

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 211**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 14/08 (2006.01)

C12N 15/40 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2006 E 06736040 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 1856534**

54 Título: **Péptidos para la detección de anticuerpos contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino**

30 Prioridad:

25.02.2005 US 656348 P

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

02.09.2016

73 Titular/es:

**IDEXX LABORATORIES, INC. (100.0%)
One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092, US**

72 Inventor/es:

KRAH, EUGENE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 581 211 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

Péptidos para la detección de anticuerpos contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

La invención se refiere a métodos y composiciones para la detección y cuantificación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (VSRRP) utilizando polipéptidos del
5 VSRRP.

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (VSRRP) es un arterivirus (virus con envoltura de ARN) que causa el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (SRRP). El virus puede causar graves problemas reproductivos en cerdos adultos que producen aborto. En cerdos en crecimiento los síntomas incluyen aumento de la mortalidad, disminución del apetito, fiebre, problemas respiratorios, neumonía, aumento de infecciones bacterianas secundarias y rinitis atrófica. En los cerdos recién nacidos el virus puede causar molestias respiratorias,
10 un retraso en el desarrollo, y aumento de las infecciones bacterianas secundarias. El virus se transmite principalmente de cerdo a cerdo. El virus también puede propagarse a través de las heces, la orina y la leche infectadas a los lechones sin anticuerpos en el calostro. Además, es posible la transmisión a través de agujas, insectos y el aire.

15 En este contexto, Witte *et al.* (Witte, S. B. *et al.*, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 7(4); julio de 2.000; págs. 700-702) describe un análisis inmunosorbente con enzima ligada (ELISA) para cuantificar anticuerpos contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (VSRRP) en el suero utilizando una nucleoproteína recombinada (Nr) del VSRRP. Además la patente europea EP 0 952 219 A1 describe proteínas de fusión recombinadas que comprenden las proteínas de la nucleocápside, así como su utilización en el diagnóstico del VSRRP. Además,
20 Wootton *et al.* (Wootton S. K. *et al.*, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 5(6); noviembre de 1998; págs. 773-779) describe la estructura antigénica de la proteínas de la nucleocápside del VSRRP.

Se necesitan métodos de detección de VSRRP en la técnica. En el mercado hay disponibles equipos de detección de anticuerpos contra el SRRP, tal como, por ejemplo, el HerdChek® PRRS Antibody 2XR Test Kit (IDEXX Labs., Inc., Westbrook, ME.).

25 **Compendio de la invención**

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

Una realización de la invención proporciona una composición de materia que comprende un polipéptido purificado que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 18. El polipéptido purificado puede estar en forma multimérica. La composición puede comprender además un vehículo.

30 Otra realización de la invención proporciona una composición de materia que comprende un polipéptido purificado que consiste la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 18 como única secuencia del ORF7 de VSRRP unida a un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas o una de sus combinaciones. El polipéptido purificado puede consistir esencialmente en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 13.

35 Otra realización de la invención proporciona un polipéptido de fusión purificado que comprende una secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 18 como única secuencia del ORF7 de VSRRP y un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas o una de sus combinaciones. La SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 18 puede estar en forma multimérica. El polipéptido purificado
40 puede consistir en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 13.

Aún otra realización de la invención proporciona un polinucleótido purificado que codifica un polipéptido purificado o un polipéptido de fusión purificado de la invención.

Todavía otra realización de la invención proporciona un método de detección de anticuerpos que se unen específicamente al virus del síndrome reproductivo y respiratorio (VSRRP) o a un polipéptido del VSRRP. El método
45 comprende poner en contacto un polipéptido purificado o un polipéptido de fusión purificado de la invención o una de sus combinaciones, con una muestra analítica que se sospecha que comprende anticuerpos específicos para VSRRP, en condiciones que permiten a complejos polipéptido/anticuerpo formar y detectar complejos polipéptido/anticuerpo. La detección de complejos polipéptido/anticuerpo es una indicación de que los anticuerpos específicos para VSRRP están presentes en la muestra analítica, y la ausencia de complejos polipéptido/anticuerpo
50 es una indicación de que los anticuerpos específicos para PRSSV no están presentes en la muestra analítica. El método puede comprender además poner en contacto los complejos polipéptido/anticuerpo con un reactivo indicador que comprende antes de su detección. Los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpos. La cantidad de anticuerpo en la muestra analítica se puede determinar. El polipéptido puede estar unido a un sustrato. El polipéptido puede estar en forma multimérica.

55 La muestra analítica puede comprender una muestra biológica obtenida de un mamífero. El método puede

comprender un análisis seleccionado del grupo de análisis que consiste en un análisis de unión cromatográfico de flujo reversible, un análisis inmunosorbente con enzima ligada, un radioinmunoanálisis, una prueba de hemaglutinación, un análisis de transferencia Western, un inmunoanálisis de polarización de fluorescencia, y un análisis de inmunofluorescencia indirecta.

- 5 Incluso otra realización de la invención proporciona un método para detectar una infección por VSRRP en un mamífero. El método comprende poner en contacto un polipéptido purificado o un polipéptido de fusión purificado de la invención o una de sus combinaciones, con una muestra biológica en condiciones que permitan formar complejos polipéptido/anticuerpo; y detectar complejos polipéptido/anticuerpo. La detección de los complejos polipéptido/anticuerpo es una indicación de que el mamífero tiene infección por PRSSV. El método puede comprender además
- 10 poner en contacto complejos polipéptido/anticuerpo con un reactivo indicador que genera una señal mensurable antes de la detección.

- Otra realización de la invención proporciona un método para disminuir la incidencia de falsos positivos en un análisis de diagnóstico que detecta anticuerpos contra el VSRRP específicos para ORF7 de VSRRP. El método comprende el uso de un polipéptido de ORF7 de VSRRP que comprende en comparación con el ORF7 completo, una
- 15 eliminación de aproximadamente 19 a aproximadamente 28 aminoácidos procedentes del terminal amino como antígeno de captura de anticuerpos en el análisis de diagnóstico. El polipéptido ORF7 de VSRRP puede ser la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 18. El polipéptido puede comprender además un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas o una de sus combinaciones.

- 20 Por consiguiente, la invención proporciona métodos y composiciones que se pueden utilizar para detectar anticuerpos y fragmentos de anticuerpos contra el VSRRP utilizando polipéptidos con sensibilidad y especificidad.

Descripcion detallada de la invención

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

Polipéptidos de VSRRP

- 25 Un polipéptido es un polímero de tres o más aminoácidos unidos de forma covalente por enlaces amida. Un polipéptido puede modificarse después de la traducción. Un polipéptido purificado es un preparado del polipéptido que está sustancialmente exento de material celular, de otros tipos de polipéptidos, de precursores químicos, de productos químicos utilizados en la síntesis del polipéptido o una de sus combinaciones. Un preparado de polipéptido que está sustancialmente exento de material celular, medio de cultivo, precursores químicos, productos
- 30 químicos utilizados en la síntesis del polipéptido tiene menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, 1% o más de otros polipéptidos, medio de cultivo, precursores químicos y/u otros productos químicos utilizados en la síntesis. Por lo tanto, un polipéptido purificado es de aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más puro.

Los polipéptidos purificados pueden ser polipéptidos completos o fragmentos de polipéptidos.

- En la Tabla 1 se comparan las secuencias de tres cepas de US ORF 7 de VSRRP: VR-2332 (negrita) (Patente de
- 35 EE.UU. n° 5.998.601) (SEQ ID NO: 8); ISU-12 (subrayado) (SEQ ID NO: 9) y US-A (cursiva) (SEQ ID NO: 10).

Tabla 1

M Met	P Pro	N Asn	N Asn	N Asn T Thr	G Gly	K Lys	Q Gln	T Thr Q Gln Q Gln	E Glu K Lys Lys	E Glu R Arg K Lys	K Lys	K Lys	G Gly	D Asp	G Gly
1				5						10				15	
Q Gln	P Pro	V Val	N Asn	Q Gln	L Leu	C Cys	Q Gln	M Met	L Leu	G Gly	K Lys	I Ile	I Ile	A Ala	Q Gln H His
			20					25					30		
Q Gln	N Asn	Q Gln 35	S Ser	R Arg	G Gly	K Lys	G Gly 40	P Pro	G Gly	K Lys	K Lys	N Asn 45	K Lys	K Lys	K Lys
N Asn	P Pro 50	E Glu	K Lys	P Pro	H His	F Phe 55	P Pro	L Leu	A Ala	T Thr	E Glu 60	D Asp	D Asp	V Val	R Arg
H His 65	H His	F Phe	T Thr	P Pro	S Ser 70	E Glu	R Arg	Q Gln	L Leu	C Cys 75	L Leu	S Ser	S Ser	I Ile	Q Gln 80
T Thr	A Ala	F Phe	N Asn	Q Gln 85	G Gly	A Ala	G Gly	T Thr	C Cys 90	T Thr	L Leu	S Ser	D Asp	S Ser 95	G Gly
R Arg	I Ile	S Ser	Y Tyr 100	T Thr	V Val	E Glu	F Phe	S Ser 105	L Leu	P Pro	T Thr	H His	H His 110	T Thr	V Val
R Arg	L Leu	I Ile	R Arg	V Val	T Thr	A Ala	S Ser P Pro	P Pro	S Ser	A Ala					
			115												120

En la Tabla 2 se muestra la identidad relativa de las tres cepas.

Tabla 2

	VR-2332	ISU-12	US-A
VR-2332	100	95,9	96,7
ISU-12	95,9	100	96,7
US-A	96,7	96,7	100

5

MPNNXGKQXX EKKGDGQPVN QLCQMLGKII AXQNQSRGKG 40
 PGKKNKKKNP EKPHEPLATE DDVRHHFTPS ERQLCLSSIQ 80
 TAFNQAGTC TLDSDGRISY TVEFSLPHTH TVRLIRVTAX PSA 123

La secuencia de consenso se muestra en la SEQ ID NO: 11:

10 X en la posición 5 puede ser N o T o puede ser cualquier aminoácido. X en la posición 9 puede ser Q o T o puede ser cualquier aminoácido. X en la posición 10 puede ser E, R o K o puede ser cualquier aminoácido. X en la posición 11 puede ser E, R o K o puede ser cualquier aminoácido. X en la posición 32 puede ser Q o H o puede ser cualquier aminoácido. X en la posición 120 puede ser S o P o puede ser cualquier aminoácido.

En una realización de la invención, un polipéptido comprende una porción de un ORF7 de VSRRP serotipo U.S.:

LCQXLGKIIAXQNQSRGKGP GKKKKNPEKPHFPLATEDDVRHHFTP SERQ
LCLSSIQTAFNQGAGTCTLS DSGRISYTFEFS LPTHHTVRLIRVTAXPSA (SEQ
ID nº:1).

X en la posición 11 puede ser cualquier aminoácido. En otras realizaciones, X en la posición 11 puede ser Q o H. X en la posición 99 pueden ser cualquier aminoácido. En otras realizaciones, X en la posición 99 puede ser P o S. X en la posición 4 puede ser cualquier aminoácido.

