragmentos u otros derivados o análogos de las mismas, incluyendo proteínas de fusión, 35 pueden usarse como inmunógeno para generar anticuerpos que reconozcan la secuencia de aminoácidos del virus PMC. Dichos anticuerpos incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, fragmentos Fab y una biblioteca de expresión de Fab.

40 Por tanto, la presente invención proporciona un método para la generación de anticuerpos que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una secuencia polipeptídica del virus PMC a un sujeto; y
- b) recoger los anticuerpos generados en el sujeto contra el polipéptido.

45 Preferiblemente, el polipéptido usado para generar el anticuerpo es antigénico. Más preferiblemente, el polipéptido se elige entre la lista que comprende las proteínas E0, E1, E2, NS2, NS3, NS4A, NS4B y/o NS5A o NS5B del virus PMC. Más preferiblemente, la proteína usada para generar el anticuerpo es la proteína E0, E2, NS2 y/o NS3 o un fragmento o derivado de las mismas. Por ejemplo, en una realización muy preferida, una composición de la invención comprende tanto un complejo E0/E2 de virus PMC como un complejo NS2/NS3 de virus PMC.

50 Una molécula es "antigénica" cuando es capaz de interactuar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígeno del sistema inmune, tal como una inmunoglobulina (anticuerpo) o receptor de antígeno de células T. Una secuencia de aminoácidos antigénica contiene al menos aproximadamente 5, y preferiblemente al menos aproximadamente 10, aminoácidos. Una parte antigénica de una molécula puede ser esa parte que es 55 inmunodominante para el reconocimiento por el anticuerpo o el receptor de células T, o puede ser una parte usada para generar un anticuerpo contra la molécula conjugando la parte antigénica con una molécula vehículo para la inmunización. Una molécula que es antigénica no necesita ser inmunogénica en sí misma, es decir, capaz de provocar una respuesta inmune sin un vehículo.

60 Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se une a un epítipo específico. El término abarca anticuerpos policlonales, monoclonales, y quiméricos, los últimos mencionados descritos con mayor detalle en las patentes de Estados Unidos N° 4.816.397 y 4.816.567, así como partes de unión a antígeno de anticuerpos, incluyendo Fab, F(ab')₂ y F(v) (incluyendo anticuerpos de cadena sencilla). Por consiguiente, la expresión "molécula de anticuerpo" en sus diversas formas gramaticales como se usa en este 65 documento contempla tanto una molécula de inmunoglobulina intacta como una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina que contiene el sitio de combinación de anticuerpo. Un "sitio de combinación de

anticuerpo" es la parte estructural de una molécula de anticuerpo compuesta de regiones variables e hipervariables de cadena pesada y ligera que se une específicamente al antígeno.

Moléculas de anticuerpo ejemplares son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y aquellas partes de una molécula de inmunoglobulina que contienen el parátipo, incluyendo aquellas partes conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), que son partes preferidas para su uso en los métodos terapéuticos descritos en este documento.

Las partes Fab y F(ab')₂ de moléculas de anticuerpo se preparan mediante la reacción proteolítica de papaína y pepsina, respectivamente, sobre moléculas de anticuerpo sustancialmente intactas por métodos que son bien conocidos. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.342.566 de Theofilopolous et al. Las partes de moléculas de anticuerpo Fab' también son bien conocidas y se producen a partir de partes F(ab')₂ seguido por reducción con mercaptoetanol de los enlaces disulfuro que unen las dos partes de cadena pesada, y seguido por alquilación del mercaptano de proteína resultante con un reactivo tal como yodoacetamida. En este documento se prefiere un anticuerpo que contenga moléculas de anticuerpo intactas.

La expresión "anticuerpo monoclonal" en sus diversas formas gramaticales se refiere a un anticuerpo que tiene solamente una especie de sitio de combinación de anticuerpo capaz de inmunorreaccionar con un antígeno particular. Un anticuerpo monoclonal por tanto presenta normalmente una sola afinidad de unión para cualquier antígeno con el cual inmunorreacciona.

Para la producción de hibridomas que secretan dichos anticuerpos monoclonales, pueden usarse métodos convencionales de producción y exploración. Estos anticuerpos monoclonales, que en sí mismos son parte de la invención, proporcionan herramientas muy útiles para la identificación e incluso determinación de proporciones relativas de los diferentes polipéptidos o proteínas en muestras biológicas, en particular muestras animales que contienen virus PMC o virus relacionados.

Los adyuvantes incluyen, aunque sin limitación, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburo, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (*bacilo de Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Preferiblemente, el adyuvante es farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden ser eficaces incluyen, aunque sin limitación: N-acetil-muramyl-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramyl-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, mencionada como nor-MDP), N-acetil-muramyl-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, mencionada como MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL + TDM + CWS) en una emulsión de escualeno al 2 %/Tween 80.

Ejemplos adicionales de adyuvantes y otros agentes incluyen hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio y potasio (alumbre), sulfato de berilio, sílice, caolín, carbono, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, muramyl dipéptido, endotoxina bacteriana, lípido X, *Corynebacterium parvum* (*Propionobacterium acnes*), Bordetella pertussis, polirribonucleótidos, alginato de sodio, lanolina, lisolecitina, vitamina A, saponina, complejos inmuno estimulantes (ISCOM), liposomas, levamisol, DEAE-dextrano, copolímeros bloqueados u otros adyuvantes sintéticos. Dichos adyuvantes están disponibles en el mercado de diversas fuentes, por ejemplo, Adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ) o adyuvante incompleto y adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan).

Normalmente, se usan adyuvantes tales como Amphigen (aceite en agua), Alhydrogel (hidróxido de aluminio), o una mezcla de Amphigen y Alhydrogel. Sólo el hidróxido de aluminio está aprobado para uso humano.

La proporción de polipéptido inmunogénico y adyuvante se puede variar sobre un amplio intervalo siempre que ambos estén presentes en cantidades eficaces. Por ejemplo, el hidróxido de aluminio puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 0,5 % de la mezcla de vacuna (base de Al₂O₃). Convenientemente, las vacunas se formulan para que contengan una concentración final de inmunógeno en el intervalo de 0,2 a 200 µg/ml, preferiblemente de 5 a 50 µg/ml, más preferiblemente 15 µg/ml.

Después de la formulación, la vacuna se puede incorporar a un recipiente estéril que después se sella y se almacena a baja temperatura, por ejemplo 4 °C, o se puede secar por congelación. La liofilización permite un almacenamiento a largo plazo en una forma estabilizada.

Las vacunas se administran convencionalmente por vía parenteral, por inyección, por ejemplo, por vía subcutánea o por vía intramuscular. Formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para supositorios, los aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden formarse a partir de

mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo del 0,5 % al 10 %, preferiblemente del 1 % al 2 %. Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen del 10 % al 95 % de ingrediente activo, preferiblemente del 25 % al 70 %.

Cuando se liofiliza la composición de vacuna, el material liofilizado puede reconstituirse antes de la administración, por ejemplo, como una suspensión. La reconstitución se efectúa preferiblemente en tampón.

Las cápsulas, comprimidos y píldoras para administración oral a un paciente pueden proporcionarse con un recubrimiento entérico que comprende, por ejemplo, Eudragit "S", Eudragit "L", acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa o hidroxipropilmetil celulosa.

Los polipéptidos del virus PMC de la invención pueden formularse en la vacuna como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con grupos amino libres del péptido) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico y maleico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina y procaína.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender, además, polipéptidos antigénicos que no se acoplan a polipéptidos del virus PMC y/o moléculas biológicamente activas cuya principal finalidad no es la de servir como antígeno, sino modular la respuesta inmune en algún otro aspecto. Los ejemplos de moléculas biológicamente activas que modulan el sistema inmune de un animal o sujeto humano incluyen citoquinas.

El término "citoquina" se refiere a cualquier polipéptido secretado que influye en la función de otras células mediando una respuesta inmune. Algunos ejemplos de citoquinas incluyen, aunque sin limitación, 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), interferón- α (IFN- α), interferón- β (IFN- β), interferón- γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), factor de necrosis tumoral- β (TNF- β), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), y factor de crecimiento transformante- β (TGF- β).

Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales contra secuencias de aminoácidos del virus PMC, o fragmentos, derivados o análogos de las mismas.

Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse diversos animales hospedadores por inyección con la secuencia de aminoácidos del virus PMC, o un derivado (por ejemplo, fragmento o proteína de fusión) de la misma, incluyendo, aunque sin limitación, conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc.

En una realización, las secuencias de aminoácidos del virus PMC o fragmento de las mismas pueden conjugarse con un vehículo inmunogénico, por ejemplo, albúmina sérica bovina (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH).

Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie de hospedador, incluyendo, aunque sin limitación adyuvante (completo e incompleto) de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (*bacilo de Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia las secuencias de aminoácidos del virus PMC, o fragmentos, análogos o derivados de las mismas, puede usarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Éstas incluyen, aunque sin limitación, la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler et al., (1975) *Nature*, 256: 495-497, la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas [Kozbor et al., (1983) *Immunology Today*, 4:72], y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos [Cole et al., (1985) en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pág. 77-96, Alan R. Liss, Inc.]. Pueden crearse líneas celulares inmortal productoras de anticuerpos por técnicas diferentes a la fusión, tales como transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o transfección con el virus Epstein-Barr. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N^o 4.341.761; 4.399.121; 4.427.783; 4.444.887; 4451, 570; 4.466.917; 4.472.500; 4491, 632; y 4.493.890.

En una realización adicional de la invención, los anticuerpos monoclonales se pueden producir en animales libres de gérmenes. De acuerdo con la invención, pueden usarse anticuerpos de cerdos y se pueden obtener usando hibridomas porcinos o transformando células B con virus PMC *in vitro*. De hecho, de acuerdo con la invención, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" [Morrison et al., (1984) *J. Bacteriol.*, 159-870; Neuberger et al., (1984) *Nature*, 312: 604-608; Takeda et al., (1985) *Nature*, 314: 452-454] por

corte y ajuste de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón específica para una secuencia de aminoácidos de PMC junto con genes de una molécula de anticuerpo de actividad biológica apropiada; dichos anticuerpos están dentro del alcance de esta invención. Dichos anticuerpos quiméricos se prefieren para uso en terapia de enfermedades o trastornos intestinales, ya que los anticuerpos son mucho menos propensos que los anticuerpos xenogénicos a inducir una respuesta inmune, en particular una respuesta alérgica, por sí mismos.

De acuerdo con la invención, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de Estados Unidos 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos de secuencia de aminoácidos del virus PMC. Una realización adicional de la invención utiliza las técnicas descritas para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab [Huse et al., (1989) Science, 246: 1275-1281] para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada por una secuencia de aminoácidos del virus PMC, o sus derivados, o análogos.

Los fragmentos de anticuerpo, que contienen el idiotipo de la molécula de anticuerpo, se pueden generar por técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, aunque sin limitación: el fragmento F (ab')₂ que puede producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab' que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro del fragmento F (ab')₂, y los fragmentos Fab que pueden generarse tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.

Selección de anticuerpos

En la producción de anticuerpos, la selección del anticuerpo deseado puede conseguirse por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA, inmunoensayos tipo "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (usando oro coloidal, marcadores enzimáticos o radioisotópicos, por ejemplo), transferencias Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc.

En una realización, la unión del anticuerpo se detecta detectando un marcador en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta detectando la unión de un anticuerpo secundario o reactivo al anticuerpo primario. En una realización adicional, el anticuerpo secundario está marcado. Se conocen muchos medios en la técnica para detectar la unión en un inmunoensayo y están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconozcan un epítipo específico de una secuencia de aminoácidos del virus PMC, se pueden ensayar hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento de la secuencia de aminoácidos del virus PMC que contiene dicho epítipo. Para la selección de un anticuerpo específico para una secuencia de aminoácidos del virus PMC de una especie particular de animal, se puede seleccionar basándose en la unión positiva con la secuencia de aminoácidos del virus PMC expresada por o aislada de células de esa especie de animal.

Marcaje de anticuerpos

Ventajosamente, el marcaje de los anticuerpos anti-inmunoglobulina se consigue mediante una enzima seleccionada de entre aquellas que son capaces de hidrolizar un sustrato, experimentando dicho sustrato una modificación de su radiación-absorción, al menos dentro de una banda predeterminada de longitudes de onda. La detección del sustrato, preferiblemente de forma comparativa con respecto a un control, entonces proporciona una medición de la probabilidad de exposición de un animal al virus, o de la presencia real de la enfermedad.

Por tanto, se proporcionan métodos preferidos para detecciones inmunoenzimáticas y también inmunofluorescentes, en particular de acuerdo con la técnica ELISA. Las valoraciones pueden ser determinaciones por inmunofluorescencia o determinaciones inmunoenzimáticas directas o indirectas. Pueden hacerse valoraciones cuantitativas de anticuerpos en los sueros estudiados.

Fragmentos que albergan epítipo

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden generarse utilizando fragmentos polipeptídicos (o moléculas, particularmente glucoproteínas que tienen el mismo esqueleto polipeptídico que los polipéptidos mencionados anteriormente en este documento) que albergan un epítipo característico de una proteína o glucoproteína del virus PMC. El polipéptido o molécula puede tener además extremos N-terminal y C-terminal, respectivamente libres o, independientemente uno del otro, unidos covalentemente a aminoácidos diferentes a los que están normalmente asociados con ellos en los polipéptidos o glucoproteínas más grandes del virus PMC, estando entonces estos últimos aminoácidos libres o perteneciendo a otra secuencia polipeptídica.

Conjugación para aumentar la inmunogenicidad

Las secuencias peptídicas de pequeño tamaño que albergan un epítipo o determinante inmunogénico (por ejemplo, aquellas que se generan fácilmente por síntesis química), pueden requerir acoplamiento o conjugación covalente con una molécula vehículo fisiológicamente aceptable y no tóxica para aumentar su carácter inmunogénico in vivo y por tanto potencian la producción de anticuerpos.

Particularmente, la invención se refiere a anticuerpos generados usando polipéptidos híbridos que contienen cualquiera de los polipéptidos que albergan epítipo que se han definido más específicamente en este documento anteriormente, recombinados con otros fragmentos polipeptídicos normalmente foráneos a las proteínas del virus PMC, que tienen tamaños suficientes para proporcionar inmunogenicidad aumentada contra el polipéptido que alberga epítipo. Los fragmentos polipeptídicos foráneos son preferiblemente inertes inmunogénicamente y/o no interfieren con las propiedades inmunogénicas del polipéptido que alberga epítipo.

Dichos polipéptidos híbridos, que pueden contener desde 5 hasta 150, incluso 250 aminoácidos, habitualmente consisten en los productos de expresión de un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido que alberga epítipo expresable bajo el control de un promotor o replicón adecuado en un hospedador adecuado.

Dichos polipéptidos que albergan epítipo, particularmente aquellos cuyos aminoácidos N-terminales y C-terminales están libres, también pueden generarse por síntesis química de acuerdo con técnicas bien conocidas en la química de proteínas.

Ejemplos de moléculas vehículo o soportes macromoleculares que pueden usarse para preparar los conjugados de acuerdo con la invención son proteínas naturales, tales como toxoide tetánico, ovoalbúmina, albúminas séricas, hemocianinas, etc. También pueden usarse vehículos macromoleculares sintéticos, por ejemplo polisinas o poli (D-L-alanina)-poli(L-lisina). Otros tipos de vehículos macromoleculares que pueden usarse, que generalmente tienen pesos moleculares superiores a 20.000, son conocidos en la bibliografía.

Los conjugados pueden sintetizarse por procesos conocidos tal como se describe por Frantz y Robertson [Infection and Immunity, 33, 193-198 (1981)] y por P.E. Kauffman [Applied and Environmental Microbiology, oct. 1981 Vol. 42, Nº 4, pág. 611-614]. Por ejemplo, pueden usarse los siguientes agentes de acoplamiento: aldehído glutárico, cloroformiato de etilo, carbodiimidas solubles en agua tales como (N-etil-N'-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida, HCl), diisocianatos, bis-diazobencidina, di- y triclora-s-triazinas, bromuros de cianógeno y benzaquinona, así como los agentes de acoplamiento mencionados en Scand. J. Immunol., 1978, vol. 8, pág. 7-23 (Avrameas, Ternynck, Guesdon).

Puede usarse cualquier proceso de acoplamiento para unir uno o varios grupos reactivos del péptido, por una parte, y uno o varios grupos reactivos del vehículo, por otra parte. El acoplamiento se consigue ventajosamente entre los grupos carboxilo y amina portados por el péptido y el vehículo en presencia de un agente de acoplamiento del tipo usado en síntesis de proteínas, por ejemplo, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida, N-hidroxibenzotriazol, etc. El acoplamiento entre grupos amina, respectivamente portados por el péptido y el vehículo también se puede hacer con glutaraldehído, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito por Boquet et al. (1982) Molec. Immunol., 19, 1441-1549, cuando el vehículo es hemocianina.

La inmunogenicidad de péptidos que albergan epítipo también se puede aumentar por oligomerización de los mismos, por ejemplo en presencia de glutaraldehído o cualquier otro agente de acoplamiento adecuado. En particular, la invención se refiere a los oligómeros inmunogénicos solubles en agua obtenidos de este modo, que comprende particularmente de 2 a 10 unidades monoméricas.

Vacunas

La invención también se refiere a composiciones de vacuna cuyo principio activo es un polipéptido o fragmento del mismo de la presente invención, es decir, los polipéptidos descritos anteriormente del virus PMC, polipéptidos de fusión u oligopéptidos, en asociación con un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable. La presente invención proporciona además polipéptidos inmunogénicos, y más particularmente polipéptidos de protección, para su uso en la preparación de composiciones de vacuna contra PMC o síndromes relacionados.

Por tanto, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende un polipéptido del virus PMC o fragmento del mismo.

Preferiblemente, el polipéptido es un polipéptido antigénico. Más preferiblemente, la vacuna comprende además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona una composición de vacuna que comprende un nucleótido del virus PMC o fragmento del mismo que codifica un polipéptido del virus PMC.

El término "vacuna", como se usa en este documento, pretende indicar cualquier composición de la invención que contenga péptido o polipéptido del virus PMC o secuencias de nucleótidos que codifiquen polipéptidos del virus PMC que tengan al menos un determinante antigénico que, cuando se administra a un animal, sea capaz de estimular una respuesta inmune contra el determinante antigénico. Se entenderá que el término vacuna no implica necesariamente que la composición proporcione una respuesta protectora completa. En su lugar será suficiente un efecto terapéutico.

La expresión "respuesta inmune" se refiere a cualquier proceso celular que se produce en el animal después de estimulación con un antígeno y está dirigida hacia la eliminación del antígeno del animal. La respuesta inmune está mediada normalmente por una o más poblaciones de células caracterizadas como de naturaleza linfocítica y/o fagocítica.

Una vacuna puede generar una respuesta inmune que bloquea la infectividad, ya sea parcial o completamente, de un agente infeccioso. La administración de la vacuna de la presente invención puede ser con fines profilácticos o terapéuticos. Cuando se proporciona profilácticamente, la vacuna se proporciona de forma anticipada a cualquier exposición al virus PMC o de forma anticipada a cualquier síntoma debido a infección por el virus PMC. La administración profiláctica del inmunógeno sirve para prevenir o atenuar cualquier infección posterior por el virus PMC en un mamífero o reducir la gravedad de la infección y/o los síntomas. Cuando se proporciona terapéuticamente, la vacuna se proporciona al aparecer (o poco después de ello) la infección o al aparecer cualquier síntoma de infección o enfermedad causada por el virus PMC. La administración terapéutica de la vacuna sirve para atenuar la infección o la enfermedad.

La respuesta inmune generada contra un péptido o polipéptido del virus PMC introducido estará dictaminada por la constitución de aminoácidos del péptido o polipéptido antigénico. Dichos determinantes pueden definir regiones antigénicas humores o mediadas por células. Sin limitarse a ningún modo de acción particular, se contempla que la respuesta inmune generada por el péptido o polipéptido del virus PMC incluirá preferiblemente respuestas inmunes tanto humores como mediadas por células. Cuando se efectúa una respuesta inmune mediada por células, conduce preferiblemente a una cascada de células T, y más específicamente mediante una cascada de células T citotóxicas.

La expresión "célula T citotóxica", como se usa en este documento, se refiere a cualquier linfocito T que expresa el marcador glucoproteico de superficie celular CD8+ que es capaz de abordar y lisar una célula diana que alberga un complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC Clase I) sobre su superficie celular y está infectada con un patógeno intracelular.

Preferiblemente, la composición de vacuna se desarrolla para generar anticuerpos contra las glucoproteínas de envuelta E0 y E2 y las proteínas no estructurales NS2 y NS3.

Las composiciones de vacuna de la presente invención se pueden usar para vacunar animales y seres humanos contra enfermedades infecciosas, preferiblemente contra PMC. El término "animal" incluye: mamíferos tales como animales de granja incluyendo ovejas, cabras, cerdos, vacas, caballos, llamas, animales domésticos tales como perros y gatos, y primates; aves, como pollos, gansos y patos; peces; y reptiles tales como cocodrilos y caimanes.

La composición de vacuna de acuerdo con la invención contiene preferiblemente una secuencia de nucleótidos como se ha descrito anteriormente, como tal o como una cepa de vacuna o en un vector u organismo hospedador, o un polipéptido como se ha descrito anteriormente, en una cantidad eficaz para producir protección contra una infección por pestivirus. La vacuna también puede ser una vacuna polivalente que comprende otros inmunógenos o nucleótidos que codifican éstos. Las vacunas pueden contener además vehículos convencionales, adyuvantes, solubilizantes, emulsionantes, conservantes, etc. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden prepararse por métodos convencionales.

Preferiblemente, el principio activo es un péptido que contiene menos de 250 unidades de aminoácido, preferiblemente menos de 150, en particular de 5 a 150 restos de aminoácido, deducibles del genoma completo del virus PMC.

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de polipéptido que alberga epítipo suficiente para inducir una respuesta inmunogénica en el sujeto al cual se administra, en una dosis única o como parte de una serie de dosis. Preferiblemente, la cantidad eficaz es suficiente para efectuar la profilaxis o el tratamiento, como se ha definido anteriormente. La cantidad exacta necesaria variará de acuerdo con la aplicación. Para aplicaciones de vacuna o para la generación de antisuero/anticuerpos policlonales, por ejemplo, la cantidad eficaz puede variar dependiendo del grupo taxonómico o especie del sujeto a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la edad y la salud general y estado físico del sujeto, la gravedad de la afección que se esté tratando, la capacidad del sistema inmune del sujeto para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la cepa de virus PMC infeccioso, el polipéptido particular seleccionado y su modo de administración, y otros factores relevantes. También se cree que las cantidades eficaces se encontrarán dentro de un intervalo relativamente grande, no crítico. Una cantidad eficaz apropiada puede determinarse fácilmente usando sólo experimentación

rutinaria.

A modo de ejemplo, las dosificaciones adecuadas de las composiciones de vacuna son aquellas que son eficaces para provocar anticuerpos in vivo, en el hospedador, particularmente un hospedador porcino. Las dosis adecuadas oscilan de 10 a 500 µg de polipéptido, proteína o glucoproteína, por ejemplo de 50 a 100 µg. Otros intervalos preferidos de proteínas para la profilaxis de PMC son 0,01 a 1000 µg/dosis, preferentemente de 0,1 a 100 µg/dosis. Pueden ser necesarias varias dosis por sujeto para conseguir una respuesta inmune suficiente y protección posterior contra PMC.

Las composiciones inmunogénicas se administran convencionalmente usando procedimientos convencionales, por ejemplo, administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracraneal, intracapsular, intramedular, intracisternal, intraperitoneal, bucal, rectal, vaginal, intranasal, oral o por en aerosol.

Preferiblemente, la composición inmunogénica se administra por vía parenteral, normalmente mediante inyección, por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular. Sin embargo, formulaciones adicionales adecuadas para otros métodos de administración incluyen formulaciones orales y supositorios o preparados para administración pulmonar, nasal u otras formas de administración. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis.

El modo de administración de las composiciones de vacuna inmunogénicas preparadas de acuerdo con la invención dependerá necesariamente de factores tales como la estabilidad de las composiciones inmunogénicas en condiciones fisiológicas, la intensidad de la respuesta inmune requerida etc.

Las composiciones de vacuna de la invención pueden co-administrarse con potenciadores adicionales de la respuesta inmune o modificadores de la respuesta biológica incluyendo, aunque sin limitación, las citoquinas IFN-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6, TNF, u otras citoquinas que afectan a las células inmunes. De acuerdo con este aspecto de la invención, el péptido o polipéptido del virus PMC se administra en terapia de combinación con una cantidad terapéuticamente activa de una o más de estas citoquinas. Además, pueden co-administrarse antibióticos convencionales con el péptido o polipéptido del virus PMC. Sin embargo, la elección de los antibióticos adecuados dependerá de la enfermedad en cuestión.

Administración parenteral

Los compuestos proporcionados en este documento pueden administrarse por cualquier técnica parenteral tal como inyecciones subcutáneas, intravenosas e intraperitoneales. Normalmente, dichas vacunas se preparan como soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar, o encapsularse la proteína en liposomas. Los ingredientes inmunogénicos activos se mezclan a menudo con excipientes y vehículos, que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos.

Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, y/o adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna.

Administración oral

Se contemplan para uso en este documento formas sólidas de dosificación oral, que se describen en líneas generales en Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. (1990 Mack Publishing Co. Easton PA 18042) en el Capítulo 89. Las formas sólidas de dosificación incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, trociscos o grageas, obleas o gránulos. Además, puede usarse encapsulación liposómica o proteínica para formular las presentes composiciones (como, por ejemplo, las microesferas proteínicas presentadas en la patente de Estados Unidos Nº 4.925.673). Puede usarse encapsulación liposómica y los liposomas pueden derivatizarse con diversos polímeros (por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.013.556). Se da una descripción de posibles formas sólidas de dosificación para el agente terapéutico por Marshall, en Modern Pharmaceutics, Capítulo 10, Banker y Rhodes ed., (1979). En general, la formulación incluirá un polipéptido o polinucleótido del virus PMC, e ingredientes inertes que permiten la protección contra el entorno del estómago, y la liberación del material biológicamente activo en el intestino.

También se contemplan específicamente formas orales de dosificación de polipéptidos o polinucleótidos del virus PMC. A este respecto los polipéptidos o polinucleótidos del virus PMC se pueden modificar químicamente para que la administración oral sea eficaz. Generalmente, la modificación química contemplada es la unión de al menos un resto a la propia molécula de proteína (o péptido), donde dicho resto permite (a) la inhibición de la proteólisis; y (b) la absorción en el torrente sanguíneo desde el estómago o el intestino. También se desea el aumento en la estabilidad global de la proteína y el aumento del tiempo en circulación en el cuerpo. Ejemplos de dichos restos incluyen: polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y poliprolina. Abuchowski et al., 1981, supra; Newmark et al., J. Appl. Biochem., 4: 185-189

(1982). Otros polímeros que podrían usarse son poli-1,3-dioxolano y poli-1,3,6-tioxocano. Se prefieren para uso farmacéutico, como se ha indicado anteriormente, restos de polietilenglicol.

Para los polipéptidos o polinucleótidos del virus PMC, la localización de la liberación puede ser el estómago, el intestino delgado (el duodeno, el yeyuno o el íleon) o el intestino grueso. Un especialista en la técnica tiene formulaciones disponibles que no se disuelven en el estómago, pero liberarán el material en el duodeno o en otro lugar en el intestino. Preferiblemente, la liberación evitará los efectos perjudiciales del entorno del estómago, mediante la protección del complejo o por liberación del material biológicamente activo más allá del entorno del estómago, tal como en el intestino.

Para asegurar la resistencia gástrica completa, es esencial un recubrimiento impermeable a al menos pH 5,0. Ejemplos de los ingredientes inertes más comunes que se usan como recubrimientos entéricos son acetato trimelitato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, acetato ftalato de polivinilo (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, acetato ftalato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S, y Shellac. Estos recubrimientos pueden usarse como películas mixtas.

También puede usarse un recubrimiento o mezcla de recubrimientos en comprimidos, que no están destinados para la protección contra el estómago. Esto puede incluir recubrimientos de azúcar, o recubrimientos que hacen que el comprimido sea más fácil de tragar. Las cápsulas pueden consistir en una cubierta dura (tal como gelatina) para la administración de agente terapéutico seco, es decir en polvo; para formas líquidas, puede usarse una cubierta de gelatina blanda. El material de cubierta de las obleas puede ser almidón espeso u otro papel comestible. Para píldoras, grageas, comprimidos moldeados o triturados de comprimidos, se pueden usar técnicas de amasado en húmedo.

El agente terapéutico se puede incluir en la formulación como multiparticulados finos en forma de gránulos o bolitas de tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm. La formulación del material para administración en cápsulas también podría ser como un polvo, tapones ligeramente comprimidos o incluso como comprimidos. El agente terapéutico podría prepararse por compresión. Pueden incluirse colorantes y agentes aromatizantes. Por ejemplo, pueden formularse (tal como mediante encapsulación en liposomas o microesferas) polipéptidos o polinucleótidos del virus PMC y después introducirse adicionalmente dentro de un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene colorantes y agentes aromatizantes.

Se puede diluir o aumentar el volumen del agente terapéutico con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir carbohidratos, especialmente manitol, alfa-lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. Ciertas sales inorgánicas también pueden usarse como cargas incluyendo trifosfato de calcio, carbonato de magnesio y cloruro de sodio. Algunos diluyentes disponibles en el mercado son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

Pueden incluirse disgregantes en la formulación del agente terapéutico en una forma de dosificación sólida. Los materiales usados como disgregantes incluyen, aunque sin limitación almidón, incluyendo el disgregante comercial basado en almidón, Explotab. Pueden usarse glicolato sódico de almidón, Amberlite, carboximetilcelulosa de sodio, ultramilopectina, alginato de sodio, gelatina, cáscara de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de los disgregantes son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Pueden usarse gomas en polvo como disgregantes y como aglutinantes y éstas pueden incluir gomas pulverizadas tales como agar, Karaya o tragacanto. El ácido algínico y su sal sódica también son útiles como disgregantes.

Pueden usarse aglutinantes para mantener el agente terapéutico junto para formar un comprimido duro, e incluyen materiales procedentes de productos naturales tales como goma arábiga, tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). Podría usarse polivinilpirrolidona (PVP) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en soluciones alcohólicas para granular el agente terapéutico.

Puede incluirse un agente antifricción en la formulación del agente terapéutico para evitar que se pegue durante el proceso de formulación. Pueden usarse lubricantes como una capa entre el agente terapéutico y la pared del troquel y éstos pueden incluir, aunque sin limitación: ácido esteárico incluyendo sus sales de magnesio y de calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. También pueden usarse lubricantes solubles tales como lauril sulfato de sodio, lauril sulfato de magnesio, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, y Carbowax 4000 y 6000.

Pueden añadirse emolientes que podrían mejorar las propiedades de flujo del complejo durante la formulación y para ayudar a la reordenación durante la compresión. Los emolientes pueden incluir almidón, talco, sílice pirogénica y silicoaluminato hidratado.

