

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 861**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2010 E 14177727 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2818182**

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

30 Prioridad:

21.12.2009 US 288401 P

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

29.09.2016

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
395 Pine Tree Road Suite 310 CCTEC
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 584 861 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevas composiciones de neumovirus y procedimientos para su utilización

5 CAMPO DE LA INVENCION

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

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

[0003] L. C. Thorpe; *Journal Of General Virology*, Vol. 86 (1), 1 enero 2005, páginas 159-169, describe la secuencia genómica de la cepa no patogénica 15 del virus de neumonía de ratones y la comparación con el genoma de la cepa patogénica J3666.

[0004] Joseph B Domachowske et al., *The Journal of Infectious Diseases*, 1 julio 2002, describe la expresión diferencial de genes de citoquinas proinflamatorias in vivo en respuesta a infecciones por neumovirus patogénicos y no patogénicos.

[0005] E Dubovi et al., GenBank, 31 octubre 2012, proporciona "JB831676.1" en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JB831676?%3Fdb=nucleotide>

[0006] E Dubovi et al., GenBank, 18 octubre 2012, proporciona "JB831676" en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JB831676?%3Fdb=nucleotide>

[0007] Stephanie F. Glineur et al., *Virology*, Vol. 443(2), 1 septiembre 2013, páginas 257-264, describe pneumovirus nuevos (PnVs): Evolución y patología inflamatoria.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0008] La presente invención (definida en las reivindicaciones) se basa en el descubrimiento de nuevos neumovirus. Los virus pueden infectar diferentes tipos de mamíferos, incluyendo, pero no necesariamente limitado a, perros, gatos y probablemente humanos. La presencia del virus se puede correlacionar positivamente con la enfermedad respiratoria aguda de los caninos (ARDC), o con enfermedades respiratorias en felinos, o con trastornos respiratorios o de otro tipo en seres humanos u otros mamíferos.

[0009] La presente invención proporciona una composición que comprende un polinucleótido de ARN aislado que es al menos un 96% idéntico sobre la longitud completa de la secuencia de SEQ ID NO: 2 ó 3. La presente invención también proporciona una composición que comprende el ADN equivalente de dicho polinucleótido de ARN aislado, en el que cada uracilo en el polinucleótido está sustituido por timina.

[0010] La presente invención proporciona además un procedimiento *in vitro* de determinación de si un canino o felino está infectado con un pneumovirus, que comprende determinar la presencia de un polinucleótido en una muestra biológica obtenida del canino o felino, en el que la presencia del polinucleótido es indicativa de que el canino o felino está infectado con un virus de pneumonia; en el que el polinucleótido es un polinucleótido de ARN que es al menos un 96% idéntico sobre la longitud completa de la secuencia de SEQ ID NO: 2 ó 3; o el ADN equivalente del mismo, en el que cada uracilo en el polinucleótido está sustituido por timina.

[0011] La presente invención proporciona además un procedimiento *in vitro* de determinación de si un felino está infectado con un pneumovirus, que comprende determinar la presencia de una proteína codificada por el complemento inverso de SEQ ID NO: 2 ó 3 en una muestra biológica obtenida del felino, en el que la presencia de la proteína es indicativa de que el felino está infectado con un virus de pneumonia.

[0012] La descripción proporciona polinucleótidos aislados y proteínas de los virus, así como los propios virus aislados. La descripción incluye composiciones y procedimientos para detectar virus, y procedimientos y composiciones para la profilaxis y/o tratamiento de signos de la enfermedad que están correlacionados positivamente con la presencia de los virus. También se proporcionan células aisladas que comprenden el virus o virus.

[0013] Los virus aquí descritos son virus de ARN de cadena negativa. La descripción incluye cadenas negativas aisladas, las cadenas positivas que tienen complementariedad inversa a las cadenas negativas, los equivalentes de ADN de los polinucleótidos de ARN, proteínas que son codificadas por las cadenas positivas, y fragmentos de los polinucleótidos y las proteínas.

[0014] En ciertos ejemplos, los virus aislados contienen un polinucleótido de cadena negativa que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que es al menos un 96% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1. También se proporcionan polinucleótidos aislados que comprenden la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3, o un polinucleótido que tiene una secuencia que es al menos un 96% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 2 ó 3.

[0015] La descripción proporciona un procedimiento de estimulación de una respuesta inmunitaria en un mamífero. La respuesta inmunitaria estimulada puede estar mediada por la célula, humoral o combinaciones de las mismas, y puede proporcionar una ventaja profiláctica y/o terapéutica al animal. El procedimiento de estimulación de una respuesta inmunitaria comprende administrar a un mamífero una composición que comprende un polinucleótido y/o virus descrito en el presente documento, una proteína viral codificada por los polinucleótidos virales descritos en este documento, un fragmento de dicha proteína, o combinaciones de los mismos. Los polinucleótidos, virus y/o las proteínas y/o fragmentos de los mismos se pueden aislar de cualquier fuente adecuada o se pueden producir recombinantemente utilizando técnicas conocidas.

[0016] La invención proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia del virus en una muestra biológica obtenida de un canino o felino, tal como se define en las reivindicaciones. El procedimiento comprende detectar de la muestra biológica una secuencia de polinucleótido comprendida por el virus, o una proteína viral o fragmento de los mismos, tal como se define en las reivindicaciones. La presencia del polinucleótido, proteína, fragmento de proteína o combinación de los mismos es indicativa de que el mamífero está infectado con el virus.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0017]

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

Figura 2. Ensayo de inmunofluorescencia que muestra la reactividad de un suero canino seleccionado al azar sometido a pruebas no relacionadas con la respiración frente a células A72 caninas infectadas y no infectadas. A) Suero en células infectadas a una dilución de 1:320. B) suero en células no infectadas a una dilución de 1:320. El fondo rojo se produce mediante contratinción con azul de Evan.

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

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0018] La presente descripción proporciona nuevos virus aislados, polinucleótidos aislados y proteínas de los virus, composiciones y procedimientos para la detección de los virus, y composiciones y procedimientos para la profilaxis y/o tratamiento de signos de la enfermedad que están correlacionados positivamente con la presencia de los virus en un mamífero.

[0019] Los virus descritos en el presente documento son virus de ARN de cadena negativa (menos). Por lo tanto, el material genético empaquetado en el virión es una sola cadena de ARN que es el complemento inverso de una cadena positiva. La cadena positiva se transcribe a partir de la cadena negativa por una ARN polimerasa dependiente de ARN. La cadena positiva funciona, al menos en parte, como un ARNm en que las proteínas virales codificadas por la cadena positiva se traducen en el citoplasma de las células infectadas, y a continuación participa en el ensamblaje de nuevas partículas virales y empaquetamiento de genomas de cadena negativa.

[0020] En ciertos ejemplos, la descripción proporciona virus aislados que contienen un polinucleótido de cadena negativa aislado que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que es al menos un 96% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1. La descripción incluye también polinucleótidos que son complementarios a la cadena negativa. Además, estos polinucleótidos comprenden la secuencia presentada en la SEQ ID NO: 4, o una secuencia que es al menos un 96% idéntica a SEQ ID NO: 4. También se proporcionan polinucleótidos aislados que

comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que es al menos un 96% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1, o que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 4, o una secuencia que es al menos un 96% idéntica a SEQ ID NO: 4. También se proporcionan polinucleótidos que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3. La composición de la invención comprende un polinucleótido que tiene una secuencia que es al menos un 96% idéntica sobre la longitud completa de la secuencia de SEQ ID NO: 2 ó 3. Los complementos inversos de estas secuencias y las secuencias que tienen al menos un 96% de identidad con los complementos inversos se describen en el presente documento. Las combinaciones de todos los polinucleótidos y proteínas y fragmentos de los mismos descritos en el presente documento también se describen en el presente documento. Los polinucleótidos virales en las composiciones de la invención se pueden caracterizar porque actúan para soportar la replicación en los virus vivos (incluyendo virus atenuados).

[0021] También se proporcionan células que contienen los virus. En varias realizaciones, las células que comprenden los virus son células aisladas, o células que se propagan in vitro para atenuar los virus, y/o como una fuente de los virus para utilizar como vacunas u otros objetivos. De este modo, las células aisladas que comprenden los virus, cultivos celulares y/o líneas celulares que comprenden los virus, virus, y/o productos virales presentes en el medio de cultivo celular, y tejidos aislados que comprenden los virus están todos descritos en el presente documento.

[0022] Se proporciona el equivalente de ADN de cada secuencia de ARN descrita en la invención. Por lo tanto, la descripción incluye cada secuencia de ARN descrita en este documento, donde cada U (uracilo) en el ARN se sustituye por T (timina). Cada uno de los polinucleótidos virales descritos en la presente invención incluye polinucleótidos que son idénticos a la secuencia presentada en la SEQ ID NO designada para cada polinucleótido, y se incluyen adicionalmente todos los polinucleótidos que son al menos un 96% idénticos a las secuencias presentadas en las SEQ ID NOs virales. En realizaciones particulares, los polinucleótidos que son al menos un 96% idénticos a las secuencias de polinucleótidos presentadas en la lista de secuencias son al menos un 96% idénticos a las secuencias en toda su longitud. Sin pretender estar ligado por ninguna teoría particular, se considera que las secuencias de polinucleótidos presentadas en el presente documento y que incluyen aquellas que tienen una identidad de al menos un 96% a las secuencias de polinucleótidos virales establecidas en el listado de secuencias, son distintas de los polinucleótidos que están comprendidos por virus relacionados, tales como los virus que ya son conocidos por infectar mamíferos murinos. También se considera, de nuevo sin pretender quedar ligado por ninguna teoría en particular, que la atenuación de los virus mediante, por ejemplo, pasos en serie, puede dar lugar a virus que comprenden y/o transcriben polinucleótidos que son al menos un 96% idénticos a las secuencias presentadas en el listado de secuencias. Las secuencias que no son idénticas a las secuencias enumeradas específicamente en el listado de secuencias pueden ser entre un 96,0% y un 99,9% idénticas a las secuencias presentadas, incluyendo todos los números enteros hasta el primer punto decimal entre los mismos. Todos los intervalos de identidad de secuencia entre 96,0% y 100%, ambos inclusive, son también realizaciones de la invención.

[0023] Los fragmentos de los polinucleótidos también se describen en el presente documento. Por lo tanto, en varias realizaciones, cada polinucleótido viral (incluyendo los complementos inversos y equivalentes de ADN de los mismos) incluye fragmentos de los polinucleótidos que varían en longitud desde 10 nucleótidos a toda la longitud del polinucleótido, e incluyendo todos los números enteros entre los mismos. Por ejemplo, la descripción incluye polinucleótidos que comprenden la secuencia SEQ ID NO: 1 e incluyendo todos los fragmentos de esa secuencia que se encuentran entre e incluyen 10 nucleótidos, hasta 8.598 nucleótidos de longitud, e incluyendo todos los números enteros entre los mismos. Los polinucleótidos de la descripción, estén o no presentes en los viriones, pueden ser más largos que los descritos en este documento, ya que las secuencias presentadas no pueden incluir la secuencia de los genomas virales completos y/o los complementos inversos y/o equivalentes de ADN de los mismos.

