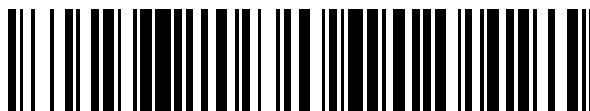


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 561**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2008** **E 08827698 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016** **EP 2191271**

54 Título: **Células permisivas y sus usos**

30 Prioridad:

27.07.2007 EP 07014842

19.06.2008 GB 0811278

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

25.04.2016

73 Titular/es:

UNIVERSITEIT GENT (100.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent, BE

72 Inventor/es:

DELPUTTE, PETER;
NAUWYNCK, HANS y
VAN GORP, HANNE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 567 561 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

Células permisivas y sus usos

Campo de la invención

5 La invención se refiere generalmente al campo de la virología. Más particularmente, la presente invención se refiere a métodos para determinar la permisividad de una célula para un virus que es un miembro de la familia *Arteriviridae*, en particular para el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRRP).

10 La invención proporciona además métodos y composiciones relacionados con la generación de células hospedantes permisivas para el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRRP). También se proporcionan mediante la presente invención métodos para usar dichas células así identificadas o así generadas, en la preparación de un cultivo de un VSRRP, así como el uso de dicho virus con el fin de diagnóstico.

Antecedentes de la invención

15 En la década de 1980 apareció una “enfermedad porcina misteriosa”, y está presente desde entonces en la industria del cerdo provocando daño económico importante a nivel mundial (Neumann et al., 2005). El agente etiológico, denominado virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRRP), se aisló por primera vez en los Países Bajos en 1991 y poco tiempo después en los Estados Unidos de América. Es un virus de ARN de hebra positiva con cubierta pequeño que se clasifica en el orden *Nidovirales*, familia *Arteriviridae*, género *Arterivirus* junto con el virus de la arteritis equina, el virus que eleva la lactato deshidrogenasa y el virus de la fiebre hemorrágica del simio, basado en la morfología similar, organización genómica, estrategia de replicación y composición de proteínas. Además, comparten un tropismo muy estrecho por el hospedante y un notable tropismo por células de la estirpe de monocitos-macrófagos (Plagemann y Moennig, 1992). Más específicamente, *in vivo*, VSRRP infecta subpoblaciones de macrófagos bien diferenciados, siendo los macrófagos alveolares las células diana primarias, aunque en cerdos sin castrar infectados también se ha mostrado que las células germinales testiculares permiten la replicación del VSRRP (Sur et al., 1997). *In vitro*, VSRRP se replica en cultivos primarios de macrófagos alveolares y monocitos de sangre periférica (PBMC), aunque los PBMCs necesitan tratamientos para mejorar la infección (Delputte et al., 2007). Además, se ha mostrado que las células de riñón de mono verde africano y derivados de las mismas (Marc-145 y CL2621) sostienen la infección del VSRRP, aunque no son de origen porcino y no pertenecen a la estirpe de monocitos-macrófagos (Kim et al., 1993; Mengeling et al., 1995). A pesar de este tropismo celular muy restringido de VSRRP, el virus es capaz de replicarse en varias líneas celulares no permisivas al transfectar su ARN vírico, indicando que el tropismo celular está determinado por la presencia o ausencia de receptores específicos sobre la superficie celular u otras proteínas implicadas en la entrada del virus (Kreutz, 1998; Meulenbergh et al., 1998).

30 Hasta ahora, se identificaron dos receptores del VSRRP en macrófagos, principalmente sulfato de heparano (Delputte et al., 2002) y sialoadhesina (Vanderheijden et al., 2003; Wissink et al., 2003). Además, Wissink et al. (2003) encontraron que un doblete de proteína de 150 kDa estaba implicado en la infección de macrófagos por VSRRP; sin embargo, la identidad de las proteínas N-glicosiladas todavía es desconocida. En el modelo actual de infección de macrófagos por VSRRP, VSRRP se une primero a sulfato de heparano conduciendo muy probablemente a la concentración del virus. Sin embargo, esta primera unión es más bien inestable y es seguida de la unión a sialoadhesina y la internalización subsiguiente (Delputte et al., 2005). Al internalizarse, el virus es transportado hacia endosomas, en los que es necesaria una caída en el pH para la replicación apropiada del virus (Kreutz y Ackermann, 1996; Nauwynck et al., 1999). A pesar de esta investigación elegante, el modelo todavía está incompleto. La expresión transitoria de sialoadhesina en células PK-15 no permisivas da como resultado la unión e internalización del virus, pero no se observó fusión y pérdida del recubrimiento de las partículas víricas (Vanderheijden et al., 2003), indicando que se necesitan otras proteínas para el desensamblaje vírico, esencial para la replicación del virus.

45 La infección de células Marc-145 por el VSRRP hace uso de una molécula similar a heparina en la superficie de células Marc-145 (Jusa et al., 1997), asemejándose a la etapa inicial de la infección de macrófagos por VSRRP. Sin embargo, puesto que la sialoadhesina está ausente en células Marc-145, la entrada del virus diferirá entre los dos tipos celulares. En células Marc-145, se ha descrito que el filamento intermedio vimentina se une a la proteína de la nucleocápside del VSRRP, y se ha sugerido que interacciona con otros filamentos citoesqueléticos para mediar el transporte del virus en el citosol (Kim et al., 2006). Recientemente, se encontró que CD151 interacciona específicamente con ARN de la región no traducida de 3' (UTR) del VSRRP (Shanmukhappa et al., 2007). Se propuso que CD151 está implicado posiblemente en la fusión entre la cubierta vírica y el endosoma, o para relocalizar los complejos ribonucleoproteicos para promover la replicación vírica. Todavía es necesaria una investigación adicional para elucidar sus modos moleculares precisos de acción durante la infección por VSRRP.

55 Recientemente, se ha descrito que el receptor depurador CD163 desempeña un papel en la infección de células Marc-145 por VSRRP y para hacer a algunas células no permisivas en cierto modo susceptibles al VSRRP con la expresión (Calvert et al., 2007), mientras que otras permanecen improductivas con la infección, a pesar de la expresión de CD163 (Calvert et al., 2007). Aunque el gen de CD163 se aisló originalmente de macrófagos, hasta ahora no se ha mostrado ningún papel para CD163 en la infección por VSRRP de sus células diana primarias.

También, no se elucidó el mecanismo mediante el cual CD163 confiere susceptibilidad parcial de tipos celulares selectos a la infección por VSRRP.

Hemos demostrado que tanto la sialoadhesina como CD163 están implicados en la infección de macrófagos por VSRRP. Además, la expresión de formas recombinantes tanto de CD163 como de sialoadhesina en células no permisivas las hace a todas ellas susceptibles a la infección por VSRRP, dando como resultado la producción y liberación de virus de progenie infecciosa. Por el contrario, cuando solamente está presente CD163, la infección es claramente menos eficiente, e incluso está ausente en algunos tipos celulares. Además, se ha dado a conocer la adaptación vírica que conduce a diferencias antigénicas en cepas víricas que se hacen crecer en células que expresan solamente CD163 cuando se comparan con virus de tipo salvaje.

En base a los análisis detallados de la cinética de infección del VSRRP, tanto en macrófagos primarios como en células que expresan sialoadhesina y CD163, se propone un papel para CD163 en la fusión y la pérdida de cubierta del virus. En comparación con los sistemas mencionados anteriormente, es decir, células que expresan solamente CD163 o sialoadhesina, se ha encontrado que la combinación de la expresión de CD163 y de sialoadhesina en una célula proporciona células permisivas que son muy eficientes para sostener la replicación vírica, y que imitan bastante bien la entrada del virus en el hospedante natural, es decir, las subpoblaciones conocidas de macrófagos bien diferenciados, en particular macrófagos alveolares que son las células diana primarias del virus. Tal mimetismo de la entrada de las células diana naturales reducirá o evitará ciertamente la adaptación del virus en cultivo celular y los cambios genéticos y antigénicos asociados que pueden dar como resultado virus con epítomos alterados. Tales epítomos modificados pueden tener efectos tremendos sobre la antigenicidad de virus de vacuna producidos en células diana, dando como resultado la pérdida de inducción de anticuerpos neutralizantes importantes. Claramente, evitar cambios en epítomos asociados con la adaptación durante el cultivo celular sería beneficioso para la producción de virus de vacuna.

Los resultados presentados muestran que Sn y CD163 trabajan sinérgicamente, puesto que la coexpresión de ambas moléculas da como resultado una mayor producción de virus en comparación con la expresión de los dos receptores solos, y esto en todos los tipos celulares ensayados. Además, se elucidó la base molecular de este efecto sinérgico, siendo que los receptores actúan en diferentes etapas durante la entrada del virus. Sn se expresa en la superficie de células diana y captura muy eficientemente el virus y lo internaliza en la célula en endosomas. Por otro lado, CD163 no interacciona con el virus en la superficie celular y no internaliza el virus, pero se colocaliza con el virus en endosomas tempranos, donde media la pérdida de cubierta del virus, seguido de la liberación del genoma de ARN en el citoplasma. Una vez que se libera el genoma en el citoplasma, se procede a la traducción del genoma, a la transcripción y a la replicación del virus.

El hallazgo de que CD163, que también se expresa en la superficie celular, no actúa sobre la superficie celular durante la infección, sino que más bien interacciona con el virus en endosomas en el interior de la célula, es bastante sorprendente. Generalmente, los receptores celulares actúan durante la fijación o internalización del virus, o la fusión directa en la superficie celular. Este modelo, en el que el receptor CD163 no es activo en la superficie celular sino que actúa sobre el virus en los endosomas es sorprendente y explica la acción inesperada y cooperativa tanto de Sn como de CD163 durante la infección vírica, dando como resultado una infección vírica muy eficiente y la producción de títulos elevados de virus.

De este modo, estos resultados proporcionan nuevos medios para generar una célula permisiva a VSRRP que permita la replicación vírica eficiente, con menos adaptación, y en consecuencia resuelve los problemas reconocidos en la técnica.

Sumario de la invención

Esta invención se basa en la caracterización de que tanto sialoadhesina como CD163 no están implicados solamente en la permisividad de macrófagos, las células diana primarias, para el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRRP), sino que estas moléculas también actúan en diferentes etapas de la infección vírica, permitiendo así un efecto cooperativo durante la infección, dando como resultado una producción potenciada de virus.

Se ha encontrado que las células no permisivas se pueden hacer permisivas, o que se puede incrementar la permisividad de células parcialmente susceptibles al hacer que dichas células expresen tanto sialoadhesina como CD163.

En consecuencia, es un primer objetivo de la presente invención proporcionar métodos para identificar la permisividad de células para el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRRP); comprendiendo dicho método determinar la expresión de CD163 y de sialoadhesina en dichas células; en el que las células que tienen expresión tanto de CD163 como de sialoadhesina se identifican como células permisivas para VSRRP.

En un segundo objetivo, la presente invención proporciona un método para generar una célula o células permisivas para, o para incrementar la permisividad de una célula o células para VSRRP, comprendiendo dicho método tratar dichas células para producir una expresión tanto de CD163 como de sialoadhesina.

En un objetivo adicional, la presente invención proporciona un método para preparar un cultivo de un VSRRP, comprendiendo dicho método proporcionar una línea celular identificada u obtenida usando uno cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, infectar dicha línea celular con virus, y cosechar el virus desde el cultivo celular.

- 5 Una vez que el virus se ha hecho crecer hasta títulos elevados, se puede procesar según el uso pretendido, por ejemplo en el diagnóstico o producción de vacunas, por medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, pero sin limitarse a, inactivando los virus cosechados con formalina, BPI, BEA o irradiación gamma, para uso en vacunas. En la alternativa, la cepa vírica usada en la infección puede ser una cepa atenuada para uso en la producción de vacunas atenuadas.
- 10 Como ya se mencionó aquí anteriormente, debido al efecto sinérgico de CD163 y sialoadhesina, habrá una reducción en la adaptación vírica y una pérdida de epítomos alterados. Esto, tomado junto con la producción vírica incrementada, tiene un efecto tremendo sobre la antigenicidad de virus de vacuna. Como sabe una persona experta en la técnica, esto último es también beneficioso a la hora de aislar otras cepas víricas a partir de muestras *in vivo* cuando se diagnostica infección de VSRRP en un sujeto.
- 15 Es claramente un objetivo de la presente invención proporcionar líneas celulares identificadas u obtenidas usando uno cualquiera de los métodos mencionados anteriormente. Las líneas celulares identificadas usando los métodos de la presente invención incluyen cultivos celulares primarios y líneas celulares continuas obtenibles de los mismos, pero para las células hospedantes naturales, es decir, las subpoblaciones conocidas de macrófagos bien diferenciados, en particular los macrófagos alveolares que son las células diana primarias de una infección por VSRRP. En una realización, dichas células consisten en células no permisivas para VSRRP, tales como, por
- 20 ejemplo, células PK-15, CHO, BHK-21 y Hek293t, que expresan tanto Sn como CD163; en una realización particular, las células CHO que expresan de forma estable sialoadhesina y CD163, depositadas el 14 de mayo de 2008 en la Belgian Coordinated Collections of Microorganisms como CHO-Sn/CD163 IC5, CHO-Sn/CD163 ID9 y CHO-Sn/CD163 IF3, con los números de acceso respectivos LMBP 6677CB, LMBP 6678CB y LMBP 66779 CB,
- 25 respectivamente.

Las líneas celulares, identificadas u obtenidas usando uno cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, también se pueden usar en un método para diagnosticar una infección de VSRRP en un sujeto. En consecuencia, un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para diagnosticar una infección vírica de una infección de VSRRP en un sujeto, comprendiendo dicho método poner en contacto una línea celular identificada u obtenida usando uno cualquiera de los métodos de la presente invención con una muestra tomada de dicho sujeto, y

30 determinar si se produce la replicación vírica o no.

Como alternativa, la infección vírica se determina evaluando la presencia de anticuerpos específicos del virus en la muestra tomada de dicho sujeto. En esta realización, la línea celular identificada u obtenida usando uno cualquiera de los métodos de la presente invención está infectada con VSRRP, y la reacción de los anticuerpos en una muestra

35 tomada a partir de dicho sujeto se realiza por medios bien conocidos por la persona experta en la técnica.

En estos métodos de diagnóstico, la muestra tomada del sujeto es típicamente un fluido biológico, tal como, por ejemplo, suero, calostros, fluidos de lavado broncoalveolar, saliva, orina o heces, tejido o un extracto tisular. El tejido o extracto tisular a analizar incluye aquellos que se sabe, o que se sospecha, que son permisivos para el virus, tales como, por ejemplo, PBMC (células mononucleares de sangre periférica), macrófagos alveolares, tejidos linfoides

40 tales como ganglios linfáticos, bazo, amígdalas y timo, y tejidos no linfoides tales como pulmones e hígado.

En una realización final, las líneas celulares identificadas u obtenidas usando uno cualquiera de los métodos mencionados anteriormente se pueden usar en un método para identificar compuestos antivíricos, es decir, compuestos antivíricos para VSRRP. En consecuencia, la invención proporciona, en un objetivo adicional, un método para identificar compuestos antivíricos, comprendiendo dicho método poner en contacto una línea celular infectada con un VSRRP con el compuesto a ensayar, y determinar la capacidad de dicho compuesto de ensayo

45 para modular la replicación vírica en dicha línea celular.

La capacidad de un compuesto para modular la replicación vírica se puede determinar usando, entre otros, la presencia de partículas víricas infecciosas en el medio. Esta última se puede determinar usando una cualquiera de las técnicas de medida de proteínas disponibles, y se determina típicamente usando anticuerpos específicos de virus

50 tardíos, en particular usando anticuerpos específicos (de virus) como se proporcionan aquí en lo sucesivo.

En los inmunoensayos relacionados con eso, la cantidad de proteína vírica producida se puede cuantificar mediante cualquier ensayo estándar tal como, por ejemplo, usando un ensayo de luminiscencia, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo de tecnología de inmunoensayo multiplicado por enzimas (EMIT), un ensayo de inmunoensayo de transferencia de excitación por resonancia de fluorescencia (FRET), un ensayo de inmunoensayo de canalización enzimática (ECIA), un ensayo de inmunoensayo fluorescente con el sustrato marcado (SLFIA), un

55 ensayo de polarización de la fluorescencia, un ensayo de protección de la fluorescencia, un ensayo de protección de la fluorescencia marcado con antígeno (ALFPIA), o ensayo de proximidad por centelleo (SPA).

Como alternativa, el efecto del compuesto sobre la replicación vírica se determina evaluando los títulos de virus en el medio, cuantificando números de células infectadas mediante inmunocitoquímica, o usando un ensayo de citotoxicidad mediante MTS para determinar la concentración citotóxica de las partículas víricas en el medio.

Breve descripción de los dibujos

- 5 **Figura 1** Expresión de sialoadhesina y CD163 en macrófagos alveolares primarios. Análisis citométrico de flujo de macrófagos teñidos con mAb 41D3 para sialoadhesina porcina (curva negra) o mAb 2A10 para CD163 porcino (curva negra). En ambos experimentos, se usó como control el anticuerpo de isotipo comparable (IgG1) 13D12 (curva blanca).
- 10 **Figura 2** Efecto de anticuerpos específicos de la sialoadhesina y de CD163 sobre la infección de macrófagos por VSRRP. **A** Los macrófagos se trataron con diferentes concentraciones de anticuerpos que reconocen sialoadhesina y CD163, a 37°C, y se inocularon con virus Lelystad que se hizo crecer en células Marc. Se calculó el porcentaje relativo de macrófagos infectados, siendo las células no tratadas (RPMI) la referencia. Cada valor representa la media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos. **B** Los macrófagos se trataron con 3,3 μ g/100 μ l de anticuerpos específicos de la sialoadhesina y de CD163, y se inocularon con diferentes cepas de VSRRP. Se calculó el porcentaje relativo de macrófagos infectados, siendo las células no tratadas (RPMI) la referencia. Cada valor representa la media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos.
- 15
- 20 **Figura 3** Infección por VSRRP de células no permisivas que expresan sialoadhesina (Sn), CD163, o la combinación de ambos. Células PK-15, CHO-K1 y BHK-21 transfectadas se inocularon con el virus Lelystad o con VR-2332. Veinticuatro horas después de la inoculación, se recogió el sobrenadante, y el virus extracelular infeccioso (barras negras) se determinó vía titulación, siendo el límite de detección 0,8 dosis infecciosas de cultivo tisular TCID₅₀/ml (log₁₀). También se determinó el virus de fondo que todavía permanece tras la retirada del inóculo (barras grises). Cada valor representa la media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos.
- 25
- 30 **Figura 4** Cinética de la infección por VSRRP en células PK-15 que expresan sialoadhesina y CD163. Células PK-15 que expresan sialoadhesina en combinación con CD163 se inocularon con VSRRP a una moi de 0,1 (línea discontinua) o una moi de 1 (línea continua). En diferentes puntos de tiempo tras la inoculación, se recogió y se tituló virus extra- e intracelular, siendo el límite de detección 0,8 TCID₅₀/ml (log₁₀). Cada valor representa la media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos.
- 35 **Figura 5** Análisis microscópico confocal de VSRRP durante la infección de células PK-15 transfectadas que expresan los receptores de VSRRP sialoadhesina y/o CD163. Se calculó el número relativo de células PK-15 con partículas víricas internalizadas, con 1 h post-inoculación como punto de referencia. Los datos se muestra para células PK-15 que expresan sialoadhesina (barras negras) y la combinación de sialoadhesina y CD163 (barras grises), pero no para PK-15 que expresan CD163, puesto que no se observaron partículas víricas internalizadas.
- 40 **Figura 6.** Efecto de anticuerpos específicos de sialoadhesina y de CD163 sobre la fijación de VSRRP a macrófagos. Los macrófagos se trataron con diferentes concentraciones de anticuerpos específicos de sialoadhesina y de CD163, a 4°C, y se inocularon con virus Lelystad a 4°C. Los virus no unidos se eliminaron entonces por lavado, y se permitió la infección al llevar las células hasta 37°C durante 10 h. Se calculó el porcentaje relativo de macrófagos infectados, siendo las células no tratadas la referencia. Cada valor representa la media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos.
- 45 **Figura 7.** Sensibilidad de células CHO^{Sn-CD163} a la infección por VSRRP. **A**. Tres densidades diferentes de células (100000, 200000 y 300000 células/ml) se infectaron a 1, 2 o 3 días después de la siembra con virus LV que se hicieron crecer en células Marc. Después de 48 horas, las células se tiñeron con anticuerpos primarios P3/27 y se contaron 3 campos de microscopio (500 células por campo), y se representaron como las cantidades absolutas de células infectadas para dichos campos microscópicos. **B**. Lo mismo que A, pero ahora las células se trataron previamente con neuraminidasa y se infectaron subsiguientemente con virus LV que se hizo crecer en macrófagos.
- 50

Descripción de la invención

- 55 Como ya se ha mencionado aquí anteriormente, la presente invención se basa en la observación de que tanto sialoadhesina como CD163 están implicados en la permisividad de macrófagos, las células diana primarias, para el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRRP). Además, y sorprendentemente, se mostró que CD163 no actúa en la superficie celular de células susceptibles durante la fijación e internalización, sino que más bien actúa durante la pérdida de cubierta del virus y la liberación del genoma en el interior de la célula en

endosomas. Este hallazgo inesperado explica por que CD163 actúa sinérgicamente con Sn durante la infección vírica, puesto que esta última interacciona con el virus en la superficie celular para permitir la fijación e internalización del virus.

5 En consecuencia, es un primer objetivo de la presente invención proporcionar métodos para identificar la permisividad de células para el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRP), comprendiendo dicho método determinar la expresión de CD163 y de sialoadhesina en dichas células, en el que las células que tienen expresión tanto de CD163 como de sialoadhesina se identifican como células permisivas para VSRP.

10 La familia *Arteriviridae* se agrupa con la *Coronaviridae* y *Roniviridae* para formar el orden *Nidovirales*. Todos los miembros del orden tienen partículas con cubierta que contienen una única especie de ARN monocatenario que codifica un número de proteínas por medio de una serie de ARN subgenómicos anidados (del latín *nido* = nido). La familia *Arteriviridae* contiene aquellos miembros con viriones esféricos de 45-60 nm de diámetro (los de la familia *Coronaviridae* tiene más de 100 nm) y que infectan a mamíferos. Su genoma consiste en ARN monocatenario de tamaño 12-16 kb y con una cola 3'-poliA. Dos ORF solapantes grandes en el extremo 5' del genoma codifican las proteínas no estructurales principales y se expresan como una proteína de fusión mediante desplazamiento del marco ribosómico. En dirección 3' hay hasta otros 9 genes, que codifican mayoritaria o completamente proteínas estructurales, y se expresan a partir de un conjunto anidado 3'-coterminar de ARN subgenómicos.

Los virus de la familia de *Arteriviridae* incluyen el virus de la arteritis equina (EAV), el virus que eleva la lactato deshidrogenasa (LDV) y el virus de la fiebre hemorrágica del simio (SHFV). El Arterivirus que tiene la mayor importancia económica es el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRP).

20 De este modo, en un objetivo, los métodos de la presente invención se usan para identificar y/o modular la permisividad de células para el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRP), así como sus variantes, incluyendo ortólogos y parálogos, en particular ortólogos humanos. En una realización particular, los métodos de la presente invención se usan para identificar y/o modular la permisibilidad de células para VSRP.

25 Como se usa aquí, las expresiones "permisividad de una célula o células", "permisividad de célula o células" y "célula o células permisivas" se refieren a la capacidad mediante la cual un virus particular, es decir, VSRP, puede completar su ciclo de replicación en una célula dada. Esto contrasta con las células "no permisivas", que no permiten la replicación completa de un virus.

30 "CD163" es un miembro de la familia rica en cisteína de receptores depuradores (SRCR) de glicoproteínas transmembránicas, y se piensa que se expresa exclusivamente en monocitos y macrófagos. Un papel identificado de CD163 es inhibir el daño tisular oxidativo tras hemólisis mediante el consumo de complejos de hemoglobina:haptoglobina por endocitosis. La liberación subsiguiente de interleucina-10 y la síntesis de hemooxigenasa-1 dan como resultado efectos antiinflamatorios y citoprotectores. El gen de CD163 humano abarca 35 kb en el cromosoma 12, y consiste en 17 exones y 16 intrones.

35 Se sabe que un número de isoformas del polipéptido de CD163, incluyendo los tipos unidos a la membrana, citoplásmicos y segregados, se generan mediante ajuste alternativo (Ritter et al., 1999). Se han dado a conocer secuencias de ADNc que codifican un polipéptido de CD163 porcino (número de acceso (Genbank AJ311716), un polipéptido de CD 163 murino (número de acceso AF274883), así como múltiples variantes humanas, ejemplificadas por los números de acceso Genbank AAH51281 y CAA80543.

40 Como se usa aquí, el polipéptido de "CD163" significa una proteína codificada por un gen de CD163 de mamífero, incluyendo variantes alélicas así como sus fragmentos biológicamente activos que contienen cambios conservativos o no conservativos, así como proteínas artificiales que son sustancialmente idénticas, es decir, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idénticas a uno cualquiera de los polipéptidos de CD163 mencionados anteriormente. En una realización particular, el polipéptido de CD163 es 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico al CD163 porcino representado por SEC ID NO:2 (codificado por el número de acceso Genbank AJ311716 o bankit927381 EU016226).

45 Por analogía, el polinucleótido de "CD163" incluye variantes alélicas así como sus fragmentos biológicamente activos que contienen cambios conservativos o no conservativos, así como cualquier molécula de ácido nucleico que sea sustancialmente idéntica, es decir, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a uno cualquiera de los polinucleótidos que codifican CD163 mencionados anteriormente. En una realización particular, el polinucleótido de sialoadhesina es 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a la molécula de ácido nucleico que codifica CD163 porcino (número de acceso Genbank AJ311716 o bankit927381 EU016226).

50 Fragmentos biológicamente activos de CD163 incluyen fragmentos que retienen la actividad de la proteína de longitud completa, tal como la isoforma con el número de acceso SwissProt Q2VL90-2, la forma soluble de CD163 (sCD163), o fragmentos que contienen al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 del dominio o dominios de SRCR.

"Sialoadhesina" es una adhesina similar a lectina que se ha mostrado que se une a ligandos glicoconjugados de una manera dependiente del ácido siálico y que se caracteriza por tener sitios de unión a ácido siálico conservados. Es

una glicoproteína transmembránica implicada en interacciones célula-célula y expresada solamente por una subpoblación de macrófagos tisulares.

Se han dado a conocer secuencias de ADNc que codifican un polipéptido de sialoadhesina porcina (número de acceso Genbank **NM_214346**), un polipéptido de sialoadhesina murina (número de acceso Genbank NM_011426), así como una variante humana (número de acceso Genbank NM_023068).

Como se usa aquí, el polipéptido de “sialoadhesina” quiere decir una proteína codificada por un gen de sialoadhesina de mamífero, incluyendo variantes alélicas así como sus fragmentos biológicamente activos que contienen cambios conservativos o no conservativos, así como proteínas artificiales que son sustancialmente idénticas, es decir, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idénticas a uno cualquiera de los polipéptidos de sialoadhesina mencionados anteriormente. En una realización particular, el polipéptido de sialoadhesina es 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a la sialoadhesina porcina representada por SEC ID NO:10 (codificado por el número de acceso Genbank **NM_214346**).