Para ayudar a la disolución del agente terapéutico en el entorno acuoso, puede añadirse un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como lauril sulfato de sodio, sulfosuccinato de dioctil sodio y sulfonato de dioctil sodio. Pueden usarse detergentes catiónicos y podrían incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. La lista de detergentes no iónicos potenciales que podrían incluirse

en la formulación como tensioactivos son laurmacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso de sacarosa, metil celulosa y carboximetil celulosa. Estos tensioactivos podrían estar presentes en la formulación del complejo en solitario o como una mezcla en diferentes proporciones.

5 Los aditivos que potencian potencialmente la absorción del complejo son, por ejemplo, los ácidos grasos, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico.

10 Puede ser deseable una formulación de liberación controlada. El complejo podría incorporarse en una matriz inerte que permita la liberación por mecanismos de difusión o lixiviación, es decir, gomas. También pueden incorporarse matrices de degeneración lenta en la formulación. Otra forma de una liberación controlada de este agente terapéutico es por un método basado en el sistema terapéutico Oros (Alza Corp.), es decir, el fármaco se encierra en una membrana semipermeable que permite que entre agua y empuje el fármaco a través de una única abertura pequeña debido a efectos osmóticos. Algunos recubrimientos entéricos también tienen un efecto de liberación retardada.

15 Pueden usarse otros recubrimientos para la formulación. Éstos incluyen diversos azúcares que podrían aplicarse en una bandeja de recubrimiento. El agente terapéutico podría también darse en un comprimido recubierto con película; los materiales usados en este caso se dividen en 2 grupos. El primero son los materiales no entéricos e incluyen metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilhidroxi-etil celulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil-metil celulosa, carboxi-metilcelulosa sódica, providona y los polietilenglicoles. El segundo grupo consiste en los materiales entéricos que son comúnmente ésteres de ácido ftálico.

20 Puede usarse una mezcla de materiales para proporcionar el recubrimiento con película óptimo. El recubrimiento con película puede realizarse en un aparato de recubrimiento de bandeja o en un lecho fluidizado o mediante recubrimiento por compresión.

Administración pulmonar

30 También se contempla en este documento la administración pulmonar de composición de vacuna. Los polipéptidos o polinucleótidos del virus PMC pueden suministrarse a los pulmones de un animal mientras inhala y cruza a través del revestimiento epitelial del pulmón hasta el torrente sanguíneo.

35 Se contemplan para uso en la práctica de esta invención son una amplia gama de dispositivos mecánicos diseñados para administración pulmonar de productos terapéuticos, incluyendo aunque sin limitación nebulizadores, inhaladores de dosis medida, e inhaladores de polvo, todos los cuales son familiares para los especialistas en la técnica.

40 Algunos ejemplos específicos de dispositivos disponibles en el mercado adecuados para la práctica de esta invención son el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; el nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; el inhalador de dosis medida Ventolin, fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, Carolina del Norte; y el inhalador de polvo Spinhaler, fabricado por Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

45 Todos estos dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para la dispensación del complejo. Normalmente, cada formulación es específica para el tipo de dispositivo empleado y puede implicar el uso de un material propulsor apropiado, además de los diluyentes habituales, adyuvantes y/o vehículos útiles en terapia. Además, se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión, u otros tipos de vehículos. También pueden prepararse proteínas modificadas químicamente en diferentes formulaciones dependiendo del tipo de modificación química o el tipo de dispositivo empleado.

50 Las formulaciones adecuadas para su uso con un nebulizador, de chorro o ultrasónico, comprenderán normalmente el complejo suspendido en agua a una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 mg de proteína biológicamente activa por ml de solución. La formulación también puede incluir un tampón y un azúcar simple (por ejemplo, para la estabilización y regulación de la presión osmótica de las proteínas). La formulación del nebulizador puede contener también un tensioactivo, para reducir o prevenir la agregación superficial inducida de la proteína causada por la atomización de la solución en la formación del aerosol.

55 Las formulaciones para su uso con un dispositivo inhalador de dosis medida comprenderán generalmente un polvo finamente dividido que contiene el complejo suspendido en un propulsor con la ayuda de un tensioactivo. El propulsor puede ser cualquier material convencional empleado para este propósito, tal como un clorofluorocarbono, un hidrocfluorocarbono, un hidrofluorocarbono, o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol, y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o combinaciones de los mismos. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soja. También pueden ser útil el ácido oleico como agente tensioactivo.

Las formulaciones a dispensar desde un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene el complejo y también puede incluir un agente de volumen, tal como lactosa, sorbitol, sacarosa, o manitol en cantidades que facilitan la dispersión del polvo desde el dispositivo, por ejemplo, del 50 al 90 % en peso de la formulación. La proteína (o derivado) debe prepararse de la forma más ventajosa en forma particulada con un tamaño de partícula promedio de menos de 10 micrómetros, más preferiblemente de 0,5 a 5 micrómetros, para la administración más eficaz al pulmón distal.

Administración nasal

También se contempla la administración nasal de la vacuna que comprende polipéptidos o polinucleótidos del virus PMC. La administración nasal permite el paso de la proteína al torrente sanguíneo directamente después de administrar el producto terapéutico a la nariz, sin la necesidad de deposición del producto en el pulmón. Las formulaciones para administración nasal incluyen aquellas con dextrano o ciclodextrano.

COMPOSICIONES TERAPÉUTICAS

Terapias basadas en polipéptidos

Los polipéptidos del virus PMC de acuerdo con la presente invención también pueden usarse como un agente profiláctico o terapéutico, que puede utilizarse con el fin de estimular respuestas humores y mediadas por células en animales, tales como cerdos, proporcionando de este modo protección contra infección con el virus PMC. La infección natural por el virus PMC induce títulos de anticuerpos en circulación contra el virus PMC. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos del virus PMC o partes de la misma, tienen el potencial de formar la base de un agente profiláctico o terapéutico administrado por vía sistémica o por vía oral para proporcionar protección contra PMC.

Por tanto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido del virus PMC que potencia la inmunocompetencia del individuo hospedador y provoca inmunidad específica contra agentes patógenos, preferentemente virus PMC.

Los regímenes terapéuticos y composiciones farmacéuticas de la invención se describen en otra parte en la memoria descriptiva. Se cree que estas composiciones tienen la capacidad de prevenir la aparición y progresión de enfermedades infecciosas tales como PMC.

Preferiblemente, las composiciones se combinan con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica (que puede ser para uso humano o animal). Las composiciones de la invención que comprenden polipéptidos del virus PMC también se pueden combinar con componentes adecuados para obtener composiciones de vacuna. Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona una secuencia de aminoácidos del virus PMC o fragmentos de la misma descrita en este documento en una cantidad terapéuticamente eficaz mezclada con un vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa en este documento para indicar una cantidad suficiente para reducir en al menos aproximadamente el 15 %, preferiblemente en al menos el 50 %, más preferiblemente en al menos el 90 %, y más preferiblemente prevenir un déficit clínicamente significativo en la actividad, función y respuesta del hospedador animal. Como alternativa, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para causar una mejora en un estado clínicamente significativo en el hospedador animal o para estimular en al menos aproximadamente un 15 %, preferiblemente en al menos un 50 %, más preferiblemente en al menos un 90 %, y más preferiblemente completamente, el sistema inmune de un animal, haciendo que genere una memoria inmunológica contra el determinante antigénico.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen una reacción alérgica o desfavorable de manera similar, tal como malestar gástrico y similares, cuando se administra a un animal. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se emplean preferiblemente el agua o soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos, particularmente para soluciones inyectables. Dichos vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990).

En una forma más específica de la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de secuencia de aminoácidos del virus PMC o un análogo, fragmento o producto derivado de la misma junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones incluyen diluyentes de diverso contenido de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica y aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, Tween 80, Polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, Thimersol, alcohol bencílico) y sustancias de aumento de volumen (por ejemplo,

lactosa, manitol). El material se puede incorporar en preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc., o en liposomas. También puede usarse ácido hialurónico. Dichas composiciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, tasa de liberación *in vivo*, y tasa de eliminación *in vivo* de las presentes proteínas y derivados. Véase, por ejemplo, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA, pág. 1435-1712. Las composiciones pueden prepararse en forma líquida, o pueden estar en polvo seco, tal como forma liofilizada.

La presente invención también proporciona el uso de secuencias de aminoácidos del virus PMC de acuerdo con la invención, para la fabricación de un medicamento para la modulación de una enfermedad asociada con el virus PMC.

Agentes terapéuticos basados en anticuerpos

La presente invención también proporciona composiciones terapéuticas que comprenden anticuerpos preparados contra los polipéptidos de la invención.

Los anticuerpos pueden usarse directamente como agentes antivirales. Para preparar anticuerpos, un animal hospedador se inmuniza usando una o más proteínas del virus PMC unidas a un vehículo como se ha descrito anteriormente para vacunas. El suero o plasma del hospedador se recoge después de un intervalo de tiempo apropiado para proporcionar una composición que comprende anticuerpos reactivos con la proteína o proteínas de la partícula de virus. La fracción de gamma globulina o los anticuerpos IgG pueden obtenerse, por ejemplo, mediante el uso de sulfato de amonio saturado o DEAE Sephadex, u otras técnicas conocidas para los especialistas en la técnica. Los anticuerpos están sustancialmente libres de muchos de los efectos secundarios adversos que pueden estar asociados con otros agentes anti-virales tales como fármacos.

Dichas composiciones terapéuticas de anticuerpos pueden contener adicionalmente uno o más de los agentes adicionales descritos anteriormente en relación a los agentes terapéuticos polipeptídicos.

La presente invención proporciona el uso de anticuerpos contra el virus PMC de acuerdo con la invención, para la fabricación de un medicamento para la modulación de una enfermedad asociada con el virus PMC.

Terapia basada en polinucleótido

La presente invención proporciona además composiciones terapéuticas que comprenden secuencias de ácido nucleico del virus PMC, así como secuencias polinucleotídicas antisentido y de ribozima que pueden hibridar con una secuencia polinucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos del virus PMC de acuerdo con la invención.

Las secuencias polinucleotídicas que codifican construcciones antisentido o ribozimas para su uso en métodos terapéuticos se administran deseablemente de forma directa como una construcción desnuda de ácido nucleico. La captación de construcciones desnudas de ácido nucleico se potencia por varias técnicas conocidas de transfección, por ejemplo, aquellas que incluyen el uso de agentes de transfección. Ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos (por ejemplo, fosfato de calcio y DEAE-dextrano) y lipofectantes (por ejemplo, lipofectam™ y transfectam™). Normalmente, las construcciones de ácido nucleico se mezclan con el agente de transfección para producir una composición.

Como alternativa, la construcción antisentido o ribozimas pueden combinarse con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica. Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato. La composición puede formularse para administración parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular, oral o transdérmica.

También se aborda por la presente invención el uso de secuencias polinucleotídicas de la invención, así como secuencias polinucleotídicas antisentido y de ribozima que pueden hibridar con una secuencia polinucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos del virus PMC de acuerdo con la invención, para la fabricación de un medicamento para la modulación de una enfermedad asociada con el virus PMC.

Administración de composiciones terapéuticas

Se apreciará que las composiciones terapéuticas proporcionadas de acuerdo con la invención se pueden administrar por cualquier medio conocido en la técnica. Las composiciones terapéuticas pueden ser para administración por inyección, o prepararse para administración oral, pulmonar, nasal u otras formas de administración. El modo de administración de las composiciones terapéuticas preparadas de acuerdo con la invención dependerá necesariamente de factores tales como la estabilidad del complejo en condiciones fisiológicas, la intensidad de la respuesta inmune requerida etc. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas para administración se administran por inyección, por vía oral, o por vía pulmonar, o nasal.

Preferiblemente, las composiciones terapéuticas se administran usando procedimientos convencionales, por ejemplo, administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracraneal, intracapsular, intramedular, intracisternal, intraperitoneal, bucal, rectal, vaginal, intranasal, oral o por aerosol.

La secuencia de aminoácidos del virus PMC o anticuerpos derivados de la misma, o secuencias polinucleotídicas se suministran más preferiblemente por vía intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea de administración. Como alternativa, la secuencia de aminoácidos del virus PMC o anticuerpos derivados de la misma, adecuadamente formulada, puede administrarse por administración nasal u oral. Las vías de administración descritas pretenden ser sólo una guía ya que un médico experto será capaz de determinar fácilmente la vía óptima de administración y cualquier dosificación para cualquier animal y condición particular.

La presente invención proporciona además un método de inducir una respuesta inmune protectora en un animal o ser humano contra un virus PMC que comprende las etapas de:

a) administrar a dicho animal o ser humano una cantidad eficaz de una composición de la invención.

La presente invención también proporciona métodos para potenciar la inmunocompetencia de un animal y la actividad de sus células efectoras inmunes contra un virus PMC que comprende la etapa de:

a) administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido o polipéptido del virus PMC.

Agente de administración de vector vivo

En otro aspecto de la invención, el virus PMC puede usarse como un vector vivo para la administración de antígenos recombinantes.

Por tanto, la presente invención proporciona un vector vivo que comprende el virus PMC y un polinucleótido heterólogo.

Preferiblemente, el polinucleótido heterólogo está unido de forma funcional a la secuencia polinucleotídica del virus PMC, de tal manera que la expresión de la secuencia polinucleotídica del virus PMC también conduzca a la expresión de la secuencia polinucleotídica heteróloga.

Además, el virus PMC puede tener una o más secciones de la secuencia polinucleotídica autóloga eliminadas. La eliminación de dichas secuencia puede volver preferiblemente al virus vivo atenuado en patogenicidad en un sujeto hospedador.

Por ejemplo, el virus PMC puede usarse como vector de administración para suministrar secuencias génicas que codifican una proteína de un segundo agente infeccioso en un sujeto a vacunar contra el segundo agente infeccioso. El segundo agente infeccioso puede ser un virus (tal como virus de la fiebre porcina clásica), una bacteria, un parásito etc.

Como alternativa, el virus PMC puede usarse como vector de administración para suministrar antígenos de alguna otra fuente. Por ejemplo, un vector de virus PMC puede usarse para suministrar proteínas antigénicas a un sujeto para estimular al sujeto para crear anticuerpos contra las proteínas antigénicas que pueden recogerse con fines tales como su uso en kits de diagnóstico, etc.

Ensayos de selección de fármacos

La presente invención también proporciona ensayos que son adecuados para identificar sustancias tales como fármacos, agentes o ligandos que se unen a secuencias de aminoácidos del virus PMC. Además, se proporcionan ensayos que son adecuados para identificar sustancias que interfieren con las secuencias de aminoácidos del virus PMC. También se proporcionan ensayos que ensayan los efectos de sustancias candidatas identificadas en ensayos *in vitro* preliminares sobre células intactas en ensayos de células completas.

Por tanto, la presente invención proporciona un método para seleccionar fármacos que comprende las etapas de:

a) poner en contacto un agente con una secuencia de aminoácidos del virus PMC o fragmento de la misma y

b) ensayar la presencia de un complejo entre el agente y la secuencia de aminoácidos del virus PMC o fragmento de la misma.

La presente invención también proporciona un método para seleccionar ligandos de las proteínas del virus PMC que comprende las etapas de:

a) poner en contacto un ligando con una secuencia de aminoácidos del virus PMC o fragmento de la misma y

b) ensayar la presencia de un complejo entre la secuencia de aminoácidos del virus PMC o fragmento y un ligando.

5

Un tipo de ensayo para identificar sustancias tales como fármacos, agentes o ligandos que se unen a secuencias de aminoácidos del virus PMC implica poner en contacto una secuencia de aminoácidos del virus PMC, que está inmovilizada en un soporte sólido, con una sustancia candidata no inmovilizada y determinar si las secuencias de aminoácidos del virus PMC y la sustancia candidata se unen entre sí y/o en qué grado. Como alternativa, la sustancia candidata puede estar inmovilizada y la secuencia de aminoácidos del virus PMC no inmovilizada.

10

En un método de ensayo preferido, la secuencia de aminoácidos del virus PMC está inmovilizada en perlas tales como perlas de agarosa. Normalmente esto se consigue expresando el componente como una proteína de fusión con GST en bacterias, levaduras o líneas celulares eucariotas superiores y purificando la proteína de fusión con GST a partir de extractos celulares en bruto usando perlas de glutatión-agarosa. La unión de la sustancia candidata a la secuencia de aminoácidos del virus PMC inmovilizada se determina después. Este tipo de ensayo es conocido en la técnica como un ensayo de despliegue de GST. Una vez más, la sustancia candidata puede estar inmovilizada y la secuencia de aminoácidos del virus PMC no inmovilizada.

15

También es posible realizar este tipo de ensayo usando diferentes sistemas de purificación por afinidad para inmovilizar uno de los componentes, por ejemplo Ni-NTA agarosa y componentes marcados con hexahistidina.

20

La unión de la secuencia de aminoácidos del virus PMC a la sustancia candidata puede determinarse por diversos métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el componente no inmovilizado se puede marcar (con, por ejemplo, un marcador radiactivo, una marca epitópica o un conjugado enzima-anticuerpo). Como alternativa, la unión se puede determinar por técnicas de detección inmunológica. Por ejemplo, la mezcla de reacción puede someterse a transferencia de Western y sondearse la transferencia con un anticuerpo que detecta el componente no inmovilizado. También se pueden usar técnicas de ELISA.

25

Las sustancias candidatas se añaden normalmente a una concentración final de 1 a 1000 nmol/ml, más preferiblemente de 1 a 100 nmol/ml. En el caso de anticuerpos, la concentración final usada es normalmente de 100 a 500 µg/ml, más preferiblemente de 200 a 300 µg/ml.

30

En un ensayo de unión competitiva, la secuencia de aminoácidos del virus PMC o fragmento normalmente está marcada. La secuencia de aminoácidos del virus PMC libre o fragmento se separa de la presente en un complejo proteína:proteína, y la cantidad de marcador libre (es decir, no complejo) es una medida de la unión del agente que se está ensayando a la secuencia de aminoácidos del virus PMC o su interferencia con la unión secuencia de aminoácidos del virus PMC:ligando, respectivamente.

35

Otra técnica para la selección de fármacos proporciona selección de alto rendimiento para compuestos que tienen afinidad de unión adecuada a la secuencia de aminoácidos del virus PMC y se describe en detalle en la solicitud PCT WO 84/03564, publicada el 13 de septiembre, 1984. En pocas palabras, se sintetizan grandes cantidades de diferentes compuestos de ensayo de péptido pequeño sobre un sustrato sólido, tal como alfileres de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de ensayo peptídicos se hacen reaccionar con la secuencia de aminoácidos del virus PMC y se lavan. Después se detecta la secuencia de aminoácidos del virus PMC unida por métodos bien conocidos en la técnica.

40

45

Esta invención también contempla el uso de ensayos de selección de fármacos competitivos en que anticuerpos capaces de unirse específicamente a la secuencia de aminoácidos del virus PMC compiten con un compuesto de ensayo por la unión a la secuencia de aminoácidos del virus PMC o fragmentos de la misma. De esta manera, los anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta uno o más determinantes antigénicos de la secuencia de aminoácidos del virus PMC.

50

KITS

55

En una realización adicional de esta invención, pueden prepararse kits para determinar la presencia o ausencia del virus PMC en animales sospechosos infectados y/o para medir cuantitativamente la infección por PMC. De acuerdo con las técnicas de ensayo descritas anteriormente, una clase de dichos kits contendrá al menos la secuencia de aminoácidos del virus PMC marcada o su compañero de unión, por ejemplo, un anticuerpo específico para la misma, e instrucciones dependiendo del método seleccionado, por ejemplo, "competitivo", tipo "sándwich", "DASP" y similares. Los kits también pueden contener reactivos periféricos tales como tampones, estabilizantes, etc.

60

Por tanto, los kits para inmunoensayo de suero de virus PMC pueden ser (a) un inmunoensayo tipo sándwich, que emplea un primer anticuerpo anti-virus PMC como anticuerpo de captura o detector y un segundo anticuerpo anti-virus PMC como anticuerpo detector o de captura para complementar el primer anticuerpo anti-virus PMC, o (b) un inmunoensayo de tipo competitivo, que emplea un anticuerpo anti-virus PMC con un antígeno del virus PMC

65

marcado o un antígeno del virus PMC unido a una fase sólida.

Por consiguiente, puede prepararse un kit de ensayo para la demostración de la presencia de virus PMC que comprende:

- (a) una cantidad predeterminada de al menos un componente inmunoquímicamente reactivo marcado obtenido mediante la unión directa o indirecta de la presente secuencia de aminoácidos del virus PMC o un compañero de unión específico para la misma, a un marcador detectable;
- (b) otros reactivos; y
- (c) instrucciones para usar dicho kit.

Más específicamente, el kit de ensayo de diagnóstico puede comprender:

- (a) una cantidad conocida de la secuencia de aminoácidos del virus PMC como se ha descrito anteriormente (o un compañero de unión) generalmente unida a una fase sólida para formar un inmunosorbente, o como alternativa, unida a un marcador adecuado, o existe una pluralidad de dichos productos finales, etc.;
- (b) si es necesario, otros reactivos; y
- (c) instrucciones para usar dicho kit de ensayo.

En una variación adicional, el kit de ensayo puede prepararse y usarse para los propósitos indicados anteriormente, que funciona de acuerdo con un protocolo predeterminado (por ejemplo, "competitivo", tipo "sándwich", de "doble anticuerpo", etc.), y comprende:

- (a) un componente marcado que se ha obtenido mediante el acoplamiento de la secuencia de aminoácidos del virus PMC con un marcador detectable;
- (b) uno o más reactivos inmunoquímicos adicionales de los cuales al menos un reactivo es un ligando o un ligando inmovilizado, estando dicho ligando seleccionado entre el grupo que consiste en:
 - (i) un ligando capaz de unirse con el componente marcado (a);
 - (ii) un ligando capaz de unirse con un compañero de unión del componente marcado (a);
 - (iii) un ligando capaz de unirse con al menos uno de los componentes a determinar; o
 - (iv) un ligando capaz de unirse con al menos uno de los compañeros de unión de al menos uno de los componentes a determinar; y
- (c) instrucciones para la realización de un protocolo para la detección y/o determinación de uno o más componentes de una reacción inmunoquímica entre la secuencia de aminoácidos del virus PMC y un compañero de unión específico para la misma.

Kits para detectar anticuerpos

La invención también proporciona kits de diagnóstico para la detección in vitro de anticuerpos contra el virus PMC, comprendiendo dichos kits cualquiera de los polipéptidos identificados en este documento y todos los reactivos biológicos y químicos, así como equipos, necesarios para realizar ensayos de diagnóstico.

Por consiguiente, la invención proporciona un kit para demostrar la presencia del virus PMC que comprende:

- (a) una cantidad predeterminada de al menos un anticuerpo marcado contra el virus PMC;
- (b) otros reactivos; y
- (c) instrucciones para usar dicho kit.

Preferiblemente, el polipéptido usado en el kit es un polipéptido antigénico o que alberga epítipo. Más preferiblemente, el polipéptido es un polipéptido que codifica, pero sin limitarse exclusivamente, la proteína E0, E2, NS2 o NS3.

Los kits preferidos comprenden todos los reactivos necesarios para realizar ensayos ELISA. Por tanto los kits preferidos incluirán, además de cualquiera de dichos polipéptidos, tampones adecuados e inmunoglobulinas anti-especie, estando las inmunoglobulinas anti-especie marcadas por una molécula inmunofluorescente o por una enzima. En el último ejemplo, los kits preferidos comprenden también un sustrato hidrolizable por la enzima y que

proporciona una señal, particularmente la absorción modificada de una radiación, al menos en una longitud de onda determinada, cuya señal es entonces indicativa de la presencia de anticuerpo en el fluido biológico a ensayar con dicho kit. Los kits también pueden incluir anticuerpos monoclonales o policlonales marcados que están dirigidos contra epítomos del virus PMC y estos anticuerpos marcados se pueden usar para bloquear o competir con anticuerpos de la muestra de ensayo. Si se bloquea la actividad del anticuerpo marcado, no habrá reacción o habrá una reacción reducida y se puede deducir que la muestra de ensayo contiene anticuerpos contra el virus PMC.

La presente invención también se refiere a un kit de diagnóstico para su uso en la detección de la presencia de anticuerpos contra el virus PMC, comprendiendo dicho kit al menos un péptido como se ha definido anteriormente, estando dicho péptido unido preferentemente a un soporte sólido.

El péptido, por ejemplo, se puede unir a diversos soportes sólidos diferentes para posibilitar la eliminación por lavado de los reactivos que no han reaccionado durante el transcurso de uso del kit. Éstos incluyen: micropocillos, tubos de ensayo recubiertos, partículas magnéticas recubiertas, varitas o bastoncillos y membranas (nitrocelulosa y otras).

Preferiblemente, los péptidos se unen a localizaciones específicas en el soporte sólido. Más preferiblemente, el soporte sólido es una tira de membrana y dichos péptidos están acoplados a la membrana en forma de líneas paralelas. Preferiblemente, el péptido usado en el kit es un péptido antigénico o que alberga epítomo.

Los antígenos del virus PMC de la presente invención normalmente se envasarán en la forma de un kit para su uso en estos inmunoensayos. El kit contendrá normalmente, en recipientes separados, el antígeno del virus PMC, las formulaciones de anticuerpo de control (positivo y/o negativo), anticuerpo marcado cuando el formato de ensayo requiere los mismos y reactivos de generación de señal (por ejemplo, sustrato de enzima) si el marcador no genera una señal directamente. El antígeno del virus PMC puede estar ya unido a un soporte sólido o se puede proporcionar por separado, con reactivos para unirlos al soporte sólido. Habitualmente se incluirán instrucciones (por ejemplo, por escrito, en cinta, CD-ROM, etc.) para realizar el ensayo en el kit.

Los inmunoensayos que utilizan antígenos del virus PMC son útiles en la selección de muestras (tales como sangre, suero, plasma, leche, fluidos corporales) para detectar si el sujeto del cual se deriva el tejido se ha expuesto a o se ha infectado con el virus PMC.

El soporte sólido usado en los kits de la presente invención puede incluir perlas poliméricas o de vidrio, nitrocelulosa, micropartículas, micropocillos de una placa de reacción, tubos de ensayo y perlas magnéticas.

El compuesto generador de señal puede incluir una enzima, un compuesto luminiscente, un fluoróforo tal como fluoresceína, una sonda fluorescente resuelta en el tiempo tal como un quelato de europio, un cromógeno, un elemento radiactivo, un compuesto quimioluminiscente tal como un éster de acridinio o partículas tales como oro coloidal, látex sencillo, o látex teñido. Ejemplos de enzimas incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano rusticano y beta-galactosidasa.

Kits para detectar polipéptidos y antígenos

La presente invención proporciona además un kit de diagnóstico para su uso en la detección de la presencia de proteínas del virus PMC.

Por consiguiente, la invención proporciona un kit para demostrar la presencia de virus PMC que comprende:

- (a) una cantidad predeterminada de al menos un polipéptido marcado derivado del virus PMC;
- (b) otros reactivos; y
- (c) instrucciones para usar dicho kit.

Preferiblemente, dicho anticuerpo está unido a un soporte sólido. El anticuerpo se puede unir a diversos soportes sólidos diferentes para posibilitar la eliminación por lavado de los reactivos que no han reaccionado durante el transcurso de uso del kit. Éstos incluyen: micropocillos, tubos de ensayo recubiertos, partículas magnéticas recubiertas, varitas o bastoncillos y membranas (nitrocelulosa y otras). Preferiblemente, los anticuerpos se unen a localizaciones específicas en un sustrato sólido.

El anticuerpo anti-virus PMC puede unirse al soporte sólido mediante diversos medios tales como adsorción pasiva, acoplamiento covalente, o usando una fase sólida pre-recubierta con un aglutinante secundario tal como proteína A, proteína G, un anticuerpo secundario específico para el anticuerpo primario, avidina, o un anticuerpo específico para un ligando particular (es decir, biotina, dinitrofenol, fluoresceína y otros). En el caso de avidina o cualquiera de los anticuerpos específicos de ligando, es necesario unir covalentemente el ligando al anticuerpo anti-virus PMC.

Por ejemplo, pueden usarse kits de ELISA para detectar la presencia de antígenos para el virus PMC en una muestra para demostrar que un animal está sufriendo PMC o es, por ejemplo, un portador no sintomático del virus.

Preferiblemente, la proteína a detectar usando la presente kit es un antígeno o una región que alberga epítipo de una proteína del virus PMC. Más preferiblemente, el anticuerpo se une a la proteína E0, E2, NS2 o NS3 de PMC.

5 Kits para detectar secuencias de ácido nucleico

La invención también proporciona kits para seleccionar animales sospechosos de estar infectados con virus PMC, o para confirmar que un animal está infectado con virus PMC, detectando secuencias de ácido nucleico del virus PMC.

10 Por consiguiente, la invención proporciona un kit para demostrar la presencia de virus PMC que comprende:

- (a) una cantidad predeterminada de al menos una secuencia de ácido nucleico marcada derivada del virus PMC;
- (b) otros reactivos; y
- (c) instrucciones para usar dicho kit.

Por ejemplo, la secuencia polinucleotídica puede ser uno o más cebadores, tales como los ejemplificados anteriormente, y las instrucciones de uso pueden ser instrucciones para realizar PCR sobre ARN o ADN extraído de una muestra tisular de un sujeto.

VECTORES, LAS CÉLULAS HOSPEDADORAS ETC.

Vectores

25 La presente invención también proporciona un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico del virus PMC o una parte de la misma como se ha definido anteriormente, unida de forma funcional a elementos de control de la transcripción y la traducción procariotas, eucariotas o virales.

30 La invención se refiere además a los hospedadores (células procariotas o eucariotas) que se transforman por los vectores y recombinantes mencionados anteriormente y que son capaces de expresar dichos fragmentos de ARN y/o ADN.

35 De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona métodos para preparar una secuencia de aminoácidos del virus PMC, que comprende las etapas de:

- (a) cultivar una célula hospedadora que contiene un vector como se ha descrito anteriormente en condiciones que proporcionan la expresión de la secuencia de aminoácidos del virus PMC; y
- (b) recuperar la secuencia del virus PMC expresada.

Este procedimiento también puede estar acompañado por la etapa de:

- (c) someter la secuencia de aminoácidos a purificación de proteínas.

45 La presente invención también se refiere a un método para la producción de un polipéptido de virus PMC recombinante, que comprende las etapas de:

- a) transformar un hospedador celular apropiado con un vector recombinante, en que una secuencia polinucleotídica del virus PMC o una parte de la misma se ha insertado bajo el control de elementos reguladores apropiados,
- b) cultivar dicho hospedador celular transformado en condiciones que posibiliten la expresión de dicho inserto, y,
- c) recoger dicho polipéptido.

Los vectores proporcionados por la presente invención normalmente comprenderán una secuencia polinucleotídica del virus PMC que codifica la secuencia deseada de aminoácidos y, preferiblemente, secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción unidas de forma funcional a la secuencia codificante de aminoácidos para permitir la expresión del polipéptido antigénico en la célula. Preferiblemente, el vector incluirá secuencias promotoras procariotas, eucariotas o virales apropiadas seguidas por las secuencias de nucleótidos del virus PMC como se ha definido anteriormente. El vector recombinante de la presente invención puede permitir preferentemente la expresión de uno cualquiera de los polipéptidos del virus PMC definidos anteriormente en un hospedador procariota o eucariota o en mamíferos vivos cuando se inyecta como ARN o ADN desnudo.