[0024] La descripción también proporciona un procedimiento para estimular una respuesta inmune en un mamífero. La respuesta inmune estimulada es una respuesta inmune que puede proporcionar un beneficio profiláctico y/o terapéutico al animal. La respuesta inmune estimulada puede ser una respuesta inmune humoral y/o mediada por células. La respuesta inmune estimulada puede dirigirse contra cualquier antígeno y/o inmunógeno codificado por el virus. Así, las partículas intactas virales, cada proteína viral, y fragmentos de las proteínas virales son realizaciones de la descripción que se pueden utilizar para estimular respuestas inmunes en mamíferos. En diversas realizaciones, los animales en los que se estimula la respuesta inmune son *Canis familiaris* o *Felis catus*, es decir, perros o gatos domesticados, respectivamente.

[0025] En ejemplos particulares, el polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que es al menos 96% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 1, o una proteína o fragmento de proteína codificada en la misma, o una partícula viral codificada por el complemento inverso de SEQ ID NO: 1, se utiliza para estimular una respuesta inmune en un canino. El polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3, o un polinucleótido que tiene una secuencia que es al menos 96% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 2 o 3, o una proteína o fragmento de proteína o una proteína viral codificada por el complemento inverso de SEQ ID NO: 2 o 3 o un polinucleótido que tiene una secuencia que es al menos 96% idéntica al complemento inverso de SEQ ID NO: 2 o 3, se usan preferiblemente para estimular una respuesta inmune en los felinos. La misma relación entre estas secuencias, proteínas, fragmentos de proteínas, y partículas virales a los caninos y felinos se aplica al uso de

estas composiciones para fines de diagnóstico, pero esto no significa de ninguna manera disminuir la idoneidad para la práctica de la invención sobre otros mamíferos, incluyendo los seres humanos.

5 [0026] El procedimiento de estimulación de una respuesta inmune comprende administrar al mamífero una composición que comprende un virus descrito en este documento, una proteína viral codificada por los polinucleótidos virales descritos en el presente documento, un fragmento de dicha proteína, o combinaciones de los mismos. Los virus y/o las proteínas y/o fragmentos de los mismos se pueden aislar a partir de cualquier fuente adecuada, o pueden ser producidos de manera recombinante usando técnicas bien conocidas. En diversas realizaciones, las proteínas virales descritas en este documento para su uso en vacunas incluyen, pero no se limitan necesariamente a las proteínas NS-1, NS-2, N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2, L, y combinaciones de las mismas. 10 Todas las secuencias de nucleótidos que codifican estas proteínas se incluyen en la descripción y pueden ser determinadas por los expertos en la materia utilizando técnicas rutinarias.

15 [0027] El mamífero al que se administra una composición de la descripción puede ser cualquier mamífero que está en riesgo de, se sospecha que tiene, o ha sido diagnosticado con una afección, que está correlacionado positivamente con la presencia de uno o más virus de neumonía, incluyendo, pero no necesariamente limitado a, los virus descritos en este documento. En un ejemplo, el animal es un perro que está en riesgo de, se sospecha que tiene o que ha sido diagnosticado con ARDC. En otro ejemplo, el mamífero es un ser humano que está en riesgo de, se sospecha que tiene o está diagnosticado con un trastorno respiratorio o cualquier otro trastorno que se puede 20 asociar positivamente con un virus descrito en este documento. A este respecto, se sabe en la técnica que virus relacionados con los virus recientemente descubiertos descritos en este documento, tales como el virus de la neumonía murina, puede resultar en una infección generalizada de los seres humanos (véase, por ejemplo, Pringle CR, Eglin RP. Murine pneumonia virus: seroepidemiological evidence of widespread human infection. J. Gen Virol. 1986 Jun; 67 (Pt 6): 975-82). Por lo tanto, es razonable considerar las composiciones y procedimientos proporcionados en el presente documento que tienen utilidad para la estimulación de respuestas inmunes en seres humanos y para el uso en el diagnóstico de infecciones virales en los seres humanos. 25

[0028] La administración de una composición de la descripción, es decir, una vacuna, a un animal puede resultar en un efecto profiláctico, lo que significa que la probabilidad de infección es menor en los animales que han recibido la vacuna con respecto a los animales que no, o los signos de la enfermedad que se correlacionan positivamente con la presencia del virus en el animal son menos graves con respecto a un animal que no ha recibido la vacuna. La administración de una vacuna de la descripción también puede tener un efecto terapéutico, lo que significa que el grado de infección (es decir, la carga o título viral y/u otros marcadores del grado de infección que son conocidos para los expertos en la materia) es menor en un animal infectado con posterioridad a la recepción de la vacuna en relación con un animal infectado que no recibe la vacuna Asimismo, los signos de la enfermedad que se correlacionan positivamente con la presencia del virus en el animal puede ser menos graves en un animal infectado que ha recibido la vacuna en relación con un animal que no. 30 35

[0029] Los virus y/o las proteínas y los polinucleótidos descritos en este documento pueden aislarse, lo que significa que se han eliminado de su ambiente natural, por ejemplo, mediante la separación de los virus de un animal y/o una muestra biológica obtenida del animal. En una realización, una célula aislada que comprende un virus descrito en este documento se considera que comprende un virus aislado. Además, el virus y/o proteínas y/o fragmentos de los mismos aislados como se describen en este documento, y/o los polinucleótidos aislados y/o recombinantes de la invención pueden purificarse hasta cualquier grado deseado de purificación. Las composiciones descritas en este documento pueden comprender, consistir o consistir esencialmente en los virus, proteínas virales, fragmento o fragmentos de los mismos, y/o polinucleótidos, fragmentos de los polinucleótidos y/o combinaciones de los mismos. Las composiciones de la invención pueden comprender, consistir, o consistir esencialmente en los polinucleótidos virales. 40 45

50 [0030] En un ejemplo, el procedimiento comprende administrar a un canino una composición que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o un polinucleótido que tiene una secuencia que es al menos 96% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO : 1, de manera que una respuesta inmune dirigida contra el virus es estimulada en el canino. El polinucleótido se puede administrar como una vacuna de ADN. Los procedimientos para fabricar, formular composiciones farmacéuticas que comprenden vacunas de ADN, y administrar composiciones que comprenden vacunas de ADN son conocidos en la técnica. En un ejemplo, el polinucleótido que se administra al canino está presente en una partícula viral. La partícula viral puede ser aislada y/o recombinante. El virus que se administra al canino contiene una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es parte de una proteína comprendida por la partícula viral. Las secuencias de aminoácidos predichas de las proteínas virales comprendidas por la partícula viral tal como se codifican por el genoma viral incluyen la proteína viral canina NS1, la proteína no estructural 1 (SEQ ID NO: 7), NS2, proteína no estructural 2 (SEQ ID NO: 8), N, nucleoproteína (SEQ ID NO: 9), P, fosfoproteína (SEQ ID NO: 10), M, proteína de la matriz (SEQ ID NO: 11), SH, proteína hidrófoba pequeña (SEQ ID NO: 12), G, proteína de unión (SEQ ID NO: 13), F, proteína de fusión (SEQ ID NO: 14), M2, proteínas de la matriz M2-1 (SEQ ID NO: 15) y M2-2 (SEQ ID NO: 16), L, ANA-polimerasa dependiente de ARN, para la que se proporciona una secuencia parcial (SEQ ID NO: 17). Las versiones felinas del virus de estas proteínas se describen también en el presente documento. 55 60 65

[0031] En otro ejemplo, el procedimiento comprende administrar a un felino un virus con una composición que contiene un polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3, o un polinucleótido que tiene una secuencia que es al menos 96% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 2 o 3, de manera que una respuesta inmune dirigida contra el virus es estimulada en el felino. En un ejemplo, el polinucleótido que se administra al felino está presente en una partícula viral. La partícula puede ser aislada y/o recombinante.

[0032] En varios ejemplos, el virus que se administra al felino contiene una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

[0033] En ciertos ejemplos, se describe en el presente documento una vacuna que puede proporcionar un efecto profiláctico y/o terapéutico dirigido contra la infección por un virus. La vacuna puede contener un virus vivo o muerto (inactivado) o fragmentos del mismo. Los virus muertos son virus que no pueden replicarse. Los virus muertos se pueden preparar usando cualquiera de una variedad de técnicas que son bien conocidas para los expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, la inactivación por calor y la modificación de las proteínas y/o ácidos nucleicos virales, cuyos procedimientos pueden incluir, pero no están necesariamente limitados a, la exposición a paraformaldehído, formalina y luz ultravioleta. Por ejemplo, las proteínas virales se pueden modificar covalentemente mediante, por ejemplo, agentes de reticulación que pueden modificar las proteínas virales con el fin de evitar una o más etapas necesarias para la entrada y/o replicación celular viral. Se considera que los virus vivos incluyen virus atenuados. Los virus atenuados son las que presentan una virulencia reducida en relación a su forma no atenuada. Por lo tanto, los virus atenuados pueden replicarse, pero sólo lentamente en relación a virus no atenuados del mismo tipo, y por lo tanto generalmente no causan enfermedades. Los expertos en la materia entenderán éstas y otras distinciones entre los virus no atenuados, atenuados y muertos de manera que pueden diferenciarse unos de otros.

[0034] La atenuación de un virus se puede obtener usando cualquier técnica estándar. En una realización, el virus se atenúa mediante pases en serie en cultivo de células de mamífero. Los pases en serie pueden resultar en la atenuación a través de una variedad de mecanismos. Cualquier célula que soporta la replicación del virus, incluyendo, pero no limitado a, células humanas, pueden utilizarse en los pases para el objetivo de la propagación y/o la atenuación viral. En varios ejemplos no limitativos, los cultivos de células para los pases pueden obtenerse o derivarse de caninos o felinos, tales como de *Canis familiaris* o *Felis catus*, respectivamente. En un ejemplo, las células son cultivos de células primarias. En una realización, las células están comprendidas por la línea celular A-72 derivada de canino que tiene la American Type Culture Collection (ATCC) número de catálogo CRL-1542. Se puede utilizar cualquier número de pases adecuados para la atenuación del virus. Los expertos en la materia serán capaces de determinar los parámetros de pases para la atenuación de los virus dado el beneficio de la presente descripción. En general, pueden utilizarse entre 5-150 pases, incluyendo todos los números enteros entre los mismos, y preferiblemente entre 20-50 pases.

[0035] Las composiciones que contienen virus pueden proporcionarse como preparaciones farmacéuticas para uso como vacunas. Las composiciones que contienen los virus se pueden preparar como una suspensión o en una forma liofilizada y pueden contener adicionalmente vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables utilizados habitualmente para dichas composiciones. Algunos ejemplos de vehículos y diluyentes adecuados para su uso con la invención se pueden encontrar en: Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2005) 21 Edición, Filadelfia, PA. Lippincott Williams & Wilkins. Ejemplos específicos no limitativos de vehículos incluyen estabilizantes, conservantes y tampones. Ejemplos específicos no limitativos de estabilizantes incluyen hidratos de carbono (tales como sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, dextrano, glutamato o glucosa), proteínas (tales como suero de leche seco, albúmina o caseína) o productos de degradación de los mismos. Los ejemplos no limitativos específicos adecuados de tampones incluyen fosfatos de metales alcalinos. Los ejemplos no limitativos específicos adecuados de conservantes son timerosal, mertiolato y gentamicina. Los ejemplos no limitativos específicos adecuados de diluyentes incluyen agua, tampón acuoso (tal como, solución salina tamponada), alcoholes y polioles (tal como glicerol).

