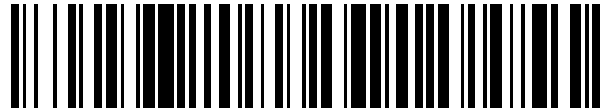


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 421**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)

**A61K 39/155** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2010 E 10842712 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2516649**

54 Título: **Nuevas composiciones de neumovirus y procedimientos para su utilización**

30 Prioridad:

**21.12.2009 US 288401 P**

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

**08.06.2015**

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)  
Cornell Center For Technology Enterprise And  
Commercialization 395 Pine Tree Road Suite 310  
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

**DUBOVI, EDWARD y  
RENSHAW, RANDALL, W.**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 537 421 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

Nuevas composiciones de neumovirus y procedimientos para su utilización

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere en general al campo de la virología y más específicamente a virus recién descubiertos en la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*, hallada en mamíferos, incluyendo caninos y felinos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los perros domésticos confinados juntos, como en un refugio de animales, residencias caninas, o instalaciones de cría, a menudo se ven afectados con infecciones respiratorias agudas (tos de las perreras). La enfermedad se transmite rápidamente y es difícil de eliminar ya que nuevos animales se introducen continuamente. Un espectro de agentes puede producir un complejo síndrome de múltiples infecciones y secuencialmente solapantes que hacen el diagnóstico y tratamiento difícil. Los perros afectados presentan signos clínicos que van desde la tos seca leve y secreción nasal a neumonía y la muerte en casos graves. Los gatos también están infectados con diversos agentes que producen dificultad respiratoria de grados diversos de gravedad. Los mismos virus o similares también pueden infectar a los seres humanos. Por lo tanto, existe una necesidad continua no satisfecha para identificar los agentes que infectan a una gran variedad de mamíferos y para desarrollar composiciones y procedimientos para su uso en el diagnóstico, profilaxis y/o terapia para dichas infecciones. La presente invención satisface estas necesidades. Reenshaw et al. (2010); *Emergency Infectious Diseases* 16(6): 993-995 describe neumovirus en perros con enfermedad respiratoria aguda.

[0003] La base de datos NCBI con número de acceso AY743909 actualizada el 11 de enero de 2005 proporciona la secuencia genómica de un neumovirus murino.

30 DESCRIPCION RESUMIDA DE LA INVENCION

[0004] La presente invención se basa en el descubrimiento de nuevos neumovirus. Los virus pueden infectar diferentes tipos de mamíferos, incluyendo, pero no necesariamente limitado a, perros, gatos y probablemente humanos. La presencia del virus se puede correlacionar positivamente con la enfermedad respiratoria aguda de los caninos (ARDC), o con enfermedades respiratorias en felinos, o con trastornos respiratorios o de otro tipo en seres humanos u otros mamíferos.

[0005] La memoria describe polinucleótidos aislados y proteínas de los virus. La invención incluye composiciones y procedimientos para la detección de los virus (tal como se describe en las reivindicaciones).

[0006] Los virus son virus de ARN de cadena negativa. La descripción incluye cadenas negativas aisladas, las cadenas positivas que tienen complementariedad inversa a las cadenas negativas, los equivalentes de ADN de los polinucleótidos de ARN, proteínas que son codificadas por las cadenas positivas, y fragmentos de los polinucleótidos y las proteínas.

[0007] En ciertas realizaciones, el polinucleótido de cadena negativa aislado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que es al menos un 96% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1. La memoria también describe polinucleótidos que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, o un polinucleótido que tiene una secuencia que es al menos un 96% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 2 o 3.

[0008] Los polinucleótidos, y/o las proteínas y/o fragmentos descritos en este documento se pueden aislar de cualquier fuente adecuada, o pueden producirse de manera recombinante usando técnicas bien conocidas.

[0009] La invención proporciona un procedimiento para detectar la presencia del virus en una muestra biológica obtenida de un canino, tal como se define en las reivindicaciones. El procedimiento comprende detectar de la muestra biológica una secuencia de polinucleótido comprendida por el virus, tal como se define en las reivindicaciones. La presencia del polinucleótido es indicativa de que el canino está infectado con el virus.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS60 [0010]

Figura 1. Ensayo de inmunofluorescencia de células A72 utilizando anticuerpos monoclonales (Mab) específicos del virus sincitial respiratorio humano. A) Mab 2G122 en células infectadas. B) Mab 2G122 en células no infectadas. C) Mab 5H5N en las células infectadas. D) Mab 5H5N en células no infectadas. Se utilizaron soluciones madre de Mab primarios obtenidas del fabricante a una dilución de 1:100. El fondo rojo se produce mediante contratinción con azul de Evan.

Figura 2. Ensayo de inmunofluorescencia que muestra la reactividad de un suero canino seleccionado al azar

sometido a pruebas no relacionadas con la respiración frente a células A72 caninas infectadas y no infectadas. A) Suero en células infectadas a una dilución de 1:320. B) suero en células no infectadas a una dilución de 1:320. El fondo rojo se produce mediante contratinción con azul de Evan.

Figura 3. Una representación gráfica de la organización de un genoma viral que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

**[0011]** La presente descripción proporciona nuevos polinucleótidos aislados y proteínas de los virus, composiciones y procedimientos para la detección de los virus.

**[0012]** Los virus descritos en el presente documento son virus de ARN de cadena negativa (menos). Por lo tanto, el material genético empaquetado en el virión es una sola cadena de ARN que es el complemento inverso de una cadena positiva. La cadena positiva se transcribe a partir de la cadena negativa por una ARN polimerasa dependiente de ARN. La cadena positiva funciona, al menos en parte, como un ARNm en que las proteínas virales codificadas por la cadena positiva se traducen en el citoplasma de las células infectadas, y a continuación participa en el ensamblaje de nuevas partículas virales y empaquetamiento de genomas de cadena negativa.

**[0013]** En ciertas realizaciones, la descripción proporciona un polinucleótido de cadena negativa aislado que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que es al menos un 96% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1. La descripción incluye también polinucleótidos que son complementarios a la cadena negativa. En ciertas realizaciones, estos polinucleótidos comprenden la secuencia presentada en la SEQ ID NO: 4, o una secuencia que es al menos un 96% idéntica a SEQ ID NO: 4. También se proporcionan polinucleótidos aislados que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que es al menos un 96% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1, o que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 4, o una secuencia que es al menos un 96% idéntica a SEQ ID NO: 4. También se describen polinucleótidos que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3, o un polinucleótido que tiene una secuencia que es al menos un 96% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 2 o 3. También se describen complementos inversos de estas secuencias y las secuencias que tienen al menos un 96% de identidad a los complementos inversos.

**[0014]** Se describe el equivalente de ADN de cada secuencia de ARN descrita en este documento. Por lo tanto, la descripción incluye cada secuencia de ARN descrita en este documento donde cada U (uracilo) en el ARN se sustituye por T (timina). Cada uno de los polinucleótidos virales descritos en este documento incluye polinucleótidos que son idénticos a la secuencia presentada en la SEQ ID NO designada para cada polinucleótido, y se incluyen adicionalmente todos los polinucleótidos que son al menos un 96% idénticos a las secuencias presentadas en las SEQ ID NOs virales. En realizaciones particulares, los polinucleótidos que son al menos un 96% idénticos a las secuencias de polinucleótidos presentadas en la lista de secuencias son al menos un 96% idénticos a las secuencias en toda su longitud. Sin pretender estar ligado por ninguna teoría particular, se considera que las secuencias de polinucleótidos presentadas en el presente documento y que incluyen aquellas que tienen una identidad de al menos un 96% a las secuencias de polinucleótidos virales establecidas en el listado de secuencias, son distintas de los polinucleótidos que están comprendidos por virus relacionados, tales como los virus que ya son conocidos por infectar mamíferos murinos. También se considera, de nuevo sin pretender quedar ligado por ninguna teoría en particular, que la atenuación de los virus mediante, por ejemplo, pasos en serie, puede dar lugar a virus que comprenden y/o transcriben polinucleótidos que son al menos un 96% idénticos a las secuencias presentadas en el listado de secuencias. Las secuencias que no son idénticas a las secuencias enumeradas específicamente en el listado de secuencias pueden ser entre un 96,0% y un 99,9% idénticas a las secuencias presentadas, incluyendo todos los números enteros hasta el primer punto decimal entre los mismos. Todos los intervalos de identidad de secuencia entre 96,0% y 100%, ambos inclusive, son también realizaciones de la invención.

**[0015]** Los fragmentos de los polinucleótidos también se describen en el presente documento. Por lo tanto, cada polinucleótido viral (incluyendo los complementos inversos y equivalentes de ADN de los mismos) puede incluir fragmentos de los polinucleótidos que varían en longitud desde 10 nucleótidos a toda la longitud del polinucleótido, e incluyendo todos los números enteros entre los mismos.

**[0016]** En realizaciones particulares, el polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que es al menos un 96% idéntica a la SEQ ID NO: 1, se utiliza con fines de diagnóstico en un canino.

**[0017]** Los polinucleótidos de la invención están aislados, lo que significa que se han eliminado de su entorno natural mediante, por ejemplo, la separación de los virus de un animal y/o una muestra biológica obtenida del animal. Además, los polinucleótidos aislados y/o recombinantes de la invención pueden purificarse hasta cualquier grado deseado de purificación. Las composiciones proporcionadas por la invención comprenden, consisten o consisten esencialmente de los polinucleótidos.

**[0018]** Los polinucleótidos descritos en este documento se pueden modificar para portar un gen/genes heterólogos.

[0019] La invención también proporciona procedimientos *in vitro*, tal como se define en las reivindicaciones, para detectar los virus descritos en este documento. El procedimiento comprende detectar la presencia de un polinucleótido viral en o de una muestra biológica de un animal, tal como se indica en las reivindicaciones. Cualquiera de los polinucleótidos virales indicados en las reivindicaciones se puede utilizar en el procedimiento de detección de la presencia o ausencia del virus. Se considera que la detección del complemento inverso o el equivalente de ADN de SEQ ID NO: 1 es la misma que la detección de un polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos un 96% de identidad a esa secuencia.

[0020] La detección puede llevarse a cabo usando cualquier muestra biológica adecuada obtenida de un mamífero para el que se desea un diagnóstico. Las fuentes adecuadas de muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, sangre, raspados de la mucosa, biopsia de tejido, o saliva. En una realización, la muestra biológica comprende un frotis nasal y/o de la faringe, o de lavado traqueal.

[0021] La presencia o ausencia del virus puede detectarse mediante pruebas para el ADN, ARN o proteína usando una variedad de técnicas que son bien conocidas en el sector. En ciertas realizaciones, la presencia del virus se determina mediante la detección de polinucleótidos que comprenden la totalidad o parte del genoma viral, o se amplifican a partir de la totalidad o una parte del genoma viral. En este sentido, la invención incluye determinar la presencia (o ausencia) del virus mediante la identificación de secuencias de polinucleótidos de la cadena viral negativa, la cadena positiva viral, o combinaciones de los mismos, tal como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa se puede utilizar para producir una copia de ADN de la cadena viral negativa o una parte de la misma, y la copia de ADN puede servir como plantilla para la amplificación del genoma viral para obtener una pluralidad de moléculas de ADN de doble cadena que incluyen la versión de ADN de las cadenas positiva o negativa o partes de la misma en una doble cadena hibridada. Los expertos en la materia reconocerán que hay una amplia variedad de técnicas de amplificación que pueden usarse para aumentar la cantidad de material genético para su uso en determinar si un virus está o estaba en una muestra biológica de interés, y el material genético amplificado (o no amplificado) se puede analizar usando muchas técnicas y reactivos bien conocidos para determinar secuencias de polinucleótidos. Por lo tanto, se puede utilizar cualquiera y todos los procedimientos para la obtención y el análisis de ácidos nucleicos de una muestra biológica para determinar la presencia o ausencia de polinucleótidos virales que incluyen, pero no se limitan a, los procedimientos que implican la detección de los polinucleótidos mediante la hibridación de ácido nucleico y/u otros tipos de sondas, y mediante la determinación de la secuencia de los polinucleótidos virales usando cualquier técnica de secuenciación conocida. Todo o una parte de la secuencia puede determinarse y usarse para identificar los polinucleótidos virales.

[0022] La composición de la invención puede comprender un polinucleótido viral aislado (tal como se define en las reivindicaciones) y componentes utilizados para la hibridación y/o amplificación de ácido nucleico. En consecuencia, las composiciones pueden comprender adicionalmente una ADN polimerasa, una transcriptasa inversa, nucleótido trifosfatos libres, sales, tampones y otros reactivos empleados habitualmente para hibridar y/o amplificar ácidos nucleicos. Un polinucleótido viral aislado y/o un polinucleótido se pueden amplificar a partir de un polinucleótido viral, en el que el polinucleótido viral y/o el polinucleótido amplificado a partir del polinucleótido viral se hibridan a uno o más cebadores de amplificación y sondas de detección utilizadas en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos a tiempo real.

[0023] Un polinucleótido viral aislado y/o un polinucleótido también se pueden amplificar a partir de un polinucleótido viral en el que el polinucleótido se hibrida a al menos una sonda que está presente en una matriz. La matriz puede estar presente en, por ejemplo, un chip utilizado para determinar la presencia o ausencia de una pluralidad de polinucleótidos distintos. Dichos chips están disponibles comercialmente y se pueden personalizar para detectar la presencia o ausencia de esencialmente cualquier polinucleótido.

[0024] También es posible fijar en un medio tangible la determinación de si el mamífero ha sido infectado o no por un virus descrito en este documento. El medio tangible puede ser cualquier tipo de medio tangible, tal como cualquier tipo de medio digital, incluyendo, pero no limitado a, archivos digitalizados que pueden ser almacenados en un ordenador, un DVD, un CD-ROM, o un mensaje de correo electrónico. El medio tangible podría ser proporcionado a un proveedor de asistencia médica con el fin de desarrollar un protocolo de tratamiento para el mamífero infectado.

[0025] Se entenderá por los expertos en la materia que, dado el beneficio de la presente descripción, se pueden producir y utilizar una variedad de reactivos en procedimientos de diagnóstico adicionales para la detección de los virus descritos en este documento. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos policlonales o monoclonales utilizando proteínas virales aisladas o recombinantes o fragmentos de las mismas codificadas por los ácidos nucleicos descritos en este documento. Por lo tanto, se pueden producir anticuerpos para reconocer específicamente cualquier determinante antigénico presente en cualquiera de dichas proteínas virales. Dichos anticuerpos pueden reconocer las proteínas virales NS-1, NS-2, N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2, y L, o partes o combinaciones de las mismas. Se espera que se puedan producir anticuerpos que pueden discriminar los virus descritos en este documento de otros virus relacionados, tal como MPV.

[0026] Los anticuerpos se pueden usar en cualquier técnica mediante la cual se puede determinar la presencia o ausencia de un antígeno viral en o de una muestra biológica. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a, transferencia Western, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, ensayos ELISA y matrices de proteínas basados en microesferas o convencionales.

[0027] Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar realizaciones específicas de la invención, pero no deben interpretarse como limitantes de la invención de ninguna manera.

#### EJEMPLO 1

[0028] Se obtuvieron muestras de frotis nasales y faríngeas de perros de raza mixta y se utilizaron para inocular cultivos de células A72 caninas (American Type Culture Collection, CRL-1542) para aislar los virus respiratorios. En una fase tardía del pase en el cultivo que corresponde a aproximadamente 21 días después de la inoculación, algunos cultivos mostraron cambios citopáticos sutiles. Después del pase continuo los cultivos mostraron pequeños focos de células redondeadas, seguido de una muerte celular rápida en todo el cultivo. Este patrón se juzgó subjetivamente como no característico de los virus comúnmente asociados con ARDC. Se obtuvieron trece aislados virales individuales y se describen en este ejemplo. Las pruebas con un panel de reactivos de diagnóstico específicos para agentes respiratorios caninos comunes no pudieron identificar un virus conocido. Más pruebas con reactivos adicionales para otros virus revelaron en última instancia el reconocimiento positivo mediante un ensayo de inmunofluorescencia (IFA) utilizando un conjunto de anticuerpos monoclonales (Mab) contra el virus sincitial respiratorio humano (anti-HRSV, no. VP-R151, Vector Laboratories, Burlingame, California, EE.UU.). Esta preparación de anticuerpo se utiliza comúnmente en nuestro laboratorio para la detección de RSV bovino (BRSV). El patrón de tinción incluía viriones filamentosos unidos a la membrana y de libre flotación e inclusiones citoplasmáticas, típicos del patrón observado en células infectadas por RSV.