El vector puede comprender un plásmido, un cósmido, un fago, o un virus o un animal transgénico no humano. Puede ser particularmente útil para el desarrollo de vacunas el BCG o vectores adenovirales, así como virus

recombinantes de la viruela aviar. Ejemplos de dichos vectores de expresión se describen en Sambrook et al., (1989) supra o Ausubel et al., (2001) supra. Muchos vectores útiles son conocidos en la técnica y se pueden obtener de proveedores tales como Stratagene, New England Biolabs, Promega Biotech, y otros.

5 Puede ser deseable usar secuencias de control reguladoras que permiten la expresión inducible del polipéptido antigénico, por ejemplo, en respuesta a la administración de una molécula exógena. Como alternativa, puede suceder un control temporal de la expresión del polipéptido antigénico únicamente introduciendo el polinucleótido en la célula cuando se desee expresar el polipéptido.

10 También puede ser conveniente incluir una señal de secreción N-terminal de manera que el polipéptido antigénico se secrete en el medio celular.

Los vectores de expresión también pueden incluir, por ejemplo, un origen de replicación o secuencia de replicación autónoma y secuencias de control de la expresión, un promotor, un potenciador y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de corte y ajuste del ARN, sitios de poliadenilación, secuencias terminadoras de la transcripción, y la secuencias estabilizadoras del ARNm. También pueden incluirse señales de secreción cuando sea apropiado, procedentes de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, que permiten a la proteína cruzar y/o alojarse en las membranas celulares, y de este modo alcanzar su topología funcional, o secretarse desde la célula. Dichos vectores se pueden preparar mediante técnicas recombinantes convencionales bien conocidas en la técnica y analizadas, por ejemplo, en Sambrook et al., (1989) o Ausubel et al., (2001).

Se seleccionará un promotor apropiado y otras secuencias de vector necesarias de manera que sean funcionales en el hospedador, y pueden incluir, cuando sea apropiado, aquellas asociadas de forma natural con genes de lipoproteínas de la membrana externa.

Pueden usarse promotores tales como los promotores trp, lac y de fagos, promotores de ARNt y promotores de enzimas glicolíticas en hospedadores procariotas. Promotores de levadura útiles incluyen regiones promotoras para la metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas tales como enolasa o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa, y otros. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levaduras se describen adicionalmente en Hitzeman et al., documento EP 73.675A. Promotores de mamífero no nativos apropiados podrían incluir los promotores temprano y tardío de SV40 o promotores derivados del virus de la leucemia murina de Moloney, virus del sarcoma aviar, adenovirus II, virus del papiloma bovino o polioma. Además, la construcción se puede unir a un gen amplificable (por ejemplo, DHFR) de manera que puedan hacerse múltiples copias del gen.

Aunque dichos vectores de expresión pueden replicarse de forma autónoma, también pueden replicarse al insertarse en el genoma de la célula hospedadora, por métodos bien conocidos en la técnica.

40 Los vectores de expresión y clonación contendrán probablemente un marcador de selección, un gen que codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de una célula hospedadora transformada con el vector. La presencia de este gen asegura el crecimiento de sólo aquellas células hospedadoras que expresan los insertos. Los genes de selección típicos codifican proteínas que a) confieren resistencia a antibióticos u otras sustancias tóxicas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, etc.; b) complementan deficiencias auxotróficas, o c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para Bacilli. La elección del marcador de selección apropiado dependerá de la célula hospedadora, y los marcadores apropiados para los diferentes hospedadores son bien conocidos en la técnica.

Los vectores que contienen secuencias polinucleotídicas del virus PMC se pueden transcribir *in vitro* y el ARN resultante introducirse en la célula hospedadora mediante métodos bien conocidos, por ejemplo, mediante inyección, o los vectores pueden introducirse directamente en células hospedador mediante métodos bien conocidos en la técnica, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular, incluyendo electroporación; transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, u otras sustancias; bombardeo con microproyectiles; lipofección; infección (donde el vector es un agente infeccioso, tal como un genoma retroviral); y otros métodos. La introducción de secuencias polinucleotídicas del virus PMC en la célula hospedador puede conseguirse por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, entre otros, los descritos anteriormente.

En una realización preferida, el polinucleótido del virus PMC es parte de un vector viral, tal como un vector de baculovirus, o virus infeccioso, tal como un baculovirus. Esto proporciona un sistema conveniente ya que no sólo puede recombinar, pueden mantenerse reservas virales y almacenarse hasta que esté listo para su uso. De forma deseable, la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido o polipéptidos antigénicos se inserta en un baculovirus recombinante que se ha modificado genéticamente para producir péptido o polipéptidos antigénicos, por ejemplo, siguiendo los métodos de Smith et al (1983) Mol Cell Biol 12: 2156-2165. Varios vectores de transferencia viral permiten que se inserte más de una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido en el mismo vector de modo que puedan co-expresarse por el mismo virus recombinante.

Células hospedadoras

Para producir una célula capaz de expresar secuencias de aminoácidos del virus PMC, preferiblemente se incorporan secuencias polinucleotídicas de la invención en un vector recombinante, que se introduce después en una célula procariota o eucariota hospedadora.

La invención también proporciona células hospedadoras transformadas o transfectadas con una secuencia polinucleotídica del virus PMC. Las células hospedadoras preferidas incluyen levaduras, hongos filamentosos, células de plantas, insectos, anfibios, especies aviares, bacterias, células de mamífero, y células humanas en cultivo tisular. De forma ilustrativa, dichas células hospedadoras se seleccionan del grupo que consiste en *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, levadura, células CHO, R1.1, BW, LM, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, BMT10 y Sf9.

Pueden prepararse grandes cantidades de secuencia polinucleotídica del virus PMC de la invención expresando secuencias polinucleotídicas del virus PMC o partes de las mismas en vectores u otros vehículos de expresión en células hospedadoras procariotas o eucariotas compatibles. Los hospedadores procariotas más comúnmente usados son cepas de *Escherichia coli*, aunque otros procariotas, tales como *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas* también se pueden usar. Ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero comúnmente usadas son células VERO y HeLa, células de ovario de hámster chino (CHO), y líneas celulares WI38, BHK, y COS, aunque los especialistas en la técnica apreciarán que otras líneas celulares pueden ser apropiadas.

También se proporcionan células de mamífero que contienen secuencias polinucleotídicas del virus PMC modificadas *in vitro* para permitir una mayor expresión de la secuencia de aminoácidos del virus PMC por medio de un evento de recombinación homóloga que consiste en la inserción de una secuencia reguladora de la expresión en proximidad funcional a la secuencia codificante de la secuencia de aminoácidos del virus PMC.

La invención no se limita a la producción de un polipéptido antigénico a la vez en la célula hospedadora. Pueden introducirse múltiples polinucleótidos que codifican diferentes polipéptidos antigénicos de interés en la misma célula hospedadora. Los polinucleótidos pueden ser parte de la misma molécula de ácido nucleico o moléculas de ácido nucleico diferentes.

GENERAL

Los especialistas en la técnica apreciarán que la invención descrita en este documento es susceptible a variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Debe entenderse que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en la memoria descriptiva, individual o colectivamente y cualquiera y todas las combinaciones o cualesquiera dos o más de las etapas o características.

La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en este documento, que se entienden con fines de ejemplificación solamente. Productos, composiciones y métodos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del alcance de la invención descrita en este documento.

Como se usa en este documento, se aceptará que el término "derivado" y "derivado de" indica que un número entero específico puede obtenerse de una fuente particular, aunque no necesariamente de forma directa de esa fuente.

A lo largo de esta memoria descriptiva, salvo que el contexto indique lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

Otras definiciones de los términos seleccionados usados en este documento se pueden encontrar dentro de la descripción detallada de la invención y se aplican en todo. Salvo que se defina lo contrario, todos los demás términos científicos y técnicos usados en este documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un especialista en la técnica a la que pertenece la invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para describir más completamente la manera de usar la invención descrita anteriormente, así como para exponer los mejores modos contemplados para realizar diversos aspectos de la invención. Se entiende que estos métodos en ningún modo sirven para limitar el verdadero alcance de esta invención, sino más bien se presentan con fines ilustrativos.

Ejemplo 1

Preparación de la muestra

Las muestras tisulares se extrajeron y se prepararon usando un método cuya base principal se deriva de Allander et al. (2001) "A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species." Proc Natl Acad Sci USA. 98 (20): 11609-14, con algunas modificaciones para mejorar la eficacia de Baugh et al. (2001) "Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription." Nucleic Acids Res. 29 (5): E29. Sin embargo, los métodos se modificaron para mejorar la eficacia.

1. Preparación de muestras de suero:

- a) Obtener al menos 240 µl del sobrenadante de un homogeneizado tisular o suero y dividir en lotes 2x 120 µl
- b) A cada 120 µl de muestra añadir 240 µl de PBS o H₂O (o tomar 50 µl de suero + 100 µl de PBS)
- c) Filtrar la muestra diluida a través de dos filtros de 0,2 µm diferentes por centrifugación a 2000 x g (lavar la parte superior del filtro y mantenerla a -20 °C)
- d) Añadir 25 µl de DNasa I (250 U) a cada tubo de muestra filtrada e incubar a 37 °C durante 2 horas
- e) Añadir 1 µl de cóctel de RNasa (500 U de RNasa A, 20000 U de RNasa T1) a cada tubo e incubar a TA durante 1 h.
- f) Tomar 1 tubo de muestra tratada (360 µl) para la extracción de ARN y un tubo para la extracción de ADN (añadir 500 µl de DNAeasy AL + 50 µl de proteinasa K, etc. y eluir en 50 µl de agua).

2. Extracción de ARN:

- a) Dividir la muestra en lotes de 90 µl y añadir 600 µl de RLT, es decir, 4 x 690 µl
- b) Homogeneizar pasando a través de una jeringa 21 G al menos 5 veces
- c) Añadir 690 µl de etanol al 70 % a cada tubo de muestra y mezclar por pipeteo
- d) Aplicar 700 µl de la muestra a la columna a la vez y centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm. Colocar los desechos de flujo en un recipiente de 5 ml y mantener a -80 °C.
- e) Añadir 700 µl de tampón RW1 a la columna y centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm. Desechar el material de flujo y el tubo de recogida.
- f) Transferir la columna a un nuevo tubo y añadir 500 µl de RPE, centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm, deseche el material de flujo
- g) Repetir la etapa (f) usando el mismo tubo, pero centrifugar durante 2 minutos a 10.000 rpm.
- h) Transferir la columna a un nuevo tubo y centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm.
- i) Eluir el ARN en 20 µl de agua libre de RNasa, dejar que reposar el agua en la columna durante 1 minuto antes de centrifugar. Reutilizar el producto eluido y centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm para recoger cualquier ARN sobrante en la columna.
- j) Almacenar a -80 °C hasta que sea necesario.

3. Extracción de ADN:

- a) A 360 µl de muestra añadir 36 µl de proteinasa K y 360 µl de tampón AL, mezclar por vórtice, incubar a 70 °C durante 10 minutos.
- b) Añadir 360 µl de etanol al 100 %, mezclar por vórtice
- c) Pipetear la mezcla de la etapa (b) en la columna DNAeasy y centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto. Colocar el flujo en un tubo y almacenar a -80 °C.
- d) Colocar la columna en un nuevo tubo y añadir 500 µl de AW1, agitar a 8.000 rpm durante 1 minuto. Desechar el flujo y el tubo.

e) Colocar la columna en un nuevo tubo y añadir 500 µl de AW2 y centrifugar a 13.000 durante 3 minutos. Desechar el flujo y centrifugar durante 1 minuto y desechar el flujo y el tubo.

f) Colocar la columna en un nuevo tubo, añadir 50 µl de agua y dejar reposar durante 1 minuto. Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto y recoger el producto eluido. Volver a aplicar los 50 µl de producto eluido y centrifugar de nuevo.

g) Almacenar el ADN a -80 °C hasta que sea necesario.

Amplificación con cebador único independiente de secuencia (SISPA) para virus de ARN bicatenario

El método SISPA empleado se desarrolló a partir del de Baugh et al. y Allander et al., para maximizar el rendimiento y la longitud del producto minimizando al mismo tiempo las reacciones secundarias independientes de molde. Sin embargo, el presente método se aplica a ARN viral de bajo rendimiento, no se ha añadido el ARNm total y una etapa de fusión.

4. Síntesis de ADNc de primera hebra

a) Mezclar lo siguiente:

1 µl de hexámeros aleatorios (10 pmol)
8 µl - 9 µl de ARN (en H₂O)

b) Mezclar, calentar a 90 °C 3 minutos, centrifugar y poner en hielo

c) En hielo añadir:

tampón de 1ª hebra	4 µl
DTT 0,1 M	2 µl
dNTP 5 mM	2 µl
SSIII (400 U)	1 µl
T4gene32	1 µl

Tampón de 1ª hebra: Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM

d) Mezclar, centrifugar y calentar a 50 °C durante 30 minutos

e) Añadir otro 1 µl de SSIII y dejar durante otros 30 minutos a 50 °C

f) Inactivar por calor a 70 °C durante 10 minutos y después colocar en hielo

5. Síntesis de ADNc de segunda hebra

a) En la mezcla de hielo:

H ₂ O	87 µl
tampón de 2ª hebra 5X	30 µl
dNTP 5 mM	6 µl
ADN polimerasa (40U)	4 µl
ADN ligasa de E. coli (10 U)	1 µl
RNasa H (2 U)	2 µl
mezcla de ADN de 1ª hebra (etapa 1)	20 µl

Tampón de 2ª hebra: Tris-HCl 20 mM (pH 6,9), MgCl₂ 4,6 mM, KCl 90 mM, b-NAD⁺ 0,15 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM

b) Mezclar, centrifugar e incubar a 16 °C durante 2 horas. *NOTA: se puede comenzar SISPA de ADN mientras esta incubación está en marcha.*

c) Añadir 10 µl (10 U) de ADN polimerasa T4 (1 u/µl) e incubar a 16 °C durante 15 min.

d) Calentar la síntesis de 2ª hebra a 72 °C 10 minutos, dejar enfriar a 37 °C.

6. Limpieza de ADN

a) Bloquear la fase centrifugado a 13.000 rpm durante 30 segundos a 4 °C

b) Añadir 150 µl de la reacción de la etapa 2

c) Añadir un volumen igual de fenol/cloroformo 160 µl

d) Agitar ligeramente

e) Centrifugar a 13000 rpm 5 minutos, 4 °C

f) Transferir la fase superior a un nuevo tubo de ~160 ul

g) Precipitar el ADN, añadir 2,5 V de etanol al 100 % es decir 375 ul y 1 ul de glucógeno (20 mg/ml). Dejar a -20 °C durante 2 horas o O/N

h) Centrifugar a 13000 rpm 20 minutos, retirar S/N del sedimento

i) Lavar el sedimento 1 x etanol al 70 % 13000 rpm 5 min a 4 °C

j) Recoger el sedimento en 35 ul de agua *NOTA: se puede parar aquí y congelar a -80 °C hasta que la muestra de SISPA de ADN también esté lista.*

SISPA de ADN

7. Síntesis de segundo hebra de ADN

a) Mezclar lo siguiente:

ADN	50 ul
10 pmoles de hexámeros aleatorios (10 pmol/ul)	1 ul
5 U de fragmento 3'-5' Exo Klenow de ADN polimerasa	1 ul
Tampón (suministrado con fragmento Klenow de ADN polimerasa)	1 ul
dNTP 5 mM	1 ul
T4gene32	1 ul

b) Dejar a 37 °C durante 1 hora

8. Limpieza de ADN

a) Bloquear la fase de centrifugación a 13.000 rpm durante 30 segundos a 4 °C

b) Añadir 60 ul de la reacción de la etapa 1

c) Añadir un volumen igual de fenol/cloroformo 60 ul

d) Agitar ligeramente

e) Centrifugar a 13.000 rpm 5 minutos, 4 °C

f) Transferir la fase superior a un nuevo tubo de ~60 ul

g) Precipitar el ADN, añadir 2,5V de etanol al 100 % es decir 150 ul y 1 ul de glucógeno (20 mg/ml). Dejar a -20 °C durante 2 horas o durante una noche

h) Centrifugar a 13.000 rpm durante 20 minutos, retirar el sobrenadante del sedimento

i) Lavar el sedimento 1 x etanol al 70 % 13.000 rpm 5 min a 4 °C

j) Recoger el sedimento en 44 ul de agua *NOTA: se puede parar aquí y congelar a -80 °C hasta que la muestra de SISPA de ARN también esté lista.*

Generación de secuencias de ácido nucleico recombinantes

9. Digestión de restricción

a) Añadir 10 U de Csp 6.1 (es decir, 1 ul de solución madre de 10 U/ul) a 35 ul de muestra, añadir 4 ul de tampón B y 5 ul de Csp6I

b) Incubar a 37 °C durante 2 horas

c) Inactivar a 65 °C durante 20 minutos

10. ADN digerido con desfosforilato

a) A la digestión de restricción inactivada (50 ul) añadir:

6 ul de tampón de desfosforilación CIP 10X
0,3 ul de CIP 18U / ul
3,7 ul de agua

5

Tampón de desfosforilasa CIP: Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,1 mM, pH 8,5

b) Incubar a 37 °C durante 30 minutos

10

c) Añadir otros 0,3 ul de CIP 18U/ul e incubar a 37 °C durante 30 minutos

11. Limpieza de ADN

15

a) Bloquear la fase de centrifugación a 13.000 rpm durante 30 segundos a 4 °C

b) Añadir 60 ul de ADN desfosforilado

c) Añadir un volumen igual (60 ul) de fenol/cloroformo

20

d) Agitar ligeramente

e) Centrifugar a 13.000 rpm 5 minutos, 4 °C

25

f) Transferir la fase superior a un nuevo tubo de ~50 ul

g) Precipitar el ADN, añadir 2,5 volúmenes de etanol al 100 % (150 ul) y 1 ul de glucógeno (20 mg/ml). Dejar a -20 °C durante 2 horas o durante una noche

30

h) Centrifugar a 13.000 rpm 20 minutos, retirar el sobrenadante del sedimento

i) Lavar el sedimento 1 x con etanol al 70 %, centrifugar a 13.000 rpm 5 min a 4 °C

j) Desechar durante 2-3 minutos o secar al aire durante 15 minutos

35

k) Reconstituir en 5,8 ul de H₂O.

12. Ligamiento de adaptador

40

a) Mezclar:

ADN ligasa T4 (5 U/ul)	1,2 ul
Tampón de ligasa 5x	2 ul
50 pmol de adaptador (extremos fosforilados)	1 ul
ADN de la Etapa 3	5,8 ul

45

Tampón de ligasa 5X: Tris-HCl 330 mM, MgCl₂ 25 mM, DTT 25 mM, ATP 5 mM, pH 7,5

b) Incubar a 4 °C durante 1 hora y 16 °C durante una noche

13. Reacción de PCR (Figura 2 resultados)

50

a) Establecer la siguiente mezcla:

ADN ligado (etapa 4)	2 ul
50 pmol de NBam24	1 ul
dNTP 5 mM	2 ul
MgCl ₂ 2 mM	2 ul
tampón de PCR 10X	5 ul
H ₂ O	38 ul

60

Tampón de PCR 10X: Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM (pH 8,3)

b) Calentar a 72 °C durante 3 minutos

c) Añadir 0,5 ul de ADN polimerasa Taq (5 U/ul)

d) Ejecutar ciclo:

65

72 °C durante 5 minutos

(94 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 3 minutos) 40 X mantenimiento a 4 °C

e) Ejecutar 10 µl y 40 µl de producto en gel EtBr al 1,0 % (dejar un pocillo entre ellos para hacer la purificación más fácil)

14. Clonación del producto de PCR

a) Secciones cortadas de la región esparcida de gel como un lote de las bandas dominantes puede ser una secuencia contaminante de los productos usados en los métodos, en lugar de la muestra real. Las bandas también pueden ser difíciles de ver si se encuentran en las regiones esparcidas.

b) Limpiar el ADN de la agarosa usando el Kit de extracción de gel MiniElute (Qiagen)

1. Escindir el fragmento de ADN del gel de agarosa con un escalpelo afilado limpio.

2. Pesar el trozo de gel en un tubo incoloro. Añadir 3 volúmenes de tampón QG a 1 volumen de gel (100 mg ~ 100 µl).

3. Incubar a 50 °C durante 10 minutos (o hasta que el corte de gel se haya disuelto completamente). Para ayudar a disolver el gel, mezclar mediante vórtice del tubo cada 2-3 minutos durante la incubación.

4. Después de que el corte de gel se haya disuelto completamente, comprobar que el color de la mezcla es amarillo (similar a tampón QG sin agarosa disuelta). Nota: Si el color de la mezcla es naranja o violeta, añadir 10 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5,0, y mezclar. El color de la mezcla se volverá amarillo.

5. Añadir 1 volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar invirtiendo el tubo varias veces.

6. Colocar una columna MinElute en un tubo de 2 ml de recogida proporcionado en una gradilla adecuada.

7. Para unir el ADN, aplicar la muestra a la columna MinElute y centrifugar durante 1 minuto.

8. Desechar el flujo y colocar la columna MinElute de vuelta en el mismo tubo de recogida.

9. Añadir 500 µl de tampón QG a la columna de centrifugación y centrifugar durante 1 min.

10. Desechar el flujo y colocar la columna MinElute de vuelta en el mismo tubo de recogida.

11. Para lavar, añadir 750 µl de tampón PE a la columna MinElute y centrifugar durante 1 min.

12. Desechar el flujo y centrifugar la columna MinElute durante 1 min adicional a $\geq 10.000 \times g$ (~13.000 rpm).

13. Colocar la columna MinElute en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpio.

14. Para eluir el ADN, añadir 10 µl de tampón EB (Tris.Cl 10 mM, pH 8,5) o H₂O al centro de la membrana, dejar reposar la columna durante 1 min., y centrifugar durante 1 min.

c) Para ligamientos y clonación usarse el kit Invitrogen TA Cloning (R) Versión V 7. Establecer la reacción de ligamiento de 10 µl de la siguiente manera:

Producto de PCR fresco	6 µl
Tampón de ligamiento 10X	1 µl
Vector PCR®2.1 (25 ng/µl)	2 µl
ADN ligasa T4 (4,0 unidades Weiss)	1 µl

Incubar la reacción de ligamiento a 14 °C durante una noche, o a -20 °C hasta estar listos para la transformación.

d) Transformar células competentes One Shot®.

1. Centrifugar viales que contienen las reacciones de ligamiento brevemente y colocarlos en hielo.

2. Descongelar en hielo un vial de 50 µl de células competentes One Shot® congeladas (suficiente para 2 ligamientos).

3. Pipetear 2 µl de cada reacción de ligamiento en 25 µl de células competentes y mezclar agitando suavemente con la punta de la pipeta.

4. Incubar los viales en hielo durante 30 minutos. Almacenar las mezclas de ligamiento restantes a -20 °C.

5. Aplicar choque térmico de las células durante 30 segundos a 42 °C sin agitación. Transferir inmediatamente los viales a hielo.

5 6. Añadir 125 µl de medio SOC a temperatura ambiente a cada vial.

7. Agitar los viales horizontalmente a 37 °C durante 1 hora a 225 rpm en una incubadora con agitación.

10 8. Extender 50 µl a 100 µl de cada vial de transformación en placas de agar LB que contienen ~80 mg/ml de X-Gal y 100 µg/ml de ampicilina.

9. Incubar las placas durante una noche a 37 °C. Colocar las placas a 4 °C durante 2-3 horas para permitir el desarrollo del color apropiado.

15. Selección de colonias para insertos y secuenciación (resultados Figura 3)

a) Usar HotStarTaqMaster Mix (50 ul/pocillo de placa):

20	1 X	110X (suficiente para una placa)
	25 ul HotStarTaqMaster Mix (vórtice)	2750 ul
	12,5 ul M13-20f (50 pmol)	1375 ul
	12,5 ul M13-20f (50 pmol)	1375 ul
	añadir 50 ul por pocillo de la placa	

25 Para hacer las soluciones madre M13-20f (50 pmol) y M13R (50 pmol): mezclar 0,5 ul de cebador 100 uM con 12 ul de agua es decir 500 ul de cebador de reserva 100 uM + 1200 ul de agua (del HotStarTaq Kit).

b) Colocar papel de aluminio estéril sobre la placa que contiene la HotStar TaqMaster Mix. Punzar a través de la lámina para hacer un agujero, y después punzar apuñalar una colonia bacteriana en cada pocillo de la placa.

c) Retirar el papel de aluminio y añadir capuchos de cinta para sellar la placa.

30 d) Ejecutar el protocolo de PCR:

95 °C durante 5min

(94 °C durante 30 s, 50 °C durante 30 s, 72 °C durante 1 minuto) X30 72 °C durante 1 min

35 4 °C mantenimiento.

e) Ejecutar 5-10ul de PCR en gel

f) Usa Qiagen Mini, eluir para limpiar el producto de la PCR restante para secuenciar.

40

Ejemplo 2

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para detectar anticuerpos contra el virus PMC

45 1. Clonar y expresar la proteína del virus PMC de interés (por ejemplo, E2, NS3) en baculovirus y purificar la proteína expresada. Esta proteína purificada se puede usar como antígeno para detectar anticuerpos específicos para las proteínas del virus PMC de interés.

50 2. Recubrir con "medio de unión" microplacas de 96 pocillos (50 µl por pocillo) con antígeno diluido en tampón carbonato (tampón carbonato 0,05 M 1x (pH 9,6): Na₂CO₃ (1,59 g); NaHCO₃ (2,93 g) de agua hasta 1 l). Mantener durante una noche a temperatura ambiente (18-25 °C).

55 3. Diluir las muestras y controles (negativo, alto y bajo positivos) 1/100 en diluyente de muestra (solución salina tamponada con fosfato (pH 7,3) que contiene leche desnatada en polvo al 1 %y Tween 20 al 0,05 %).

4. Lavar las placas 5 veces con PBS-Tween y sacar para secar.

5. Transferir las muestras diluidas y los controles a la placa de ELISA por duplicado: 50 ul a cada pocillo.

60 6. Incubar a 37 °C durante 1 hora en un recipiente humidificado.

7. Lavar las placas 5 veces con PBS-Tween, rotar y lavar 5 veces más, después sacar para secar.

65 8. Diluir el conjugado (IgG antiporcina, conjugada con peroxidasa de rábano rusticano) en diluyente de muestra y añadir 50 ul a cada pocillo.

9. Incubar a 37 °C durante 1 hora en un recipiente humidificado.

10. Lavar las placas 10 veces con PBS-Tween, y luego 5 veces con agua purificada.

5 11. Revelar añadiendo 100 ul de sustrato TMB a cada pocillo. Incubar a 37 °C en la oscuridad durante aproximadamente 10 min hasta que conseguir la DO diana para los controles. Puede usarse un sustrato TMB disponible en el mercado (por ejemplo, Boehringer Mannheim Corp., Pierce Chemical Co., y Kirkegaard & Perry Laboratories).

10 12. Detener añadiendo 100 ul de ácido sulfúrico 1 M.

13. Leer los valores de DO a 450 nm.

14. Calcular los resultados.

15

Ejemplo 3

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para detectar antígenos de virus PMC

20 Debe observarse que las soluciones de trabajo del reactivo detector y los reactivos de conjugado enzimático deben prepararse en aproximadamente 1 hora antes de su uso y después almacenarse a 4 °C.

▪ Materiales

25 Tampón de lavado ELISA - 10X concentrado: Tris 1 M; HCl (6,25 Normal) para el ajuste del pH; timerosal al 0,01 %; y Tween 20 al 5 %.

30 Reactivo detector - 10X concentrado: etilenglicol al 25 %, timerosal al 0,01 %, anticuerpo de cabra anti-virus PMC biotinilado aproximadamente al 5 %, y colorante alimenticio amarillo al 0,06 % en PBS (pH 7,4). El reactivo detector de trabajo se prepara mezclando 1 parte del reactivo detector concentrado 10x, 1 parte de reactivo NSB concentrado 10X, y 8 partes de tampón de diluyente de reactivo. Este agente de trabajo debe prepararse en aproximadamente 1 hora antes de su uso.

35 Reactivo NSB - 10X concentrado: etilenglicol al 25 %, timerosal al 0,01 %, IgG de ratón al 0,2 %, colorante alimenticio rojo al 0,06 % en PBS (pH 7,4).

Tampón de diluyente de reactivo: albúmina de suero bovino al 2,5 %, timerosal al 0,01 %, y gammaglobulina bovina al 1,0 % en PBS (pH 7,4).

40 Reactivo de conjugado enzimático - 10X concentrado: etilenglicol al 25 %, timerosal al 0,01 %, complejo de estreptavidina-peroxidasa de rábano biotinilada (dilución aproximadamente de 1 a 700), albúmina de conejo al 0,1 %, y gammaglobulina de conejo al 0,02 % en PBS (pH 7,4). El reactivo de conjugado enzimático de trabajo debe prepararse mezclando 1 parte de reactivo de conjugado enzimático concentrado 10X, 1 parte de reactivo NSB concentrado 10X, y 8 partes de tampón de diluyente de reactivo. Este reactivo de trabajo debe prepararse en aproximadamente 1 hora antes de su uso.

45

Control negativo: Igepal al 1 %, y timerosal al 0,01 % en PBS (pH 7,4).

Control positivo: Igepal al 1 %, timerosal al 0,01 %, albúmina de suero bovino al 1 %, cultivo de virus PMC (dilución aproximadamente 1:20) y fluoruro de fenil metil sulfonilo 50 µM en PBS (pH 7,4).

50

▪ Método

55 1. Preparar las muestras por métodos convencionales. Para muestras que contienen células (tejidos, glóbulos blancos) homogeneizar el tejido y añadir tampón de lisis de muestra (NP40 al 1 %). Dejar al menos 1 hora para la extracción de antígeno y mezclar continuamente.

2. Aclarar las muestras por centrifugación durante 15 minutos a aproximadamente 2000g.

60 3. Recubrir microplacas de 96 pocillos con antisuero policlonal purificado contra antígenos del virus PMC (100 ul/pocillo). Como alternativa, puede usarse una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-virus PMC. Cada placa de 96 pocillos se recubre durante una noche a temperatura ambiente con 0,1 ml por pocillo de una solución que contiene anticuerpo purificado a 5 µg/ml y albúmina de suero bovino a 10 µg/ml en tampón carbonato (pH 9,6). Después del recubrimiento, cada placa se lava tres veces con tampón de lavado ELISA y se deja secar durante una noche a 4 °C. Se usa una bolsa de aluminio para envolver cada placa después del secado, y se incluye un desecante dentro de cada bolsa para eliminar la humedad.

65

4. Lavar las placas ELISA 3 veces pipeteando 0,2 ml de tampón de lavado ELISA en cada pocillo y sacar o pipetear para secar antes de la adición de la muestra.