Por analogía, el polinucleótido de “sialoadhesina” incluye variantes alélicas así como sus fragmentos biológicamente activos que contienen cambios conservativos o no conservativos, así como cualquier molécula de ácido nucleico que es sustancialmente idéntica, es decir, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a uno cualquiera de los polinucleótidos que codifican sialoadhesina mencionados anteriormente. En una realización particular, el polinucleótido de sialoadhesina es 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico a la molécula de ácido nucleico que codifica sialoadhesina porcina (número de acceso Genbank **NM_214346**).

Los fragmentos biológicamente activos de sialoadhesina incluyen fragmentos que retienen la actividad de la proteína de longitud completa, es decir, que retienen la capacidad de unirse a VSRRP. Los fragmentos biológicamente activos incluyen, por ejemplo, la forma soluble conocida de sialoadhesina, fragmentos que contienen al menos 1, 2, 3 o 4 de los dominios similares a Ig, en particular los dominios N-terminales, más en particular que consisten en el dominio similar a Ig de unión a ácido siálico, variable, N-terminal.

Como se usan aquí, las expresiones “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan de forma intercambiable para referirse a polinucleótidos de cualquier longitud, ya sea desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos (por ejemplo, inosina, 7-desazaguanosina, etc.). “Oligonucleótidos” se refiere a polinucleótidos de menos de 100 nucleótidos de longitud, preferiblemente menos de 50 nucleótidos de longitud, y lo más preferible alrededor de 10-30 nucleótidos de longitud. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden llevar a cabo cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un gen o fragmento génico (por ejemplo, una sonda, cebador, etiqueta EST o SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas y cebadores de ácidos nucleicos. Un polinucleótido puede incluir nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos nucleotídicos. Si están presentes, las modificaciones a la estructura nucleotídica se pueden proporcionar antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente tras la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente marcador. El término también se refiere tanto a moléculas bicatenarias como monocatenarias. Excepto que se especifique o se requiera de otro modo, cualquier realización de esta invención que sea un polinucleótido engloba tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias conocidas o que se predice que constituyen la forma bicatenaria.

“Polipéptido” se refiere a cualquier péptido o proteína que comprende aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados. “Polipéptido” se refiere tanto a cadenas cortas, habitualmente denominadas péptidos, oligopéptidos u oligómeros, como a cadenas más largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por los genes.

“Polipéptidos” incluye secuencias de aminoácidos modificadas mediante procesos naturales, tal como procesamiento post-traducciona, o mediante técnicas de modificación química, que son bien conocidas en la técnica. Tales modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en bibliografía de investigación voluminosa.

Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier parte en un polipéptido, incluyendo la cadena principal del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los términos amino o carboxilo. Se apreciará que puede estar presente el mismo tipo de modificación en el mismo grado o en grados variables en varios sitios en un polipéptido dado. También, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones (véanse, por ejemplo, *Protein-Structure and Molecular Properties*, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York, 1993; Wold, F., *Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, páginas 1-12 en *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, 1983; Seifter et al., “Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors”, *Meth Enzymol* (1990) 182: 626-646 y Rattan et al., “Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging”, *Ann NY Acad Sci* (1992) 663: 4842).

Identidad de secuencias

El porcentaje de identidad de secuencias de ácidos nucleicos y de polipéptidos se puede calcular usando algoritmos comercialmente disponibles que comparan una secuencia de referencia con una secuencia de consulta. Para determinar homologías/identidades, se pueden usar los siguientes programas (proporcionados por el National Center for Biotechnology Information): BLAST, BLAST con espacios, BLASTN y PSI-BLAST, que se pueden usar con los parámetros por defecto.

El algoritmo GAP (Genetics Computer Group, Madison, WI) usa el algoritmo de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas que maximiza el número de emparejamientos y minimiza el número de espacios. Generalmente, se usan los parámetros por defecto, con una penalización de creación de espacio = 12 y una penalización de extensión de espacio = 4.

Otro método para determinar la mejor concordancia global entre una secuencia de ácido nucleico o una porción de la misma y una secuencia de consulta es el uso del programa de ordenador FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al (Comp. App. Biosci., 6; 237-245 (1990)). El programa proporciona un alineamiento de secuencias global. El resultado de dicho alineamiento de secuencias global es la identidad en porcentaje. Los parámetros adecuados usados en una búsqueda de FASTDB de una secuencia de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz = Unitaria, k-tuple = 4, Penalización de Falta de Concordancia = 1, Penalización de Unión = 30, Longitud de Grupo de Aleatorización = 0, Puntuación de Corte = 1, Penalización de Espacio = 5, Penalización de Tamaño de Espacio = 0,05, y Tamaño de Ventana = 500 o la longitud de la secuencia de consulta en bases nucleotídicas, lo que sea más corto. Los parámetros adecuados para calcular el porcentaje de identidad y la similitud de un alineamiento de aminoácidos son: Matriz = PAM 150, k-tuple = 2, Penalización de Falta de Concordancia = 1, Penalización de Unión = 20, Longitud de Grupo de Aleatorización = 0, Puntuación de Corte = 1, Penalización de Espacio = 5, Penalización de Tamaño de Espacio = 0,05, y Tamaño de Ventana = 500 o la longitud de la secuencia de consulta en bases nucleotídicas, lo que sea más corto.

Expresión de CD163 y de sialoadhesina

La "expresión" se refiere generalmente al proceso mediante el cual los polinucleótidos se transcriben en ARNm, y/o al proceso mediante el cual el ARNm se traduce subsiguientemente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Por tanto, la "expresión" de un producto génico, en la presente invención de CD163 y sialoadhesina, se puede determinar a nivel del ácido nucleico o a nivel proteico.

La detección puede hacerse mediante cualquier método apropiado, incluyendo, por ejemplo, detectando la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen, o la cantidad de ácidos nucleicos derivados de los transcritos de ARNm. Los ejemplos de ácidos nucleicos derivados de un ARNm incluyen un ADNc producido a partir de la transcripción inversa del ARNm, un ARN transcrito a partir del ADNc, un ADN amplificado a partir del ADNc, un ARN transcrito a partir del ADNc amplificado, y similar. A fin de detectar el nivel de expresión del ARNm, la cantidad del ácido nucleico derivado debería de ser proporcional a la cantidad del transcrito de ARNm del que deriva. El nivel de expresión del ARNm de un gen se puede detectar mediante cualquier método incluyendo procedimientos de hibridación (por ejemplo, matrices de ácidos nucleicos, análisis de transferencia Northern, etc.) y/o de amplificación según métodos ampliamente conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ARN en o procedente de una muestra se puede detectar directamente o tras la amplificación. Se puede usar cualquier método de amplificación adecuado. En una realización, el ADNc se transcribe de forma inversa a partir de ARN, y entonces se amplifica opcionalmente, por ejemplo, mediante PCR. Tras la amplificación, los fragmentos de ADN resultantes se pueden detectar, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de agarosa seguido de visualización con tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz ultravioleta. Una amplificación específica de genes de interés expresados diferencialmente se puede verificar demostrando que el fragmento de ADN amplificado tiene el tamaño predicho, presenta el patrón de digestión por restricción afirmado, y/o se hibrida a la secuencia de ADN clonada correcta.

En métodos de hibridación, se usa una sonda, es decir, moléculas de ácidos nucleicos que tienen al menos 10 nucleótidos y que muestran complementariedad u homología de secuencia con la molécula de ácido nucleico a determinar. Se sabe en la técnica que una sonda "perfectamente emparejada" no es necesaria para una hibridación específica. Una sonda útil para detectar ARNm es al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 99% idéntica a la región homóloga en la molécula de ácido nucleico a determinar. En un aspecto, una sonda tiene alrededor de 50 a alrededor de 75 nucleótidos, o, como alternativa, alrededor de 50 a alrededor de 100 nucleótidos de longitud. Estas sondas se pueden diseñar a partir de la secuencia de genes de longitud completa. En ciertas realizaciones, será ventajoso emplear secuencias de ácidos nucleicos como se describen aquí en combinación con un marcador apropiado para detectar secuencias de hibridación y/o complementarias. En la técnica se conoce una amplia variedad de marcadores, etiquetas y/o informadores apropiados, incluyendo ligandos fluorescentes, radioactivos, enzimáticos u otros ligandos, tales como avidina/biotina, que son capaces de dar una señal detectable. Se puede emplear un marcador fluorescente o una etiqueta enzimática, tal como ureasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa, en lugar de reactivos radioactivos u otros reactivos medioambientalmente indeseables. En el caso de etiquetas enzimáticas, se conocen sustratos indicadores colorimétricos que se pueden emplear para proporcionar una señal que es visible al ojo humano o espectrofotométricamente, para identificar la hibridación específica con muestras que contienen ácidos nucleicos complementarios.

La detección del nivel de expresión génica también puede incluir detectar la cantidad del polipéptido o proteína codificados por el gen. Para el análisis proteico, en la técnica existe una variedad de técnicas. Incluyen, pero no se limitan a, radioinmunoensayo (RIA), ELISA (ensayos inmunoradiométricos ligados a enzima), inmunoensayos de "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos in situ (usando, por ejemplo, oro coloidal, marcadores enzimáticos o radioisótopos), análisis de transferencia western, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos inmunofluorescentes, y PAGE-SDS. Un método para determinar el nivel de proteína implica (a) proporcionar una muestra biológica que contiene polipéptidos, y (b) medir la cantidad de cualquier unión inmuno-específica que se produzca entre un anticuerpo reactivo con el producto de expresión de un gen de interés y un componente en la muestra, en el que la cantidad de unión inmuno-específica indica el nivel de las proteínas expresadas. Para estos inmunoensayos se requieren anticuerpos que reconocen y se unen específicamente a los productos proteicos de estos genes. Éstos se pueden adquirir de vendedores comerciales, o se pueden generar e identificar usando métodos bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª edición (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel et al. eds., (1987)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL and ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, ed. (1987)).

En un segundo objetivo, la presente invención proporciona un método para generar una célula o células permisivas para, o para incrementar la permisividad de una célula o células para VSRRP, comprendiendo dicho método tratar dichas células para producir una expresión tanto de CD163 como de sialoadhesina.

La expresión de CD163 y de sialoadhesina se puede facilitar o incrementar mediante métodos que implican la introducción de ácido nucleico exógeno en la célula. Tal célula puede comprender un polinucleótido o vector de una manera que permite la expresión de un polipéptido codificado de CD163 o sialoadhesina.

Los polinucleótidos que codifican CD163 o sialoadhesina se pueden introducir en la célula hospedante como parte de un plásmido circular, como un ADN lineal que comprende una región que codifica la proteína aislada, o en un vector vírico. Los métodos para introducir ácido nucleico exógeno en la célula hospedante bien conocidos y puestos en práctica de forma habitual en la técnica incluyen transformación, transfección, electroporación, inyección nuclear, o fusión con portadores tales como liposomas, micelas, células hospedantes, y protoplastos. Los sistemas de células hospedantes de la invención incluyen sistemas de células vegetales, de invertebrados y de vertebrados. Los hospedantes pueden incluir, pero no se limitan a, los siguientes: células de insectos, células de riñón porcino (PK), células de riñón felino (FK), células testiculares de cerdo (ST), células de riñón de mono verde africano (células MA-104, MARC-145, VERO, y COS), células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de hámster recién nacido, células 293 humanas, y fibroblastos 3T3 murinos. Para la expresión de los polipéptidos según la invención también se pueden usar sistemas de cultivo de células hospedantes de insectos. En otra realización, los polipéptidos se expresan usando un sistema de expresión de Drosophila. Como alternativa, los polipéptidos se expresan usando plataformas de producción a base de plantas, tales como, por ejemplo, descritas en Twyman R.M. et al., Molecular farming in plants: host systems and expression technology Trends Biotechnol. **21**, 570-578.

La elección de un vector de expresión adecuado para la expresión de los polipéptidos según la invención dependerá por supuesto de la célula hospedante específica a usar, y está dentro de la pericia del experto normal. Los ejemplos de vectores de expresión adecuados incluyen pSport y pcDNA3 (Invitrogen), pCMV-Script (Stratagene), y pSVL (Pharmacia Biotech). Los vectores de expresión para uso en células hospedantes de mamífero pueden incluir secuencias de control transcripcionales y traduccionales derivadas de genomas víricos. Las secuencias promotoras y secuencias modificadoras usadas normalmente que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, las derivadas de citomegalovirus humano (CMV), virus del sarcoma de Rous (RSV), adenovirus 2, virus del polioma, y virus 40 del simio (SV40). Los métodos para la construcción de vectores de expresión de mamíferos se describen, por ejemplo, en Okayama y Berg (Mol. Cell. Biol. 3:280 (1983)); Cosman et al. (Mol. Immunol. 23:935 (1986)); Cosman et al. (Nature 312:768 (1984)); documento EP-A-0367566; y documento WO 91/18982.

Debido a que se sabe que existen secuencias de CD163 en células de diversas especies, el gen endógeno se puede modificar para permitir, o incrementar, la expresión del polipéptido de CD163. Las células se pueden modificar (por ejemplo, mediante recombinación homóloga) para proporcionar una mayor expresión sustituyendo, en todo o en parte, el promotor de CD163 de origen natural por todo o parte de un promotor heterólogo, de manera que las células expresan el polipéptido de CD163 en mayores niveles. El promotor heterólogo se inserta de tal manera que esté enlazado operativamente a secuencias codificantes de CD163 endógenas. [Véanse, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT n° WO 94/12650, Publicación Internacional PCT n° WO 92/20808, y Publicación Internacional PCT n° WO 91/09955]. También se contempla que, además del ADN promotor heterólogo, se puede insertar ADN marcador amplificable (por ejemplo, ada, dhfr, y el gen cad multifuncional, que codifica carbamil fosfato sintasa, aspartato transcarbamilasa, y dihidroorotasa) y/o ADN intrónico junto con el ADN promotor heterólogo. Si se enlaza a la secuencia codificante de CD163, la amplificación del ADN marcador mediante métodos de selección estándar da como resultado la coamplificación de las secuencias codificantes de CD163 en las células.

La expresión de CD163 también se puede inducir mediante tratamiento químico. Los ésteres de forbol, especialmente el miristato-acetato de forbol (PMA), activan una o más isozimas del receptor de membrana ubicuo,

proteína cinasa C (PKC), y son medios particularmente preferidos para incrementar la expresión de CD163. También se contemplan otros métodos de movilización del calcio intracelular.

La expresión de sialoadhesina también se puede inducir mediante tratamiento químico. Se ha dado a conocer que IFN- α incrementa e incluso es capaz de inducir la expresión de sialoadhesina en la estirpe de células de monocitos-macrófagos. De este modo, el tratamiento con IFN- α es un medio alternativo para incrementar/inducir la expresión de sialoadhesina en una célula.

Líneas celulares

Las líneas celulares identificadas u obtenidas usando los métodos de la presente invención son claramente un objeto adicional de la presente invención.

En una primera realización, estas líneas celulares consisten en cultivos celulares primarios de células identificadas como permisivas para VSRRP, con la condición de que dichas células no sean las células hospedantes naturales, es decir, las subpoblaciones conocidas de macrófagos bien diferenciados, en particular los macrófagos alveolares que son las células diana primarias de una infección por VSRRP.

Las células que se cultivan directamente a partir de un animal o persona son conocidas como "células primarias". Con la excepción de algunos derivados de tumores, la mayoría de los cultivos de células primarias tienen una duración limitada. Después de un cierto número de duplicaciones de la población, las células sufren el proceso de senescencia y detienen la división, mientras que generalmente retienen la viabilidad. Los métodos para hacer crecer cultivos en suspensión y de adhesión de células primarias son conocidos por la persona experta en la técnica, tales como, por ejemplo, los descritos en "General Techniques of Cell Culture", Maureen A. Harrison e Ian F. Rae, Cambridge University Press 2007.

Como se usa en los métodos de la presente invención, las "células primarias" derivan de células que apoyan la replicación del VSRRP. En una realización, dichas células consisten en las subpoblaciones conocidas de células diferenciadas de la estirpe de monocitos/macrófagos, en particular los macrófagos alveolares que son las células diana primarias de una infección por VSRRP. En realizaciones particulares de la presente invención, las "células primarias" derivan de los macrófagos alveolares que son las células diana primarias.

Esto contrasta con las "células continuas", también conocidas como "una línea celular establecida" o "inmortalizada", que ha adquirido la capacidad para proliferar indefinidamente ya sea a través de mutación al azar o modificación deliberada, tal como la expresión artificial del gen de la telomerasa. Existen numerosas líneas celulares bien establecidas representativas de tipos celulares particulares.

En el contexto de la presente invención, las células continuas derivan mediante inmortalización de los cultivos celulares primarios mencionados aquí anteriormente o se obtienen de una línea celular continua establecida tratada, en particular mediante transfección con una secuencia de ácido nucleico que codifica CD163 y/o sialoadhesina, para producir una expresión estable tanto de CD163 como de sialoadhesina. En una realización alternativa, la expresión de CD163 también se puede inducir mediante tratamiento químico en líneas de células continuas que expresan de forma estable Sn. Los ésteres de forbol, especialmente miristato-acetato de forbol (PMA), activan una o más isozimas del receptor de membrana ubicuo, proteína cinasa C (PKC), y son medios particularmente preferidos para incrementar la expresión de CD163. También se contemplan otros métodos de movilización del calcio intracelular. Análogamente, también se pueden inducir células continuas que expresan de forma estable CD163 para que expresen Sn mediante tratamiento químico, usando, por ejemplo, IFN- α .

Los ejemplos de líneas de células continuas derivadas de la estirpe de monocitos/macrófagos y útiles en el contexto de la presente invención son THP-1, MM-1, J774, SU-DHL, RAW264, 3D4, y otras.

Existen varios métodos consolidados para inmortalizar células de mamífero en cultivo. Los genes víricos, incluyendo el virus de Epstein-Barr (EBV), el antígeno T del virus 40 del simio (SV40), el adenovirus E1A y E1B, y el virus del papiloma humano (HPV) E6 y E7 pueden inducir inmortalización mediante un proceso conocido como transformación vírica. Aunque el proceso es fiable y relativamente simple, estas células se convierten en genéticamente inestables (aneuploidía) y pierden las propiedades de células primarias. Para la mayor parte, estos genes víricos logran la inmortalización inactivando los genes supresores de tumores que ponen a las células en un estado senescente replicativo. El método preferido para inmortalizar células es a través de la expresión de la proteína de transcriptasa inversa telomerasa (TERT), particularmente aquellas células más afectadas por la longitud del telómero (por ejemplo, humanas). Esta proteína es inactiva en la mayoría de las células somáticas, pero cuando *hTERT* es expresada de forma exógena, las células son capaces de mantener longitudes del telómero suficientes para evitar la senescencia replicativa. El análisis de varias líneas celulares inmortalizadas por la telomerasa ha verificado que las células mantienen un genotipo estable y retienen marcadores fenotípicos críticos.

Las células continuas bien establecidas usadas aquí se seleccionan típicamente del grupo que consiste en células con características leucocitarias, o en células no leucocitarias tales como, por ejemplo, células de testículo de cerdo, células de riñón de cerdo (por ejemplo, PK15 (CCL-33), SK-RST (CRL-2842)), cultivos de células epiteliales, queratinocitos de piel (por ejemplo, HEK001 (CRL-2404), CCD1102 (CRL-2310)), células Vero (CCL-81),

fibroblastos de pulmón fetales humanos (por ejemplo HFL1 (CCL-153)), células de pulmón embrionarias humanas (por ejemplo HEL299 (CCL-137)), células de ovario de hámster chino (CHO) o células de riñón embrionarias humanas (HEK).

5 Por tanto, en una realización adicional, las líneas celulares consisten en células continuas que expresan tanto CD163 como sialoadhesina.

Cultivo de virus

10 En un objetivo adicional, la presente invención proporciona un método para preparar un cultivo de un VSRRP, comprendiendo dicho método proporcionar una línea celular identificada u obtenida usando uno cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, identificar dicha línea celular con virus, y cosechar el virus a partir del cultivo celular.

Una vez que el virus se ha hecho crecer hasta títulos elevados, se puede procesar según el uso pretendido, por ejemplo en el diagnóstico o producción de vacunas, por medios conocidos en la técnica.

15 Por ejemplo, en el caso de la producción de vacunas, los virus cosechados se pueden inactivar, por ejemplo con formalina, BPI, BEA o irradiación gamma, para uso en vacunas. En la alternativa, la cepa vírica usada en la infección puede ser una cepa atenuada para uso en la producción de vacunas atenuadas.

Diagnóstico

20 En los métodos de diagnóstico, las células permisivas de la presente invención se ponen en contacto con una muestra tomada de un sujeto infectado; las células se cultivan para permitir la replicación del virus; el virus se cosecha a partir de dicho cultivo celular y se identifica usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como por ejemplo, usando anticuerpos específicos para VSRRP.

25 El anticuerpo específico (del virus) es en particular un anticuerpo monoclonal o un derivado del mismo, seleccionándose este último preferiblemente del grupo de fragmentos de anticuerpos, conjugados u homólogos, pero también complejos y absorbatos conocidos por el experto. En una realización particular, los anticuerpos específicos (del virus) se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos específicos de la nucleocápside del VSRRP, tales como P3/27 y SDOW17 y WBE1, 4, 5 y 6.

30 En la alternativa, la presente invención proporciona el uso de los virus cosechados a partir de los cultivos celulares mencionados anteriormente en métodos para determinar una infección vírica o una infección vírica previa en un sujeto, evaluando la presencia de anticuerpos específicos del virus en la muestra tomada de dicho sujeto, es decir, detectando la unión de dichos anticuerpos específicos del virus a los virus cosechados a partir del cultivo celular, o la unión de los anticuerpos específicos del virus a las células infectadas que expresan proteínas víricas.

35 En la técnica existe una variedad de técnicas para determinar la unión de los anticuerpos específicos del virus al virus. Incluyen, pero no se limitan a, radioinmunoensayo (RIA), ELISA (ensayos inmunoradiométricos ligados a enzima), inmunoensayos de "sándwich", inmunoensayos de "competición", ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos in situ (usando, por ejemplo, oro coloidal, marcadores enzimáticos o radioisótopos), análisis de transferencia western, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos inmunofluorescentes y PAGE-SDS.

40 En una realización particular, la presencia de anticuerpos específicos del virus se determinará usando un ensayo de competición o de sándwich típico. Por ejemplo, en un ensayo de sándwich, la unión de los anticuerpos específicos del virus se realiza usando un anticuerpo marcado secundario, que es reactivo para el anticuerpo primario específico del virus y tiene preferiblemente la capacidad para reaccionar con múltiples sitios en el anticuerpo primario. En un ensayo de competición, una cantidad estándar de un anticuerpo marcado específico del virus competirá con los anticuerpos presentes en la muestra por la unión al virus.

Los marcadores conocidos son del tipo radioactivo o fluorométrico, que se detectan mediante instrumentación, y marcadores colorimétricos, típicamente marcadores enzimáticos que provocan la conversión de un sustrato correspondiente en la forma coloreada.

45 Las enzimas se han usado a menudo como marcadores en inmunoensayo. En el inmunoensayo enzimático convencional (EIA), una enzima se conjuga covalentemente con un componente de un par que se une específicamente de antígeno-anticuerpo, y el conjugado enzimático resultante se hace reaccionar con un sustrato para producir una señal que se detecta y se mide. La señal puede ser un cambio de color, detectada a simple vista o mediante una técnica espectrofotométrica, o puede ser la conversión del sustrato en un producto detectado mediante fluorescencia.

En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar un método para determinar una infección vírica o una infección vírica previa en un sujeto, comprendiendo dicho método:

cosechar VSRRP a partir de un cultivo celular obtenible usando uno cualquiera de los métodos de la presente invención;

poner en contacto dicho virus con una muestra tomada de dicho sujeto; y

determinar la presencia de anticuerpos específicos del virus en la muestra tomada de dicho sujeto.

En uno cualquiera de los métodos de diagnóstico, mencionados aquí anteriormente, la muestra es típicamente un fluido biológico, tal como, por ejemplo, suero, calostros, fluidos de lavado broncoalveolar, saliva, orina o heces, tejido o un extracto tisular. El tejido o extracto tisular a analizar incluye aquellos que se sabe, o que se sospecha, que son permisivos para el virus, tales como, por ejemplo, PBMC (células mononucleares de sangre periférica), macrófagos alveolares, tejidos linfoides tales como ganglios linfáticos, bazo, amígdalas y timo, y tejidos no linfoides tales como pulmones e hígado.

Esta invención se entenderá mejor con referencia a los Detalles Experimentales que siguen, pero los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que éstos son solamente ilustrativos de la invención como se describe de forma más completa en las reivindicaciones que siguen más adelante. Adicionalmente, a lo largo de esta solicitud, se citan diversas publicaciones. La descripción de estas publicaciones es para describir de forma más completa el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran la invención. A la luz de estos ejemplos, la persona experta en la técnica ideará otras realizaciones.

MÉTODOS

Cultivo celular y transfección

Se obtuvieron macrófagos alveolares primarios de cerdos Belgian Landrace convencionales de 4 a 6 semanas procedentes de una manada negativa para VSRRP como se describe por Wensvoort et al. (Wensvoort et al., 1991), y se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de aminoácidos no esenciales y 1 mM de piruvato sódico. Se cultivaron células Marc-145 en Medio Esencial Mínimo con sales de Earle (MEM) suplementado con 5% de FBS. Se hicieron crecer células PK-15 en MEM suplementado con 10% de FBS. Se cultivaron células BHK-21 en MEM suplementado con 10% de FBS, 1% de aminoácidos no esenciales y 1 mM de piruvato sódico. Se cultivaron células CHO-K1 en medio F-12 suplementado con 10% de FBS y 1 mM de piruvato sódico. Todas las células se hicieron crecer en su medio específico suplementado con 2 mM de L-glutamina y una mezcla de antibióticos en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37°C. Las células PK-15, BHK-21 y CHO-K1 se transfectaron respectivamente con lipofectamina (Invitrogen), lipofectamina 2000 (Invitrogen) y FuGENE 6 (Roche) según las instrucciones del fabricante.

Virus

Se usó la pasada 13^a en macrófagos de la cepa del VSRRP de prototipo europeo, virus Lelystad (LV) (proporcionado amablemente por G. Wensvoort), (Wensvoort et al., 1991). La cepa europea del VSRRP se hizo pasar en primer lugar sobre macrófagos y se cultivó subsiguientemente en células Marc-145 durante 4 pasadas, mientras que para la cepa del VSRRP de prototipo americano, VR-2332, se usó la 4^a pasada en células Marc-145, que nunca se hizo pasar sobre macrófagos (Collins et al., 1992). Se usó una 5^a pasada en células Marc-145 del aislado belga 94v360 (Duan et al., 1997a).

Anticuerpos

CD163 se detectó vía anticuerpo monoclonal (mAb) 2A10 de ratón anti-CD163 porcino (Ab-Direct) (Bullido et al., 1997; Sanchez et al., 1999) o anticuerpo policlonal (pAb) de cabra anti-CD163 humano (R&D Systems). Para el reconocimiento de sialoadhesina porcina, se ha usado el mAb 41D3 (Duan et al., 1998b; Vanderheijden et al., 2003). Como controles negativos, se usó mAb 13D12 irrelevante de isotipo comparable dirigido contra gD del virus de la pseudorrabia (Nauwynck y Pensaert, 1995) y anticuerpos de cabra purificados. VSRRP se visualizó vía el mAb P3/27 que reconoce la nucleocápside (Wieczorek-Krohmer et al., 1996), o un suero policlonal porcino obtenido de cerdos infectados con VSRRP.