[0029] Después de los primeros resultados de IFA, se intentó amplificar un fragmento del gen de la nucleocápside (N) del virus usando cebadores de PCR que fueron diseñados en base a un alineamiento de secuencias RSV ovinas humanas y bovinas. Esto no tuvo éxito. Las soluciones madre de los Mabs individuales en el conjunto anti-RSV y sus especificidades se obtuvieron del fabricante y se utilizaron para IFA (figura 1). La tinción con Mab 5H5N (específico de la proteína M2) iluminó ambos viriones y las inclusiones. Mab 2G 122 (específico de proteína P) tiñó principalmente inclusiones y produjo una señal asociada a la membrana relativamente uniforme. No se obtuvo tinción con Mabs 1C3 (específico de proteína N) o 5A6 (específico de proteína F). Los 4 Mabs individuales reconocieron BRSV mediante IFA. El reconocimiento del virus canino por sólo 2 de 4 Mab y la imposibilidad de amplificar una región conservada del genoma de RSV sugirió que estaba relacionado, pero no era una forma típica de RSV.

[0030] Se persiguió la elucidación de la secuencia del virus mediante el diseño de cebadores de PCR degenerados basados en secuencias de aminoácidos (aa) altamente conservadas en múltiples alineamientos de secuencias de todos los virus en la subfamilia *Pneumovirinae* utilizando el algoritmo CODEHOP. Se marcaron las regiones específicas dentro de los genes de L (polimerasa) y N. La secuenciación de los productos de reacción y el análisis BLAST reveló que el virus estaba estrechamente relacionado con el neumovirus murino (MPV), tradicionalmente conocido como neumovirus (o virus de la neumonía) de ratones. Se encontró que dos productos de PCR del gen de L eran de un 95% a 97% idénticos a MPV y un fragmento del gen de N era aproximadamente un 96% idéntico.

[0031] Para hacer frente a la cuestión de si el neumovirus recién identificado se limitaba al grupo de perros del refugio analizados, se cribaron muestras de suero canino azar y se encontró que 6 de 27 animales tenían anticuerpos que reconocían específicamente el virus en cultivos infectados. Los patrones de tinción fueron similares a los observados con los Mabs (figura 2). Los sueros bovinos que contenían cantidades variables de anticuerpos neutralizantes contra el BRSV no teñían las células infectadas con el virus canino.

[0032] Este ejemplo demuestra que los virus aislados de 13 perros con ARDC parecen estar muy estrechamente relacionados con el MPV y por lo tanto se consideraron como neumovirus canino (CnPnV). El neumovirus murino es uno de sólo tres especies de virus clasificados en el género *Pneumovirus* en la subfamilia *Pneumovirinae* en la familia *Paramyxoviridae*. El RSV humano es la especie tipo y está muy estrechamente relacionado con el BRSV, mientras que el MPV está más alejado. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de la proteína N del RSV humano y bovino son aproximadamente un 94% idénticas entre sí, pero sólo tienen un 60% de identidad con MPV. Sólo hay dos cepas totalmente secuenciadas de MPV, "Cepa 15" ("Strain 15") y J3666, y son un 99,7% idénticas a nivel de nucleótidos.

[0033] La asociación de CnPnV con ARDC puede ser patógena en algunos casos, en particular cuando están implicadas en etiologías complejas. Por analogía, se conoce comúnmente que el MPV infecta colonias de roedores de laboratorio y las pruebas serológicas apuntan a una infección de varias especies de roedores salvajes, pero se sabe poco sobre su ecología natural. De hecho, no está claro que los roedores sean los únicos huéspedes naturales de MPV o si virus estrechamente relacionados pueden estar circulando en otras especies. Se han descrito evidencias para la infección humana en asociación con síntomas respiratorios (Pringle CR, et al. J Gen Virol. 1986; 67: 975-82). En la naturaleza, la infección de roedores puede ser subclínica o latente. Los signos clínicos en ratones

de laboratorio pueden variar desde asintomática hasta la progresión a un edema pulmonar, con alta morbilidad y mortalidad. Las cepas patógenas, incluyendo tanto J3666 como Cepa 15, pueden producir una neumonía grave y la muerte en 6-10 días cuando se inocula a baja dosis. La patogenicidad o falta de la misma puede ser dependiente del virus y la cepa del ratón.

5 [0034] Múltiples agentes bacterianos y virales pueden estar implicados en la enfermedad respiratoria canina. Se considera por tanto que CnPnV es otro agente capaz de iniciar la secuencia de eventos que comprometen los mecanismos de defensa del tracto respiratorio superior, conduciendo a una enfermedad más grave.

## 10 EJEMPLO 2

[0035] Se utilizaron los materiales y procedimientos presentados en este ejemplo para obtener los resultados descritos en los ejemplos restantes.

### 15 *Aislamiento del virus*

[0036] Se recogieron muestras nasales y faríngeas de perros de razas mixtas con signos de enfermedad respiratoria utilizando hisopos húmedos y se procesaron dentro de las 24 horas siguientes a la recepción en el Centro de Diagnóstico de Salud Animal de la Universidad de Cornell. Antes de la inoculación, los hisopos se sumergieron en 3 ml de medio esencial mínimo (MEM) con sales de Earle (Gibco 10370, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), albúmina de suero bovino al 0,5%, penicilina (200 U/ml), estreptomycin (200 µg/ml), y fungizona (2,5 µg/ml) durante 30 min y a continuación se agitaron mecánicamente durante 10 s. Las alícuotas de los extractos de los frotis nasales y faríngeos, 0,5 ml cada una, se combinaron y utilizaron para inocular un solo matraz T25 de células A72 semi-confluentes (Binn et al., 1980) (CRL-1542, American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU.) sin medio adicional. El extracto permaneció en la monocapa durante 1-3 h y a continuación se enjuagó con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las células se mantuvieron en 6 ml de medio de cultivo (medio L15 de Leibovitz, suero bovino fetal al 10% (FBS) inactivado por calor, penicilina 200 U/ml, estreptomycin 200 µg/ml, gentamicina 50 µg/ml) a 37°C y se subcultivaron cada 6-8 días. Los cultivos de A72 de control no inoculados se realizaron en paralelo a lo largo del procedimiento de aislamiento.

### 30 *Ensayos de inmunofluorescencia*

[0037] Las células se dejaron unirse a los portaobjetos de vidrio y a continuación se aclararon con PBS y se fijaron en acetona fría durante 10 min. Los portaobjetos se secaron al aire y se almacenaron a -20°C antes de la tinción. Se aplicaron anticuerpos primarios y secundarios diluidos en PBS a los portaobjetos y se incubaron durante 30 min a 37°C. Después de cada incubación, los portaobjetos se aclararon en PBS durante 15 min. La tinción se visualizó por microscopía de fluorescencia. Se utilizó un conjunto de Mab contra HRSV fue utilizado en la identificación inicial (VP-R151, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) a una dilución de 1:400. Se utilizó anti-PVM de ratón (CL-603IFA, Charles River Laboratories, Wilmington, MA EE.UU.) suministrado a una concentración 1 X a una dilución de 1:20. El anticuerpo secundario, IgG de cabra anti-ratón marcado con FITC (18/02/06, KPL, Gaithersburg, MD, EE.UU.), se utilizó a una dilución de 1:40 (12,5 µg/ml).

### *Purificación de ARN*

45 [0038] El ARN celular total se purificó de células A72 (74106, Qiagen, Valencia, CA, USA). Las células de un matraz infectado de 25 cm<sup>2</sup> que muestra aproximadamente un 50-75% de efecto citopático (CPE) se sedimentaron y se purificaron a través de cada columna. Los sobrenadantes libres de células y el medio que contenía los eluatos de los frotis se purificaron (52906, Qiagen) utilizando 140 µl de muestra. Los ARN purificados se volvieron a suspender en 40 µl de H<sub>2</sub>O libre de ARNasa.

### 50 *PCR*

[0039] Las secuencias de los cebadores degenerados utilizados inicialmente para obtener fragmentos genómicos se basaron en alineaciones de virus en el *Pneumovirinae* y se diseñaron utilizando el algoritmo CODEHOP (blocks.fhcrc.org/codehop.html) (Rose et al, 1998). Se realizó una PCR con transcripción inversa (RT-PCR) en una reacción de una sola etapa (210212, Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un volumen de 25 µl. Se utilizaron 1 µl de ARN total a una dilución de 1:5-1:10 y 10 pmol de cada cebador por reacción. Las condiciones de reacción para la etapa de RT fueron 30 min a 50°C y a continuación 15 minutos a 95°C. Las condiciones de ciclado fueron 60 s a 95°C, 30 s a 54-56°C, y 60-90 s a 72°C durante 35 ciclos. Los conjuntos de cebadores para el gen de N: N276F, tcggtgcaggccgaratggarcarg/P1R, (SEQ ID NO: 35) ggaactcggggcgaaytttccat; SEQ ID NO: 36); gen de L no 1: L428F, ccggatcttcggccayccnatggt/(SEQ ID NO: 37) L538R, ttcttagggaggatggcyytrtrctt; (SEQ ID NO: 38) gen de L no. 2: L698F, catcaccgacctgtccaagtyaaycargc/(SEQ ID NO: 39) L894R, tgaagtcgtccaggatgtrtrdatcca (SEQ ID NO: 40). Se diseñaron dos conjuntos de cebadores de PCR usados con muestras de frotis de diversas localizaciones geográficas basándose en las alineaciones de las secuencias de CnPnV, J3666 y cepa 15 de MPV. Proteína G: G715F, ggcctctgtttctcttctg/(SEQ ID NO: 41)

5 G1062R, ccgtggtgctctgtg (SEQ ID NO: 42); Proteína SH1: SH1F, atggatcctaactgacctcayac (SEQ ID NO: 43)/SH187R, gattgggatgaacygtgcattg (SEQ ID NO: 44). Cebadores utilizados para amplificar los aislados Brne de bajo pase: G84F, tgtaaaagtgaccaaagtgtga (SEQ ID NO: 45)/G404R, aaatcttcaggtaatcaggtc (SEQ ID NO: 46); G849F, ttttaacaacaagaatcagtc (SEQ ID NO: 47) G1048R, ctccctaggtgctgggggttg (SEQ ID NO: 48). Condiciones de reacción para los amplicones G y SH fueron RT a 50°C durante 30 min, inactivación/desnaturalización a 95°C durante 15 min, y PCR en 60 s a 95°C, 30 s a 54°C, y 90 s a 72°C, durante 35 ciclos.

#### *Análisis genómico*

10 **[0040]** Los productos de PCR se secuenciaron utilizando un Analizador de ADN Applied Biosystems Automated 3730 DNA Analyzer en el Cornell University Sequencing and Genotyping Core Laboratory. Los cebadores usados para determinar las secuencias completas se basaron en secuencias de MPV o secuencias CnPnV previamente determinadas. Se generaron productos de PCR solapantes para cubrir huecos y regiones de unión a cebador. Todas las regiones se secuenciaron en ambas cadenas. Los aislados de CnPnV se compararon con las secuencias de la cepa 15 de MPV (GenBank AY729016) y J3666 (GenBank NC006579) utilizando Lasergene (DNASTAR, Madison, WI, EE.UU.).

### **EJEMPLO 3**

#### 20 *Aislamiento e Identificación*

25 **[0041]** Se utilizaron eluatos de frotis nasales y faríngeos para inocular células A72. Después de un período relativamente largo en el cultivo, que normalmente aparece después del tercer o cuarto pase, se observó un CPE limitado. El CPE inicial normalmente incluía pequeños focos dispersos de células redondeadas, a veces con pequeños sincitios y vacuolización. Este CPE progresó lentamente durante varios días en cultivos estacionarios. El subcultivo condujo a menudo a monocapas que mantuvieron este CPE de bajo grado, pero en algunos cultivos se produjo una rápida progresión y disgregación de la monocapa en 24-48 horas. Este patrón, aunque similar a algunas infecciones por virus del herpes, no dio positivo para virus del herpes canino y no parecía ser típico de cualquiera de los virus respiratorios caninos que se aíslan habitualmente usando procedimientos similares. Varios de los aislados de pases tempranos se replicaron mal en el cultivo, mostrando poco o ningún CPE tras la transferencia de sobrenadante a células nuevas. Sin embargo, con el paso continuo algunos cultivos desarrollaron más consistente un CPE transferible y se eligieron para su posterior análisis. Las pruebas iniciales mostraron que los sueros de varios perros no relacionados parecían reconocer el antígeno viral en cultivos con CPE (datos no presentados), pero las pruebas para virus respiratorios caninos comunes fueron negativas. Tal como se indica en el ejemplo 1, los Mabs específicos para HRSV reconocían fuertemente el antígeno viral. La tinción por IFA positiva con un suero policlonal anti-PVM se utilizó para su confirmación. El suero de ratón anti-PVM sólo reconoció débilmente BRSV mediante IFA.

40 **[0042]** Las 13 aislados originales de CnPnV descritos en el ejemplo 1 se originaron de 2 refugios de animales que fueron gestionados por la misma organización. Para investigar si el virus estaba confinado a estos 2 lugares, se analizaron mediante PCR muestras de frotis nasales o faríngeas de perros enfermos de otras localizaciones geográficas. Se analizaron diecinueve perros de 8 estados de los EE.UU. (CO, GA, FL, EN, MO, NV, SC, VA) utilizando conjuntos de cebadores para los genes de G y SH. De las 19 muestras, una de Nevada, y 5 de un grupo de 9 perros de Carolina del Sur, dieron positivo por PCR de G y SH y se confirmaron por secuenciación. No se obtuvieron resultados positivos por PCR de los otros 13 perros. El aislamiento del virus en las células A72 se intentó en 6 muestras de frotis nasales adicionales de Nueva York y Pensilvania que se presentaron para el diagnóstico respiratorio canino. De éstos, dos aislados adicionales vinieron de un hospital veterinario de la ciudad de Nueva York y otro se originó de un refugio en Philadelphia, PA. Estos aislados fueron confirmados como CnPnV mediante IFA con anticuerpos anti-RSV y anti-PVM y posteriormente con RT-PCR. Aunque estos resultados por RT-PCR y aislamiento de virus no proporcionan una evaluación precisa de la prevalencia, sí indican que la infección con CnPnV está muy extendida.

#### *Análisis de secuencia*

55 **[0043]** Los estudios previos han observado diferencias entre aislados virales que pueden ser atribuibles a la presencia de cuasiespecies naturales, mutación durante el paso del cultivo, o subproductos de PCR. Para determinar las secuencias consenso más precisas para los aislados de CnPnV, se utilizaron múltiples reacciones de RT-PCR solapantes utilizando ARN celular total como plantilla. Se secuenciaron los aislados virales de dos perros, uno en el paso 4 del cultivo de tejidos (Ane4) y uno en el paso 17 (Brne 17), y se compararon con las secuencias de J3666 (Thorpe y Easton, 2005) y la cepa 15 (Krempl et al., 2005). Se obtuvo una secuencia de 8598 nt (SEQ ID NO: 60 1) de CnPnV-Ane4 comenzando con la secuencia líder 3' adyacente a NS1 y que se extendía una corta distancia en la región codificante de L, que cubre completamente 9 de los 10 genes predichos en el genoma. Se confirmó el orden de los genes NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L. La identidad global de la secuencia de nt de esta región de CnPnV-Ane4 en comparación con las cepas de MPV fue de un 95,0% para J3666 y un 94,7% para la cepa 15. Las cepas de MPV son un 99,7% idénticas entre sí. No se hallaron espacios dentro de las regiones codificantes en las comparaciones de CnPnV-Ane4 y las cepas de MPV. Con excepciones con respecto a las diferencias de longitud

para G y SH tal como se describe en las secciones 3.4 y 3.5, se encontró que todas las regiones codificantes en MPV y CnPnV-Ane4 codificaban proteínas de la misma longitud.

*Análisis comparativo de regiones no traducidas*

**[0044]** Los límites de las secuencias de GS y GE en CnPnV se determinaron mediante la alineación de las secuencias de J3666 y cepa 15 (Thorpe, L.C., Easton, A.J., 2005. *J. Gen. Virol* 86, 159-169; Kreml, et al. 2005. *Virus Genes* 30, 237-249). Las secuencias de GS de MPV fueron descritas por Chambers et al. (1991) y más recientemente (Dibben y Easton, 2007) como 9 nt de longitud basadas en las secuencias GS de RSV según determinó Collins et al. (1986). Kuo et al. (1997) proporcionaron evidencias de que el 10<sup>o</sup> nt es también importante en la GS de RSV y esto se ha equiparado a una GS de MPV por tener 10 nt de longitud (Kreml et al., 2005). En la tabla 1, la GS se presenta como 10 nt para incluir ambas interpretaciones. La tabla 1 proporciona secuencias de GS, GE e IGR entre regiones codificantes en CnPnV-Ane4 en comparación con la cepa 15 y J3666 de MPV.