- 5 En otra realización de la invención, un polipéptido comprende una porción de un ORF7 de VSRRP serotipo U.S. y una etiqueta de histidina:

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHPFTGSLCQXLGKIIAXQ
NQSRGKGP GKKKKNPEKPHFPLATEDDVRHHFTP SERQLCLSSIQTAFNQ
G AGTCTLS DSGRISYTFEFS LPTHHTVRLIRVTAXPSA (SEQ ID nº :2).

- 10 X en la posición 42 representa cualquier aminoácido. En determinadas realizaciones, X en la posición 42 puede ser M o I. X en la posición 49 representa cualquier aminoácido. En determinadas realizaciones, X en la posición 49 representa Q o H. X en la posición 137 representa cualquier aminoácido. En determinadas realizaciones, X en la posición 137 representa P o S.

En la presente memoria se describe un polipéptido con ORF7 de Lelystad de VSRRP truncado en el terminal de N.

CQLLGAXIKSQRQQPRGGQAKKKKPEKPHFPLAAEDDIRHHLTQTERSLCLQSIQTAF
NQGAGTASLSSSGEVSFQVEFMLPVAHTVRLIRVTSTASQ GAS (SEQ ID nº: 12).

X en la posición 7 representa cualquier aminoácido o puede ser M o I. Otra realización es

CQLLGAXIKSQRQQPRGGQAKKKKPEKPHFPLAAEDDIRHHLTQTERSLCLQSIQTAF
NQGAGTASLSSSGEVSFQVEFMLPVAHTVRLIRVTSTASQ GAS (SEQ ID nº: 18).

15

X en la posición 7 puede ser cualquier aminoácido. En realizaciones preferidas, X en la posición 7 es H o I.

Otra realización proporciona un polipéptido con ORF7 de Lelystad del VSRRP truncado en N etiquetado con His:

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHPFTGSCQLLGAXIKSQRQQPR
GGQAKKKKPEKPHFPLAAEDDIRHHLTQTERSLCLQSIQTAFNQGAGTASLSSSGEV
SFQVEFMLPVAHTVRLIRVTSTASQ GAS (SEQ ID nº: 13).

- 20 X en la posición 45 representa cualquier aminoácido. En determinadas realizaciones, la X en la posición 45 puede ser M o I.

- 25 La SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 12, y/o la SEQ ID NO: 13 son más solubles que un polipéptido que comprende un ORF7 de VSRRP completo. Además, los polipéptidos de la invención se unen específicamente a anticuerpos específicos para VSRRP. Por lo tanto, las características básicas y nuevas de polipéptidos de la invención es que pueden ser más solubles que un ORF7 de VSRRP completo, tienen mayor especificidad en los análisis de detección de VSRRP que el ORF7 de VSRRP completo y se unen específicamente a los anticuerpos anti-VSRRP.

En la presente memoria se describen polipéptidos con ORF7 de VSRRP incompletos. En particular, los polipéptidos con ORF7 de VSRRP pueden tener truncamientos en el terminal N.

Un polipéptido con ORF7 de VSRRP puede tener aproximadamente de 19 a 28 aminoácidos retirados del terminal N; aproximadamente 20 a aproximadamente 27 aminoácidos retirados del terminal N; o aproximadamente 21 a aproximadamente 26 aminoácidos retirados del terminal N. Si está presente, el resto M que se produce en el ORF7 de VSRRP en aproximadamente la posición 25 y en aproximadamente la posición 33 de VSRRP de Lelystad se puede sustituir por otro aminoácido. Véase, p. ej., la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 18.

Los fragmentos de polipéptidos de la invención pueden comprender aproximadamente 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o más aminoácidos de los polipéptidos descritos en la presente memoria. Las variantes de polipéptidos son al menos aproximadamente 80, o aproximadamente 90, 96, 98 o 99% idénticos a las secuencias de polipéptidos que se muestran en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13. Las variantes de polipéptidos tienen una o más variaciones conservadoras de aminoácidos u otras modificaciones de menor importancia y conservan la actividad biológica, es decir, son equivalentes biológicamente funcionales. Un equivalente biológicamente activo tiene la función sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido natural correspondiente.

Porcentaje de identidad de secuencia tiene un significado reconocido en la técnica y hay una serie de procedimientos para medir la identidad entre dos secuencias de polipéptidos o polinucleótidos. Véase, p. ej., Lesk, Ed. *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, Nueva York, (1988); Smith, Ed. *Biocomputing: Informatics And Genoma Projects*, Academic Press, Nueva York, (1993); Griffin y Griffin, Eds., *Computer Analysis Of Sequence Data*, Parte I, Humana Press, Nueva Jersey, (1994); von Heinje, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Academic Press, (1987) y Gribskov y Devereux, Eds., *Sequence Analysis Primer*, M. Stockton Press, Nueva York, (1991). Los métodos para la alineación de polinucleótidos o polipéptidos están codificados en programas informáticos, incluido el paquete de programas GCG (Devereux *et al.*, *Nuc Acids Res.* 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul *et al.*, *J. Molec. Biol.* 215:403 (1990)) y el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711), que utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Adv App. Math.*, 2:482-489 (1981)). Por ejemplo, puede utilizarse el programa informático ALIGN que emplea el algoritmo FASTA, con una búsqueda de huecos afines con una penalización abierta por hueco de -12 y una penalización por ampliación de hueco de -2.

Cuando se utiliza cualquiera de los programas de alineación de secuencias para determinar si una secuencia determinada es, por ejemplo, aproximadamente 95% idéntica a una secuencia de referencia, los parámetros se ajustan de tal manera que el porcentaje de identidad se calcula sobre el completo del polinucleótido de referencia y que se permiten huecos de hasta el 5% de identidad del número total de nucleótidos en el polinucleótido de referencia.

Las variantes generalmente se pueden identificar modificando una de las secuencias de polipéptidos y evaluando las propiedades del polipéptido modificado para determinar si es un equivalente biológico. Una variante es un equivalente biológico si reacciona sustancialmente igual que un polipéptido en un análisis tal como un análisis inmunohistoquímico, un análisis de inmunoadsorción con enzima ligada (ELISA), un radioinmunoanálisis (RIA), un análisis inmunoenzimático o un análisis de transferencia Western, p. ej., tiene 90 a 110% de la actividad del polipéptido original. El análisis puede ser un análisis de competencia en donde el polipéptido biológicamente equivalente es capaz de reducir la unión del polipéptido a un antígeno o anticuerpo reactivo correspondiente en aproximadamente 80, 95, 99 o 100%. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido natural correspondiente también se une específicamente al polipéptido variante. Los polipéptidos variantes de la invención pueden comprender aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones conservadoras de aminoácidos.

Una sustitución conservadora es aquella en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido quedase sustancialmente sin cambios. En general, los siguientes grupos de aminoácidos representan cambios conservadores: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his y (5) phe, tyr, trp, his.

Un polipéptido de la invención puede comprender además una secuencia señal (o líder) que con la traducción o después de la traducción dirige la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede comprender un enlazador u otra secuencia para facilidad de síntesis, purificación o identificación del polipéptido (p. ej., poli-His), o para mejorar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede conjugarse a una región Fc de inmunoglobulina o a albúmina de suero bovino.

Un polipéptido puede estar unido por enlace covalente o no covalente a una secuencia de aminoácidos a la que el polipéptido no se asocia normalmente en la naturaleza. Además, un polipéptido puede estar unido por enlace covalente o no covalente a compuestos o moléculas distintas de aminoácidos. Por ejemplo, un polipéptido puede estar unido a un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de terminación de la transferencia, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas o una de sus combinaciones. Un espaciador de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos que no están asociados por lo general de forma contigua a un polipéptido de la invención en la naturaleza. Un espaciador de aminoácidos puede comprender aproximadamente 1, 5, 10, 20, 100, 1.000 o más aminoácidos.

Si se desea, un polipéptido puede ser una proteína de fusión, que puede contener también otras secuencias de aminoácidos, tales como enlazadores de aminoácidos, espaciadores de aminoácidos, secuencias señal, secuencias de terminación de la transferencia TMR, dominios transmembrana, así como ligandos útiles en la purificación de proteínas, tales como glutatión-S-transferasa, etiqueta de histidina y proteína A estafilocócica o una de sus combinaciones. En una proteína de fusión puede estar presente más de un polipéptido de la invención. En una proteína de fusión pueden estar presentes fragmentos de polipéptidos. Una proteína de fusión de la invención puede comprender una o más de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, uno de sus fragmentos o una de sus combinaciones.

Los polipéptidos de la invención pueden estar en forma multimérica. Es decir, un polipéptido puede comprender una o más copias de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 12 y/o la SEQ ID NO: 13. Un polipéptido polimérico puede ser un péptido antigénico múltiple (PAM). Véase, p. ej., Tam, *J. Immunol. Methods*, 196:17-32 (1996).

Los polipéptidos de la invención pueden comprender un antígeno que es reconocido por un anticuerpo reactivo contra VSRRP. El antígeno puede comprender uno o más epítopos (es decir, determinantes antigénicos). Un epítipo puede ser un epítipo lineal, un epítipo secuencial o un epítipo conformacional. Los epítopos dentro de un polipéptido de la invención pueden identificarse por varios métodos. Véase, p. ej., la patente de EE.UU. nº 4.554.101; Jameson y Wolf, *CABIOS* 4:181-186 (1988). Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede aislarse e identificarse. Una serie de péptidos cortos, que juntos abarcan una secuencia polipeptídica completa, puede prepararse por escisión proteolítica. Comenzando, por ejemplo, con fragmentos de polipéptido eicosámero, en cada fragmento se puede probar la presencia de epítopos reconocidos en un ELISA. Por ejemplo, en un análisis ELISA un polipéptido del VSRRP, tal como un fragmento de polipéptido eicosámero, está unido a un soporte sólido, tal como los pocillos de una placa de múltiples pocillos de plástico. Se marca una población de anticuerpos, se añaden al soporte sólido y se deja que se una al antígeno sin marcar, en condiciones en que se bloquea la absorción inespecífica, y cualquier anticuerpo no unido y otras proteínas se lavan. La unión del anticuerpo se detecta, por ejemplo, mediante una reacción que convierte un sustrato incoloro en un producto de reacción coloreado. Progresivamente fragmentos más pequeños y superpuestos, se pueden probar a continuación de un eicosámero identificado para cartografiar el epítipo de interés.

Un polipéptido de la invención puede producirse por ingeniería genética. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención se puede introducir en un vector de expresión recombinado, que se puede expresar en un sistema de células anfitrionas de expresión adecuada usando técnicas bien conocidas en la técnica. Una variedad de sistemas de expresión de bacterias, levaduras, plantas, mamíferos e insectos están disponibles en la técnica y cualquiera de dichos sistemas de expresión pueden utilizarse. Opcionalmente, un polinucleótido que codifica un polipéptido se puede traducir en un sistema de traducción exento de células. Un polipéptido también puede sintetizarse químicamente u obtenerse a partir de cultivos de VSRRP.