Constructos

Se han descrito variantes de CD163 que difieren en su cola citoplásmica (Nielsen et al., 2006). Puesto que estas variaciones no parecen determinar la función receptora del VSRRP (Calvert et al., 2007), solamente se ha clonado una variante, la corta. Por lo tanto, se aisló ARN celular total a partir de macrófagos porcinos vía el RNeasy Mini Kit (Qiagen) y se convirtió subsiguientemente en ADNc vía cebadores oligo dT (Invitrogen) y transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen), seguido de tratamiento con RNase H (Gibco). El ADNc monocatenario obtenido sirvió a su vez como molde para la amplificación mediante PCR de la secuencia de CD163 vía la polimerasa Pfx Platinum (Invitrogen) y los siguientes cebadores: cebador directo 5'CAC CAT GGA CAA ACT CAG AAT GGT GCT ACA TGA AAA CTC T3', y cebador inverso 5'TCA TTG TAC TTC AGA GTG GTC TCC TGA GGG ATT 3' (Invitrogen). El fragmento de PCR se clonó entonces finalmente en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO (Invitrogen).

La sialoadhesina se clonó en el mismo vector como se describió por Vanderheijden et al. (Vanderheijden et al., 2003). Todas las secuencias se verificaron vía digestión por restricción y secuenciación.

Líneas celulares estables

- 5 Para construir una línea celular que coexpresa Sn y CD163, se transfectaron células CHO-K1 con un plásmido que contiene el ADNc de Sn y un gen de resistencia a geneticina. Tras la selección en busca de la resistencia a geneticina, las células se transfectaron con un plásmido que contiene el ADNc de CD163 y un gen de resistencia a zeocina, que permitió la selección de células que expresan tanto Sn como CD163. Finalmente, se aislaron 16 clones que coexpresaron Sn y CD163 (CHOSn-CD163). Se aislaron 10 clones en los que el 100% de las células expresaron de forma estable Sn y CD163, mientras que los otros 6 clones perdieron la expresión del receptor de Sn o de CD163. Tras un primer cribado para la susceptibilidad a la infección por VSRRP, se seleccionaron tres clones CHO^{Sn-CD163}, es decir IC5, ID9 y IF3, para la investigación posterior, y se depositaron en la Belgian Coordinated Collections of Microorganisms como CHO-Sn/CD163 IC5, CHO-Sn/CD163 ID9 y CHO-Sn/CD163 IF3 con los números de accesos respectivos LMBP 6677CB, LMBP 6678CB y LMBP 66779 CB, respectivamente.

Inactivación vírica

- 15 La inactivación con radiación ultravioleta (UV) se llevó a cabo con un reticulador de UV (UVP, Inc). Se radió virus purificado (10^7 TCID₅₀/ml) con luz UV de diferentes dosis (0 - 100 - 1000 - 2000 - 3000 o 4000 mJ/cm²) (Darnell et al. 2004). La inactivación con etilenimina binaria (BEI) se realizó incubando virus purificado (10^7 TCID₅₀/ml) con 1 mM de BEI (Aldrich) durante varias (0 - 6 - 12 - 24 - 48 o 72 horas) a 37°C. La reacción se detuvo con 0,1 mM de tiosulfato de sodio (Sigma) (Mondal et al. 2005).

20 Citometría de flujo

- Veinticuatro horas después de la siembra, los macrófagos se recogieron de la placa de cultivo celular mediante incubación con PBS enfriado con hielo durante 30 min. a 4°C inmediatamente antes de la inmunotinción y del análisis citométrico de flujo. Las células se fijaron primeramente con paraformaldehído al 3%, seguido del lavado e incubación con mAb primario 41D3, 2A10, o anticuerpos de control de isotipo comparable, a 4°C. Después, las células se lavaron 3 veces, y se incubaron subsiguientemente con Ab de cabra anti-ratón marcado con FITC (Molecular Probes). Finalmente, las células se lavaron 3 veces, se resuspendieron en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se analizaron con un Becton-Dickinson (San Jose, California) FACScalibur. Para cada muestra, se analizaron veinte mil células, y se almacenaron tres parámetros para el análisis posterior: dispersión directa de la luz, dispersión hacia los lados de la luz, y fluorescencia verde.

30 Titulación del virus

- Para determinar el título del virus extracelular, se recogió sobrenadante y se centrifugó para eliminar el desecho celular. Para determinar el título de virus intracelular, las células se lavaron, se recogieron y se analizaron mediante 3 ciclos de congelación-descongelación. Para la titulación en células Marc-145, las células se plantaron 3 días antes de la inoculación. Después, se inocularon con una serie de dilución de 10 veces de las muestras y se incubaron durante 7 días a 37°C, seguido de la evaluación del efecto citopático (CPE). Para la titulación en macrófagos, las células se plantaron 1 día antes de la inoculación seguido de la inoculación con una serie de dilución de 10 veces de las muestras, incubación durante 3 días a 37°C, y finalmente evaluación. Se estudió la CPE, y además las células infectadas se visualizaron vía un ensayo de monocapa de inmunoperoxidasa (IPMA) (Wensvoort et al., 1991).

Tinción y microscopía de inmunofluorescencia

- 40 Las células transfectadas y/o infectadas se fijaron con metanol enfriado con hielo, excepto que se demandaran fotografías o estudios de colocalización. En estos casos, se usó paraformaldehído al 3%, y, si fue necesario, esas células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1%. Los reactivos de fijación y de permeabilización se eliminaron vía lavado 3 veces con PBS. Las células fijadas se incubaron con anticuerpos primarios durante al menos 1 h a 37°C, se lavaron 3 veces con PBS, y se incubaron adicionalmente con anticuerpos secundarios durante al menos 1 h a 37°C. Finalmente, las células se lavaron 3 veces, se embebieron en glicerina-DABCO, se montaron y se analizaron vía microscopía de fluorescencia.

Colocalización

- 50 Para cuantificar la colocalización entre sialoadhesina y CD163 en la superficie de macrófagos, se tomaron imágenes confocales y se analizaron vía el programa CoLocalizer Pro. Antes de fusionar las dos imágenes, se restó el fondo fluorescente débil. En base a la superposición, se calcularon diferentes parámetros de colocalización según el manual.

Tratamiento de macrófagos con anticuerpos específicos de sialoadhesina y de CD163

Los macrófagos se sembraron en 96 pocillos 24 h antes de que se llevase a cabo el experimento. Se preparó una serie de diluciones de tres veces para diferentes anticuerpos (2A10, CD163-pAb, 41D3, 13D12, anticuerpos de

cabra purificados) y el complejo HbHp (Hb A₀ H0267, Hp type2-2 H9762 de Sigma-Aldrich), que se obtuvo mediante incubación durante 15 min. de ambos componentes a temperatura ambiente. Los macrófagos se incubaron entonces durante una hora a 37°C con el gradiente de concentración de anticuerpos/proteínas, seguido de la inoculación con VSRRP en presencia de anticuerpos/proteínas durante una hora a 37°C. Después del tratamiento, las células se lavaron, se incubaron adicionalmente durante 9 a 37°C y se fijaron con metanol. Las células infectadas se visualizaron vía una tinción de inmunoperoxidasa con mAb P3/27 o el suero policlonal de cerdo como anticuerpos primarios, y respectivamente anti-ratón de cabra HRP o anticuerpo de conejo HRP (Dako) como anticuerpos secundarios. En las reacciones de control, no se observó ninguna diferencia en el porcentaje de células infectadas para los 2 anticuerpos diferentes que reconocen VSRRP. Después de contar el porcentaje de células infectadas, se calcularon los porcentajes relativos de infección con células sin ningún tratamiento con anticuerpos/proteínas como valor de referencia representado mediante el dato de RPMI.

Experimentos de infección en células no de diana y en macrófagos

Para diferentes experimentos de infección, se usó un protocolo similar como se describirá aquí. Veinticuatro horas tras la transfección de células no diana con VSRRP, o 24 h tras la siembra de los macrófagos, las células se lavaron una vez con RPMI seguido de inoculación con sobrenadante vírico de VSRRP, que se aclaró del desecho celular vía centrifugación. Las células inoculadas se incubaron durante 1 h a 37°C en presencia del virus. Tras la eliminación del virus, los macrófagos se cubrieron directamente con medio, a diferencia de las células no diana, que se lavaron 5 veces con RPMI antes de la incubación en medio. La disolución de lavado final se recogió y se tituló para determinar la cantidad de virus de fondo que todavía estaba presente tras eliminar el inóculo. En diferentes puntos de tiempo tras la inoculación, las células se fijaron con metanol enfriado con hielo o con paraformaldehído, y el virus intra- y extracelular se recogió como se describe en la titulación del virus.

Experimentos de infección en células CHOS^{Sn-CD163}

Para diferentes experimentos de infección, se usó un protocolo similar como se describirá aquí. Tres clones de células CHOS^{Sn-CD163} diferentes (IC5, ID9 y IF3) sembrados a diferentes densidades (100000, 200000 o 300000 células/ml) se infectaron en diferentes días tras la siembra (1, 2 o 3 días después de la siembra) con LV que se hizo crecer en marc (moi 1) o con LV que se hizo crecer en macrófagos (moi 10). Después de 48 horas tras la inoculación, las células se fijaron con metanol y se tiñeron con anticuerpo primario P3/27 y con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra HRP. Después, se añadió sustrato AEC. Las células infectadas de 3 campos con una lente 40x (500 células por campo) se contaron con un microscopio. Para potenciar la interacción del virus con el receptor de sialoadhesina, que depende de la interacción de ácidos siálicos ligados al virus con el dominio de unión a ácido siálico N-terminal de Sn, y potenciar la infección subsiguiente, las células se trataron con neuraminidasa (50 mU/ml de neuraminidasa de *Vibrio cholerae*) para eliminar ácidos siálicos celulares que actúan en cis antes de la infección con los virus VSRRP que se hicieron crecer en macrófagos.

RESULTADOS

1. Expresión de los receptores de VSRRP sialoadhesina y CD163 en macrófagos, las células diana *in vivo* de VSRRP

Se ha descrito que ambos receptores de VSRRP, sialoadhesina y CD163, están restringidos a monocitos-macrófagos (Duan et al., 1998b; Sanchez et al., 1999). Para investigar adicionalmente su papel en la infección por VSRRP, en primer lugar quisimos confirmar su presencia y analizar su patrón de expresión en una población de macrófagos. Por lo tanto, se cultivaron macrófagos durante 24 horas, se recogieron de la placa de cultivo celular, se inmunotifieron y se analizaron vía citometría de flujo, o se cultivaron durante 24 horas, se fijaron, se inmunotifieron y se analizaron vía microscopía confocal. Similarmente a informes previos, los datos de citometría de flujo (Fig. 1A) muestran que casi 100% de los macrófagos son positivos para ambos receptores de VSRRP. De este modo, los macrófagos representan una población homogénea con respecto a la expresión de sialoadhesina y CD163. La tinción de inmunofluorescencia seguido de análisis confocal (Fig. 1B) revela una expresión casi exclusiva de sialoadhesina en la membrana celular. Esto contrasta con CD163, que está claramente presente en la membrana celular y también intracelularmente.

2. Efecto de anticuerpos específicos de sialoadhesina y de CD163 sobre la infección por VSRRP de macrófagos

Para examinar el papel de CD163 en la infección por VSRRP de macrófagos primarios, se evaluó el efecto de un mAb específico de CD163 y de un pAb sobre la infección por VSRRP de macrófagos. Por lo tanto, los macrófagos se preincubaron con diferentes concentraciones de anticuerpos, seguido de la inoculación de los macrófagos con VSRRP en presencia de los anticuerpos durante 1 h, lavado, incubación posterior durante 9 h a 37°C, fijación con metanol, y finalmente tinción con anticuerpos específicos de VSRRP. Los porcentajes relativos de macrófagos infectados se representan en la figura 2A, que muestra que mAb 41D3, dirigido contra sialoadhesina porcina, reduce fuertemente la infección por VSRRP de una manera dependiente de la dosis, como ya se ha descrito anteriormente (Duan et al., 1998a). De forma interesante, también el anticuerpo policlonal específico de CD163 reduce claramente la infección por VSRRP hasta 75% de una manera dependiente de la dosis, sugiriendo un papel para CD163 en la infección por VSRRP de macrófagos. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal específico de CD163 no tuvo ningún

efecto sobre la infección por VSRRP (datos no mostrados). También, el ligando mejor caracterizado de CD163, el complejo de hemoglobina-haptoglobina, no influyó sobre la infección por VSRRP (datos no mostrados). Finalmente, cuando se combinaron 41D3 y el anticuerpo policlonal específico de CD163, se bloqueó completamente la infección por VSRRP. Ninguno de los controles negativos, que son anticuerpos de control irrelevantes de isótopos comparables, tuvo un efecto sobre la infección por VSRRP. Estos resultados demuestran claramente que CD163 y sialoadhesina están implicados en la infección por VSRRP de macrófagos.

VSRRP presenta una variabilidad genética, antigénica y clínica notable, dando como resultado grupos distintos de aislados dentro de la misma familia vírica (Goldberg et al., 2003), urgiendo la necesidad de investigar si sialoadhesina y CD163 están implicados en la infección de diferentes cepas de VSRRP (Fig. 2B-C). Por lo tanto, se ensayaron diferentes aislados en busca de su infecciosidad en macrófagos en presencia de anticuerpos que reconocen a los receptores de VSRRP como se describe anteriormente. La cepa de VSRRP de prototipo europeo virus Lelystad (LV), la cepa de prototipo americano VR-2332 y el aislado belga 94v360 muestran todos ellos una clara reducción en presencia de 41D3 y del anticuerpo policlonal específico de CD163, y una reducción incluso mayor cuando se combinan ambos anticuerpos. Los 3 aislados usados se adaptaron para crecer en células Marc-145. De forma interesante, la cepa LV que se hizo crecer en macrófagos sin ninguna adaptación a una línea celular muestra la misma tendencia, sugiriendo que la diversidad genética o las células productoras de VSRRP no influyen en la necesidad de las diferentes cepas de VSRRP por sialoadhesina y CD163 para infectar a macrófagos.

3. Células no diana de VSRRP que expresan tanto sialoadhesina como CD163 apoyan la infección productiva por VSRRP y son más eficientes en comparación con CD163 solo

Puesto que el experimento con anticuerpos mostró que tanto sialoadhesina como CD163 están implicados en la infección por VSRRP de macrófagos, se investigó su papel potencial en la infección productiva de VSRRP en diferentes líneas celulares no susceptibles, ya sea que se expresen separadamente o en combinación. Células PK-15, CHO-K1 y BHK-21 se transfectaron con sialoadhesina, CD163, o con una combinación de ambos, y, 24 h tras la infección, las células se inocularon con el virus Lelystad del prototipo europeo o con el virus VR-2332 del prototipo americano. A las 24 horas tras la inoculación, se recogió sobrenadante y las células se fijaron. El sobrenadante se tituló en células Marc-145 para determinar la cantidad de virus infeccioso producido en las células transfectadas transitoriamente (Fig. 3). Las células fijadas se analizaron vía microscopía de inmunofluorescencia en busca de la presencia de VSRRP.

Además de las células PK-15, CHO-K1 y BHK-21, se ensayaron células HEK293t en busca de su susceptibilidad a la infección por VSRRP. De forma similar a las otras 3 líneas celulares, las células HEK293t que expresan sialoadhesina no apoyaron la infección productiva por VSRRP. Las células HEK293t que expresan CD163 solo apoyaron la infección productiva por VSRRP, y se observaron células 10-100 veces más infectadas en células que expresan tanto sialoadhesina como CD163 (datos no mostrados).

La línea inferior, las células que expresan solamente sialoadhesina nunca mostraron infección, como ya se señaló por Vanderhijden et al. (2003). Solamente se observaron células infectadas cuando estaba presente CD163, solo o en combinación con sialoadhesina (dato no mostrado), pero cuando CD163 solo es capaz de mantener la infección por VSRRP, se observaron células 10-100 veces más infectadas en células que expresan tanto sialoadhesina como CD163.

De acuerdo con los resultados obtenidos vía microscopía de inmunofluorescencia, no se detectó virus extracelular para células que expresan solamente sialoadhesina. Excepto para células PK-15, había algo de virus extracelular, sin embargo, células infectadas. Cuando solamente se expresa CD163, las tres líneas celulares producen nuevo virus infeccioso, pero los títulos de virus son más bien bajos, probablemente debido a la baja eficiencia de la infección. Cuando están presentes tanto sialoadhesina como CD163, las tres líneas celulares producen nuevo virus infeccioso, con títulos de virus notablemente mayores en comparación con células con solamente CD163, especialmente para células PK-15 y CHO-K1. La comparación entre la cepa del VSRRP del prototipo europeo y del prototipo americano muestra mayores títulos de virus para la cepa VR-2332 en células PK-15 y CHO-K1, pero no en células BHK-21. Además, para una repetición del experimento, la titulación se llevó a cabo no solamente en células Marc-145 sino también en macrófagos, revelando los mismos títulos de virus. De este modo, las células no diana de VSRRP que expresan CD163 o CD163 combinado con sialoadhesina producen nuevo virus que es infeccioso tanto en células Marc-145 como en macrófagos. Se dio un apoyo adicional al hecho de que células no permisivas para VSRRP se pueden hacer permisivas con títulos elevados de virus cuando se expresan tanto CD163 como sialoadhesina al evaluar la infecciosidad de la cepa Lelystad del VSRRP del prototipo europeo, la cepa VR-2332 del VSRRP del prototipo americano y el aislado del VSRRP belga 94V360 en las células PK-15, CHO-K1, BHK-21 y HEK293t. Para las 4 líneas celulares, se observaron resultados similares como se describen para las 2 cepas de los prototipos. 94V360 no fue capaz de infectar células que expresan solamente sialoadhesina. Las células que expresan CD163 fueron capaces de mantener la infección por VSRRP; sin embargo, se observaron células 10-100 veces más infectadas en células que expresan tanto sialoadhesina como CD163.

4. Cinética de la infección por VSRRP en células PK-15 que expresan tanto sialoadhesina como CD163

Debido a que la combinación de sialoadhesina y CD163 apoya eficientemente la infección por VSRRP en células no permisivas, se deseó estudiar la cinética de la infección por VSRRP en aquellas células no diana. Por lo tanto, se transfectaron células de riñón de cerdo PK-15 con una combinación de sialoadhesina y CD163, y, 24 h tras la transfección, las células se inocularon con el virus Lelystad a una *moi* de 0,1 o 1. En diferentes puntos de tiempo tras la infección, se recogió virus intra- y extracelular para ser titulado en células Marc-145, como se muestra en la figura 4. Partiendo de 12hpi, se puede observar un incremento en el título de virus extracelular, que alcanza su máximo a alrededor de 48hpi. Después, el título cae, lo que se puede explicar posiblemente por el número limitado de células que expresan sialoadhesina y CD163, y/o por que el virus se inactiva por la temperatura. La cantidad de partículas víricas internalizadas es claramente dependiente del título en el inóculo. En las primeras 6 h, la cantidad de virus internalizado permanece la misma o muestra una pequeña caída. Después, aumenta hasta alcanzar un máximo a alrededor de 24hpi. Lo que a su vez es seguido por una disminución del virus intracelular.

5. Función específica para sialoadhesina y CD163 durante la infección por VSRRP de células PK-15

Puesto que la infección por VSRRP de macrófagos y células no diana depende claramente de sialoadhesina y CD163, es necesario investigar sus contribuciones moleculares específicas a la infección por VSRRP. Los resultados obtenidos previamente en el laboratorio indican que sialoadhesina es importante para la internalización del virus (Vanderheijden et al., 2003). Deseamos confirmar estos resultados y estudiar el papel de CD163 durante la infección por VSRRP. Por lo tanto, células PK-15 se transfectaron con sialoadhesina, CD163, o con una combinación de ambos, lo que fue seguido de la inoculación con el virus Lelystad. En diferentes puntos de tiempo tras la infección, las células se fijaron, y el VSRRP se visualizó vía tinción de inmunofluorescencia con el mAb P3/27 que reconoce la proteína de la nucleocápside del VSRRP, representado en la figura 5. Las células que expresan sialoadhesina internalizan claramente partículas víricas de VSRRP; sin embargo, el desensamblaje vírico no se produce en cualquier punto de tiempo, y las células no se infectan de forma productiva. Solamente a 24hpi hay una pequeña disminución en el número de células con partículas víricas internalizadas. En células que expresan CD163, no se pudieron observar partículas víricas internalizadas. Sorprendentemente, esas células se infectaron y produjeron nuevas partículas víricas infecciosas. Las células PK-15 que expresan tanto sialoadhesina como CD163 internalizan partículas víricas de forma similar a células PK-15 que expresan sialoadhesina. Sin embargo, debido a la presencia de CD163, se observa una clara reducción en el número de células que muestran partículas víricas internalizadas a 6hpi, dando como resultado infección a 12hpi, e incluso más a 24hpi. De este modo, la infección de células que expresan tanto sialoadhesina como CD163 es mucho más eficiente que las células que expresan solamente CD163, como ya se mostró anteriormente (Fig. 3). Esos resultados confirman el papel de sialoadhesina como receptor de internalización, y muestran inesperadamente un papel para CD163 en la fusión.

6. Tratamiento de macrófagos con anticuerpos específicos de sialoadhesina y de CD163 a 4°C

Además de sialoadhesina, se muestra que CD163 está implicado durante la entrada de VSRRP en macrófagos. La sialoadhesina es conocida como receptor de fijación e internalización del VSRRP. Nuestros datos sugieren un papel para CD163 durante la pérdida de cubierta del VSRRP; sin embargo, es necesaria una investigación posterior para descifrar su funcionamiento exacto. Por lo tanto, se deseó investigar si CD163 está implicado durante la fijación del VSRRP.

Se sembraron macrófagos en 96 pocillos, 24 h antes de que se llevase a cabo el experimento. Se preparó una serie de diluciones de tres veces para diferentes anticuerpos (pAb CD163, 41D3, 13D12, anticuerpos de cabra de control purificados). Para el tratamiento a 4°C, los macrófagos se preincubaron durante 30 min. a 4°C antes de la incubación durante 1 h a 4°C con los ligandos, seguido de la inoculación con VSRRP en presencia de una nueva serie de diluciones de ligandos durante 1 h a 4°C. Tras la inoculación, las células se lavaron, se incubaron durante 10 h a 37°C, y se fijaron con metanol. Las células infectadas se visualizaron vía una tinción de inmunoperoxidasa con mAb P3/27 o el suero policlonal de cerdo como anticuerpos primarios, y respectivamente anti-ratón de cabra o anti-cerdo de conejo marcados con HRP (Dako) como anticuerpos secundarios. No se observó diferencia en el porcentaje de células infectadas para los 2 anticuerpos diferentes que reconocen a VSRRP. Las células sin el tratamiento con ligandos se representan como control. Para estas células no tratadas, el porcentaje medio de células infectadas se calculó a partir de 6 réplicas. Este porcentaje medio se usó como valor de referencia en el cálculo de los porcentajes relativos de infección.

El anticuerpo monoclonal 41D3 redujo la infección por VSRRP, en contraste con el pAb dirigido contra CD163, que no reduce la infección por VSRRP cuando se administra a 4°C (Fig. 6). Estos datos confirman el papel de sialoadhesina como receptor de fijación del VSRRP, y sugieren que CD163 no está implicado en la fijación de VSRRP a macrófagos.

7. Entrada de VSRRP en macrófagos: colocalización entre CD163 y VSRRP

Se muestra que CD163 está implicado en la entrada de VSRRP en macrófagos; sin embargo no durante la fijación. Además, CD163 permite al VSRRP desensamblarse e infectar de forma productiva células no diana, sugiriendo que CD163 actúa durante la entrada del VSRRP. Para ensayar esta hipótesis, investigamos la entrada de VSRRP en macrófagos vía análisis confocal de experimentos de inmunofluorescencia que muestran VSRRP y CD163 en diferentes puntos de tiempo tras la inoculación.

Veinticuatro horas después de la siembra, los macrófagos se lavaron y se incubaron con VSRRP durante 5, 10 o un máximo de 15 min. a 37°C. 15 min. después de la inoculación, el virus se sustituyó por medio, y las células se incubaron adicionalmente a 37°C. En diferentes puntos de tiempo tras la inoculación, las células se lavaron, se fijaron con paraformaldehído, se permeabilizaron con TX-100 y se tiñeron. Las células se incubaron en primer lugar con un mAb dirigido contra GP5 (isotipo IgG2a), seguido de la incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón de cabra Rojo Tejas. Las células se incubaron entonces nuevamente con el anticuerpo que reconoce GP5. Finalmente, CD163 se visualizó vía mAb 2A10, que estaba marcado directamente con Alexa 488 vía el kit marcador de zenon específico de IgG1 de ratón (Invitrogen). Las tinciones se analizaron vía microscopía confocal.

VSRRP se fija a los macrófagos a partir de 5 min. después de la inoculación, y los primeros viriones internalizados se observaron a partir de 10 min. después de la inoculación (datos no mostrados). VSRRP unido a la superficie de los macrófagos no se colocó con CD163. Sin embargo, las partículas víricas internalizadas terminaron en endosomas positivos a CD163. A partir de 45 min. tras la inoculación, los endosomas desaparecieron, y VSRRP y CD163 comenzaron a separarse.

La observación sorprendente de que VSRRP y CD163 se colocan en endosomas, contrastando esto con Sn que se coloca con VSRRP en la superficie celular, muestra además que CD163 no está implicado en la fijación de VSRRP a los macrófagos, sino que más bien tiene un papel en la fusión y pérdida de la cubierta del virus en el interior de las células en endosomas.

8. Unión, internalización, fusión e infección de VSRRP en células CHO que expresan de forma estable Sn y CD163.

Desde el Día 2 en adelante hay poca diferencia en el grado de infecciosidad de las células CHO^{Sn-CD163} estables, independientemente del hecho de si el VSRRP se hizo crecer en células Marc-145 (Fig. 7A) o en macrófagos (Fig. 7B). El pretratamiento de las células con neuraminidasa potenció la infección de las células con virus SRRP que se hizo crecer en macrófagos. La permisividad real de las células CHO^{Sn-CD163} estables se confirmó mediante inmunotinción en dichas células.

Se sembraron tres clones diferentes de células CHO^{Sn-CD163} (IC5, ID9 e IF3) a 200000 células/ml en una placa de 24 pocillos con inserto. Después de 2 días, las células se inocularon con LV que se hizo crecer en células marc o con LV inactivado que se hizo crecer en células marc. Las células se fijaron con metanol después de 1 hora a 4°C (unión; a 4°C el virus no es capaz de internalizarse), 1 hora a 37°C (internalización), 5 horas a 37°C (fusión; esto significa que las partículas víricas se desmantelan; como consecuencia, desaparece la tinción del virus), 12 horas a 37°C (infección) y 24 horas a 37°C (infección). El virus se tiñó con un anticuerpo primario P3/27 y un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra FITC. Las partículas víricas se contaron con un microscopio confocal.