**Tabla 1**

Gen 3'	GE	IGR	GS	Gen 5'	Longitud NTR
NS1	uaguuaauuaaaa	caaaggggu	aggacaagug	NS1	
NS2	uaguuaagaaaa	<u>u</u> auu*	aggacaa <u>u</u> uc*	NS2	sin dif.
N	uaauuaauuaaaa (+1[a])	cuggaaaa <u>u</u> au*	aggauaaaua	N	sin dif.
P	uaguuaauuaaaa	uaac(-3[aca])	aggacaaaua	P	1 nt más larga
M	uaguuaauuaaaa	c(-1[u])	aggaua <u>g</u> ua*	M	3 nt más corta
SH	uaguuaacaaaaa	uu	aggaua <u>a</u> gua*	SH	sin dif. <sup>a</sup>
G	uaguuaaugaaaa (+1[a])	uaagcu <u>a</u> ugauuaau* (-1[c])	aggacaaaua	G	sin dif.
F	uaguuaauuaaaaa (+1[a])	cuu <sup>b</sup>	aggauaagug <sup>b</sup>	F	sin dif.
M2	uaguuaauuaaaaa (-2[a])	uaau <u>c</u> aaau*	aggaucaaua	M2	1 nt más larga
				L	2 nt más corta

**[0045]** Para la tabla 1, no hay diferencias en las longitudes de NTR entre las dos cepas de MPV. Las secuencias de ARN están en la orientación 5' a 3'. \*: Indica al menos 1 cambio de nt de J3666 y la cepa 15. Las diferencias de nt están en negrita y subrayado. GE: fin del gen; IGR: región intergénica; GS: inicio del gen; sin dif.; no hay diferencias en la longitud. <sup>a</sup>Para M-SH no hay diferencia en la longitud total de NTR; un u se elimina de la IGR y otro u se añade en dirección 5' en la NTR. <sup>b</sup>La IGR de 3 nucleótidos y probablemente GS de M2 se basan en el análisis por Dibben y Easton (Dibben, O., Easton, A.J., 2007. *Mutational Analysis of the Gene Start Sequences of Pneumonia Virus of Mice*. *Virus Res.* 130, 303-309). Las secuencias que tienen 10 o más nucleótidos mostradas en la tabla 1 tienen las siguientes SEQ ID: Para las secuencias en la columna "GE" NS1 uaguuaauuaaaa (SEQ ID NO: 18); NS2 uaguuaagaaaa (SEQ ID NO: 19); N uaauuaauuaaaa (SEQ ID NO: 20); P (SEQ ID NO: 18); M uaguuaauuaaaa (SEQ ID NO: 21); SH uaguuaacaaaaa (SEQ ID NO: 22); G uaguuaaugaaaa (SEQ ID NO: 23); F uaguuaauuaaaaa (SEQ ID NO: 33); y M2 uaguuaauuaaaaa (SEQ ID NO: 34). Para las secuencias en la columna de "IGR": N cuggaaaau (SEQ ID NO: 24); y G uaagcuaugauuaau (SEQ ID NO: 25); para las secuencias en la columna de "GS"; NS1 aggacaagug (SEQ ID NO: 26); NS2 aggacaauuc (SEQ ID NO: 27); N aggauaaaua (SEQ ID NO: 28); P (SEQ ID NO: 28); M aggacaaaua (SEQ ID NO: 29); SH aggauaagua (SEQ ID NO: 30); G (SEQ ID NO: 30); M2 aggauaagug (SEQ ID NO: 31); F (SEQ ID NO: 29) y L aggaucaaua (SEQ ID NO: 32).

**[0046]** Se identificaron algunas variaciones de longitud y diferencias de nt en las NTR de CnPnV-Ane4, la mayoría se encuentran dentro de la IGR. No hay diferencias entre las dos cepas de MPV en las IGR. Chambers et al. (Chambers, P., Matthews, DA, Pringle, CR, Easton, AJ, 1991. *Virus Res.* 18, 263-270) determinaron la GS de M2 a partir de un clon de ADNc, pero también indicaron la presencia de 2 secuencias potenciales adicionales de GS (GS1 y GS2) en la IGR de 56 nt. El análisis mutacional determinó posteriormente que la supuesta secuencia de GS no era funcional debido a G en lugar de A en la posición 6. Posteriormente, determinaron que las secuencias de GS1 y GS2 eran capaces de dirigir la iniciación de la transcripción, siendo la primera secuencia (GS1) la más importante. Llegaron a la conclusión de que la secuencia de GS identificada originalmente se identificó erróneamente probablemente debido a una delección espontánea durante la clonación de ADNc. En CnPnV la secuencia de GS1 para M2 que sigue inmediatamente a la secuencia de GE para F es idéntica a las secuencias de inicio de gen de SH y G, excepto en el nt 10<sup>o</sup>. Se cree que GS1 se usa principalmente y se muestra en la tabla 1. La GS2 para M2, AGGACAGGG, difiere en sólo 2 posiciones de la secuencia de consenso descrita en (Dibben, O., Easton, AJ, 2007. *Virus Res.* 130, 303-309), pero puede tener una actividad limitada, ya que no tiene una A conservada en la posición 7. Esto difiere de J3666 y la cepa 15 donde la A se conserva. La tercera GS potencial de M2 (GS3) en CnPnV-Ane4 es idéntica a la de J3666 y la cepa 15 y por lo tanto se presume que es muy poco funcional debido a la G en la posición 6.

*Análisis de proteínas no estructurales*



**[0047]** La proteína hidrofóbica pequeña no estructural parece tolerar una variabilidad significativa, ya que es la proteína más divergente entre las dos cepas de MPV donde sólo hay un 92,4% de identidad de aa sobre los 92 aa que comparten. En CnPnV-Ane4 la proteína SH fue la más divergente de todas las proteínas examinadas en comparación con la cepa 15 de MPV. SH de CnPnV-Ane4 tiene 4 diferencias de aa (95,7%) con J3666 y 9 diferencias de aa (90,2%) con la cepa 15 y es por lo tanto más similar a J3666 que las cepas de MPV entre sí (tabla 2). Otra diferencia significativa es en la longitud de la ORF de SH en diferentes aislados. Tanto CnPnV-Ane4 como la cepa 15 tienen ORF de SH de 279 nt (92 aa), mientras que la secuencia SH de J3666 publicada tiene 345 nt (114 aa). Sin embargo, se ha descrito que las secuencias amplificadas de forma independiente de J3666 codificaban de forma diversa para 92, 96, ó 114 aa y se sugirió que representaban mutantes de escape de anticuerpos. La tabla 2 proporciona un resumen del porcentaje de identidad de los genes y proteínas de CnPnV-Ane4 a los virus en la subfamilia Pneumovirinae.

Tabla 2

Gen	MPV-J3666 nt/aa ( $\Delta$ nt/ $\Delta$ aa) <sup>a</sup>	MPV-cepa 15 nt/aa ( $\Delta$ nt/ $\Delta$ aa)	HRSV nt/aa	BRSV nt/aa	HMPV nt/aa	AMPV nt/aa
NS1	94,4/93,8 (18/7)	94,4/93,8 (18/7)	44,1/15,0	43,4/15,9	NA	NA
NS2	95,1/94,2 (23/9)	95,1/94,2 (23/9)	42,6/22,6	42,6/22,6	NA	NA
N	95,9/97,7 (48/9)	96,0/98,0 (42/8)	61,1/59,6	61,4/60,4	51,7/45,2	50,3/42,6
P	95,0/96,6 (44/10)	94,3/94,4 (1/15)	49,9/41,9	48,8/44,4	40, 8/29,1	40,4/29,1
M	96,6/8,1 (27/5)	96,5/98,1 (28/5)	54,6/41,6	54,4/42,0	51,4/39,1	50,5/39,1
SH	93,2/95,7 (19/4)	91,0/90,2 (25/9)	44,7/18,5	39,7/16,0	31,5/6,6	29,3/12,0
G	94,5/91,9 (66/32)	94,5/91,7 (65/33)	33,4/19,4	37,1/14,4	36,7/10,5	33,2/10,7
F	97,1/97,4 (47/14)	97,0/97,0 (49/16)	54,6/43,6	55,0/45,3	50,9/40,8	49,8/41,0
M2-1	95,5/96,6 (24/6)	95,5/96,6 (24/6)	53,5/42,6	52,4/42,0	47,0/36,0	48,7/36,0
M2-2	96,3/95,9 (11/4)	96,3/95,9 (11/4)	37,3/11,1	39,9/12,2	34,0/5,6	34,9/9,9

**[0048]** Para la tabla 2, las referencias a la secuencia de GenBank no: HRSV, N\_001781; BRSV, NC\_001989; HMPV, NC\_004148.2; AMPV, NC\_007652, que corresponden a secuencias de longitud completa de RSV humano, RSV bovino, metaneumovirus humano y metaneumovirus aviar. nt: nucleótido; aa: aminoácido; NA: No aplicable. <sup>a</sup>números de nt y diferencias de aa en cada gen. Se encontró que la proteína P de CnPnV-Ane4 presentaba 10 diferencias de aa con J3666 y 15 diferencias de aa con la cepa 15. Las alineaciones de P de MPV y RSV muestran dos regiones de alta homología que flanquean una región amino-proximal del aa 22 a 124 que no tiene una similitud obvia y contiene de 6 a 7 espacios en la alineación. Se identificaron dos regiones de diversidad moderada dentro de esta región de baja homología en P cuando se comparó CnPnV-Ane4 con ambas cepas de MPV. Siete diferencias de aa están agrupadas en la región de aa 58 a 74 y se encuentran otros 4 cambios en los aa 93-102. Los gráficos de probabilidad predicen la primera región de diversidad de los aa 58-74 para tener una probabilidad de superficie y un índice antigénico relativamente altos. La segunda región diversa en los aa 93-102 es hidrofóbica y tiene una probabilidad de superficie predicha baja (datos no mostrados). Un segundo ORF solapante iniciado internamente en P, capaz de codificar una proteína de 137 aa, ha sido identificado en MPV. Se utilizaron construcciones de minigenomas sintéticos para estudiar la proteína producida a partir del segundo ORF y se encontró que funcionaba como un inhibidor de la transcripción. CnPnV-Ane4 tiene el segundo ORF solapante de P que se inicia en la misma posición pero termina más temprano y produce una proteína de menos de la mitad del tamaño de 54 aa debido a una transversión de T a A en el nt 285 produciendo un codón TAG. (Dibben, O., et al. (2008) Virus Res. 131, 47-53). Esto deja abierta la cuestión de si una proteína P-2 más corta, si se produce, tiene la misma funcionalidad.

**[0049]** Las proteínas no estructurales restantes incluyen NS1 y NS2, y M1-1 y M1-2 que se traducen a partir de los marcos de lectura alternativos en el gen de M2. No hay diferencias entre estas proteínas en la cepa 15 y J3666. Sin embargo, CnPnV presenta diferencias con los aislados de MPV en cada una de estas proteínas. NS1 de CnPnV-Ane4 tiene 7 diferencias de aa en comparación con las dos cepas de MPV, 4 situadas cerca del extremo C-terminal. En NS2 hay 9 diferencias de aa que están distribuidas relativamente uniformemente a lo largo de la secuencia. CnPnV-Ane4 es un 96,6% idéntica a M2-1 con 6 diferencias de aa y un 95,9% idéntica a M2-2 con 4 diferencias de aa.

#### Análisis de proteínas estructurales

**[0050]** Las proteínas de unión a G de neumovirus son de especial interés porque habitualmente son las más divergentes y son dianas primarias para respuestas de anticuerpos neutralizantes. La proteína G está relativamente muy conservadas entre los dos aislados de MPV que tienen sólo 3 diferencias de los 396 aa (99,2%). En CnPnV, la proteína G es la proteína menos conservadas en comparación con J3666 y la segunda menos conservada después de SH en la cepa 15. Hay diferencias de 32 aa y 33 aa con J3666 y la cepa 15 G, respectivamente. Las diferencias de aa están generalmente distribuidas al azar con la excepción de varias diferencias agrupadas en la región 113-124 y diferencias de 11 aa entre aa 331 y 367 (basado en la numeración de la ORF de Ane4). Una observación notable es que el ORF de G de CnPnV-Ane4 es 54 nt más largo que su homólogo en J3666 y la cepa 15. Un cambio de ACG a AUG en la posición +29 de la GS crea un codón de iniciación alternativo que está presente en J3666 pero no

en la cepa 15. Un segundo cambio de UAG a AGA en +65 elimina un codón de terminación en el marco. El ORF de G codifica una proteína con una cola citoplasmática de 53 aa, 18 aa más larga que las secuencias publicadas de J3666 y la cepa 15. La secuencia de J3666 tiene un codón de terminación en esta posición, mientras que la cepa 15 no. Por lo tanto, tanto en J3666 como en la cepa 15 una mutación en un único punto podría producir la variante G más larga. Esto no es inédito, ya que la secuencia del producto RT-PCR no clonado amplificado a partir de los pulmones de ratones infectados con J3666 también tenía el cambio de U a A en +65. Por lo tanto, parece que la variante de G más larga no es una característica que sea única para CnPnV. Teniendo en cuenta las ventajas de la presente descripción, los datos de secuencia adicionales de caninos y productos de RT-PCR murinos para determinar qué variación predomina en infecciones naturales pueden determinarse usando la capacidad ordinaria de la técnica. Parece haber cierta plasticidad natural en la longitud de la cola citoplasmática de G y la cola es en sí misma un determinante de la virulencia. Un mutante de MPV recombinante que carece de la cola citoplasmática de G se atenuó en ratones BalbC, pero los niveles de replicación eran indistinguibles de los virus de tipo salvaje (Krempl, CD, et al. 2007, J. Virol. 81, 9490-9501). En el RSV los primeros 6 aa de la cola citoplasmática son esenciales para la interacción con la proteína M. No se sabe si el aa N-proximal de G es esencial para la unión a M en MPV, pero si se demuestra que es el caso, entonces las dos variaciones de la cola citoplasmática podrían diferir en su capacidad de interactuar con M.

**[0051]** La proteína F del CnPnV-Ane4 no tiene un nivel alto de diversidad similar a la que se encuentra en G y de hecho es una de las proteínas más conservadas en comparación con MPV. Hay 14 diferencias de aa con J3666 y 16 diferencias de aa con la cepa 15 con un 97% o más de conservación. Aproximadamente la mitad de las diferencias de aa están dentro de los últimos 55 aa en el extremo COOH-terminal, dentro o adyacente al dominio transmembrana, y la mayoría de las sustituciones de aa son del tipo de grupo funcional similar. En general, N es la proteína más altamente conservada en relación con los otros neumovirus. La región central de la proteína de los aa 245-333 en CnPnV-Ane4 alcanza del 92 al 93% de identidad con HRSV y BRSV. La N de CnPnV-Ane4 tiene 9 diferencias de aa con J3666 y 8 diferencias con la cepa 15 que se distribuyen de manera relativamente uniforme. Ninguna de las diferencias de aa corresponde a las posiciones invariantes identificadas en los neumovirus o a los residuos que interactúan con el genoma de ARN. Parece poco probable que cualquiera de estas diferencias pueda tener un efecto significativo sobre la estructura o función de la proteína. La proteína M tiene el nivel de conservación más alto con los aislados de MPV al 98,1%. Las 5 diferencias aa se distribuyen uniformemente en la secuencia y en todos los casos se conservan los grupos funcionales. Sólo una diferencia, un cambio de V a I en el aa 18, implica un residuo que se encuentra normalmente como invariante en la proteína M de neumovirus y metaneumovirus.

*Análisis a alto y bajo pase en el cultivo*

**[0052]** Se identificó un aislado bien adaptado al cultivo y consistentemente replicado y produjo CPE cuando se utilizó para infectar cultivos sin tratar. Aunque este aislado estaba en el pase 17 (Brne17), se secuenció y posteriormente se comparó con el aislado Ane4 del pase inferior. De los 8423 nt secuenciados, se identificaron 7 diferencias de nt en Brne17 (tabla 3, proporciona las diferencias de nucleótidos y aminoácidos entre CnPnV-Ane4 y Brne en dos etapas del pase y ex vivo). Para la tabla 3, <sup>a</sup>posición del nucleótido desde el principio de cada inicio del gen. <sup>b</sup>Numeración de aminoácido basada en la posición en cada ORF. ND: no determinado; nt: nucleótido; aa: aminoácido.