35 Polinucleótidos de VSRRP

Los polinucleótidos de la invención contienen un genoma microbiano incompleto y pueden ser ácidos nucleicos monocatenarios o bicatenarios. Un polinucleótido puede ser ARN, ADN, ADNc, ADN genómico, ARN o ADN sintetizado químicamente o una de sus combinaciones. Los polinucleótidos se pueden purificar exentos de otros componentes, tales como proteínas, lípidos y otros polinucleótidos. Por ejemplo, el polinucleótido puede estar 50% 75%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% purificado. Los polinucleótidos de la invención codifican los polipéptidos descritos anteriormente. En una realización de la invención, los polinucleótidos codifican un polipéptido que se muestra en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 13, o una de sus combinaciones. Los polinucleótidos de la invención pueden comprender otras secuencias de nucleótidos, tales como secuencias que codifican enlazadores, espaciadores, secuencias señal, secuencias de terminación de transferencia TMR, dominios transmembrana o ligandos útiles en la purificación de proteínas tales como glutatión-S-transferasa, etiqueta de histidina y proteína A estafilocócica.

Los polinucleótidos de la invención pueden estar aislados. Un polinucleótido aislado es un polinucleótido de origen natural que no está inmediatamente contiguo a una o ambas de las secuencias genómicas que flanquean a 5' y 3' que está naturalmente asociado. Un polinucleótido aislado puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN recombinado de cualquier longitud, siempre que las secuencias de ácidos nucleicos que se encuentran naturalmente flanqueando inmediatamente la molécula de ADN recombinado en un genoma natural se hayan eliminado o estén ausentes. Los polinucleótidos aislados incluyen también moléculas de ácido nucleico sintéticas. Una molécula de ácido nucleico existente entre cientos de millones de otras moléculas de ácido nucleico dentro de, por ejemplo, ADNc o bibliotecas genómicas, o porciones de gel que contienen un producto de digestión de restricción de ADN genómico no han de considerarse un polinucleótido aislado.

Los polinucleótidos de la invención también pueden comprender fragmentos que codifican polipéptidos inmunógenos. Los polinucleótidos de la invención pueden codificar polipéptidos completos, fragmentos de polipéptidos y variantes de polipéptidos o de fusión.

Las secuencias degeneradas de nucleótidos que codifican polipéptidos de la invención, así como secuencias de

nucleótidos homólogas que son al menos aproximadamente 80, o aproximadamente 90, 96, 98, o 99% idénticas a las secuencias de polinucleótidos de la invención y uno de sus complementos se describen también en la presente memoria. El porcentaje de identidad de secuencia se puede calcular como se describe en el apartado "Polipéptidos".

Las secuencias degeneradas de nucleótidos son polinucleótidos que codifican un polipéptido de la invención o uno de sus fragmentos, pero difieren en secuencia de ácido nucleico procedente de la secuencia polinucleotídica natural, debido a la degeneración del código genético. Las moléculas de ADN complementario (ADNc), los homólogos de especies y las variantes de polinucleótidos de VSRRP que codifican polipéptidos de VSRRP biológicamente funcionales también son polinucleótidos de VSRRP. Los polinucleótidos de la invención pueden aislarse de secuencias de ácido nucleico presentes en, por ejemplo, una muestra biológica, tales como de saliva, sangre, leche, jugo de carne, suero, fluido de lavado pulmonar, esputo, pulmones, amígdala, ganglios linfáticos u otra muestra de tejido, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico o exudados de heridas. Los polinucleótidos también se pueden sintetizar en el laboratorio, por ejemplo, usando un sintetizador automático. Un método de amplificación tal como PCR puede utilizarse para amplificar polinucleótidos de ADN o ADNc genómico que codifica los polipéptidos.

Los polinucleótidos de la invención pueden comprender secuencias de codificación para los polipéptidos de origen natural o pueden codificar secuencias alteradas que no se encuentran en la naturaleza. Si se desea, los polinucleótidos pueden clonarse en un vector de expresión que comprende elementos de control de expresión, incluidos, por ejemplo, orígenes de la duplicación, activadores, potenciadores u otros elementos reguladores que dirigen la expresión de los polinucleótidos de la invención en células anfitrionas. Un vector de expresión puede ser, por ejemplo, un plásmido, tal como pBR322, pUC o ColE1, o un vector de adenovirus, tal como un vector tipo 2 de adenovirus o un vector tipo 5. Opcionalmente, se pueden utilizar otros vectores, incluidos pero sin limitarse a, virus Sindbis, virus 40 de simios, vectores de alfavirus, vectores de poxvirus y vectores de citomegalovirus y retrovíricos, tales como el virus del sarcoma murino, virus de tumor de mama de ratón, el virus de la leucemia murina de Moloney y virus del sarcoma de Rous. Pueden utilizarse también micromosomas tales como MC y MC1, bacteriófagos, fagómitos, cromosomas artificiales de levadura, cromosomas artificiales bacterianos, partículas de virus, partículas similares a virus, cósmidos (plásmidos en los que se han insertado sitios cos de fago lambda) y replicones (elementos genéticos que son capaces de duplicación bajo su propio control en una célula).

Los métodos para preparar polinucleótidos operativamente unidos a una secuencia de control de la expresión y expresarlos en una célula anfitriona son bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., la patente de los EE.UU. nº 4.366.246. Un polinucleótido de la invención está operativamente unido cuando se coloca junto a o cerca de uno o más elementos de control de expresión, que dirigen la transcripción y/o traducción del polinucleótido.

Los polinucleótidos de la invención se pueden usar, por ejemplo, como sondas o cebadores, por ejemplo cebadores de PCR, para detectar la presencia de los polinucleótidos de VSRRP en una muestra, tal como una muestra biológica. La capacidad de dichas sondas y cebadores para hibridar específicamente a secuencias de polinucleótidos de VSRRP les permitirá ser de utilidad en la detección de la presencia de secuencias complementarias en una muestra dada. Las sondas de polinucleótidos y los cebadores de la invención pueden hibridar a secuencias complementarias en una muestra tal como una muestra biológica, incluidas la saliva, sangre, suero, leche, jugo de carne, líquido de lavado pulmonar, esputo, pulmones, amígdala, ganglios linfáticos o de otra muestra de tejido, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico o exudado de heridas. Los polinucleótidos de la muestra pueden ser sometidos, por ejemplo, a electroforesis en gel u otras técnicas de separación por tamaño o pueden inmovilizarse sin separación por tamaño. Las sondas de polinucleótidos o los cebadores pueden marcarse. Los marcadores adecuados, y los métodos para marcar sondas y cebadores son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, marcadores radiactivos incorporados por traslado de la muestra o por la cinasa, marcadores de biotina, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, marcadores de quelante metálico y marcadores enzimáticos. Los polinucleótidos de la muestra se ponen en contacto con las sondas o los cebadores en condiciones de hibridación de restricciones adecuadas.

Dependiendo de la aplicación, se pueden utilizar condiciones variables de hibridación para conseguir grados variables de selectividad de la sonda o cebador hacia la secuencia diana. Para aplicaciones que requieren gran selectividad, se pueden utilizar condiciones relativamente rigurosas, tales como condiciones de baja salinidad y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por una concentración salina de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,15 M de sal a temperaturas de aproximadamente 50°C. a aproximadamente 70°C. Para aplicaciones que requieren menos selectividad, pueden utilizarse condiciones de hibridación menos rigurosas. Por ejemplo, condiciones salinas de aproximadamente 0,14 M a aproximadamente 0,9 M de sal, a temperaturas que van desde aproximadamente 20°C a aproximadamente 55°C. La presencia de un complejo hibridado que comprende la sonda o cebador y un polinucleótido complementario de la muestra analítica indica la presencia de VSRRP o de una secuencia de polinucleótidos de VSRRP en la muestra.

Métodos de Detección

Los métodos de la invención pueden utilizarse para detectar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos específicos para VSRRP en una muestra analítica, tal como una muestra biológica, una muestra ambiental o una muestra de laboratorio. Una muestra biológica puede incluir, por ejemplo, saliva, sangre, suero, leche, jugo de carne, líquido de lavado pulmonar, esputo, pulmones, amígdalas, ganglios linfáticos o de otra muestra de tejido, orina, heces, líquido

cefalorraquídeo, líquido amniótico, o exudado de heridas de un animal tal como un caballo, gato, perro, cerdo o ser humano. La muestra analítica puede estar sin tratar, precipitada, fraccionada, separada, diluida, concentrada o purificada antes de combinarse con un polipéptido de la invención.

5 Los métodos comprenden poner en contacto un polipéptido de la invención con una muestra analítica en condiciones que permiten formar un complejo polipéptido/anticuerpo. Es decir, un polipéptido de la invención se une específicamente a un anticuerpo específico para VSRRP localizado en la muestra. En esta realización, un polipéptido de la invención está actuando como reactivo de captura de anticuerpos. Un experto en la técnica está familiarizado con los análisis y condiciones que se utilizan para detectar la unión de complejo anticuerpo/polipéptido. Se detecta la formación de un complejo entre polipéptidos y anticuerpos anti-VSRRP en la muestra.

10 Un anticuerpo puede utilizarse en un método de diagnóstico de la infección por VSRRP mediante la obtención de una muestra analítica de un ser humano o animal que se sospecha que tiene una infección por VSRRP. La muestra analítica se pone en contacto con un anticuerpo en condiciones que permitan la formación de un complejo antígeno-anticuerpo (es decir, un inmunocomplejo). La cantidad de complejos antígeno-anticuerpo puede determinarse por metodología conocida en la técnica. Un nivel más alto que el formado en una muestra de referencia indica una
15 infección por VSRRP. Alternativamente, un polipéptido de la invención puede ponerse en contacto con una muestra analítica. Los anticuerpos contra VSRRP en una muestra corporal positiva formarán un complejo antígeno-anticuerpo en condiciones adecuadas. La cantidad de complejos antígeno-anticuerpo se puede determinar por métodos conocidos en la técnica.

20 En una realización de la invención, el complejo polipéptido/anticuerpo se detecta cuando un reactivo indicador, tal como una enzima, que se une al anticuerpo, cataliza una reacción detectable. Opcionalmente, un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señal puede aplicarse al complejo polipéptido/anticuerpo en condiciones que permitan la formación de un complejo polipéptido/anticuerpo/indicador. Se detecta el complejo polipéptido/anticuerpo/indicador. Opcionalmente, el polipéptido o anticuerpo puede marcarse con un reactivo
25 indicador antes de la formación de un complejo polipéptido/anticuerpo. El método puede comprender opcionalmente una referencia positiva o negativa.