5. Bloquear las placas de ELISA con solución de bloqueo 1 (200 ul/pocillo) durante 30 min a 37 °C en un recipiente humidificado.

6. Transferir 100 ul de cada muestra (incluyendo los controles) a la placa de ELISA.

7. Incubar las placas durante 60 min a 37 °C en un recipiente humidificado.

8. Lavar las placas de ELISA 5 veces con solución de lavado ELISA.

9. Bloquear de placas de ELISA con solución de bloqueo 2 (150 ul) durante 30 min a 37 °C en un recipiente humidificado.

10 Lavar las placas de ELISA 5 veces.

11. Añadir reactivo detector que contiene anticuerpo monoclonal anti-virus PMC biotinilado (100 ul) a todos los pocillos.

12. Incubar las placas durante 60 min a 37 °C en un recipiente humidificado.

13. Lavar las placas 5 veces.

14. Añadir reactivo de conjugado enzimático que contiene el complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano biotinilada y añadir 100 ul a todos los pocillos.

15. Incubar las placas durante 30 min a 37 °C en un recipiente humidificado.

16. Lavar las placas 10 veces.

17. Preparar y añadir 100 ul de solución de sustrato TMB a todos los pocillos. Puede usarse un sustrato TMB disponible en el mercado (por ejemplo, Boehringer Mannheim Corp, Pierce Chemical Co, y Kirkegaard & Perry Laboratories).

18. Incubar las placas durante aproximadamente 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad.

19. Parar la reacción con ácido sulfúrico 1 M (100 ul por pocillo).

20. Leer las DO en lector de placas ELISA a 450 nm.

21. Calcular los resultados.

Ejemplo 4

Detección de ARN del virus PMC por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcriptasa inversa (RT)

a) Extraer el ARN de la muestra de ensayo como se ha descrito en el Ejemplo 1. Incluir en todas las etapas de las reacciones controles positivos y negativos conocidos y un "blanco".

b) Transcribir de forma inversa (RT) el ARN del siguiente modo:

1. Mezclar lo siguiente:

hexámeros aleatorios (50 pmol)	1 ul
ARN (en H ₂ O)	9ul

2. Calentar a 90 °C durante 3 minutos, centrifugar y poner en hielo

3. En hielo añadir:

tampón de 1ª hebra	4 ul
dTT 0,1 M	2 ul
dNTP 5 mM	2 ul
SSIII (200 U)	1 ul

4. Mezclar, centrifugar, calentar a 45 °C durante 60 minutos.

5. Inactivar por calor a 70 °C durante 10 minutos

6. Colocar en hielo.

c) Configurar 1ª ronda de PCR.

1. Mezclar los siguientes reactivos de PCR

5	RT	5 ul
	Cebador directo 4 uM	1 ul
	Cebador inverso 4 uM	1 ul
	mezcla de PCR Hotstart (Qiagen)	12,5 ul
	Agua	5,5ul
10	(véase la Tabla 3 para los cebadores de la 1ª reacción de PCR)	

2. Ciclar la máquina de PCR en:

95 °C durante 15 minutos (94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 min) x 40 72 °C durante 1 min

4 °C mantenimiento

d) Configurar PCR anidada

1. Mezclar los siguientes reactivos de PCR:

20	Producto 1ª PCR	1 ul
	Cebador anidado directo 20 uM	1 ul
	Cebador anidado inverso 20 uM	1 ul
	Mezcla de PCR Hotstart (Qiagen)	12,5 ul
25	Agua	9,5 ul

(véase la Tabla 3 para los cebadores de PCR anidada. Si no hay cebador anidado enumerado, usar cebador de 1ª PCR)

2. Ciclar la máquina de PCR en

95 °C durante 15 minutos

(94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 min) x 25

72 °C durante 1 min

4 °C mantenimiento

e) Ejecutar 5 ul de producto de PCR anidada en un gel de bromuro de etidio al 1,5 % durante 1 hora. Dependiendo de los cebadores usados, el tamaño esperado del producto es como se enumera en la Tabla 1.

Tabla 3. Cebadores para la detección por PCR del virus PMC

Clon	Virus	*Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' a 3')	Tamaño del producto anidado
CR3 9	Pestivirus	CR39F (63) CR39R (190) CR39FN (87)	CACATCTAGCAGCAGACTATGA GTACCAGTTGCACCACCC TGAAAAGGATTACGG	103pb
ER5 10	Pestivirus	ER510F (7) ER510R (213) ER510FN (68) ER510RN (182)	AAACCGACGAAGTAGACC AGACGAGAACATAGTGGC GAAACAGTAAAGCCAACG CTGGTAATCGGAAACATC	114pb
ER6 2	Pestivirus	ER62F (203) ER62FN (373) ER62R (637) ER62RN (516)	GGGACCGAGGGATACGA AGAGGTAATTGGGTAT CAGCAGGTTGATTTCTTCAT TTGCCAAGTTTCAC	98pb
ER5 5	Pestivirus	ER55F (31) ER55R (214) ER55FN (64) ER55RN (162)	AAACCGCCGAAGTAAACC CTGGAGCCCTGGTAATGG GACGGGAATGGGTTCA TAGGTGCTTCTTATTGGTAT	143pb

*F = cebador directo, R = cebador inverso, FN = cebador anidado directo, RN = cebador anidado inverso

Ejemplo 5

Determinación de la secuencia viral de longitud completa

5 Una vez se ha confirmado la autenticidad de la presencia de la secuencia del virus PMC en una muestra por PCR, puede obtenerse la secuencia viral completa mediante el diseño de cebadores de PCR para abarcar los huecos entre los clones (remítase a la Tabla 4). Se realizó RT-PCR como una reacción de RT-PCR de dos etapas (RT después PCR) o de una etapa.

10 1. Reacción de RT:

a) Mezclar lo siguiente:

15 1 ul de hexámeros aleatorios (50 pmol)
4 ul de ARN
4 ul de agua libre de RNasa

b) Calentar a 70 °C 10 minutos, centrifugar y poner en hielo

20 c) En hielo añadir

4ul de tampón de 1ª hebra
2 ul de DTT 0,1 M
2ul de dNTP 5 mM
2 ul de SSIII (400 U)

25 d) Mezclar, centrifugar, calentar a 42 °C durante 60 minutos.
e) Inactivar por calor a 70 °C durante 10 minutos

f) Colocar en hielo

30 2. Reacción de PCR:

a) Mezclar los siguientes reactivos de PCR

35 RT 1 ul
Cebador directo 20 uM 1 ul
Cebador inverso 20 uM 1 ul
Mezcla de PCR Hotstart (Qiagen) 12,5 ul
Agua 13,5 ul
(véase la Tabla 4 para los cebadores de PCR)

40 b) Ciclar la máquina de PCR en:

95 °C durante 15 minutos
(94 °C durante 30 segundos, 47 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 2 min) x 40
45 72 °C durante 1 min
4 °C - mantenimiento

3. Método de RT-PCR de una etapa

50 a) Mezclar los siguientes reactivos del kit SSIII RT-PCR

Mezcla de reacción 2x 25 ul
Cebador directo 30 uM 1 ul
Cebador inverso 30 uM 1 ul
55 Mezcla SSIII RT/Platinum 2ul para productos de 2,5 kb o menos
4 ul para productos de 2,5 kb o más
15,8 ul para productos de 2,5 kb o menos
13,8 ul para productos 2,5 kb o más
Agua
(véase la Tabla 4 para los cebadores de PCR)

60 b) Ciclar la máquina de PCR en:

50 °C durante 50 minutos
94 °C durante 2 min
65 (94 °C durante 15 segundos, 50 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 1 min/kb) x40
68 °C durante 5 min

4 °C - mantenimiento

El producto de RT-PCR de interés se limpió por centrifugación de PCR y se clonó en el vector de clonación Invitrogen TA pCR2.1 (véase el Ejemplo 1). Los clones positivos se identificaron y enviaron para secuenciación, como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Los cebadores usados para secuenciación fueron M13r, m13-20, cebadores en la Tabla 4 y cebadores diseñados específicamente para secuenciación (véase la Tabla 5).

La secuencia del plásmido, los cebadores de PCR y las lecturas de mala secuencia se retiraron de la secuencia antes de usarse en el programa Bioedit (Hall, TA (1999) BioEdit: un editor de alineación de secuencias biológicas fácil de usar y el programa de análisis para Windows 95/98/NT Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98). Bioedit permitió la construcción de contigs y la producción de la secuencia consenso de longitud completa para el virus.

Tabla 4. Cebadores diseñados para PCR de los huecos entre las secuencias de los clones SISPA

Región para PCR	*Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' a 3')	Tamaño del producto
5'UTR-Erns	JFP1F JFRR3R	CATGCCCATAGTAGGAC ACCAGTTRCACCAMCCAT	1338pb
Erns-P7	CR39-Er55PCRF ER55-510-512 R	AGGGCTCTCACATGGTTGTC CCATTACCAGGGCTCCAG	1810pb
Erns-NS5A	CR39F(63) ER55RN(162)	CACATCTAGCAGCAGACTATGA TAGGTGCTTCTTATTGGTAT	2349pb
P7-NS5A	ER55-510-512 F CR316-CR24R	CGTTGGCTTTACTGTTTCATTG TCCCCGAAGCTTGGTTTAAT	5560pb
NS3-NS5A	NS3F CR316-CR24R	GTCAGGCCTGCCTATCTTTG TCCCCGAAGCTTGGTTTAAT	4431pb
NS5A-NS5B	CR316-CR24F ER62-ER63R	CGGGACCATTAAVVAAGC CAGGGGGTTCCAAGAATACA	2440pb

* F = cebador directo, R= cebador inverso

Tabla 5. Cebadores diseñados para secuenciación

Localización en la proteína del cebador	*Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' a 3')
5 UTR	5utr (140)R	GGTGTACTCACCGCTTAGCC
NPRO	NPRO(630)RS	TTGCTACAATCGCCCTTCTT
NPRO	NPRO(779)FS	AGGGAGAATGACAGGGTCTG
Cápsida	capsid(927)FS	ACAAAGGAGCAAAACCCAAG
ERNS	EO(1365)RS	GTCACGTTGGTGGACCCTAC
E1	E1(2402)RS	AGCCAGAAATGCCACAGC
E1	E1(2606)FS	ACCTGTGTGGGTGCTAACAT
E2	E2(3086)RS	TTACTTTGTCTTCCCGTTGC
NS2	NS2(4409)FS	CCAAGAACTTCCCCATACG
NS2	ns2(4460)RS	TTCCACATCCTCTTTCTTCTTT
NS3	NS3(5170)RS	GCTGGCCCTCGAATGATCCA
NS3	NS3(5468)FS	GTTCCCTGTGTCCTTGCTGA
NS3	NS3(5670)RS	TG TTTTGTCTTGGCACTGG
NS3	NS3(6296)FS	GAGCACAACAGGGCAGAAAT
NS3	NS3(6479)RS	CCATCTTCCTTGTTAGGCACA
NS3	NS3F(6525)F	GTCAGGCCTGCCTATCTTTG
NS3	NS3(7153)FS	GGAGAAGTCACTGACGCACA
NS3	NS3(7241)RS	GCCATTTCATCCCAGTATG
NS4B	NS4B(7715)FS	GGGGTCCACACAGCATTGTA
NS4B	NS4B (7893)RS	CCCTTGATACTCACGCCTGT
NS4B	NS4B(8532)FS	GCCGACTCAAAATGGAGAAA
NS5A	NS5A(8810)RS	GCCACCCTATTCTTGGATCTC
NS5B	NS5B(10889)FS	AAATGAGAAGAGGGCAGTGG
NS5B	NS5BF-10936	AAGGCCACCACTCAAATCAC
NS5B	NS5BR-12039	AGGCTTCTGCTTGACCCAGT

* FS = cebador directo, RS= cebador inverso

NOTA: Los números en paréntesis son localizaciones estimadas en la cepa de pestivirus de referencia NADL.

Ejemplo 6

Secuencias UTR

5 Se usaron 5' RACE y 3' RACE para obtener las secuencias 5'UTR y 3'UTR.

1. Método 5' RACE

10 Los datos de secuencia de la región 5' no traducida completa (UTR) se generaron usando amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE, BD), como se describe por BD Biosciences Clontech con las siguientes modificaciones. Se usó cebador específico de virus PMC CR24R (5'TCCCCGAAGCTTGGTTTAAT 3') para generar el ADNc. Se realizó PCR Hotstart (Qiagen) con cebadores CR39R (Tabla 3) y mezcla de cebador A universal BD (5'CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT3' y 5'CTAATACGACTCACTATAGGGC3') con una temperatura de hibridación de 67 °C y un tiempo de extensión de 2 minutos. Se usaron el cebador
15 específico de virus PMC N^{Pro}(630)RS (Tabla 5) y el cebador A universal anidado BD (5'AAGCAGTGGTATCAACGCAGAT3') para la PCR anidada Hotstart, con una temperatura de hibridación de 55 °C y un tiempo de extensión de 2 minutos. Productos anidados de PCR se limpiaron, clonaron y secuenciaron.

2. Método 3' RACE

20 Los datos de secuencia de la región no traducida completa 3' se generaron añadiendo primero una cola poli (A) al ARN viral, usando el Kit A-Plus Poly (A) polymerase tailing de Epicentre durante 8 minutos. Esto estuvo seguido por amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE, BD), como se describe por BD Biosciences Clontech con las siguientes modificaciones. Se realizó PCR Hotstart (Qiagen) con cebadores ER62F (Tabla 3) y mezcla de cebador A universal BD (5'CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT3' y
25 5'CTAATACGACTCACTATAGGGC3') con una temperatura de hibridación de 65 °C y tiempo de extensión de 2 minutos. Se usaron el cebador específico de virus PMC NS5B(12100)F (Tabla 5) y el cebador A universal anidado BD (5'AAGCAGTGGTATCAACGCAGAT3') para la PCR anidada Hotstart, con una temperatura de hibridación de 65 °C y un tiempo de extensión de 2 minutos. Los productos anidados de PCR se limpiaron, clonaron y secuenciaron.

Ejemplo 7

PCR a tiempo real

35 Se desarrollaron los siguientes cebadores y una sonda de apareamiento basada en tecnología Taqman®:

Cebador directo: CAGTTGGTGTGATCCATGATCCT

Cebador inverso: GGCCTCACCTGCAACTTT

40 **Sonda:** 6FAMAAGTCTTCAGCAGTTAACTMGBNFQ

Pueden desarrollarse combinaciones de cebadores/sondas similares para otros segmentos del genoma PMC.

45 Se realizó un ensayo de PCR a tiempo real usando las siguientes etapas:

a) Extraer el ARN de la muestra de ensayo. Incluir en todas las etapas de las reacciones controles positivos y negativos conocidos y un "blanco".

b) Preparar la mezcla de reacción (volumenes por muestra) del siguiente modo:

50	2x Mastermix (Roche)	12,5 ul
	40x Multiscribe	0,625 ul
	Cebador directo	1 ul
	Cebador inverso	1 ul
55	Sonda Taqman	1 ul
	Molde (muestra)	2 ul
	Agua	6,875 ul

c) Establecer las condiciones de ciclo para el termociclador de PCR disponible (los siguientes ciclos son apropiados para un Cefeidas SmartCycler)

Ciclar la máquina de PCR en:

Fase 1: Repetir 1x

65 48 °C durante 30 minutos
95 °C durante 10 minutos

Fase 2: Repetir 45x

95 °C durante 15 segundos

58 °C durante 30 segundos cada vez

d) Determinar los resultados usando el software SmartCycler usando valores de ciclo umbral (CT). Un valor de CT <35 se considera que es positivo. Los valores entre 35-40 son sospechosos y los valores >40 son negativos.

Ejemplo 8

Producción de baculovirus recombinantes y expresión de proteínas de virus PMC recombinante

1. Clonación de fragmentos de PCR

Los productos de PCR se purifican con columnas PCR SPINCLEAN™ (Progen Industries, Limited), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Si la reacción de PCR produce bandas no específicas además del producto requerido, o fue necesaria subclonación de otro plásmido, el ADN puede purificarse adicionalmente por elución de un gel de agarosa al 0,8 %, usando una modificación del método descrito por Heery (1990).

Los fragmentos de PCR purificados se digieren y se ligan en vectores de transferencia de baculovirus pBlueBacHis A, B o C (sistema de expresión de baculovirus MaxBac, Invitrogen Corporation) que contienen salientes cohesivos compatibles, usando protocolos de clonación convencionales (Sambrook et al., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, 1991). Los vectores A, B o C proporcionan tres fases de lectura diferentes para conseguir la expresión de proteínas en el sistema de expresión de baculovirus.

2. Transformación de plásmidos de baculovirus con los fragmentos de PCR

Los ligamientos se transforman en la cepa de *E. coli* competente Top 10 (Invitrogen Corporation), Genotipo: F-mcrA D(mrr-hsdRMS-McrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoRecA1 araD139 D(ara-leu) 7697 galU galK rpsL endA1 nupG, y/o *E. coli* Sure® (Stratagene), Genotipo: e14'(McrA)D (mcrCB-hsdSMR-mrr) 171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 rel A1 lac recB recJ sbcc umuC::Tn5 (kan') uurC[F' proAB lacI^aZ D m15 Tn10 (Tet^r)]^c. Los protocolos para la preparación de células competentes y la transformación de las bacterias se toman del Invitrogen MaxBac Baculovirus Expression System Manual Versión 1.8.

Selección de clones bacterianos para el plásmido que contiene el fragmento de PCR y purificación del plásmido para transfección.

Los clones bacterianos que contienen pBlueBacHis + fragmento de PCR se identifican cultivando colonias, extrayendo los plásmidos usando el método miniprep de ebullición descrito en Sambrook, et al. (1989), y después emprendiendo digestiones de restricción de los plásmidos para verificar aquellos que contienen el inserto del tamaño correcto. Los plásmidos recombinantes se purifican a un nivel adecuado para reacciones de transfección usando kits de purificación de plásmido (QIAGEN Pty Ltd., columnas tip-20 o tip-100), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3. Producción de baculovirus recombinantes purificados por transfección con liposoma catiónico de células Sf9 para producir baculovirus recombinantes

Los baculovirus recombinantes se producen mediante co-transfección del ADN del virus de la poliedrosis nuclear de Autographa californica (AcMNPV) de tipo silvestre linealizado y vector de transferencia de baculovirus que contiene el fragmento de PCR en células Sf9, por la técnica de transfección mediada por liposoma catiónico. Esto se realiza de acuerdo con el Invitrogen MaxBac Baculovirus Expression System Manual Versión 1.8.

4. Purificación en placa de baculovirus recombinantes

El virus recombinante se purifica en placa tres veces antes de preparar reservas maestras de virus, asegurando que el virus se clona a partir de una sola partícula y ningún virus de tipo silvestre está presente. Los ensayos de placa se establecen de acuerdo con el Invitrogen MaxBac Baculovirus Expression System Manual Versión 1.8.

Después de cada ronda de purificación en placa, los virus recombinantes se seleccionan usando un ELISA de captura de antígeno de pestivirus (PACE) modificado (Shannon et al., 1991). El método modificado implica añadir sobrenadante + células (50 µl/pocillo) directamente a una placa ELISA lavada y bloqueada, y la placa se incuba durante 1 hora a 37 °C. Después se añade solución de anticuerpo (50 µl/pocillo). El anticuerpo usado es antisuero de cabra anti-pestivirus biotinilado o anticuerpos monoclonales anti-virus PMC individuales (mAb). La placa se incuba durante una noche a 22 °C, después se revela como se describe por Shannon et al. (1991), omitiendo la incubación con IgG anti-ratón biotinilada para muestras que se hacen reaccionar con el antisuero de cabra biotinilado.

5. Reservas maestra, de siembra y de trabajo de baculovirus recombinante

5 La reserva maestra de virus para cada uno de los baculovirus recombinantes construidos se hace de acuerdo con el Invitrogen MaxBac Baculovirus Expression System Manual Versión 1.8. El título de la reserva se determina por un ensayo en placa, como se ha descrito anteriormente, excepto que las células se recubren con carboximetilcelulosa al 1,5 % (CMC, BDH; CMC al 6 % en agua desionizada, diluida 1 en 4 con TC100 completo + X-gal [125 µg/ml, Boehringer Mannheim]). Después de 7 días, se cuentan las placas azules para dar el título del virus.

10 La reserva de siembra y de trabajo se hacen a partir de la reserva maestra y de siembra, respectivamente, usando una MOI baja de 0,1 a 0,5 pfu/ml. Todas las reservas de virus se almacenan a 4 °C para su uso en la producción de vacunas. Para almacenamiento a largo plazo de las reservas maestra, de siembra y de trabajo, cada virus recombinante es envasa en ampollas y se congela a -80 °C.

15 6. Optimización de la producción de proteínas recombinantes

Se usan suspensiones de células de insecto Sf9, adaptadas a medio sin suero Sf-900 II de acuerdo con el protocolo descrito por Gibco BRL (1995), para optimizar la expresión de la proteína recombinante. Se infectan dos matraces cónicos, que contienen 50 ml de células ($1,5 \times 10^6$ células por ml), con baculovirus recombinante a una MOI alta y 20 baja, entre 0,1 y 5,0. Un tercer matraz actúa como cultivo de control no infectado. Los 3 matraces se incuban con agitación a 28 °C, y se retiran alícuotas de 5 ml a intervalos de 24 horas durante un máximo de 7 días.

25 Las muestras se centrifugan a temperatura ambiente (TA) durante 10 min a 900 xg, y los sobrenadantes se retiran cuidadosamente. Los sedimentos y los sobrenadantes se almacenan a -20 °C hasta que se complete el muestreo diario. La cantidad de proteína de pestivirus recombinante específica en las muestras se determina entonces usando el PACE modificado descrito anteriormente. Los sedimentos celulares se reconstituyen en 200 µl o 250 µl de NP-40 (1 % [v/v] en PBS), se agitan con vórtice y se centrifugan a TA durante 10 min a 900 x g. Se ensayan diluciones en 30 serie del extracto de sedimento (en NP40 al 1 % [v/v]). Los sobrenadantes de cultivo se ensayan sin diluir, así como diluidos en serie (en NP40 al 1 % [v/v]). Si la viabilidad celular está reducida a una tasa más alta de infección, entonces una MOI de 0,1 a 2 es más apropiada.

<120> Especies de pestivirus

<212> Tipo: ADN

35 <211> Longitud: 12077

Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 1

Descripción de la secuencia: nucleótido del virus PMC

<213> Nombre del organismo: virus PMC

gtataacgac	agtagttcaa	gtgtcgttat	gcatcattgg	ccataacaaa	ttatctaatt	60
tggaaatagg	acctgcgacc	tgtacgaagg	ccgagcgtcg	gtagccattc	cgactagtag	120
gactagtaca	aataggtcaa	ctggttgagc	aggtgagtg	gctgcagcgg	ctaagcgggtg	180
agtacaccgt	attcgtcaac	aggtgctact	ggaaaggatc	accactagc	gatgcctgtg	240
tggacgagga	catgtccaag	ccaatgttat	cagtagcggg	ggtcgttact	gagaaagctg	300
cccagaatgg	gtagttgcac	atacagtctg	ataggatgcc	ggcggatgcc	ctgtattttg	360
accagtataa	atattatccg	ttgtaaagca	tatgaatact	tttactttta	atacatatgg	420
agggagttag	gaaggaaaca	tgttcttttag	aactgcaccc	acgccgccac	cagggtgcca	480
agaaccgggt	tacacaagca	caatgagacc	aatttttggc	gaaccccatc	cacctctaca	540
caaacacagc	acgttaaaat	tgccacattg	gagggggatc	aaaacaatta	gagttaagaa	600
gagagaattg	ccaaagaagg	gcgattgtag	caactcaaca	acagctccca	cttcgggggt	660
gtacgttgaa	ttaggggctg	tgttctataa	agattacacg	ggcacgggat	accatcgtgt	720
accgctagaa	ctttgtacaa	accaagagag	gtgcgagggg	tccaagtgtg	tagggagaa	780
gacaggggtc	gatggcaggt	tgtacaacgt	tttagtatgt	ccggacgatt	gtatcctctt	840
tgagagacac	tgtagaggtc	aaacagtcgt	cctgaaatgg	atttccaacc	ccttgacatc	900
accacttttg	gtccagagtt	gttctgacga	caaaggagca	aaacccaagg	tgaacccaaa	960
agacgacagg	atgaagcaag	gaaaaatagt	gacaaagcct	aaagagactg	aagcagatca	1020
aaaaactaga	ccaccagatg	ccacgatagt	gggtgacggg	cagaagtatc	aggtgaggaa	1080
gaaggggaaa	gcgaaaccca	agactcaaga	cggcttatac	cacaacaaga	acaaaccaga	1140
agcgtccagg	aagaagcttg	agaaggcctt	gctagcatgg	gcaatattag	cctgcctatt	1200
ggtggtaccg	gtaggggtcca	ccaacgtgac	acaatggaac	ttatgggaca	ataaaagtac	1260
tacagacata	catagcgtca	tgttttctag	agggattaaa	aggagtctgc	atggaatttg	1320
gcccacacaa	atctgcaaag	ggatccctac	acatctagca	gcagactatg	aactgaaaag	1380
gattcacggg	atggtggatg	caagcccat	gaccaacttc	acatgttgta	ggctacagag	1440
acatgagtgg	aacaagcatg	ggtggtgcaa	ctggtacaat	atagagccgt	ggatcaatct	1500
catgaataat	acccaaggac	tattaaacac	tggagacaat	ttactgagt	gcgcagtcac	1560
atgcagggtat	gatgcagact	taggggtgaa	tatagtgact	caagccagga	ctactccaac	1620
tatcctgact	ggctgtaaga	aagggcacaa	cttctctttc	tcagggggagg	tcagggcctc	1680
accctgcaac	tttgagttaa	ctgctgaaga	cttgctcagg	atcatggatc	acaccaactg	1740
cgagggattt	acctacttcg	gggaagggaat	cgttgacggg	tacaccgagg	tagtagagaa	1800
ggccagggtca	agtggtttca	gggtctctac	atggttgctg	agtaagattg	aaaacaccaa	1860
gaaaaaaata	ttcggagctg	aagccagtc	ttactgcccc	gtggctaaga	gggtcttcaa	1920
cattatttat	accaacaatt	gcaccccgct	tggactgcca	gataagtcaa	aaattatagg	1980
accaggaacc	tttgacatca	gtggcagggg	tgaattcata	tttccaaaac	ttccctacca	2040
cgtagatgac	ttcattctac	tgagcttaat	tgcaatgtct	gattttgctc	cagagacatc	2100
aagtataatc	tacctggctt	tgcactacct	aatgccaagt	aatgacaaca	gggacttcgt	2160
gatggacctg	gacccaaata	aactaaacct	tactgcaact	aaatccgtgg	caagtgtggt	2220
ccctacatcg	gtgaatgtgt	taggtgaatg	ggtgtgcgtc	aaaccaagtt	ggtggcctta	2280

ttccgcgaa	atcactaatc	tgataggagg	tgatcatcacc	gtggcagact	tagttatcaa	2340
gaccattgaa	gaattgctaa	atattgtggac	cgaagcaaca	gctgtggcat	ttctggctgc	2400
totaataaaa	attttttagag	gccagccgat	ccaagcggta	gcatgggttaa	tcatcatagg	2460
gggagcacaa	gcccacacct	gcaaccctga	attcatgtac	gcattagcga	aaaataccag	2520
cataggttca	ttaggaccag	aatcactgac	gacaagggtg	taccaactaa	ccagcggttt	2580
caaaactcact	gacagcacga	ttgaagtcac	ctgtgtgggt	gctaacatga	ggattcatgt	2640
agtgtgcca	cttgtaagt	acagatat	ggccataaac	caccctagag	cactgccaac	2700
aacggcgtg	ttcaggaaaa	tacacactca	gcatgaggta	ccaagagaaa	gaatcatgag	2760
tgagtcacaaa	aggaggtaca	cttgtccttg	tggttctaaa	ccagtgggtga	ggtcaacaac	2820
acaattcaac	ccaatatcta	tatctacccc	aagctttgaa	cttgaatgcc	ctaggggttg	2880
gactggggct	gtagagtgt	cactagtctc	cccatcaact	ctgacaacag	agactatatt	2940
cacatacagg	aagcccaaac	cattcggact	tgaaaactgg	tgcaagtata	cagtgggtgga	3000
gaaagggatc	ctgtattctt	gtaaatttgg	gggcaattca	acatgcatca	aagggtctat	3060
agttaaagg	caacgggaag	acaaagtaag	gtactgtgaa	tgggtgtggt	ataagttcag	3120
ttcaccaaat	ggactgcctc	agtatccact	gggattgtgt	gagaaagaac	aatcagaagg	3180
actcagggat	tatggtgact	tcccatgctg	caacaacggc	acttgtattg	acaaagaagg	3240
tagtgtgcaa	tgctacatag	gggataagaa	agttaccgtg	aagctgtata	atgcctcact	3300
attggccccc	atgcctgca	aaccatag	gtataactcc	caggggcccc	cagcgcctaa	3360
gacctgcact	tataggtggg	cctcaacatt	agaaaataaa	tattatgaac	ccagggacag	3420
ctactaccag	caatacatta	taaagtcagg	gtatcaatat	tggtttgatc	tcacagcaaa	3480
ggatcatgtg	gcagactgga	tcacaaaata	ctttccaata	ataatagtgg	ccttggttagg	3540
gggcagaggc	accttgtggg	tgttgatagc	ttatgagttg	ctaactcagt	atgaggtagt	3600
aggagacgag	aacatagtgg	ctcaagctga	agccctggta	atcggaacaa	tcttgatgag	3660
tttagactta	gagataatta	gctgcttcct	tctgttgttg	atcgtggtga	aaaaacaagc	3720
tgtcaggaga	acgttggctt	tactgtttca	ttggataact	atgaacccat	tccagtcagt	3780
aatgatcaca	gtggtctact	tcgtcggttt	ggtgagggcc	gaagagggaa	ctaaagaggg	3840
tagtacaagc	gggccaccaa	tccatgtagt	tgcaatactg	ttattcctct	tgtaaccacac	3900
agtgaagtat	aaggacttta	acatagcaat	gatcttactt	ataacattgt	ccctgaaaag	3960
ctcatcctac	atacatacca	gcttgatga	aattccattg	cttgtggctg	taataagtct	4020
cacatgctcc	atatacattt	ttgacttgca	ggtaaagagc	aagctagtgg	ccccactat	4080
agggtataatt	ggagttaccc	tagcaatgag	agttttgtgg	ctggtaaggc	aaatgactat	4140
accaaccccc	tctgtgtcca	ttagtctgat	agatccaaag	atggtcataa	tactctactt	4200
gatatcccta	actattacag	tcaatcacaa	cctagaccta	gcaagttatt	gcttgaaact	4260
gggacctttt	atcctatcat	tcctaacaat	gtgggtggat	gttgtcatcc	tcctgctcat	4320
gctgccttgg	tacgaactag	taaaagtcta	ctacctaaaa	aagaagaaag	aggatgtgga	4380
aacatgggtc	caaaattcag	gaatatccac	ccaagaaact	tccccatacg	gatttgattt	4440
ttctagcccc	ggggaggagg	tgcacacact	accaatgcaa	aataaaaacca	aattttgtag	4500
gactgcttac	atgactgtac	taagggtctt	ggtgataaca	gccatcagca	gtgtctggaa	4560
accaataatt	ttagcagaac	tcctaataga	ggcagtgtat	tggacacaca	ttaaaatagc	4620
caaagaattg	gcgggggtcaa	gcagggtcgt	tgctagggtc	attgcatcta	ttatagagtt	4680
gaattggggc	atggacgaaa	agaagcatc	tcggtacaaa	agattttacc	tattatcatc	4740
caaaaataaca	gatctaattg	ttaagcacaa	aatccaaaat	gagacagtaa	aatcctgggt	4800
tgaagaaact	gaaatatttg	gaatacaaaa	agtggcaatg	gtgataaggg	ctcattctct	4860
gagtttggag	ccaaatgcc	tcctttgctc	cgtttgtgaa	gaaaaacaaa	atcaaaaagc	4920
caaaaggccc	tgccctaagt	gtggtagtag	aggcactcaa	ataaagtgtg	ggctgacact	4980