**Tabla 3**

Gen	Posición	Ane4	Brne17	Brne3	BrneSw
N	nt 1081 <sup>a</sup>	T	C	ND	ND
	-	-	-		
M	nt 543	A	G	ND	ND
	aa 178 <sup>b</sup>	Q	R		
SH-G NTR	nt 397	-	+A	ND	ND
	-	-			
G	nt 392	A	T	T	A
	aa 122	K	parada	parada	K
G	nt 1053	T	C	T	ND
	aa 342	L	P	L	
F	nt 1098	A	T	ND	ND
	-	-	-		
F	nt 1140	G	A	ND	ND
	-	-	-		

**[0053]** Una única diferencia de nt en N y 2 diferencias en F son sustituciones sinónimas. La adición de un residuo A en la secuencia GE de SH en Brne17 es también no codificante. Dos diferencias nt son sustituciones no sinónimas causando un cambio de Q a R en el aa 178 en M y un cambio de L a P en el aa 342 en G. La diferencia más significativa hallada en Brne17 es la sustitución de un U por una A en el nt 364 en el ORF de G que da lugar a la sustitución de un residuo K por un codón de terminación en la posición de aa 122. Esta posición corresponde al nt 310 (aa 104) en las cepas de MPV. La terminación en esta posición daría a Brne17 una G truncada con una cola

citoplasmática de 53 aa, un dominio transmembrana de 24 aa, y un ectodominio de sólo 44 aa. El hallazgo de una G truncada en Brne17 impulsó la secuenciación adicional de productos de amplificación de la solución madre del paso 3 y del eluato del hisopo original (Brne3 y BrneSw). De manera destacada, esto demostró que la variante truncada ya se había establecido tan pronto como en el paso 3. Sin embargo, en BrneSw había una A en el nt 364 lo que indica que las especies virales predominantes en el perro no tenían una G truncada. Un segundo conjunto independiente de extracciones y amplificaciones de ARN incluía muestras de los pases 1 y 2 y sólo en el paso 1 había un pico subyacente en el electroferograma indicando una subpoblación menor con A en el nt 364. Por lo tanto, parece que la forma truncada se seleccionó rápidamente en el cultivo. Se identificó una mutación similar en la cepa 15 pasada en el cultivo (Warwick) donde una sola inserción de nt que crea un desplazamiento de marco provoca la terminación prematura del péptido. La iniciación de la traducción en un sitio en dirección 3' alternativo todavía puede producir una proteína G que es 33 aa más corta y carece de una cola citoplásmica. La G truncada se ha sugerido como al menos una explicación parcial para la reducción de la virulencia de la cepa 15 (Warwick).

**[0054]** En el VSR, se encontró que el mutante cp-52 pasado por frío tenía una gran delección que eliminaba la producción tanto de G como de SH, pero no impedía la replicación en el cultivo. La situación es análoga en el MPV ya que se replicó un recombinante que carece de todo el gen de G, así como un virus recombinante completo en cultivos de células BHK-21, pero no se replicó a niveles detectables en ratones. Esto sugiere que G es siempre esencial in vivo y por lo tanto se esperaría la detección de sólo la variante no truncada en BrneSw. El porqué parecía haber una completa selección de la variante truncada al final del paso 2 no está claro. Si la selección es simplemente debida al aumento de la eficacia de la replicación, entonces sería de esperar que la ausencia de G aumente la tasa de replicación y el título, pero no hay evidencias de apoyo de que éste sea el caso (Krempl et al., 2007, supra). Los factores que afectan a la selección de mutantes de delección de G pueden ser específicos de células A72.

**[0055]** La figura 3 proporciona una representación gráfica de la organización del genoma de la SEQ ID NO: 1. Los expertos en la materia entenderán que el gráfico en la figura 3 se muestra en la orientación 3' a 5' porque es un virus de cadena negativa, mientras que la SEQ ID NO: 1 presenta la cadena negativa en 5' a 3' leyendo de izquierda a derecha por orientación convencional. Por lo tanto, en la figura 3, el ORF de L es en el extremo 3' de la cadena positiva. La tabla 4 proporciona una anotación de la secuencia presentada en la SEQ ID NO: 1; las abreviaturas son: GS, secuencia señal del inicio del gen; ORF, marco de lectura abierto; GE, secuencia señal del fin del gen; IGR, región intergénica no transcrita. Los nucleótidos no listados se cree que no están traducidos.

**Tabla 4**

líder 3'	1-25
NS1-GS	26-35
NS1-ORF	64-405
NS1-GE	423-435
IGR	436-443
NS2-GS	444-453
NS2-ORF	457-927
NS2-GE	1001-1014
IGR	1015-1018
N-GS	1019-1028
N-ORF	1050-2231
N-GE	2225-2238
IGR	2239-2249
P-GS	2250-2259
P-ORF	2259-3146
P-GE	3144-3156
IGR	3157-3160
M-GS	3161-3170
M-ORF	3171-3944
M-GE	4080-4092
IGR	4093
SH-GS	4094-4103
SH-ORF	4104-4382
SH-GE	4476-4489
IGR	4490-4491
G-GS	4492-4501
G-ORF	4520-5764
G-GE	5812-5825
IGR	5826-5841
F-GS	5842-5851

F-ORF	5851-7464
F-GE	7490-7504
IGR	7505-7507
M2-GS	7508-7517
M2-1-ORF	7564-8094
M2-2-ORF	8028-8324
M2-GE	8420-8433
IGR	8434-8442
L-GS	8443-8452
L-ORF	8452-8598

**EJEMPLO 4**

5 **[0056]** También se analizaron muestras biológicas obtenidas de felinos para la presencia de virus que podrían estar relacionados con el virus canino identificado en el presente documento. Las secuencias se obtuvieron para dos aislados, denominados 29 Kentucky (29 KY) y 77 de Kentucky (77 KY). Las secuencias parciales de los genes de G de 29 KY y 77KY proporcionan 353 nt correspondientes a los nt 726 a 1078 en el aislado de neumovirus canino (CnPnV) Ane4 descrito anteriormente y el gen de SH parcial: 29 KY que tiene 207 nt correspondientes a nt 2-208 en CnPnV-Ane4.

10 **[0057]** La secuencia de nucleótidos parcial de G de ambos aislados es un 94,7% idéntica al aislado J3666 del neumovirus murino (MPV) y un 98,0% idéntica a Ane4. La secuencia de 117 aminoácidos (aa) es un 90,6% idéntica a J3666 y un 97,4% idéntica a Ane4. Por lo tanto, las secuencias de G de 29 KY/77 KY están más relacionadas con Ane4 que con J3666.

15 **[0058]** La secuencia parcial de nt de SH de 29 KY es un 94,7% idéntica a J3666 y un 97,1% idéntica a Ane4. La secuencia de 69 aa es un 98,5% idéntica a J3666 y un 97,1% idéntica a Ane4. Por lo tanto, la secuencia 29 KY de felino está ligeramente más relacionada con J3666 que con Ane4. Sin embargo, se considera que estas secuencias representan neumovirus felinos recién descubiertos. Por lo tanto, la descripción de composiciones y procedimientos y todas las realizaciones de la invención descritas para los neumovirus caninos tal como se establece anteriormente se aplican a los virus felinos también y esas descripciones se reiteran por tanto para el virus felino.

20 **[0059]** Los expertos en la materia entenderán a partir de lo anterior que se ha demostrado que la infección por CnPnV no se limita a perros en los refugios del que se aisló originalmente. Se ha identificado fácilmente en muestras de perros con enfermedad respiratoria aguda. Aunque no se ha demostrado definitivamente un papel causal en la enfermedad, la presente invención ha proporcionado composiciones y procedimientos para identificar la presencia del virus y proteger contra el mismo, que se espera que sean importantes en el control de trastornos respiratorios en los mamíferos, incluyendo, pero no necesariamente limitado a, dichos trastornos en felinos y caninos que se correlacionan positivamente con la presencia del virus.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

35 **[0060]**  
 <110> Cornell University  
 <120> NUEVAS COMPOSICIONES DE NEUMOVIRUS Y PROCEDIMIENTOS PARA SU UTILIZACIÓN  
 <130> 018617.00191\_PCT  
 <150> US 61/288,401  
 <151> 2009-12-21  
 <160> 48  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 8598  
 <212> ARN  
 <213> Neumovirus canino  
 <400> 1  
 ggagguggug gcggugaagu cgucuucaa gaaaggucua ccaaugauac agcugccaag 60  
 55 agcauuaguu ucacuaaaag auauaacacc cuuuaguag cuaucuggua aguacacau 120

ES 2 537 421 T3

	uacuucuugu	ucaucaauag	gauccauauu	gauccuaauu	gauuauuuuu	auauaacuau	180
5	ugaauuaaca	ugaaguuggu	ugacuuggaa	ucucacacgau	ugacaauuug	agguuaauga	240
	cugauagcug	acagaugaag	gaauacaguc	cacaucaucu	ggccugacua	uaaucaaagu	300
	cuaugaucac	uugauuacuc	cagcugaguu	cuaugcagca	caaggccucu	uucacacagg	360
10	cuaucacauc	gacacgguuc	cacaccacag	acuucccugc	aucuauuuuu	guggaugguc	420
	uagacccauc	guaagugagg	uuucuauuuu	cuccaauaau	auacaucuua	ugcaguaugg	480
15	cuggauagua	uuuaggcagc	cuuaucauuc	uguuuucaua	gaagaauuuu	ucuucuccuc	540
	gauggagaug	acagauugga	ucagacugca	uaauacuccu	acuggcaguu	ucuugagaau	600
	gugaauaacu	ugucucuucu	uguguaucuu	gucuauauaa	gauaguauag	uguugcaacu	660
20	ucucaaaaua	uugacguccu	cugcguugcu	aucucuugcu	uguaauacca	gaccaacauc	720
	caaguucugu	aacacaguaa	ucaaacugcc	acaagcuauc	gacuuaguga	uguuguuagu	780
25	uuuuuccagg	uaacuuuua	gcacaccuau	gguucccuaa	gcuaucucag	caguccuuug	840
	uggugcauca	aauccacuga	caucggucau	ugcaucugug	uugguaucga	ggaaccuaua	900
	aauccuauug	agcauauagu	ucugccugag	cauaagaguu	uucaaaggcc	auucccaua	960
30	uuuaugacua	uacuugcaau	uccuuccucu	ggaacaaaac	ccuugaaccu	caaauuugca	1020
	aggucucaca	cucauccuac	ccuguccuug	agagucgagg	gaaguguugg	gucuggauug	1080
35	ucacuuaucc	uaaguuuuuu	aauuaacuaa	cucaauuauug	auuugguaca	auugucauga	1140
	uaaaacugug	aggccaggug	uacuuuugga	uuucaaccug	uugucccuga	uaauuuucga	1200
	uaccuuauac	agaaugaacc	cuaugacaac	cauuuuuaua	auaagcauuu	caacgaugag	1260
40	cagaguuguu	aguauauaug	acuugguuua	acuuuuauuc	acucuguuuu	cacuuaguc	1320
	cauaaacuga	ucagaggccu	ucaagaaugu	gcgugucuga	uugaugcuau	gcuccacauc	1380
45	ucuuauagca	acaucaaaau	uauugcagag	gaaauucaa	gggucauuu	ucaagaccaa	1440
	cgguuccccu	cugacuacaa	uugacuugcc	aacuucuuug	cuaagauagu	agacaguguu	1500
	uccuacuuga	accuugucca	ccccuuuguu	ggagauguag	ugacaaccu	cuggcagagu	1560
50	ccuuauuaua	ccuuugucau	uauugaugac	ugugcaacug	uuauuggccu	agcaagacac	1620
	caagcaacc	auuguaguca	guacugcugu	acucacauau	guuuuacuug	uggaaucuu	1680
55	acaaucguag	uuagugguau	acauguuuga	guugcauucu	cgugauguua	cagguacagu	1740
	uagacuuuuc	agagugucac	agaaaacaua	cccuuugugg	aucucacaau	cuguugguga	1800
	ugggaaguau	gauaaugagc	cugcauugug	acaauaccag	ccauuaucag	cucuagccaa	1860
60	acaagcauau	uugucugcua	uguuaugaca	gucuauggaa	cuucuuuuu	ccaacaauc	1920
	uguguccaua	acaccaaaua	acgggaguug	uauuuauua	accagugugu	cagcauugac	1980
65	ugaacuuauu	auugcuuacc	cguuuucuuc	cauuauagcu	cuacuagaua	gcauuauuc	2040
	uuuuuggccu	gcugaaacag	ccaugccgcc	uacuauuggag	gugaguuccc	ggucuguuaa	2100
	cauaaaagau	gaaacagugu	guguuaaucc	ugcauuagau	gaaaauucac	gagacacuuc	2160

ES 2 537 421 T3

	caaaagucuu	uuguugagcu	guuggaauuc	aaugacggca	gugaugucgu	gcacaucaca	2220
5	agagacucgg	uuuuuuuuug	ggaguaauuc	uuuagauaug	aaguuuuuca	aaucaucucac	2280
	cacuuuagcu	aacacugaca	ugccguuggu	uaggcuaaca	acagccucau	uuguauuuuc	2340
	cacugcuucu	cuaaucaaug	caaucucacu	uucaaguugc	acugucuugg	cuaaagccac	2400
10	cccggcagug	acugcagccc	cgagaccaag	aaucaaaccg	aggaaccucu	ucuuccuuuu	2460
	ggacuucaaa	gcauuggaug	auaacguucu	caauucaucc	acugcauuac	uauagauugc	2520
	aagcucauga	gccaaauaacg	aguugcugcu	cuugcaugac	ucaauuuuuu	uuugagacaa	2580
15	cuuaauugac	auaacuguca	ugugccaacc	aguucuaagg	gcacucuuau	aaccugcagu	2640
	cucaacacua	cauguggacu	cauagaauuu	uucuguuau	guauuugggu	gaauugguuu	2700
20	gguguugaag	aucaacagaa	gaacuagaaa	gauccugcca	ggaaucauau	uuguccuauu	2760
	auaucauagc	uuuuuuuuca	uuacuacug	auaagguugg	uacuuuuucu	gaaguugauu	2820
	cggguauagg	ucacucaaga	auuagaccuc	cuuggaaaua	auuggagcau	aggacaccaa	2880
25	uagggcauug	uugguuuggg	uucucugcuu	gagccuacuc	cacauaaagc	ucuuuuucuc	2940
	cgacugagag	guuuggaccu	ccuaggugcg	gggguugggu	uccuugucuc	cgguguuggu	3000
30	gccguggugg	ugccugugga	uuguuuagau	gcagcuuugu	gggcuugagg	acuuaggcug	3060
	gguaguccaa	cuagaggaag	guuuuugaa	agcccaucac	augugagaua	aaauuugua	3120
	ucuaggccag	cugagucugc	acagguggua	cacugagacu	gauucuuguu	guuaaaacua	3180
35	ggaaacaaaa	ucacaguuuug	gucugucagg	uugcaguuuug	uucugggaac	aacacaauua	3240
	gaguuacucc	aaauaguuuu	ccaauaggaa	ucauaaugca	auuccaugau	aacuuguuga	3300
40	ccuccaagcu	cuagcacggc	ucucuucuga	ucagugcuua	aaccagaaag	gaagaaacag	3360
	aagcccugau	cacacccauu	guggacacac	auugcccuuu	uguuggagua	cguagaaagg	3420
	gugauaaccu	cuauauaagg	ugcagcuucu	ucuccaccac	cauuguuuaa	gcccauguuu	3480
45	gccuucuuug	uuacaagauc	agggcaaaca	cuuccuaagu	ugaucucacg	uuucucauaa	3540
	caguuggugc	ugugauguuc	aggaccugga	ggcuugcaua	gaacauccaa	uacgagcuug	3600
50	aaaucuucag	guaaaucagg	ucggucuaaa	uaaccuuugc	uggagcauug	guagggaucc	3660
	ucugagggug	ucaccuuuuu	gacaggcucu	gugaucucau	gguggguggu	gguuuuggug	3720
	ggggguuuug	ugaguuuugg	gguggucccu	ugcucugugg	ugggcaggcc	ggcgguuuggu	3780
55	uggggagggg	cggaugugcu	guuccggauu	guggcguucu	gcguggaguu	ggccuuguga	3840
	uuugauguga	auacagaaua	cauuugacc	cccacacaaa	cugccacagc	agcacuugug	3900
60	agcacaccug	caauaagcuu	acacauuugg	uucacuuuuu	caacaguuccu	aaauuguca	3960
	ggauacugag	uucucucaaa	guucaaaaua	guaaugcugc	caccacuuc	aaaguuccuu	4020
	cccuaucuaa	gugaagucua	cuuguaguuc	ucuuguaua	gcugcucuc	aguucucuc	4080
65	agauuccaau	aagauaguac	uuauccuauu	uuuuuguuaa	cuagacgaca	uacuacaagg	4140
	gcugauugaa	ucaccuagca	gaguggggcu	gucuggcucg	ggguuuauug	aaggauguu	4200