Tabla 1. Unión, internalización, fusión e infección de LV (control) y LV inactivado en tres líneas celulares CHOSn-CD163 diferentes (IC5, ID9 e IF3)

	control			BEI			UV		
	IC5	ID9	IF3	IC5	ID9	IF3	IC5	ID9	IF3
Unión (partículas)	14	12	7	18	9	10	5	6	5
Internalización (partículas)	41	31	31	38	34	25	35	23	24
Fusión (partículas)	3	2	2	1	1	2	0	0	0
Infección 12hpi (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infección 24hpi (%)	5	2	2	0	0	0	0	0	0

Como se muestra en la tabla mencionada anteriormente, el virus LV que se hizo crecer en marc puede llevar a cabo un ciclo vírico completo en las tres líneas celulares CHO^{Sn-CD163}. En primer lugar, las partículas víricas se unen a las células, después las partículas víricas se internalizan en las células, después de lo cual las partículas se desmantelan para liberar el genoma. Finalmente, se produce la infección. Claramente, esto muestra que la ruta de infección del VSRRP en estas células imita la infección observada en las células diana in vivo, Los macrófagos. LV inactivado con BEI y con UV muestra unión, internalización y fusión idénticas al LV no inactivado, pero no hay infección, de manera que estos métodos son buenos candidatos para el desarrollo de vacunas. Estos resultados demuestran claramente el uso de las líneas celulares CHO^{Sn-CD163} estables en el estudio y optimización de procesos de inactivación vírica como parte de la producción de vacunas, y en consecuencia proporcionan una alternativa interesante para las células hospedantes naturales menos accesibles.

9. Producción de virus intracelular y extracelular en células infectadas 2 días después de la siembra

Se mostró una prueba adicional de la permisividad de las células CHO^{Sn-CD163} estables cuando se analiza la producción de virus intracelular y extracelular en dichas células al titular el virus producido no solamente en las células CHO^{Sn-CD163} sino también en las células hospedantes naturales (macrófagos alveolares) y en las células Marc-145, que se sabe que sostienen la infección por VSRP. El clon de CHO^{Sn-CD163} IC5 se infectó 2 días después de la siembra con LV que se hizo crecer en células marc, con VR que se hizo crecer en células marc, con 94V360 que se hizo crecer en macrófagos, de forma similar a los procedimientos de infección descritos aquí anteriormente. También se incluyó el pretratamiento de las células con neuraminidasa para la infección con VSRP 94V360 que se hizo crecer en macrófagos. La titulación de virus extracelular (extra) e intracelular (intra) se realizó a 3 días (Tabla 2) y 5 días (Tabla 3) después de la inoculación respectivamente, y se expresó como unidades log₁₀ de la TCID₅₀/ml.

10 Tabla 2. Titulación en diferentes tipos celulares (Marc-145, macrófagos y clon IC5 de CHO^{Sn-CD163}) de la producción de virus intra- y extra-celular 3 días después de la inoculación.

	LV marc	VR marc	94V360 macrófagos	94V360 macrófagos + neuraminidasa
Extra en células marc	4,3	4,8	/	3,8
Extra en macrófagos	4,3	5,3	4,8	5,3
Extra en CHO ^{Sn-CD163}	3,3	4,8	2,8	4,3
Intra en células marc	4,8	5,8	2,1	3,3
Intra en macrófagos	4,3	5,3	3,8	4,8
Intra en CHO ^{Sn-CD163}	3,8	5,3	/	3,8

Tabla 3. Titulación en diferentes tipos celulares (Marc-145, macrófagos y clon IC5 de CHO^{Sn-CD163}) de la producción de virus intra- y extra-celular 5 días después de la inoculación.

	LV marc	VR marc	94V360 macrófagos	94V360 macrófagos + neuraminidasa
Extra en células marc	4,3	5,3	/	3,8
Extra en macrófagos	5,55	5,3	4,8	5,3
Extra en CHO ^{Sn-CD163}	2,1	4,8	3,3	4,8
Intra en células marc	3,1	4,0	2,1	2,8
Intra en macrófagos	3,8	4,3	4,3	3,6
Intra en CHO ^{Sn-CD163}	2,8	4,3	3,3	3,3

Juntos, estos resultados muestran claramente que el virus se produce en células CHO^{Sn-CD163} y que este virus puede infectar no solamente a células CHO^{Sn-CD163}, sino también células Marc-145 y macrófagos primarios, mostrando que no se ha producido adaptación vírica durante la infección de células CHO^{Sn-CD163}. En particular es interesante que, para todos los virus producidos en células CHO^{Sn-CD163}, siempre se detectaron mediante titulación los niveles más elevados en macrófagos, mostrando nuevamente que no se produjo adaptación durante el cultivo in vitro que modificase los epítomos víricos implicados en la infección de macrófagos e inducción de anticuerpos neutralizantes.

En conclusión, estos resultados muestran que las células CHO^{Sn-CD163} se pueden usar para la producción de virus para uso en vacunas o en diagnóstico.

Referencias

- 25 Bullido, R., Gomez del Moral, M., Alonso, F., Ezquerro, A., Zapata, A., Sanchez, C., Ortuno, E., Alvarez, B. y Dominguez, J. (1997). Monoclonal antibodies specific for porcine monocytes/macrophages: macrophage heterogeneity in the pig evidenced by the expression of surface antigens. Tissue antigens 49, 403-413.
- Calvert, J. G., Slade, D. E., Shields, S. L., Jolie, R., Mannan, R. M., Ankenbauer, R. G. y Welch, S. K. (2007). CD163 Expression Confers Susceptibility to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses. J Virol.

- Collins, J. E., Benfield, D. A., Christianson, W. T., Harris, L., Hennings, J. C., Shaw, D. P., Goyal, S. M., McCullough, S., Morrison, R. B., Joo, H. S. et al. (1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 4, 117-126.
- 5 Delputte, P. L., Costers, S. y Nauwynck, H. J. (2005). Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *The Journal of general virology* 86, 1441-1445.
- Delputte, P. L., Van Breedam, W., Barbé, F., Van Reeth, K. y Nauwynck, H. J. (2007). Interferon alpha treatment enhances porcine arterivirus infection of monocytes via upregulation of the porcine arterivirus receptor sialoadhesin. *J Interf Cytok Res* accepted.
- 10 Delputte, P. L., Vanderheijden, N., Nauwynck, H. J. y Pensaert, M. B. (2002). Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J Virol* 76, 4312-4320.
- Duan, X., Nauwynck, H. J., Favoreel, H. W. y Pensaert, M. B. (1998b). Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. *J Virol* 72, 4520-4523.
- 15 Duan, X., Nauwynck, H. J. y Pensaert, M. B. (1997a). Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Archives of virology* 142, 2483-2497.
- Jusa, E. R., Inaba, Y., Kouno, M. y Hirose, O. (1997). Effect of heparin on infection of cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res* 58,488-491.
- 20 Kim, H. S., Kwang, J., Yoon, I. J., Joo, H. S. y Frey, M. L. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Archives of virology* 133, 477-483.
- Kim, J. K., Fahad, A. M., Shanmukhappa, K. y Kapil, S. (2006). Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10. *J Virol* 80, 689-696.
- 25 Kreutz, L. C. (1998). Cellular membrane factors are the major determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus tropism. *Virus Res* 53, 121-128.
- Kreutz, L. C. y Ackermann, M. R. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res* 42, 137-147.
- 30 Mengeling, W. L., Lager, K. M. y Vorwald, A. C. (1995). Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest* 7, 3-16.
- Meulenbergh, J. J., Bos-de Ruijter, J. N., van de Graaf, R., Wensvoort, G. y Moormann, R. J. (1998). Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol* 72, 380-387.
- 35 Nauwynck, H. J., Duan, X., Favoreel, H. W., Van Oostveldt, P. y Pensaert, M. B. (1999). Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *The Journal of general virology* 80 (Pt 2), 297-305.
- Nauwynck, H. J. y Pensaert, M. B. (1995). Effect of specific antibodies on the cell-associated spread of pseudorabies virus in monolayers of different cell types. *Archives of virology* 140, 1137-1146.
- 40 Neumann, E. J., Kliebenstein, J. B., Johnson, C. D., Mabry, J. W., Bush, E. J., Seitzinger, A. H., Green, A. L. y Zimmerman, J. J. (2005). Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 227, 385-392.
- Nielsen, M. J., Madsen, M., Moller, H. J. y Moestrup, S. K. (2006). The macrophage scavenger receptor CD163: endocytic properties of cytoplasmic tail variants. *Journal of leukocyte biology* 79, 837-845.
- 45 Plagemann, P. G. y Moennig, V. (1992). Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses. *Adv Virus Res* 41, 99-192.
- Sanchez, C., Domenech, N., Vazquez, J., Alonso, F., Ezquerra, A. y Dominguez, J. (1999). The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation. *J Immunol* 162, 5230-5237.
- 50 Shanmukhappa, K., Kim, J. K. y Kapil, S. (2007). Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virol J* 4, 62.

- Sur, J. H., Doster, A. R., Christian, J. S., Galeota, J. A., Wills, R. W., Zimmerman, J. J. y Osorio, F. A. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J Virol* 71, 9170-9179.
- 5 Vanderheijden, N., Delputte, P. L., Favoreel, H. W., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., van Woensel, P. A. y Nauwynck, H. J. (2003). Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol* 77, 8207-8215.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J. M., ter Laak, E. A., Bloemraad, M., de Kluyver, E. P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F. y et al. (1991). Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *The Veterinary quarterly* 13, 121-130.
- 10 Wieczorek-Krohmer, M., Weiland, F., Conzelmann, K., Kohl, D., Visser, N., van Woensel, P., Thiel, H. J. y Weiland, E. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): monoclonal antibodies detect common epitopes on two viral proteins of European and U.S. isolates. *Vet Microbiol* 51, 257-266.
- 15 Wissink, E. H., van Wijk, H. A., Pol, J. M., Godeke, G. J., van Rijn, P. A., Rottier, P. J. y Meulenbergh, J. J. (2003). Identification of porcine alveolar macrophage glycoproteins involved in infection of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Archives of virology* 148, 177-187.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Ghent University
- <120> CÉLULAS PERMISIVAS Y USOS DE LAS MISMAS
- <130> P07/021
- 20 <150> EP 07014842.4
- <151> 2007-07-27
- <150> GB 0811278.1
- <151> 2008-06-19
- <160> 14
- 25 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 3400
- <212> ADN
- <213> Sus scrofa
- 30 <300>
- <308> GenBank/AJ311716
- <309> 2005-04-15
- <313> (1)..(3400)
- <400> 1

atggtgctac	ttgaagactc	tggatctgca	gacttttagaa	gatgttctgc	ccattttaagt	60
tccttcactt	ttgctgtagt	cgctgttctc	agtgcctgct	tggctactag	ttctcttgga	120
ggaaaagaca	aggagctgag	gctaacgggt	ggtgaaaaca	agtgtctctg	aagagtggag	180
gtgaaagtgc	aggaggagt	gggaactgtg	tgtataatag	gctgggacat	ggatgtggtc	240
tctgttgttt	gtaggcagct	gggatgtcca	actgctatca	aagccactgg	atgggcta	300
tttagtgacg	gttctggacg	catttggatg	gatcatgttt	cttgtcgagg	gaatgagtca	360
gctctctggg	actgcaacaa	tgatggatgg	ggaaagcata	actgtactca	ccaacaggat	420
gctggagtaa	cctgctcaga	tggatctgat	ttagagatga	ggctggtgaa	tggaggaaac	480
cggtgcttag	gaagaataga	agtcaaat	caagagcggg	ggggaacagt	gtgtgatgat	540
aacttcaaca	taaatcatgc	ttctgtggtt	tgtaaacaac	ttgaatgtgg	aagtgtgtgc	600
agtttctctg	gttcagctaa	ttttggagaa	ggttctggac	caatctggtt	tgatgatctt	660
gtatgcaatg	gaatgagtc	agctctctgg	aactgcaaac	atgaaggatg	gggaaagcac	720
aattgcatgc	atgctgagga	tgctggagt	atttgcctaa	atggagcaga	cctgaaactg	780
agagtgttag	atggactaac	tgaatgttca	ggaaagattg	aagtgaatt	ccaaggagaa	840
tggggaacaa	tctgtatga	tggctgggat	atgatgatg	ccgctgtggc	atgtaagcaa	900
ctgggatgtc	caactgctgt	cactgccatt	ggtcgagtta	acgccagtga	gggaactgga	960
cacatttggc	ttgacagtgt	ttcttgccat	ggacacgagt	ctgctctctg	gcagtgtaga	1020
caccatgcat	ggggaagaca	ttattgcaat	cataatgaag	atgctggtgt	gacatgttct	1080
gatggatcag	atctggaact	gagacttaaa	ggtggaggca	gccactgtgc	tgggacagt	1140
gaggtggaaa	ttcagaact	ggtaggaaaa	gtgtgtgata	gaagctggg	actgaaagaa	1200
gctgatgtgg	tttgacaggca	gctgggatgt	ggtatctgcac	tcaaacatc	atatcaagtt	1260
tattccaaaa	ccaaggcaac	aaacacatgg	ctgtttgtaa	gcagctgtaa	tggaaatgaa	1320
acttctcttt	gggactgcaa	gaattggcag	tggggtggac	ttagtgtgta	tcactatgac	1380
gaagccaaaa	ttacctgctc	agccacacag	aaacccaggc	tgggtggagg	ggacattccc	1440
tgtctctgtc	gtgttgaagt	acaacatgga	gacacgtggg	gcaccgtctg	tgattctgac	1500
ttctctctgg	aggcggccag	cgtgctgtgc	agggaactac	agtgcggcac	tgtgtttcc	1560
ctcctggggg	gagctcactt	tggagaagga	agtggacaga	tctgggctga	agaattccag	1620
tgtgaggggc	acgagtcaca	cctttcactc	tgtccagtag	caccccgccc	tgacgggaca	1680
tgtagccaca	gcagggacgt	cggcgtagtc	tgtcaagat	acacacaaat	ccgcttggtg	1740
aatggcaaga	ccccatgtga	aggaagagt	gagctcaaca	ttcttgggtc	ctgggggtcc	1800
ctctgcaact	ctcactggga	catggaagat	gcccatgttt	tatgccagca	gcttaaatgt	1860
ggagttgccc	tttctatccc	gggaggagca	ccttttggga	aagggaagtga	gcaggctctg	1920
aggcacatgt	ttcacatgac	tgggactgag	aagcacatgg	gagattgttc	cgtcactgct	1980
ctgggcgcct	cactctgttc	ttcaggggcaa	gtggcctctg	taactgtctc	agggaaaccag	2040
agtgcagcac	tatccccgtg	caattcatca	tcctcgacc	catcaagctc	tattatttca	2100
gaagaaagt	gtgttgctg	catagggagt	ggtcaacttc	gcctggctga	tggagggtgt	2160
cgttgtgctg	ggagagttag	ggtctatcct	ggggcatcct	ggggcaccat	ctgtgatgac	2220
agctgggacc	tgaatgatgc	ccatgtggtg	tgcacacagc	tgagctgtgg	atgggccatt	2280
aatgccactg	gttctgtcct	ttttggggaa	ggaaacaggc	ccatttggct	ggatgagata	2340
aatgtgaatg	gaaagaatc	tcataatttg	caatgccact	cacatgggtt	ggggcgccac	2400
aatgacagc	ataaggagga	tgcaggagtc	atctgctcag	agttcatgtc	tctgagactg	2460
atcagtga	acagcagaga	gacctgtgca	gggcgcctgg	aagtttttta	caacggagct	2520
tggggcagcg	ttggcaggaa	tagcatgtct	ccagccacag	tgggggtggt	atgcaggcag	2580
ctgggctgtg	cagacagagg	ggacatcagc	cctgcatctt	cagacaagac	agtgtccagg	2640
cacatgtggg	tggacaatgt	tcagtgtcct	aaaggacctg	acacactatg	gcagtgtccc	2700
tcacttccat	ggaagaagag	actggccagc	ccctcagagg	agacatggat	cacatgtgcc	2760
aacaaaataa	gacttcaaga	aggaaacact	aattgttctg	gacgtgtgga	gatctgttac	2820
ggaggttcct	ggggcactgt	gtgtgacgac	tcctgggacc	ttgaagatgc	tcagggtggt	2880
tgccgacagc	tgggctgtgg	ctcagctttg	gaggcaggaa	aagagcccg	atttggccag	2940
gggactgggc	ccatagtggc	caatgaagt	aagtgcagg	ggaatgaacc	ctccttgtgg	3000
gattgtcctg	ccagatccctg	gggcccagct	gactgtggac	acaaggagga	tgctgtgtg	3060
acgtgctcag	aaattgcaaa	gagccgagaa	tcctacatg	ccacaggtcg	ctcatctttt	3120
gttgacattg	caatctttgg	ggtcattctg	ttggcctgtc	tcacgcatt	cctcatttgg	3180
actcagaagc	gaagacagag	gcagcggtc	tcagttttct	caggaggaga	gaattctgtc	3240
catcaaatc	aataccggga	gatgaattct	tgctgaaag	cagatgaaac	ggatatgcta	3300
aatccctcag	gagaccactc	tgaagtacaa	tgaaggagaa	aatgggaatt	ataacctggg	3360
gagttcagcc	tttaagatag	cttgatgaag	acctggacta			3400

<210> 2

<211> 1115

5 <212> PRT

<213> Sus scrofa

<300>

<308> GenPept/CAC84397

<309> 2005-04-15

<313> (1)..(1115)

5 <400> 2

MDKLRLMVLHE	NSGSADFRRRC	SAHLSSFTFA	VVAVLSACL	TSSLGGKDKE	LRLTGGENKC	60
SGRVEVKVQE	EWGTVCNNGW	DMDVVSVC	QLGCPTAIKA	TGWANFSAGS	GRIWMDHVSC	120
RGNESALWDC	KHDGWGKHNC	THQQDAGVTC	SDGSDLEMGL	VNGGNRCLGR	IEVKFQGRWG	180
TVCDNDFNIN	HASVVKQLE	CGSAVSFSGS	ANFEGSGPI	WFDDLVCNGN	ESALWNCKHE	240
GWGKHNCDA	EDAGVICLNG	ADLKLRRVDG	VTECSGRLEV	KFQGEWGTIC	DDGWSDDDAA	300
VACKQLGCPT	AVTAIGRVNA	SEGTGHIWLD	SVSCHGHESA	LWQCRHHEWG	KHYCNHDEDA	360
GVTCSDGSDL	ELRLKGGGSH	CAGTVEVEIQ	KLVGKVCDS	WGLKEADVVC	RQLGCGSALK	420
TSYQVYSKTK	ATNTWLFVSS	CNGNETSLWD	CKNWQWGLS	CDHYDEAKIT	CSAHRKPRLV	480
GGDIPCSGRV	EVQHGDWTGT	VCDSDFSLEA	ASVLCRELQC	GTVVSLLGGA	HFEGEGSQIW	540
AEEFQCEGHE	SHLSLCPVAP	RPDGTCSHR	DVGVCSTRYT	QIRLVNGKTP	CEGRVELNIL	600
GSWGSCLNSH	WDMEDAHVLC	QQLKCGVALS	IPGGAPFGKG	SEQVWRHMFH	CTGTEKMGD	660
CSVTALGASL	CSSGQVASVI	CSGNQSQTLS	PCNSSSSDPS	SSIIEENG	ACIGSGQLRL	720
VDGGGRCAGR	VEVYHEGWSG	TICDDSDWLN	DAHVVCKQLS	CGWAINATGS	AHFEGGTGPI	780
WLDEINCNGK	ESHIWQCHSH	GWGRHNCRHK	EDAGVICSEF	MSLRLESENS	RETCAGRLEV	840
FYNGAWGSVG	RNSMSPATVG	VVCRQLGCAD	RGDISPASSD	KTVSRHMMVD	NVQCPKGPDT	900
LWQCPSSPWK	KRLASPSEET	WITCANKIRL	QEGNTNCSGR	VEIWWYGGSWG	TVCDSDWLE	960
DAQVVCRLG	CGSALEAGKE	AAFGQGTGPI	WLNEVKCKGN	ETSLWDPCPAR	SWGHSDCGHK	1020
EDAAVTCSEI	AKSRESLHAT	GRSSFVALAI	FGVILLACLI	AFLIWTQKRR	QRQRLSVFSG	1080
GENSVHQIQY	REMNSCLKAD	ETDMLNPSGD	HSEVQ			1115

<210> 3

<211> 4405

10 <212> ADN

<213> mus musculus

<300>

<308> GenBank/AF274883

<309> 2001-05-10

15 <313> (1)..(4405)

<400> 3

ES 2 567 561 T3

gtggtcatcc	actttctaca	gagaacacgt	ctatgaaata	gtatcaggag	acacacggag	60
ccatcaaaat	catcaagctt	tggaaatgggt	ggacacagaa	tggttcttct	tggagggtgct	120
ggatctcctg	gttgtaaaag	gtttgtccat	ctaggtttct	ttgttggtgc	tgtgagctca	180
cttctcagtg	cctctgctgt	cactaacgct	cctggagaaa	tgaagaagga	actgagactg	240
gcgggtggtg	aaaacaactg	tagtgggaga	gtggaactta	agatccatga	caagtggggc	300
acagtgtgca	gtaacggctg	gagcatgaat	gaagtgtccg	tggtttgcca	gcagctggga	360
tgcccaactt	ctattaagc	ccttggtatg	gctaactcca	gcgccggctc	tggatatatc	420
tggatggaca	aagtttcttg	tacagggaat	gagtcagctc	tttgggactg	caaacatgat	480
gggtggggaa	agcataactg	tacctatgaa	aaagatgctg	gagtgacctg	ctcagatgga	540
tctaatttgg	agatgagact	ggtgaacagt	gcgggccacc	gatgcttagg	aagagtagaa	600
ataaagttcc	agggaaagtg	ggggacggtg	tgtgacgaca	acttcagcaa	agatcacgct	660
tctgtgattt	gtaaacagct	tggatgtgga	agtgccatta	gtttctctgg	ctcagctaaa	720
ttgggagctg	gttctggacc	aatctggctc	gatgacctgg	catgcaatgg	aatgagtcga	780
gctctctggg	actgcaaaaa	cgggggatgg	ggcaagcata	actgtgacca	tgctgaggat	840
gtcgggtgga	tttgcttaga	gggagcagat	ctgagcctga	gactagtgga	tggagtgtcc	900
agatgttcag	gaagattgga	agtgaagattc	caaggagaaat	gggggaccgt	gtgtgatgat	960
aactgggatc	tccgggatgc	ttctgtggtg	tgcaagcaac	tgggatgtcc	aactgccatc	1020
agtgccattg	gtcgaagttaa	tgccagtggg	ggatctggac	agatttggct	tgacaaattt	1080
tcatgcgaag	gacatgaggc	aactccttgg	gagtgtaaac	accaagagtg	gggaaagcat	1140
tactgtcatc	atagagaaga	cgctggtgtg	acatgttctg	atggagcaga	tctggaactt	1200
agactttag	gtggaggcag	tcgctgtgct	ggcattgtgg	aggtggagat	tcagaagctg	1260
actgggaaga	tgtgtagccg	aggctggaca	ctggcagatg	cggatgtggt	ttgcagacag	1320
cttggatgtg	gatctgcgct	tcaaaaccag	gctaagatct	actctaaaac	tggggcaaca	1380
aatacgtggc	tctttcctgg	atcttgtaat	ggaaatgaaa	ctactttttg	gcaatgcaaa	1440
aactggcagt	ggggcgccct	ttcctgtgat	aatttcgaag	aagccaaagt	tcctgtctca	1500
ggccacaggg	aaccagact	ggttgaggga	gaaatcccat	gctctggtcg	tgtggaagtg	1560
aaacacggag	acgtgtgggg	ctccgtctgt	gattttgact	tgtctctgga	agctgccagt	1620

```

gtggtgtgca ggaattaca atgtggaaca gtcgtctcta tcctaggggg agcacatttt 1680
ggagaaggaa gtggacagat ctgggggtgaa gaattccagt gtagtgggga tgagtcccat 1740
ctttcactat gctcagtgcc gccccgcta gacagaactt gtaccacag cagggatgtc 1800
agcgtagtct gctcacgata catagatatatt cgtctggcag gcggcgagtc ctctgtgag 1860
ggaagagtgg agctcaagac actcggagcc tgggggtcccc tctgcagttc tcattgggac 1920
atggaagatg ctcatgtctt atgtcagcag ctgaagtgtg gggttgccc atctattcca 1980
gaaggagcac attttgggaa aggagctggt caggtctgga gtcacatggt ccactgcaact 2040
ggaactgagg aacatatagg agattgcctc atgactgctc tgggtgccc gacgtgttcc 2100
gaaggacagg tggcctctgt catctgtctc ggaaccaaat cccagacact attgccatgt 2160
agttcattgt ctccagtcga aacaacaagc tctacaattc caaaggagag tgaagttccc 2220
tgcatagcaa gtggccagct tcgcttggtg ggtggagggtg gtcgctgcgc tgggaagagt 2280
gaggtctgcc acgagggctc ttggggcacc gtcgtgtgatg acaattggga tatgactgat 2340
gccaatgtgg tgtgcaagca gctggagctg ggcgtggcaa ttaacgccac tggctctgtc 2400
tacttcgggg aaggagcagg agctatctgg ctagacgaag tcatctgcac tgggaaagag 2460
tctcatattt ggcagtgcca ttcatatggc tggggacgcc ataactgcag gcacaaagaa 2520
gatgcagggt ttatctgtct cgagttcatg tctctgaggc tgaccaacga agcccacaaa 2580
gaaaactgca caggctgcct tgaagtgtt tacaatggta catggggcag tattggcagt 2640
agcaatatgt ctccaaccac tgtgggggtg gtgtgccgtc agctgggctg tgcagacaa 2700
gggactgtga aaccataacc ttacagacaag acaccatcca ggcccatgtg ggtagatcgt 2760
gtgcagtgct caaaggaggt tgacactttg tggcagtgcc cctcgtcacc ttggaaacag 2820
agacaggcca gccccctcct ccaggagtc ttgatcatct gtgacaacaa aataagactc 2880
cagggaaggc atcacagatg ttctggagct gtggagatct ggcacaaagg ttctgggga 2940
acagtgtgtg atgactcctg ggatcttaat gatgctaagg ttgtatgtaa gcagttgggc 3000
tgtggccaag ctgtgaaggc actaaaagaa gcagcatttg gtccaggaa tggggccata 3060
tggctcaatg aaattaaagt tagagggaat gagtcttccc tgtgggattg tcctgccaaa 3120
ccgtggagtc acagcagact tgggcacaaa gaagatgctt ccattccagt cctcccaaaa 3180
atgacttcag aatcacatca tggcacaggt caccacccc tcacggcact cttggtttgt 3240
ggagccattc tatttgtcct cctcattgtc ttctctctgt ggactctgaa gcgacgacgg 3300
attcagcgac ttacagtttc ctcaagagga gaggtcttga tacatcaagt tcagtaccaa 3360
gagatggatt caaaggcgga tgatctggac ttgctgaaat cctcgggggt cattcagagg 3420
cacactgaga aggaaaatga taattataa tccactgagg ttggagttaa agaagccttg 3480
acaggacagc cagctaaatg gaacaagagc ccaggcaacg cacggatgac cacagctgca 3540
tcttcatgca gtcctttgtt tcctggaact ctgctgaacc tgcaaaaacc atatttgtga 3600
atgtgaccac ttaatataga tgggagactt ttgagggaat taacaatat tgctatttgt 3660
ttgcttgttc gcaatagggt ctcatatgt atagccctgg agatggcgat agagagcagg 3720
caagcctaga attcacagat atctgcttgt ctctgcttc caaatgctgg gatcaaatat 3780
gtggaccacc acatgtggtt taacaattgt gtcttgattt tataaatttc tgggtggttt 3840
ttctgacgtt tttaggggtt cgtgaatata aaataatgtc ttttcggttg gcatgcta 3900
ttttaaatat tatacacttc cttgtagtga gtttaagaat aatttcttat aaccaagtca 3960
attcattttc actttgaatt atttaataaa ggaatatggt cattgtgacc acacacacag 4020
cagttgtgac cgctgtatg aggccttcaa aaaatatatt aaaaatagag ggctggagaa 4080
atggctcaga ggtcctgagt tcaattccta gcaaccacat ggtggctcac aaccatctgt 4140
aatgggaatc cgatgccctc ttccagtgtg tctgaagata gtgacactgt cctcattaac 4200
ataaaataaa taaataaatc tttaaaaaaa gaaaagacaa tagaggaggg gaggggcgtg 4260
agcgtaggag tgaggactga ttgagaagaa ggttgaggga agtgggggga ggtgaaaagc 4320
tagttgggaa cttatgtgat cacagtgcac catgtccaaa tatgacatgt ccaaaaatgt 4380
tattaataaa gaaacggaaa tcaaaa 4405