ggccgagttt	gaggaagaac	attacaaaaa	aatatacatc	ctcgaaggcc	aagatgaaac	5040
tcccatgagg	aaagaagaaa	gacagcaagt	aacttatgtc	tctaggggtg	ctctgttcct	5100
taggaatctt	cctatcttag	cttcaaaaaa	caaataccta	cttgtaggca	atctgggtat	5160
ggaattgcaa	gatttggaag	gtatgggatg	gatcattcga	gggccagccg	tctgcaagaa	5220
gataatacac	catgagaaat	gcaggccttc	aataccagac	aaactcatgg	cattcttcgg	5280
gattatgcct	aggggagtta	caccaagagc	ccctacacgg	ttccctgtgt	ccttgctgaa	5340
gataagacgg	ggttttgaga	ccggctgggc	ctacacacac	cctggagggg	taagtagtgt	5400
gatgcatgtc	accgctgggt	cggatatata	tgtcaatgac	tcaataggga	ggacaaaaat	5460
ccagtgccaa	gacaaaaaca	ctacaacaga	tgagtgtgaa	tatggtgtga	aaacagactc	5520
aggggtgctc	gatggagctc	ggtgctatgt	catcaaccct	gaagcaacca	acatagcagg	5580
gaccaagggg	gccatggtac	acctgaggaa	agctggaggga	gagttcaact	gcgtgactgc	5640
ccagggtacc	cccgccttct	ataatctaaa	gaacttaaaa	ggatgggtcag	gcctgcctat	5700
ctttgaagct	gccacaggaa	gagtggtagg	aagggtaaaa	gcaggaaaaa	acactgacaa	5760
tgctccaaca	accattatgt	cagggacgca	agtggcaaaa	ccatcagagt	gtgacctaga	5820
atcagtgggt	aggaaactag	agacaatgaa	cagaggggaa	ttcaaaacaag	tgactctggc	5880
tacaggcgca	ggaaagacaa	ccatgctacc	aaagctgtta	atagaatcca	taggcaggca	5940
taagagagtg	ttagtactga	tcccgcttag	agctgcagcg	gagggggtgt	accagtacat	6000
gagaaccaaa	caccaagca	tatctttcaa	cttgaggata	gggatctga	aagaaggtga	6060
catggcaact	gggatcacct	atgcctctta	tgggtacttc	tgccaaatgg	acatgcctag	6120
actggagaat	gcaatgaagg	aataccacta	tattttcttg	gatgaatata	actgtgccac	6180
accagaacag	ttggcagtg	tgtcaaaaat	acataggttc	ggtgaatcag	ttagggtaat	6240
agccatgacc	gccacgccat	ccgggactgt	gagcacaaca	gggcagaaat	tcacaattga	6300
ggaggtggta	gtacctgaag	tgatgaagg	ggaggacctt	gctgatgatt	acatcgaaat	6360
agcaggggtg	aagggtgcaa	agaaagagtt	agagggtaac	gtactgactt	ttgtgcctac	6420
aaggaagatg	gcatcggaag	cagcaaaaaa	attaaccaca	cagggataca	atgctggata	6480
ctacttcagt	ggagaagatc	catcatccct	goggacaact	acttctaagt	caccatata	6540
agtagttgca	accaatgcc	ttgaatccgg	ggtaacctta	ccggaccttg	atacagtaac	6600
agatacaggc	atgaagtgtg	aaaagagact	aagaatcgaa	aacaaagctc	cctacatcgt	6660
aacaggactg	aaaagaatgg	ctataacaac	gggggagcaa	gctcaaagaa	aaggtagggg	6720
aggcaggggt	aaacctggga	ggtacttgag	aggacctgaa	aacactgcag	gtgaaaagga	6780
ctatcactat	gaccttttac	aggcacagag	gtacggcatc	caagactcaa	taaacatcac	6840
caagtctttc	agggagatga	actatgattg	ggcattatat	gaggaagacc	cgttaaagat	6900
tgcccaatta	gagttgctaa	acacactcct	gatctcaagg	gatctgccag	tagtaacaaa	6960
aaatctgatg	gcccgcacaa	cacatcccga	acctatacaa	ttggcttaca	atagtttaga	7020
aacccctgta	ccggtggcat	tcccaaaagt	gaaaaatgga	gaagtcactg	acgcacatga	7080
aacttacgag	ttgatgacct	gtaggaagct	tgagaaagac	ccccctatat	acctgtatgc	7140
aacagaagaa	gaagatctcg	tagtggacat	actgggattg	aaatggccag	acgccacaga	7200
gagggctgtc	ttggaagtgc	aagacgccct	gggccagatc	acaggtttat	ctgcagggga	7260
gacagcttta	ctcatagccc	tattaggggtg	ggtgggctac	gaagccttgg	tgaagaggca	7320
cgtgcctatg	gtgacagaca	tatacacccct	agaagatgaa	aaattggaag	acactacaca	7380
cctacaattt	gccccagatg	atctgaacaa	ttcagatacc	attgagctcc	aagacttatc	7440
gaatcaccaa	atccaacaaa	ttctagaagg	tgggaaggaa	tatgtcggcc	aagcctacca	7500
attcctcagg	ttgcaagctg	agagggctgc	caactcagac	aaaggcaaga	aagcaatggc	7560
agcggcccca	ttactagccc	acaagttcct	ggaatacttg	caagagcatg	cagggtgacat	7620
aaagaagtat	ggtctatggg	gggtccacac	agcattgtat	aacagcataa	aagaaagact	7680

gggtcacgaa	actgcattcg	catctctggt	tataaaatgg	attgcctttt	cctcagatgg	7740
agtccccggg	atgattaagc	aagcagcagt	agacttggtg	gtatactata	taatcaacag	7800
gcctgagtat	caaggggata	aggagacaca	gaatgcaggt	agacaatttg	ttggctccct	7860
ttttgtttca	tgtctagcag	agtacacatt	caaaaacttc	aataaatcag	cattagaagg	7920
attgatcgag	cctgccttaa	gctatctacc	ctacgcttca	agcgcactaa	agttattcct	7980
accgactaga	cttgaaagtg	tagtgatact	gtccactact	atatacagaa	catacttata	8040
aatcaggaaa	ggatctagtc	aggggttagc	cgggctggca	gttagctcag	cgatggagat	8100
catgaaccag	aacccaatca	gcgtggctat	tgcactggca	ctaggagtcg	gagcaatagc	8160
ggcacataat	gccattgaga	gcagtgaggc	aaaaaggact	ctcctgatga	aggtctttgt	8220
taagaacttt	ttggaccaag	cagccactga	tgagcttggt	aaagagaacc	ctgagaagat	8280
cataatggca	gtgtttgagg	gcattcaaac	agctggaaat	ccattgagac	ttgtatacca	8340
tctatatgca	atgttctaca	aagggtagac	tgccgcggaa	atagctgaaa	aaaccgctgg	8400
taggaacatt	tttgtgttaa	caatatattga	aggattggaa	atgttaggcc	tggatgccga	8460
ctcaaaatgg	agaaatctga	gctctaatta	tcttattgat	gcagtgaaga	aaatcattga	8520
aaaaatgact	aaaacagcaa	caagcttcac	ctacagcttt	ttgaaatctt	tgcttctctg	8580
cccttctctg	tgtactaaat	cagaaagaga	tccaagaata	gggtggcccc	aaaaagacta	8640
cgactacctc	gaggtccgat	gcgcttggtg	gtataacagg	agagctataa	aaagagactc	8700
aggacctgtg	ttatgggaga	ccttagagga	gacgggtcca	gagtactgcc	acaacagagg	8760
tgaaaggggg	ctcagcaatg	tgaagactac	tagatgcttt	gtccaaggag	aggaaatccc	8820
tccaattgca	ctgaggaaa	gagtaggtga	gatgttggtc	aaggggtgtt	cattcagaat	8880
agattttgat	aaagacaaga	tactttcaac	agacaagtgg	aaggtaccac	atagggcagt	8940
tacatcaatc	tttgaggatt	ggcaggggat	tggttacaga	gaggcttacc	tagggacca	9000
accagactat	gggggtctgg	tgccagatc	ttgtgtaact	gtaacaaaac	aagggttaac	9060
attcttgaaa	actgccagag	gcatggcttt	cacgactgac	ctgaccatcc	agaacatcaa	9120
aatgctgata	gctacatgct	tcaagaacaa	ggtgaaggaa	ggggagatac	cagctacgat	9180
tgaaggggaa	acatggatca	acataccact	agtgaatgag	gacaccggga	ccattaaacc	9240
aagcttcggg	gaaagagtga	ttcccgaacc	atatgaggag	gacccacttg	aaggcccaag	9300
tgtaatcggt	gaaacaggag	gcatagccat	caaccaaata	ggggtcaatc	cacaatccag	9360
tacatgtgga	acagttttta	cagcagtga	ggatctgtgc	caaacagtta	gtaataaagc	9420
caagaatatc	aaaattgggt	tttcggaagg	ccaataccca	ggtccagggg	ttgcaaagaa	9480
gacactgaac	cagctcatat	aagatgaaga	cccaaaacca	ttcatatttg	tttgtggctc	9540
tgacaagtca	atgtctaata	gggcaaaaac	tgcgaggaac	atcaagagaa	tcaccaccac	9600
aacacctgag	aaattcagag	acttggaaca	aaacaagaaa	ttgataattg	tgctgttagg	9660
tgatagatac	catgaagata	tagaaaagta	tgcagacttc	aagggcacct	tcttgaccag	9720
acaaaccttg	gaagcactag	caagtgccaa	agctgtagag	aaggacatga	ccaagaaaga	9780
agcagcaaga	gtattggcaa	tggaagaaaa	ggatgaacta	gaactcccag	ggtggctgca	9840
tacagatgca	cccaaattcc	tagacattac	taaggacaac	atcacacatc	acctaatagg	9900
ggacatgcag	agtctgagag	aaagagcagg	ggagatagga	gcaaaggcca	ccactcaaat	9960
cactaagaaa	gggagtgtat	acacaatcaa	tctgagtacg	tgggtgggagt	cagagagggt	10020
ggcatctttg	gaacctttgt	tccgggaact	actatctaaa	tgcaggccag	tggacaggga	10080
gacatataag	aattgtcatt	ttgcaacagc	agcccaactt	gccggaggaa	actgggtacc	10140
ggtagcacca	gttgtacatc	ttggggaaat	tccggtaaag	aagaaaaaga	ctctccccta	10200
cgaggcatac	aagctcctaa	aagagatggt	tgactcggag	aaggaattcc	ataaaccagt	10260
gagcagggaa	aaacaccaat	ggatactgaa	caaagtga	actggtgggtg	acctcggtt	10320
aaaaaatcta	gtatgtccag	gtagggttgg	agaaccaatc	ctaagagaga	agaagaaatt	10380

```

caacatttac aacaagagga ttaccagtac tatgttatca gtagggataa ggccagaaaa 10440
attgccagtg gtaagagccc agaccagtac caaagaattt catgaagcaa taagggacaa 10500
aatagacaaa aaagcaaaaca cacagacccc aggcctacac aaagaattgt tggagatatt 10560
caactcaata tgtgccatcc ccgaacttag aaatacctac aaagagggtg attgggacgt 10620
tctaacctca ggcatataata ggaaagggtg agccgggtac ttcgaaaaaa tgaacatagg 10680
ggagatcata gatagtgaaca aaaaatcagt ggaacaactc ataaagagaa tgaaatcagg 10740
gctagaattc aactactatg agactgcaat accaaaaaat gagaagaggg cagtggtaga 10800
tgattggatg gaagggtgact atgtagaaga aaaaagacca agagtcatac agtatcctga 10860
ggcaaagatg agattagcta taaccaagt aatgtataac tgggtcaagc agaagcctat 10920
agtaatccct ggatacgaag gtaagactcc tttgtttcat gttttcgaca aggtccacaa 10980
agaatggaaa aatttcaaca gtccagttgc agtcagtttt gacactaaag cctgggacac 11040
acaagtaaca ccaaagacc ttctcctcat atcagaaatc caaaagtatt attacaagaa 11100
agaataccat agattcatag ataatttgac cgagaaaatg gtggaggtag cagtggtttg 11160
tgaagacgga aacgtctaca taagagaagg tcagagggga agtgggtcaac cagacactag 11220
cgcaggtaat agtatgttga atgtactgac tatgatatat gccttctgca aagctaactc 11280
catcccttac tcagccttcc acagggtagc aaagatacat gtgtgtggag atgatggttt 11340
cttgataact gagaaaagtt ttggtgaggc ctttgcgac aaggggcctc aaattttgat 11400
ggaagcagga aaaccacaaa aacttatagg tgaatttgga ctgaaattgg catataaatt 11460
tgatgacatt gaattttgct cgcatacacc aataaaggtc aggtgggctg acaacaacac 11520
atcatacatg cccggaagag acacagctac cattctagct aaaatggcaa cccgccttga 11580
ctctagtggg gagaggggga ccgagggata cgagctggcc gtggccttca gtttcttact 11640
aatgtattct tgggaacccc tggtagaag aatatgcctg cttgtcatgt ctacaattga 11700
cacaaaagaa gctagccaaa ataacactat atatacattt aggggggatc ccataggtgc 11760
ctacacagag gtaattgggt ataggctgga ccaactaaaa cagacagagt tctctaaatt 11820
ggctcagctg aatttgtcaa tggcaatact tcaaatatac aataaaaaaca caaccaagag 11880
actcatcgaa gattgtgtga aacttgcaa ccaaaataag caaatattgg tgaatgcaga 11940
cggtttgatc agcaagaaaa cgggctacac atatgagcca acagctggcc acactaagat 12000
aggcaagcac tatgaagaaa tcaacctgct gaaagataca ccacaaaaaa ctgtctacca 12060
aggaactgaa aggtata 12077

```

Característica

5 Secuencia: SEC ID Nº: 1
 <221> Clave característica: 5'UTR
 <222> Localización de: 1
 <222> Localización a: 418
 Otra información: 5'UTR

10

Característica

Secuencia: SEC ID Nº: 1
 <221> Clave característica: gen
 <222> Localización de: 419
 <222> Localización a: 922
 Otra información: Npro

15

Característica

Secuencia: SEC ID Nº: 1
 <221> Clave característica: gen
 <222> Localización de: 923
 <222> Localización a: 1219
 Otra información: Cápsida

20

25

	Característica
5	Secuencia: SEC ID Nº: 1: <221> Clave característica: gen <222> Localización de: 1220 <222> Localización a: 1885 Otra información: E0
10	Característica
15	Secuencia: SEC ID Nº: 1: <221> Clave característica: gen <222> Localización de: 1886 <222> Localización a: 2473 Otra información: E1
	Característica
20	Secuencia: SEC ID Nº: 1: <221> Clave característica: gen <222> Localización de: 2474 <222> Localización a: 3604 Otra información: E2
25	Característica
30	Secuencia: SEC ID Nº: 1: <221> Clave característica: gen <222> Localización de: 3605 <222> Localización a: 3820 Otra información: P7
	Característica
35	Secuencia: SEC ID Nº: 1: <221> Clave característica: gen <222> Localización de: 3821 <222> Localización a: 5224 Otra información: NS2
40	Característica
45	Secuencia: SEC ID Nº: 1: <221> Clave característica: gen <222> Localización de: 5225 <222> Localización a: 7252 Otra información: NS3
50	Característica
55	Secuencia: SEC ID Nº: 1: <221> Clave característica: gen <222> Localización de: 7253 <222> Localización a: 7441 Otra información: NS4A
	Característica
60	Secuencia: SEC ID Nº: 1: <221> Clave característica: gen <222> Localización de: 7442 <222> Localización a: 8482 Otra información: NS4B
65	Característica

Secuencia: SEC ID Nº: 1:
 <221> Clave característica: gen
 <222> Localización de: 8483
 <222> Localización a: 9997
 Otra información: NS5A

Característica

Secuencia: SEC ID Nº: 1:
 <221> Clave característica: gen
 <222> Localización de: 9998
 <222> Localización a: 12077
 Otra información: NS5B
 Secuencia

<212> Tipo: PRT
 <211> Longitud: 3785
 Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 2
 Descripción de la secuencia: proteína del virus PMC
 <213> Nombre del organismo: virus PMC

GGSEEGNMFF	RTAPTTPPGC	QEPVYTSTMR	PIFGEPHPPL	HKHSTLKLPH	WRGIKTIRVK	60
KRELPKKGDC	SNSTTAPTS	VYVELGAVFY	KDYTGTVYHR	VPLELCTNQE	RCEGSKCVGR	120
MTGSDGRLYN	VLVCPDDCIL	FERHCRGQTV	VLKWSNPLT	SPLWVQSCSD	DKGAKPKVKP	180
KDDRMKQGKI	VTKPKETead	QKTRPPDATI	VVDGQKYQVR	KKGKAKPKTQ	DGLYHNKNKP	240
EASRKKLEKA	LLAWAILACL	LVVPVGSTNV	TQWNLWDNKS	TTDIHSMVFS	RGIKRS LHGI	300
WPTQICKGIP	THLAADYELK	RIHGMVDASP	MTNFTCCRLQ	RHEWNKHGWC	NWYNIEPWIN	360
LMNNTQGLLN	TGDNFTECAV	TCRYDADLGV	NIVTQARTTP	TILTGCKKGH	NFSFSGEVRA	420
SPCNFELTAE	DLRIMDHTN	CEGFTYFGE	IVDGYTEVVE	KARSSGPRAL	TWLSSKIENT	480
KKKIFGAEAS	PYCPVAKRVF	NIIYTNNCTP	LGLPDKSKII	GPGTFDISGR	DEFIFPKLPY	540
HVDDFILLSL	IAMSDFAPET	SSIIYLALHY	LMPSNDNRDF	VMDLDPNKLN	LTATKSVASV	600
VPTSVNVLGE	WVCVKPSWWP	YSAEITNLIG	GVITVADLVI	KTIEELLNLW	TEATAVAFLA	660
ALIKIFRGQP	IQAVAWLIII	GGAAQATCNP	EFMYALAKNT	SIGSLGPESL	TTRWYQLTSG	720
FKLTDSTIEV	TCVGANMRIH	VVCPLVSDRY	LAINHPRALP	TTAWFRKIHT	QHEVPRERIM	780
SESKRRYTCP	CGSKPVVRST	TQFNPISIST	PSFELECPRG	WTGAVECTLV	SPSTLTETI	840
FTYRKPKPFG	LENWCKYTVV	EKGILYSCKF	GGNSTCIKGL	IVKGQREDKV	RYCEWCGYKF	900
SSPNGLPQYP	LGLCEKEQSE	GLRDYGDFFC	CNNGTCIDKE	GSVQCYIGDK	KVTVKLYNAS	960
LLAPMPCKPI	VYNSQGPPAP	KTCTYRWAST	LENKYYEPRD	SYQYQYIIS	GYQYWFDLTA	1020
KDHVADWITK	YFPIIIVALL	GGRGTLWVLI	AYELLTQYEV	VGDENIVAQA	EALVIGNILM	1080
SLDLEIISCF	LLLLIVVKKQ	AVRRTLALLF	HWITMNPFS	VMITVVYFVG	LVRABEGTKE	1140
GSTSGPPIHV	VAILLEFLLYH	TVKYKDFNIA	MILLITLSLK	SSSYIHTSLY	EIPLLVAVIS	1200
LTCSEIYIFDL	QVKSCLVAPT	IGIIGVTLAM	RVLWLVRQMT	IPTPSVSIIS	IDPKMVIILY	1260
LISLTITVNH	NLDLASCYLK	LGPFILSFLT	MWVDVVILL	MLPWYELVKV	YYLKKKKEDV	1320
ETWFQNSGIS	TQETSPYGF	FSSPGEVHT	LPMQNKTKFC	RTAYMTVLRA	LVITAISVW	1380
KPIILAEELLI	EAVYWTHIKI	AKELAGSSRF	VARFIASIE	LNWAMDEKEA	SRYKRFYLLS	1440
SKITDLMVKH	KIQNETVKS	FEETEIFGIQ	KVAMVIRAH	LSLEPNAILC	SVCEBKQNK	1500
AKRPCPKCGS	RGTQIKCGLT	LAEFBEEHYK	KIYILEGQDE	TPMRKEERQQ	VTYVSRGALF	1560
LRNLPILASK	NKYLLVGNLG	MELQDLESMG	WIIRGPAVCK	KIIHHEKCRP	SIPDKLMAFF	1620
GIMPRGVTPR	APTRFPVSL	KIRRGFETGW	AYTHPGGVSS	VMHVTAGSDI	YVNDISGRTK	1680
IQCDKNTTT	DECEYGVKTD	SGCSDGARC	VINPEATNIA	GTKGAMVHLR	KAGGEFNCVT	1740
AQGTAPAFYNL	KNLKGWSGLP	IFEAATGRVV	GRVKAGKNTD	NAPTTIMSGT	QVAKPSECDL	1800
ESVVRKLETM	NRGEFKQVTL	ATGAGKTTML	PKLLIESIGR	HKRVLVLIPL	RAAAEGVYQY	1860

MRTKHPISIF	NLRIGDLKEG	DMATGITYAS	YGYFCQMDMP	RLENAMKEYH	YIFLDEYHCA	1920
TPEQLAVMSK	IHRFGESVRV	IAMTATPSGT	VSTTGQKFTI	EEVVVPEVMK	GEDLADDYIE	1980
IAGLKVPKKE	LEGNVLTfVP	TRKMASETAK	KLTTQGYNAG	YFSGEDPSS	LRTTTSKSPY	2040
IVVATNAIES	GVTLPLDLTV	IDTGMKCEKR	LRIENKAPYI	VTGLKRMAIT	TGEQAQRKGR	2100
VGRVKPGRYL	RGPTNTAGEK	DYHYDLLQAO	RYGIQDSINI	TKSFREMNYD	WALYEEDPLK	2160
IAQLELLNTL	LISRDLPVVT	KNLMARTTHP	EPQLLAYNSL	ETPVVPVAFPK	VKNGEVTDH	2220
ETYELMTCRK	LEKDPPIYLY	ATEEEDLVVD	ILGLKWPDAT	ERAVLEVQDA	LGQITGLSAG	2280
ETALLIALLG	WVGYEALVKK	HVPMVTDIYT	LEDEKLEDTT	HLQFAPDDL	NSDTIELQDL	2340
SNHQIQQILE	GGKEYVGOAY	QFLRLQAERA	ANSKGGKKAM	AAAPLLAHKF	LEYLQEHAGD	2400
IKKYGLWGVH	TALYNSIKER	LGHETAFASL	VIKWIASFSS	GVPGMKQAA	VDLVVYIIN	2460
RPEYQGDKET	QNAGRQFVGS	LFVSCLAEYT	PKNFNKSAL	GLIEPALSYL	PYASSALKLF	2520
LPTRLESVVI	LSTTIYRTYL	SIRKGSQGL	AGLAVSSAME	IMNQNPISSA	IALLAGVGAI	2580
AAHNAIESSE	AKRTLLMKVF	VKNFLDQAAT	DELVKENPEK	IIMAVFEGIQ	TAGNPLRLVY	2640
HYAMFYKGW	TAAETAEKTA	GRNIFVLTIF	EGLEMLGLDA	DSKWRNLSSN	YLIDAVKKII	2700
EKMTKTATSF	TYSFLKSLLP	APFSCTKSER	DPRIGWPQKD	YDYLEVRAC	GYNRRAIKRD	2760
SGPVLWETLE	ETGPEYCHNR	GERGLSNVKT	TRCFVQGEI	PPIALRKGVG	EMLVKGVSR	2820
IDFDKDKILS	TDKWKVPHRA	VTSIFEDWQG	IGYREAYLGT	KPDYGGVLP	SCVTVTQKGL	2880
TFLKTARGMA	FTDILTQNI	KMLIATCFKN	KVKEGEIPAT	IEGETWINIP	LVNEDTGTIK	2940
PSFGERVISE	PYEEDPLEGP	SVIVETGGIA	INQIGVNPQS	STCGTVFTAV	KDLCQTVSNK	3000
AKNIKIGFSE	GQYPGPVAK	KTLNQLIQDE	DPKPFIFVCG	SDKSMSNRK	TARNIKRITT	3060
TTPEKFRDLA	KNKKLIIVLL	GDRYHEDIEK	YADFKGTFLT	RQTLALASA	KAVEKDMTKK	3120
BAARVLAMEE	KDELELPGWL	HTDAPKFLDI	TKDNITHHLI	GDMQSLRERA	GEIGAKATTQ	3180
ITKKGSVYTI	NLSTWWESE	LASLEPLFRE	LLSKCRPVDR	ETYKNCHFAT	AAQLAGGNWV	3240
PVAPVVHLGE	IPVKKKKTLP	YEAYKLLKEM	VDSEKEFHKP	VSREKHQWIL	NKVKTGGDLG	3300
LKNLVCPRGR	GEPILREKKK	FNIYNKRITS	TMLSVGIRPE	KLPVVRAQTS	TKEFHAEIRD	3360
KIDKKANTQT	PGLHKELLEI	FNSICAPEL	RNTYKEVDWD	VLTSGINRKG	AAGYFEKMI	3420
GEIIDSDDKS	VEQLIKRMKS	GLEFNYYETA	IPKNEKRAV	DDWMEGDYVE	EKRPRVIQYP	3480
EAKMRLAITK	VMYNWVKQKP	IVIPGYEGKT	PLFHVFDKVH	KEWKNFNSPV	AVSFDTKAWD	3540
TQVTPKDLLL	ISEIQKYYYK	KEYHRFIDNL	TEKMVEVPV	CEDGNVYIRE	GQRGSGQPD	3600
SAGNSMLNVL	TMIYAFCKAN	SIPYSAFHRV	AKIHVCGDDG	FLITEKSFG	AFAIKGPQIL	3660
MEAGKPQKLI	GEFGLKLAYK	PDDIEFCSHT	PIKVRWADNN	TSYMPGRDTA	TILAKMATRL	3720
DSSGERGTEG	YELAVAFSFL	LMYSWNPLVR	RICLLVMSTI	DTKEASQNT	IYTFRGDPFG	3780
AYTEVIGYRL	DQLKQTEFSK	LAQLNLSMAI	LQIYNKNTTK	RLIEDCVKLG	NQNKQILVNA	3840
DRLISKKTGY	TYEPTAGHTK	IGKHYYEINL	LKDTPOKTVY	QGTERY		3886

Secuencia

5 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 418
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 3
 Descripción de la secuencia: 5'UTR
 <213> Nombre del organismo: virus PMC

10

gtataacgac	agtagttcaa	gtgtcggttat	gcatacattgg	ccataacaaa	ttatctaatt	60
tggaataggg	acctgcgacc	tgtacgaagg	ccgagcgctcg	gtagccattc	cgactagtag	120
gactagtaca	aataggtcaa	ctgggttgagc	aggtgagtg	gctgcagcgg	ctaagcgggtg	180
agtacaccgt	attcggtcaac	agggtgtact	ggaaaggatc	accactagc	gatgcctgtg	240
tggaacgagga	catgtccaag	ccaatgttat	cagtagcggg	ggtcggttact	gagaaagctg	300
cccagaatgg	gtagttgcac	atacagttctg	ataggatgcc	ggcggatgcc	ctgtattttg	360
accagtataa	atattatccg	ttgtaaaagca	tatgaatact	tttactttta	atacatat	418

Secuencia

15 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 504
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 4
 Descripción de la secuencia: NPro
 <213> Nombre del organismo: virus PMC

ggagggagtg	aggaaggaaa	catgttcttt	agaactgcac	ccacgccgcc	accaggggtgc	60
caagaaccgg	tttacacaag	cacaatgaga	ccaatttttg	gcgaacccca	tccacctcta	120
cacaaacaca	gcacgttaaa	attgccacat	tggaggggga	tcaaaacaat	tagagttaag	180
aagagagaat	tgccaaagaa	gggcgattgt	agcaactcaa	caacagctcc	cacttcgggg	240
gtgtacgttg	aattaggggc	tgtgttctat	aaagattaca	cgggcacggt	ataccatcgt	300
gtaccgctag	aactttgtac	aaaccaagag	aggtgcgagg	gatccaagtg	tgtagggaga	360
atgacaggg	ctgatggcag	gttggtacaac	gttttagtat	gtccggacga	ttgtatcctc	420
tttgagagac	actgtagagg	tcaaacagtc	gtcctgaaat	ggatttccaa	ccccttgaca	480
tcaccacttt	gggtccagag	ttgt				504

Secuencia

5 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 297
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 5
 Descripción de la secuencia: Cápsida
 <213> Nombre del organismo: virus PMC

tctgacgaca	aaggagcaaa	acccaaggtg	aaaccaaag	acgacaggat	gaagcaagga	60
aaaatagtga	caaagcctaa	agagactgaa	gcagatcaaa	aaactagacc	accagatgcc	120
acgatatggg	ttgacgggca	gaagtatcag	gtgaggaaga	aggggaaagc	gaaacccaag	180
actcaagacg	gcttatacca	caacaagaac	aaaccagaag	cgtccaggaa	gaagcttgag	240
aaggccttgc	tagcatgggc	aatattagcc	tgcctattgg	tggtaccggt	aggggtcc	297

Secuencia

15 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 666
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 6
 Descripción de la secuencia: E0
 <213> Nombre del organismo: virus PMC

accaacgtga	cacaatggaa	cttatgggac	aataaaagta	ctacagacat	acatagcgtc	60
atgttttcta	gagggattaa	aaggagtctg	catggaattt	ggcccacaca	aatctgcaaa	120
gggatcccta	cacatctagc	agcagactat	gaactgaaaa	ggattcacgg	gatgggtggat	180
gcaagcccca	tgaccaactt	cacatgttgt	aggtacaga	gacatgagtg	gaacaagcat	240
gggtggtgca	actggtacaa	tatagagccg	tggatcaatc	tcataaataa	taccaagga	300
ctattaaaca	ctggagacaa	tttcactgag	tgcgcagtca	catgcaggta	tgatgcagac	360
ttaggggtga	atatagtgac	tcaagccagg	actactccaa	ctatcctgac	tggctgtaag	420
aaagggcaca	acttctcttt	ctcaggggag	gtcagggcct	cacctgcaa	ctttgagtta	480
actgctgaag	acttgctcag	gatcatggat	cacaccaact	gcgagggatt	tacctacttc	540
ggggaaggaa	tcgttgacgg	ttacaccgag	gtagtagaga	aggccagggtc	aagtggtttc	600
agggctctca	catggttgtc	gagtaagatt	gaaaacacca	agaaaaaat	attcggagct	660
gaagcc						666