ES 2 537 421 T3

	uuugcuguuu	auaacauuau	guaguguucc	uugaguacag	guugcccggc	agacuaguua	4260
5	cauugauucc	auaacuuggu	ggagggugau	ugggaugaac	cgugcauugg	cugcuagcga	4320
	ugccugaugu	agcaaugcuc	cuacugcugc	aggccauuau	cagcgcacac	acuguguuga	4380
	uaacagcgca	ugcaaggaga	agagcuguca	gggcuagugu	aaauauaugua	ccaauacggc	4440
10	ugcuggucau	guugaucuca	aaagugaucu	gguaugaggu	cauguuagga	uccauuacuu	4500
	auccuguuuu	auuuuacuaa	gauaugugug	uggauauaug	uaggugugua	uauugguug	4560
15	ucauauaggau	guugguggca	auaguuguug	ugcuagguga	agucgugggg	uuguaguau	4620
	ggauugagcu	gaucaauuggu	gacuuucua	uuuuucaucc	acuuguugag	gaacucuuga	4680
	guauguagga	agugccugua	uguuuccagu	ucauaaucac	aucauguagg	cucaccugag	4740
20	ucagauaggg	accaguucu	gcaagaauuu	gacaaccugc	cuuuagcagu	uugaugcac	4800
	cuuuggugga	ugugauguug	aucacaagug	ugaguccugc	auagggagcc	accuagcug	4860
25	uuguuauagc	augguccaca	ucggagcuua	uagccugcuc	cacacuauca	agguccugcu	4920
	gucugauaga	cagugcucug	augaagacag	guauagugaa	ugacuuuau	guaaccugu	4980
	uauggaaaga	gcagacagcu	aucagcucac	gaguaggucg	auuaguagga	guaaugcugg	5040
30	gcacagugua	aagcauguuu	uuaggcuuaa	gaauugucac	acagaagcuc	uuuuuaucaa	5100
	aagcaacagg	uacuucguau	uccauguugc	cccagucauc	caaggcuau	auagcauuu	5160
35	ucaagaauug	ccuuggcaug	guggcuaggc	cugcauugga	agagcucaga	ucuaccuuga	5220
	ucaugggacc	auguacaguu	gauuuuugug	uacagaugac	uguaacauca	uguagcaggu	5280
	ccaugacaga	guuccuuggu	agagauguuu	gaaacauugg	uauccacaca	guuagugua	5340
40	uguuggcuga	auguuuuuca	accaaguuuu	gcuguauugc	agcuguauau	gggacgccau	5400
	gguaucucuc	uaccaaguag	gccuccauua	uuuguccugu	uauuuuauu	aacuaaaaau	5460
45	uaaugcccau	gaugucauca	acauccaagu	cuuccuugc	cuccucagca	uugcuggaca	5520
	cuauuuuuc	uaguauccuu	gcucugucug	uuuuuuuaca	ggcugaucca	ucaucaguuu	5580
	cagcucuaga	gcauuccuca	ucucugagcu	ucuccauggc	cgccacucug	ucauugacag	5640
50	ucaagauguc	agacuugauc	aucucaauua	guucuuucuc	agugccuaua	agggaucuc	5700
	uaaucucauc	ucuagcagug	guugguccag	caguugcuac	cauaauggug	uuuuuuaggc	5760
55	cuauuuuugua	ggacaauuu	uccucuaau	uaucuagucu	uuguucuaca	gaugaagagc	5820
	ccggcucuu	guuagucucc	ucaauugua	gauugcuuu	uucaucaua	ccaucagcgg	5880
	caaaaguuu	cauggucucc	uuuacaggc	uggcuccca	uccgacaaac	uucucuucgg	5940
60	guuccacaaa	ggugaccauc	ggcuuccuag	uuuuuuuagu	aucgguauc	ucugagcagc	6000
	auggcuucuu	acuguguucc	ggauugucag	gaaccucaua	gacauguau	gucucuaugu	6060
65	cagcaucaga	uucuuugggc	ugcucuuccu	uguuuuuggg	aggugugggu	gguggagugg	6120
	aggggggagu	ggaggguuua	gugaguuuu	cggcggcucu	ugggggggag	aguuugaau	6180
	agcugcgcaa	uauugggggc	auguuuuuu	uggugacaug	aguggcagug	uucgguauc	6240

ES 2 537 421 T3

	cagcuagugg	uuuuuccgaa	gggaaggau	uanguuugag	aaacuccucu	gccuucuugu	6300
5	uggcauccuc	accgacaaa	ucaggggcaa	auuucuccau	auuuauccua	uauuuuccag	6360
	uuuuuaauua	aaaucauca	ucaggagugu	caucaacaau	gcucagcugu	uggcugauca	6420
	gcucucuuc	uucuguaguc	aaguucaaug	cacuguagu	aaauacauug	uuguccuuua	6480
10	aucuuucugc	auaaucuuua	gcagcaucaa	agaguucucu	auucuuagga	gcacccuuau	6540
	aagaccuau	gaugccuaaa	ccugcagcau	ugccaagcac	gacacuggug	aaauaggac	6600
	aaugguca	agagaggagu	gaagcuuuug	gauuuuuucu	aaauaugauag	aauccugccu	6660
15	ccccuccuug	cuucugggca	uauucguaaa	ccucaaccac	cuguuccauc	ucagcuugaa	6720
	cacuagcaug	gccuagcaug	auuuuucuga	caguuuuugc	caguuuuacc	caccucagca	6780
20	uaacuugucc	ugccccguau	gcauucauga	agagaccaga	aaacagcccc	ucaaccuugc	6840
	ugccaccuu	gacacuagac	ugggccaggc	caaaagugau	gaagacauca	auguaauaag	6900
	gcuuccuuuc	aaacagguca	uaaaagcuuu	cagcuauucg	cuugaccucc	agguugggau	6960
25	aucuggcuuu	cucggcuuuc	agcacuuuu	aagccuucuc	uuccacagca	ucaaguccuc	7020
	cucugucucc	ugcagcuau	uuggaaaca	cuauugcugc	aacacagaga	acuauuacac	7080
30	cacaucugg	ugcaucaugc	cuccgauuu	cagguaacc	ggcuccugu	uugaguucuu	7140
	uugcuaccac	uccucuggcu	uguauucca	gaucagcu	auuggccgca	ucuauuccca	7200
	cuauaucuag	gacuuguauu	uuauagucuu	uuccuugua	uuugauugua	aaguccuuga	7260
35	gcuguguguc	cacacuuuu	acauuguagc	cggcuucucu	caguauuuug	augcugucau	7320
	cucugccua	caaggacaug	gcauuuugga	gcccuauuc	ugccacuuc	ucgcagcggu	7380
40	ugaaagcagu	aaguaggaac	augccaagug	uccuugcaag	ggccuucugc	auagcaugac	7440
	cagauacacu	gguuacaucg	ccuguggauc	ugguaacacu	guauuugcag	uuggacagca	7500
	ggcuauccuu	guuugagaca	ucauugagcu	ucaacuuguc	uagagacauu	uuggcccggc	7560
45	uuaggauug	uauuuauccu	aaauuuuuuc	uaaaacuaau	cauagacuaa	auacuguauc	7620
	acuugcuaua	ggugguggga	uucucugcug	guuggagcga	ucugaaucag	cucagucauc	7680
50	aucauccuca	uuacagauc	agucauggcc	uggguacaga	augcauccug	ugcacucaau	7740
	ccagucuuuc	uugugcugua	caaagaaga	cuuuggguau	uucuccccag	uuacuucuu	7800
	cugccuccuu	augcacuucc	acucaaugcu	gucugccuca	gaugccauua	ccauccaagc	7860
55	caugucuucc	acauauugcu	uggccucaau	guaccccauu	uuuuuccuuu	uaagucuauc	7920
	auugcagauc	cugaugaagu	uccgguugau	guaucuagug	auguuuuuga	agcucggcug	7980
60	gaauuuuua	augagcaagu	caagccaccu	cucugagcuc	ugugugguac	gggacaccuu	8040
	gcccaucccu	gcuucaucac	ucgacucuu	acugucugaa	auguucaaga	uaguagcagg	8100
	uuuagaaaug	gucugaguga	acuuguucau	agcuguggac	auuaggauuu	guccuaccu	8160
65	uuguuuuaau	uaacuacaua	augugcuguc	auuuuaacca	cugaucagcu	cugccaauag	8220
	cucacaugug	gggucaaugg	gaggcucua	cucuugcccu	guaggacuaa	acacgauauc	8280



ES 2 537 421 T3

	uuuugugaac caauguguua auguuuggcc ucuucuagua uuauggauga auuuggcagc	8340
5	uugcacaaau ggucucaaca aguugcaguc ccuucccacg agguacacgg agagucucug	8400
	aucuugccau guacugcaca cccuagcacc ucuuaagauc guuuccaaau cugaccuauu	8460
	gaaguugguu auguggaau ccaaccaugc agcucuucca ccauaaccaa gcuccaucou	8520
10	cacauuacag cccaugauuc uggucuuuaa gacuaguugu cuccacuugu ccuaacuuuu	8580
	ucggaguggu ggguuugg	8598
15	<210> 2 <211> 354 <212> ARN <213> Neumovirus felino	
20	<400> 2 ccgugguggu gccuguggau uguuugaguu cagcuuugug ggcuugagga cuuaggcugg	60
	guaguccaac uagagggagg uuucuugaaa gcccaucaca ugugagguaa aauuuguuau	120
25	cuaggccagc ugagucugca caggugguac acugagacug auucuuguug uuaaaacuag	180
	gaaacaaaau cacaguuugg ucugucaggu ugcaguuuugu ucugggaaca acacaauuaa	240
30	aguugcucca auaguguuuc caauaggaau cauaaugcaa uuccaugaua gcuuguugac	300
	cuccaagcuc uagcacagcu cucuucugau cagugcuuaa accagaaagg aaga	354
35	<210> 3 <211> 207 <212> ARN <213> Neumovirus felino	
40	<400> 3 gauugggag aacugugcau uggcugcuua cgaugccuga uguagcaaug cuccuacugc	60
	ugcaggccau uaucagcgca cacacugugu ugauaacagc gcaugcaagg aggagagcug	120
45	ucagggcuag uguaauguau gugccaauac ggcugcuggu cauguugauc ucaaaaguga	180
	ucugguguga ggucauguua ggaucca	207
50	<210> 4 <211> 8598 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
55	<400> 4 ccaaacccac cacuccgaaa aaguuaggac aaguggagac aacuagucuu aaagaccaga	60
	aucaugggcu gaaaugugau gauggagcuu gguuauggug gaagagcugc augguuggca	120
60	uuccacauaa ccaacucaa uaggucagau uuggaaacga ucuuaagagg ugcuagggug	180
	ugcaguacau ggcaagauca gagacucucc guguaaccucg ugggaagggga cugcaacuug	240
	uugagaccou uugugcaagc ugccaaaauuc auccaauuaa cuagaagagg ccaaacauua	300
65	acacauuggu ucacaaaaga uaucguguuu aguccuacag ggcaagagau agagccuccc	360
	auugacccca caugugagcu auuggcagag cugaucagug guuaaaauga cagcacauua	420

ES 2 537 421 T3

	uguaguuaau	uaaaacaaag	gguaggacaa	auccuaaugu	ccacagcuau	gaacaaguuc	480
	acucagacca	uuucuaaacc	ugcuacuauc	uugaacauuu	cagacaguga	agagucgagu	540
5	gaugaagcag	ggaugggcaa	ggugucccg	accacacaga	gcucagagag	guggcuugac	600
	uugcucauug	aaaaauucca	gccgagcuua	caaaacauca	cuagauacau	caaccggaac	660
10	uucaucagga	ucugcaauga	uagacuuaaa	aaggaaaaaa	ugggguacau	ugaggccaag	720
	caauaugugg	aagacauggc	uuggauggua	auggcaucug	aggcagacag	cauugagugg	780
	aagugcauaa	ggaggcagaa	gaaaguaacu	ggggagaaa	acccaaaguu	cuucuuugua	840
15	cagcacaag	aagacuggau	ugagugcaca	ggaugcauuc	uguaccagg	ccaugacuug	900
	aucuguaaug	aggaugauga	ugacugagcu	gauucagauc	gcuccaacca	gcagagauc	960
20	ccaccaccua	uagcaaguga	uacaguauuu	agucuaugau	uaguuauga	aaaauuuag	1020
	gauaaauaca	cauccuaagc	cgggccaaaa	ugucucuaga	caaguugaag	cucaaugaug	1080
	ucucaaacaa	ggauagccug	cuguccaacu	gcaaauacag	uguuaccaga	uccacaggcg	1140
25	auguaaccag	uguaucuggu	caugcuaugc	agaaggcccu	ugcaaggaca	cuuggcaugu	1200
	uccuacuuac	ugcuuucaac	cgcugcgaag	aaguggcaga	gauagggcuc	caauaugcca	1260
30	uguccuuguu	aggcagagau	gacagcauca	aaauacugag	agaagccggc	uacaauguaa	1320
	aaugugugga	cacacagcuc	aaggacuuua	caaucaaaau	acaaggaaaa	gacuauaaaa	1380
	uacaaguccu	agauauagug	ggaauagaug	cggccaauuu	agcugaucug	gagauacaag	1440
35	ccagaggagu	gguagcaaaa	gaacucaaaa	caggagccgg	guuaccugau	aaucggaggc	1500
	augaugcacc	agauuguggu	guaauaguuc	ucuguguugc	agcauuaguu	guuuccaaau	1560
40	uagcugcagg	agacagagga	ggacuugaug	cuguggaaaag	aagggcuuuu	aaugugcuga	1620
	aagccgagaa	agccagauau	cccaaccugg	aggucaagca	gauagcugaa	agcuuuuau	1680
	accuguuuga	aaggaagccu	uauuacauug	augucuucau	cacuuuuggc	cuggcccagu	1740
45	cuagugucaa	ggguggcagc	aagguugagg	ggcuguuuuc	uggucucuuc	augaauugcau	1800
	acggggcagg	acaaguuaug	cugagguggg	guuuacuggc	aaaaucuguc	aagaauauca	1860
50	ugcuaggcca	ugcuaguguu	caagcugaga	uggaacaggu	gguugagguu	uacgaauaug	1920
	cccagaagca	aggaggggag	gcaggauucu	aucauuuuag	aaaauaucca	aaagcuucac	1980
	uccucucuuu	gaccaauugu	ccuaauuuca	ccagugucgu	gcuuggcaau	gcugcagguu	2040
55	uaggcaucau	agggucuuau	aagggugcuc	cuaagaauag	agaacucuuu	gaugcugcua	2100
	aagauuaugc	agaaagauua	aaggacaaca	auguaauuaa	cuacagugca	uugaacuuga	2160
60	cuacagaaga	aagagagcug	aucagccaac	agcugagcau	uguugaugac	acuccugaug	2220
	augauuuuuu	auuaaaaaacu	ggaaaauuua	ggauaaaauu	ggagaaauuu	gccccugaau	2280
	uugucgguga	ggaugccaac	aagaaggcag	aggaguuuuc	caaacauaga	uccuucccuu	2340
65	cggaaaaacc	acuagcuggu	auaccgaaca	cugccacuca	ugucaccaa	uauaacaugc	2400
	cccccauuu	gcgcagcuca	uucaaacucu	ccccccaag	agccgccgca	aaacucacua	2460