[0036] Los expertos en la materia entenderán que las preparaciones de vacuna proporcionadas en este documento pueden comprender uno o más compuestos con actividad adyuvante. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan necesariamente a, adyuvante incompleto de Freund, dipéptido de treonil muramilo, hidróxido de aluminio, fosfato u óxido, emulsión de aceite-en-agua o agua-en-aceite a base de, por ejemplo, un aceite mineral o un aceite vegetal, tal como acetato de vitamina E, y saponinas.

[0037] Las vacunas descritas en el presente documento se pueden administrar a través de cualquier vía adecuada. En varios ejemplos, las vacunas se pueden administrar por vía parenteral, intramuscular o subcutánea, por vía intravenosa o por vía oral, incluyendo, pero no necesariamente limitado a, por vía nasal. Los expertos en la materia entenderán que las cantidades eficaces de las vacunas pueden determinarse usando consideraciones comunes, tales como el tipo, el tamaño, la edad, el entorno, el riesgo de o fase de infección, del animal en el que se desea la respuesta inmune estimulada. En general, las vacunas vivas de acuerdo con la invención se pueden administrar en una dosis de 10^1 - 10^6 unidades formadoras de placa (pfu) por animal, por ejemplo en una dosis de 1 ml. Las vacunas inactivadas pueden contener el equivalente antigénico de 10^6 - 10^{10} pfu por animal.

- 5 [0038] Los polinucleótidos de la descripción pueden modificarse para portar un gen/genes heterólogos, que pueden, por ejemplo, proporcionar inmunización contra no sólo los virus descritos en este documento, sino también contra otros virus relacionados o no relacionados y/u otros agentes infecciosos. Del mismo modo, las formulaciones de vacunas proporcionadas en el presente documento también pueden comprender agentes inmunogénicos que están destinados a estimular la respuesta inmune contra agentes infecciosos que son distintos de los virus descritos en este documento. Por lo tanto, la descripción contempla vacunas de combinación para su uso en diversos mamíferos y contra diversos agentes infecciosos. Las vacunas de combinación pueden incluir proteínas de fusión que comprenden toda o una parte de las proteínas virales descritas en este documento, y que pueden contener secuencias de polipéptidos de otras proteínas para proporcionar una vacuna multivalente que es eficaz contra diferentes agentes infecciosos. La descripción comprende además administrar otras composiciones que pueden proporcionar un efecto beneficioso en el animal, que podrían administrarse antes de, simultáneamente, o posterior a las terapias convencionales para tales infecciones.
- 10
- 15 [0039] La invención también proporciona procedimientos *in vitro*, tal como se define en las reivindicaciones, para detectar los virus descritos en este documento. El procedimiento *in vitro* comprende detectar la presencia de un polinucleótido viral en o de una muestra biológica obtenida de un canino o felino; o detectar la presencia de una proteína viral en o de una muestra biológica obtenida de un felino (tal como se define en las reivindicaciones). Cualquiera de los polinucleótidos y proteínas virales indicados en las reivindicaciones se puede utilizar en el procedimiento *in vitro* de detección de la presencia o ausencia del virus. Se considera que la detección del complemento inverso o el equivalente de ADN de SEQ ID NO: 1, 2 ó 3 es lo mismo que la detección de un polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, 2 ó 3 o una secuencia que tiene al menos un 96% de identidad a cualquiera de estas secuencias.
- 20
- 25 [0040] La detección puede llevarse a cabo usando cualquier muestra biológica adecuada obtenida de un mamífero para el que se desea un diagnóstico. Las fuentes adecuadas de muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, sangre, raspados de la mucosa, biopsia de tejido, o saliva. En una realización, la muestra biológica comprende un frotis nasal y/o de la faringe, o de lavado traqueal.
- 30
- 35 [0041] La presencia o ausencia del virus puede detectarse mediante pruebas para el ADN, ARN o proteína usando una variedad de técnicas que son bien conocidas en el sector. En ciertos ejemplos, la presencia del virus se determina mediante la detección de polinucleótidos que comprenden la totalidad o parte del genoma viral, o se amplifican a partir de la totalidad o una parte del genoma viral. En este sentido, la invención incluye determinar la presencia (o ausencia) del virus mediante la identificación de secuencias de polinucleótidos de ARN definidas en las reivindicaciones. La presente invención también incluye detectar las versiones de ADN de los polinucleótidos de ARN definidos en las reivindicaciones. Por ejemplo, en una realización, la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa se puede utilizar para producir una copia de ADN de la cadena viral negativa o una parte de la misma, y la copia de ADN puede servir como plantilla para la amplificación del genoma viral para obtener una pluralidad de moléculas de ADN de doble cadena que incluyen la versión de ADN de las cadenas positiva o negativa o partes de la misma en una doble cadena hibridada. Los expertos en la materia reconocerán que hay una amplia variedad de técnicas de amplificación que pueden usarse para aumentar la cantidad de material genético para su uso en determinar si un virus está o estaba en una muestra biológica de interés, y el material genético amplificado (o no amplificado) se puede analizar usando muchas técnicas y reactivos bien conocidos para determinar secuencias de polinucleótidos. Por lo tanto, la presente invención incluye cualquiera y todos los procedimientos (dentro del alcance de las reivindicaciones) para la obtención y el análisis de ácidos nucleicos de una muestra biológica, de manera que se puede determinar la presencia o ausencia de polinucleótidos virales, que incluyen, pero no se limitan a, los procedimientos que implican la detección de los polinucleótidos mediante la hibridación de ácido nucleico y/u otros tipos de sondas, y mediante la determinación de la secuencia de los polinucleótidos virales usando cualquier técnica de secuenciación conocida. Todo o una parte de la secuencia puede determinarse y usarse para identificar los polinucleótidos virales.
- 40
- 45
- 50
- 55 [0042] En ciertas realizaciones, la composición de la invención comprende un polinucleótido viral aislado (tal como se define en las reivindicaciones) y también comprende componentes utilizados para la hibridación y/o amplificación de ácido nucleico. En consecuencia, las composiciones pueden comprender adicionalmente una ADN polimerasa, una transcriptasa inversa, nucleótido trifosfatos libres, sales, tampones y otros reactivos empleados habitualmente para hibridar y/o amplificar ácidos nucleicos. En una realización, el polinucleótido viral aislado y/o un polinucleótido amplificado a partir de un polinucleótido viral de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, se hibridan a uno o más cebadores de amplificación y sondas de detección utilizadas en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos a tiempo real.
- 60
- 65 [0043] El polinucleótido viral aislado y/o un polinucleótido amplificado a partir de un polinucleótido viral de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, se pueden hibridar a al menos una sonda que está presente en una matriz. La matriz puede estar presente en, por ejemplo, un chip utilizado para determinar la presencia o ausencia de una pluralidad de polinucleótidos distintos. Dichos chips están disponibles comercialmente y se pueden personalizar para detectar la presencia o ausencia de esencialmente cualquier polinucleótido.

[0044] En varios ejemplos, la descripción también comprende fijar en un medio tangible la determinación de si el mamífero ha sido infectado o no por un virus descrito en este documento. El medio tangible puede ser cualquier tipo de medio tangible, tal como cualquier tipo de medio digital, incluyendo, pero no limitado a, archivos digitalizados que pueden ser almacenados en un ordenador, un DVD, un CD-ROM, o un mensaje de correo electrónico. El medio tangible podría ser proporcionado a un proveedor de asistencia médica con el fin de desarrollar un protocolo de tratamiento para el mamífero infectado.

[0045] Se entenderá por los expertos en la materia que, dado el beneficio de la presente invención, se pueden producir y utilizar una variedad de reactivos en procedimientos de diagnóstico adicionales para la detección de los virus descritos en este documento. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos policlonales o monoclonales utilizando los viriones o partes de los viriones, o proteínas virales aisladas o recombinantes o fragmentos de las mismas. Por lo tanto, se pueden producir anticuerpos para reconocer específicamente cualquier determinante antigénico presente en cualquiera de dichas proteínas virales. En varias realizaciones, los anticuerpos reconocen las proteínas virales NS-1, NS-2, N, P, M, SH, G, F, M2-1, M2-2, y L, o partes o combinaciones de las mismas. Se espera que se puedan producir anticuerpos que pueden discriminar los virus descritos en este documento de otros virus relacionados, tal como MPV.

[0046] Los anticuerpos se pueden usar en cualquier técnica mediante la cual se puede determinar la presencia o ausencia de un antígeno viral en o de una muestra biológica. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a, transferencia Western, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, ensayos ELISA y matrices de proteínas basadas en microesferas o convencionales.

[0047] En un ejemplo, la descripción proporciona un virus o proteína de virus aislado y/o recombinante que está presente en un complejo con un anticuerpo.

[0048] Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar realizaciones específicas de la invención.

EJEMPLO 1

[0049] Se obtuvieron muestras de frotis nasales y faríngeas de perros de raza mixta y se utilizaron para inocular cultivos de células A72 caninas (American Type Culture Collection, CRL-1542) para aislar los virus respiratorios. En una fase tardía del pase en el cultivo que corresponde a aproximadamente 21 días después de la inoculación, algunos cultivos mostraron cambios citopáticos sutiles. Después del pase continuo los cultivos mostraron pequeños focos de células redondeadas, seguido de una muerte celular rápida en todo el cultivo. Este patrón se juzgó subjetivamente como no característico de los virus comúnmente asociados con ARDC. Se obtuvieron trece aislados virales individuales y se describen en este ejemplo. Las pruebas con un panel de reactivos de diagnóstico específicos para agentes respiratorios caninos comunes no pudieron identificar un virus conocido. Más pruebas con reactivos adicionales para otros virus revelaron en última instancia el reconocimiento positivo mediante un ensayo de inmunofluorescencia (IFA) utilizando un conjunto de anticuerpos monoclonales (Mab) contra el virus sincitial respiratorio humano (anti-HRSV, no. VP-R151, Vector Laboratories, Burlingame, California, EE.UU.). Esta preparación de anticuerpo se utiliza comúnmente en nuestro laboratorio para la detección de RSV bovino (BRSV). El patrón de tinción incluía viriones filamentosos unidos a la membrana y de libre flotación e inclusiones citoplasmáticas, típicos del patrón observado en células infectadas por RSV.

[0050] Después de los primeros resultados de IFA, se intentó amplificar un fragmento del gen de la nucleocápside (N) del virus usando cebadores de PCR que fueron diseñados en base a un alineamiento de secuencias RSV ovinas humanas y bovinas. Esto no tuvo éxito. Las soluciones madre de los Mabs individuales en el conjunto anti-RSV y sus especificidades se obtuvieron del fabricante y se utilizaron para IFA (figura 1). La tinción con Mab 5H5N (específico de la proteína M2) iluminó ambos viriones y las inclusiones. Mab 2G 122 (específico de proteína P) tiñó principalmente inclusiones y produjo una señal asociada a la membrana relativamente uniforme. No se obtuvo tinción con Mabs 1C3 (específico de proteína N) o 5A6 (específico de proteína F). Los 4 Mabs individuales reconocieron BRSV mediante IFA. El reconocimiento del virus canino por sólo 2 de 4 Mab y la imposibilidad de amplificar una región conservada del genoma de RSV sugirió que estaba relacionado, pero no era una forma típica de RSV.