Secuencia

25 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 588
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 7
 Descripción de la secuencia: E1
 <213> Nombre del organismo: virus PMC

agtccttact	gccagtggtc	taagaggggtc	ttcaacatta	tttatacca	caattgcacc	60
ccgcttggac	tgccagataa	gtcaaaaatt	ataggaccag	gaacctttga	catcagtggtc	120
agggatgaat	tcatatttcc	aaaactcccc	taccacgtag	atgacttcat	tctactgagc	180
ttaattgcaa	tgtctgattt	tgtctcagag	acatcaagta	taatctacct	ggctttgcac	240
tacctaatgc	caagtaatga	caacagggac	ttcgtgatgg	acctggaccc	aaataaacta	300
aaccttactg	caactaaatc	cgtggcaagt	gtggtcctta	catcggtgaa	tgtgttaggt	360
gaattgggtg	gcgtcaaac	aagttggtgg	ccttattccg	ccgaaatcac	taactctgata	420
ggaggtgtca	tcaccgtggc	agacttagtt	atcaagacca	ttgaagaatt	gctaaatttg	480
tggaccgaag	caacagctgt	ggcatttctg	gctgctctaa	taaaaatttt	tagaggccag	540
ccgatccaag	cggtagcatg	gttaatcatc	atagggggag	cacaagcc		588

Secuencia

5 <212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 1131
Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 8
Descripción de la secuencia: E2
<213> Nombre del organismo: virus PMC

```

caaacctgca accctgaatt catgtacgca ttagcgaaaa ataccagcat aggttcatta 60
ggaccagaat cactgacgac aaggtggtac caactaacca gcggtttcaa actcactgac 120
agcacgattg aagtcacctg tgtgggtgct aacatgagga ttcattgtagt gtgcccactt 180
gtaagtgaca gatatttggc cataaaccac cctagagcac tgccaacaac ggcgtgggtc 240
aggaaaatac acactcagca tgaggtacca agagaaagaa tcatgagtga gtcaaaaagg 300
aggtagactt gtccttggg ttctaacca gtggtgaggt caacaacaca attcaaccca 360
atatctatat ctaccccaag ctttgaactt gaatgcceta ggggttggac tggggctgta 420
gagtgtacac tagtctcccc atcaactctg acaacagaga ctatattcac atacagggaag 480
cccaaaccat tcggacttga aaactggtgc aagtatacag tgggtggagaa agggatcctg 540
tattcttcta aatttggggg caattcaaca tgcatacaag ggcttatagt taaagggcaa 600
cgggaagaca aagtaaggta ctgtgaatgg tgtggttata agttcagttc accaaatgga 660
ctgcctcagt atccactggg attgtgtgag aaagaacaat cagaaggact cagggtattat 720
ggtgacttcc catgctgcaa caacggcact tgtattgaca aagaaggtag tgtgcaatgc 780
tacatagggg ataagaaagt taccgtgaag ctgtataatg cctcactatt ggcccccattg 840
ccctgcaaac ccatagtgtg taactcccag gggcccccag cgccctaagac ctgcacttat 900
aggtgggcct caacattaga aaataaatat tatgaaccca gggacagcta ctaccagcaa 960
tacattataa agtcagggtg tcaatattgg tttgatctca cagcaaagga tcatgtggca 1020
gactggatca caaaataact tccaataata atagtggcct tgtagggggg cagaggcacc 1080
ttgtgggtgt tgatagctta tgagttgcta actcagtatg aggtagtagg a 1131

```

Secuencia

15 <212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 216
Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 9
Descripción de la secuencia: P7
<213> Nombre del organismo: virus PMC

```

gacgagaaca tagtggctca agctgaagcc ctggtaatcg gaaacatctt gatgagttta 60
gacttagaga taattagctg cttccttctg ttgttgatcg tggtgaaaaa acaagctgtc 120
aggagaacgt tggctttact gtttcattgg ataactatga acccattcca gtcagtaatg 180
atcacagtgg tctacttcgt cgggttggtg agggcc 216

```

Secuencia

25 <212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 1404
Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 10
Descripción de la secuencia: NS2
<213> Nombre del organismo: virus PMC

```

gaagagggaa ctaaagaggg tagtacaagc gggccaccaa tccatgtagt tgcaatactg      60
ttattcctct tgtaccacac agtgaagtat aaggacttta acatagcaat gatcttactt      120
ataacattgt ccctgaaaag ctcatcctac atacatacca gcttgtaga aattccattg      180
cttggtgctg taataagtct cacatgctcc atatacattt ttgacttgca ggtaaagagc      240
aagctagtgg ccccaactat aggtataatt ggagttaccc tagcaatgag agttttgtgg      300
ctggtaaggc aaatgactat accaaccctc tctgtgtcca ttagtctgat agatccaaag      360
atggtcataa tactctactt gatatcccta actattacag tcaatcaca cctagacctt      420
gcaagttatt gcttgaaact gggacctttt atcctatcat tcctaacaat gtgggtggat      480
gttgatcatc tctgtctcat gctgccttgg tacgaactag taaaagtcta ctacctaaaa      540
aagaagaaag aggatgtgga aacatgggtc caaaattcag gaatatccac ccaagaaact      600
tccccatacg gatttgattt ttctagcccc ggggagggag tgcacacact accaatgcaa      660
aataaaacca aattttgtag gactgcttac atgactgtac taagggtctt ggtgataaca      720
gccatcagca gtgtctggaa accaataatt ttagcagaac tcctaataga ggcagtgtat      780
tggacacaca ttaaaatagc caaagaattg gcgggggtcaa gcagggtcgt tgctagggtc      840
attgcatcta ttatagagtt gaattgggac atggacgaaa aagaagcatc tcggtacaaa      900
agattttacc tattatcatc caaaataaca gatctaattg ttaagcaca aatccaaat      960
gagacagtaa aatcctggtt tgaagaaact gaaatatttg gaatacaaaa agtggcaatg     1020

gtgataaggg ctcatctctt gagtttggag ccaaattgcca tcctttgctc cgtttgtgaa     1080
gaaaaacaaa atcaaaaagc caaaaggccc tgccctaagt gtggtagtag aggcactcaa     1140
ataaagtgtg ggctgacact ggccgagttt gaggaagaac attacaaaa aatatacatc     1200
ctcgaaggcc aagatgaaac tcccatgagg aaagaagaaa gacagcaagt aacttatgtc     1260
tctaggggtg ctctgttcct taggaatctt cctatcttag cttcaaaaaa caaatacctt     1320
cttgtaggca atctgggtat ggaattgcaa gatttggaaa gtatgggatg gatcattcga     1380
gggccagccg tctgcaagaa gata                                     1404

```

Secuencia

5 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 2028
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 11
 Descripción de la secuencia: NS3
 <213> Nombre del organismo: virus PMC

10

atacaccatg	agaaatgcag	gccttcaata	ccagacaaac	tcattggcatt	cttcgggatt	60
atgcctaggg	gagttacacc	aagagcccc	acacgggtcc	ctgtgtcctt	gctgaagata	120
agacgggggt	ttgagaccgg	ctgggcctac	acacaccctg	gaggggtaag	tagtgtgatg	180
catgtcaccg	ctgggtcgga	tatatatgtc	aatgactcaa	tagggaggac	aaaaatccag	240
tgccaagaca	aaaacactac	aacagatgag	tgtgaatatg	gtgtgaaaac	agactcaggg	300
tgctctgatg	gagctcggtg	ctatgtcatc	aacctgaag	caaccaacat	agcagggacc	360
aagggggcca	tggtacacct	gaggaaagct	ggaggagagt	tcaactgctg	gactgccag	420
ggtacccccg	ccttctataa	tctaaagaac	ttaaaggat	ggtcaggcct	gcctatcttt	480
gaagctgcca	caggaagagt	ggtaggaagg	gtaaaagcag	gaaaaaacac	tgacaatgct	540
ccaacaacca	ttatgtcagg	gacgcaagt	gcaaaaccat	cagagtgtga	cctagaatca	600
gtggtgagga	aactagagac	aatgaacaga	ggggaattca	aacaagtgc	tctggctaca	660
ggcgagga	agacaacccat	gctaccaaag	ctgttaatat	aatccatagg	caggcataag	720
agagtgttag	tactgatccc	gttgagagct	gcagcggagg	gggtgtacca	gtacatgaga	780
accaaaccac	caagcatatc	tttcaacttg	aggatagggg	atctgaaaga	aggtgacatg	840
gcaactggga	tcacctatgc	ctcttatggg	tacttctgcc	aaatggacat	gcctagactg	900
gagaatgcaa	tgaaggaata	ccactatatt	ttcttggatg	aatatcactg	tgccacacca	960
gaacagttgg	cagtgtatgtc	aaaaatacat	aggttcgggtg	aatcagttag	ggtaaatagcc	1020
atgaccgcca	cgccatccgg	gactgtgagc	acaacagggc	agaaattcac	aattgaggag	1080
gtggtagtac	ctgaagtgat	gaagggggag	gaccttgctg	atgattacat	cgaaatagca	1140
gggttgaagg	tgccaaagaa	agagtttagag	ggtaacgtac	tgacttttgt	gcctacaagg	1200
aaagtggcat	cggaaacagc	aaaaaaatta	accacacagg	gatacaatgc	tggtactact	1260
ttcagtggag	aagatccatc	atccctgagg	acaactactt	ctaagtcacc	atatatagta	1320
gttgcaacca	atgccattga	atccggggta	accttaccgg	accttgatac	agtaatagat	1380
acagggcatga	agtgtgaaaa	gagactaaga	atcgaaaaca	aagctcccta	catcgtaaca	1440
ggactgaaaa	gaatggctat	aacaacgggg	gagcaagctc	aaagaaaagg	tagggtaggc	1500
aggggttaaac	ctgggaggta	cttgagagga	cctgaaaaca	ctgcagggtga	aaaggactat	1560
cactatgacc	ttttacaggc	acagagggtac	ggcatccaag	actcaataaa	catcaccaag	1620
tctttcaggg	agatgaacta	tgattgggca	ttatatgagg	aagaccggtt	aaagattgcc	1680
caattagagt	tgctaaacac	actcctgac	tcaagggtac	tgccagtgtg	aacaaaaaat	1740
ctgatggccc	gcacaacaca	tcccgaacct	atacaattgg	cttacaatag	tttagaaacc	1800
cctgtaccgg	tggtattccc	aaaagtgaag	aatggagaag	tcactgacgc	acatgaaact	1860
tacgagttga	tgacctgtag	gaagcttgag	aaagaccccc	ctatatacct	gtatgcaaca	1920
gaagaagaag	atctcgtagt	ggacatactg	ggattgaaat	ggccagacgc	cacagagagg	1980
gctgtcttgg	aagtgcaga	cgccctgggc	cagatcacag	gtttatct		2028

Secuencia

5 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 189
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 12
 Descripción de la secuencia: NS4A
 <213> Nombre del organismo: virus PMC

10

gcaggggaga	cagctttact	catagcccta	ttaggggtggg	tgggctacga	agccttggtg	60
aagaggcagc	tgccatgggt	gacagacata	tacaccctag	aagatgaaaa	attggaagac	120
actacacacc	tacaatttgc	cccagatgat	ctgaacaatt	cagataccat	tgagctccaa	180
gacttatcgc						189

Secuencia

15 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 1041
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 13
 Descripción de la secuencia: NS4B
 <213> Nombre del organismo: virus PMC

20

aatcaccaaa	tccaacaaat	tctagaaggt	gggaaggaat	atgtcggcca	agcctaccaa	60
ttcctcaggt	tgcaagctga	gagggctgcc	aactcagaca	aaggcaagaa	agcaatggca	120
gcggcccat	tactagccca	caagttcctg	gaatacttgc	aagagcatgc	aggtgacata	180
aagaagtatg	gtctatgggg	ggtccacaca	gcattgtata	acagcataaa	agaaagactg	240
ggtcacgaaa	ctgcattcgc	atctctgggt	ataaaatgga	ttgccttttc	ctcagatgga	300
gtcccgggga	tgattaagca	agcagcagta	gacttgggtg	tatactatat	aatcaacagg	360
cctgagtatc	aaggggataa	ggagacacag	aatgcaggta	gacaatttgt	tggtccctt	420
tttgtttcat	gtctagcaga	gtacacattc	aaaaacttca	ataaatcagc	attagaaggga	480
ttgatcgagc	ctgccttaag	ctatctaccc	tacgcttcaa	gcgcactaaa	gttattccta	540
ccgactagac	ttgaaagtgt	agtgatactg	tccactacta	tatacagaac	atacttatca	600
atcaggaaa	gatctagtca	gggttttagcc	gggctggcag	ttagctcagc	gatggagatc	660
atgaaccaga	acccaatcag	cgtggctatt	gcactggcac	taggagtcgg	agcaatagcg	720
gcacataatg	ccattgagag	cagtgaaggca	aaaaggactc	tcttgatgaa	ggtctttgtt	780
aagaactttt	tggaccaagc	agccactgat	gagcttgtga	aagagaaccc	tgagaagatc	840
ataatggcag	tgtttgaggg	cattcaaaca	gctggaaatc	cattgagact	tgtataccat	900
ctatatgcaa	tgttctacaa	aggggtgact	gccgcggaaa	tagctgaaaa	aaccgctggt	960
aggaacattt	ttgtgttaac	aatatttgaa	ggattggaaa	tgttaggcct	ggatgccgac	1020
tcaaaatgga	gaaatctgag	c				1041

Secuencia

5 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 1515
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 14
 Descripción de la secuencia: NS5A
 <213> Nombre del organismo: virus PMC

10

tctaattatc	ttattgatgc	agtgaagaaa	atcattgaaa	aaatgactaa	aacagcaaca	60
agcttcacct	acagcttttt	gaaatctttg	cttctctgcc	ccttctctgtg	tactaaatca	120
gaaagagatc	caagaatagg	gtggccccc	aaagactacg	actacctcga	ggtccgatgc	180
gcttgtgggt	ataacaggag	agctataaaa	agagactcag	gacctgtgtt	atgggagacc	240
ttagaggaga	cgggtccaga	gtactgccac	aacagagggtg	aaagggggct	cagcaatgtg	300
aagactacta	gatgctttgt	ccaaggagag	gaaatccctc	caattgcact	gaggaaaggga	360
gtagggtgaga	tggttggtcaa	gggtgtttca	ttcagaatag	attttgataa	agacaagata	420
ctttcaacag	acaagtggaa	ggtaccacat	agggcagtta	catcaatctt	tgaggatttg	480
caggggtattg	gttacagaga	ggcttaccta	gggaccaaac	cagactatgg	gggtctgggtg	540
cccagatctt	gtgtaactgt	aacaaaacaa	gggttaacat	tcttgaaaac	tgccagaggc	600
atggctttca	cgaactgacct	gaccatccag	aacatcaaaa	tgctgatagc	tacatgcttc	660
aagaacaagg	tgaagggaag	ggagatacca	gctacgattg	aaggggaaac	atggatcaac	720
ataccactag	tgaatgagga	caccgggacc	attaaaccaa	gcttcgggga	aagagtgatt	780
cccgaaccat	atgaggagga	cccacttgaa	ggcccaagtg	taatcgttga	aacaggaggc	840
atagccatca	accaaatagg	ggtcaatcca	caatccagta	catgtggaac	agtttttaca	900
gcagtgaagg	atctgtgccca	aacagttagt	aataaagcca	agaatatcaa	aattgggttt	960
tcggaaggcc	aatacccagg	tccaggggtt	gcaaagaaga	cactgaacca	gctcatacaa	1020
gatgaagacc	caaaaccatt	catatttgtt	tgtggctctg	acaagtcaat	gtctaactcg	1080
gcaaaaactg	cgaggaacat	caagagaatc	accaccacaa	cacctgagaa	attcagagac	1140
ttggcaaaaa	acaagaaatt	gataattgtg	ctgttaggtg	atagatacca	tgaagatata	1200
gaaaagtatg	cagacttcaa	gggcaccttc	ttgaccagac	aaaccttgga	agcactagca	1260
agtgccaaag	ctgtagagaa	ggacatgacc	aagaaagaag	cagcaagagt	attggcaatg	1320
gaagaaaagg	atgaactaga	actcccaggg	tggtctcata	cagatgcacc	caaattccta	1380
gacattacta	aggacaacat	cacacatcac	ctaatagggg	acatgcagag	tctgagagaa	1440
agagcagggg	agataggagc	aaaggccacc	actcaaatca	ctaagaaaag	gagtgtatac	1500
acaatcaatc	tgagt					1515

Secuencia

15 <212> Tipo: ADN
 <211> Longitud: 2080
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 15
 Descripción de la secuencia: NS5B
 <213> Nombre del organismo: virus PMC

20

acgtggtggg	agtcagagag	gttggcatct	ttggaacctt	tggtccggga	actactatct	60
aaatgcaggc	cagtggacag	ggagacatat	aagaattgtc	attttgcaac	agcagcccaa	120
cttgccggag	gaaactgggt	accggtagca	ccagttgtac	atcttgggga	aattccggta	180
aagaagaaaa	agactctccc	ctacgaggca	tacaagctcc	taaaagagat	ggttgactcg	240
gagaaggaat	tccataaacc	agtgagcagg	gaaaaacacc	aatggatact	gaacaaagtg	300
aaaactgggtg	gtgacctcgg	cttaaaaaat	ctagtatgtc	caggtagggg	tggagaacca	360
atcctaagag	agaagaagaa	attcaacatt	tacaacaaga	ggattaccag	tactatgtta	420
tcagtaggga	taaggccaga	aaaattgcc	gtggtaagag	cccagaccag	taccaaagaa	480
tttcatgaag	caataaggga	caaaatagac	aaaaaagcaa	acacacagac	cccaggccta	540
cacaaagaat	tgttggagat	attcaactca	atatgtgcc	tccccgaact	tagaaatacc	600
tacaaagagg	ttgattggga	cgttctaacc	tcaggcataa	ataggaaagg	tgagccggg	660
tacttcgaaa	aaatgaacat	aggggagatc	atagatagt	acaaaaaatc	agtggacaa	720
ctcataaaga	gaatgaaatc	agggctagaa	ttcaactact	atgagactgc	aataccaaaa	780
aatgagaaga	gggcagtgg	agatgattgg	atggaagggt	actatgtaga	agaaaaaga	840
ccaagagtca	tacagtatcc	tgaggcaaag	atgagattag	ctataaccaa	agtaatgtat	900
aactgggtca	acagaagcc	tatagtaatc	cctggatacg	aaggtaagac	tcctttgttt	960
catgttttcg	acaaggtcca	caaagaatgg	aaaaatttca	acagtccagt	tgagtcagt	1020
tttgacacta	aagcctggga	cacacaagta	acacccaaag	accttctcct	catatcagaa	1080
atccaaaagt	attattacaa	gaaagaatac	catagattca	tagataattt	gaccgagaaa	1140
atggtggagg	taccagtgg	ttgtgaagac	ggaaacgtct	acataagaga	aggtcagagg	1200
ggaagtggtc	aaccagacac	tagcgcagg	aatagtatgt	tgaatgtact	gactatgata	1260
tatgccttct	gcaaagctaa	ctccatccct	tactcagcct	tccacagggt	agcaaagata	1320
catgtgtgtg	gagatgatgg	tttcttgata	actgagaaaa	gttttgggtg	ggcctttgctg	1380
atcaaggggc	ctcaaat	gatggaagca	ggaaaaccac	aaaaacttat	aggtgaattt	1440
ggactgaaat	tggtcatata	atttgatgac	attgaatttt	gctcgcatac	accaataaag	1500
gtcaggtggg	ctgacaacaa	cacatcatac	atgcccggaa	gagacacagc	taccattcta	1560
gctaaaatgg	caaccgcct	tgactctagt	ggggagaggg	ggaccgaggg	atacagagctg	1620
gccgtggcct	tcagtttctt	actaatgtat	tcttgggaacc	ccctggtaag	aagaatatgc	1680
ctgcttggtc	tgctacaat	tgacacaaaa	gaagctagcc	aaaataacac	tatatataca	1740
tttagggggg	atcccatagg	tgectacaca	gaggtaattg	ggtataggct	ggaccaacta	1800
aaacagacag	agttctctaa	attggctcag	ctgaatttgt	caatggcaat	acttcaaata	1860
tacaataaaa	acacaaccaa	gagactcatc	gaagattgtg	tgaaacttgg	caaccaaata	1920
aagcaaatat	tggtgaatgc	agaccgtttg	atcagcaaga	aaacgggcta	cacatatgag	1980
ccaacagctg	gccacactaa	gataggcaag	cactatgaag	aaatcaacct	gctgaaagat	2040
acaccacaaa	aaactgtcta	ccaagggaact	gaaaggata			2080

Secuencia

5 <212> Tipo: PRT
 <211> Longitud: 167
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 16
 Descripción de la secuencia: proteína NPro
 <213> Nombre del organismo: virus PMC

10

GGSEEGNMFF	RTAPTTPPGC	QEPVYTSTMR	PIFGEPHPPL	HKHSTLKLPH	WRGIKTIRVK	60
KRELPPKKGDC	SNSTTAPTSG	VYVELGAVFY	KDYTGTVYHR	VPLELCTNQE	RCEGSKCVGR	120
MTGSDGRLYN	VLVCPDDCIL	FERHCRGQTV	VLKWISNPLT	SPLWVQS		167

Secuencia

15 <212> Tipo: PRT
 <211> Longitud: 99
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 17
 Descripción de la secuencia: proteína cápsida
 <213> Nombre del organismo: virus PMC

20

SDDKGAKPKV	KPKDDRMKQG	KIVTKPKETE	ADQKTRPPDA	TIVVDGQKYQ	VRKKGKAKPK	60
TQDGLYHNKN	KPEASRKKLE	KALLAWAILA	CLLVVPVGS			99

Secuencia

<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 222
Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 18
Descripción de la secuencia: proteína E0
<213> Nombre del organismo: virus PMC

TNVTQWNLWD	NKSTTDIHSV	MFSRGIKRSI	HGIWPTQICK	GIPTHLAADY	ELKRIHGMVD	60
ASPMTNFTCC	RLQRHEWNKH	GWCNWNIEP	WINLMNNTQG	LLNTGDNFTE	CAVTCRYDAD	120
LGVNIVTQAR	TPPTILTQCK	KGHNFSSSGE	VRASPCNFEL	TAEDLLRIMD	HTNCEGFTYF	180
EGEIVDGYTE	VVEKARSSGF	RALTWLSSKI	ENTKKKIFGA	EA		222

Secuencia

<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 196
Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 19
Descripción de la secuencia: proteína E1
<213> Nombre del organismo: Virus PMC

SPYCPVAKRV	FNIITYNNCT	PLGLPDKSKI	IGPGTFDISG	RDEFIFPKLP	YHVDDFILLS	60
LIAMSDFAPE	TSSIIYLALH	YLMPSNDNRD	FVMDLDPNKL	NLTATKSVAS	VVPTSVNVLG	120
EWVCVKPSWW	PYSAEITNLI	GGVITVADLV	IKTIEELLNL	WTEATAVAFL	AALIKIFRGQ	180
PIQAVAWLII	IGGAQA					196

Secuencia

<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 377
Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 20
Descripción de la secuencia: proteína E2
<213> Nombre del organismo: Virus PMC

QTCNPEFMYA	LAKNTSIGSL	GPESLTTRWY	QLTSGFKLTD	STIEVTCVGA	NMRIHVVCPL	60
VSDRYLAINH	PRALPTTAWF	RKIHTQHEVP	RERIMSESKR	RYTCPCGSKP	VVRSTTQFNP	120
ISISTPSFEL	ECPRGWTGAV	ECTLVSPSTL	TTETIFTYRK	PKPFGLENWC	KYTVVEKGIL	180
YSCKFGGNST	CIKGLIVKGQ	REDKVRyceW	CGYKFSSPNG	LPQYPLGLCE	KEQSEGLRDY	240
GDFPCCNNGT	CIDKEGSVQC	YIGDKKVTVK	LYNASLLAPM	PCKPIVYNSQ	GPPAPKTCTY	300
RWASTLENKY	YEPRDSYYQQ	YIIKSGYQYW	FDLTAKDHVA	DWITKYFPPI	IVALLGGRGT	360
LWVLIAYELL	TQYEVVG					377

Secuencia

<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 72
Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 21
Descripción de la secuencia: proteína P7
<213> Nombre del organismo: Virus PMC

DENIVAQAEA	LVIGNILMSL	DLEIISCFLL	LLIVVKKQAV	RRTLALLFWH	ITMNPFSVM	60
ITVVYFVGLV	RA					72

Secuencia

<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 468
Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 22
Descripción de la secuencia: proteína NS2
<213> Nombre del organismo: Virus PMC

EEGKKEGSTS	GPPIHVVAIL	LFLLYHTVKY	KDFNIAMILL	ITLSLKSSSY	IHTSLYEIPL	60
LVAVISLTCS	IYIFDLQVKS	KLVAPTIGII	GVTLAMRVLW	LVRQMTIPTP	SVSISLIDPK	120
MVIIYLISL	TITVNHNLDL	ASYCLKLGPF	ILSFLTMWVD	VVILLMLPW	YELVKVYYLK	180
KKKEDVETWF	QNSGISTQET	SPYGFDFSSP	GEVHTLPMQ	NKTKFCRTAY	MTVLRALVIT	240
AISSVWKPII	LAELLIEAVY	WTHIKIAKEL	AGSSRFVARF	IASIIELNWA	MDEKEASRYK	300
RFYLLSSKIT	DLMVKHKIQN	ETVKSWEET	EIFGIQKVAM	VIRAHSLSL	PNAILCSVCE	360
EKQKQAKRP	CPKCGSRGTQ	IKCGLTLAEF	EEHYKKIYI	LEGQDETPMR	KEERQQVTYV	420
SRGALFLRNL	PILASKNKYL	LVGNLGMELQ	DLESMGWIIR	GPAVCKKI		468

Secuencia

5 <212> Tipo: PRT
 <211> Longitud: 676
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 23
 Descripción de la secuencia: proteína NS3
 <213> Nombre del organismo: Virus PMC

IHHEKCRPSI	PDKLMAFFGI	MPRGVTPRAP	TRFPVSLKI	RRGFETGWAY	THPGGVSSVM	60
HVTAGSDIYV	NDSIGRTKIQ	QODKNTTIDE	CEYGVKTDG	CSDGARCXYI	NPEATNIAGT	120
KGAMVHLRKA	GGEFNCVTAQ	GTPAFYNLKN	LKGWSGLPIF	EAATGRVVGR	VKAGKNTDNA	180
PTTIMSGTQV	AKPSECDLES	VVRKLETMNR	GEFKQVTLAT	GAGKTTMLPK	LLIESIGRHK	240
RVLVLIPLRA	AAEGVYQYMR	TKHPSISFNL	RIGDLKEGDM	ATGITYASYG	YFCQMDMPRL	300
ENAMKEYHYI	FLDEYHCATP	EQLAVMSKIH	RFGESVRVIA	MTATPSGTVS	TTGQKFTIEE	360
VVVPEVMKGE	DLADDYIEIA	GLKVPKKELE	GNVLTFFVPT	KMASETAKKL	TTQGYNAGYY	420
FSGEDPSSLR	TTTSKSPYIV	VATNAIESGV	TLPDLDTVID	TGMKCEKRLR	IENKAPYIVT	480
GLKRMAITTG	EQAQRKGRVG	RVKPGRYLRG	PENTAGEKDY	HYDLLQAQRY	GIQDSINITK	540
SFREMNYDWA	LYEEDPLKIA	QLELLNTLLI	SRDLPVVTKN	LMARTTHPEP	IQLAYNSLET	600
PVPVAFPKVK	NGEVTDAHET	YELMTCRKLE	KDPPIYLYAT	EEEDLVVDIL	GLKWPDAATER	660
AVLEVQDALG	QITGLS					676

Secuencia

15 <212> Tipo: PRT
 <211> Longitud: 63
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 24
 Descripción de la secuencia: proteína NS4A
 <213> Nombre del organismo: Virus PMC

AGETALLIAL	LGVVGYEALV	KRHVPMVTDI	YTLEDEKLED	TTHLQFAPDD	LNNSDTIELQ	60
DLS						63

Secuencia

25 <212> Tipo: PRT
 <211> Longitud: 347
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 25
 Descripción de la secuencia: proteína NS4B
 <213> Nombre del organismo: Virus PMC

NHQIQQILEG	GKEYVGQAYQ	FLRLQAERAA	NSDKGKKAMA	AAPLLAHKFL	EYLQEHAGDI	60
KKYGLWGVHT	ALYNSIKERL	GHEAFASLV	IKWIAFSSDG	VPGMIKQAAV	DLVVYYIINR	120
PEYQGDKESTQ	NAGRQFVGS	FVSCLAEYTF	KNFNKSALEG	LIEPALSYP	YASSALKLFL	180
PTRLESVVIL	STTIYRTYLS	IRKSSQGLA	GLAVSSAMEI	MNQNPISVAI	ALALGVGAIA	240
AHNAIESSEA	KRTLLMKVFN	KNFLDQAATD	ELVKENPEKI	IMAVFEGIQT	AGNPLRLVYH	300
LYAMFYKGWT	AAEIAEKTAG	RNIFVLTIFE	GLEMLGLDAD	SKWRNLS		347

Secuencia

35 <212> Tipo: PRT
 <211> Longitud: 505
 Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 26

Descripción de la secuencia: proteína NS5A
<213> Nombre del organismo: Virus PMC

SNYLIDAVKK IIEKMTKTAT SFTYSFLKSL LPAPFSCTKS ERDPRIGWPQ KDYDYLEVRC	60
ACGYNRRRAIK RDSGPVLWET LEETGPEYCH NRGERGLSNV KTTRCFVQGE EIPPIALRKG	120
VGEMLVKGVVS FRIDFDKDKI LSTDKWKVPH RAVTSIFEDW QGIGYREAYL GTKPDYGGVLV	180
PRSCVTVTQK GLTFLKTARG MAFTTDLTIQ NIKMLIATCF KNKVKEGEIP ATIEGETWIN	240
IPLVNEDTGT IKPSFGERVI PEPYEEDPLE GPSVIVETGG IAINQIGVNP QSSTCGTVFT	300
AVKDLQCQTVS NKAKNIKIGF SEGQYPGPGV AKKTLNQLIQ DEDPKPFIFV CGSDKSMSNR	360
AKTARNIKRI TTTTPEKFRD LAKNKKLIIV LLGDRYHEDI EKYADFKGTF LTRQTLLEALA	420
SAKAVEKDMT KKEAARVLAM BEKDELELPG WLHTDAPKFL DITKDNITHH LIGDMQSLRE	480
RAGEIGAKAT TQITKKGSVY TINLS	505

5

Secuencia

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 693

10

Nombre de la secuencia: SEC ID N°: 27

Descripción de la secuencia: proteína NS5B

<213> Nombre del organismo: Virus PMC

TWWESERLAS LEPLFRELLS KCRPVDRETY KNCHFATAAQ LAGGNWVPVA PVVHLGEIPV	60
KKKKTLPYEA YKLLKEMVDS EKEFHKPVSR EKHQWILNKV KTGGDLGLKN LVCPGRVGEP	120
ILREKKKFNI YNKRITSTML SVGIRPEKLP VVRAQTSTKE FHEAIRDKID KKANTQTPGL	180
HKELLEIFNS ICAIPELRNT YKEVDWDVLT SGINRKAAG YPEKMNIGEI IDSDKKSVEQ	240
LIKRMKSGLE FNYETAIPK NEKRAVVDDW MEGDYVEEKR PRVIQYPEAK MRLAITKVMY	300
NWVKQKPIVI PGYEGKTPLF HVFDKVHKEW KNFNSPVAVS FDTKAWDTQV TPKDLLLISE	360
IQKYYYKKEY HRFIDNLTEK MVEVPVVCED GNVYIREGQR GSGQPDTSAG NSMLNVLTMI	420
YAFCKANSIP YSAFHRVAKI HVCDDGFLI TEKSFGAFA IKGPQILMEA GKPQKLIGEF	480
GLKLAYKFDD IEFCSHTPIK VRWADNNTSY MPGRDTATIL AKMATRLDSS GERGTGEYEL	540
AVAFSFLLMY SWNPLVRRIC LLVMSTIDTK EASQNNTIYT FRGDPIGAYT EVIGYRLDQL	600
KQTEFSKLAQ LNLMAILQI YNKNTTKRLI EDCVKLGQNQ KQILVNADRL ISKKTGYTYE	660
PTAGHTKIGK HYBEINLLKD TPQKTVYQGT ERY	693

15

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia aislada de nucleótidos de ARN o ADN del virus PMC que se une al ácido nucleico de PMC en condiciones rigurosas de hibridación **caracterizada por que** dicha secuencia aislada de nucleótidos de ARN o ADN del virus PMC consiste en:
 - a) la SEC ID N° 11, en la que cuando la secuencia aislada de nucleótidos de ARN o ADN es una secuencia de nucleótidos de ARN, los nucleótidos de timidina (t) están sustituidos con nucleótidos de uridina (u);
 - b) una secuencia de ARN o ADN que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia sobre al menos 100 nucleótidos con la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N° 11; o
 - c) una secuencia de nucleótidos de ARN o ADN que comprende el complemento de la secuencia de nucleótidos de (a) o (b).
2. Un método para detectar la presencia o la ausencia de ácidos nucleicos del virus PMC en una muestra biológica, incluyendo el método las etapas de:
 - a) poner la muestra biológica que contiene ácido nucleico en contacto con una sonda polinucleotídica o un cebador que comprenden una secuencia aislada de nucleótidos de ARN o ADN de acuerdo con la reivindicación 1, en condiciones rigurosas de hibridación; ydetectar cualquier dúplex formado entre la sonda o el cebador y los ácidos nucleicos en la muestra.
3. Un método para la detección de ácidos nucleicos del virus PMC presentes en una muestra biológica, incluyendo el método las etapas de:
 - a) amplificar los ácidos nucleicos con al menos un cebador que comprende una secuencia aislada de nucleótidos de ARN o ADN de acuerdo con la reivindicación 1, y
 - b) detectar las secuencias de nucleótidos amplificadas.
4. Un método para la detección de ácidos nucleicos del virus PMC presentes en una muestra biológica, incluyendo el método las etapas de:
 - a) hibridar los ácidos nucleicos de la muestra biológica en condiciones rigurosas de hibridación con una o más sondas que comprenden una secuencia aislada de nucleótidos de ARN o ADN de acuerdo con la reivindicación 1,
 - b) lavar en condiciones apropiadas, y
 - c) detectar los híbridos formados.
5. Un método para explorar el tejido de sujetos para ácidos nucleicos del virus PMC, comprendiendo el método las etapas de:
 - a) extraer el ADN del tejido *ex vivo*;
 - b) escindir con enzimas de restricción dicho ADN;
 - c) someter a electroforesis los fragmentos; y
 - d) someter a transferencia de Southern el ADN genómico de los tejidos y a posterior hibridación en condiciones rigurosas de hibridación con una secuencia de nucleótidos de ADN clonada marcada de acuerdo con la reivindicación 1.