ES 2 537 421 T3

	aaccuccac	ucccccucc	acuccaccac	ccacaccucc	ccaaaacaag	gaagagcagc	2520
	ccaaagaau	ugaugcugac	auagagacca	uacaugucua	ugagguuccu	gacaauccgg	2580
5	aacacagua	gaagccaugc	ugcucagaug	auaccgauac	uaagaaaacu	aggaagccga	2640
	uggucaccuu	uguggaaccc	gaagagaagu	uugucggauu	gggagccagc	cuguacaagg	2700
	agaccaugca	aacuuuugcc	gcugaugguu	augaugaaga	aagcaaucua	ucuuuugagg	2760
10	agacuaacca	agagccgggc	ucuucaucug	uagaacaaag	acuagauaga	auagaggaga	2820
	aauguccua	cauaauaggc	cuuuuaaaca	ccaauauggu	agcaacugcu	ggaccaacca	2880
15	cugcuagaga	ugagauuaga	gaugcccuua	uaggcacuag	agaagaacuu	auugagauga	2940
	ucaagucuga	caucuugacu	gucaaugaca	gaguggcggc	cauggagaag	cucagagaug	3000
	aggaaugcuc	uagagcugaa	acugaugaug	gaucagccug	uuuuuaaaca	gacagagcaa	3060
20	ggauacuaga	uaagauagug	uccagcaaug	cugaggaggc	uaaggaagac	uuggauguug	3120
	augacaucau	gggcauuauu	uuuuaguuaa	uuaaaauaac	aggacaaaau	auggaggccu	3180
25	acuugguaga	gauguaccuu	ggcgucccau	auacagcugc	aaucacagcu	aacuugguug	3240
	aaaaacauuc	agccaacaua	ucacuaacug	uguggauacc	aauguuucua	acaucucuiac	3300
	caaggaacuc	ugucauggac	cugcuacaug	auguuacagu	caucuguaca	caauaucaa	3360
30	cuguacaugg	ucccaugauc	aagguagauc	ugagcucuuc	caaugcaggc	cuagccacca	3420
	ugccaaggca	auucuugaua	aaugcuauca	uagccuugga	ugacuggggc	aacauggaau	3480
35	acgaaguacc	uguugcuuuu	gauaaaaaga	gcuucugugu	gacaauucuu	aagccuaaaa	3540
	acaugcuuuu	cacugugccc	agcauuacuc	cuacuaaucg	accuacucuu	gagcugauag	3600
	cugucugcuc	uuuccauaac	aggguuacau	uaaagucuuu	cacuauaccu	gucuucauca	3660
40	gagcacuguc	uaucagacag	caggaccuug	auagugugga	gcaggcuaua	agcuccgaug	3720
	uggaccaugc	uauaacaaca	gcuagggugg	cucccuaugc	aggacucaca	cuugugauca	3780
45	acaucacauc	caccaaaggu	gcauucaaac	ugcuaaaaggc	agguugucua	auucuugcag	3840
	aacugggucc	cuauugacu	caggugagcc	uacaugaugu	gauuaugaac	uggaaacaua	3900
	caggcacuuc	cuacauacuc	aagaguuccu	caacaagugg	augaaaaauu	agaaagucac	3960
50	cauugaucag	cucaauccau	aacuacaacc	ccacgacuuc	accuagcaca	acaacuauug	4020
	ccaccaacau	ccaauugaca	accacauaua	cacaccuaca	uaauuccaca	cacauaucuu	4080
55	aguuaaaaua	aacaggauaa	guaauggauc	cuaacaugac	cucauaccag	aucacuuuug	4140
	agaucaacau	gaccagcagc	cguauuggua	cauauuuuac	acuagcccug	acagcucuuc	4200
	uccuugcaug	cgcuuuuau	aacacagugu	gugcgcugau	aauggccugc	agcaguagga	4260
60	gcauugcuac	aucaggcauc	gcuagcagcc	aaugcacggg	ucaucccaau	caccuccac	4320
	caaguuaugg	aaucaaugua	acuagucugc	cgggcaaccu	guacucaagg	aacacuacau	4380
65	aauguuauaa	acagcaaaaa	ccaucuuuca	auaaaccccg	agccagacag	ccccacucug	4440
	cuaggugauu	caaucagccc	uuguaguaug	ucgucuaugu	aacaaaaauu	uaggauaagu	4500

ES 2 537 421 T3

	acuauucuau	uggaaucuga	ugagaacugu	agagcagcuc	auacaagaga	acuacaaguu	4560
	gacuucacuu	aguaugggaa	ggaacuuuga	aguggguggc	agcauuacua	auuugaacuu	4620
5	ugagagaacu	caguauccug	acacauuuag	gacuguugua	aaagugaacc	aaauguguaa	4680
	gcuuauugca	ggugugcuca	caagugcugc	uguggcaguu	uguguggggg	ucauaaugua	4740
	uucuguaauuc	acaucaaauc	acaaggccaa	cuccacgcag	aacgccacaa	uccggaacag	4800
10	cacauccgcc	ccuccccaac	caaccgccgg	ccugcccacc	acagagcaag	ggaccacccc	4860
	caaacucacc	aaacccccca	ccaaaaccac	caccacccau	gagaucacag	agccugucua	4920
15	aauggugaca	cccucagagg	aucccuacca	augcuccagc	aaugguuauu	uagaccgacc	4980
	ugauuuaccu	gaagauuua	agcucguauu	ggauguucua	ugcaagccuc	cagguccuga	5040
	acaucacagc	accaacuguu	augagaaacg	ugagaucaac	uuaggaagug	uuugcccuga	5100
20	ucuuguaaca	augaaggcaa	acaugggcuu	aaacaauuggu	gguggagaag	aagcugcacc	5160
	uuauauagag	guuaucacc	uuucuacgua	cuccaacaaa	agggcaaugu	guguccacaa	5220
25	ugggugugau	cagggcuucu	guuuuuccu	uucuguuua	agcacugauc	agaagagagc	5280
	cgugcuagag	cuuggagguc	aacaaguauu	cauggaaauug	cauuaugauu	ccuauuggaa	5340
	acacuauugg	aguaacucua	auuguguugu	ucccagaaca	aacugcaacc	ugacagacca	5400
30	aacugugauu	uuguuuuccua	guuuuaacaa	caagaaucag	ucucagugua	ccaccugugc	5460
	agacucagcu	ggccuagaua	acaaauuuua	ucucacaugu	gaugggcuuu	caagaaaccu	5520
35	uccucuaguu	ggacuaccca	gccuaagucc	ucaagcccac	aaagcugcac	ucaaaacauc	5580
	cacaggcacc	accacggcac	caacaccgga	gacaaggaac	ccaacccccg	caccuaggag	5640
	guccaaaccu	cucagucgga	agaaaagagc	uuuauuggga	guaggcucaa	gcagagaacc	5700
40	caaaccaaca	augcccuaau	gguguccuau	gcuccaauua	uuuccaagga	ggucuaauuc	5760
	uugagugacc	uauacccgaa	ucaacuucag	aaauaguacc	aaccuuauca	guaguuaaug	5820
45	aaaaauaagc	uaugauuaa	uaggacaaau	augauuccug	gcaggaucuu	ucuaguucuu	5880
	cuguugaucu	ucaacaccaa	accaauucac	ccaaauacau	uaacagaaaa	auucuaugag	5940
	uccacaugua	guguugagac	ugcagguuau	aagagugccc	uuagaacugg	uuggcacaug	6000
50	acaguuaugu	caauuaaguu	gucucaaaau	aaauuugagu	caugcaagag	cagcaacucg	6060
	uuauuggcuc	augagcuugc	aaucuauagu	aaugcagugg	augaauugag	aacguuauca	6120
55	uccaauugcuu	ugaaguccaa	aaggaagaag	agguuuccucg	guuugauucu	uggucucggg	6180
	gcugcaguca	cugccggggg	ggcuuuagcc	aagacagugc	aacuugaaag	ugagauugca	6240
	uugauuagag	aagcagugag	aaauacaaau	gaggcuguug	uuagccuaac	caacggcaug	6300
60	ucaguguuag	cuaaaguggu	agaugauuuug	aaaaacuuca	uaucuuaaaga	auuacuccca	6360
	aaaauaaacc	gagucucuuug	ugaugugcac	gacaucacug	ccgucuuuag	auuccaacag	6420
65	cucaacaaaa	gacuuuugga	agugucucgu	gaauuuucau	cuaaugcagg	auuaacacac	6480
	acuguuucau	cuuuuauuguu	aacagaccgg	gaacucaccu	ccauaguagg	cggcauggcu	6540

ES 2 537 421 T3

	guuucagcag	gccaaaaaga	gauaaugcua	ucuaguagag	cuauaaugag	aagaaacggg	6600
	uuagcaauau	uaaguucagu	caaugcugac	acacugguuu	auauaaauaca	acucccguaa	6660
5	uuugguguaa	uggacacaga	uuguugggua	auaagaaguu	ccaauagacug	ucauaacaua	6720
	gcagacaaaau	augcuuguuu	ggcuagagcu	gauaauggcu	gguaauuguca	caaugcaggc	6780
10	ucauuaucau	acuucccauc	accaacagau	ugugagaucc	acaauuggua	uguuuucugu	6840
	gacacucuga	aaagucuaac	uguaccugua	acaucacgag	aaugcaacuc	aaacauguau	6900
	accacuaacu	acgauuguaa	gauuuccaca	aguaaaaacu	augugaguac	agcaguacug	6960
15	acuacaauug	guugcuuggu	gucuugcuau	ggccaauaca	guugcacagu	caucaauaau	7020
	gacaaaggua	uaauaaggac	ucugccagau	gguuugcacu	acaucuccaa	caaaggggug	7080
	gacaagguuc	aaguaggaaa	cacugucua	uaucuuagca	aagaaguugg	caagucaauu	7140
20	guagucagag	gggaaccguu	ggucuugaaa	uauagccuu	ugaauuuccc	ugacgauaaa	7200
	uuugauguug	cuauaagaga	uguggagcau	agcaucaauc	agacacgcac	auucuugaag	7260
25	gccucugauc	aguuauugga	cuuaagugaa	aacagaguga	auaaaaguuu	aaccaaguca	7320
	uauauacuaa	caacucugcu	caucguugua	augcuuauua	uaauaauggu	ugucauaggg	7380
	uucuuucugu	auaagguauc	gaaaauuuuc	agggacaaca	gguuugaaauc	caaaaguaca	7440
30	ccuggccuca	caguuuuuuc	augacaauug	uacccaauc	uaauugaguu	aguuauuuua	7500
	aaaacuuagg	auaagugaca	auccagaccc	aacacuuccc	ucgacucuca	aggacagggg	7560
35	aggaugagug	ugagaccuug	caauuuugag	guucaagggg	uuuguuccag	aggagaggaau	7620
	ugcaaguaua	gucuuuuuu	uugggaauug	ccuuuugaaa	cucuuaugcu	caggcagaac	7680
	uauaugcuca	auaggauuuu	uagguuccuc	gauaccaaca	cagaugcaau	gaccgauguc	7740
40	aguggauuug	augcaccaca	aaggacugcu	gaguauugcu	ugggaaccu	aggugugcug	7800
	aaaaguuacc	uggaaaaaac	uaacaacauc	acuaaugcga	uagcuugugg	caguuugauu	7860
45	acuguguuac	agaacuugga	uguuggucug	guaauacaag	caagagauag	caacgcagag	7920
	gacgucauuu	auuugagaag	uugcaacacu	auacuauuu	auauagaca	gauacacaag	7980
	aagagacaag	uuuuucacau	ucucaagaaa	cugccaguag	gaguauuau	cagucugauc	8040
50	caaucuguca	ucuccaucga	ggagaagaua	aauuuuucua	ugaaaacaga	augauaaggc	8100
	ugccuaaaau	cuauccagcc	auacugcaua	agauguauau	uauuggagua	aaugaaacc	8160
55	ucacuuacga	ugggucuaaga	ccauccacaa	uaauagaugc	agggaagucu	guggugugga	8220
	accgugucga	ugugauagcc	ugugugaaa	aggccuugug	cugcauagaa	cucagcugga	8280
	guaaucaagu	gaucauagac	uuugauuuu	gucaggccag	augaugugga	cuguauuccu	8340
60	ucaucuguca	gcuaucaguc	auuaaccuca	aauuugcaau	cguguagauu	ccaagucaac	8400
	caacuucaug	uuuuuucaau	aguuuuuuu	aaauuuucaa	uuaggaucaa	uauaggauccu	8460
65	auugaugaac	aagaaguaaa	uguguacuua	ccagauagcu	acuuuuaggg	uguuuuuucu	8520
	uuuagugaaa	cuauugcucu	uggcagcugu	aucauuggua	gaccuuuuuu	gaaagacgac	8580

uucaccgcca ccaccucc

8598

5 <210> 5  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Neumovirus felino  
 <400> 5  
 10 Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asp Gln Lys Arg Ala Val Leu Glu Leu Gly  
 1 5 10 15  
 15 Gly Gln Gln Ala Ile Met Glu Leu His Tyr Asp Ser Tyr Trp Lys His  
 20 25  
 20 Tyr Trp Ser Asn Phe Asn Cys Val Val Pro Arg Thr Asn Cys Asn Leu  
 35 40 45  
 25 Thr Asp Gln Thr Val Ile Leu Phe Pro Ser Phe Asn Asn Lys Asn Gln  
 50 55 60  
 30 Ser Gln Cys Thr Thr Cys Ala Asp Ser Ala Gly Leu Asp Asn Lys Phe  
 65 70 75 80  
 35 Tyr Leu Thr Cys Asp Gly Leu Ser Arg Asn Leu Pro Leu Val Gly Leu  
 85 90 95  
 40 Pro Ser Leu Ser Pro Gln Ala His Lys Ala Glu Leu Lys Gln Ser Thr  
 100 105 110  
 45 Gly Thr Thr Thr  
 115  
 50 <210> 6  
 <211> 68  
 <212> PRT  
 <213> Neumovirus felino  
 <400> 6  
 55 Asp Pro Asn Met Thr Ser His Gln Ile Thr Phe Glu Ile Asn Met Thr  
 1 5 10 15  
 60 Ser Ser Arg Ile Gly Thr Tyr Ile Thr Leu Ala Leu Thr Ala Leu Leu  
 20 25 30  
 65 Leu Ala Cys Ala Val Ile Asn Thr Val Cys Ala Leu Ile Met Ala Cys  
 35 40 45  
 70 Ser Ser Arg Ser Ile Ala Thr Ser Gly Ile Val Ser Ser Gln Cys Thr  
 50 55 60  
 75 Val His Pro Asn  
 65 65

ES 2 537 421 T3

<210> 7  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 5 <213> Neumovirus canino  
  
 <400> 7  
 10 Met Gly Cys Asn Val Met Met Glu Leu Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Trp Leu Ala Phe His Ile Thr Asn Phe Asn Arg Ser Asp Leu Glu Thr  
 15 20 25 30  
 Ile Leu Arg Gly Ala Arg Val Cys Ser Thr Trp Gln Asp Gln Arg Leu  
 20 35 40 45  
 Ser Val Tyr Leu Val Gly Arg Asp Cys Asn Leu Leu Arg Pro Phe Val  
 25 30 35 40 45 50 55 60  
 Gln Ala Ala Lys Phe Ile His Asn Thr Arg Arg Gly Gln Thr Leu Thr  
 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80  
 His Trp Phe Thr Lys Asp Ile Val Phe Ser Pro Thr Gly Gln Glu Ile  
 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95  
 Glu Pro Pro Ile Asp Pro Thr Cys Glu Leu Leu Ala Glu Leu Ile Ser  
 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110  
 Gly  
 40  
 <210> 8  
 <211> 156  
 <212> PRT  
 45 <213> Neumovirus canino  
  
 <400> 8  
 50 Met Ser Thr Ala Met Asn Lys Phe Thr Gln Thr Ile Ser Lys Pro Ala  
 1 5 10 15  
 Thr Ile Leu Asn Ile Ser Asp Ser Glu Glu Ser Ser Asp Glu Ala Gly  
 55 20 25 30  
 Met Gly Lys Val Ser Arg Thr Thr Gln Ser Ser Glu Arg Trp Leu Asp  
 60 35 40 45  
 Leu Leu Ile Glu Lys Phe Gln Pro Ser Leu Gln Asn Ile Thr Arg Tyr  
 65 50 55 60  
 Ile Asn Arg Asn Phe Ile Arg Ile Cys Asn Asp Arg Leu Lys Lys Glu  
 65 70 75 80  
 Lys Met Gly Tyr Ile Glu Ala Lys Gln Tyr Val Glu Asp Met Ala Trp