[0051] Se persiguió la elucidación de la secuencia del virus mediante el diseño de cebadores de PCR degenerados basados en secuencias de aminoácidos (aa) altamente conservadas en múltiples alineamientos de secuencias de todos los virus en la subfamilia *Pneumovirinae* utilizando el algoritmo CODEHOP. Se marcaron las regiones específicas dentro de los genes de L (polimerasa) y N. La secuenciación de los productos de reacción y el análisis BLAST reveló que el virus estaba estrechamente relacionado con el neumovirus murino (MPV), tradicionalmente conocido como neumovirus (o virus de la neumonía) de ratones. Se encontró que dos productos de PCR del gen de L eran de un 95% a 97% idénticos a MPV y un fragmento del gen de N era aproximadamente un 96% idéntico.

[0052] Para hacer frente a la cuestión de si el neumovirus recién identificado se limitaba al grupo de perros del refugio analizados, se cribaron muestras de suero canino azar y se encontró que 6 de 27 animales tenían anticuerpos que reconocían específicamente el virus en cultivos infectados. Los patrones de tinción fueron similares

a los observados con los Mabs (figura 2). Los sueros bovinos que contenían cantidades variables de anticuerpos neutralizantes contra el BRSV no teñían las células infectadas con el virus canino.

[0053] Este ejemplo demuestra que los virus aislados de 13 perros con ARDC parecen estar muy estrechamente relacionados con el MPV y por lo tanto se consideraron como neumovirus canino (CnPnV). El neumovirus murino es uno de sólo tres especies de virus clasificados en el género *Pneumovirus* en la subfamilia *Pneumovirinae* en la familia *Paramyxoviridae*. El RSV humano es la especie tipo y está muy estrechamente relacionado con el BRSV, mientras que el MPV está más alejado. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de la proteína N del RSV humano y bovino son aproximadamente un 94% idénticas entre sí, pero sólo tienen un 60% de identidad con MPV. Sólo hay dos cepas totalmente secuenciadas de MPV, "Cepa 15" ("Strain 15") y J3666, y son un 99,7% idénticas a nivel de nucleótidos.

[0054] La asociación de CnPnV con ARDC puede ser patógena en algunos casos, en particular cuando están implicadas en etiologías complejas. Por analogía, se conoce comúnmente que el MPV infecta colonias de roedores de laboratorio y las pruebas serológicas apuntan a una infección de varias especies de roedores salvajes, pero se sabe poco sobre su ecología natural. De hecho, no está claro que los roedores sean los únicos huéspedes naturales de MPV o si virus estrechamente relacionados pueden estar circulando en otras especies. Se han descrito evidencias para la infección humana en asociación con síntomas respiratorios (Pringle CR, et al. J Gen Virol. 1986; 67: 975-82). En la naturaleza, la infección de roedores puede ser subclínica o latente. Los signos clínicos en ratones de laboratorio pueden variar desde asintomática hasta la progresión a un edema pulmonar, con alta morbilidad y mortalidad. Las cepas patógenas, incluyendo tanto J3666 como Cepa 15, pueden producir una neumonía grave y la muerte en 6-10 días cuando se inocula a baja dosis. La patogenicidad o falta de la misma puede ser dependiente del virus y la cepa del ratón.

[0055] Múltiples agentes bacterianos y virales pueden estar implicados en la enfermedad respiratoria canina. Se considera por tanto que CnPnV es otro agente capaz de iniciar la secuencia de eventos que comprometen los mecanismos de defensa del tracto respiratorio superior, conduciendo a una enfermedad más grave.

EJEMPLO 2

[0056] Se utilizaron los materiales y procedimientos presentados en este ejemplo para obtener los resultados descritos en los ejemplos restantes.

Aislamiento del virus

[0057] Se recogieron muestras nasales y faríngeas de perros de razas mixtas con signos de enfermedad respiratoria utilizando hisopos húmedos y se procesaron dentro de las 24 horas siguientes a la recepción en el Centro de Diagnóstico de Salud Animal de la Universidad de Cornell. Antes de la inoculación, los hisopos se sumergieron en 3 ml de medio esencial mínimo (MEM) con sales de Earle (Gibco 10370, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), albúmina de suero bovino al 0,5%, penicilina (200 U/ml), estreptomycin (200 µg/ml), y fungizona (2,5 µg/ml) durante 30 min y a continuación se agitaron mecánicamente durante 10 s. Las alícuotas de los extractos de los frotis nasales y faríngeos, 0,5 ml cada una, se combinaron y utilizaron para inocular un solo matraz T25 de células A72 semi-confluentes (Binn et al., 1980) (CRL-1542, American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU.) sin medio adicional. El extracto permaneció en la monocapa durante 1-3 h y a continuación se enjuagó con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las células se mantuvieron en 6 ml de medio de cultivo (medio L15 de Leibovitz, suero bovino fetal al 10% (FBS) inactivado por calor, penicilina 200 U/ml, estreptomycin 200 µg/ml, gentamicina 50 µg/ml) a 37°C y se subcultivaron cada 6-8 días. Los cultivos de A72 de control no inoculados se realizaron en paralelo a lo largo del procedimiento de aislamiento.

Ensayos de inmunofluorescencia

[0058] Las células se dejaron unirse a los portaobjetos de vidrio y a continuación se aclararon con PBS y se fijaron en acetona fría durante 10 min. Los portaobjetos se secaron al aire y se almacenaron a -20°C antes de la tinción. Se aplicaron anticuerpos primarios y secundarios diluidos en PBS a los portaobjetos y se incubaron durante 30 min a 37°C. Después de cada incubación, los portaobjetos se aclararon en PBS durante 15 min. La tinción se visualizó por microscopía de fluorescencia. Se utilizó un conjunto de Mab contra HRSV fue utilizado en la identificación inicial (VP-R151, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) a una dilución de 1:400. Se utilizó anti-PVM de ratón (CL-6031FA, Charles River Laboratories, Wilmington, MA EE.UU.) suministrado a una concentración 1 X a una dilución de 1:20. El anticuerpo secundario, IgG de cabra anti-ratón marcado con FITC (18/02/06, KPL, Gaithersburg, MD, EE.UU.), se utilizó a una dilución de 1:40 (12,5 µg/ml).

Purificación de ARN

[0059] El ARN celular total se purificó de células A72 (74106, Qiagen, Valencia, CA, USA). Las células de un matraz infectado de 25 cm² que muestra aproximadamente un 50-75% de efecto citopático (CPE) se sedimentaron y se purificaron a través de cada columna. Los sobrenadantes libres de células y el medio que contenía los eluatos de los

frotis se purificaron (52906, Qiagen) utilizando 140 µl de muestra. Los ARN purificados se volvieron a suspender en 40 µl de H₂O libre de ARNasa.

PCR

5
10
15
20
25

[0060] Las secuencias de los cebadores degenerados utilizados inicialmente para obtener fragmentos genómicos se basaron en alineaciones de virus en el *Pneumovirinae* y se diseñaron utilizando el algoritmo CODEHOP (blocks.fhcr.org/codehop.html) (Rose et al, 1998). Se realizó una PCR con transcripción inversa (RT-PCR) en una reacción de una sola etapa (210212, Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un volumen de 25 µl. Se utilizaron 1 µl de ARN total a una dilución de 1:5-1:10 y 10 pmol de cada cebador por reacción. Las condiciones de reacción para la etapa de RT fueron 30 min a 50°C y a continuación 15 minutos a 95°C. Las condiciones de ciclado fueron 60 s a 95°C, 30 s a 54-56°C, y 60-90 s a 72°C durante 35 ciclos. Los conjuntos de cebadores para el gen de N: N276F, tccgtgcaggccgaratggarcarg/P1R, (SEQ ID NO: 35) ggaactcggggcggaaytтыccat; SEQ ID NO: 36); gen de L no 1: L428F, ccggatcttcggccayccnatggt/(SEQ ID NO: 37) L538R, ttcttaggaggggagatggcyttrtrct; (SEQ ID NO: 38) gen de L no. 2: L698F, catcaccgacctgtccaagttyaaycargc/(SEQ ID NO: 39) L894R, ttgaagtcgcccaggatggtrttatcca (SEQ ID NO: 40). Se diseñaron dos conjuntos de cebadores de PCR usados con muestras de frotis de diversas localizaciones geográficas basándose en las alineaciones de las secuencias de CnPnV, J3666 y cepa 15 de MPV. Proteína G: G715F, ggcttctgtttcttcttctg/(SEQ ID NO: 41) G1062R, ccgtgggtgctcctgtg (SEQ ID NO: 42); Proteína SH1: SH1F, atggatcctaactgacctcayac (SEQ ID NO: 43)/SH187R, gattgggatgaacygtgcattg (SEQ ID NO: 44). Cebadores utilizados para amplificar los aislados Brne de bajo pase: G84F, tgtaaaagtgaaacaaatgtgta (SEQ ID NO: 45)/G404R, aaatcttcagtgaaatcaggctc (SEQ ID NO: 46); G849F, ttttaacaacaagaatcagtc (SEQ ID NO: 47) G1048R, ctcttaggtgcgggggttg (SEQ ID NO: 48). Condiciones de reacción para los amplicones G y SH fueron RT a 50°C durante 30 min, inactivación/desnaturalización a 95°C durante 15 min, y PCR en 60 s a 95°C, 30 s a 54°C, y 90 s a 72°C, durante 35 ciclos.

Análisis genómico

30
35

[0061] Los productos de PCR se secuenciaron utilizando un Analizador de ADN Applied Biosystems Automated 3730 DNA Analyzer en el Cornell University Sequencing and Genotyping Core Laboratory. Los cebadores usados para determinar las secuencias completas se basaron en secuencias de MPV o secuencias CnPnV previamente determinadas. Se generaron productos de PCR solapantes para cubrir huecos y regiones de unión a cebador. Todas las regiones se secuenciaron en ambas cadenas. Los aislados de CnPnV se compararon con las secuencias de la cepa 15 de MPV (GenBank AY729016) y J3666 (GenBank NC006579) utilizando Lasergene (DNASTAR, Madison, WI, EE.UU.).

EJEMPLO comparativo 3

Aislamiento e Identificación

40
45
50
55

[0062] Se utilizaron eluatos de frotis nasales y faríngeos para inocular células A72. Después de un período relativamente largo en el cultivo, que normalmente aparece después del tercer o cuarto pase, se observó un CPE limitado. El CPE inicial normalmente incluía pequeños focos dispersos de células redondeadas, a veces con pequeños sincitios y vacuolización. Este CPE progresó lentamente durante varios días en cultivos estacionarios. El subcultivo condujo a menudo a monocapas que mantuvieron este CPE de bajo grado, pero en algunos cultivos se produjo una rápida progresión y disgregación de la monocapa en 24-48 horas. Este patrón, aunque similar a algunas infecciones por virus del herpes, no dio positivo para virus del herpes canino y no parecía ser típico de cualquiera de los virus respiratorios caninos que se aíslan habitualmente usando procedimientos similares. Varios de los aislados de pases tempranos se replicaron mal en el cultivo, mostrando poco o ningún CPE tras la transferencia de sobrenadante a células nuevas. Sin embargo, con el paso continuo algunos cultivos desarrollaron más consistente un CPE transferible y se eligieron para su posterior análisis. Las pruebas iniciales mostraron que los sueros de varios perros no relacionados parecían reconocer el antígeno viral en cultivos con CPE (datos no presentados), pero las pruebas para virus respiratorios caninos comunes fueron negativas. Tal como se indica en el ejemplo 1, los Mabs específicos para HRSV reconocían fuertemente el antígeno viral. La tinción por IFA positiva con un suero policlonal anti-PVM se utilizó para su confirmación. El suero de ratón anti-PVM sólo reconoció débilmente BRSV mediante IFA.