```

<210> 4

<211> 1121

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<300>

<308> GenPept/AAK16065

<309> 2001-05-10

<313> (1)..(1121)

10 <400> 4

MGGHRMVLG	GAGSPGCKRF	VHLGFFVAV	SSLLSASAVT	NAPGEMKKEL	RLAGGENNCS	60
GRVELKIHDK	WGTVCNSNGWS	MNEVSVVCQQ	LGCPTSIKAL	GWANSSAGSG	YIWMKVSCT	120
GNESALWDCK	HDGWGKHNT	HEKDAGVTC	DGSNLEMRLV	NSAGHRCLGR	VEIKFQGWG	180
TVCDDNFSKD	HASVICKQLG	CGSAISFSGS	AKLGAGSGPI	WLDDLACNGN	ESALWDCKHR	240
GWGKHNCDA	EDVGVICLEG	ADLSLRLVDG	VSRCGRLEV	RFQGEWGTVC	DDNWDLRDAS	300
VVCKQLGCPT	AISAIGRVNA	SESGQIWL	NISCEGHEAT	LWECKHQEWG	KHYCHHREDA	360
GVTCSGDADL	ELRLVGGGSR	CAGIVEVEIQ	KLTGKMCSRG	WTLADADVVC	RQLGCGSALQ	420
TQAKIYKTG	ATNTWLFPGS	CNGNETTFWQ	CKNQWGGLS	CDNFEEAKVT	CSGHREPLV	480
GGEIPCSGRV	EVKHGDVWGS	VCDLFLSLEA	ASVVCRELQC	GTVVSILGGA	HFGEGSGQIW	540
GEEFQCSGDE	SHLSLCSVAP	PLDRTCTHSR	DVSVVCSTRYI	DIRLAGGESS	CEGRVELKTL	600
GAWGPLCSSH	WDMEDAHVLC	QQLKCGVAQS	IPEGAHFQKG	AGQVWSHMFH	CTGTEEHIGD	660
CLMTALGAPT	CSEGQVASVI	CSGNQSQTL	PCSSLSPVQT	TSSTIPKESE	VPCIASGQLR	720
LVGGGGRCAG	RVEVYHEGSW	GTVCDDNWD	TDANVVCQKL	DCGVAINATG	SAYFEGGAGA	780
IWLDEVICTG	KESHIWQCHS	HGWGRHNCRH	KEDAGVICSE	FMSLRLTNEA	HKESCTGRLE	840
VFYNGTWSGI	GSSNMSPPTV	GVVCRQLGCA	DNGTVKPIPS	DKTPSRPMWV	DRVQCPKQVD	900
TLWQCPSSPW	KQRQASPSSQ	ESWIICDNKI	RLQEGHTDCS	GRVEIWHKGF	WGTVCDDSWD	960
LNDKVVCKQ	LGGCQAVKAL	KEAAFPGTG	PIWLNEIKCR	GNESLWDCP	AKPWSHSDCG	1020
HKEDASIQCL	PKMTSESHHG	TGHPTLTALL	VCGAILLVLL	IVFLLWTLKR	RQIQRLTVSS	1080
RGEVLIHQVQ	YQEMDSKADD	LDLLKSSGVI	QRHTEKENDN	L		1121

<210> 5

<211> 3780

<212> ADN

5 <213> homo sapiens

<300>

<308> GenBank/BC051281

<309> 2006-07-15

<313> (1)..(3780)

10 <400> 5

aacatttcta	gggaataata	caagaagatt	taggaatcat	tgaagttata	aatctttgga	60
atgagcaaac	tcagaatggt	gctacttgaa	gactctggat	ctgctgactt	cagaagacat	120
tttgtcaact	tgagtccctt	caccattact	gtgggtcttac	ttctcagtc	ctgttttgtc	180
accagttctc	ttggagggaac	agacaaggag	ctgaggctag	tggatggtga	aaacaagtgt	240
agcgggagag	tggaagtga	agtcaggag	gagtgaggaa	cgggtgtgaa	taatggctgg	300
agcatggaag	cgggtctctgt	gattttgtaac	cagctgggat	gtccaactgc	tatcaaagcc	360
cctggatggg	ctaattccag	tgacagttct	ggacgcattt	ggatggatca	tgtttcttgt	420
cgtgggaatg	agtcagctct	ttgggattgc	aaacatgatg	gatggggaaa	gcatagtaac	480
tgtactcacc	aacaagatgc	tggagtgaac	tgctcagatg	gatccaattt	ggaaatgagg	540
ctgacgcgtg	gagggaaatat	gtgttctgga	agaatagaga	tcaaattcca	aggacggtgg	600
ggaacagtg	gtgatgataa	cttcaacata	gatcatgcat	ctgtcatttg	tagacaactt	660
gaatgtggaa	gtgctgtcag	tttctctggt	tcatctaatt	ttggagaagg	ctctggacca	720
atctggtttg	atgatcttat	atgcaacgga	aatgagtcag	ctctctggaa	ctgcaaacat	780
caaggatggg	gaaagcataa	ctgtgatcat	gctgaggatg	ctggagtgat	ttgctcaaag	840
ggagcagatc	tgagcctgag	actggtagat	ggagtcactg	aatgttcagg	aagattagaa	900
gtgagattcc	aaggagaatg	ggggacaata	tgtgatgacg	gctgggacag	ttacgatgct	960

```

gctgtggcat gcaagcaact gggatgtcca actgccgtca cagccattgg tcgagttaac 1020
gccagtaagg gatttggaca catctggcct gacagcgctt cttgccaggg acatgaacct 1080
gctgtctggc aatgtaaaca ccatgaatgg ggaagcatt attgcaatca caatgaagat 1140
gctggcgtga catgttctga tggatcagat ctggagctaa gacttagagg tggaggcagc 1200
cgctgtgctg ggacagtga ggtggagatt cagagactgt tagggaaggt gtgtgacaga 1260
ggctggggac tgaagaagc tgatgtggtt tgcaggcagc tgggatgtgg atctgcactc 1320
aaaacatcct atcaagtgtg ctccaaaatc caggcaacaa acacatggct gtttctaagt 1380
agctgtaacg gaaatgaaac ttctctttgg gactgcaaga actggcaatg ggggtggactt 1440
acctgtgatc actatgaaga agccaaaatt acctgctcag cccacaggga acccagactg 1500
gttggagggg acattccctg ttctggacgt gttgaagtga agcatgtga cacgtggggc 1560
tccatctgtg attcggactt ctctctggaa gctgccagcg ttctatgcag ggaattacag 1620
tgtggcacag ttgtctctat cctgggggga gctcactttg gagagggaaa tggacagatc 1680
tgggctgaag aattccagtg tgagggacat gactccatc ttctactctg cccagtagca 1740
ccccgccag aggaacttg tagccacagc agggatgttg gagtagtctg ctcaagatac 1800
acagaaattc gcttggtgaa tggcaagacc ccgtgtgagg gcagagtgga gctcaaaacg 1860
cttgggtgctt ggggatccct ctgtaactct cactgggaca tagaagatgc ccatgttctt 1920
tgccagcagc ttaaatgttg agttgccctt tctacccag gaggagcacg ttttggaaaa 1980
ggaaatgttc agatctggag gcatatgttt cactgcactg ggactgagca gcacatggga 2040
gattgtctct taactgtctt aggtgcttca ttatgtctt cagagcaagt ggcctctgta 2100
atctgtctag gaaaccagtc ccaaacactg tcctcgtgca attcatcgtc tttggggcca 2160
acaaggccca ccattccaga agaaagtgtc gtggcctgca tagagagtgg tcaacttcgc 2220
ctggtaaatg gagggagtcg ctgtgctggg agagtagaga tctatcatga gggctcctgg 2280
ggcaccatct gtgatgacag ctgggacctg agtgatgccc acgtggtttg cagacagctg 2340
ggctgtggag aggccattaa tgccactggt tctgctcatt ttgggggaag aacagggcc 2400
atctggctgg atgagatgaa atgcaatgga aaagaatccc gcatttgcca gtgccattca 2460
cacggctggg ggcagcaaaa ttgcaggcac aaggaggatg cgggagtat ctgctcagaa 2520
ttcatgtctc tgagactgac cagtgaagcc agcagagagg cctgtgcagg gcgtctggaa 2580
gttttttaca atggagcttg gggcactggt ggcaagagta gcatgtctga aaccactgtg 2640
gggtgtggtg gcaggcagct gggctgtgca gacaaaggga aaatcaacc tgcacttta 2700
gacaaggcca tgtccattcc catgtgggtg gacaatgttc agtgtccaaa aggcctgac 2760
acgctgtggc agtgccatc atctccatgg gagaagagac tggccagccc ctcgaggag 2820
acctggatca catgtgacaa caagataaga cttcagggaag gacccacttc ctgttctgga 2880
cgtgtggaga tctggcatgg aggttccttg gggacagtgt gtgatgactc ttgggacttg 2940
gacgatgtc aggtgtgtgt tcaacaactt ggctgtgtc cagctttgaa agcattcaaa 3000
gaagcagagt ttggtcagg gactggaccg atatggctca atgaagtga gtgcaagg 3060
aatgagtctt ccttgtggga ttgtcctgcc agacgctggg gccatagtga gtgtgggcac 3120
aagggaagac ctgcagtga ttgcacagat atttcagtgc agaaaacccc aaaaaagcc 3180
acaacaggtc gctcatccc tcagtcatcc tttattgcag tcgggatcct tggggtgtt 3240
ctgttggcca ttttctgcgc attattcttc ttgactaaaa agcgaagaca gagacagcg 3300
cttgacgttt cctcaaggag agagaactta gtccaccaa ttcaataccg ggagatgaat 3360
tcttgctga atgcagatga tctggacctg atgaattcct cagaaaattc ccatgagtca 3420
gctgatttca gtgctgctga actaatttct gtgtctaat ttcttcttat ttctggatg 3480
gaaaaggagg ccattctgag ccacactgaa aaggaaaatg ggaatttata acccagtga 3540
ttcagccttt aagatacctt gatgaagacc tggactattg aatggagcag aaattcacct 3600
ctctcactga ctattacagt tgcattttta tggagtctt cttctcctag gattcctaag 3660
actgctgctg aatttataaa aattaagttt gtgaatgtga ctacttagtg gtgtatatga 3720
gactttcaag ggaattaaat aaataaataa gaattgtatt gaaaaaaaa aaaaaaaaa 3780

```

<210> 6

<211> 1156

<212> PRT

5 <213> HOMO SAPIENS

<300>

<308> GenPept/AAH51281

<309> 2006-07-15

<313> (1)..(1156)

10 <400> 6

MSKLRMVLE	DSGSADFRRH	FVNLSPTIT	VLLLLSACFV	TSSLGGTDKE	LRLVDGENKC	60
SGRVEVKVQE	EWGTVCNNGW	SMEAVSVICN	QLGCPTAIKA	PGWANSSAGS	GRIWMDHVSC	120
RGNESALWDC	KHDGWGKHSN	CTHQQDAGVT	CSDGSNLEMR	LTRGGNMCSG	RIEIKFQGRW	180
GTVCDDNFNI	DHASVICRQL	ECGSVVSFSG	SSNFGEGSGP	IWFDDLICNG	NESALWNCKH	240
QGWGKHNCNH	AEDAGVICSK	GADLSLRLVD	GVTECSGRLE	VRFQGEWGTI	CDDGWDSDYA	300
AVACKQLGCP	TAVTAIGRVN	ASKGFGHIWL	DSVSCQGHEP	AVWQCKHHEW	GKHYCNHNE	360
AGVTCSDGSD	LELRLRGGS	RCAGTVEVEI	QRLLGKVCDR	GWGLKEADV	CRQLGCGSAL	420
KTSYQVYSKI	QATNTWLFLS	SCNGNETSLW	DCKNWQWGL	TCDHYEAAKI	TCSAHREPR	480
VGGDIPCSGR	VEVKHGDWGW	SICSDSFSLE	AASVLCRELQ	CGTVVSILGG	AHFGEGNGQI	540
WAEFQCEGH	ESHLSLCPVA	PRPEGTCSHS	RDVGVCVSR	TEIRLVNGKT	PCEGRVELKT	600
LGAWGSCLNS	HWDIEDAHVL	CQQLKCGVAL	STPGGARFGK	GNGQIWRHMF	HCTGTEQHMG	660
DCPVTALGAS	LCPSEQVASV	ICSGNQSQTL	SSCNSSSLGP	TRPTIPEESA	VACIESGQLR	720
LVNGGGRCAG	RVEIYHEGSW	GTICDDSWDL	SDAHVVCRL	GCGEAINATG	SAHFGEGTGP	780
IWLDEMKGND	KESRIWQCHS	HGWGQQNCRH	KEDAGVICSE	FMSLRLTSEA	SREACAGRL	840
VFYNGAWGTV	GKSSMSETTV	GVVCRQLGCA	DKGKINPASL	DKAMSIPMWV	DNVQCPKGP	900
TLWQCPSSPW	EKRLASPSEE	TWITCDNKIR	LQEGPTSCSG	RVEIWHGGSW	GTVCDDSWDL	960
DDAQVVCQQL	GCGPALKAFK	EAQFGQGTGP	IWLNEVKCKG	NESSLWDCPA	RRWGHSECGH	1020
KEDAAVNCTD	ISVQKTPQKA	TTGRSSRQSS	FIAVGILGVV	LLAIFVALFF	LTKRRRQRQR	1080
LAVSSRGENL	VHQIQYREMN	SCLNADDLDL	MNSSENSHES	ADFSAAELIS	VSKFLPISGM	1140
EKEAILSHT	KENGNL					1156

<210> 7

<211> 4950

<212> ADN

5 <213> homo sapiens

<300>

<308> GenBank/Z22970

<309> 2005-04-18

<313> (1)..(4950)

10 <400> 7

gaattcttag	ttgttttctt	tagaagaaca	tttctaggga	ataatacaag	aagatttagg	60
aatcattgaa	gttataaatc	tttggaatga	gcaaaactcag	aattggtgcta	cttgaagact	120
ctggatctgc	tgacttcaga	agacattttg	tcaacctgag	tcccttcacc	attactgtgg	180
tcttacttct	cagtgctgtg	tttgtcacca	gttctcttgg	aggaacagac	aaggagctga	240
ggctagtggg	tggtgaaaac	aagtgtagcg	ggagagtggg	agtgaagtc	caggaggagt	300
ggggaacggg	tgtaataaat	ggctggagca	tggaagcggg	ctctgtgatt	tgtaaccagc	360
tgggatgtcc	aactgctatc	aaagcccctg	gatgggctaa	ttccagtgcg	ggttctggac	420
gcatttggat	ggatcatgtt	tcttgctctg	ggaatgagtc	agctctttgg	gattgcaaac	480
atgatggatg	gggaagcat	agtaactgta	ctcaccaaca	agatgctgga	gtgacctgct	540
cagatggatc	caatttggaa	atgaggctga	cgcgtggagg	gaatatgtgt	tctggaagaa	600
tagagatcaa	attccaagga	cgggtgggga	cagtgtgtga	tgataacttc	aacatagatc	660
atgcatctgt	cattttaga	caacttgaat	gtggaagtgc	tgtagctttc	tctggttcat	720
ctaattttgg	agaaggctct	ggaccaatct	ggtttgatga	tcttatatgc	aacggaaatg	780
agtcagctct	ctggaactgc	aaacatcaag	gatgggggaa	gcataactgt	gatcatgctg	840
aggatgctgg	agtgatttgc	tcaaagggag	cagatctgag	cctgagactg	gtagatggag	900
tactgaatg	ttcagggaag	ttagaagtga	gattccaagg	agaatggggg	acaatatgtg	960
atgacggctg	ggacagttac	gatgctgctg	tggcatgcaa	gcaactggga	tgtccaactg	1020

ccgtcacagc	cattggtcga	gttaacgcca	gtaagggatt	tggacacatc	tggcttgaca	1080
gcgtttcttg	ccagggacat	gaacctgctg	tctggcaatg	taaacaccat	gaatggggaa	1140
agcattattg	caatcacaa	gaagatgctg	gcgtgacatg	ttctgatgga	tcagatctgg	1200
agctaagact	tagaggtagg	ggcagccgct	gtgctgggac	agttgagggtg	gagattcaga	1260
gactgttagg	gaagggtgtg	gacagaggct	ggggactgaa	agaagctgat	gtggtttgca	1320
ggcagctggg	atgtggatct	gcactcaaaa	catcttatca	agtgtactcc	aaaatccagg	1380
caacaaacac	atggctgttt	ctaagtagct	gtaacggaaa	tgaacttct	ctttgggact	1440
gcaagaactg	gcaatggggt	ggacttacct	gtgatcacta	tgaagaagcc	aaaattacct	1500
gctcagccca	cagggaaccc	agactgggtg	gaggggacat	tccctgttct	ggacgtgttg	1560
aagtgaagca	tggtagacacg	tggggctcca	tctgtgattc	ggacttctct	ctggaagctg	1620
ccagcgttct	atgcagggaa	ttacagtgtg	gcacagttgt	ctctatcctg	gggggagctc	1680
actttggaga	gggaaatgga	cagatctggg	ctgaagaatt	ccagtgtgag	ggacatgagt	1740
cccattcttt	actctgccca	gtagcacccc	gcccagaagg	aactttagc	caagcaggg	1800
atgttggagt	agtctgtctc	agatacacag	aaattcgctt	ggtgaatggc	aagaccccg	1860
gtgagggcag	agtggagctc	aaaacgcttg	gtgctggggg	atccctctgt	aactctcact	1920
gggacataga	agatgcccat	gttctttgct	agcagcttaa	atgtggagtt	gccctttcta	1980
ccccaggagg	agcagctttt	ggaaaaggaa	atggtcagat	ctggaggcat	atgtttcact	2040
gcactggggc	tgagcagcac	atgggagatt	gtcctgtaac	tgctctagg	gcttcattat	2100
gtccttcaga	gcaagtggcc	tctgtaatct	gctcagga	ccagtcccaa	acactgtcct	2160
cgtgcaattc	atcgtctttg	ggcccaacaa	ggcctaccat	tccagaagaa	agtgtctgtg	2220
cctgcataga	gagtggtcaa	cttcgcctgg	taaatggagg	aggtcgctgt	gctgggagag	2280
tagagatcta	tcatgagggc	tcctggggca	ccatctgtga	tgacagctgg	gacctgagt	2340
atgccacagt	ggtttgcaga	cagctgggct	gtggagaggc	cattaatgcc	actggttctg	2400
ctcatttttg	ggaaggaa	gggcccatct	ggctggatga	gatgaaatgc	aatggaaaag	2460
aatcccgcat	ttggcagctg	cattcacacg	gctgggggca	gcaaaattgc	aggcacaagg	2520
aggatgctgg	agttatctgc	tcagaattca	tgtctctgag	actgaccagt	gaagccagca	2580
gagaggcctg	tgagggcg	ctggaagttt	tttacaatgg	agcttggggc	actgttggca	2640
agagttagcat	gtctgaaacc	actgtgggtg	tgggtgtcag	gcagctgggc	tgtgcagaca	2700
aaggggaaat	caaccctgca	tcttttagaca	aggccatgtc	cattcccatg	tgggtggaca	2760
atgttcagt	tccaaaagga	cctgacacgc	tgtggcagtg	cccatcatct	ccatgggaga	2820
agagactggc	cagccccctg	gaggagacct	ggatcacatg	tgacaacaag	ataagacttc	2880
agggaaggacc	cacttctctg	tctggacgtg	tggagatctg	gcatggagg	tcctggggga	2940
cagtgtgtga	tgactcttgg	gacttggacg	atgctcagg	ggtgtgtcaa	caacttggct	3000
gtggtccctg	tttgaagca	ttcaaagaag	cagagtttgg	tcaggggact	ggaccgatat	3060
ggctcaatga	agtgaagtgc	aaagggaatg	agcttctctt	gtgggattgt	cctgccagac	3120
gctggggcca	tagtgagtg	gggcacaagg	aagacgctgc	agtgaattgc	acagatat	3180
cagtgcagaa	aacccccaca	aaagccacaa	caggctcgctc	atcccgtcag	tcactcttta	3240
ttgcagtcgg	gaccccttgg	gttgttctgt	tggccatttt	cgctgcatta	ttcttcttga	3300
ctaaaaagcg	aagacagaga	cagcggcttg	cagtttctc	aagaggagag	aacttagtcc	3360
accaaattca	ataccgggag	atgaattctt	gcctgaatgc	agatgatctg	gacctaatga	3420
attcctcagg	tctgtgggtt	cttggagggt	ctattgccca	ggggttcaga	tcagtggctg	3480
cagttgaggc	acagacattc	tactttgata	aacagttaaa	aaagtctaaa	aatgtaatag	3540
gaagcttaga	tgcataata	ggacaagaat	gactgaaat	tattcttgg	gaatatcaaa	3600
attgcaatca	tagggaggcc	tttagcttaa	gaggcctgtg	attattcctg	atagagggtat	3660
ggaaagaacc	atgcagagga	atattatgac	ttggacctca	ttttattaaa	acagaaatta	3720
atcttaca	agattgtcat	aagtgcag	ttacttttt	tctttaaat	ttgttgtgta	3780
tatttaagg	atacaacatg	attttatggg	atgtatatag	atagtaaaaa	gcttactaaa	3840
gcaaaagcaa	tgaacacacc	catcatctga	catagttacc	cttttttgg	ttgttcttgt	3900
ggcaagagca	gctaaaacct	actcacttag	catgaatcct	acatacagca	caatgttatt	3960
acctataatc	ctcatgttgt	acattagacc	tctagactgg	ttcattctac	gtatctgcta	4020
ctttgtatcc	tctgacctac	atacgtcttt	cacagtttct	tccattccca	tttctgtca	4080
tttttttct	ctagcttgat	atattattata	tttttcccta	aaagtctaaa	accttaacct	4140
ttcaatatct	ttattgcatg	agaagccata	caaaccaca	gaactagcct	tatttctcat	4200
cacatcatgc	tgttttatcc	ttgaacttct	athtagcacc	agtgactaa	ttctgcatct	4260

```

gggcaggatg actttactgg gttggaagaa atatcccaaa acccattgtc tttactccat 4320
gaaggggtccc tgaccttctg agaggggcct gcctcacttc ttccatccaa agaattatgc 4380
atctgctact gtgtcagggg acatatttaa ggaacatgta ctgttactgt gtcaggaaac 4440
atatttaaga aataggaagag actttctctg ccccttaaat cacacatgct tttcttccta 4500
gttatgggtg gtgttttttag ttgtctaaag agcctcacag ttacgtgaga agaggtctgg 4560
tttattttccc agtaattatt ttcttccttt cagaaaattc ccatgagtca gctgatttca 4620
gtgctgctga actaatttct gtgtctaaat ttcttcctat ttctggaatg gaaaaggagg 4680
ccatttctgag ccacactgaa aaggaaaaatg ggaatttata acccagtgag ttcagccttt 4740
aagatacctt gatgaagacc tggactattg aatggagcag aaattcacct ctctcactga 4800
ctattacagt tgcattttta tggagttctt cttctcctag gattcctaag actgctgctg 4860
aatttataaa aattaagttt gtgaatgtga ctacttagtg gtgtatatga gactttcaag 4920
ggaattaaat aaataataa gaatgttaa 4950

```

<210> 8

<211> 1156

<212> PRT

5 <213> HOMO SAPIENS

<300>

<308> GenPept/CAA80543

<309> 2005-04-18

<313> (1)..(1156)

10 <400> 8

```

MVLLLEDSGSA DFRRHVFNLS PFTITVLLLL SACFVTSSLG GTDKELRLVD GENKCSGRVE 60
VKVQEEWGTV CNNGWSMEAV SVICNQLGCP TAIKAPGWAN SSAGSGRIWM DHVSCRGNES 120
ALWDCKHDGW GKHSNCTHQQ DAGVTCSDGS NLEMRLTRGG NMCSGRIEIK FQGRWGTVCD 180
DNFNIDHASV ICRQLECGSA VSFSGSSNFG EGS GPIWFDD LICNGNESAL WNCKHQGWGK 240
HNCDHAEDAG VICSKGADLS LRLVDGVTEC SGRLEVRFGQ EWGTICDDGW DSYDAAVACK 300
QLGCPTAVTA IGRVNASKGF GHIWLDSVSC QGHEPAVWQC KHHEWGKHYC NHNEDAGVTC 360
SDGSDLELRL RGGSRCAGT VEVEIQRLG KVC DRGWGLK EADVVCRLG CGSALKTSYQ 420
VYSKIQTANT WLFLSSCNGN ETSLWDCKNW QWGLTCDHY EEAKITCSAH REPRLVGGDI 480
PCSGRVEVKH GDTWGSICDS DFSLEAASVL CRELQCGTVV SILGGAHFGE GNGQIWAEFF 540
QCEGHESHLS LCPVAPRPEG TCSHSRDVG VCSRYTEIRL VNGKTPCEGR VELKTLGAWG 600
SLCNSHWDIE DAHVLCQQLK CGVALSTPGG ARFGKGNGQI WRHMFHCTGT EQHMGDCPVT 660
ALGASLCPSE QVASVICSGN QSQTLSSCNS SSLGPTRPTI PEESAVACIE SGQLRLVNGG 720
GRCAGRVEIY HEGSWGITCD DSWDLSDAH VCRQLGCGEA INATGSAHFG EGTGPIWLDE 780
MKCNGKESRI WQCHSHGWGQ QNCRHKEDAG VICSEFMSLR LTSEASREAC AGRLEVFYNG 840
AWGTVGKSSM SETTVGVVCR QLGCADKGI NPASLDKAMS IPMWVDNVQC PKGPDTLWQC 900
PSSPWEKRLA SPSEETWITC DNKIRLQEGP TSCSGRVEIW HGGSWGTVCD DSWDLDDAQV 960
VCQQLGCCPA LKAFKEAEGF QGTGPIWLNE VKCKGNESSL WDCPARRWGH SECCHKEDAA 1020
VNCTDISVQK TPQKATTGRS SRQSSFIAVG ILGVVLLAIF VALFFLTKKR RQRQLAVSS 1080
RGENLVHQIQ YREMNSCLNA DDLDLMNSSG LWVLGGSIAQ GFRSVAAVEA QTFYFDKQLK 1140
KSKNVIGSLD AYNQGE 1156