Los análisis de la invención incluyen, pero no se limitan a los basados en la competencia, análisis de reacción directa o de tipo sándwich, incluidos, pero no limitados a, análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), transferencia Western, IFA, radioinmunoanálisis (RIA), hemaglutinación (HA) e inmunoanálisis de polarización
30 fluorescente (FPIA). Un análisis de la invención comprende un análisis de unión cromatográfico de flujo reversible, por ejemplo un análisis SNAP®. Véase la patente de EE.UU. nº 5.726.010.

Los análisis pueden usar fases sólidas o sustratos o pueden realizarse por inmunoprecipitación o cualquier otro método que no utilice fases sólidas. Cuando se usa una fase sólida o sustrato, un polipéptido de la invención está directa o indirectamente unido a un soporte sólido o un sustrato tal como a un pocillo de microvaloración, a perlas magnéticas, a perlas no magnéticas, a la columna, a la matriz, a la membrana, a la trama fibrosa compuesta de
35 fibras sintéticas o naturales (p. ej., materiales a base de vidrio o de celulosa o polímeros termoplásticos, tales como, polietileno, polipropileno o poliéster), a la estructura sinterizada compuesta por materiales en partículas (p. ej., de vidrio o diversos polímeros termoplásticos), o película de membrana fundida compuesta de nitrocelulosa, nilón, polisulfona o similares (generalmente de naturaleza sintética). En una realización, se sinteriza un sustrato, partículas finas de polietileno, conocido comúnmente como polietileno poroso, por ejemplo, polietileno poroso de 10-15 micras
40 de Chromex Corporation (Albuquerque, N.M.). Todos estos materiales de sustrato pueden ser usados en formas adecuadas, tales como películas, láminas o placas, o pueden recubrirse, unirse o laminarse a vehículos inertes apropiados, tales como papel, vidrio, películas plásticas o telas. Los métodos adecuados para inmovilizar péptidos sobre fases sólidas incluyen, interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares.

En un tipo de formato de análisis, uno o más polipéptidos se pueden revestir sobre una fase sólida o sustrato. Una
45 muestra analítica sospechosa de contener un anticuerpo anti-VSRRP o uno de sus fragmentos se incuba con un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señal conjugado a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para VSRRP durante un tiempo y en condiciones suficientes para formar complejos antígeno/anticuerpo de cualquiera de las anticuerpos de la muestra analítica contra los polipéptidos de la fase sólida o el compuesto reactivo indicador conjugado con un anticuerpo específico para VSRRP a los polipéptidos de la fase
50 sólida. La reducción en la unión del reactivo indicador conjugado con un anticuerpo anti VSRRP a la fase sólida puede medirse cuantitativamente. Una reducción mensurable en la señal comparada con la señal generada en una muestra analítica de VSRRP negativa confirmada indica la presencia de anticuerpo anti-VSRRP en la muestra analítica. Este tipo de análisis puede cuantificar la cantidad de anticuerpos anti-VSRRP en una muestra analítica.

En otro tipo de formato de análisis, uno o más polipéptidos de la invención se revisten sobre un soporte o sustrato.
55 Un polipéptido de la invención está conjugado con un reactivo indicador y se añade a una muestra analítica. Esta mezcla se aplica al soporte o sustrato. Si los anticuerpos del VSRRP están presentes en la muestra analítica se unirán al polipéptido conjugado con un reactivo indicador y al polipéptido inmovilizado sobre el soporte. Puede detectarse entonces el complejo polipéptido/anticuerpo/indicador. Este tipo de análisis puede cuantificar la cantidad de anticuerpos anti-VSRRP en una muestra analítica.

En otro tipo de formato de análisis, uno o más polipéptidos de la invención se revisten sobre un soporte o sustrato. La muestra analítica se aplica al soporte o sustrato y se incuban. Los componentes no unidos de la muestra se lavan lavando del soporte sólido con una solución de lavado. Si hay presentes anticuerpos de VSRRP en la muestra analítica, se unirán al polipéptido recubierto sobre la fase sólida. Este complejo polipéptido/anticuerpo puede detectarse usando un segundo anticuerpo específico de la especie que está conjugado con un reactivo indicador. El complejo indicador de anticuerpo polipéptido/anticuerpo/anti-especie puede detectarse entonces. Este tipo de análisis puede cuantificar la cantidad de anticuerpos anti-VSRRP en una muestra analítica.

La formación de un complejo polipéptido/anticuerpo o un complejo polipéptido/anticuerpo/indicador puede detectarse por métodos radiométricos, colorimétricos, fluorimétricos, separación por tamaño o de precipitación. Opcionalmente, la detección de un complejo polipéptido/anticuerpo es mediante la adición de un anticuerpo secundario que está acoplado a un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señal. Los reactivos indicadores que comprenden compuestos generadores de señal (marcadores) asociados a un complejo polipéptido/anticuerpo pueden detectarse utilizando los métodos descritos anteriormente e incluyen agentes cromógenos, catalizadores tales como enzimas, compuestos fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, compuestos quimioluminiscentes tales como dioxetanos, acridinios, fenantridinios, rutenio y luminol, elementos radiactivos, marcadores visuales directos, así como cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Ejemplos de enzimas incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa y similares. La selección de un marcador específico no es crítica, pero será capaz de producir una señal por sí mismo o junto con una o más sustancias adicionales.

La formación del complejo es indicativa de la presencia de anticuerpos anti-VSRRP en una muestra analítica. Por lo tanto, los métodos de la invención pueden utilizarse para diagnosticar la infección por VSRRP en un paciente.

Los métodos de la invención también pueden indicar la suma o cantidad de anticuerpos anti-VSRRP en una muestra analítica. Con muchos reactivos indicadores, tales como enzimas, la cantidad de anticuerpo presente es proporcional a la señal generada. Dependiendo del tipo de muestra analítica, puede diluirse con un reactivo tampón adecuado, concentrarse o ponerse en contacto con una fase sólida sin manipulación alguna. Por ejemplo, por lo general se prefiere probar muestras de suero o plasma que han sido diluidas previamente, o concentrar muestras tales como orina, con el fin de determinar la presencia y/o cantidad de anticuerpo presente.

La invención puede utilizarse en relación con los equipos de análisis (p. ej., artículos de fabricación) para detectar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-VSRRP o polipéptidos de VSRRP en una muestra. Un equipo comprende uno o más polipéptidos de la invención y medios para determinar la unión del polipéptido a los anticuerpos anti-VSRRP o fragmentos de anticuerpos en la muestra. Un equipo o artículo de fabricación también puede comprender uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y medios para determinar la unión de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a VSRRP o a polipéptidos de VSRRP en la muestra. Un equipo puede comprender un dispositivo que contiene uno o más polipéptidos o anticuerpos de la invención e instrucciones para la utilización de uno o más polipéptidos o anticuerpos p. ej., la identificación de una infección por VSRRP en un mamífero. El equipo también puede comprender material de envasado que comprende un marcador que indica que los uno o más polipéptidos o anticuerpos del equipo pueden utilizarse para la identificación de la infección por VSRRP. Otros componentes tales como tampones, referencias y similares, conocidos por cualquier experto en la técnica, pueden estar incluidos en dichos equipos de prueba. Los polipéptidos, anticuerpos, análisis y equipos de la invención son útiles, por ejemplo, en el diagnóstico de cada uno de los casos de infección por VSRRP en un paciente, así como los estudios epidemiológicos de brotes de VSRRP. Los polipéptidos y análisis de la invención pueden combinarse con otros polipéptidos o análisis para detectar la presencia de VSRRP junto con otros organismos.

La invención descrita de forma ilustrativa en la presente memoria puede ser practicada adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se describen específicamente en la presente memoria. Así, por ejemplo, en cada caso en la presente memoria cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede ser sustituido por cualquiera de los otros dos términos. Debe entenderse que aunque la presente invención se ha descrito específicamente mediante realizaciones preferidas, las características opcionales, la modificación y variación de los conceptos descritos en la presente memoria pueden ser recurridos a los expertos en la técnica.

Además, cuando se describen características o aspectos de la invención en términos de grupos de Markush u otra agrupación de alternativas, los expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe de este modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush o de otro grupo.

A continuación se proporcionan a título de ilustración y no se pretende que limiten el alcance de la invención descrita en términos generales anteriormente y definida en las reivindicaciones independientes.

Ejemplos

Ejemplo 1

PEXUSorf7 se expresó y se purificó como se ha descrito anteriormente (*EMBO J.* 1984, 3: 1429-1434). USORF7

recombinado completo, derivado USORF7 por eliminación en el terminal N y proteínas del derivado USORF7 por eliminación en el terminal carboxilo se expresaron utilizando un sistema de expresión pET Studier usando métodos descritos por el fabricante (EMD Biosciences, Ind., Madison, WI 53719). Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas descritas a continuación se clonaron en el sistema de expresión pET200 utilizando métodos descritos por el fabricante. Las proteínas recombinadas se expresaron con una etiqueta de histidina en el extremo amino que está codificada por el vector que permite la purificación rápida por afinidad. Las proteínas se expresaron y purificaron a partir de la cepa BL21 (estrella) de *E. coli* utilizando métodos descritos por el fabricante (EMD Biosciences). Lisados en bruto de *E. coli* se separaron con geles de SDS-PAGE, las proteínas separadas se transfirieron a nitrocelulosa, y la transferencia de nitrocelulosa se bloqueó utilizando técnicas normalizadas conocidas por cualquier experto en la técnica. Véase, p. ej., Sambrook y Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001). Presencia de anticuerpos porcinos se detectó con conjugado HRP anti-IgG porcina en cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA., 19390) utilizando técnicas normalizadas conocidas por cualquier experto en la técnica.

La secuencia del marco de lectura abierto 7 (ORF7) de VSSPR (serotipo EE.UU.) tiene una longitud de 123 aminoácidos y se muestra a continuación: Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, serotipo U.S.

**MPNNGKQQKKKKG DGQPVNQLCQMLGKIIAQQNQSRGKGP GKKNKKKNPEK
PHFPLATEDDVRHHFTP SERQLCLSSIQTAFNQGAGTCTLS DSGRISYTV EFSLPTH
HTVRLIRVTAPPSA (SEQ ID nº:3)**

La secuencia de aminoácidos de PEXUSorf7 se muestra en la SEQ ID NO: 4. Los aminoácidos del ORF7 del SRRP, serotipo U.S. están en negrita y subrayado. Los 123 aminoácidos del ORF7 están presentes.

Los aminoácidos 2 a 123 del ORF7 de serotipo EE.UU. están presentes y están en negrilla y subrayados en la SEQ ID NO: 5. Esta proteína recombinada se expresó utilizando el vector de expresión pET200 de Novagen. Una etiqueta de fusión de 37 aminoácidos está unida al extremo amino de la proteína.

Los aminoácidos 2 a 123 de la ORF7 serotipo estadounidenses están presentes y están en negrita y subrayado en la SEC ID NO: 5. Esta proteína recombinada se expresó usando el vector de expresión pET200 de Novagen. Una etiqueta de fusión de 37 aminoácidos está unido al amino terminal de la proteína.

**MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHPFTGSLPNNNGKQOQKKK
KGDGQPVNQLCOMLGKIIAQQNQSRGKGP GKKNKKKNPEKPHFPLATEDD
VRHHFTP SERQLCLSSIQTAFNQGAGTCTLS DSGRISYTV EFSLPTHHTVRLIR
VTAPPSA SEQ ID nº:5.**

Se eliminaron 21 aminoácidos del extremo amino de ORF7. Los aminoácidos 22 a 123 están presentes, el serotipo U.S. Los aminoácidos del ORF7 están en negrita y subrayado en la SEQ ID NO: 6. La proteína recombinada se expresó utilizando el vector de expresión pET200 de Novagen. El aminoácido número 25 (de la proteína completa del SRRP) - metionina (M) - se convierte en isoleucina (I) - para eliminar el sitio de iniciación de la traducción aberrante. Esta proteína lleva la misma etiqueta de fusión de 37 aminoácidos unida al extremo amino de la proteína.

**MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHPFTGSLCQILGKIIAQONQ
SRGKGP GKKNKKKNPEKPHFPLATEDDVRHHFTP SERQLCLSSIQTAFNOGA
GTCTLS DSGRISYTV EFSLPTHHTVRLIRVTAPPSA SEQ ID nº: 6.**

Se eliminaron 30 aminoácidos desde el extremo carboxi del ORF7 de serotipo U.S. Los aminoácidos 2 a 93 del ORF7 de serotipo U.S. están presentes y están en negrita y subrayados en la SEQ ID NO: 7. La proteína recombinada se expresa utilizando el vector de expresión pET200 de Novagen. Esta proteína lleva la misma etiqueta de fusión de 37 aminoácidos unida al extremo amino de la proteína. Esta proteína tiene una etiqueta adicional de 30 aminoácidos unida al extremo carboxilo que está codificada por el vector que no es del virus del SRRP.

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHPFTGSLPNNNGKQOKKK
KG DGQPVNQLCQMLGKIIAQONQSRGKGP GKKNKKKNPEKPHFPLATEDD
VRHHFTP SERQLCLSSIQTAFNOGAGTCTLSLESLEK GELNDPAANKARKEAE
LAAATAEQ SEQ ID nº:7

Ejemplo 2

Reactividad en la transferencia Western

Estos datos demuestran que el derivado por eliminación del terminal C de ORF7 U.S. (SEQ ID NO: 7) no reacciona con el suero porcino positivo en una transferencia Western, en tanto que el ORF7 de EE.UU completo y el derivado por eliminación del terminal N (también conocido como amino-terminal) de ORF 7 U.S. (SEQ ID NO: 6) ambos reaccionan con sueros porcinos positivos.

Tabla 3

	Sueros porcinos positivos	Sueros porcinos negativos
PEXUSorf7 (SEQ ID NO: 4)	Positivo	Negativo
ORF7 U.S. (SEQ ID NO: 5)	Positivo	Negativo
ORF7 U.S. derivado del terminal N (SEQ ID NO: 6)	Positivo	Negativo
ORF7 U.S. derivado del terminal C (SEQ ID NO: 7)	Negativo	Negativo

10 Ejemplo 3

Reactividad en ELISA

La proteína recombinada se expresó usando un sistema de expresión pET Studier utilizando métodos descritos por el fabricante (EMD Biosciences, Ind., Madison, WI 53719). Los genes que codifican las proteínas descritas anteriormente se clonaron en el sistema de expresión pET200 utilizando métodos descritos por el fabricante. Las proteínas recombinadas se expresan con una etiqueta de histidina en el extremo amino que está codificada por el vector que permite la purificación rápida por afinidad. La proteína se expresó y se purificó a partir de la cepa BL21 (estrella) de *E. coli* utilizando métodos descritos por el fabricante (EMD Biosciences).

Se recubrieron placas Immulon 1 durante la noche a 4°C con la proteína recombinada purificada a 1 µg/ml en tampón carbonato, pH 9,5. Las placas se vaciaron con "golpecitos" y palmaditas secas. Las placas se bloquearon durante la noche utilizando 2,5% de BSA en PBS. Se "dieron golpecitos" y palmaditas secas en las placas y se recubrieron con 2,5% de sacarosa en tampón Tris 10 mM (pH 7,5). Después de los golpecitos y palmaditas secas, las placas se secaron al vacío durante 4 horas y se almacenaron con desecante.

Las muestras se analizaron en estas placas de ELISA utilizando reactivos y métodos disponibles en el mercado del "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Antibody Test Kit" (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook ME, número de catálogo 06-04404-00). Los resultados demostraron que el derivado por eliminación del terminal N de la proteína ORF7 U.S. (SEQ ID NO: 6) reacciona de una manera similar a la proteína completa en un análisis ELISA (SEQ ID nº: 5).

Ejemplo 4

Los siguientes polipéptidos del ORF 7 del VSRRP de Lelystad se prepararon usando técnicas bien conocidas en la técnica. Las secuencias de una proteína con ORF7 de Lelystad están en negrita y subrayadas. Otros aminoácidos son parejas de fusión/etiquetas añadidas a estas proteínas recombinadas.

Secuencia de la beta-gal ORF7 de Lelystad expresada por el vector pEX4:

MEQRITLKEAWDRSGAWLLPVSLVKKRKTTLAPNTQTASPRALADSLMQLARQVS
 RLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDRPSQQLRSLNGEWRFAWFPAPEAVPESWLEC
 DLPEADTVVVPSNWQM HGYD APIYTNVTYPITVNPPFVPTENPTGCYSLTFNVDE
 SWLQEGQTRIFDGVNSAFHLWCNGRWVGYGQDSRLPSEFDLSAFLRAGENRLA
 VMVLRWSDGSYLEDDQDMWRMSGIFRDVSL LHKPTTQISDFHVATR FNDDFSRA
 VLEAEVQMC GELRDYLRVTVSLWQGETQVASGTAPFGGEI DERGGYADRVTLR
 LNVENPKLWSAEIPNLYRAVVELHTADGTLIEAEACDVGFREVRIENGLLLLNGK
 PLLIRGVNRHEHHPLHGQVMDEQTMVQDGD PKGF EFELGTL LAGKNOSOKKKK
STAPMGNGOPVNQLCOLLGAMIKSOROOPRGGOAKKKKPEKPHFPLAED
DIRHHLTQTERSLCLOSIQTAFNOGAGTASLSSSGKVSEFQVEFMLPVAHTVR
LIRVTSTASASOGARDPLE (SEQ ID nº:14)

Secuencia de His-ORF7 Lelystad expresa procedente del vector pET200.

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHPFTGL LAGKNOSOKKKKS
TAPMGNGOPVNQLCOLLGAMIKSOROOPRGGOAKKKKPEKPHFPLAEDD
IRHHLTQTERSLCLOSIQTAFNOGAGTASLSSSGKVSEFQVEFMLPVAHTVRLI
RVTSTASASOGAS (SEQ ID nº:15)

5 Secuencia de ORF7 de Lelystad truncado en el terminal N expresada procedente del vector pET200. Este péptido por eliminación del terminal N tiene 26 aminoácidos eliminados del extremo amino:

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHPFTGSC QLLGAIKSORO
OPRGGOAKKKKPEKPHFPLAEDDIRHHLTQTERSLCLOSIQTAFNOGAGT
ASLSSSGEVSEFQVEFMLPVAHTVRLIRVTSTASASOGAS (SEQ ID nº:16)

Secuencia del ORF7 de Lelystad truncado en His carboxi expresada procedente del vector pET200. Este péptido por eliminación del terminal C tiene 34 aminoácidos eliminados del extremo carboxilo:

MGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDDDDKDHPFTGL LAGKNOSOKKKKSTAPM
GNGOPVNQLCOLLGAMIKSOROOPRGGOAKKKKPEKPHFPLAEDDIRH
LTQTERSLCLOSIQTAFNOGAGTASLS (SEQ ID nº:17).

10 La reactividad de estos polipéptidos se ensayó utilizando una transferencia de Western. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

	Sueros porcinos positivos	Sueros porcinos negativos
PEXLSorf7 (SEQ ID NO: 14)	Positivo	Negativo
ORF7 de Lelystad completo (SEQ ID NO: 15)	Positivo	Negativo
ORF7 de Lelystad derivado por eliminación del terminal N (SEQ ID NO: 16)	Positivo	Negativo
ORF7 de Lelystad derivado por eliminación del terminal C (SEQ ID NO: 17)	Negativo	Negativo

Estos datos demuestran que el derivado por eliminación del terminal C de ORF7 de Lelystad no reacciona con sueros porcinos positivos en una transferencia Western, en tanto que el ORF7 de Lelystad completo y el derivado del ORF 7 de Lelystad por eliminación del terminal N reaccionan con sueros porcinos positivos.

5 Ejemplo 5

Reactividad en ELISA

La proteína recombinada se expresó usando un sistema de expresión pET de Studier utilizando métodos descritos por el fabricante (EMD Biosciences, Ind., Madison, WI. 53719). Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos descritos anteriormente se clonaron en el sistema de expresión pET200 usando métodos descritos por el fabricante.

- 10 Los polipéptidos recombinados se expresan con una etiqueta de histidina en el extremo amino terminal que está codificado por el vector que permite la purificación rápida por afinidad. La proteína se expresó y se purificó a partir de la cepa BL21 (estrella) de *E. coli* usando métodos descritos por el fabricante (EMD Biosciences). Se recubrieron placas Immulon 1 durante la noche a 4°C con proteína recombinada purificada a 1 µg/ml en tampón carbonato, pH 9,5. Las placas se vaciaron con "golpecitos" y palmaditas secas. Las placas se bloquearon durante la noche
- 15 utilizando 2,5% de BSA en PBS. Se "dieron golpecitos" y palmaditas secas en las placas y se recubrieron con 2,5% de sacarosa en tampón Tris 10 mM (pH 7,5). Después de los golpecitos y palmaditas secas, las placas se secaron al vacío durante 4 horas y se almacenaron con desecante. Las muestras se ensayaron en estas placas de ELISA utilizando reactivos y métodos disponibles en el mercado del "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Antibody Test Kit" (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook ME., número de catálogo 06-04404-00). Estos datos
- 20 demuestran que el derivado por eliminación del terminal N de la proteína del ORF7 de Lelystad es tan reactivo como la proteína completa en un análisis ELISA.

Ejemplo 6

Mejora de la especificidad de detección de anticuerpos utilizando antígeno orf7 de EE.UU. Truncado.

- 25 Se ensayó la inmunoreactividad en formato ELISA del polipéptido truncado en el terminal N del ORF7 U.S. (SEQ ID NO: 6) generado por expresión de la proteína recombinada y en comparación con el ORF7 U.S. completo (SEQ ID NO: 5). Las proteínas recombinadas de la SEQ ID NO: 5 y nº 6 se expresaron y purificaron como se describió anteriormente (Ejemplo 3). Se recubrieron placas Immulon® I con los polipéptidos como se describió anteriormente (Ejemplo 3). El recubrimiento de placas y las diluciones de anticuerpos secundarios se optimizaron para producir aproximadamente señales específicas equivalentes a la del análisis IDEXX HerdCheck® 2XR ELISA usando sueros
- 30 porcinos de referencia positiva. La reactividad frente a sueros porcinos seleccionados se evaluó mediante ELISA (véase la tabla 7).