60
65

[0063] Las 13 aislados originales de CnPnV descritos en el ejemplo 1 se originaron de 2 refugios de animales que fueron gestionados por la misma organización. Para investigar si el virus estaba confinado a estos 2 lugares, se analizaron mediante PCR muestras de frotis nasales o faríngeas de perros enfermos de otras localizaciones geográficas. Se analizaron diecinueve perros de 8 estados de los EE.UU. (CO, GA, FL, EN, MO, NV, SC, VA) utilizando conjuntos de cebadores para los genes de G y SH. De las 19 muestras, una de Nevada, y 5 de un grupo de 9 perros de Carolina del Sur, dieron positivo con PCR de G y SH y se confirmaron por secuenciación. No se obtuvieron resultados positivos por PCR de los otros 13 perros. El aislamiento del virus en las células A72 se intentó en 6 muestras de frotis nasales adicionales de Nueva York y Pensilvania que se presentaron para el diagnóstico respiratorio canino. De éstos, dos aislados adicionales vinieron de un hospital veterinario de la ciudad de Nueva York y otro se originó de un refugio en Philadelphia, PA. Estos aislados fueron confirmados como CnPnV mediante IFA con anticuerpos anti-RSV y anti-PVM y posteriormente con RT-PCR. Aunque estos resultados por RT-PCR y

aislamiento de virus no proporcionan una evaluación precisa de la prevalencia, sí indican que la infección con CnPnV está muy extendida.

Análisis de secuencia

5 **[0064]** Los estudios previos han observado diferencias entre aislados virales que pueden ser atribuibles a la presencia de cuasiespecies naturales, mutación durante el paso del cultivo, o subproductos de PCR. Para determinar las secuencias consenso más precisas para los aislados de CnPnV, se utilizaron múltiples reacciones de RT-PCR solapantes utilizando ARN celular total como plantilla. Se secuenciaron los aislados virales de dos perros, uno en el paso 4 del cultivo de tejidos (Ane4) y uno en el paso 17 (Brne 17), y se compararon con las secuencias de J3666 (Thorpe y Easton, 2005) y la cepa 15 (Krempf et al., 2005). Se obtuvo una secuencia de 8598 nt (SEQ ID NO: 1) de CnPnV-Ane4 comenzando con la secuencia líder 3' adyacente a NS1 y que se extendía una corta distancia en la región codificante de L, que cubre completamente 9 de los 10 genes predichos en el genoma. Se confirmó el orden de los genes NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L. La identidad global de la secuencia de nt de esta región de CnPnV-Ane4 en comparación con las cepas de MPV fue de un 95,0% para J3666 y un 94,7% para la cepa 15. Las cepas de MPV son un 99,7% idénticas entre sí. No se hallaron espacios dentro de las regiones codificantes en las comparaciones de CnPnV-Ane4 y las cepas de MPV. Con excepciones con respecto a las diferencias de longitud para G y SH tal como se describe en las secciones 3.4 y 3.5, se encontró que todas las regiones codificantes en MPV y CnPnV-Ane4 codificaban proteínas de la misma longitud.

Análisis comparativo de regiones no traducidas

25 **[0065]** Los límites de las secuencias de GS y GE en CnPnV se determinaron mediante la alineación de las secuencias de J3666 y cepa 15 (Thorpe, L.C., Easton, A.J., 2005. J. Gen. Virol 86, 159-169; Krempf, et al. 2005. Virus Genes 30, 237-249). Las secuencias de GS de MPV fueron descritas por Chambers et al. (1991) y más recientemente (Dibben y Easton, 2007) como 9 nt de longitud basadas en las secuencias GS de RSV según determinó Collins et al. (1986). Kuo et al. (1997) proporcionaron evidencias de que el 10º nt es también importante en la GS de RSV y esto se ha equiparado a una GS de MPV por tener 10 nt de longitud (Krempf et al., 2005). En la tabla 1, la GS se presenta como 10 nt para incluir ambas interpretaciones. La tabla 1 proporciona secuencias de GS, GE e IGR entre regiones codificantes en CnPnV-Ane4 en comparación con la cepa 15 y J3666 de MPV.

Tabla 1

Gen 3'	GE	IGR	GS	Gen 5'	Longitud NTR
NS1	uaguuaauuaaaa	caaaggggu	aggacaagug	NS1	
NS2	uaguuaauagaaaaa	uauu*	aggacaa <u>auc</u> *	NS2	sin dif.
N	uauuuauuaaaaa (+1[a])	cuggaaaa <u>au</u> *	aggauaaaaua	N	sin dif.
P	uaguuaauuaaaa	uaac(-3[aca])	aggacaaaaua	P	1 nt más larga
M	uaguuaauuaaaa	c(-1[u])	aggauaa <u>gua</u> *	M	3 nt más corta
SH	uaguuaacaaaaaa	uu	aggauaa <u>gua</u>	SH	sin dif. ^a
G	uaguuaauagaaaaa (+1[a])	uaagcu <u>augauuaau</u> * (-1[c])	aggacaaaaua	G	sin dif.
F	uaguuaauuaaaaaa (+1[a])	cuu ^b	aggauaa <u>gug</u> ^b	F	sin dif.
M2	uaguuaauuaaaaaa (-2[a])	uaau <u>cauu</u> *	aggaucaaua	M2	1 nt más larga
				L	2 nt más corta

35 **[0066]** Para la tabla 1, no hay diferencias en las longitudes de NTR entre las dos cepas de MPV. Las secuencias de ARN están en la orientación 5' a 3'. *: Indica al menos 1 cambio de nt de J3666 y la cepa 15. Las diferencias de nt están en negrita y subrayado. GE: fin del gen; IGR: región intergénica; GS: inicio del gen; sin dif.; no hay diferencias en la longitud. ^aPara M-SH no hay diferencia en la longitud total de NTR; un u se elimina de la IGR y otro u se añade en dirección 5' en la NTR. ^bLa IGR de 3 nucleótidos y probablemente GS de M2 se basan en el análisis por Dibben y Easton (Dibben, O., Easton, A.J., 2007. Mutational Analysis of the Gene Start Sequences of Pneumonia Virus of Mice. Virus Res. 130, 303 -309). Las secuencias que tienen 10 o más nucleótidos mostradas en la tabla 1 tienen las siguientes SEQ ID: Para las secuencias en la columna "GE" NS1 uaguuaauuaaaaa (SEQ ID NO: 18); NS2 uaguuaauagaaaaa (SEQ ID NO: 19); N uauuuauuaaaaa (SEQ ID NO: 20); P (SEQ ID NO: 18); M uaguuaauuaaaaa (SEQ ID NO: 21); SH uaguuaacaaaaaa (SEQ ID NO: 22); G uaguuaauagaaaaa (SEQ ID NO: 23); F uaguuaauuaaaaaa (SEQ ID NO: 33); y M2 uaguuaauuaaaaaa (SEQ ID NO: 34). Para las secuencias en la columna de "IGR": N cuggaaaaau (SEQ ID NO: 24); y G uaagcuaugauuaau (SEQ ID NO: 25); para las secuencias en la columna de "GS": NS1 aggacaagug (SEQ ID NO: 26); NS2 aggacaaauc (SEQ ID NO: 27); N aggauaaaaua (SEQ ID NO: 28); P (SEQ ID NO: 28); M aggacaaaaua (SEQ ID NO: 29); SH aggauaagua (SEQ ID NO: 30); G (SEQ ID NO: 30); M2 aggauaagug (SEQ ID NO: 31); F (SEQ ID NO: 29) y L aggaucaaua SEQ ID NO: 32).

50 **[0067]** Se identificaron algunas variaciones de longitud y diferencias de nt en las NTR de CnPnV-Ane4, la mayoría se encuentran dentro de la IGR. No hay diferencias entre las dos cepas de MPV en las IGR. Chambers et al. (Chambers, P., Matthews, DA, Pringle, CR, Easton, AJ, 1991. Virus Res. 18, 263-270) determinaron la GS de M2 a

partir de un clon de ADNc, pero también indicaron la presencia de 2 secuencias potenciales adicionales de GS (GS1 y GS2) en la IGR de 56 nt. El análisis mutacional determinó posteriormente que la supuesta secuencia de GS no era funcional debido a G en lugar de A en la posición 6. Posteriormente, determinaron que las secuencias de GS1 y GS2 eran capaces de dirigir la iniciación de la transcripción, siendo la primera secuencia (GS1) la más importante. Llegaron a la conclusión de que la secuencia de GS identificada originalmente se identificó erróneamente probablemente debido a una delección espontánea durante la clonación de ADNc. En CnPnV la secuencia de GS1 para M2 que sigue inmediatamente a la secuencia de GE para F es idéntica a las secuencias de inicio de gen de SH y G, excepto en el nt 10°. Se cree que GS1 se usa principalmente y se muestra en la tabla 1. La GS2 para M2, AGGACAGGG, difiere en sólo 2 posiciones de la secuencia de consenso descrita en (Dibben, O., Easton, AJ, 2007. Virus Res. 130, 303-309), pero puede tener una actividad limitada, ya que no tiene una A conservada en la posición 7. Esto difiere de J3666 y la cepa 15 donde la A se conserva. La tercera GS potencial de M2 (GS3) en CnPnV-Ane4 es idéntica a la de J3666 y la cepa 15 y por lo tanto se presume que es muy poco funcional debido a la G en la posición 6.

15 *Análisis de proteínas no estructurales*

[0068] La proteína hidrofóbica pequeña no estructural parece tolerar una variabilidad significativa, ya que es la proteína más divergente entre las dos cepas de MPV donde sólo hay un 92,4% de identidad de aa sobre los 92 aa que comparten. En CnPnV-Ane4 la proteína SH fue la más divergente de todas las proteínas examinadas en comparación con la cepa 15 de MPV. SH de CnPnV-Ane4 tiene 4 diferencias de aa (95,7%) con J3666 y 9 diferencias de aa (90,2%) con la cepa 15 y es por lo tanto más similar a J3666 que las cepas de MPV entre sí (tabla 2). Otra diferencia significativa es en la longitud de la ORF de SH en diferentes aislados. Tanto CnPnV-Ane4 como la cepa 15 tienen ORF de SH de 279 nt (92 aa), mientras que la secuencia SH de J3666 publicada tiene 345 nt (114 aa). Sin embargo, se ha descrito que las secuencias amplificadas de forma independiente de J3666 codificaban de forma diversa para 92, 96, ó 114 aa y se sugirió que representaban mutantes de escape de anticuerpos. La tabla 2 proporciona un resumen del porcentaje de identidad de los genes y proteínas de CnPnV-Ane4 a los virus en la subfamilia Pneumovirinae.