Figura 1

gtataacgac	agtagttcaa	gtgtcgttat	gcacatttgg	ccataacaaa	ttatctaatt	60
tggaaatagg	acctgcgacc	tgtacgaagg	ccgagcgctg	gtagccattc	cgactagtag	120
gactagtaca	aataggtcaa	ctgggttgagc	aggtgagtg	gctgcagcgg	ctaagcggtg	180
agtacaccgt	attcgtcaac	aggtgctact	ggaaaggatc	accactagc	gatgcctgtg	240
tggacgagga	catgtccaag	ccaatgttat	cagtagcggg	ggtcggtact	gagaaagctg	300
cccagaatgg	gtagttgcac	atacagtcctg	ataggatgcc	ggcggatgcc	ctgtattttg	360
accagtataa	atattatccg	ttgtaaagca	tatgaatact	tttactttta	atacatatgg	420
agggagtgag	gaaggaaaca	tgttcttttag	aactgcaccc	acgcccacac	cagggtgcca	480
agaaccgggt	tacacaagca	caatgagacc	aatttttggc	gaaccccatc	cacctctaca	540
caaacacagc	acgttaaaat	tgccacattg	gagggggatc	aaaacaatta	gagttaagaa	600
gagagaattg	ccaaagaagg	gcgattttag	caactcaaca	acagctccca	cttcgggggt	660
gtacgttgaa	ttaggggctg	tgttctataa	agattacacg	ggcagcgtat	accatcgtgt	720
accgctagaa	ctttgtacaa	accaagagag	gtgcgaggga	tccaagtgtg	tagggagaat	780
gacaggggtc	gatggcaggt	tgtacaacgt	tttagtatgt	ccggacgatt	gtatcctctt	840
tgagagacac	tgtagaggtc	aaacagtcgt	cctgaaatgg	atttccaacc	ccttgacatc	900
accacttttg	gtccagagtt	gttctgacga	caaaggagca	aaacccaagg	tgaaaccaaa	960
agacgacagg	atgaagcaag	gaaaaatagt	gacaaagcct	aaagagactg	aagcagatca	1020
aaaaactaga	ccaccagatg	ccacgatagt	ggttgacggg	cagaagtatc	aggtgaggaa	1080
gaaggggaaa	gcgaaaccca	agactcaaga	cggcttatac	cacaacaaga	acaaaccaga	1140
agcgtccagg	aagaagcttg	agaaggcctt	gctagcatgg	gcaatattag	cctgcctatt	1200
ggtggtaccg	gtaggggtcca	ccaacgtgac	acaatggaac	ttatgggaca	ataaaaagta	1260
tacagacata	catagcgtca	tgttttctag	agggattaaa	aggagtctgc	atggaaattg	1320
gccacacaaa	atctgcaaa	ggatccctac	acatctagca	gcagactatg	aactgaaaag	1380
gattcacggg	atgggtgatg	caagcccat	gaccaacttc	acatgttgta	ggctacagag	1440
acatgagtg	aacaagcatg	ggtggtgcaa	ctgggtacaat	atagagccgt	ggatcaatct	1500
catgaataat	acccaaggac	tattaaacac	tggagacaat	ttcactgagt	gcgcagtcac	1560
atgcaggtat	gatgcagact	taggggtgaa	tatagtgaat	caagccagga	ctactccaac	1620
tatcctgact	ggctgtaaga	aagggcacaa	cttctcttct	tcaggggagg	tcagggcctc	1680
acctgtcaac	tttgagttaa	ctgctgaaga	cttgctcagg	atcatggatc	acaccaactg	1740
cgagggattt	acctactctg	gggaaggaa	cgttgacggg	tacaccgagg	tagtagagaa	1800
ggccaggtca	agtgggttca	gggctctcac	atgggttctg	agtaagattg	aaaacaccaa	1860
gaaaaaaata	ttcggagctg	aagccagtc	ttactgcccc	gtggctaaga	gggtcttcaa	1920
cattattttat	accaacaatt	gcaccccgct	tggactgcca	gataagtcaa	aaattatagg	1980
accaggaacc	tttgacatca	gtggcaggga	tgaattcata	tttccaaaac	ttccctacca	2040
cgtagatgac	ttcattctac	tgagcttaat	tgcacatgct	gattttgctc	cagagacatc	2100
aagtataatc	tacctggctt	tgcactacct	aatgccaaat	aatgacaaca	gggactcgt	2160
gatggacctg	gaaccaaata	aactaaacct	tactgcaact	aaatccgtgg	caagtgtggt	2220
ccctacatcg	gtgaatgtgt	taggtgaatg	ggtgtgcgtc	aaaccaagtt	ggtggcctta	2280
ttccgccgaa	atcactaatc	tgataggagg	tgtcatcacc	gtggcagact	tagttatcaa	2340
gaccattgaa	gaattgctaa	atttgtggac	cgaagcaaca	gctgtggcat	ttctggctgc	2400
tctaataaaa	attttttagag	gccagccgat	ccaagcggta	gcatgggtta	tcatcatagg	2460
gggagcacia	gcccacacct	gcaacccctg	attcatgtac	gcattagcga	aaaataccag	2520
cataggttca	ttaggaccag	aatcactgac	gacaagggtg	taccaactaa	ccagcgggtt	2580
caaactcact	gacagcacga	ttgaagtcac	ctgtgtgggt	gctaacatga	ggattcatgt	2640
agtgtgccca	cttgtaagtg	acagatattt	ggccataaac	caccctagag	cactgccaac	2700
aacggcgtgg	ttcaggaaaa	tacacactca	gcatgaggta	ccaagagaaa	gaatcatgag	2760
tgagtcaaaa	aggaggtaca	cttgtccttg	tggttctaaa	ccagtgggtg	ggtcaacaac	2820
acaattcaaa	ccaatatcta	tatctacccc	aagctttgaa	cttgaatgcc	ctaggggttg	2880
gactggggct	gtagagtgtg	cactagtctc	cccatcaact	ctgacaacag	agactatatt	2940
cacatacagg	aagcccaaac	cattcggact	tgaaaactgg	tgcaagtata	cagtgggtga	3000
gaaagggatc	ctgtattctt	gtaaatttgg	gggcaattca	acatgcatca	aagggttat	3060
agttaaaagg	caacgggaag	acaaagtaag	gtactgtgaa	tgggtgtggt	ataagttcag	3120
ttcaccaaat	ggactgcctc	agtatccact	gggattgtgt	gagaaagaac	aatcagaagg	3180
actcagggat	tatggtgact	tcccatgctg	caacaacggc	acttgtattg	acaaagaagg	3240
tagtgtgcaa	tgctacatag	gggataagaa	agttaccgtg	aagctgtata	atgcctcact	3300
attggccccc	atgccctgca	aaccatagat	gtataactcc	caggggcccc	cagcgcctaa	3360
gacctgcact	tataggtggg	cctcaacatt	agaaaaataa	tattatgaac	ccagggacag	3420
ctactaccag	caatacatta	taaagtcagg	gtatcaatat	tggtttgatc	tcacagcaaa	3480

ggatcatgtg	gcagactgga	tcacaaaata	ctttccaata	ataatagtgg	ccttggttagg	3540
gggcagaggc	accttgtggg	tgttgatagc	ttatgagttg	ctaactcagt	atgaggtagt	3600
aggagacgag	aacatagtgg	ctcaagctga	agccctggta	atcggaaaca	tcttgatgag	3660
tttagaactta	gagataatta	gctgcttcc	tctgttggtg	atcgtggtga	aaaaacaagc	3720
tgtcaggaga	acgttggtt	tactgtttca	ttggataact	atgaacccat	tccagtcagt	3780
aatgatcaca	gtggtctact	tctgctggtt	ggtgagggcc	gaagagggaa	ctaaagaggg	3840
tagtacaagc	gggccaccaa	tccatgtagt	tgcaatactg	ttattcctct	tgtaccacac	3900
agtgaagtat	aaggacttta	acatagcaat	gatcttactt	ataacattgt	ccctgaaaag	3960
ctcatcctac	atacatacca	gcttgtatga	aattccattg	cttgtggctg	taataagtct	4020
cacatgtctc	atatacattt	ttgacttgca	ggtaaagagc	aagctagtgg	ccccactat	4080
aggtataatt	ggagttaccc	tagcaatgag	agttttgtgg	ctggtaaggc	aaatgactat	4140
accaaccccc	tctgtgtcca	ttagtctgat	agatccaaag	atggtcataa	tactctactt	4200
gatatcccta	actattacag	tcaatcacaa	cctagacctt	gcaagtattt	gcttgaaact	4260
gggacctttt	atcctatcat	tcctaacaat	gtgggtggat	gttgtcatcc	tcctgctcat	4320
gctgccttgg	tacgaactag	taaaagtcta	ctacctaaaa	aagaagaaag	aggatgtgga	4380
aacatgggtc	caaaattcag	gaatatccac	ccaagaaact	tcccatacg	gatttgattt	4440
ttctagcccc	ggggagggag	tgacacacac	accaatgcaa	aataaaacca	aattttgtag	4500
gactgcttac	atgactgtac	taagggcttt	ggtgataaca	gccatcagca	gtgtctggaa	4560
accaataatt	ttagcagaac	tcctaataga	ggcagtgtat	tgacacacac	ttaaaatagc	4620
caaagaattg	gcggggtcaa	gcagggtcgt	tgctagggtc	attgcatcta	ttatagagtt	4680
gaattggggc	atggacgaaa	agaagcatc	tcgggtacaaa	agattttacc	tattatcatc	4740
caaaaataca	gatctaattg	ttaagcacia	aatccaaaat	gagacagtaa	aatcctgggt	4800
tgaagaaact	tgaaataaaa	agtggtcaatg	agtggtcaatg	gtgataaggg	ctcattctct	4860
gagtttgagg	ccaaatgccca	tcctttgtct	cgttttgtgaa	gaaaaacaaa	atcaaaaagc	4920
caaaaaggccc	tgccctaagt	gtggtagtag	aggcactcaa	ataaagtgtg	ggctgacact	4980
ggccgagttt	gaggaagaac	attacaaaaa	aatatacatc	ctcgagggcc	aagatgaaac	5040
tcccatgagg	aaagaagaaa	gacagcaagt	aacttatgtc	tctaggggtg	ctctgttcc	5100
taggaatcct	cctatccttag	cttcaaaaaa	caaataccta	cttgtaggca	atctgggtat	5160
ggaattggcaa	gatattgaaa	gtatgggatg	gatcattcga	gggccagccg	ctcgcaagaa	5220
gataatacac	catgagaaat	gcaggccttc	aataccagac	aaactcatgg	cattctctgg	5280
gattatgect	aggggagtta	caccaagagc	ccctacacgg	ttccctgtgt	ccttgcctgaa	5340
gataaagcgg	ggttttgaga	cgggtctggc	ctacacacac	cctggagggg	taagtagtgt	5400
gatgcatgtc	accgctgggt	cggatatata	tgtcaatgac	tcaataggga	ggacaaaaat	5460
ccagtgccaa	gacaaaaaca	ctacaacaga	tgagtgtgaa	tatggtgtga	aaacagactc	5520
aggtgtctct	gatggagctc	ggtgctatgt	catcaaccct	gaagcaacca	acatgcagg	5580
gaccaagggg	gccatgggtac	acctgaggaa	agctggaggga	gagttcaact	gcgtgactgc	5640
ccagggtacc	cccgcttct	ataatctaaa	gaacttaaaa	ggatggtcag	gcctgcctat	5700
ctttgaagct	gccacaggaa	gagtggtagg	aagggtaaaa	gcaggaaaaa	acactgacaa	5760
tgctccaaca	accattatgt	cagggacgca	agtggtcaaaa	ccatcagagt	gtgacctaga	5820
atcagtgggt	aggaaactag	agacaatgaa	cagaggggaa	ttcaaacaag	tgactctggc	5880
tacagggcga	ggaaagacaa	ccatgctacc	aaagctgtta	atagaatcca	taggcaggca	5940
taagagagtg	ttagtactga	tcccgtttag	agctgacagc	gaggggtgtg	accaggtcat	6000
gagaacccaa	cacccaagca	tatctttcaa	cttgaggata	ggggatctga	aagaagggtga	6060
catggcaact	gggatcacct	atgcctctta	tggttacttc	tgccaaatgg	acatgcctag	6120
actggagaat	gcaatgaagg	aataccacta	tattttcttg	gatgaatata	actgtgccac	6180
accagaacag	ttggcagtga	tgtaaaaaat	acataggttc	ggtgaatcag	ttagggtaat	6240
agccatgacc	gccacgccat	cgggactgt	gagcacaaca	gggcagaaat	tcacaattga	6300
ggaggtggta	gtacctgaag	tgatgaagg	gggagacctt	gctgatgatt	acatcgaaat	6360
agcaggggtg	aaggtgccaa	agaaagagtt	agagggtaac	gtactgactt	ttgtgcctac	6420
aaggaagatg	gcatcggaag	cagcaaaaaa	attaaccaca	cagggatata	atgctggata	6480
ctacttcagt	ggagaagatc	catcatccct	gcggacaact	acttctaagt	caccatatat	6540
agtagttgca	accaatgccca	ttgaatccgg	ggtaacctta	cgggaccttg	atacagtaat	6600
agatacaggc	atgaagtgtg	aaaagagact	aagaatcgaa	aacaaagctc	cctacatcgt	6660
aacaggactg	aaaagaatgg	ctataacaac	ggggagcgaa	gctcaaagaa	aaggtagggt	6720
aggcaggggt	aaacctggga	ggtacttgag	aggactcgaa	aacactgcag	gtgaaaagga	6780
ctatcactat	gaccttttac	aggcacagag	gtacggcatc	caagactcaa	taaacatcac	6840
caagtctttc	aggagatga	actatgattg	ggcattatat	gaggaagacc	cgttaaagat	6900
tgcccaatta	gagttgctaa	acacactcct	gatctcaagg	gatctgccag	tagtaacaaa	6960
aaatctgatg	gcccgcacaa	cacatcccga	acctatacaa	ttggcttaca	atagttttaga	7020
aacccctgta	ccggtggcat	tcccaaaaag	gaaaaatgga	gaagtcaact	acgcacatga	7080
aacttacgag	ttgatgacct	gtaggaagct	tgagaaagac	ccccctatat	acctgatgc	7140
aacagaagaa	gaagatctcg	tagtggacat	actgggattg	aaatggccag	acgccacaga	7200
gagggtctgc	ttggaagtgc	aagacgcctt	gggccagatc	acaggtttat	ctgcagggga	7260

gacagccttta	ctcatagccc	tattaggggtg	gggtgggctac	gaagccttgg	tgaagaggca	7320
cgtgcctatg	gtgacagaca	tatacaccct	agaagatgaa	aaattggaag	acactacaca	7380
cctacaatttt	gccccagatg	atctgaacaa	ttcagatacc	attgagctcc	aagacttatc	7440
gaatcaccaa	atccaaacaaa	ttctagaagg	tgggaaggaa	tatgtcggcc	aagcctacca	7500
attcctcag	ttgcaagctg	agagggctgc	caactcagac	aaaggcaaga	aagcaatggc	7560
agcggcccca	ttactagccc	acaagttcct	ggaatacttg	caagagcatg	caggtgacat	7620
aaagaagtat	gggtctatggg	gggtccacac	agcattgtat	aacagcataa	aagaaagact	7680
gggtcacgaa	actgcattcg	catctctggt	tataaaatgg	attgcctttt	cctcagatgg	7740
agtcgccggg	atgattaagc	aagcagcagt	agacttggtg	gtatactata	taatcaacag	7800
gcttgagtat	caaggggata	aggagacaca	gaatgcaggt	agacaatttg	ttggctccct	7860
ttttgtttca	tgtctagcag	agtacacatt	caaaaacttc	aataaatcag	cattagaagg	7920
attgatcgag	cctgccttaa	gctatctacc	ctacgcttca	agcgactaa	agttattcct	7980
accgactaga	cttgaaagtg	tagtgatact	gtccactact	atatacagaa	catactttatc	8040
aatcaggaaa	ggatctagtc	agggttttagc	cgggctggca	gttagctcag	cgatggagat	8100
catgaaccag	aacccaatca	gcgtggctat	tgcactggca	ctaggagtgc	gagcaatagc	8160
ggcacataat	caagttgaga	gcagtgaagg	aaaaaggact	ctcctgatga	aggtccttgt	8220
taagaacttt	ttggaccaag	cagccactga	tgagcttgtg	aaagagaacc	ctgagaagat	8280
cataatggca	gtgtttgagg	gcattcaaac	agctggaaat	ccattgagac	ttgtatacca	8340
tctatatgca	atgtttctaca	aagggtggac	tgccgcggaa	atagctgaaa	aaaccgctgg	8400
taggaacatt	tttgtgttaa	caatatittga	aggattggaa	atgttaggcc	tggtatgcga	8460
ctcaaaatgg	agaaatctga	gctctaatta	tcttattgat	gcagtgaaga	aaatcattga	8520
aaaaatgact	aaaacagcaa	caagcttcac	ctacagcttt	ttgaaatcct	tgcttcctgc	8580
ccccttctcg	tgtactaaat	cagaaaagaga	tccaagaata	gggtggcccc	aaaaagacta	8640
cgactacctc	gaggtccgat	gcgcttgttg	gtataacagg	agagctataa	aaagagactc	8700
aggacctgtg	ttatgggaga	ccttagaggga	gacgggtcca	gagtactgcc	acaacagagg	8760
tgaaaggggg	ctcagcaatg	tgaagactac	tagatgcttt	gtccaaggag	aggaaatccc	8820
tccaattgca	ctgaggaaag	gagtaggtga	gatgttggtc	aagggtgttt	cattcagaat	8880
agattttgat	aaagacaaga	tactttcaac	agacaagtgg	aaggtaccac	atagggcagt	8940
tacatcaatc	tttaggattt	ggcagggtat	tggttacaga	gaggcttacc	tagggaccac	9000
accagactat	gggggtctgg	tgcccagatc	ttgtgtaact	gtaacaaaac	aagggttaac	9060
attctttgaaa	actgccagag	gcattggcttt	cacgactgac	ctgaccatcc	agaacatcaa	9120
aatgctgata	gctacatgct	tcaagaacaa	ggtgaaggaa	ggggagatac	cagctacgat	9180
tgaaggggaa	acatggatca	acataccact	agtgaatgag	gacaccggga	ccattaaacc	9240
agcttctcgg	gaaagagtga	ttcccgaacc	atataggagg	gaccacttg	aaggcccaag	9300
tgtaatcggt	gaaacaggag	gcatagccat	caaccataa	gggttcaate	cacaatccag	9360
tacatgtgga	acagttttta	cagcagtga	ggatctgtgc	caaacagtta	gtaataaagc	9420
caagaatatc	aaaattgggt	tttcgggaag	ccaataccca	ggtccagggg	ttgcaaagaa	9480
gacactgaac	cagctcatat	aagatgaaga	cccaaaaacca	ttcatatttg	tttgtggctc	9540
tgacaagtca	atgtctaate	gggcaaaaac	tgcgagggaac	atcaagagaa	tcaccaccac	9600
aacacctgag	aaattcagag	acttggcaaa	aaacaagaaa	ttgataattg	tgctgttagg	9660
tgatagatac	catgaagata	tagaaaagta	tgcgacttcc	aagggcacct	tcttgaccag	9720
acaaaccttg	gaagcactag	caagtgccaa	agctgtagag	aaggacatga	ccaagaaaga	9780
agcagcaaga	gtattggcaa	tggaagaaaa	ggatgaacta	gaactcccag	ggtggctgca	9840
tacagatgca	cccaaattcc	tagacattac	taaggacaac	atcacacatc	acctaatagg	9900
ggacatgcag	agtctgagag	aaagagcagg	ggagatagga	gcaaaggcca	ccactcaaat	9960
cactaagaaa	gggagtgtat	acacaatcaa	tctgagtacg	tggtgggagt	cagagagggtt	10020
ggcatccttt	gaacctttgt	tccgggaact	actactctaa	tgaggccag	tggaaggga	10080
gacatataag	aattgtcatt	ttgcaacagc	agoccaactt	gccggaggaa	actgggtacc	10140
ggtagcacca	gttgtagatc	ttggggaaat	tccggtaaa	aagaaaaaga	ctctccccta	10200
cgaggcatac	aagctcctaa	aagagatggt	tgactcggag	aaggaattcc	ataaaccagt	10260
gagcagggaa	aaacaccaat	ggatactgaa	caaagtga	actggtggtg	acctcggctt	10320
aaaaaatcta	gtatgtccag	gtagggttgg	agaaccaatc	ctaagagaga	agaagaaatt	10380
caacattttac	aacaagagga	ttaccagtac	tatgttatca	gtagggataa	ggccagaaaa	10440
attgccagtg	gtaagagccc	agacagtac	caaagaattt	catgaagcaa	taagggacaa	10500
aataagcaaaa	aaagcaaaaca	cacagacccc	aggcctacac	aaagaattgt	tgagatattt	10560
caactcaata	tgtgccatcc	ccgaacttag	aaatacctac	aaagaggttg	attgggacgt	10620
tctaacctca	ggcataaata	ggaaaggtgc	agccgggtac	ttcgaaaaaa	tgaacatagg	10680
ggagatcata	gatagtgaca	aaaaatcagt	ggaaccaactc	ataaagagaa	tgaaatcagg	10740
gctagaattc	aactactatg	agactgcaat	acaaaaaaat	gagaagaggg	cagtggtaga	10800
tgattggatg	gaaggtgact	atgtagaaga	aaaaagacca	agagtcatat	agtatcctga	10860
ggcaaatggt	agattagcta	taaccaaggt	aatgtataac	tgggtcaagc	agaagcctat	10920
agtaatccct	ggatacgaag	gtaagactcc	tttgtttcat	gttttcgaca	aggtccacaa	10980
agaatggaaa	aatttcaaca	gtccagtggc	agtcagtttt	gacactaaag	cctgggacac	11040

ES 2 530 716 T3

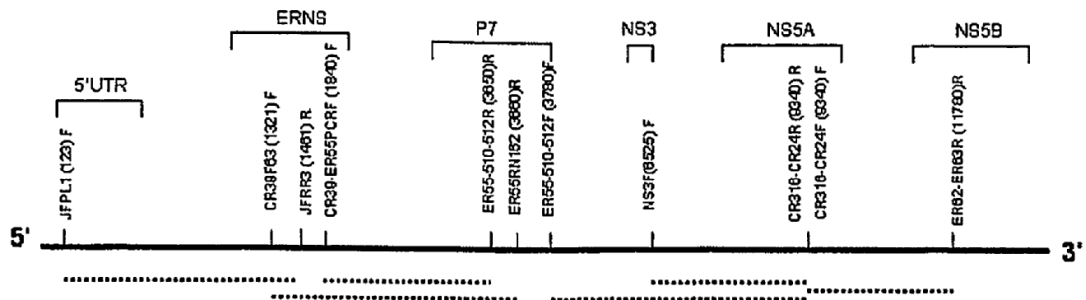
acaagtaaca	cccaaagacc	ttctcctcat	atcagaaatc	caaaagtatt	attacaagaa	11100
agaataccat	agattcatag	ataatttgac	cgagaaaatg	gtggaggtac	cagtggtttg	11160
tgaagacgga	aacgtctaca	taagagaagg	tcagagggga	agtgggtcaac	cagacactag	11220
cgcaggtaat	agtatgttga	atgtactgac	tatgatatat	gccttctgca	aagctaactc	11280
catcccttac	tcagccttcc	acagggtagc	aaagatacat	gtgtgtggag	atgatggttt	11340
cttgataact	gagaaaagtt	ttggtgaggc	ctttgcgatc	aaggggcctc	aaattttgat	11400
ggaagcagga	aaaccacaaa	aacttatagg	tgaatttgga	ctgaaattgg	catataaatt	11460
tgatgacatt	gaattttgct	cgcatacacc	aataaaggtc	aggtgggctg	acaacaacac	11520
atcatacatg	cccggaagag	acacagctac	cattctagct	aaaatggcaa	cccgcttga	11580
ctctagtggg	gagaggggga	ccgagggata	cgagctggcc	gtggccttca	gtttcttact	11640
aatgtattct	tggaaacccc	tggtaagaag	aatatgcctg	cttgtcatgt	ctacaattga	11700
cacaaaagaa	gctagccaaa	ataacactat	atatacattt	aggggggatc	ccataggtgc	11760
ctacacagag	gtaattgggt	ataggctgga	ccaactaaaa	cagacagagt	tctctaaatt	11820
ggctcagctg	aatttgtcaa	tggcaatact	tcaaataatac	aataaaaaaca	caaccaagag	11880
actcatcgaa	gatttgtgtga	aacttggcaa	ccaaaataag	caaataattgg	tgaatgcaga	11940
ccgtttgatc	agcaagaaaa	cgggctacac	atatgagcca	acagctggcc	acactaagat	12000
aggcaagcac	tatgaagaaa	tcaacctgct	gaaagataca	ccacaaaaaa	ctgtctacca	12060
aggaactgaa	aggtata					12077