- Se diseñaron muestras de sueros seleccionados como negativas para VSRRP por otra metodología que incluye IFA y PCR, sin embargo, presentaron reactividad en IDEXX HerdCheck® 2XR ELISA. Esto sugiere la presencia de señales inespecíficas en la placa 2XR. Las muestras de suero con estas características son falsos positivos en
- 35 IDEXX HerdCheck® 2XR ELISA y los expertos en la técnica de diagnóstico de SRRP las denominan normalmente "singletons". La eliminación de los 26 aminoácidos del terminal N del ORF7 U.S. dio como resultado un antígeno inmunorreactivo que presenta menor reactividad y mayor especificidad en comparación con el ORF7 U.S. completo (79% de especificidad frente a 69% de especificidad, respectivamente). El valor de DO₆₅₀ de ≤ 0,200 se determinó como valor umbral para el que se consideran negativas las muestras en base a la optimización de IDEXX
- 40 HerdCheck® 2XR empleando patrones de referencia positiva y negativa. El truncamiento de la parte del terminal amino del antígeno ORF7 U.S. produjo una reducción significativa de la señal inespecífica de los sueros porcinos.

Tabla 5

Antígeno U.S.				
		Completo		69% de especificidad
		Positivo	Negativo	
Terminal N	Positivo	12	2	
	Negativo	8	44	
79% de especificidad				

Ejemplo 7

Mejora de la especificidad de la detección de anticuerpos utilizando antígeno orf7 truncado de Lelystad

- 5 El ORF7 completo (SEQ ID NO: 15) de la cepa Lelystad del virus del SRRP, así como la versión truncada en el terminal N (SEQ ID NO: 16) se expresaron en *E. coli* y se aislaron para el análisis ELISA frente al suero porcino seleccionado como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 5). Se optimizaron el recubrimiento de placas y las diluciones del anticuerpo secundario (conjugado) para producir la señal específica que era aproximadamente equivalente a la del análisis IDEXX HerdCheck® 2XR ELISA utilizando sueros de referencia positiva. Muestras de
- 10 sueros seleccionados se denominaron negativas para VSRRP por otra metodología incluidas IFA y PCR, sin embargo, presentaban reactividad en IDEXX HerdCheck® 2XR ELISA.

- 15 La proteína con orf7 de Lelystad truncada en el terminal N presentó menor inmunorreactividad y mayor especificidad en comparación con la proteína con orf7 de Lelystad completa (62% de especificidad en comparación con el 42% de especificidad con respectivamente). Se determinó el valor de OD₆₅₀ de ≤ 0,200 como valor umbral para el que las muestras se consideran negativas en base a la optimización por IDEXX HerdCheck 2XR que emplea patrones de referencia positiva y negativa. El truncamiento de la porción terminal N del antígeno ORF7 de Lelystad produjo una reducción significativa en la señal inespecífica de los sueros porcinos.

Tabla 6

Antígeno Lelystad				
		Completo		42% de especificidad
		Positivo	Negativo	
Terminal N	Positivo	20	5	
	Negativo	18	23	
62% de especificidad				

ES 2 581 211 T3

Tabla 7 Reactividad de las muestras de suero "singletón" con polipéptidos con ORF7 completos y truncados en ELISA. Se muestran valores de DO₆₅₀ para polipéptidos completos (FL) y truncados en el terminal N (Trn). Una DO >0,2 es positiva (valores en negrita).

Muestra	Antígeno orf7 de U.S.		Antígeno orf7 de Lelystad	
	Trn	F.L.	Trn	F.L.
40840-2	0,176	0,214	0,077	0,071
4057:80-6	0,195	0,181	0,237	0,207
42635 - 44	0,068	0,064	0,081	0,073
42628-8	0,091	0,473	0,118	0,124
40860-23	0,119	0,156	0,171	0,176
42958-27	0,083	0,080	0,125	0,261
42945-2	0,082	0,090	0,080	0,203
4057:86F -8	0,102	0,089	0,338	0,572
4057:86F -10	0,094	0,080	0,273	0,439
4057:86F -1	0,098	0,086	0,334	0,560
4057:86F -5	0,100	0,095	0,309	0,488
4057:86F -6	0,108	0,094	0,313	0,562
4057:86F -9	0,095	0,083	0,330	0,521
4057:86F -3	0,100	0,083	0,317	0,515
024403-2	0,145	0,159	0,173	0,544
42449 - 68	0,039	0,039	0,041	0,041
4057:86F -7	0,100	0,086	0,333	0,556
4057:86F -4	0,097	0,083	0,304	0,509
021290-324	0,512	0,519	0,129	0,462
41134 - 11	0,117	0,121	0,272	0,290
019278-7	0,102	0,095	0,176	0,560
41423-13	0,095	0,087	0,101	0,086
39852-3	0,066	0,069	0,081	0,073
4057:80 - 1	0,124	0,115	0,135	0,305
019276-12	0,105	0,089	0,121	0,127
4057:80-2	0,151	0,243	0,205	0,177

ES 2 581 211 T3

019523-13	0,093	0,098	0,151	0,145
019323-4	0,084	0,076	0,109	0,336
42958 - 44	0,441	0,338	0,287	0,161
39470-31	0,227	0,192	0,160	0,205
019278-29	0,278	0,241	0,403	0,343
019972-28	0,522	0,382	0,437	0,288
41134-10	0,086	0,074	0,092	0,257
020570-17	0,107	0,094	1,176	0,635
022081-55	0,159	0,131	0,203	0,222
022081-53	0,208	0,939	0,243	0,224
P-5000-1	0,141	0,099	0,191	0,407
4057:80-5	0,135	0,152	0,207	0,163
P-5004	0,107	0,101	0,141	0,116
39472-8	0,593	0,679	0,080	0,077
39852-7	0,064	0,069	0,088	0,097
40860 -24	0,449	0,607	0,242	0,171
022081-37	0,110	0,789	0,170	0,531
022060-22	0,104	0,095	0,154	0,536
4057:80-4	0,595	0,594	0,210	0,185
019278-44	0,179	0,140	0,143	0,125
P 5003 -3	0,106	0,514	0,141	0,112
P 5003 -1	0,118	0,592	0,151	0,116
018911-13	1,344	1,127	0,152	0,143
P 5003 -2	0,112	0,578	0,154	0,115
034916-26	0,077	0,066	0,140	0,287
021687-8	0,074	0,080	0,121	0,763
4057:80-3	0,248	0,241	0,282	0,406
41423-25	0,086	0,091	0,095	0,073
P-5000 - 2	0,102	0,093	0,145	0,119
41932-8	0,066	0,071	0,090	0,754
019278-30	0,137	0,145	1,004	0,675

ES 2 581 211 T3

028676-58	0,092	0,084	0,107	0,131
42945 - 56	0,124	1,347	0,158	0,145
4057:80-7	1,163	1,217	0,454	0,674
021378-513	0,146	0,148	0,158	0,280
4057:80-8	0,209	0,196	0,142	0,185
019276-27	0,090	0,081	1,106	1,227
42635-10	1,502	1,585	0,155	0,099
018912-11	0,124	0,135	0,108	2,074
024177-3	0,120	0,104	0,155	0,346

Listado de secuencias

<110> Krah, Eugene R

<120> Péptidos para la detección de anticuerpos contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

5

<130> 04-980A

<150> 60/656348

<151> 2005-02-25

<160> 18

10 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 102

<212> PRT

<213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

15 <220>

<221> CARACT_MISC

<222> (4)..(4)

<223> X representa cualquier aminoácido.

<220>

20 <221> CARACT_MISC

<222> (11)..(11)

<223> X representa cualquier aminoácido.

<220>

<221> CARACT_MISC

25 <222> (99)..(99)

<223> X representa cualquier aminoácido.

<400> 1

ES 2 581 211 T3

Leu Cys Gln Xaa Leu Gly Lys Ile Ile Ala Xaa Gln Asn Gln Ser Arg
1 5 10 15

Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys Asn Pro Glu Lys Pro
20 25 30

His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg His His Phe Thr Pro
35 40 45

Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln Thr Ala Phe Asn Gln
50 55 60

Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly Arg Ile Ser Tyr Thr
65 70 75 80

Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val Arg Leu Ile Arg Val
85 90 95

Thr Ala Xaa Pro Ser Ala
100

<210> 2

<211> 140

<212> PRT

5 <213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

<220>

<221> CARACT_MISC

<222> (42)..(42)

<223> X puede ser cualquier aminoácido.

10 <220>

<221> CARACT_MISC

<222> (49)..(49)

<223> X puede ser cualquier aminoácido.

<220>

15 <221> CARACT_MISC

<222> (137)..(137)

<223> X puede ser cualquier aminoácido.

<400> 2

ES 2 581 211 T3

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

His Pro Phe Thr Gly Ser Leu Cys Gln Xaa Leu Gly Lys Ile Ile Ala
35 40 45

Xaa Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys
50 55 60

Lys Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val
65 70 75 80

Arg His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile
85 90 95

Gln Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser
100 105 110

Gly Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr
115 120 125

Val Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Xaa Pro Ser Ala
130 135 140

<210> 3

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

<400> 3

Met Pro Asn Asn Asn Gly Lys Gln Gln Lys Lys Lys Lys Gly Asp Gly
1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu Gly Lys Ile Ile Ala Gln
20 25 30

Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys
35 40 45

Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg
50 55 60

His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln
65 70 75 80

Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly
85 90 95

Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val
100 105 110

Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Pro Pro Ser Ala
115 120

10 <210> 4

<211> 533

<212> PRT

<213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

ES 2 581 211 T3

<400> 4

Met Glu Gln Arg Ile Thr Leu Lys Glu Ala Trp Asp Arg Ser Gly Ala
 1 5 10 15

Trp Leu Leu Pro Val Ser Leu Val Lys Arg Lys Thr Thr Leu Ala Pro
 20 25 30

Asn Thr Gln Thr Ala Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asp Ser Leu Met Gln
 35 40 45

Leu Ala Arg Gln Val Ser Arg Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro
 50 55 60

Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser
 65 70 75 80

Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe Pro
 85 90 95

Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Trp Leu Glu Cys Asp Leu Pro Glu
 100 105 110

Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr Asp
 115 120 125

Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro
 130 135 140

ES 2 581 211 T3

Phe Val Pro Thr Glu Asn Pro Thr Gly Cys Tyr Ser Leu Thr Phe Asn
 145 150 155 160
 Val Asp Glu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Gln Thr Arg Ile Ile Phe Asp
 165 170 175
 Gly Val Asn Ser Ala Phe His Leu Trp Cys Asn Gly Arg Trp Val Gly
 180 185 190
 Tyr Gly Gln Asp Ser Arg Leu Pro Ser Glu Phe Asp Leu Ser Ala Phe
 195 200 205
 Leu Arg Ala Gly Glu Asn Arg Leu Ala Val Met Val Leu Arg Trp Ser
 210 215 220
 Asp Gly Ser Tyr Leu Glu Asp Gln Asp Met Trp Arg Met Ser Gly Ile
 225 230 235 240
 Phe Arg Asp Val Ser Leu Leu His Lys Pro Thr Thr Gln Ile Ser Asp
 245 250 255
 Phe His Val Ala Thr Arg Phe Asn Asp Asp Phe Ser Arg Ala Val Leu
 260 265 270
 Glu Ala Glu Val Gln Met Cys Gly Glu Leu Arg Asp Tyr Leu Arg Val
 275 280 285
 Thr Val Ser Leu Trp Gln Gly Glu Thr Gln Val Ala Ser Gly Thr Ala
 290 295 300
 Pro Phe Gly Gly Glu Ile Ile Asp Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Asp Arg
 305 310 315 320
 Val Thr Leu Arg Leu Asn Val Glu Asn Pro Lys Leu Trp Ser Ala Glu
 325 330 335
 Ile Pro Asn Leu Tyr Arg Ala Val Val Glu Leu His Thr Ala Asp Gly
 340 345 350
 Thr Leu Ile Glu Ala Glu Ala Cys Asp Val Gly Phe Arg Glu Val Arg
 355 360 365
 Ile Glu Asn Gly Leu Leu Leu Leu Asn Gly Lys Pro Leu Leu Ile Arg
 370 375 380
 Gly Val Asn Arg His Glu His His Pro Leu His Gly Gln Val Met Asp
 385 390 395 400
 Glu Gln Thr Met Val Gln Asp Gly Asp Pro Met Pro Asn Asn Asn Gly
 405 410 415

ES 2 581 211 T3

Lys Gln Gln Lys Lys Lys Lys Gly Asp Gly Gln Pro Val Asn Gln Leu
420 425 430

Cys Gln Met Leu Gly Lys Ile Ile Ala Gln Gln Asn Gln Ser Arg Gly
435 440 445

Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys Asn Pro Glu Lys Pro His
450 455 460

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

Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln Thr Ala Phe Asn Gln Gly
485 490 495

Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly Arg Ile Ser Tyr Thr Val
500 505 510

Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val Arg Leu Ile Arg Val Thr
515 520 525

Ala Pro Pro Ser Ala
530

<210> 5

<211> 161

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Part of U.S. PRRSV serotype ORF7 with a 37 amino acid fusion tag is attached to amino terminus

<400> 5

Met Arg Gly Ser His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

His Pro Phe Thr Gly Ser Leu Pro Asn Asn Asn Gly Lys Gln Gln Lys
35 40 45

Lys Lys Lys Gly Asp Gly Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu
50 55 60

Gly Lys Ile Ile Ala Gln Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly
65 70 75 80

Lys Lys Asn Lys Lys Lys Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala
85 90 95

Thr Glu Asp Asp Val Arg His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu
100 105 110

10

ES 2 581 211 T3

Cys Leu Ser Ser Ile Gln Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys
 115 120 125

Thr Leu Ser Asp Ser Gly Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu
 130 135 140

Pro Thr His His Thr Val Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Pro Pro Ser
 145 150 155 160

Ala

<210> 6

<211> 140

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión que comprende parte del ORF7 del PRRSV de serotipo norteamericano; el aminoácido número 25 - metionina está convertido en isoleucina; una cola de fusión de 37 aminoácidos está unida al extremo amino de la proteína.

10 <400> 6

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
 1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
 20 25 30

His Pro Phe Thr Gly Ser Leu Cys Gln Ile Leu Gly Lys Ile Ile Ala
 35 40 45

Gln Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys
 50 55 60

Lys Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val
 65 70 75 80

Arg His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile
 85 90 95

Gln Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser
 100 105 110

Gly Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr
 115 120 125

Val Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Pro Pro Ser Ala
 130 135 140

<210> 7

<211> 161

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión que contiene parte del ORF7 de PRSSV norteamericano; una cola de fusión de 37 aminoácidos está presente en extremo amino de la proteína; una cola adicional de 30 aminoácidos codificada por el vector de expresión está unida al extremo carboxi.

20 <400> 7

ES 2 581 211 T3

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
 1 5 10 15
 Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
 20 25 30
 His Pro Phe Thr Gly Ser Leu Pro Asn Asn Asn Gly Lys Gln Gln Lys
 35 40 45
 Lys Lys Lys Gly Asp Gly Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu
 50 55 60
 Gly Lys Ile Ile Ala Gln Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly
 65 70 75 80
 Lys Lys Asn Lys Lys Lys Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala
 85 90 95
 Thr Glu Asp Asp Val Arg His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu
 100 105 110
 Cys Leu Ser Ser Ile Gln Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys
 115 120 125
 Thr Leu Ser Leu Glu Ser Leu Glu Lys Gly Glu Leu Asn Asp Pro Ala
 130 135 140
 Ala Asn Lys Ala Arg Lys Glu Ala Glu Leu Ala Ala Ala Thr Ala Glu
 145 150 155 160

Gln

<210> 8

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

<400> 8

Met Pro Asn Asn Asn Gly Lys Gln Thr Glu Glu Lys Lys Gly Asp Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu Gly Lys Ile Ile Ala Gln
 20 25 30
 Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys
 35 40 45
 Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg
 50 55 60
 His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln
 65 70 75 80
 Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly
 85 90 95
 Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val
 100 105 110
 Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Ser Pro Ser Ala
 115 120

ES 2 581 211 T3

<210> 9
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

5 <400> 9
 Met Pro Asn Asn Thr Gly Lys Gln Gln Lys Arg Lys Lys Gly Asp Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu Gly Lys Ile Ile Ala His
 20 25 30
 Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys
 35 40 45
 Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg
 50 55 60
 His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln
 65 70 75 80
 Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly
 85 90 95
 Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val
 100 105 110
 Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Pro Pro Ser Ala
 115 120

<210> 10
 <211> 123
 <212> PRT
 10 <213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

<400> 10
 Met Pro Asn Asn Asn Gly Lys Gln Gln Lys Lys Lys Lys Gly Asp Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu Gly Lys Ile Ile Ala Gln
 20 25 30
 Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys
 35 40 45
 Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg
 50 55 60
 His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln
 65 70 75 80
 Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly
 85 90 95
 Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val
 100 105 110
 Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Ser Pro Ser Ala
 115 120

<210> 11
 <211> 123
 15 <212> PRT

ES 2 581 211 T3

<213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

<220>

<221> CARACT_MISC

<222> (5)..(5)

5 <223> X representa cualquier aminoácido.

<220>

<221> CARACT_MISC

<222> (9)..(9)

<223> X representa cualquier aminoácido.

10 <220>

<221> CARACT_MISC

<222> (10)..(10)

<223> X representa cualquier aminoácido.

<220>

15 <221> CARACT_MISC

<222> (32)..(32)

<223> X representa cualquier aminoácido.

<220>

<221> CARACT_MISC

20 <222> (120)..(120)

<223> X representa cualquier aminoácido.

<400> 11

Met Pro Asn Asn Xaa Gln Lys Gln Xaa Xaa Glu Lys Lys Gln Asp Gln
1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu Gln Lys Ile Ile Ala Xaa
20 25 30

Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys
35 40 45

Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg
50 55 60

His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln
65 70 75 80

Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly
85 90 95

Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val
100 105 110

25 Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Xaa Pro Ser Ala
115 120

<210> 12

<211> 102

<212> PRT

<213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

30 <220>

<221> CARACT_MISC

<222> (7)..(7)

<223> X representa cualquier aminoácido.

<400> 12

ES 2 581 211 T3

Cys Gln Leu Leu Gly Ala Xaa Ile Lys Ser Gln Arg Gln Gln Pro Arg
1 5 10 15

Gly Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu
20 25 30

Ala Ala Glu Asp Asp Ile Arg His His Leu Thr Gln Thr Glu Arg Ser
35 40 45

Leu Cys Leu Gln Ser Ile Gln Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr
50 55 60

Ala Ser Leu Ser Ser Ser Gly Glu Val Ser Phe Gln Val Glu Phe Met
65 70 75 80

Leu Pro Val Ala His Thr Val Arg Leu Ile Arg Val Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Ala Ser Gln Gly Ala Ser
100

<210> 13

<211> 140

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido de ORF7 de PRRSV de Lelystad truncado en 5' con cola de His

<220>

<221> CARACT_MISC

10 <222> (45)..(45)

<223> X representa cualquier aminoácido

<400> 13

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

His Pro Phe Thr Gly Ser Cys Gln Leu Leu Gly Ala Xaa Ile Lys Ser
35 40 45

Gln Arg Gln Gln Pro Arg Gly Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys Pro Glu
50 55 60

Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Ala Glu Asp Asp Ile Arg His His Leu
65 70 75 80

Thr Gln Thr Glu Arg Ser Leu Cys Leu Gln Ser Ile Gln Thr Ala Phe
85 90 95

Asn Gln Gly Ala Gly Thr Ala Ser Leu Ser Ser Ser Gly Glu Val Ser
100 105 110

Phe Gln Val Glu Phe Met Leu Pro Val Ala His Thr Val Arg Leu Ile
115 120 125

Arg Val Thr Ser Thr Ser Ala Ser Gln Gly Ala Ser
130 135 140

<210> 14

ES 2 581 211 T3

<211> 551
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
5 <223> beta gal-ORF7 Lelystad expresado por el vector pEX4

<400> 14
Met Glu Gln Arg Ile Thr Leu Lys Glu Ala Trp Asp Arg Ser Gly Ala
1 5 10 15

Trp Leu Leu Pro Val Ser Leu Val Lys Arg Lys Thr Thr Leu Ala Pro
20 25 30

ES 2 581 211 T3

Asn Thr Gln Thr Ala Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asp Ser Leu Met Gln
 35 40 45

Leu Ala Arg Gln Val Ser Arg Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro
 50 55 60

Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser
 65 70 75 80

Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe Pro
 85 90 95

Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Trp Leu Glu Cys Asp Leu Pro Glu
 100 105 110

Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr Asp
 115 120 125

Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro
 130 135 140

Phe Val Pro Thr Glu Asn Pro Thr Gly Cys Tyr Ser Leu Thr Phe Asn
 145 150 155 160

Val Asp Glu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Gln Thr Arg Ile Ile Phe Asp
 165 170 175