Tabla 2

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

[0069] Para la tabla 2, las referencias a la secuencia de GenBank no: HRSV, N_001781; BRSV, NC_001989; HMPV, NC_004148.2; AMPV, NC_007652, que corresponden a secuencias de longitud completa de RSV humano, RSV bovino, metaneumovirus humano y metaneumovirus aviar. nt: nucleótido; aa: aminoácido; NA: No aplicable. ^anúmeros de nt y diferencias de aa en cada gen. Se encontró que la proteína P de CnPnV-Ane4 presentaba 10 diferencias de aa con J3666 y 15 diferencias de aa con la cepa 15. Las alineaciones de P de MPV y RSV muestran dos regiones de alta homología que flanquean una región amino-proximal del aa 22 a 124 que no tiene una similitud obvia y contiene de 6 a 7 espacios en la alineación. Se identificaron dos regiones de diversidad moderada dentro de esta región de baja homología en P cuando se comparó CnPnV-Ane4 con ambas cepas de MPV. Siete diferencias de aa están agrupadas en la región de aa 58 a 74 y se encuentran otros 4 cambios en los aa 93-102. Los gráficos de probabilidad predicen la primera región de diversidad de los aa 58-74 para tener una probabilidad de superficie y un índice antigénico relativamente altos. La segunda región diversa en los aa 93-102 es hidrofoba y tiene una probabilidad de superficie predicha baja (datos no mostrados). Un segundo ORF solapante iniciado internamente en P, capaz de codificar una proteína de 137 aa, ha sido identificado en MPV. Se utilizaron construcciones de minigenomas sintéticos para estudiar la proteína producida a partir del segundo ORF y se encontró que funcionaba como un inhibidor de la transcripción. CnPnV-Ane4 tiene el segundo ORF solapante de P que se inicia en la misma posición pero termina más temprano y produce una proteína de menos de la mitad del tamaño de 54 aa debido a una transversión de T a A en el nt 285 produciendo un codón TAG. (Dibben, O., et al. (2008) Virus Res. 131, 47-53). Esto deja abierta la cuestión de si una proteína P-2 más corta, si se produce, tiene la misma funcionalidad.

[0070] Las proteínas no estructurales restantes incluyen NS1 y NS2, y M1-1 y M1-2 que se traducen a partir de los marcos de lectura alternativos en el gen de M2. No hay diferencias entre estas proteínas en la cepa 15 y J3666. Sin embargo, CnPnV presenta diferencias con los aislados de MPV en cada una de estas proteínas. NS1 de CnPnV-

Ane4 tiene 7 diferencias de aa en comparación con las dos cepas de MPV, 4 situadas cerca del extremo C-terminal. En NS2 hay 9 diferencias de aa que están distribuidas relativamente uniformemente a lo largo de la secuencia. CnPnV-Ane4 es un 96,6% idéntica a M2-1 con 6 diferencias de aa y un 95,9% idéntica a M2-2 con 4 diferencias de aa.

5

Análisis de proteínas estructurales

[0071] Las proteínas de unión a G de neumovirus son de especial interés porque habitualmente son las más divergentes y son dianas primarias para respuestas de anticuerpos neutralizantes. La proteína G está relativamente muy conservadas entre los dos aislados de MPV que tienen sólo 3 diferencias de los 396 aa (99,2%). En CnPnV, la proteína G es la proteína menos conservadas en comparación con J3666 y la segundo menos conservada después de SH en la cepa 15. Hay diferencias de 32 aa y 33 aa con J3666 y la cepa 15 G, respectivamente. Las diferencias de aa están generalmente distribuidas al azar con la excepción de varias diferencias agrupadas en la región 113-124 y diferencias de 11 aa entre aa 331 y 367 (basado en la numeración de la ORF de Ane4). Una observación notable es que el ORF de G de CnPnV-Ane4 es 54 nt más largo que su homólogo en J3666 y la cepa 15. Un cambio de ACG a AUG en la posición +29 de la GS crea un codón de iniciación alternativo que está presente en J3666 pero no en la cepa 15. Un segundo cambio de UAG a AGA en +65 elimina un codón de terminación en el marco. El ORF de G codifica una proteína con una cola citoplasmática de 53 aa, 18 aa más larga que las secuencias publicadas de J3666 y la cepa 15. La secuencia de J3666 tiene un codón de terminación en esta posición, mientras que la cepa 15 no. Por lo tanto, tanto en J3666 como en la cepa 15 una mutación en un único punto podría producir la variante G más larga. Esto no es inédito, ya que la secuencia del producto RT-PCR no clonado amplificado a partir de los pulmones de ratones infectados con J3666 también tenía el cambio de U a A en +65. Por lo tanto, parece que la variante de G más larga no es una característica que sea única para CnPnV. Teniendo en cuenta las ventajas de la presente descripción, los datos de secuencia adicionales de caninos y productos de RT-PCR murinos para determinar qué variación predomina en infecciones naturales pueden determinarse usando la capacidad ordinaria de la técnica. Parece haber cierta plasticidad natural en la longitud de la cola citoplásmica de G y la cola es en sí misma un determinante de la virulencia. Un mutante de MPV recombinante que carece de la cola citoplásmica de G se atenuó en ratones BalbC, pero los niveles de replicación eran indistinguibles de los virus de tipo salvaje (Krempl, CD, et al. 2007, J. Virol. 81, 9490-9501). En el RSV los primeros 6 aa de la cola citoplasmática son esenciales para la interacción con la proteína M. No se sabe si el aa N-proximal de G es esencial para la unión a M en MPV, pero si se demuestra que es el caso, entonces las dos variaciones de la cola citoplasmática podrían diferir en su capacidad de interactuar con M.

[0072] La proteína F del CnPnV-Ane4 no tiene un nivel alto de diversidad similar a la que se encuentra en G y de hecho es una de las proteínas más conservadas en comparación con MPV. Hay 14 diferencias de aa con J3666 y 16 diferencias de aa con la cepa 15 con un 97% o más de conservación. Aproximadamente la mitad de las diferencias de aa están dentro de los últimos 55 aa en el extremo COOH-terminal, dentro o adyacente al dominio transmembrana, y la mayoría de las sustituciones de aa son del tipo de grupo funcional similar. En general, N es la proteína más altamente conservada en relación con los otros neumovirus. La región central de la proteína de los aa 245-333 en CnPnV-Ane4 alcanza del 92 al 93% de identidad con HRSV y BRSV. La N de CnPnV-Ane4 tiene 9 diferencias de aa con J3666 y 8 diferencias con la cepa 15 que se distribuyen de manera relativamente uniforme. Ninguna de las diferencias de aa corresponde a las posiciones invariantes identificadas en los neumovirus o a los residuos que interactúan con el genoma de ARN. Parece poco probable que cualquiera de estas diferencias pueda tener un efecto significativo sobre la estructura o función de la proteína. La proteína M tiene el nivel de conservación más alto con los aislados de MPV al 98,1%. Las 5 diferencias aa se distribuyen uniformemente en la secuencia y en todos los casos se conservan los grupos funcionales. Sólo una diferencia, un cambio de V a I en el aa 18, implica un residuo que se encuentra normalmente como invariante en la proteína M de neumovirus y metaneumovirus.

Análisis a alto y bajo pase en el cultivo

[0073] Se identificó un aislado bien adaptado al cultivo y consistentemente replicado y produjo CPE cuando se utilizó para infectar cultivos sin tratar. Aunque este aislado estaba en el pase 17 (Brne17), se secuenció y posteriormente se comparó con el aislado Ane4 del pase inferior. De los 8423 nt secuenciados, se identificaron 7 diferencias de nt en Brne17 (tabla 3, proporciona las diferencias de nucleótidos y aminoácidos entre CnPnV-Ane4 y Brne en dos etapas del pase y ex vivo). Para la tabla 3, ^aposición del nucleótido desde el principio de cada inicio del gen. ^bNumeración de aminoácido basada en la posición en cada ORF. ND: no determinado; nt: nucleótido; aa: aminoácido.

Tabla 3

Gen	Posición	Ane4	Brne17	Brne3	BrneSw
N	nt 1081 ^a	T	C	ND	ND
	-	-	-		
M	nt 543	A	G	ND	ND
	aa 178 ^b	Q	R		
SH-G NTR	nt 397	-	+A	ND	ND

60

G	-	-	T	T	A
	nt 392	A			
	aa 122	K	parada	parada	K
G	nt 1053	T	C	T	ND
	aa 342	L	P	L	
F	nt 1098	A	T	ND	ND
	-	-	-	-	-
F	nt 1140	G	A	ND	ND
	-	-	-	-	-

[0074] Una única diferencia de nt en N y 2 diferencias en F son sustituciones sinónimas. La adición de un residuo A en la secuencia GE de SH en Brne17 es también no codificante. Dos diferencias nt son sustituciones no sinónimas causando un cambio de Q a R en el aa 178 en M y un cambio de L a P en el aa 342 en G. La diferencia más significativa hallada en Brne17 es la sustitución de un U por una A en el nt 364 en el ORF de G que da lugar a la sustitución de un residuo K por un codón de terminación en la posición de aa 122. Esta posición corresponde al nt 310 (aa 104) en las cepas de MPV. La terminación en esta posición daría a Brne17 una G truncada con una cola citoplasmática de 53 aa, un dominio transmembrana de 24 aa, y un ectodominio de sólo 44 aa. El hallazgo de una G truncada en Brne17 impulsó la secuenciación adicional de productos de amplificación de la solución madre del paso 3 y del eluato del hisopo original (Brne3 y BrneSw). De manera destacada, esto demostró que la variante truncada ya se había establecido tan pronto como en el paso 3. Sin embargo, en BrneSw había una A en el nt 364 lo que indica que las especies virales predominantes en el perro no tenían una G truncada. Un segundo conjunto independiente de extracciones y amplificaciones de ARN incluía muestras de los pasos 1 y 2 y sólo en el paso 1 había un pico subyacente en el electroferograma indicando una subpoblación menor con A en el nt 364. Por lo tanto, parece que la forma truncada se seleccionó rápidamente en el cultivo. Se identificó una mutación similar en la cepa 15 pasada en el cultivo (Warwick) donde una sola inserción de nt que crea un desplazamiento de marco provoca la terminación prematura del péptido. La iniciación de la traducción en un sitio en dirección 3' alternativo todavía puede producir una proteína G que es 33 aa más corta y carece de una cola citoplásmica. La G truncada se ha sugerido como al menos una explicación parcial para la reducción de la virulencia de la cepa 15 (Warwick).

[0075] En el VSR, se encontró que el mutante cp-52 pasado por frío tenía una gran delección que eliminaba la producción tanto de G como de SH, pero no impedía la replicación en el cultivo. La situación es análoga en el MPV ya que se replicó un recombinante que carece de todo el gen de G, así como un virus recombinante completo en cultivos de células BHK-21, pero no se replicó a niveles detectables en ratones. Esto sugiere que G es siempre esencial in vivo y por lo tanto se esperaría la detección de sólo la variante no truncada en BrneSw. El porqué parecía haber una completa selección de la variante truncada al final del paso 2 no está claro. Si la selección es simplemente debida al aumento de la eficacia de la replicación, entonces sería de esperar que la ausencia de G aumente la tasa de replicación y el título, pero no hay evidencias de apoyo de que éste sea el caso (Krempl et al., 2007, supra). Los factores que afectan a la selección de mutantes de delección de G pueden ser específicos de células A72.