Figura 2

GGSEEGNMFF	RTAPTTPPGC	QEPVYTSTMR	PIFGEPHPPL	HKHSTLKLPH	WRGIKTIRVK	60
KRELPPKGDG	SNSTTAPTS	VYVELGAVFY	KDYTGTVYHR	VPLELCTNQE	RCEGSKCVGR	120
MTGSDGRLYN	VLVCPDDCIL	FERHCRGQTV	VLKWISNPLT	SPLWVQSCSD	DKGAKPKVKP	180
KDDRMKQKGI	VTKPKETead	QKTRPPDATI	VVDGQKYQVR	KKGKAKPKTQ	DGLYHNKNKP	240
EASRKKLEKA	LLAWAILACL	LVVPVGSTNV	TQWNLWDNKS	TTDIHSMVFS	RGIKRSLHGI	300
WPTQICKGIP	THLAADYELK	RIHGMVDASP	MTNFTCCRLQ	RHEWNKHGWC	NWYNIBPWIN	360
LMNNTQGLLN	TGDNFTECAV	TCRYDADLGV	NIVTQARTTP	TILTGCKKGH	NFSFSGEVRA	420
SPCNFELTAE	DLRIMDHTN	CEGFYTFGEG	IVDGYTEVVE	KARSSGFRAL	TWLSSKIENT	480
KKKIPGAESA	PYCPVAKRVF	NIIYTNNCTP	LGLPDKSKII	GPPTFDISGR	DEFIFPKLPY	540
HVDDFILLSL	IAMSDFAPET	SSIIYLALHY	LMPSNDNRDF	VMDLDPNKLN	LTATKSVASV	600
VPTSVNVLGE	WVCVKPSWVP	YSAEITNLIG	GVITVADLVI	KTIEELLNLW	TEATAVAFLA	660
ALIKIFRGQP	IQAVAWLIII	GGAQAQTCNP	EFMYALAKNT	SIGSLGPESL	TTRWYQLTSG	720
FKLTDSTIEV	TCVGANMRIH	VVCPLVSDRY	LAINHPRALP	TTAWFRKIHT	QHEVPRERIM	780
SESKRRYTCP	CGSKPVVRST	TQFNPIISIT	PSFELECPRG	WTGAVECTLV	SPSTLTETETI	840
FTYRKPKPFG	LENWCKYTVV	EKGILYSCKF	GGNSTCIKGL	IVKGQREDKV	RYCEWCGYKF	900
SSPNGLPQYP	LGLCEKEQSE	GLRDYGDFFC	CNNGTCIDKE	GSVQCYIGDK	KVTVKLYNAS	960
LLAPMPCKPI	PYCPVAKRVF	TCCTYRWAST	LENKYYEPRD	SYQQYIIS	GYQYWFDLTA	1020
KDHVADWITK	YFPIIIIVALL	GGRGTLWVLI	AYELLTQYEV	VGDENIVAQA	EALVIGNILM	1080
SLDLEIISCF	LLLLIVVKKQ	AVRRTLALLF	HWITMNPFFQ	VMITVVYFVG	LVRABEETKE	1140
GSTSGPPIHV	VAILLFLLYH	TVKYKDFNIA	MILLITLSLK	SSSYIHTSLY	EIPLLVAVIS	1200
LTCSTIYIFDL	QVKSCLVAPT	IGIIGVTLAM	RVLWLVRQMT	IPTPSVSISL	IDPKMVIILY	1260
LISLTITVNH	NLDLASYCLK	LGPFIILSFLT	MWVDVVILLL	MLPWYELVKV	YYLKKKKEDV	1320
ETWFQNSGIS	TQETSPYGF	FSSPGEGVHT	LPMQNKTKFC	RTAYMTVLRA	LVITAISVW	1380
KPIILAEELLI	EAVYWITHIKI	AKELAGSSRF	VARFIASIE	LNWAMDEKEA	SRYKRFYLLS	1440
SKITDLMVKH	KIQNETVKSW	FEETEIFGIQ	KVAMVIRAH	LSLEPNAILC	SVCBEKQNK	1500
AKRCPCKGCS	RGTQIKCGLT	LAEEFEEHYK	KIYILEGQDE	TPMRKEERQ	VTVYVSRGALF	1560
LRNLPILASK	NKYLLVGNLG	MELQDLESMG	WIIRGPAVCK	KIIHHEKCRP	SIPDKLMAFF	1620
GIMPRGVTPR	APTRFPVSL	KIRRGFETGW	AYTHPGGVSS	VMHVTAGSDI	YVNDISGRTK	1680
IQQDQKNTTT	DECEYGVKTD	SGCSDGARC	VINPEATNIA	GTKGAMVHLR	KAGGEFNCVT	1740
AQGTAPAFYNL	KNLKGWSGLP	IFEAATGRVV	GRVKAGKNTD	NAPTTIMSGT	QVAKPSECDL	1800
ESVVRKLETM	NRGEFKQVTL	ATGAGKTTML	PKLLIESIGR	HKRVLVLIPL	RAAABGVYQY	1860
MRTKHPISMF	KIQNETVKSW	FEETEIFGIQ	KVAMVIRAH	LSLEPNAILC	SVCBEKQNK	1920
TPEQLAVMSK	IHRFGESVRV	IAMTATPSGT	VSTTGQKFTI	BEVVVPEVMK	GEDLADYIE	1980
IAGLKVPKKE	LEGNVLTFFP	TRKMASETAK	KLTTQGYNAG	YYFSGEDPSS	LRTTTSKSPY	2040
IVVATNAIES	GVTLPLDLTV	IDTGMKCEKR	LRIENKAPYI	VTGLKRMAT	TGEQAQRKGR	2100
VGRVKPGRYL	RGPENTAGEK	DYHYDLLQAA	RYGIQDSINI	TKSFREMNYD	WALYEDPLK	2160
IAQLELLNTL	LISRDLPVVT	KNLMARTTHP	EPIQLAYNSL	ETPVVPAFPK	VKNGEVTDH	2220
ETYELMTCRK	LEKDPPIYLY	ATEEEDLVVD	ILGLKWPDAT	ERAVLEVQDA	LQGITGLSAG	2280
ETALLIALLG	WVGYEALVKR	HVPMVTDIYT	LEDEKLEDTT	HLQFAPDDL	NSDTIELQDL	2340
SNHQIQQILE	GGKEYVGQAY	QFLRLQAERA	ANSKDGKKAM	AAAPLLAHKF	LEYLQEHAGD	2400
IKKYGLWGVH	TALYNSIKER	LGHETAFASL	VIKWIAFSSD	GVPGMKQAA	VDLVVYIIN	2460
RPEYQGDKET	QNAQRQFVGS	LFVSCLAEYT	FKNFNKSAL	GLIEPALSYL	PYASSALKLF	2520
LPTRLESVVI	LSTTIYRTRYL	SIRKSSSQGL	AGLAVSSAME	IMNQNPISSA	IALALGVGAI	2580
AAHNAIESSE	AKRTLLMKVF	VKNFLDQAAT	DELVKENPEK	IIMAVFEGIQ	TAGNPLRLVY	2640
HLVAMFYKGW	TAAEIAEKTA	GRNIFVLTFI	EGLEMLGLDA	DSKWRNLSSN	YLIDAVKKII	2700
EKMTKTATSF	TYSFLKSLLP	APFSCTKSER	DPRIGWPQKD	YDYLEVRCAC	GYNRRATKRD	2760
SGPVLWETLE	ETGPEYCHNR	GERGLSNVKT	TRCFVQGEET	PPIALRKGVG	EMLVKGVSVR	2820
IDFDKDKILS	TDKWKVPHRA	VTSIFEDWQG	IGYREAYLGT	KPDYGGVLP	SCVTVTKQGL	2880
TFLKTARGMA	FTTDLTIQNI	KMLIATCFKN	KVKEGEIPAT	IEGETWINIP	LVNEDTGTIK	2940
PSPGERVIPE	PYEEDPLEGP	SVIVETGGIA	INQIGVNPQS	STCGTVFTAV	KDLCQTVSNK	3000
AKNIKIGFSE	QYPPGPGVAK	KTLNQLIQDE	DPKPFIFVCG	SDKSMSNRAK	TARNIKRITT	3060
TPPEKFRDLA	KNKKLIIVLL	GDRYHEDIEK	YADFKGTFLT	RQTLEALASA	KAVEKDMTKK	3120
EAARVLAMEE	KDELELPGWL	HTDAPKFLDI	TKDNITHHLI	GDMQSLRERA	GEIGAKATTQ	3180
ITKKGSVYTI	NLSTWWESER	LASLEPLFRE	LLSKCRPVDR	ETYKNCHFAT	AAQLAGGNVW	3240
PVAPVVHLGE	IPVKKKKTLF	YEAYKLLKEM	VDSEKEFHKP	VSREKHQWIL	NKVKTTGGDLG	3300
LKNLVCPRGV	GEPIREKKK	FNIYNKRITS	TMLSVGIRPE	KLPVVRQAQS	TKEFHEAIRD	3360
KIDKKANTQT	PGLHKELLEI	FNSICAIPEL	RNTYKEVDWD	VLTSGINRKG	AAGYFEKMMI	3420
GEIIDSDDKS	VEQLIKRMKS	GLEFNYYETA	IPKNEKRAVV	DDWMEGDYVE	EKRPRVIQYP	3480

EAKMRLAITK	VMYNWVKQKP	IVIPGYEGKT	PLFHVFDKVV	KEWKNFNSPV	AVSFDTKAWD	3540
TQVTPKDLLE	ISEIQKYYYK	KEYHRFIDNL	TEKMVEVPVV	CEDGNVYIRE	GQRGSGQPD	3600
SAGNSMLNVL	TMIYAFCKAN	SIPYSAFHRV	AKIHVCGDDG	FLITEKSFGE	AFAIKGPQIL	3660
MEAGKPQKLI	GEFGLKLAYK	FDDIEFCSHT	PIKVRWADNN	TSYMPGRDTA	TILAKMATRL	3720
DSSGERGTEG	YELAVAFSFL	LMYSWNPLVR	RICLLVMSTI	DTKEASQNTT	IYTFRGDPIG	3780
AYTEVIGYRL	DQLKQTEFSK	LAQLNLSMAI	LQIYNKNTTK	RLIEDCVKLG	NQNKQILVNA	3840
DRLISKKTGY	TYEPTAGHTK	IGKHVEEINL	LKDTFQKTVY	QGTERY		3886

Figura 3



Lista de claves:

.....

Producto de PCR

————

Secuencia de referencia NADL ~~g18526649~~

.....{...}F R Cebadores [...] indica localizaciones en pb basadas en la secuencia NADL

R indica cebador inverso

F indica cebador directo

Figura 4

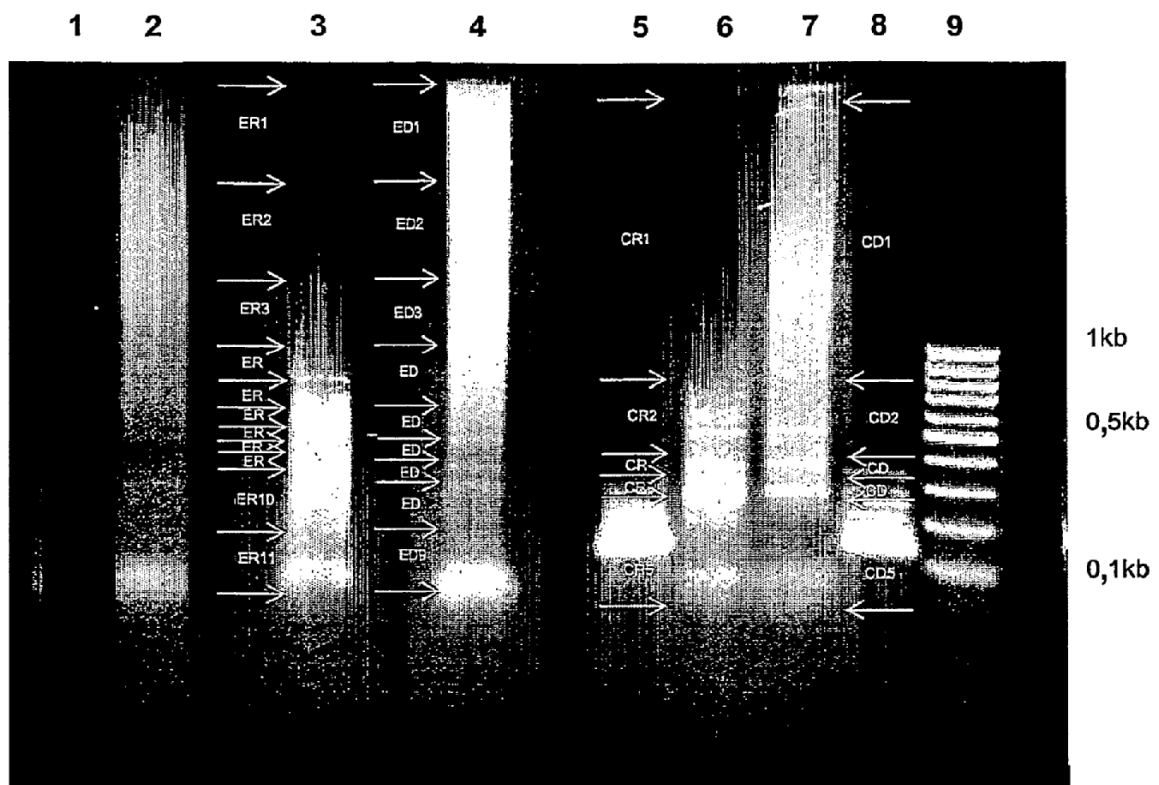


Figura 5A

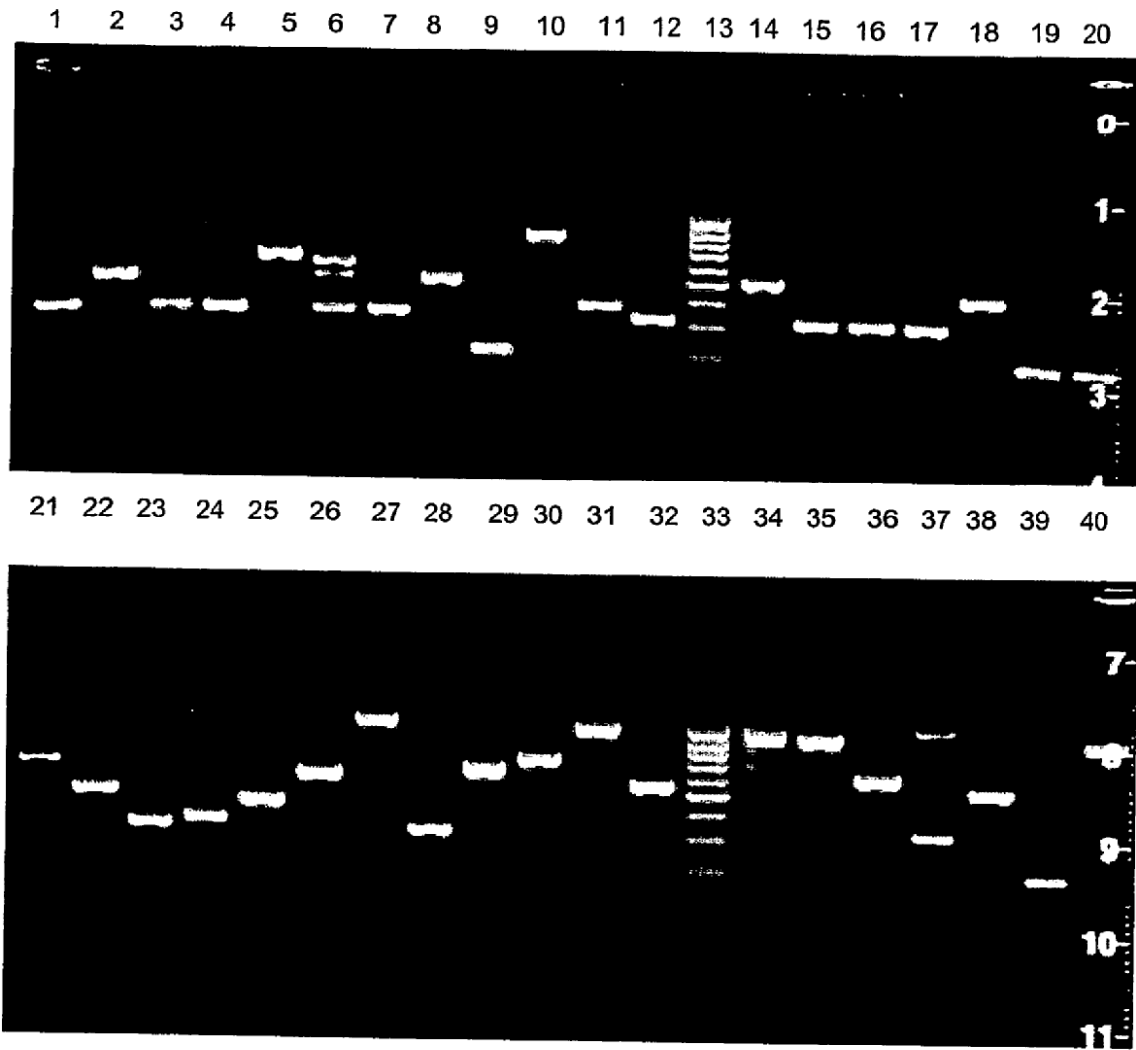


Figura 5B

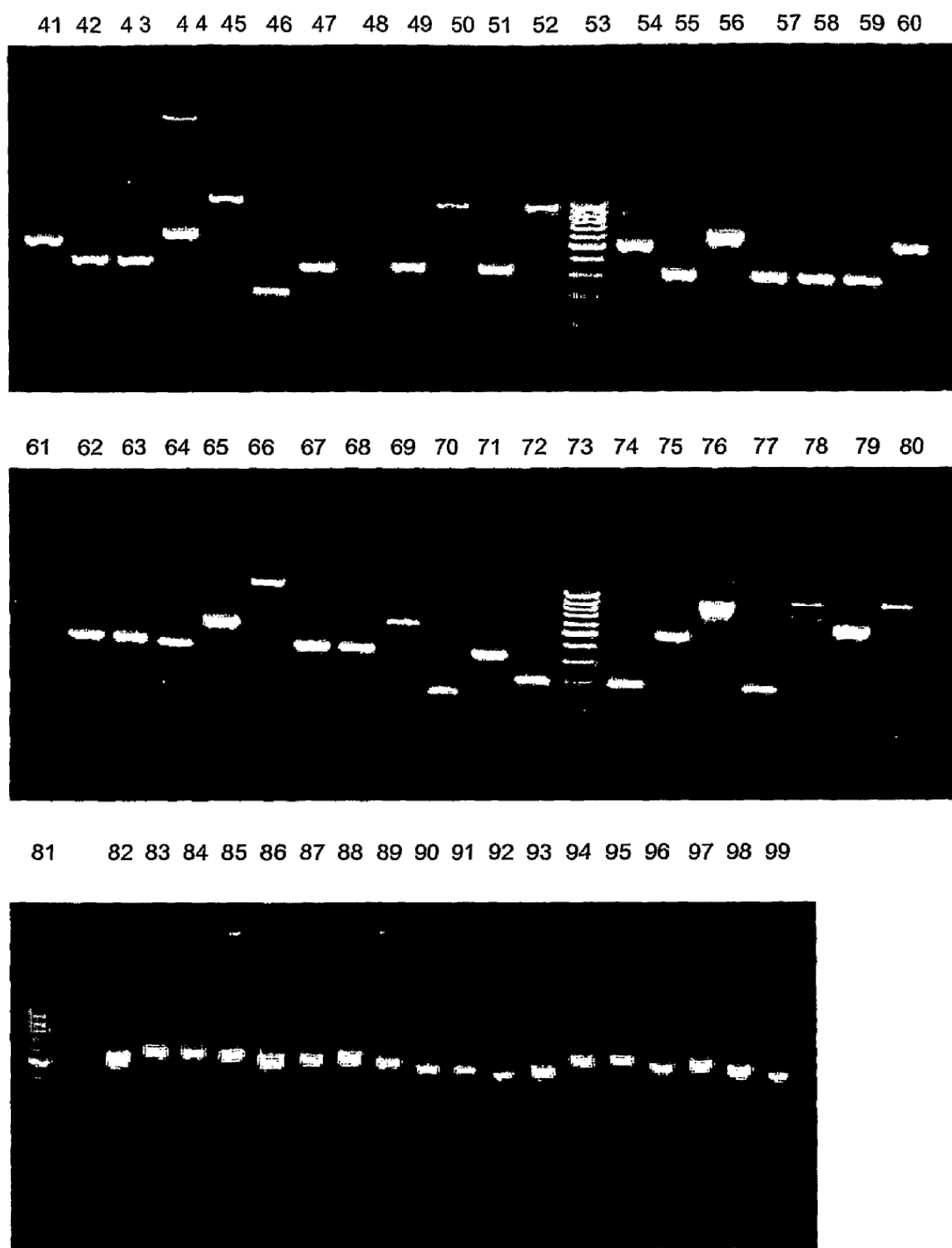


Figura 6A

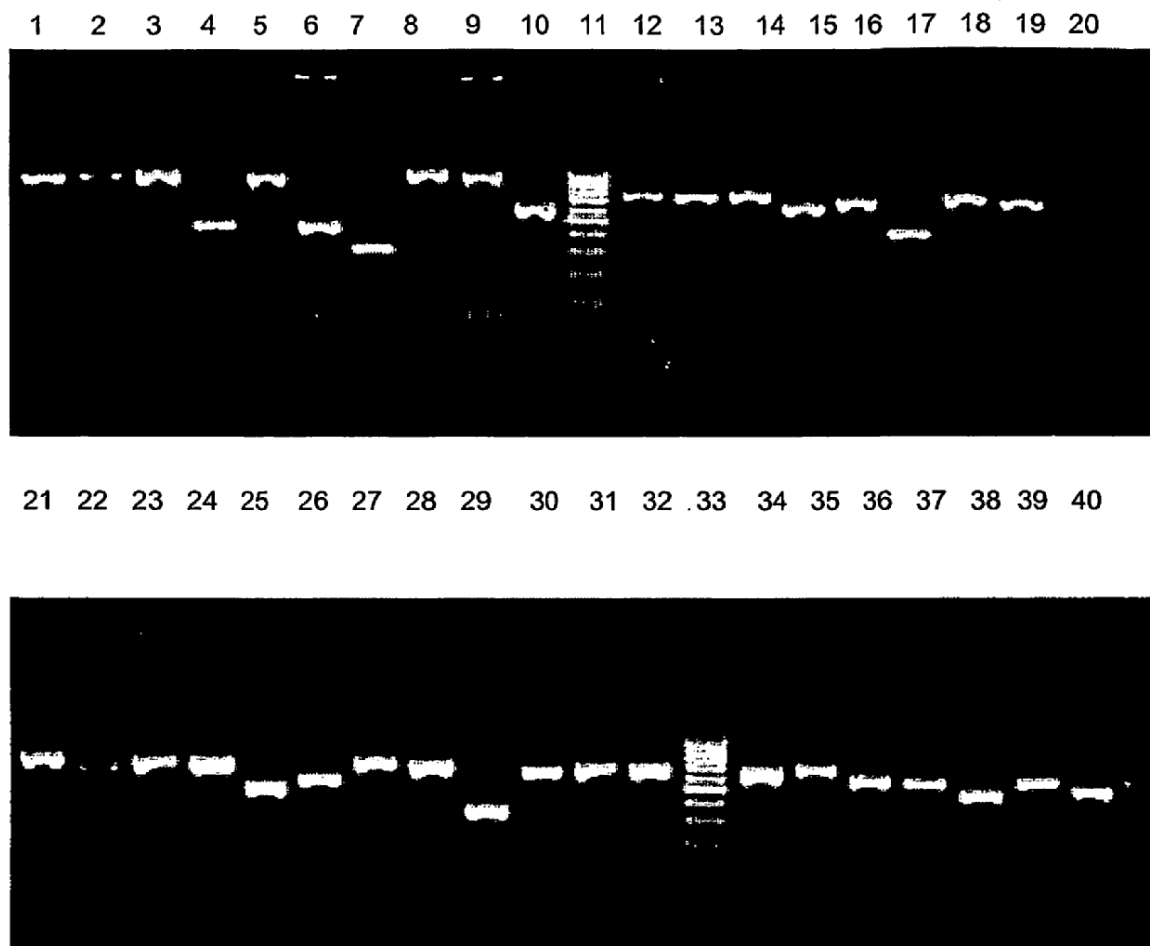


Figura 6B

41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80



81 82 83 84 85 86 87



Figura 7A

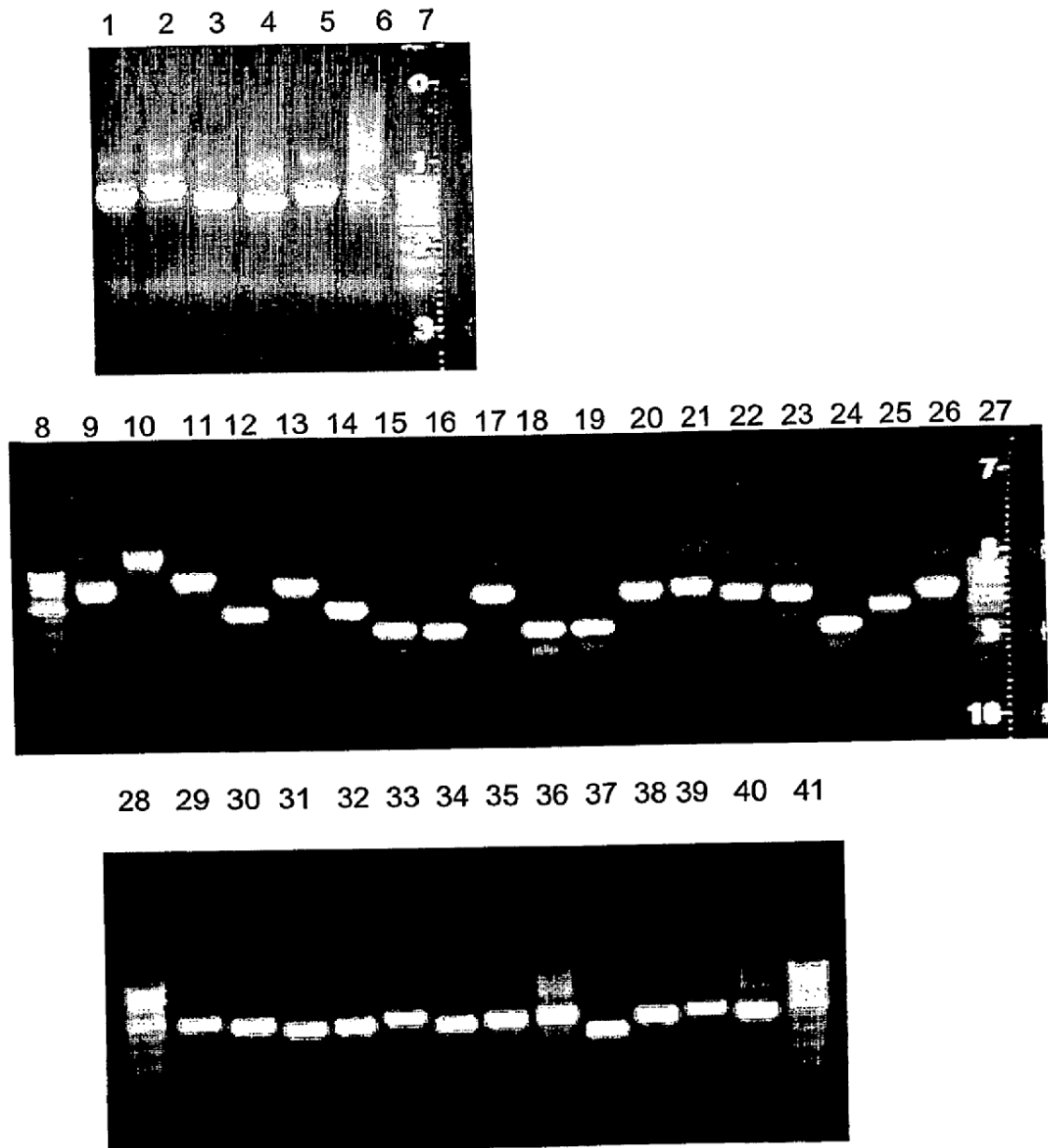


Figura 7B

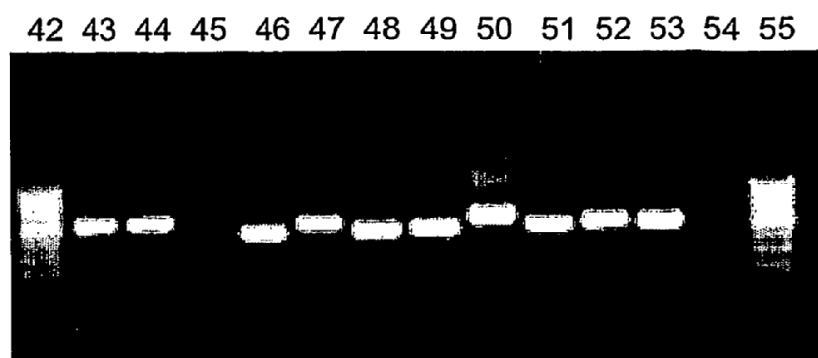


Figura 8A

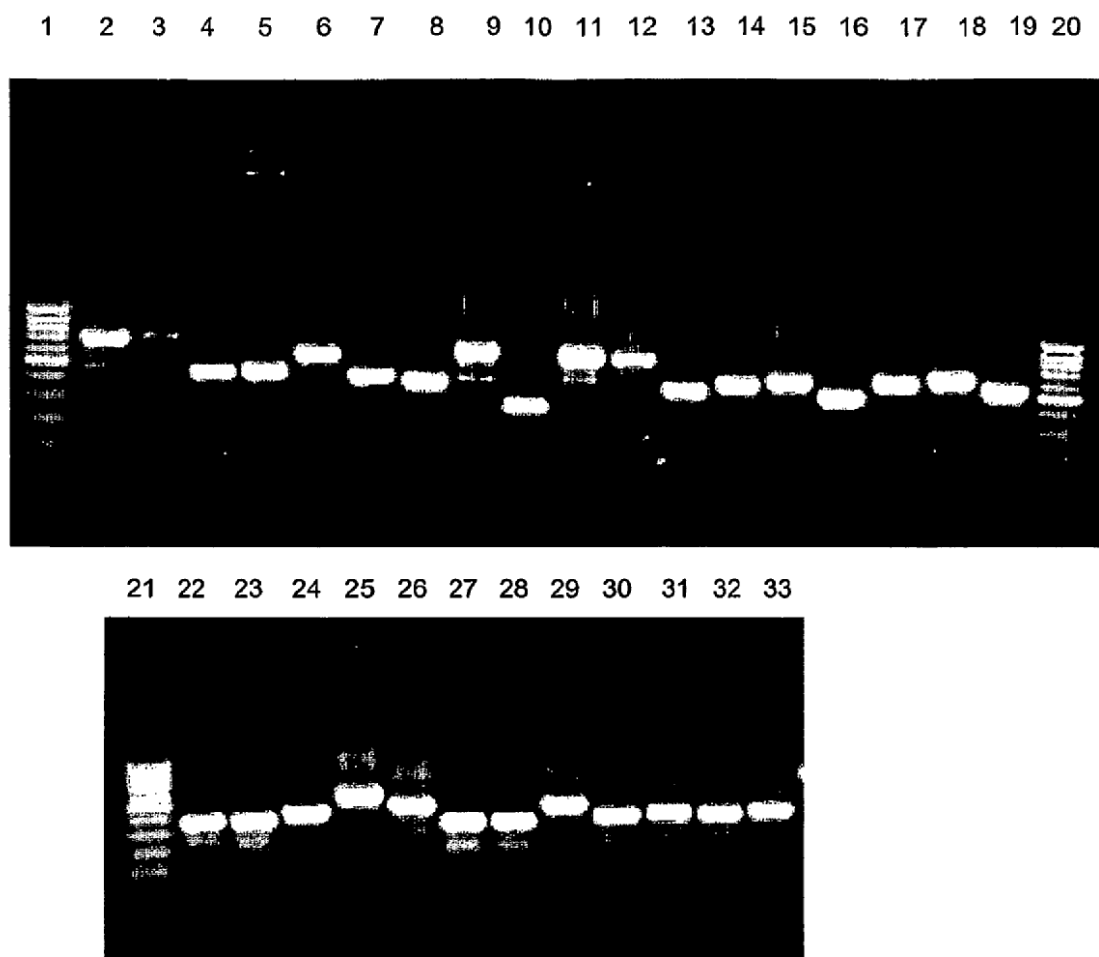


Figura 8B

34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53



Figura 9