```

<210> 9

<211> 5193

<212> ADN

15 <213> sus scrofa

<300>

<308> GenBank/NM_214346

<309> 2004-08-05

<313> (1)..(5193)

20 <400> 9

ES 2 567 561 T3

atggacttcc	tgctcctgct	cctcctcctg	gcttcacatctg	ctctagcagg	cctggcctcg	60
tggacgggtt	ccagccccga	gaccgtgcag	ggcatcaagg	gctcctgcct	catcatcccc	120
tgacacttcc	gcttccccgg	caacgtggag	gtgccccatg	gcatcacagc	catctggtac	180
tatgactact	caggcaagcg	cctggttagtg	agccactcca	ggaacccaaa	ggtggtggag	240
aaccacttcc	aaggccgggc	cctgctgttg	gggcagggtg	aacagaggac	gtgcagcctg	300
ctgctgaagg	acctgcagcc	ccaggactcg	ggctcctata	acttccgctt	tgagatcagc	360
gaggccaacc	gctggtcaga	tgtaaaaggc	acagttgtca	ccgtgacaga	ggtgcccagc	420
gtgcccacca	ttgccttgcc	agccaagctg	catgagggca	tggagggtga	cttcaactgc	480
tccactccct	atgtgtgccc	gacggagccg	gtcaacctac	agtggcaagg	ccaggatccc	540
acccgctccg	tcacctccca	cctccagaag	cttgagccct	cgggcaccag	ccacatggag	600
acccgtcaca	tggccctgtc	ctggcaggac	catggccgga	tcctgagctg	ccaggctctca	660
gcagccgaac	gcaggatgca	gaaggagatt	cacctccaag	tgcatgtatg	ccccagggtt	720
gtggagatcc	ttttcagcca	ctccggacgg	aacgtccttc	cagggtgatct	ggtcaccctc	780
agctgccacg	tgaatagcag	caaccctcag	gtcagttccg	tgcatgtggg	caaggatggg	840
acgaagctca	aagaccagaa	acgtgtactg	cagttgcgcc	gggcagcctg	ggctgatgct	900
ggcgctctaca	cctgccaaag	cgggaatgcc	gtgggctctt	cagtctcacc	cccggtcagc	960
ctccacgtct	tcattggtga	ggtccaggta	agccctgtgg	gctccatcct	ggagaaccag	1020
acggtgacgc	tggcctgcaa	tacacctaa	gaagcgccca	gcgagctgcg	ctacagctgg	1080
tacaagaacc	acgccctgct	ggagggtctt	cacagccgca	ccctccggct	gactcagtt	1140
accagggcgg	attcgggctt	ctacttctgc	gaggtgcaga	acgccccggg	cagagagcgc	1200
tctccccctg	ctcagctggg	ggtcagccac	ccaccctcga	ccccggacct	aactgccttc	1260
ctggagacac	aggcggggct	ggtgggcatc	ctccaatgct	ctgtggtcag	cgagccccc	1320
gctactctgg	tgttgtcaca	cgggggcctc	atcttggcct	ctacctcggg	ggagggtgac	1380
cacagcccac	gcttcagtgt	cgcctctgcc	cccaactccc	tgcgctgga	gattcaagac	1440
ctggggccaa	cagacagtgg	ggaatacatg	tgctcagcca	gcagttctct	tgggaatgcg	1500
tcctccaccc	tggacttcca	tgccaatgca	gcccgcctcc	tcacagcccc	agcagcagag	1560
gtgggtggaag	ggcaggcggt	gacactgagc	tgccaggagca	gcctgagcct	gatgcctgac	1620
acccgttttt	cctggtaacct	gaacggggcc	ctgattctcg	agggggccag	cagcagcctc	1680
ctgctccacg	cagcctccag	cacagatgcc	ggctcatacc	actgccgggc	ccagaacagc	1740
cacagcacca	gcggggcctc	ctcacctgct	gttctcaccg	tgctctacgc	cccacgccag	1800
cccgtgttca	ctgcccagct	ggaccctgat	actgcaggag	ctggggcccg	acgccaaggc	1860
ctcctcttgt	gccgtgtgga	cagcgacccc	ccagcccagc	tgcatgtgct	ccacaggggc	1920
cgtgttgtgg	cctcttctct	gtcatggggg	ggcggctgct	gcacctgagg	aggctgtttc	1980
caccgcatga	aggtcaccaa	agcaccaca	ctactgcgtg	tagagatccg	agacccgggtg	2040
ctggaggatg	agggtgtgta	cctgtgcgag	gccagcagcg	ccctgggcaa	cgctccgccc	2100
tctgcaacct	tggatgcccc	ggccactgtc	ctggctatca	caccgtcaca	cacgctgcag	2160
gaaggcattg	aagccaacct	gacttgcaac	gtgagccgtg	aagccagcgg	ccctgccaac	2220
ttctcctggt	tccgagatgg	ggcgctatgg	gccaggggcc	ctctggacac	cgtgacgctg	2280
ctacctgtgg	ccagaactga	tgctgccctc	tatgcttgcc	gcacgtctac	cagggtgtgt	2340
gctggcctct	ccaccctgtg	ggcctgaaat	gtgctctatc	cccccgatcc	tccaaagtgt	2400
tcagccctcc	tggacgtgga	ccagggccac	acggctgtgt	tcgtctgtac	tgtggacagt	2460
cgccctcttg	cccagttggc	cctgttccgt	ggggaacacc	tcctggccgc	cagctcggca	2520
ctccggctcc	cccctcgtgg	cgcctccag	gccaaagcct	cggccaactc	cttgacagta	2580
gagggtccgag	acttgagcct	tggggactct	ggcagctacc	actgtgaggc	caccaacatc	2640
cttggatcag	ccaacacttc	tcttaccttc	cagggtccgag	gagcctgggt	ccgggtgtca	2700
ccgtcgctcg	agctccagga	gggcaggcct	gtggctctga	gctgccagg	acccataggg	2760
gtcctggagg	ggacctcata	tcgttggtat	cgggatggcc	agccctccca	ggagtccact	2820
tcggccacgc	tccgttttgc	agccataact	ctgagccagg	ctggagccta	ccattgccaa	2880
gcccgaagtc	caggctcagc	caccacggac	ctggctgccc	ctgtcagcct	ccacgtgacc	2940
tacgcacctc	gccaggccac	actcaccacc	ctgatggact	caggcctcgg	gcgactgggc	3000

ES 2 567 561 T3

```

ctccttctgt gccgtgtgaa cagtgaacct cctgcccagc tccgactgct ccatgggagc 3060
cgcctctgtg cctctactct acaagggtgt gagggagctt caggcagctc tccccgccta 3120
cagggtggcca cagcccccac cacgctgcgc ctggagatcc acaacgcagt gctggaggat 3180
gaaggcgctc acacctgcga ggccaccaac accctgggtc agaccttgcc ctccgccgcc 3240
ttcgaatgcc aggcctatgag agtgagggtg tggcccaatg ccaccgtgca agaggggagc 3300
ctggtgaacc tgacctgcct tgtatggacc acgcacctgg cccagctcac ctacacgtgg 3360
taccgagacc agcagcagct cccagggtgct gccactcca tccctctgcc caatgtcact 3420
gtcacagatg ccgcctccta ccgctgtggc atattgatcc ctggccaggc actccgcctc 3480
tccagacctg tcgccttggg tgcctcttac gacccccgca gactgcgcct gaccatctc 3540
ttggagagcc gtggtgggca gctggccgtg gtgctgtgca ctgtggacag tcgcccagct 3600
gccagctga cctcagcca tgcctggccg ctctggcct cctcaaccgc agcctctgtc 3660
cccaacaccc tgcgcctgga gctgtgggag ccccggccca gtgatgaggg tctctacagc 3720
tgctcggccc gcagtcctct gggccaggcc aacacatccc tggagctgca gctagagggc 3780
gtgcaggtag cactggctcc atcgggcact gtgcccagg gggccctgt cacagtgaac 3840
tgtgaagacc ctgctgccc cccaccact ctctatgtct ggtaccacaa cagccgttgg 3900
ctgcaggagg ggtcggctgc ctccctctcg ttccagcgg ctacacgggc tcacgaggc 3960
gctatacct gccaggtcca ggatgccag ggacacgca tctccagcc cgcagcactg 4020
cacatcctct atgcccctcg ggatgctgtc ctttctctct tctgggactc aagggccagc 4080
cctatggcgg tggtagactg cactgtggac agcgagccac ctgcccagat gacctgtcc 4140
catgatggca aggtgctggc caccagccat ggggtccacg gcttagcagt ggggacaggc 4200
catgtccagg tggcccgcga cgccctgcag ctgcccgtgc agaatgtgcc ctacgtgac 4260
aaggacacct acgtctgcat ggaccgcaac tccttgggct cagtacgac catggggcag 4320
ctgcagccag aagggtgtga cgtggttagc gagccagggc tggatgtgcc tgaaggcaca 4380
gcgctgaacc tgagctgtcg cctccctagt ggccctgggc acataggcaa ctccaccttt 4440
gcttgggtcc ggaacggtcg gcagctacac acagagctcg tgcccaccct taccttacc 4500
catgtggccc gcgcccagc tggctgttac cactgccagg ctgagctccc cgcggggcct 4560
gccacctctg ctccagctct gctccgggtg ctctaccctc ccaagacgcc caccatgact 4620
gtttttgtgg agcccagggg tggcatccag ggcatctgga actgcccagt ggacagtga 4680
cccctagcca gcctgacct ccacctgggc agtcggctgg tggcctccag ccagcctcag 4740
gctgcccctg ccaagccgca catccgcgtc tcagccagtc ccaatgcctt gcgagtggac 4800
atggaggagc tgaagcccag tgaccagggg gagtatgtgt gctcggcctc caatgccctg 4860
ggctctgctc ctgctgccac ctacttcgga accagagccc tgcatcgctc gcatctgttc 4920
cagcaccttc tctggttctt ggggctgtg gcgagcctcc tcttctact gttgggcctg 4980
ggggctctgt acgctggag acggggaaat tttacaagc tgagaatggg cgaatattca 5040
gtagagatgg tatctcggaa ggaaccacg cagatgtcca ctgaccagga agaagttact 5100
ggaatcggtg atgatcggg ctctgtgaac caggcggcat ttgatcctgc ccacctctgt 5160
gaaacacac agtctgtgaa aagcacagtc tga 5193

```

<210> 10

<211> 1730

<212> PRT

5 <213> sus scrofa

<300>

<308> GenPept/NP_999511

<309> 2004-08-05

<313> (1)..(1730)

10 <400> 10

```

MDFLLLLLLL ASSALAGLAS WTVSSPETVQ GIKGSCLIP CTFGFANVE VPHGITAIWY 60
YDYSGRKLVV SHSRNPKVVE NHFQGRALLL GQVEQRTCSL LLKDLQPQDS GSYNFRFEIS 120
EGNRWSDVKG TVVTVEVPS VPTIALPAKL HEGMEVDFNC STPYVCPTEP VNLQWQQQDP 180

```

ES 2 567 561 T3

TRSVTSHLQK	LEPSGTSHME	TLHMALSWQD	HGRILSCQVS	AAERRMQKEI	HLQVQYAPKG	240
VEILFSHSGR	NVLPGDLVTL	SCQVNSSNPQ	VSSVQVVKDG	TKLKDQKRVL	QLRRAAWADA	300
GVYTCQAGNA	VGSSVSPPVS	LHVFMAEVQV	SPVGSILENQ	TVTTLACNTPK	EAPSELRYSW	360
YKNHALLEGS	HSRTLRLHSV	TRADSGFYFC	EVQNARGRER	SPPVSVVVSH	PPLTPDLTAF	420
LETQAGLVGI	LQCSVSEPP	ATLVLSHGGL	ILASTSGEGD	HSPRFSVASA	PNSLRLEIQD	480
LGPTDSGEYM	CSASSSLGNA	SSTLDFHANA	ARLLISPAAE	VVEGQAVTLS	CRSSLSLMPD	540
TRFSWYLNGA	LILEGPSSSL	LLPAASSTDA	GSYHCRAQNS	HSTSGPSSPA	VLTVLYAPRQ	600
PVFTAQLDPD	TAGAGAGRQG	LLLCRVSDSP	PAQLQLLHRG	RVVASSLSWG	GGCCTCGGCF	660
HRMKVTKAPN	LLRVEIRDPV	LEDEGVYLCE	ASSALGNASA	SATLDAQATV	LVITPSHTLQ	720
EGIEANLTCN	VSREASGPAN	FSWFRDGLW	AQGPLDVTTL	LPVARTDAAL	YACRIVTEAG	780
AGLSTPVALN	VLYPPDPKKL	SALLDVDQGH	TAVFVCTVDS	RPLAQLALFR	GEHLLAASSA	840
LRLPPRGRQK	AKASANSLLQ	EVRLSLGDS	GSYHCEATNI	LGSANTSITF	QVRGAWVRVS	900
PSPELQEGQA	VVLSCQVPIG	VLEGTSYRWY	RDGQPLQEST	SATLRFAAIT	LSQAGAYHCQ	960
AQAPGSATTD	LAAPVSLHVT	YAPRQATLTT	LMDSGLGRLG	LLLCRVNSDP	PAQLRLHGS	1020
RLVASTLQGV	EELAGSSPRL	QVATAPNTRL	LEIHNAVLED	EGVYTCEATN	TLGQTLASAA	1080
FDAQAMRVQV	WPNAVQEGQ	LVNLTCLVWT	THLAQLTYTW	YRDQQQLPGA	AHSILLPNVT	1140
VTDAASYRCG	ILIPGQALRL	SRPVALDVLY	APRRLRLTHL	LESRGGLAV	VLCTVDSRPA	1200
AQLTSLHAGR	LLASSTAASV	PNTLRLELWE	PRPSDEGLYS	CSARSPLGQA	NTSLELRLEG	1260
VQVALAPSAT	VPEGAPVTVT	CEDPAARPPT	LYVWYHNSRW	LQEGSAASLS	FPAATRAHAG	1320
AYTCQVQDAH	GTRISQPAAL	HILYAPRDAV	LSSFWDSTRS	PMVVQCTVD	SEPPEAMTSL	1380
HDGKVLATSH	VHGLAVGTG	HVQVARNALQ	LRVQNVPSRD	KDITYVCMERN	SLGSVSTMGQ	1440
LQPEGVHVVA	EPGLDVPEGT	ALNLSCLRLP	GPGHIGNSTF	AWFRNGRQLH	TESVPTLTFT	1500
HVARAQAGLY	HCQAEPLAGA	ATSAPVLLRV	LYPPKTPMT	VFVEPEGGIQ	GILDCRVDS	1560
PLASLTLLHG	SRLVASSQPQ	AAPAKPHIRV	SASPNALRVD	MEELKPSDQG	EYVCSASNAL	1620
GSASAATYFG	TRALHRLHLF	QHLLWFLGLL	ASLLFLLGL	GWYAWRRGN	FYKLRMGEYS	1680
VEMVSRKETT	QMSTDQEEVT	GIGDDAGSVN	QAADFPAHLC	ENTQSVKSTV		1730

<210> 11

<211> 6387

<212> ADN

5 <213> mus musculus

<300>

<308> GenBank/NM_011426

<309> 2000-01-25

<313> (1)..(6387)

10 <400> 11

agacaagatt	aggcctagag	taagtctatg	aaacacagag	aaaggggaca	gcataggggt	60
taagaaatga	ggtctttcaa	aatctcaggg	ggcaatgagg	agttttttga	gagagggaagg	120
actcttttaa	ggaagttgaa	ggaggattct	gtgaacttga	gaccaccctg	agctgccaag	180
ttgagaactt	tgtctacaaa	caagccaggc	agcctcagcg	tgtgctcagt	ccgacttgta	240
gctggagagg	caggagacca	atctccggtg	cttacggtgc	ttgctggatg	ccctggagta	300
agtgcagagg	tctcactgga	ctccaggttc	tgttggtttg	agtaatagga	ggcggcaggg	360
gagaagtga	gagagacatg	cactgctgat	ctgccttgag	gctgtgtcct	taaggggtgg	420
agccaagggg	cacagaagac	tctctgggac	atgccacca	gtgagagcat	ttccaatcac	480
tccctgagcc	aggaacaggg	gcttctggtt	ccctgctggt	ggctgccaca	gcagtccttc	540
ctgttggtt	gaccaacaca	gcaggtgaga	taaaccttat	agacttgggc	cctggagtgc	600
tccaggcagt	ctctgtgtgc	ctaccaccc	ggcttcccta	ggcacctgaa	tgcacctggg	660
cactgggatg	tgtgtcctgt	tctccctgct	cctgctggcc	tctgtcttct	cactaggcca	720
gaccacatgg	ggtgtctcca	gtcccaagaa	tgtgcagggc	ttgtcgggat	cctgcctgct	780
cattccctgc	atcttcagct	accctgccga	tgtcccagtg	tccaatggca	tcacagccat	840
ctgggtactat	gactactcgg	gcaagcggca	ggtggtaatc	cactcagggg	acccaagct	900
ggtggacaag	cgtttcaggg	gtcgagctga	actgatgggg	aacatggacc	acaagggtgtg	960

caacctgttg	ctcaaaagact	tgaagcctga	agactctggc	acctacaact	tccgctttga	1020
gatcagtgt	agcaaccgct	ggttagatgt	caaaggcacc	acggctactg	tgacaacgga	1080
tcccagcccc	ccactatta	ccattcctga	ggagctgctg	gaaggcatgg	agaggaactt	1140
caactgttcc	acaccctacc	tgtgacctga	ggagaagcaa	gtcagcctgc	agtggcgagg	1200
ccaggacccc	accactctg	tcacctccag	cttccagagc	ctcgagccca	ctggcgctca	1260
tcaccagacg	accctacata	tggccctatc	ctggcaggac	cacggctcga	ccctgctctg	1320
ccagtcttca	ttgggcgcac	acagtagtctg	gaaagagggt	tacctgcaag	tgccacatgc	1380
ccccaaggt	gtggagatcc	tcctcagctc	ctcagggagg	aacatccttc	ccggggatcc	1440
agtacacatc	acctgcagag	tgaacagcag	ctatcctgct	gtcagtgcg	tgcaagtggc	1500
cagggacgga	gtgaacctcg	gagtcacggg	acatgtgctt	cggctgttct	cagcagcctg	1560
gaatgattct	ggggcctaca	cctgccaaag	aacaaatgat	atgggctctc	tgggtgctac	1620
cccgtcagc	ctccatgttt	ttatggctga	agtcaaatg	aaccccgag	ggcccgtctt	1680
ggaaaatgag	acagtgactc	tgtctgttag	cacgccgaag	gaggctcccc	aggagctccg	1740
ctatagctga	tacaagaacc	acattctctc	ggaagatgcc	catgcctcaa	ccttgacact	1800
gcctgcagtc	accagggtcg	atactggctt	ctacttctgt	gaagtgcaga	atgcccaggg	1860
cagtgcagcg	tccagtcctt	tgagtgtggt	ggtcagatat	ccacccctta	ctccagacct	1920
gaccaccttc	ctggagacac	aggccggact	tgtgggcata	ttgcattgct	ccgtggtcag	1980
tgagccccctg	gtactgtgg	tgtctgcaca	cggaggcctc	acgttggcct	ccaactctgg	2040
agaaaatgac	ttcaaccccc	gattcaggat	ctcctctgcc	cccaactccc	tgccgctaga	2100
aatccgagac	ttgcagccag	cagacagcgg	agagtacaca	tgtcttagctg	tcaactccct	2160
tggaactca	acgtccagcc	tagacttcta	tgctaagtgt	gcccgactcc	tcatacaacc	2220
ttcagcagag	gttgtggaag	ggcaggcggt	gacctgagc	tgcaaggagt	gcctgagccc	2280
agctcctgac	actcgcttct	cctggtacct	gaacggagct	ctacttctgg	aaggatccag	2340
cagcagcctc	ctgcttctct	cggcttccag	cactgatgcg	ggctcatact	actgtaggac	2400
gcaggctggc	cccaaaccca	gcggccctc	cctgcctact	gtcctcactg	tgttctatcc	2460
cccaagaaag	cccacattca	ctgccaggct	ggatttggat	acctctggag	tcggggatgg	2520
acgacggggc	atcctcttgt	gccacgtaga	cagcgatccc	ccagcccagc	tacggcttct	2580
ccacaagggc	catgttgttg	ccacttctct	gccatcaagg	tgtgggagct	gttcccagcg	2640
cacaaaagtc	agcagaacct	ccaactcact	gcacgtggag	atccagaagc	ctgtattaga	2700
ggatgagggc	gtgtacctgt	gtgaggctag	caacacattg	ggcaactcct	cagccgcagc	2760
ctctttcaat	gctaaggcca	ctgtacttgt	catcacaccg	tcaaatacac	tgctgtaagg	2820
cacagaggcc	aacctaaact	gcaacgtgaa	ccaggagggt	gctgtcagcc	ctgccaactt	2880
ctcctggttc	cggaatggag	tgtgtgggac	ccagggatca	ctggagactg	tgaggctgca	2940
gcctgtggcc	agaaactgat	ctgctgtcta	tgcttccgcg	ctcctcaccg	aggatggggc	3000
tcagctctcg	gctcctgttg	tcctaagtgt	gctgtatgcc	ccagaccctc	caaagctgtc	3060
agccctccta	gatgtgggtc	agggccacat	ggcgtgttcc	atctgcaactg	tggaacagcta	3120
tcccttggtc	cacctgtctc	tgttccgtgg	ggaccatctc	ctggccacca	acttggaaacc	3180
ccagcgtccc	tcccatggca	ggatccaggc	caaggccaca	gccaaactcc	tgcaagctaga	3240
ggtcagagaa	ctagggtctt	tggactcttg	aaactaccac	tgtgaagcca	ccatatttct	3300
tgggtcagcc	aacagttcac	tcttcttcca	ggtcagagga	gcctgggtcc	aggtttcacc	3360
atcacctgag	ctccgggagg	gccaggctgt	ggtcctgagc	tgccagggtg	ccacaggagt	3420
ctctgagggg	acctcataca	gctggatatca	ggatggccgc	cccctccagg	agtcaacctc	3480
atctacactc	cgcatcgag	ccataagtct	gaggcaagct	ggtgcctacc	attgccaagc	3540
tcaggcccca	gacacagcta	ttgccagcct	ggctgccctc	gtcagcctcc	atgtgtccta	3600
tacccacagt	catgttacac	tcagtgcctt	gctgagcag	gacctgagc	gactaggcca	3660
cctgggtgtc	agtgtacaaa	gtgaccctcc	agcgcagctg	caactgttcc	accggaatcg	3720
cctcgtggcc	tctaccttac	aaggcgcgga	cgaattggca	ggcagtaatc	cccggctgca	3780
tgtgactgtg	ctccccaatg	agctgcgcct	gcagatccac	tttccagagc	tggaaggatga	3840
cgggacctat	acatgcgaag	ccagcaacac	actgggccag	gcctcggctg	cagctgactt	3900
cgatgccag	gctgtgcgag	tgactgtgtg	gcccattgcc	actgtgcaag	aggggcagca	3960
ggtgaacctg	acctgcttgg	tgtggagcac	ccaccaggac	tcactcagct	acacatggta	4020
caagggcggg	caacaactcc	ttgttgccag	atccatcacc	ctgccagctg	ttaagggtttt	4080
ggatgctacc	tcctaccgct	gtggtgtggg	gctccccggc	cacgcacccc	atctctccag	4140
accctgtacc	ctggtgtgct	tcctatgctc	ccgaacacct	cggctgacct	acctcctaga	4200

ES 2 567 561 T3

```

gaccacagggc aggcagctgg ccctgggtact gtgtacgggt gatagtcgtc cacctgccca 4260
gctaactctc agccatgggtg accagcttgt agcctcctca actgaagcct ctgtcccca 4320
caccctgcgc cttagagcttc aggatccaag gcctagtaat gaggggctct atagctgctc 4380
tgccacagc ccattgggca aggccaacac gtccctggaa cttctgctgg aagggtgccg 4440
agtgaatag aatccctctg gtatgtgtacc ctagggagag cctgtcacag tgacctgcga 4500
ggaccctgct gccctctcat ccgccctcta tgcctgggtt cacaatggcc attggcttca 4560
ggaggggaccg gcttctctac tccagttcct ggtgactaca cgggctcacg ctggtgctta 4620
cttttgccag gtgcatgata cacaaggcac acggagctcc agacctgcc aacctgcaaat 4680
tctctatgcc ccccggtatg ctgtcctgtc ttcctttcga gactcaagga ccaggctcat 4740
ggtcgtgatt cagtgcaccg tggacagtga gccacctgct gagatgggtc tatccacaa 4800
tggcaagggtg ctatgctcca gccacgagcg tcacagctca gacatcagga taggccacat 4860
ccaggtagcc cgaatagctc ttcgactaca agtgcaagat gtgactctgg gtgatggcaa 4920
cacctatggt tgcacagccc agaatacact gggctccatc agtaccaccc agaggcttct 4980
gaggggagacc gatatactg tgacagctga gccaggcttg gatgtgccag agggcacagc 5040
tctgaactta agctgcctcc tccctgggtg ctctggggcc acgggcaact cttccttcac 5100
gtggttctgg aatcgccacc gactacattc agctcctgtg cccacactct ccttcacccc 5160
tgtggtccgg gctcaggctg ggtgtacca ctgcagggtc gatctcccca cggggccac 5220
tacctctgct ccagttatgc tccgtgtcct ctatccccc aagacgccc ctctcatagt 5280
gtttgtggag cctcagggtg gccaccaggg catcctcgac tgtcagtggt acagttagcc 5340
cctggccatc ctactcttc accggggcag tcaactagta gcctccaacc aacttcacga 5400
tgctccacc aagcccaca tccgagtcac tgctcctccc aatgccttga gagtggacat 5460
agaggagctc ggccctagca atcaagggga gtatgtgtgc actgcctcca aactctggg 5520
ctctgcctca gcctctgcct actttgggac cagagctctg caccactgc agctgttcca 5580
gaggctgctc tgggtcctgg gatttctggc aggccttcctg tgcctgctgc tgggtctggt 5640
ggcctatcac acctggagaa agaagagttc taccaagctg aatgaggatg agaattcagc 5700
agagatggcc actaagaaaa atactatcca ggaggaagtg gttgctgtc tctgacaact 5760
cagggtgctg gaacaagatc ctgcctacct ctgtataagc agtacagaga catctggctt 5820
tcctgacctg cccgacttgc cttccaagcc tcttgatcct aagaaaaatg gacgaaggga 5880
ggtttggggg tggaggtcaa cctgccgcct ccagggtctc gagacggact cagccatggt 5940
gccacgtct ctctgtgtgg ttttctctg tatcccttg cctttctctt aaagctcac 6000
cttggacttt cttggtgggt tagagcaaca tccagtttct cacagacttt ctaagacggt 6060
ctgtaccagc caggatatca gtcagggtgc tctaacagag actcaatata gtgaccacag 6120
catgacaggg tcttagtttt ccctcctggc ctggttatgt tgttgggtg tcagaatcct 6180
tcttgcttga ttttctccat tcccgaagtg ttgccttga ttatgaagct caggttaactg 6240
cagtgcccat ggaccctaca gggagaagga agagtgaagg gaagacatac ccatcccat 6300
ggtccatgga ctgtgtgtgc aattgcaccc caccacactt ctcattccgt agaaactggt 6360
cacataaaca taccatgctg aaagggga