[0076] La figura 3 proporciona una representación gráfica de la organización del genoma de la SEQ ID NO: 1. Los expertos en la materia entenderán que el gráfico en la figura 3 se muestra en la orientación 3' a 5' porque es un virus de cadena negativa, mientras que la SEQ ID NO: 1 presenta la cadena negativa en 5' a 3' leyendo de izquierda a derecha por orientación convencional. Por lo tanto, en la figura 3, el ORF de L es en el extremo 3' de la cadena positiva. La tabla 4 proporciona una anotación de la secuencia presentada en la SEQ ID NO: 1; las abreviaturas son: GS, secuencia señal del inicio del gen; ORF, marco de lectura abierto; GE, secuencia señal del fin del gen; IGR, región intergénica no transcrita. Los nucleótidos no listados se cree que no están traducidos.

Tabla 4

líder 3'	1-25
NS1-GS	26-35
NS1-ORF	64-405
NS1-GE	423-435
IGR	436-443
NS2-GS	444-453
NS2-ORF	457-927
NS2-GE	1001-1014
IGR	1015-1018
N-GS	1019-1028
N-ORF	1050-2231
N-GE	2225-2238
IGR	2239-2249
P-GS	2250-2259
P-ORF	2259-3146

P-GE	3144-3156
IGR	3157-3160
M-GS	3161-3170
M-ORF	3171-3944
M-GE	4080-4092
IGR	4093
SH-GS	4094-4103
SH-ORF	4104-4382
SH-GE	4476-4489
IGR	4490-4491
G-GS	4492-4501
G-ORF	4520-5764
G-GE	5812-5825
IGR	5826-5841
F-GS	5842-5851
F-ORF	5851-7464
F-GE	7490-7504
IGR	7505-7507
M2-GS	7508-7517
M2-1-ORF	7564-8094
M2-2-ORF	8028-8324
M2-GE	8420-8433
IGR	8434-8442
L-GS	8443-8452
L-ORF	8452-8598

EJEMPLO 4

5 **[0077]** También se analizaron muestras biológicas obtenidas de felinos para la presencia de virus que podrían estar relacionados con el virus canino identificado en el presente documento. Las secuencias se obtuvieron para dos aislados, denominados 29 Kentucky (29 KY) y 77 de Kentucky (77 KY). Las secuencias parciales de los genes de G de 29 KY y 77KY proporcionan 353 nt correspondientes a los nt 726 a 1078 en el aislado de neumovirus canino (CnPnV) Ane4 descrito anteriormente y el gen de SH parcial: 29 KY que tiene 207 nt correspondientes a nt 2-208 en CnPnV-Ane4.

10 **[0078]** La secuencia de nucleótidos parcial de G de ambos aislados es un 94,7% idéntica al aislado J3666 del neumovirus murino (MPV) y un 98,0% idéntica a Ane4. La secuencia de 117 aminoácidos (aa) es un 90,6% idéntica a J3666 y un 97,4% idéntica a Ane4. Por lo tanto, las secuencias de G de 29 KY/77 KY están más relacionadas con Ane4 que con J3666.

15 **[0079]** La secuencia parcial de nt de SH de 29 KY es un 94,7% idéntica a J3666 y un 97,1% idéntica a Ane4. La secuencia de 69 aa es un 98,5% idéntica a J3666 y un 97,1% idéntica a Ane4. Por lo tanto, la secuencia 29 KY de felino está ligeramente más relacionada con J3666 que con Ane4. Sin embargo, se considera que estas secuencias representan neumovirus felinos recién descubiertos. Por lo tanto, la descripción de composiciones y procedimientos y todas las realizaciones de la invención descritas para los neumovirus caninos tal como se establece anteriormente se aplican a los virus felinos también y esas descripciones se reiteran por tanto para el virus felino.

20 **[0080]** Los expertos en la materia entenderán a partir de lo anterior que se ha demostrado que la infección por CnPnV no se limita a perros en los refugios del que se aisló originalmente. Se ha identificado fácilmente en muestras de perros con enfermedad respiratoria aguda. Aunque no se ha demostrado definitivamente un papel causal en la enfermedad, la presente invención ha proporcionado composiciones y procedimientos para identificar la presencia del virus y proteger contra el mismo, que se espera que sean importantes en el control de trastornos respiratorios en los mamíferos, incluyendo, pero no necesariamente limitado a, dichos trastornos en felinos y caninos que se correlacionan positivamente con la presencia del virus.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

30 **[0081]**
<110> Cornell University

35 <120> NUEVAS COMPOSICIONES DE NEUMOVIRUS Y PROCEDIMIENTOS PARA SU UTILIZACIÓN

40 <130> P39113EP-D1-PCT

ES 2 584 861 T3

<140> No asignado aún
 <141> 2010-12-21
 5 <150> EP10842712.1
 <151> 2010-12-21
 <150> US 61/288,401
 <151> 2009-12-21
 10 <160> 48
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 15 <211> 8598
 <212> ARN
 <213> Neumovirus canino
 <400> 1
 20 ggagguggug gcgguagaagu cgucuuuca gaaaggucua ccaaugauac agcugccaag 60
 agcauuaguu ucacuaaaag auauaacacc cuuuuaguag cuaucuggua aguacacauu 120
 uacuucuugu ucaucaauag gauccauuu gauccuaau gauuauuuuu auuaacuau 180
 25 ugaauuaaca ugaaguuggu ugacuuggaa ucuacacgau ugacaauuug agguuaauga 240
 cugauagcug acagaugaag gaauacaguc cacaucaucu ggccugacua uaucaaga 300
 30 cuaugaucac uugauuacuc cagcugaguu cuaugcagca caaggccucu uucacacagg 360
 cuacacauc gacacgguuc cacaccacag acuucccugc aucuauuuu guggaugguc 420
 uagaccauc guaagugagg uuucuauuuu cuccaauuu auacaucuua ugcaguaugg 480
 35 cuggauagua uuuaggcagc cuuaucauuc uguuuucaua gaagaauuu ucuucuccuc 540
 gauggagaug acagauugga ucagacugca uauacuuccu acuggcaguu ucuugagaau 600
 40 gugaauaacu ugucucuucu uguguauuu gucuauuuuu gauaguauag uguugcaacu 660
 ucuaauuaa uugacguccu cugcguugcu aucucuugcu uguauuacca gaccaacauc 720
 caaguucugu aacacagua ucaaacugcc acaagcuac gacuaguga uguuguuagu 780
 45 uuuuuccagg uaacuuiuca gcacaccuau gguucccaaa gcauacucag caguccuuug 840
 uggugcauca auccacuga caucggucuu ugcaucugug uugguaucga ggaaccuaua 900
 50 aauccuauug agcauauagu ucugccugag cauaagaguu uucaaaggcc auucccaua 960
 uuuauagacua uacuugcaau uccuccucu ggaacaaaac ccuugaaccu caauuuugca 1020
 aggucucaca cucauccuac ccuguccuug agagucgagg gaaguguugg gucuggauug 1080
 55 ucacuuauc uaaguuuuuu aauuaacuaa cucauuuau auuuuguaca auugucauga 1140
 uaaaacugug aggccaggug uacuuiuuga uucaaccug uugucccuga uauuuucga 1200
 60 uaccuuauac agaaugaacc cuaugacaac cauuuuuua auuagcauu caacgaugag 1260
 cagaguuguu aguauauaug acuuuuuuu acuuuuuuu acucuguuuu cacuuuaguc 1320
 cauuuacuga ucagaggccu ucaagaauu gcgugucuga uugaugcuau gcuccacauc 1380
 65 ucuuuuagca acaucaaau uaucgucagg gaaauucaa ggucauuuu ucaagaccaa 1440
 cgguucccu cugacuaca uugacuugcc aacuucuuug cuuagauagu agacaguguu 1500

ES 2 584 861 T3

	uccuacuuga	accuugucca	cccuuuguu	ggagauguag	ugacaaccu	cuggcagagu	1560
5	ccuuauuaa	ccuugucou	uauugaugac	ugugcaacug	uuauuggccau	agcaagacac	1620
	caagcaacc	auuguaguca	guacugcugu	acucacauau	guuuuacuug	uggaaaucuu	1680
	acaaucguag	uuagugguau	acauguuuga	guugcauucu	cgugauguua	cagguacagu	1740
10	uagacuuuuc	agagugucac	agaaaacaua	cccuuugugg	aucucacaau	cuguugguga	1800
	ugggaaguau	gauaaugagc	cugcauugug	acaauaccag	ccauuauacag	cucuagccaa	1860
	acaagcauau	uugucugcua	uguuauagaca	gucuauggaa	cuucuuaaua	cccaacaauc	1920
15	uguguccaua	acaccaaaua	acgggaguug	uauuauuaa	accagugugu	cagcauugac	1980
	ugaacuuaau	auugcuaacc	cguuuucuuc	cauuauagcu	cuacuagaua	gcauuauuc	2040
20	uuuuuggccu	gcugaaacag	ccaugccgcc	uacuauuggag	gugaguuccc	ggucuguuaa	2100
	cauaaaagau	gaaacagugu	guguuaaucc	ugcauuagau	gaaaauucac	gagacacuuc	2160
	caaaagucuu	uuguugagcu	guuggaauuc	aaugacggca	gugaugucgu	gcacaucaca	2220
25	agagacucgg	uuuuuuuug	ggaguauuuc	uuuagauaug	aaguuuuuca	aaucaucuc	2280
	cacuuuagcu	aacacugaca	ugccguuggu	uaggcuuaca	acagccucau	uuguauuucu	2340
30	cacugcuucu	cuaaucaaug	caaucucacu	uucaaguugc	acugucuugg	cuaaagccac	2400
	cccggcagug	acugcagccc	cgagaccaag	aaucuaaccg	aggaaccucu	ucuuccuuuu	2460
	ggacuucaaa	gcauuggaug	auaacguucu	cauucaucc	acugcauuac	uauagauugc	2520
35	aagcucauga	gccauaacg	aguugcugcu	cuugcaugac	ucaauuuua	uuugagacaa	2580
	cuuaauugac	auaacuguca	ugugccaacc	aguucuaagg	gcacucuua	aaccugcagu	2640
40	cucaacacua	cauguggacu	cauagaauuu	uucuguuaau	guuuuugggu	gaauugguuu	2700
	gguguugaag	aucaacagaa	gaacuagaaa	gauccugcca	ggaucuuau	uuguccuauu	2760
	auaucuagc	uuuuuuuca	uuacuacug	auaagguugg	uacuuuuucu	gaaguugauu	2820
45	cggguauagg	ucacucaaga	uuagaccuc	cuuggaaaau	auuggagcau	aggacaccaa	2880
	uagggcauug	uugguuuggg	uucucugcuu	gagccuacuc	cacauaaagc	ucuuuuucuc	2940
50	cgacugagag	guuuggaccu	ccuaggugcg	ggguuugggu	uccuugucuc	cgguguuggu	3000
	gccguggugg	ugccugugga	uuguuuagau	gcagcuuugu	gggcuugagg	acuuaggcug	3060
	gguaugccaa	cuagaggaag	guuuuugaa	agcccuauc	augugagaua	aaauuuguua	3120
55	ucuaggccag	cugagucugc	acagguggua	cacugagacu	gauucuuguu	guuaaaacua	3180
	ggaaacaaaa	ucacaguuu	gucugucagg	uugcaguuu	uucugggaac	aacacaauua	3240
60	gaguuaucucc	aaauaguuuu	ccaauaggaa	ucauaaugca	auuccaugau	aacuuguuga	3300
	ccuccaagcu	cuagcacggc	ucucuucuga	ucagugcuua	aaccagaaag	gaagaaacag	3360
	aagcccugau	cacaccuau	guggacacac	auugccuuu	uguuggagua	cguagaaagg	3420
65	gugauaacuu	cuauuaaagg	ugcagcuucu	ucuccaccac	cauuguuuua	gcccauguuu	3480
	gccuucuuug	uuacaagauc	agggcaaaaca	cuuccuaagu	ugaucucacg	uuucucauaa	3540