ES 2 537 421 T3

				85					90				95			
5	Met	Val	Met	Ala 100	Ser	Glu	Ala	Asp	Ser 105	Ile	Glu	Trp	Lys	Cys 110	Ile	Arg
10	Arg	Gln	Lys 115	Lys	Val	Thr	Gly	Glu 120	Lys	Tyr	Pro	Lys	Phe 125	Phe	Phe	Val
15	Gln	His 130	Lys	Glu	Asp	Trp	Ile 135	Glu	Cys	Thr	Gly	Cys 140	Ile	Leu	Tyr	Pro
20	Gly 145	His	Asp	Leu	Ile	Cys 150	Asn	Glu	Asp	Asp	Asp 155	Asp				
25	<210>	9														
	<211>	393														
	<212>	PRT														
	<213>	Neumovirus canino														
30	<400>	9														
35	Met	Ser	Leu	Asp	Lys 5	Leu	Lys	Leu	Asn	Asp 10	Val	Ser	Asn	Lys	Asp 15	Ser
40	Leu	Leu	Ser	Asn 20	Cys	Lys	Tyr	Ser	Val 25	Thr	Arg	Ser	Thr	Gly 30	Asp	Val
45	Thr	Ser	Val 35	Ser	Gly	His	Ala	Met 40	Gln	Lys	Ala	Leu	Ala 45	Arg	Thr	Leu
50	Gly	Met 50	Phe	Leu	Leu	Thr	Ala 55	Phe	Asn	Arg	Cys	Glu 60	Glu	Val	Ala	Glu
55	Ile 65	Gly	Leu	Gln	Tyr	Ala 70	Met	Ser	Leu	Leu	Gly 75	Arg	Asp	Asp	Ser	Ile 80
60	Lys	Ile	Leu	Arg	Glu 85	Ala	Gly	Tyr	Asn	Val 90	Lys	Cys	Val	Asp	Thr 95	Gln
65	Leu	Lys	Asp	Phe 100	Thr	Ile	Lys	Leu	Gln 105	Gly	Lys	Asp	Tyr	Lys 110	Ile	Gln
70	Val	Leu	Asp 115	Ile	Val	Gly	Ile	Asp 120	Ala	Ala	Asn	Leu	Ala 125	Asp	Leu	Glu
75	Ile	Gln 130	Ala	Arg	Gly	Val	Val 135	Ala	Lys	Glu	Leu	Lys 140	Thr	Gly	Ala	Gly
80	Leu	Pro	Asp	Asn	Arg	Arg 150	His	Asp	Ala	Pro	Asp 155	Cys	Gly	Val	Ile	Val 160
85	Leu	Cys	Val	Ala	Ala 165	Leu	Val	Val	Ser	Lys 170	Leu	Ala	Ala	Gly	Asp 175	Arg



ES 2 537 421 T3

5 Gly Gly Leu Asp Ala Val Glu Arg Arg Ala Leu Asn Val Leu Lys Ala  
 180 185 190  
 10 Glu Lys Ala Arg Tyr Pro Asn Leu Glu Val Lys Gln Ile Ala Glu Ser  
 195 200 205  
 15 Phe Tyr Asp Leu Phe Glu Arg Lys Pro Tyr Tyr Ile Asp Val Phe Ile  
 210 215 220  
 20 Thr Phe Gly Leu Ala Gln Ser Ser Val Lys Gly Gly Ser Lys Val Glu  
 225 230 235  
 25 Gly Leu Phe Ser Gly Leu Phe Met Asn Ala Tyr Gly Ala Gly Gln Val  
 245 250 255  
 30 Met Leu Arg Trp Gly Leu Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met Leu  
 260 265 270  
 35 Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val Tyr  
 275 280 285  
 40 Glu Tyr Ala Gln Lys Gln Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile Arg  
 290 295 300  
 45 Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Asn Cys Pro Asn Phe  
 305 310 315 320  
 50 Thr Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Ile Gly Ser  
 325 330 335  
 55 Tyr Lys Gly Ala Pro Lys Asn Arg Glu Leu Phe Asp Ala Ala Lys Asp  
 340 345 350  
 60 Tyr Ala Glu Arg Leu Lys Asp Asn Asn Val Ile Asn Tyr Ser Ala Leu  
 355 360 365  
 65 Asn Leu Thr Thr Glu Glu Arg Glu Leu Ile Ser Gln Gln Leu Ser Ile  
 370 375 380  
 70 Val Asp Asp Thr Pro Asp Asp Asp Ile  
 385 390  
 75 <210> 10  
 <211> 295  
 <212> PRT  
 <213> Neumovirus canino  
 80 <400> 10  
 85 Met Glu Lys Phe Ala Pro Glu Phe Val Gly Glu Asp Ala Asn Lys Lys  
 1 5 10 15

ES 2 537 421 T3

Ala Glu Glu Phe Leu Lys His Arg Ser Phe Pro Ser Glu Lys Pro Leu  
 20 25 30

5 Ala Gly Ile Pro Asn Thr Ala Thr His Val Thr Lys Tyr Asn Met Pro  
 35 40 45

10 Pro Ile Leu Arg Ser Ser Phe Lys Leu Ser Pro Pro Arg Ala Ala Ala  
 50 55 60

15 Lys Leu Thr Lys Pro Ser Thr Pro Pro Ser Thr Pro Pro Pro Thr Pro  
 65 70 75 80

20 Pro Gln Asn Lys Glu Glu Gln Pro Lys Glu Ser Asp Ala Asp Ile Glu  
 85 90 95

Thr Ile His Val Tyr Glu Val Pro Asp Asn Pro Glu His Ser Lys Lys  
 100 105 110

25 Pro Cys Cys Ser Asp Asp Thr Asp Thr Lys Lys Thr Arg Lys Pro Met  
 115 120 125

30 Val Thr Phe Val Glu Pro Glu Glu Lys Phe Val Gly Leu Gly Ala Ser  
 130 135 140

35 Leu Tyr Lys Glu Thr Met Gln Thr Phe Ala Ala Asp Gly Tyr Asp Glu  
 145 150 155 160

40 Glu Ser Asn Leu Ser Phe Glu Glu Thr Asn Gln Glu Pro Gly Ser Ser  
 165 170 175

Ser Val Glu Gln Arg Leu Asp Arg Ile Glu Glu Lys Leu Ser Tyr Ile  
 180 185 190

45 Ile Gly Leu Leu Asn Thr Ile Met Val Ala Thr Ala Gly Pro Thr Thr  
 195 200 205

50 Ala Arg Asp Glu Ile Arg Asp Ala Leu Ile Gly Thr Arg Glu Glu Leu  
 210 215 220

55 Ile Glu Met Ile Lys Ser Asp Ile Leu Thr Val Asn Asp Arg Val Ala  
 225 230 235 240

60 Ala Met Glu Lys Leu Arg Asp Glu Glu Cys Ser Arg Ala Glu Thr Asp  
 245 250 255

Asp Gly Ser Ala Cys Tyr Leu Thr Asp Arg Ala Arg Ile Leu Asp Lys  
 260 265 270

65 Ile Val Ser Ser Asn Ala Glu Glu Ala Lys Glu Asp Leu Asp Val Asp  
 275 280 285

ES 2 537 421 T3

Asp Ile Met Gly Ile Asn Phe  
 290 295  
 5  
 <210> 11  
 <211> 257  
 <212> PRT  
 <213> Neumovirus canino  
 10  
 <400> 11  
 Met Glu Ala Tyr Leu Val Glu Met Tyr His Gly Val Pro Tyr Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Ile Gln Leu Asn Leu Val Glu Lys His Ser Ala Asn Ile Ser Leu  
 20  
 Thr Val Trp Ile Pro Met Phe Gln Thr Ser Leu Pro Arg Asn Ser Val  
 35  
 Met Asp Leu Leu His Asp Val Thr Val Ile Cys Thr Gln Ile Ser Thr  
 50 55 60  
 Val His Gly Pro Met Ile Lys Val Asp Leu Ser Ser Ser Asn Ala Gly  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Thr Met Pro Arg Gln Phe Leu Ile Asn Ala Ile Ile Ala Leu  
 85 90 95  
 Asp Asp Trp Gly Asn Met Glu Tyr Glu Val Pro Val Ala Phe Asp Lys  
 100 105 110  
 40  
 Lys Ser Phe Cys Val Thr Ile Leu Lys Pro Lys Asn Met Leu Tyr Thr  
 115 120 125  
 45  
 Val Pro Ser Ile Thr Pro Thr Asn Arg Pro Thr His Glu Leu Ile Ala  
 130 135 140  
 50  
 Val Cys Ser Phe His Asn Arg Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Ile Pro  
 145 150 155 160  
 Val Phe Ile Arg Ala Leu Ser Ile Arg Gln Gln Asp Leu Asp Ser Val  
 165 170 175  
 55  
 Glu Gln Ala Ile Ser Ser Asp Val Asp His Ala Ile Thr Thr Ala Arg  
 180 185 190  
 60  
 Val Ala Pro Tyr Ala Gly Leu Thr Leu Val Ile Asn Ile Thr Ser Thr  
 195 200 205  
 65  
 Lys Gly Ala Phe Lys Leu Leu Lys Ala Gly Cys Gln Ile Leu Ala Glu  
 210 215 220

ES 2 537 421 T3

Leu Gly Pro Tyr Leu Thr Gln Val Ser Leu His Asp Val Ile Met Asn  
 225 230 235 240  
 5 Trp Lys His Thr Gly Thr Ser Tyr Ile Leu Lys Ser Ser Ser Thr Ser  
 245 250 255  
 10 Gly  
 <210> 12  
 <211> 92  
 15 <212> PRT  
 <213> Neumovirus canino  
 <400> 12  
 20 Met Asp Pro Asn Met Thr Ser Tyr Gln Ile Thr Phe Glu Ile Asn Met  
 1 5 10 15  
 25 Thr Ser Ser Arg Ile Gly Thr Tyr Ile Thr Leu Ala Leu Thr Ala Leu  
 20 25 30  
 30 Leu Leu Ala Cys Ala Val Ile Asn Thr Val Cys Ala Leu Ile Met Ala  
 35 40 45  
 35 Cys Ser Ser Arg Ser Ile Ala Thr Ser Gly Ile Ala Ser Ser Gln Cys  
 50 55 60  
 40 Thr Val His Pro Asn His Pro Pro Pro Ser Tyr Gly Ile Asn Val Thr  
 65 70 75 80  
 45 Ser Leu Pro Gly Asn Leu Tyr Ser Arg Asn Thr Thr  
 85 90  
 <210> 13  
 <211> 414  
 <212> PRT  
 <213> Neumovirus canino  
 <400> 13  
 50 Met Arg Thr Val Glu Gln Leu Ile Gln Glu Asn Tyr Lys Leu Thr Ser  
 1 5 10 15  
 55 Leu Ser Met Gly Arg Asn Phe Glu Val Gly Gly Ser Ile Thr Asn Leu  
 20 25 30  
 60 Asn Phe Glu Arg Thr Gln Tyr Pro Asp Thr Phe Arg Thr Val Val Lys  
 35 40 45  
 65 Val Asn Gln Met Cys Lys Leu Ile Ala Gly Val Leu Thr Ser Ala Ala  
 50 55 60  
 Val Ala Val Cys Val Gly Val Ile Met Tyr Ser Val Phe Thr Ser Asn  
 65 70 75 80

ES 2 537 421 T3

5 His Lys Ala Asn Ser<sub>85</sub> Thr Gln Asn Ala Thr<sub>90</sub> Ile Arg Asn Ser Thr Ser  
 Ala Pro Pro Gln<sub>100</sub> Pro Thr Ala Gly Leu<sub>105</sub> Pro Thr Thr Glu Gln<sub>110</sub> Gly Thr  
 10 Thr Pro Lys<sub>115</sub> Leu Thr Lys Pro Pro<sub>120</sub> Thr Lys Thr Thr Thr His His Glu  
 15 Ile Thr<sub>130</sub> Glu Pro Val Lys Met<sub>135</sub> Val Thr Pro Ser Glu<sub>140</sub> Asp Pro Tyr Gln  
 20 Cys Ser Ser Asn Gly Tyr<sub>150</sub> Leu Asp Arg Pro Asp<sub>155</sub> Leu Pro Glu Asp Phe<sub>160</sub>  
 25 Lys Leu Val Leu Asp<sub>165</sub> Val Leu Cys Lys Pro<sub>170</sub> Pro Gly Pro Glu His<sub>175</sub> His  
 Ser Thr Asn Cys<sub>180</sub> Tyr Glu Lys Arg Glu<sub>185</sub> Ile Asn Leu Gly Ser<sub>190</sub> Val Cys  
 30 Pro Asp Leu<sub>195</sub> Val Thr Met Lys Ala<sub>200</sub> Asn Met Gly Leu Asn<sub>205</sub> Asn Gly Gly  
 35 Gly Glu<sub>210</sub> Glu Ala Ala Pro Tyr<sub>215</sub> Ile Glu Val Ile Thr<sub>220</sub> Leu Ser Thr Tyr  
 40 Ser Asn Lys Arg Ala Met<sub>230</sub> Cys Val His Asn Gly<sub>235</sub> Cys Asp Gln Gly Phe<sub>240</sub>  
 45 Cys Phe Phe Leu Ser<sub>245</sub> Gly Leu Ser Thr Asp<sub>250</sub> Gln Lys Arg Ala Val<sub>255</sub> Leu  
 50 Glu Leu Gly Gly<sub>260</sub> Gln Gln Val Ile Met<sub>265</sub> Glu Leu His Tyr Asp<sub>270</sub> Ser Tyr  
 Trp Lys His<sub>275</sub> Tyr Trp Ser Asn Ser<sub>280</sub> Asn Cys Val Val Pro<sub>285</sub> Arg Thr Asn  
 55 Cys Asn Leu Thr Asp Gln Thr<sub>295</sub> Val Ile Leu Phe Pro<sub>300</sub> Ser Phe Asn Asn  
 60 Lys Asn Gln Ser Gln Cys<sub>310</sub> Thr Thr Cys Ala Asp<sub>315</sub> Ser Ala Gly Leu Asp<sub>320</sub>  
 65 Asn Lys Phe Tyr Leu<sub>325</sub> Thr Cys Asp Gly Leu<sub>330</sub> Ser Arg Asn Leu Pro<sub>335</sub> Leu  
 Val Gly Leu Pro<sub>340</sub> Ser Leu Ser Pro Gln<sub>345</sub> Ala His Lys Ala Ala<sub>350</sub> Leu Lys

ES 2 537 421 T3

5 Gln Ser Thr Gly Thr Thr Thr Ala Pro Thr Pro Glu Thr Arg Asn Pro  
 355 360 365  
 Thr Pro Ala Pro Arg Arg Ser Lys Pro Leu Ser Arg Lys Lys Arg Ala  
 370 375 380  
 10 Leu Cys Gly Val Gly Ser Ser Arg Glu Pro Lys Pro Thr Met Pro Tyr  
 385 390 395 400  
 15 Trp Cys Pro Met Leu Gln Leu Phe Pro Arg Arg Ser Asn Ser  
 405 410  
 20 <210> 14  
 <211> 537  
 <212> PRT  
 <213> Neumovirus canino  
 <400> 14  
 25 Met Ile Pro Gly Arg Ile Phe Leu Val Leu Leu Leu Ile Phe Asn Thr  
 1 5 10 15  
 30 Lys Pro Ile His Pro Asn Thr Leu Thr Glu Lys Phe Tyr Glu Ser Thr  
 20 25 30  
 35 Cys Ser Val Glu Thr Ala Gly Tyr Lys Ser Ala Leu Arg Thr Gly Trp  
 35 40 45  
 40 His Met Thr Val Met Ser Ile Lys Leu Ser Gln Ile Asn Ile Glu Ser  
 50 55 60  
 45 Cys Lys Ser Ser Asn Ser Leu Leu Ala His Glu Leu Ala Ile Tyr Ser  
 65 70 75 80  
 50 Asn Ala Val Asp Glu Leu Arg Thr Leu Ser Ser Asn Ala Leu Lys Ser  
 85 90 95  
 55 Lys Arg Lys Lys Arg Phe Leu Gly Leu Ile Leu Gly Leu Gly Ala Ala  
 100 105 110  
 60 Val Thr Ala Gly Val Ala Leu Ala Lys Thr Val Gln Leu Glu Ser Glu  
 115 120 125  
 65 Ile Ala Leu Ile Arg Glu Ala Val Arg Asn Thr Asn Glu Ala Val Val  
 130 135 140  
 Ser Leu Thr Asn Gly Met Ser Val Leu Ala Lys Val Val Asp Asp Leu  
 145 150 155 160  
 70 Lys Asn Phe Ile Ser Lys Glu Leu Leu Pro Lys Ile Asn Arg Val Ser  
 165 170 175