```

<210> 12

<211> 1695

<212> PRT

5 <213> mus musculus

<300>

<308> GenPept

<309> 2000-01-25

<313> (1)..(1695)

10 <400> 12

```

MCVLFSLLLL ASVFSLGQTT WGVSSPKNVQ GLSGSCLLIP CIFSYPADVP VSNGITAIWY 60
YDYSGRQVY IHSQDPKLV D KFRGRRAELM GNMDHKVCNL LLKDLKPEDS GTYNFRFEIS 120
DSNRWLDVKG TTVTVTDPDS PPTITPEEL REGMERNFNC STPYLCLQEK QVSLQWRGQD 180
PTHSVTSFQ SLEPTGVYHQ TTLHMAISWQ DHGRTLCCQF SLGAHSSRKE VYLQVPHAPK 240
GVEILLSSSG RNILGDPVT LTCRVNSSYP AVSAVQWARD GVNLGVTGHV LRLFSAWWD 300

```

SGAYTCQATN	DMGSLVSSPL	SLHVFMAEVK	MNPAGPVLEN	ETVTLLCSTP	KEAPQELRYS	360
WYKNHILLED	AHASTLHLP	VTRADTGIFY	CEVQNAQGSE	RSSPLSVVVR	YPPLTPDLTT	420
FLETQAGLVG	ILHCSVVSEP	LATVVLSHGG	LTLASNSGEN	DFNPRFRISS	APNSLRLEIR	480
DLQPADSGEY	TCLAVNSLGN	STSSLDIFYAN	VARLLINPSA	EVVEGQAVTL	SCRSGLSPAP	540
DTRFSWYLNQ	ALLLEGSSSS	LLLPAASTSD	AGSYYCRTQA	GPNTSGPSLP	TVLTVFYPPR	600
KPTFTARLDL	DTSGVGDGRR	GILLCHVDSD	PPAQLRLLHK	GHVVATSLPS	RCGSCSQRTK	660
VSRTSNSLHV	EIQKPVLEDE	GVYLCEASNT	LGNSAAAASF	NAKATVLVIT	PSNTLREGTE	720
ANLTCNVNQE	VAVSPANFSW	FRNGVLWTQG	SLETVRLQPV	ARTDAAVYAC	RLLTEDGAQL	780
SAPVVLVSVL	APDPPKLSAL	LDVGQGHMAV	FICTVDSYPL	AHLSLFRGDH	LLATNLEPQR	840
PSHGRIQAKA	TANSLQLEVR	ELGLVDSGNY	HCEATNILGS	ANSSLFFQVR	GAWVQVSPSP	900
ELREGQAVVL	SCQVPTGVSE	GTSYSWYQDG	RPLQUESTSST	LRIAAISLRQ	AGAYHCQAQA	960
PDTAIASLAA	PVSLHVSYP	RHVTLSALLS	TDPERLGHLV	CSVQSDPPAQ	LQLFHRNRLV	1020
ASTLQGADEL	AGSNPRLHVT	VLPNELRLQI	HFPELEDDGT	YTCEASNTLG	QASAAADFDA	1080
QAVRVTVWPN	ATVQEGQQVN	LTCLVWSTHQ	DSLSTYWKYG	GQQLLGARSI	TLPSVKVLDA	1140
TSYRCGVGLP	GHAPHLSRPV	TLDVLHAPRN	LRLTYLLETQ	GRQLALVLCT	VDSRPPAQLT	1200
LSHGDQLVAS	STEASVPNTL	RLELQDPRPS	NEGLYSCSAH	SPLGKANTSL	ELLLEGVRVK	1260
MNPSGSGVPEG	EPVTVTCEDP	AALSSALYAW	FHNGHWLQEG	PASSLQFLVT	TRAHAGAYFC	1320
QVHDTQGTRS	SRPASLQILY	APRDAVLSSF	RDSRTRLMVV	IQCTVDSEPP	AEMVLSHNGK	1380
VLAASHERHS	SASGIGHIQV	ARNALRLQVQ	DVTLDGNTY	VCTAQNTLGS	ISTTQRLITE	1440
TDIRVTAEPG	LDVPEGTALN	LSCLLPGGSG	PTGNSSFTWF	WNRHRLHSAP	VPTLSFTPVV	1500
RAQAGLYHCR	ADLPTGATTS	APVMLRVLYP	PKTPTLIVFV	EPQGGHQGIL	DCRVDSEPLA	1560
ILTLHRGSQL	VASNQLHDAP	TKPHIRVTAP	PNALRVDIEE	LGPSNQGEYV	CTASNTLGSA	1620
SASAYFGTRA	LHQLQLFQRL	LWVLGFLAGF	LCLLLGLVAY	HTWRKKSSTK	LNEDENSAEM	1680
ATKKNITQEE	VVAAL					1695

<210> 13

<211> 6736

<212> ADN

5 <213> homo sapiens

<300>

<308> GenBank/NM_023068

<309> 2001-02-13

<313> (1)..(6736)

10 <400> 13

atgggcttct	tgcccaagct	tctcctcctg	gcctcattct	tcccagcagg	ccaggcctca	60
tggggcgctt	ccagtcccca	ggacgtgcag	gggtgtgaagg	ggctctgcct	gcttatcccc	120
tgcattctca	gcttcctgc	cgacgtggag	gtgcccgcag	gcatcacggc	catctggtac	180
tacgactact	cgggccagcg	gcaggtggtg	agccactcgg	cggaccccaa	gctggtggag	240
gcccgccttc	gcggccgcac	cgagttcatg	gggaaccccg	agcacagggt	gtgcaacctg	300
ctgctgaagg	acctgcagcc	cgaggactct	ggttcctaca	acttccgctt	cgagatcagt	360
gaggtcaacc	gctggtcaga	tgtgaaaggc	accttggtca	cagtaacaga	ggagcccagg	420
gtgcccacca	ttgcctcccc	gggtggagctt	ctcgagggcg	cagaggtgga	cttcaactgc	480
tccactccct	acgtatgcct	gcaggagcag	gtcagactgc	agtggcaagg	ccaggaccct	540
gctcgctctg	tcaccttcaa	cagccagaag	tttgagccca	ccggcgctcg	ccacctggag	600
accctccaca	tggccatgtc	ctggcaggac	cacggccgga	tcctgcgctg	ccagctctcc	660
gtggccaatc	acagggtcca	gagcgagatt	cacctccaag	tgaagtatgc	ccccaagggt	720
gtgaagatcc	tcctcagccc	ctcggggagg	aacatccttc	cagggtgagct	ggtcacactc	780
acctgccagg	tgaacagcag	ctaccctgca	gtcagttcca	ttaagtggct	caaggatggg	840
gtacgcctcc	aaaccaagac	tgggtgtgctg	cacctgcccc	aggcagcctg	gagcgatgct	900
ggcgctctca	ctctgcaagc	tgagaacggc	gtgggctctt	tgggtctacc	ccccatcagc	960
ctccacatct	tcatgtgtga	gggtccagggtg	agcccagcag	gtcccatcct	ggagaaccag	1020
acagtgcac	tagtctgcaa	cacacccaat	gaggcaccca	gtgatctccg	ctacagctgg	1080

tacaagaacc	atgtcctgct	ggaggatgcc	cactcccata	ccctccggct	gcacttggcc	1140
actagggctg	atactggctt	ctacttctgt	gagggtgcaga	acgtccatgg	cagcgagcgc	1200
tcggggccctg	tcagcgtggg	agtcaaccac	ccgcctctca	ctcagtcctt	gacagccttc	1260
ctggagagcc	aggcgggact	tgtgggcata	cttcaactgct	ctgtgggtcag	tgagcccctg	1320
gccacactgg	tgctgtcaca	tgggggtcat	atcctggcct	ccacctccgg	ggacagtgat	1380
cacagcccac	gcttcagtgg	tacctctggg	cccaactccc	tgcgccctgga	gatccgagac	1440
ctggaggaaa	ctgacagtgg	ggagtacaag	tgtccagcca	ccaactccct	tggaaatgca	1500
acctccaccc	tggaactcca	tgccaatgcc	gcccgtctcc	tcatcagccc	ggcagccgag	1560
gtgggtggaag	gacaggcagt	gacactgagc	tgcagaagcg	gcctaagccc	cacacctgat	1620
gcccgccttct	cctgggtacct	gaatggagcc	ctgcttcacg	aggggtcccg	cagcagcctc	1680
ctgtcccccg	cggcctccag	cactgacgcc	ggctcatacc	actgccgggc	ccgggacggc	1740
cacagtgccca	gtggcccctc	ttcgccagct	gttctcactg	tgctctaccc	ccctcgacaa	1800
ccaacattca	ccaccaggct	ggaccttgat	gccgctgggg	ccggggctgg	acggcgaggc	1860
ctcctttttgt	gccgtgtgga	cagcgacccc	ccgcgcaggc	tgcaagtgtg	ccacaaggac	1920
cgtgtgtgtgg	ccacttccct	gccatcaggg	gggtggctgca	gcacctgtgg	gggctgttcc	1980
ccacgcacga	aggtcaccaa	agcccccaac	ttgtctgcgtg	tggagattca	caaccctttg	2040
ctggaagagg	agggcttgta	cctctgtgag	gccagcaatg	ccctgggcaa	cgctccacc	2100
tcagccacct	tcaatggcca	ggccactgtc	ctggccattg	caccatcaca	cacacttcag	2160
gagggcacag	aagccaactt	gacttgcaac	gtgagccggg	aagctgctgg	cagccctgct	2220
aacttctcct	ggttccgaaa	tgggggtgctg	tggggcccagg	gtccccctgga	gaccgtgaca	2280
ctgtctgccg	tggccagaa	tgatgctgcc	ctttacgcct	gccgcctcct	gactgaggct	2340
gggtcccagc	tctccactcc	cgtgtcctcg	agtgtactct	atcccccgga	ccgtccaaag	2400
ctgtcagccc	tcctagacat	gggccagggc	cacatggctc	tgctcatctg	cactgtggac	2460
agccgcccc	tggccttgct	ggccttgctt	catggggagc	acctcctggc	caccagcctg	2520
gggtccccagg	tcccatccca	tgggtcggtt	caggctaag	ctgaggccaa	ctccctgaag	2580
ttagagggtcc	gagaactggg	ccttggggac	tctggcagct	accgctgtga	ggccacaaat	2640
gttcttggat	catccaacac	ctcactcttc	ttccagggtcc	gaggagcctg	ggtccagggtg	2700
tcaccatcac	ctgagctcca	agagggccag	gctgtgggtcc	tgagtggcca	ggtacacaca	2760
ggagtccag	aggggacctc	atatcggttg	tatcgggatg	gccagccctt	ccaggagtgc	2820
acctcggcca	cgctccgctt	tgcagccata	actttgacac	aagctggggc	ctatcattgc	2880
caagcccagg	ccccaggctc	agccaccacg	agcctagctg	cacccatcag	cctccacgtg	2940
tcctatgccc	cagccacagt	cacactcact	acctgatagg	acacaggccc	tggacgactg	3000
ggcctcctcc	tgtgccgtgt	ggacagtga	cctccggccc	agctgcggct	gtccacagg	3060
gatcgccttg	tggcctccac	cctacaagg	gtggggggac	ccgaaggcag	ctctcccagg	3120
ctgcatgtgg	ctgtggcccc	caacacactg	cgtctggaga	tccacggggc	tatgtctggag	3180
gatgagggtg	tctatatctg	tgaggcctcc	aacaccctgg	gccaggcctc	ggcctcagct	3240
gacttcgacg	ctcaagctgt	gaatgtgcag	gtgtggcccg	gggctaccgt	gcgggagggg	3300
cagctggtga	acctgacctg	ccttgtgtgg	accactcacc	cggcccagct	cacctacaca	3360
tgttaccagg	atgggacaga	gcgcctggat	gcccaactcca	tccccctgcc	caacgtcaca	3420
gtcagggatg	ccacctccta	ccgtgcgggt	gtggggcccc	ctggctgggc	accccgctc	3480
tccagacctc	tcaccttgga	cgtcctctac	gcgcccgcga	acctgcgcct	gacctacctc	3540
ctggagagcc	atggcgggca	gctggccctg	gtactgtgca	ctgtggacag	ccgcccgcgc	3600
gcccagctgg	ccctcagcca	cgcgggtcgc	ctcttggcct	cctcgacagc	agcctctgtc	3660
cccaacaccc	tgcgcctgga	gctgcgaggg	ccacagccca	gggatgaggg	tttctacagc	3720
tgctctgccc	gcagccctct	gggcagggcc	aacacgtccc	tggagctgcg	gctggagggg	3780
gtgcgggtga	tccttgctcc	ggaggctgcc	gtgcctgaag	gtgcccccat	cacagtga	3840
tgtgcggacc	ctgtgcccc	cgcacccaca	ctctatactt	ggtaccacaa	cggctcgttg	3900
ctgcaggagg	gtccagctgc	ctcactctca	ttcctgggtg	ccacgcgggc	tcagtgcagg	3960
gctactctt	gccaggccca	ggatgcccag	ggcaccgcga	gctcccgtcc	tgctgcccctg	4020
caagtctct	atgccccca	ggacgtgtc	ctgtcctcct	tccgggactc	caggggcaga	4080
tccatggctg	tgatacagtg	cactgtggac	agtgaaccac	ctgtgagct	ggccctatct	4140
catgatggca	aggtgctggc	cacgagcagc	gggggtccaca	gcttggcatc	agggacaggc	4200
catgtccagg	tggcccga	cgccctacgg	ctgcagggtg	aagatgtgcc	tgcagggtgat	4260
gacacctatg	tttgcacagc	ccaaaacttg	ctgggctcaa	tcagcaccat	cgggcgggtg	4320

```

caggtagaag gtcacgcgt ggtggcagag cctggcctgg acgtgcctga gggcgctgcc 4380
ctgaacctca gctgccgcct cctgggtggc cctgggcctg tgggcaactc cacttttgca 4440
tggttcttga atgaccggcg gctgcacgcg gagcctgtgc cactctcgc cttacccac 4500
gtggctcgtg ctcaagctgg gatgtaccac tgcctggctg agctcccccac tgggctgct 4560
gcctctgctc cagtcatgct ccgtgtgctc tacctccca agacgcccac catgatggtc 4620
ttcgtggagc ctgaggggtg cctccggggc atcctggatt gccgagtga cagcgagccg 4680
ctcgccagcc tgactctcca ccttggcagt cgaactgggtg cctccagtca gcccagggg 4740
gctcctgcag agccacacat ccatgtcctg gcttccccca atgcccctgag ggtggacatc 4800
gaggcgctga gggccagcga ccaaggggaa tacatctgtt ctgcctcaaa tgcctgggc 4860
tctgcctcta cctccacctt ctttggggc agagccctgc accgcctgca tcagttccag 4920
cagctgctct gggctcctgg actgctgggt ggctcctgc tcctgctgtt gggcctgggg 4980
gcctgctaca cctggagaag gaggcggtt tgaagcaga gcatgggga gaattcgggt 5040
gagatggctt ttcagaaaga gaccacgcag ctcatgtatc ctgatgcagc cacatgtgag 5100
acctcaacct tgacccctcc ccttggcctg ccagtgggtg tgcctgccct ccggaggaga 5160
aagtggccag aatctgtgat gactccagcc tatgaatgtg aatgaggcag tgttgagtcc 5220
tgcccgctc tacgaaaca gctctgtgac atctgacttt ttatgacctg gcccgaagcc 5280
tcttggcccc ccaaaaatgg gtgggtgag gtctgccag gagggtgtt accctggagg 5340
acactgaaga gactgagct gatctcgtc tctcttctc ggatctcctc cttctctcc 5400
atctctccct caaaggaagc cctgccctt cacatcctt tcctcgaag tcacctgga 5460
ctttgggttg attgcagcat cctgcacct cagaggctca ccaaggcatt ctgtattcaa 5520
cagagtatca gtcagcctgc tctaacaaga gaccaaatac agtgacttca acatgataga 5580
atcttatttt tctctccac gctagtctgg ctgttacgat ggtttatgat gttgggctc 5640
aggatcctt tatcttctt tctctatcc ctaaaatgat gcctttgatt gtgaggctca 5700
ccatggcccc gctttgtcca catgccctc agccagaaga aggaagagtg gaggtagaag 5760
cacacccatg ccatgggtg acgcaactca gaagctgcac aggacttttc cactcacttc 5820
ccattggctg gagtattgtc acatggctac tgcaagctac aaggagagact gggaaatgta 5880
gtttttattt tgagtcaga ggacatttg aattggactt ccaaggact cccaactgtg 5940
agctcatccc tgagactttt gacattgtt ggaatgccac cagcaggcca tgttttctc 6000
cagtgcctat ctactgagg ccagggtgtg cccctggcca ttctgggtgt gggcttctc 6060
gaagagggtg tactctcac actaagactg aggaataaa aaagggttg tgttttcta 6120
gggagagagc atgccagga gtggagttg ctaagcagac atcctgtgc cagatttggc 6180
ccctgaaga agagatgccc tcattccccc caccaccccc cctaccccc gggactgggt 6240
actaccttac tggcccttac aagagtgag ggagacaca gatgtgtc gcatccttat 6300
tcctgtcca gatgcctc tgttcagac tgtgtgagc cctgtcctt tcctggagac 6360
cctgtgtcgg gctgttaaag agaattgatt accaagaagg aatgacgtc cctgcgaat 6420
cagggaacca caggagagag ctcttgagt ggctagtac tccccctgca gcctggtgga 6480
gatgggtgga ggagcgaaga gccctctgct ctaggatttg ggttgaaaaa cagagagaga 6540
agtggggagt tgccacagga gctaacacgc tgggaggcag ttggggcg gtgaactttg 6600
tgtagccgag gccgcacct ccctcattcc aggtcattc attttcatgc tccattgcca 6660
gactcttgct gggagcccg ccagaatgtc ctccaataa aactccatc tatgacgcaa 6720
aaaaaaaaa aaaaaa 6736

```

<210> 14

<211> 1709

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<300>

<308> GenPept/NP_075556

<309> 2001-02-13

<313> (1)..(1709)

10 <400> 14

MGFLPKLLLL ASFFPAGQAS WGVSSPDVQ GVKGSCLLIP CIFSFPADVE VPDGITAIWY 60

YDYSQRQV	SHSADPKLVE	ARFRGRTEFM	GNPEHRVCNL	LLKDLQPEDS	GSYNFRFEIS	120
EVNRWSDVK	TLVTVTEEP	RVTIASPV	LEGTEVDFNC	STPYVCLQEQ	VRLQWQGQDP	180
ARSVTFNSQK	FEPTGVGHLE	TLHMAMSWQD	HGRILRCQLS	VANHRAQSEI	HLQVKYAPKG	240
VKILLSPSGR	NILPGELVTL	TCQVNSSYP	VSSIKWLKDG	VRLQTKTGV	HLPQAAWSDA	300
GVYTCQAENG	VGSLVSPPI	LHIFMAEVQV	SPAGPILENQ	TVTLVCNTPN	EAPSDLRYSW	360
YKNHVLLEDA	HSHTLRLHLA	TRADTGIFYC	EVQNVHGSE	SGPVSVVNH	PPLTPVLTAF	420
LETQAGLVGI	LHCSVVSEPL	ATLVLSHGGH	ILASTSGDSD	HSPRFSGTSG	PNSLRLEIRD	480
LEETDSGEYK	CSATNSLGNA	TSTLDFHANA	ARLLISPAAE	VVEGQAVTLS	CRSGLSPTPD	540
ARFSWYLNGA	LLHEGPGSSL	LLPAASSTDA	GSYHCRARDG	HSASGPSSPA	VLTVLYPPRQ	600
PTFTTRLDLD	AAGAGAGRRG	LLLRCRVSDP	PARLQLLHKD	RVVATSLPSG	GGCSTCGGCS	660
PRMKVTKAPN	LLRVEIHNPL	LEEEGLYLCE	ASNALGNAST	SATFNGQATV	LAIAPSHTLQ	720
EGTEANLTCN	VSREAAGSPA	NFSWFRNGVL	WAQGPLET	LLPVARTDAA	LYACRILTEA	780
GAQLSTPVLL	SVLYPPDRPK	LSALLDMGQG	HMALECTVD	SRPLALLALF	HGEHLLATSL	840
GPQVPSHGRF	QAKAEANSLK	LEVRELGLGD	SGSYRCEATN	VLGSSNTSLF	FQVRGAWVQV	900
SPSPELQEGQ	AVVLSCQVHT	GVPEGTSYRW	YRDGQPLQES	TSATLRF	TLTQAGAYHC	960
QAQAPGSATT	SLAAPISLHV	SYAPRHVTLT	TLMDTGPGRL	GLLRCRVSD	PPAQLRLLHG	1020
DRLVASTLQG	VGGPEGSSPR	LHVAVAPNTL	RLEIHGAMLE	DEGVYICEAS	NTLQASASA	1080
DFDAQAVNVQ	VWPGATVREG	QLVNLTCLVW	TTHPAQLTYT	WYQDGGQRLD	AHSIPLPNVT	1140
VRDATSYRCG	VGGPPGRAPRL	SRPITLDVLY	APRNLRLTYL	LESHGGQLAL	VLCTVDSRPP	1200
AQLALSHAGR	LLASSTAASV	PNTLRLELRG	PQPRDEGFYS	CSARSPLGQA	NTSLELRLEG	1260
VRVILAPEAA	VPEGAPITVT	CADPAAHAPT	LYTWYHNGRW	LQEGPAASLS	FLVATRAHAG	1320
AYSCQAQDAQ	GTRSSRPAAL	QVLYAPQDAV	LSSFRDSRAR	SMAVIQCTVD	SEPPAELALS	1380
HDGKVLATSS	GVHSLASGTG	HVQVARNALR	LQVQDVPA	DTYVCTAQN	LGSISTIGRL	1440
QVEGARVVAE	PGLDVPEGAA	LNLSRLLGG	PGPVGNSTFA	WFWNDRRLHA	EPVPTLAFTH	1500
VARAQAGMYH	CLAEPTGAA	ASAPVMLRVL	YPPKPTMMV	FVEPEGGLRG	ILDCRVDS	1560
LASLTLHLGS	RLVASSQPQG	APAEPHIHVL	ASPNALRVDI	EALRPSDQGE	YICSASNVLG	1620
SASTSTYFGV	RALHRLHQFQ	QLLWVLGLLV	GLLLLLLGLG	ACYTWRRRRV	CKQSMGENSV	1680
EMAFQKET	LIDPDAATCE	TSTCAPPLG				1709

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar la permisividad de una célula o células para el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRRP), comprendiendo dicho método determinar la expresión de CD163 y de sialoadhesina en dichas células, en el que las células que tienen expresión tanto de CD163 como de sialoadhesina se identifican como células permisivas para VSRRP.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que la expresión de CD163 y de sialoadhesina se determina a nivel del ácido nucleico o de proteína.
3. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la proteína CD163 es cualquier proteína homóloga de mamífero o artificial que es al menos 70% idéntica a CD163 porcino con SEC ID NO:2, incluyendo fragmentos biológicamente activos de la misma que contienen al menos un dominio rico en cisteína del receptor depurador (SRCR) y que retienen la actividad de la proteína de longitud completa.
4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la proteína sialoadhesina es cualquier proteína homóloga de mamífero o artificial que es al menos 70% idéntica a sialoadhesina porcina con SEC ID NO:10, incluyendo fragmentos biológicamente activos de la misma que retienen la actividad de la proteína de longitud completa al ser capaces de unirse a VSRRP.
5. Un método para generar una célula o células permisivas para VSRRP, comprendiendo dicho método tratar dichas células para producir una expresión tanto de CD163 como de sialoadhesina.
6. Un método según la reivindicación 5, en el que la proteína CD163 es cualquier proteína homóloga de mamífero o artificial que es al menos 70% idéntica a CD163 porcino con SEC ID NO:2, incluyendo fragmentos biológicamente activos de la misma que contienen al menos un dominio rico en cisteína del receptor depurador (SRCR) y que retienen la actividad de la proteína de longitud completa, y/o en el que la proteína sialoadhesina es cualquier proteína homóloga de mamífero o artificial que es al menos 70% idéntica a sialoadhesina porcina con SEC ID NO:10, incluyendo fragmentos biológicamente activos de la misma que retienen la actividad de la proteína de longitud completa al ser capaz de unirse a VSRRP.
7. Un método según las reivindicaciones 5 o 6, en el que la expresión de CD163 y/o de sialoadhesina se logra mediante la introducción de ácido nucleico exógeno.
8. Un método según la reivindicación 5 o 6, en el que la expresión de CD163 y/o de sialoadhesina se logra mediante tratamiento químico.
9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que la célula o células se seleccionan del grupo que consiste en células de insecto, células de levadura, células de riñón porcino (PK), células de riñón felino (FK), células testiculares de cerdo (ST), células de riñón de mono verde africano (células MA-104, MARC-145, VERO, y COS), células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de hámster recién nacido, células 293 humanas, fibroblastos 3T3 murinos, y plataformas de producción a base de plantas.
10. Una línea celular permisiva para VSRRP, caracterizada dicha línea celular por la expresión tanto de CD163 como de sialoadhesina, con la condición de que dicha línea celular no sea la célula hospedante natural, es decir, las subpoblaciones conocidas de macrófagos bien diferenciados, en particular los macrófagos alveolares que son las células diana primarias de VSRRP.
11. Una línea celular según la reivindicación 10, seleccionándose dicha línea celular del grupo de células continuas que consisten en células testiculares de cerdo, células de riñón de cerdo, células PK15 (CCL-33), células SK-RST (CRL-2842), cultivos de células epiteliales, queratinocitos de piel, células HEK001 (CRL-2404), células CCD1102 (CRL-2310), células Vero (CCL-81), fibroblastos de pulmón fetales humanos, células HFL1 (CCL-153), células de pulmón embrionarias humanas, células HEL299 (CCL-137), células de ovario de hámster chino (CHO), y células de riñón embrionarias humanas (HEK).
12. Una línea celular según la reivindicación 10, en la que dicha línea celular consiste en células no permisivas para VSRRP, tales como, por ejemplo, células PK-15, CHO, BHK-21 y Hek293t, que expresan tanto Sn como CD163; en una realización particular, las células CHO que expresan de forma estable sialoadhesina y CD163 depositadas el 14 de mayo de 2008 en la Belgian Coordinated Collections of Microorganisms como CHO-Sn/CD163 IC5, CHO-Sn/CD163ID9 y CHO-Sn/CD163 IF3, con los números de acceso respectivos LMBP 6677CB, LMBP 6678CB y LMBP 66779 CB.
13. Un método para preparar un cultivo de VSRRP, comprendiendo dicho método a) proporcionar una célula o línea celular identificada usando los métodos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o generada usando los métodos según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9; b) infectar dicha célula o línea celular con un virus de VSRRP; y c) cosechar dicho virus a partir del cultivo celular.

14. Un método según la reivindicación 13, que comprende además la etapa de inactivar el virus cosechado a partir del cultivo celular.

5 15. Un método para determinar la infección con VSRRP, en un sujeto, comprendiendo dicho método: a) poner en contacto una célula o línea celular, identificada usando los métodos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o generada usando los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, con una muestra tomada de dicho sujeto; b) cultivar dichas células para permitir la replicación del virus; y c) identificar la presencia de VSRRP en dicho cultivo celular usando anticuerpos específicos del virus o determinando los títulos de virus en el medio.