Gly Val Asn Ser Ala Phe His Leu Trp Cys Asn Gly Arg Trp Val Gly
 180 185 190

Tyr Gly Gln Asp Ser Arg Leu Pro Ser Glu Phe Asp Leu Ser Ala Phe
 195 200 205

Leu Arg Ala Gly Glu Asn Arg Leu Ala Val Met Val Leu Arg Trp Ser
 210 215 220

Asp Gly Ser Tyr Leu Glu Asp Gln Asp Met Trp Arg Met Ser Gly Ile
 225 230 235 240

Phe Arg Asp Val Ser Leu Leu His Lys Pro Thr Thr Gln Ile Ser Asp
 245 250 255

Phe His Val Ala Thr Arg Phe Asn Asp Asp Phe Ser Arg Ala Val Leu
 260 265 270

Glu Ala Glu Val Gln Met Cys Gly Glu Leu Arg Asp Tyr Leu Arg Val
 275 280 285

Thr Val Ser Leu Trp Gln Gly Glu Thr Gln Val Ala Ser Gly Thr Ala
 290 295 300

ES 2 581 211 T3

Pro Phe Gly Gly Glu Ile Ile Asp Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Asp Arg
305 310 315 320

Val Thr Leu Arg Leu Asn Val Glu Asn Pro Lys Leu Trp Ser Ala Glu
325 330 335

Ile Pro Asn Leu Tyr Arg Ala Val Val Glu Leu His Thr Ala Asp Gly
340 345 350

Thr Leu Ile Glu Ala Glu Ala Cys Asp Val Gly Phe Arg Glu Val Arg
355 360 365

Ile Glu Asn Gly Leu Leu Leu Leu Asn Gly Lys Pro Leu Leu Ile Arg
370 375 380

Gly Val Asn Arg His Glu His His Pro Leu His Gly Gln Val Met Asp
385 390 395 400

Glu Gln Thr Met Val Gln Asp Gly Asp Pro Lys Gly Phe Glu Phe Glu
405 410 415

Leu Gly Thr Leu Ala Gly Lys Asn Gln Ser Gln Lys Lys Lys Lys Ser
420 425 430

Thr Ala Pro Met Gly Asn Gly Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Leu
435 440 445

Leu Gly Ala Met Ile Lys Ser Gln Arg Gln Gln Pro Arg Gly Gly Gln
450 455 460

Ala Lys Lys Lys Lys Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Ala Glu
465 470 475 480

Asp Asp Ile Arg His His Leu Thr Gln Thr Glu Arg Ser Leu Cys Leu
485 490 495

Gln Ser Ile Gln Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Ala Ser Leu
500 505 510

Ser Ser Ser Gly Lys Val Ser Phe Gln Val Glu Phe Met Leu Pro Val
515 520 525

Ala His Thr Val Arg Leu Ile Arg Val Thr Ser Thr Ser Ala Ser Gln
530 535 540

Gly Ala Arg Asp Pro Leu Glu
545 550

<210> 15

<211> 165

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> His-ORF7de PRRSV Lelystad expresado a partir del vector pET200

<400> 15

ES 2 581 211 T3

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

His Pro Phe Thr Gly Leu Ala Gly Lys Asn Gln Ser Gln Lys Lys Lys
35 40 45

Lys Ser Thr Ala Pro Met Gly Asn Gly Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys
50 55 60

Gln Leu Leu Gly Ala Met Ile Lys Ser Gln Arg Gln Gln Pro Arg Gly
65 70 75 80

Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala
85 90 95

Ala Glu Asp Asp Ile Arg His His Leu Thr Gln Thr Glu Arg Ser Leu
100 105 110

Cys Leu Gln Ser Ile Gln Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Ala
115 120 125

Ser Leu Ser Ser Ser Gly Lys Val Ser Phe Gln Val Glu Phe Met Leu
130 135 140

Pro Val Ala His Thr Val Arg Leu Ile Arg Val Thr Ser Thr Ser Ala
145 150 155 160

Ser Gln Gly Ala Ser
165

<210> 16

<211> 140

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> His-ORF7 truncado en 5' de PRRSV Lelystad expresado a partir del vector pET200

<400> 16

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp
20 25 30

10

ES 2 581 211 T3

His Pro Phe Thr Gly Ser Cys Gln Leu Leu Gly Ala Ile Ile Lys Ser
 35 40 45

Gln Arg Gln Gln Pro Arg Gly Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys Pro Glu
 50 55 60

Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Ala Glu Asp Asp Ile Arg His His Leu
 65 70 75 80

Thr Gln Thr Glu Arg Ser Leu Cys Leu Gln Ser Ile Gln Thr Ala Phe
 85 90 95

Asn Gln Gly Ala Gly Thr Ala Ser Leu Ser Ser Ser Gly Glu Val Ser
 100 105 110

Phe Gln Val Glu Phe Met Leu Pro Val Ala His Thr Val Arg Leu Ile
 115 120 125

Arg Val Thr Ser Thr Ser Ala Ser Gln Gly Ala Ser
 130 135 140

<210> 17

<211> 127

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> His-ORF7 truncado en 3' de PRRSV Lelystad expresado a partir del vector pET200

<400> 17

Met Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr Gly
 1 5 10 15

Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Asp Asp Asp Lys Asp His Pro Phe Thr
 20 25 30

Gly Leu Ala Gly Lys Asn Gln Ser Gln Lys Lys Lys Lys Ser Thr Ala
 35 40 45

Pro Met Gly Asn Gly Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Leu Leu Gly
 50 55 60

Ala Met Ile Lys Ser Gln Arg Gln Gln Pro Arg Gly Gly Gln Ala Lys
 65 70 75 80

Lys Lys Lys Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Ala Glu Asp Asp
 85 90 95

Ile Arg His His Leu Thr Gln Thr Glu Arg Ser Leu Cys Leu Gln Ser
 100 105 110

Ile Gln Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Ala Ser Leu Ser
 115 120 125

10 <210> 18

<211> 102

<212> PRT

<213> Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

<220>

15 <221> CARACT_MISC

<222> (7)..(7)

<223> X representa cualquier aminoácido

ES 2 581 211 T3

<400> 18

Cys Gln Leu Leu Gly Ala Xaa Ile Lys Ser Gln Arg Gln Gln Pro Arg
1 5 10 15

Gly Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu
20 25 30

Ala Ala Glu Asp Asp Ile Arg His His Leu Thr Gln Thr Glu Arg Ser
35 40 45

Leu Cys Leu Gln Ser Ile Gln Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr
50 55 60

Ala Ser Leu Ser Ser Ser Gly Glu Val Ser Phe Gln Val Glu Phe Met
65 70 75 80

Leu Pro Val Ala His Thr Val Arg Leu Ile Arg Val Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Ala Ser Gln Gly Ala Ser
100

REIVINDICACIONES

1. Una composición de materia que comprende un polipéptido purificado que consiste en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 18.
2. La composición de materia de la reivindicación 1, en donde el polipéptido purificado está en forma multimérica.
- 5 3. La composición de materia de la reivindicación 1, que comprende además un vehículo.
4. Una composición de materia que comprende un polipéptido purificado que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 18 como única secuencia del ORF7 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (VSRRP) unida a un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas o una de sus combinaciones.
- 10 5. La composición de materia de la reivindicación 4, en donde el polipéptido purificado consiste en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 13.
6. Un polipéptido de fusión purificado que comprende una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 18 como única secuencia del ORF7 del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (VSRRP) y un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas o una de sus combinaciones.
- 15 7. El polipéptido de fusión purificado de la reivindicación 6, en donde SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 18 está en forma multimérica.
- 20 8. El polipéptido de fusión purificado de la reivindicación 6, en donde el polipéptido purificado consiste en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 13.
9. Un polinucleótido purificado que codifica el polipéptido purificado de la reivindicación 1 o la reivindicación 4.
10. Un polinucleótido purificado que codifica el polipéptido de fusión purificado de la reivindicación 6.
11. Un método de detección de anticuerpos que se unen específicamente al virus del síndrome reproductivo y respiratorio (VSRRP) o a un polipéptido del VSRRP, que comprende:
- 25 (a) poner en contacto una composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 4 o un polipéptido de fusión purificado de la reivindicación 6 o una de sus combinaciones, con una muestra analítica que se sospecha que comprende anticuerpos específicos para VSRRP, en condiciones que permiten formar complejos polipéptido/anticuerpo;
- 30 (b) detectar complejos polipéptido/anticuerpo;
- en donde la detección de complejos polipéptido/anticuerpo es una indicación de que los anticuerpos específicos para VSRRP están presentes en la muestra analítica, y en donde la ausencia de complejos polipéptido/anticuerpo es una indicación de que los anticuerpos específicos para PRSSV no están presentes en la muestra analítica.
12. El método de la reivindicación 11, que comprende además poner en contacto los complejos de (a) con un reactivo indicador antes de la realización de (b).
- 35 13. El método de la reivindicación 11, en donde los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos.
14. El método de la reivindicación 11, en donde se determina la cantidad de anticuerpo en la muestra analítica.
15. El método de la reivindicación 11, en donde el polipéptido está unido a un sustrato.
16. El método de la reivindicación 11, en donde el polipéptido está en forma multimérica.
- 40 17. El método de la reivindicación 11, en donde la muestra analítica comprende una muestra biológica obtenida de un mamífero.
18. El método de la reivindicación 11, en donde el método comprende un análisis seleccionado del grupo de análisis que consiste en un análisis de unión cromatográfico de flujo reversible, un análisis inmunosorbente con enzima ligada, un radioinmunoanálisis, un análisis de hemaglutinación, un análisis de transferencia Western, un inmunoanálisis de polarización de fluorescencia, y un análisis de inmunofluorescencia indirecta.
- 45 19. Un método de detección de una infección por virus del síndrome reproductivo y respiratorio (VSRRP) en un mamífero que comprende:

- (a) poner en contacto una composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 4 o un polipéptido de fusión purificado de la reivindicación 6 o una de sus combinaciones, con una muestra biológica en condiciones que permiten formar complejos polipéptido/anticuerpo;
- (b) detectar complejos polipéptido/anticuerpo;
- 5 en donde la detección de complejos polipéptido/anticuerpo es una indicación de que el mamífero tiene una infección por VSRRP y en donde la ausencia de complejos polipéptido/anticuerpo es una indicación de que el mamífero no tiene una infección por PRSSV.
20. El método de la reivindicación 19, que comprende además poner en contacto los complejos polipéptido/anticuerpo de (a) con un reactivo indicador que genera una señal mensurable antes de la realización de
10 (b).
21. Un método para disminuir la incidencia de falsos positivos en un análisis de diagnóstico que detecta anticuerpos contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino VSRRP específicos para ORF7 de VSRRP que comprende:
- 15 utilizar un polipéptido ORF7 de VSRRP que comprende, en comparación con el ORF7 completo, una eliminación de aproximadamente 19 a aproximadamente 28 aminoácidos procedentes del terminal amino como antígeno de captura de anticuerpos en el análisis de diagnóstico.
22. El método de la reivindicación 21, en donde el polipéptido ORF7 de VSRRP es la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 18.
23. El método de la reivindicación 21, en donde el polipéptido comprende además en ambos terminales un reactivo
20 indicador, un espaciador de aminoácidos, un enlazador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas o una de sus combinaciones.
24. El método de la reivindicación 21, en donde el polipéptido consiste en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 13.