ES 2 537 421 T3

Cys Asp Val His Asp Ile Thr Ala Val Ile Arg Phe Gln Gln Leu Asn  
 180 185 190  
 5 Lys Arg Leu Leu Glu Val Ser Arg Glu Phe Ser Ser Asn Ala Gly Leu  
 195 200 205  
 10 Thr His Thr Val Ser Ser Phe Met Leu Thr Asp Arg Glu Leu Thr Ser  
 210 215 220  
 15 Ile Val Gly Gly Met Ala Val Ser Ala Gly Gln Lys Glu Ile Met Leu  
 225 230 235 240  
 20 Ser Ser Arg Ala Ile Met Arg Arg Asn Gly Leu Ala Ile Leu Ser Ser  
 245 250 255  
 Val Asn Ala Asp Thr Leu Val Tyr Ile Ile Gln Leu Pro Leu Phe Gly  
 260 265 270  
 25 Val Met Asp Thr Asp Cys Trp Val Ile Arg Ser Ser Ile Asp Cys His  
 275 280 285  
 30 Asn Ile Ala Asp Lys Tyr Ala Cys Leu Ala Arg Ala Asp Asn Gly Trp  
 290 295 300  
 35 Tyr Cys His Asn Ala Gly Ser Leu Ser Tyr Phe Pro Ser Pro Thr Asp  
 305 310 315 320  
 40 Cys Glu Ile His Asn Gly Tyr Val Phe Cys Asp Thr Leu Lys Ser Leu  
 325 330 335  
 Thr Val Pro Val Thr Ser Arg Glu Cys Asn Ser Asn Met Tyr Thr Thr  
 340 345 350  
 45 Asn Tyr Asp Cys Lys Ile Ser Thr Ser Lys Thr Tyr Val Ser Thr Ala  
 355 360 365  
 50 Val Leu Thr Thr Met Gly Cys Leu Val Ser Cys Tyr Gly His Asn Ser  
 370 375 380  
 55 Cys Thr Val Ile Asn Asn Asp Lys Gly Ile Ile Arg Thr Leu Pro Asp  
 385 390 400  
 60 Gly Cys His Tyr Ile Ser Asn Lys Gly Val Asp Lys Val Gln Val Gly  
 405 410 415  
 Asn Thr Val Tyr Tyr Leu Ser Lys Glu Val Gly Lys Ser Ile Val Val  
 420 425 430  
 65 Arg Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Tyr Asp Pro Leu Asn Phe Pro Asp  
 435 440 445

ES 2 537 421 T3

Asp Lys Phe Asp Val Ala Ile Arg Asp Val Glu His Ser Ile Asn Gln  
 450 455 460  
 5 Thr Arg Thr Phe Leu Lys Ala Ser Asp Gln Leu Leu Asp Leu Ser Glu  
 465 470 475 480  
 10 Asn Arg Val Asn Lys Ser Leu Thr Lys Ser Tyr Ile Leu Thr Thr Leu  
 485 490 495  
 15 Leu Ile Val Val Met Leu Ile Ile Ile Met Val Val Ile Gly Phe Ile  
 500 505 510  
 20 Leu Tyr Lys Val Ser Lys Ile Ile Arg Asp Asn Arg Leu Lys Ser Lys  
 515 520 525  
 25 Ser Thr Pro Gly Leu Thr Val Leu Ser  
 530 535  
 30 <210> 15  
 <211> 176  
 <212> PRT  
 <213> Neumovirus canino  
 <400> 15  
 35 Met Ser Val Arg Pro Cys Lys Phe Glu Val Gln Gly Phe Cys Ser Arg  
 1 5 10 15  
 40 Gly Arg Asn Cys Lys Tyr Ser His Lys Tyr Trp Glu Trp Pro Leu Lys  
 20 25 30  
 45 Thr Leu Met Leu Arg Gln Asn Tyr Met Leu Asn Arg Ile Tyr Arg Phe  
 35 40 45  
 50 Leu Asp Thr Asn Thr Asp Ala Met Thr Asp Val Ser Gly Phe Asp Ala  
 50 55 60  
 55 Pro Gln Arg Thr Ala Glu Tyr Ala Leu Gly Thr Ile Gly Val Leu Lys  
 65 70 75 80  
 60 Ser Tyr Leu Glu Lys Thr Asn Asn Ile Thr Lys Ser Ile Ala Cys Gly  
 85 90 95  
 65 Ser Leu Ile Thr Val Leu Gln Asn Leu Asp Val Gly Leu Val Ile Gln  
 100 105 110  
 70 Ala Arg Asp Ser Asn Ala Glu Asp Val Asn Tyr Leu Arg Ser Cys Asn  
 115 120 125  
 75 Thr Ile Leu Ser Tyr Ile Asp Lys Ile His Lys Lys Arg Gln Val Ile  
 130 135 140



ES 2 537 421 T3

His Ile Leu Lys Lys Leu Pro Val Gly Val Leu Cys Ser Leu Ile Gln  
 145 150 155 160

5 Ser Val Ile Ser Ile Glu Glu Lys Ile Asn Ser Ser Met Lys Thr Glu  
 165 170 175

<210> 16  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> Neumovirus canino

<400> 16

15 Met Gln Ser Asp Pro Ile Cys His Leu His Arg Gly Glu Asp Lys Phe  
 1 5 10 15

20 Phe Tyr Glu Asn Arg Met Ile Arg Leu Pro Lys Tyr Tyr Pro Ala Ile  
 20 25 30

25 Leu His Lys Met Tyr Ile Ile Gly Val Asn Arg Asn Leu Thr Tyr Asp  
 35 40 45

30 Gly Ser Arg Pro Ser Thr Ile Ile Asp Ala Gly Lys Ser Val Val Trp  
 50 55 60

35 Asn Arg Val Asp Val Ile Ala Cys Val Lys Glu Ala Leu Cys Cys Ile  
 65 70 75 80

40 Glu Leu Ser Trp Ser Asn Gln Val Ile Ile Asp Phe Asp Tyr Ser Gln  
 85 90 95

40 Ala Arg

<210> 17  
 <211> 49  
 <212> PRT  
 <213> Neumovirus canino

<400> 17

50 Met Asp Pro Ile Asp Glu Gln Glu Val Asn Val Tyr Leu Pro Asp Ser  
 1 5 10 15

55 Tyr Leu Lys Gly Val Ile Ser Phe Ser Glu Thr Asn Ala Leu Gly Ser  
 20 25 30

60 Cys Ile Ile Gly Arg Pro Phe Leu Lys Asp Asp Phe Thr Ala Thr Thr  
 35 40 45

Ser

65 <210> 18  
 <211> 13

	<212> ARN	
	<213> Neumovirus canino	
5	<400> 18 uaguuaauua aaa	13
10	<210> 19 <211> 14 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
15	<400> 19 uaguuauga aaaa	14
20	<210> 20 <211> 14 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
25	<400> 20 uaauuaauua aaaa	14
30	<210> 21 <211> 13 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
35	<400> 21 uaguuaaaua aaa	13
40	<210> 22 <211> 14 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
45	<400> 22 uaguuaacaa aaaa	14
50	<210> 23 <211> 14 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
55	<400> 23 uaguuaauga aaaa	14
60	<210> 24 <211> 11 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
65	<400> 24 cuggaaaaua u	11
70	<210> 25 <211> 16 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
75	<400> 25 uaagcuauga uauaau	16

5	<210> 26 <211> 10 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
10	<400> 26 aggacaagug	10
15	<210> 27 <211> 10 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
20	<400> 27 aggacaauc	10
25	<210> 28 <211> 10 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
30	<400> 28 aggauaaaua	10
35	<210> 29 <211> 10 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
40	<400> 29 aggacaaaua	10
45	<210> 30 <211> 10 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
50	<400> 30 aggauaagua	10
55	<210> 31 <211> 10 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
60	<400> 31 aggauaagug	10
65	<210> 32 <211> 10 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
	<400> 32 aggaucaaua	10
	<210> 33 <211> 15 <212> ARN	

	<213> Neumovirus canino	
5	<400> 33 uaguuaauua aaaaa	15
	<210> 34 <211> 14 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
10	<400> 34 uaguuaauua aaaa	14
15	<210> 35 <211> 25 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> secuencia de cebadores degenerados	
25	<400> 35 tccgtgcagg ccgaratgga rcarg	25
30	<210> 36 <211> 25 <212> ADN <213> secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador degenerado	
	<400> 36 ggaactcggg ggccaaytty tccat	25
40	<210> 37 <211> 24 <212> ADN <213> secuencia artificial	
45	<220> <223> primer	
50	<220> <221> misc_feature <222> (19)..(19) <223> n es a, c, g, o t	
55	<400> 37 ccggatcttc ggccayccna tggc	24
60	<210> 38 <211> 29 <212> ADN <213> secuencia artificial	
65	<220> <223> cebador degenerado	
	<400> 38 ttcttaggag gggagatggc yttrtcrtt	29

	<210> 39	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador degenerado	
10	<400> 39	
	catcaccgac ctgtccaagt tyaaycargc	30
	<210> 40	
15	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> cebador degenerado	
	<400> 40	
	ttgaagtcgt ccaggatggt rttatcca	29
25	<210> 41	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 41	
35	ggcttctggt tcttccttc tgg	23
	<210> 42	
40	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> cebador	
	<400> 42	
	ccgtggtggt gcctgtg	17
50	<210> 43	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> cebador degenerado	
	<400> 43	
60	atggatccta acatgacctc ayac	24
	<210> 44	
	<211> 22	
	<212> ADN	
65	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador degenerado	

	<400> 44		
	gattgggatg aacygtgcat tg		22
5	<210> 45		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 45		
15	tgtaaaagtg aaccaaagt gta		23
	<210> 46		
	<211> 22		
20	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
25	<400> 46		
	aaatcttcag gtaaatacagg tc		22
	<210> 47		
30	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 47		
40	ttttaacaac aagaatcagt c		21
	<210> 48		
	<211> 20		
	<212> ADN		
45	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
50	<400> 48		
	ctcctaggtg cgggggttgg		20

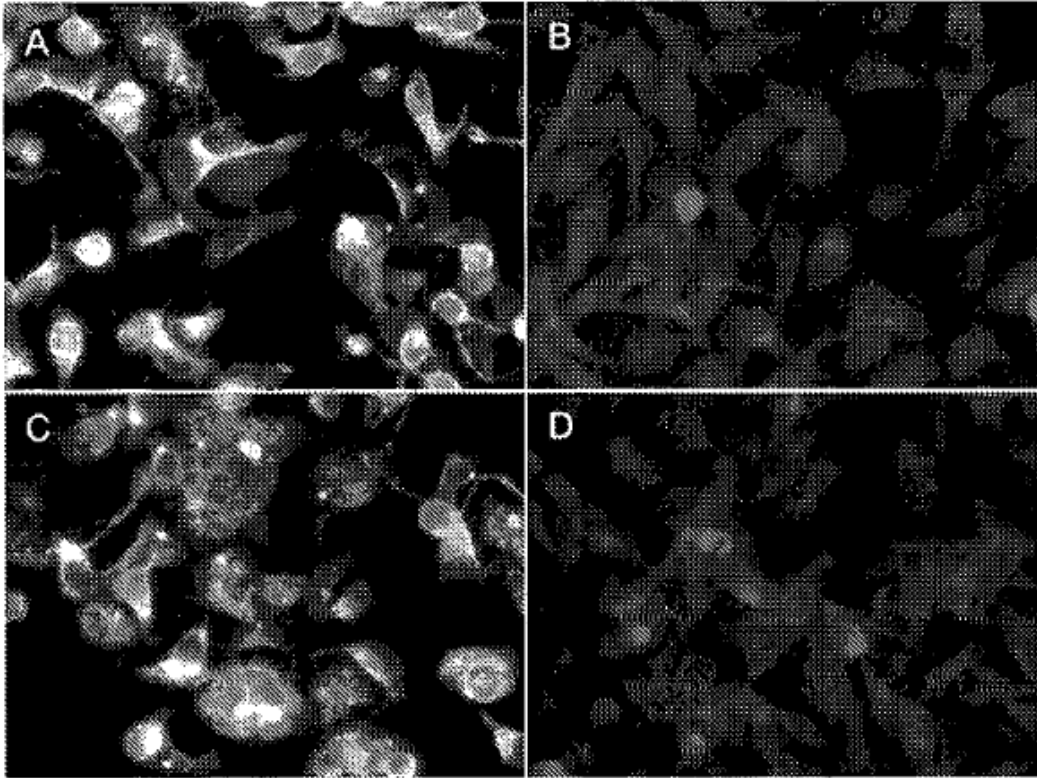
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición que comprende un polinucleótido de ARN aislado que es al menos un 96% idéntico sobre la longitud completa de la secuencia de SEQ ID NO: 1, o un polinucleótido de ARN aislado que es al menos un 96% idéntico sobre la longitud completa de la secuencia de SEQ ID NO: 4.
2. Composición que comprende el equivalente de ADN del polinucleótido de ARN aislado, según la reivindicación 1, en la que cada uracilo en el polinucleótido está sustituido por timina.
- 10 3. Procedimiento *in vitro* de determinación de si un canino está infectado o no con un neumovirus, que comprende determinar la presencia de un polinucleótido en una muestra biológica obtenida del canino, en el que la presencia del polinucleótido es indicativa de que el canino está infectado con un virus de neumonía;
- 15 en el que el polinucleótido es un polinucleótido de ARN que es al menos un 96% idéntico sobre la longitud completa de la secuencia de SEQ ID NO: 1; o sobre la longitud completa del complemento inverso de la misma tal como se define en la SEQ ID NO: 4, o el equivalente de ADN de la misma en la que cada uracilo en el polinucleótido está sustituido por timina.

**Figura 1**

(Inmunofluorescencia verde)

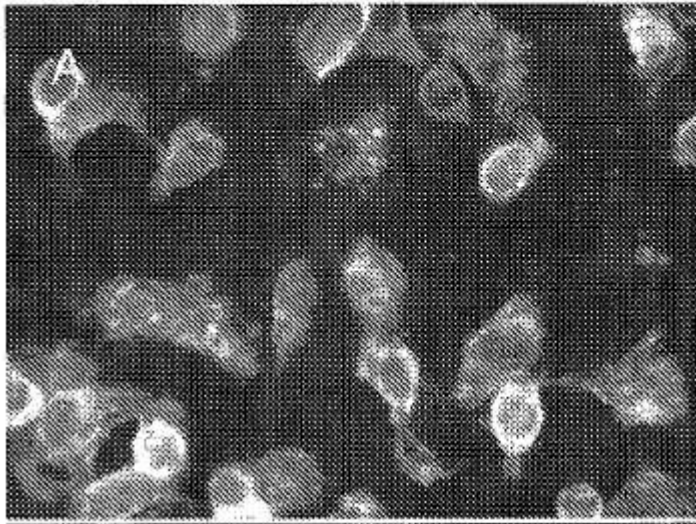
(Inmunofluorescencia roja producida mediante contraincisión)





**Figura 2**

(Inmunofluorescencia verde)



(Inmunofluorescencia roja producida mediante contratinción)

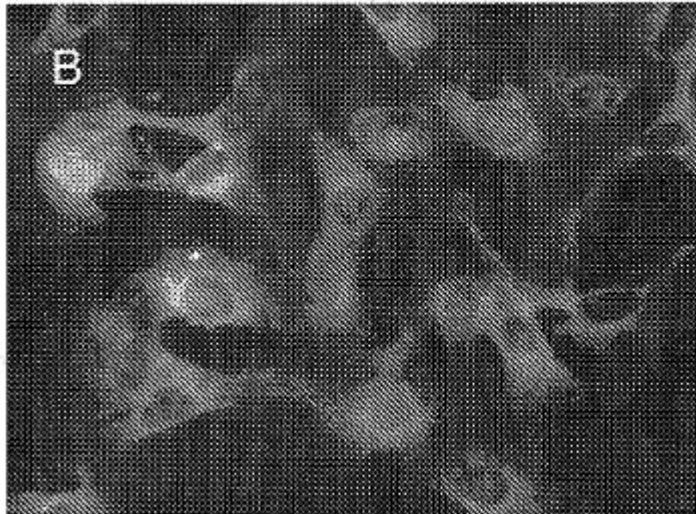


Figura 3