16. Uso de una línea celular según la reivindicación 10, 11 o 12, en un método para identificar compuestos antivíricos frente a VSRRP.

10

Fig.1

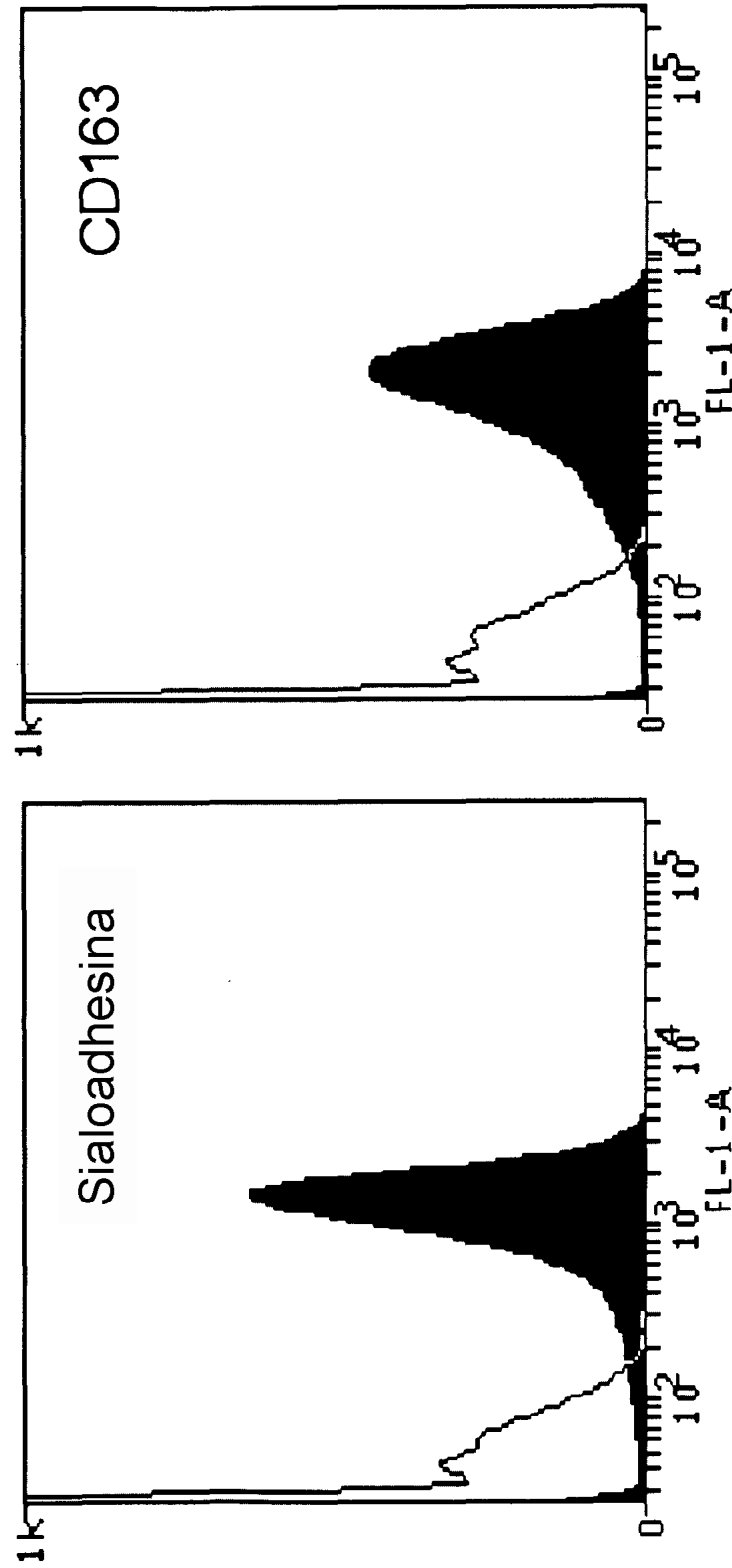
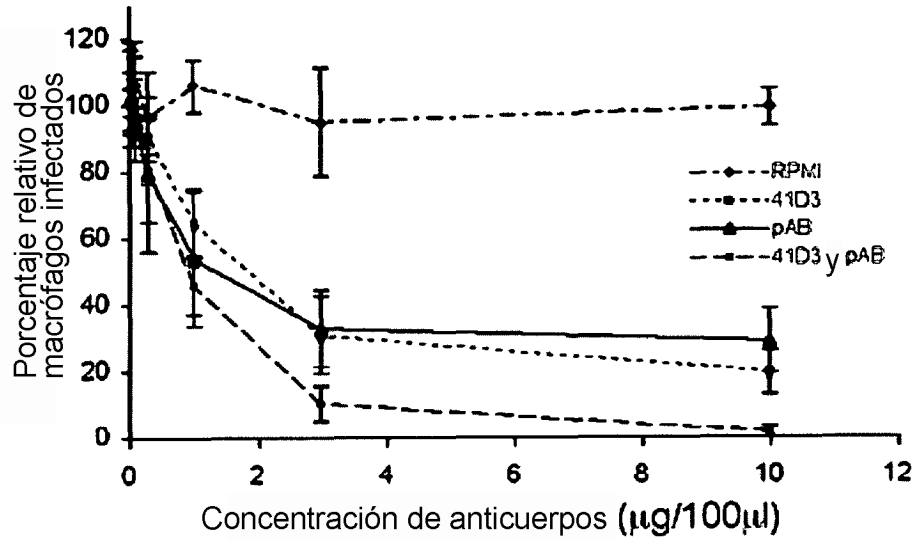


Fig.2

A



B

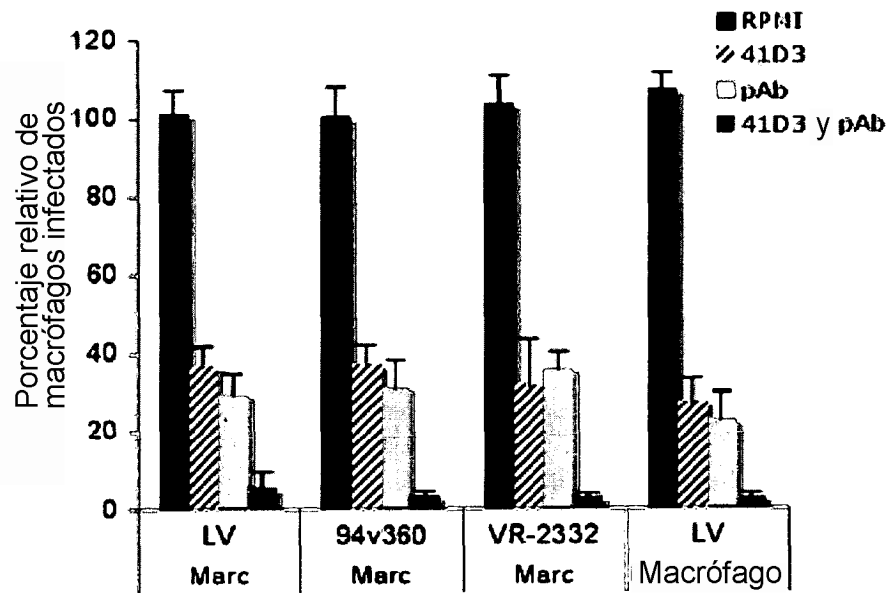


Fig.3

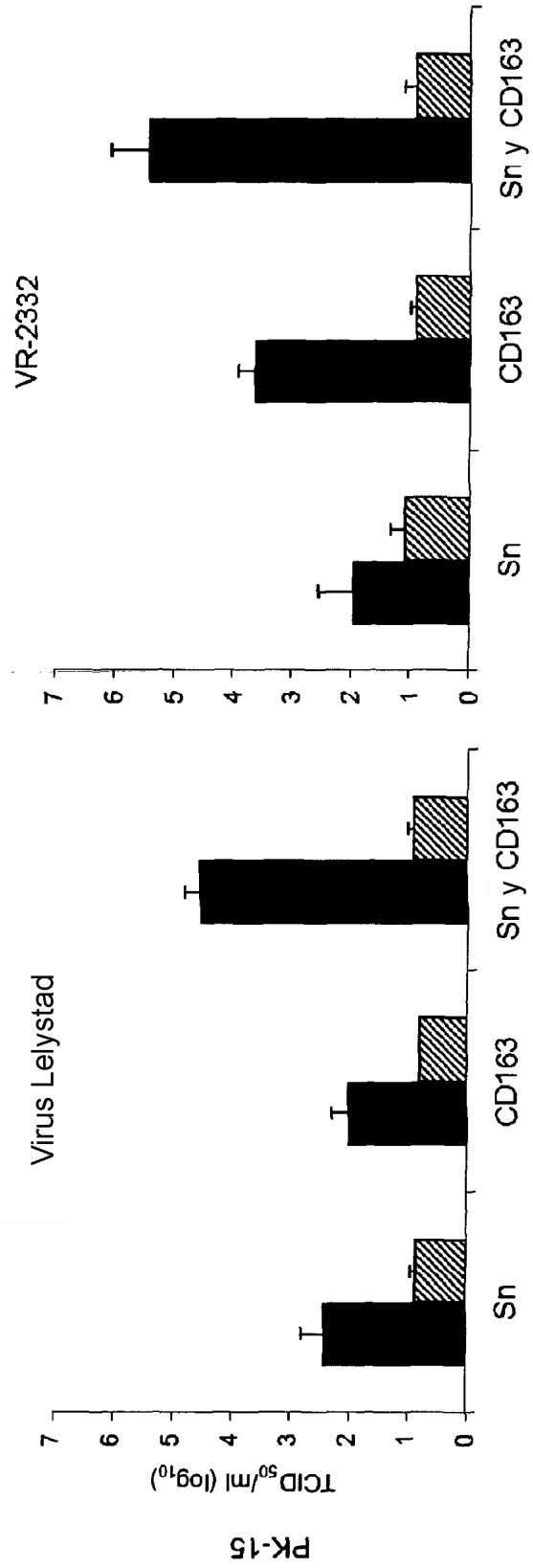


Fig.3 - continuación

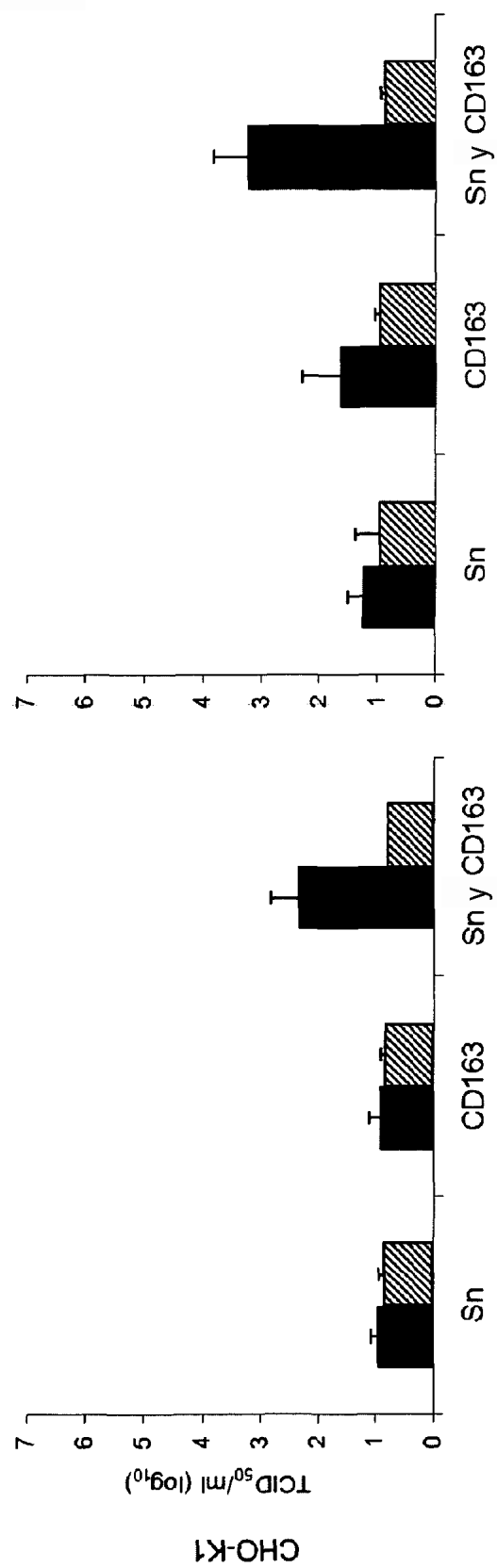


Fig.3 - continuación

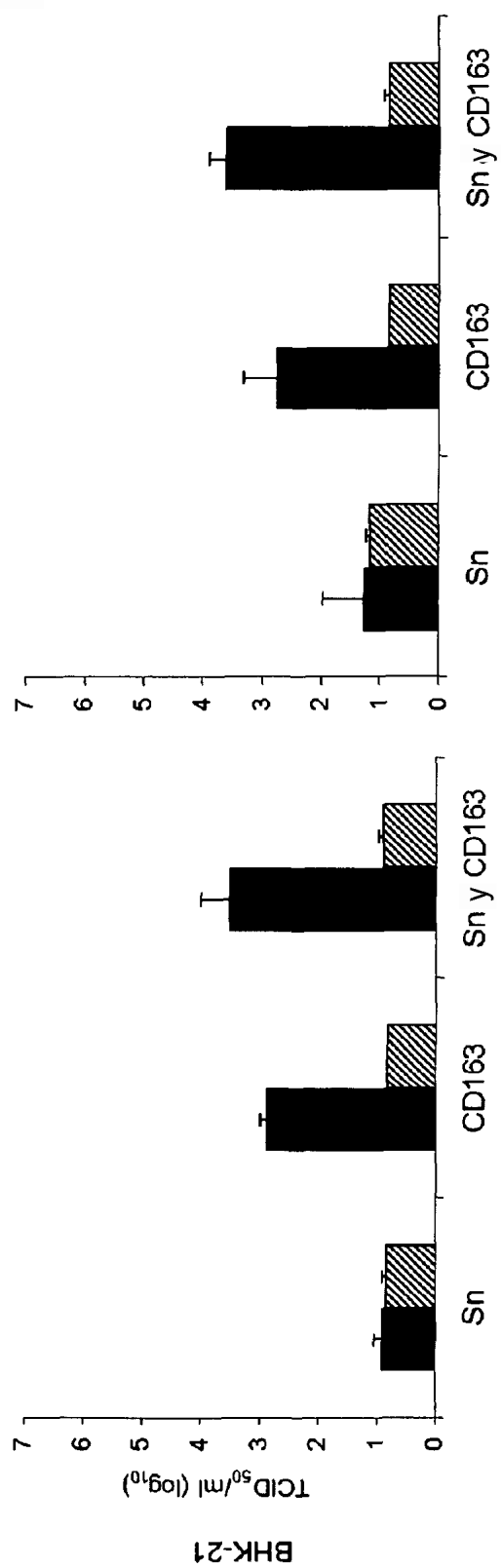


Fig.4

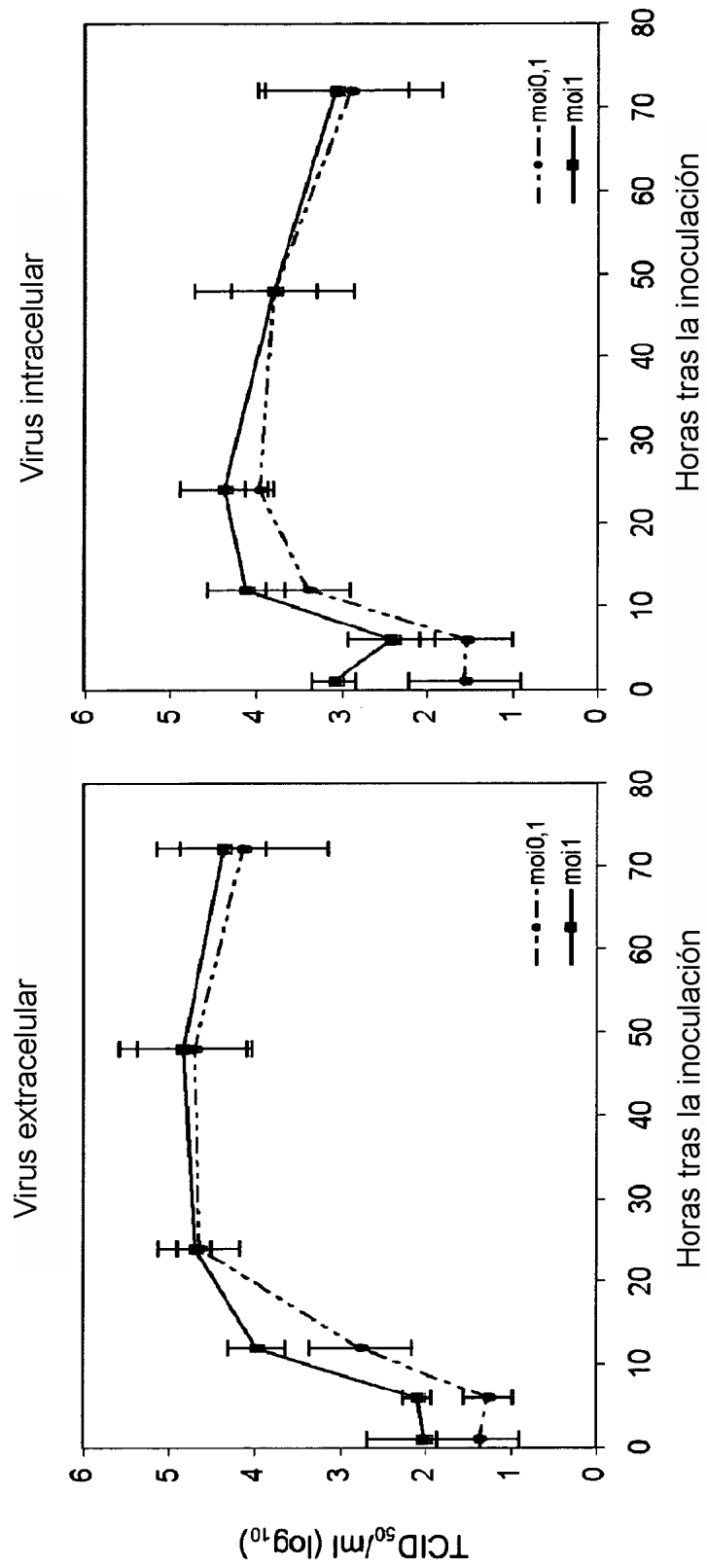


Fig.5

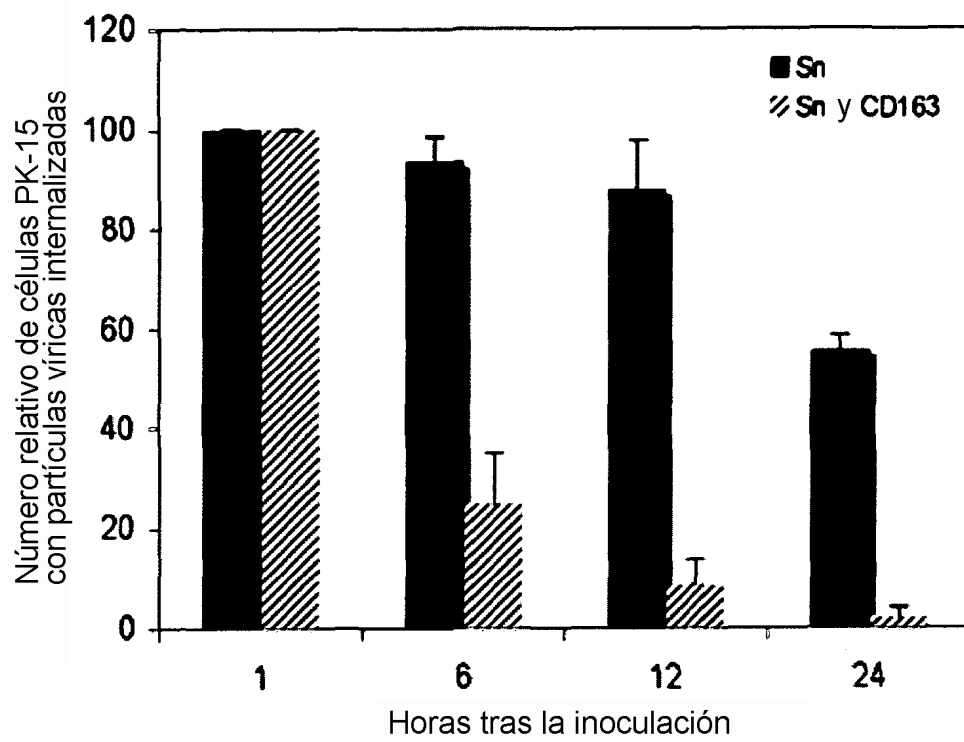


Fig.6

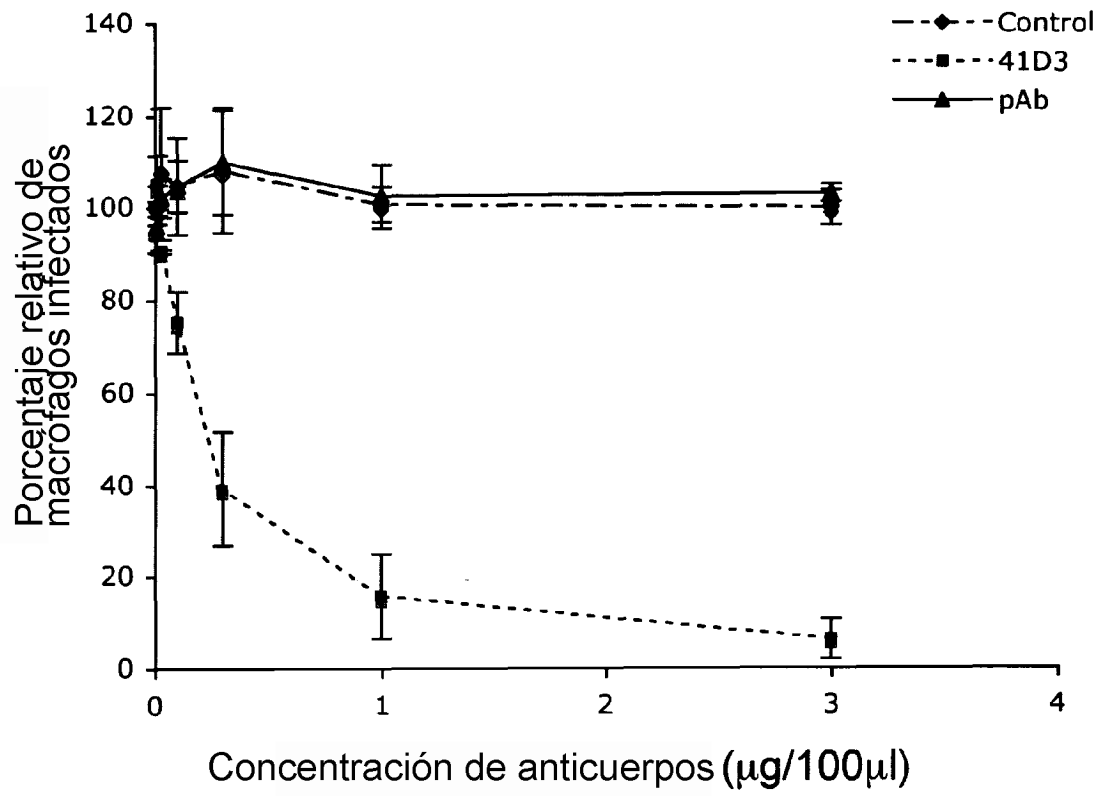


Fig.7 A

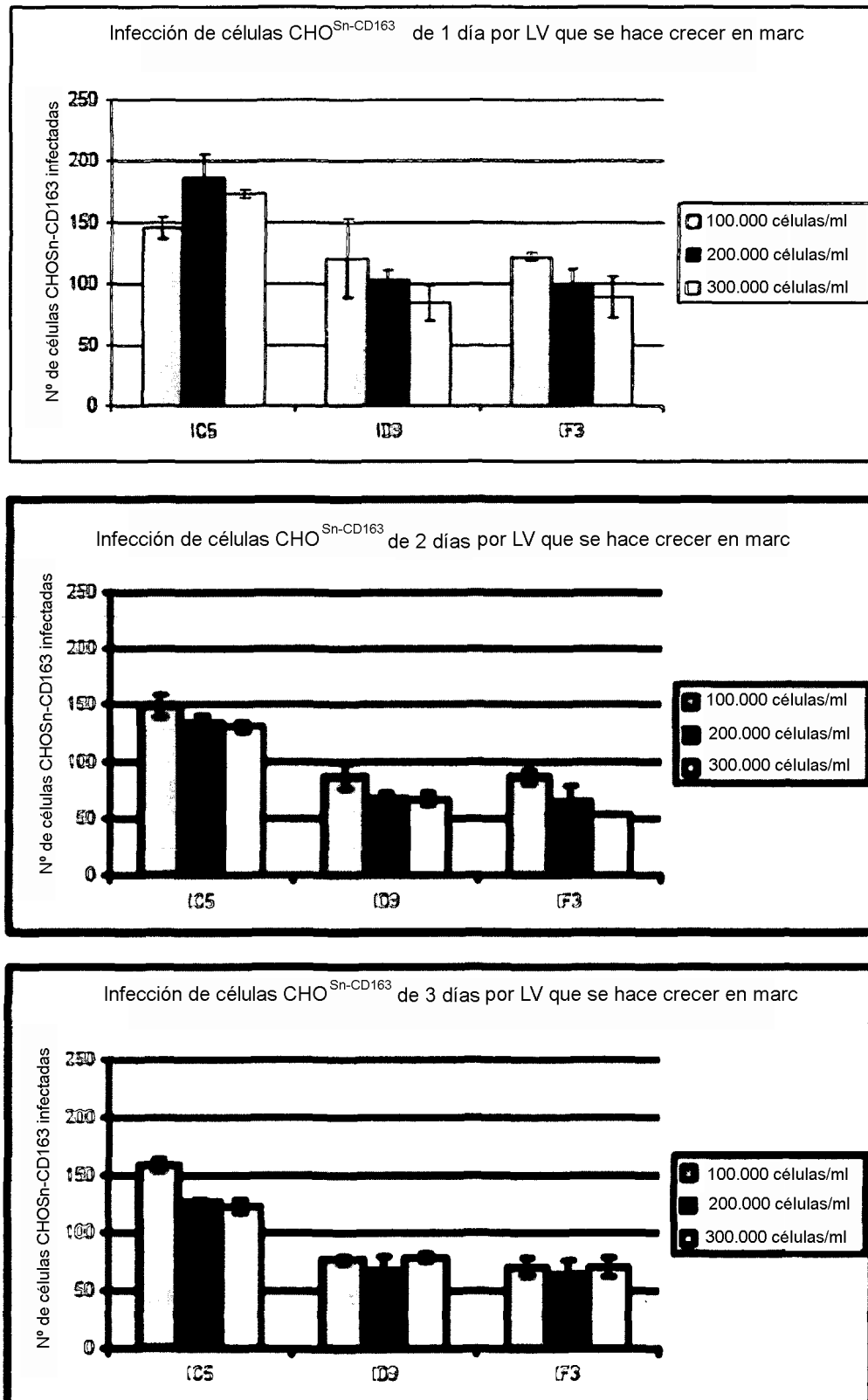


Fig.7 B