ES 2 584 861 T3

	caguuggugc	ugugauguuc	aggaccugga	ggcuugcaua	gaacauccaa	uacgagcuug	3600
5	aaaucuucag	guaaaucagg	ucggucuaaa	uaaccuauugc	uggagcauug	guagggaucc	3660
	ucugagggug	ucaccauuuu	gacaggcucu	gugaucucau	gguggguggu	gguuuuggug	3720
	ggggguuugg	ugaguuuugg	gguggucccu	ugcucugugg	ugggcaggcc	ggcggguuggu	3780
10	uggggagggg	cggaugugcu	guuccggauu	guggcguucu	gcguggaguu	ggccuuguga	3840
	uuugauguga	auacagaaua	cauuauagacc	cccacacaaa	cugccacagc	agcacuugug	3900
15	agcacaccug	caauaagcuu	acacauuugg	uucacuuuuu	caacaguccu	aaauguguca	3960
	ggauacugag	uucucucaaa	guucaaaaua	guaaugcugc	caccacuuc	aaaguuccuu	4020
	cccauacuaa	gugaagucaa	cuuguaguuc	ucuuguaua	gcugcucuac	aguucucauc	4080
20	agauuccaau	aagauaguac	uuauccuaau	uuuuuguuaa	cuagacgaca	uacuacaagg	4140
	gcugauugaa	ucaccuagca	gaguggggcu	gucuggcucg	ggguuuauug	aaggaugguu	4200
25	uuugcuguuu	auaacauuau	guaguguucc	uugaguacag	guugcccggc	agacuaguua	4260
	cauugauucc	auaacuuggu	ggagggugau	ugggaugaac	cgugcauugg	cugcuagcga	4320
	ugccugaugu	agcaaugcuc	cuacugcugc	aggccauuau	cagcgcacac	acuguguuga	4380
30	uaacagcgca	ugcaaggaga	agagcuguca	gggcuagugu	aaauauagua	ccaauacggc	4440
	ugcuggucau	guugaucuca	aaagugaucu	gguaugaggu	cauguuagga	uccauuacuu	4500
35	auccuguuuu	auuuuacuaa	gauaugugug	uggauauaug	uaggugugua	uauuggguug	4560
	ucauauaggau	guugguggca	auaguuguug	ugcuagguga	agucgugggg	uuguaguua	4620
	ggauugagcu	gaucaauuggu	gacuuucua	uuuuucaucc	acuuguugag	gaacucuuga	4680
40	guauguagga	agugccugua	uguuuccagu	ucauaaucac	aucauguagg	cucaccugag	4740
	ucagauaggg	accaguucu	gcaagaauuu	gacaaccugc	cuuagcagu	uugaaugcac	4800
45	cuuuggugga	ugugauguug	aucacaagug	ugaguuccugc	auaggagacc	accuagcug	4860
	uuguuauagc	augguccaca	ucggagcuua	uagccugcuc	cacacuauca	agguccugcu	4920
	gucugauaga	cagugcucug	augaagacag	guauagugaa	ugacuuuaa	guaaccugcu	4980
50	uauaggaaaga	gcagacagcu	aucagcucau	gaguaggucg	auuaguagga	guaaugcugg	5040
	gcacagugua	aagcauguuu	uuaggcuua	gaauugucac	acagaagcuc	uuuuuaucaa	5100
55	aagcaacagg	uacuucguau	uccauguugc	cccagucauc	caaggcuau	auagcauuu	5160
	ucaagaauug	ccuuggcaug	guggcuaggc	cugcauugga	agagcucaga	ucuaccuuga	5220
	ucaugggacc	auguacaguu	gauauuugug	uacagaugac	uguaacauca	uguagcaggu	5280
60	ccaugacaga	guuccuuggu	agagauguuu	gaaacauugg	uauccacaca	guuagugua	5340
	uguuggcuga	auguuuuuca	accaaguuuu	gcuguauugc	agcuguauau	gggacgccau	5400
65	gguaucucuc	uaccaaguag	gccuccauua	uuuguccugu	uauuuuuuuu	aacuaaaaau	5460
	uaaugcccau	gaugucauca	acauccaagu	cuuccuagc	cuccucagca	uugcuggaca	5520
	cuaucuuuuc	uaguauccuu	gcucugucug	uuaaaauaca	ggcugaucca	ucaucaguuu	5580

ES 2 584 861 T3

cagcucuaga gcauuccuca ucucugagcu ucuccauggc cgccacucug ucauugacag 5640
 5 ucaagauguc agacuugauc aucucaauaa guucuucucu agugccuaua agggcaucuc 5700
 uaaucucauc ucuagcagug guugguccag caguugcuac cauaauggug uuuaaaaggc 5760
 cuauuaugua ggacaauuuc uccucuauuc uaucuagucu uuguucuaca gaugaagagc 5820
 10 ccggcucuug guuagucucc ucaaaugaua gauugcuuuc uucaucauaa ccaucagcgg 5880
 caaaaguuuug cauggucucc uuguacaggc uggcucccaa uccgacaaac uucucuucgg 5940
 guuccacaaa ggugaccauc ggcuuccuag uuuucuuagu aucgguauc ucuagcagc 6000
 15 auggcuucuu acuguguucc ggauugucag gaaccucaua gacauguaug gucucuaugu 6060
 cagcaucaga uucuuugggc ugcucuuccu uguuuugggg aggugugggu gguggagugg 6120
 20 agggggggagu ggaggguuua gugaguuuug cggcggcucu ugggggggag aguuugaug 6180
 agcugcgcaa uauggggggc auguuauuu uggugacaug aguggcagug uucgguauc 6240
 cagcuagugg uuuuuccgaa ggggaaggauc uauguuugag aaacuccucu gccuucuugu 6300
 25 uggcauccuc accgacaaau ucaggggcaa auuucuccau auuuauccua uauuuuccag 6360
 uuuuuauua aauaucauca ucaggagugu caucaacaau gcucagcugu uggcugauca 6420
 30 gcucucuuc uucuguaguc aaguucaaug cacuguagu aauuacauug uuguccuuua 6480
 aucuuucugc auaaucuuua gcagcauca agaguucucu auucuuagga gcacccuuau 6540
 aagaccuau gaugccuaaa ccugcagcau ugccaagcac gacacuggug aaauaggac 6600
 35 aauugguca agagaggagu gaagcuuuug gauuuuuuc aauaugauag aauccugccu 6660
 cccucuuug cuucugggca uauucguaaa ccucaaccac cuguuccauc ucagcuugaa 6720
 40 cacuagcaug gccuagcaug auauucuuga cagauuuugc caguaaacc caccucagca 6780
 uaacuugucc ugccccguau gcauucauga agagaccaga aaacagcccc ucaaccuugc 6840
 ugccacccuu gacacuagac ugggccaggc caaaagugau gaagacauc auguaauaag 6900
 45 gcuuccuuuc aaacagguca uaaaagcuuu cagcuaucug cuugaccucc agguugggau 6960
 aucuggcuuu cucggcuuuc agcacuuua aagcccuuc uuccacagca ucaaguccuc 7020
 50 cucugucucc ugcagcuau uuggaaaca cuaaugcugc aacacagaga acuauuacac 7080
 cacaucugg ugcaucaugc succgauuau cagguaacc gccuccuguu uugaguucuu 7140
 uugcuaccac uccucuggcu uguaucucca gacagcuua auuggccgca ucuauucca 7200
 55 cuauaucuag gacuuguauu uuauagucuu uuccuuguaa uuugauugua aaguccuuga 7260
 gcuguguguc cacacuuuu acauuguagc cggcuucucu caguauuuug augcuguc 7320
 60 cucugccuaa caaggacaug gcauuuugga gcccuaucuc ugccacuuc ucgcagcgg 7380
 ugaaagcagu aaguaggaac augccaagug uccuugcaag ggccuucugc auagcaugac 7440
 cagauacacu gguuacaucg ccuguggauc ugguaacacu guauuugcag uuggacagca 7500
 65 ggcuaucuu guuugagaca ucauugagcu ucaacuuguc uagagacau uuggcccggc 7560
 uuaggaugug uauuuauccu aauuuuuuuc uauaacuaa cauagacua auacugauc 7620

ES 2 584 861 T3

	acuugcuaua	ggugguggga	uucucugcug	guuggagcga	ucugaaucag	cucagucauc	7680
5	aUCAUCCUCA	uuacagauca	agucauggcc	uggguacaga	augcauccug	ugcacucaau	7740
	ccagucuucu	uugugcugua	caaagaaga	cuuuggguau	uucuccccag	uuacuuucu	7800
	cugccuccuu	augcacuucc	acucaaugcu	gucugccuca	gaugccauua	ccauccaagc	7860
10	caugucuucc	acauauugcu	uggccucaau	guaccccacu	uuuuccuuuu	uaagucuauc	7920
	auugcagauc	cugaugaagu	uccgguugau	guaucuaug	auguuuuua	agcucggcug	7980
	gaauuuuua	augagcaagu	caagccaccu	cucugagcuc	ugugugguac	gggacaccuu	8040
15	gcccAUCCCU	gcuucaucac	ucgacucuuc	acugucugaa	auguucaaga	uaguagcagg	8100
	uuuagaaaug	gucugaguga	acuuguucau	agcuguggac	auuaggauuu	guccuaccuu	8160
20	uuguuuuaau	uaacuacaua	augugcuguc	auuuuaacca	cugaucagcu	cugccaauag	8220
	cucacaugug	gggucaaugg	gaggcucuau	cucuugcccu	guaggacuaa	acacgauauc	8280
	uuuugugaac	caauguguua	auguuuggcc	ucuucuagua	uuauuggauga	auuuggcagc	8340
25	uugcacaau	ggucucaaca	aguugcaguc	ccuucccacg	agguacacgg	agagucucug	8400
	aucuugccau	guacugcaca	cccuagcacc	ucuuuagauc	guuuccaaau	cugaccuauu	8460
30	gaaguugguu	auguggaau	ccaaccaugc	agcucuucca	ccauaaccaa	gcuccaucuu	8520
	cacauuacag	cccaugauuc	uggucuuuaa	gacuaguugu	cuccacuugu	ccuaacuuuu	8580
35	ucggaguggu	ggguuugg					8598
	<210>	2					
	<211>	354					
	<212>	ARN					
40	<213>	Neumovirus felino					
	<400>	2					
	ccgugguggu	gccuguggau	uguuugaguu	cagcuuugug	ggcuugagga	cuuaggcugg	60
45	guaguccaac	uagagggagg	uuucuugaaa	gcccAUCACA	ugugagguaa	aauuuguuau	120
	cuaggccagc	ugagucugca	caggugguac	acugagacug	auucuuguug	uuaaaacuag	180
	gaaacaaaau	cacaguuuugg	ucugucaggu	ugcaguuuugu	ucugggaaca	acacaauuaa	240
50	aguugcucca	auaguguuuc	caauaggaau	cauaaugcaa	uuccaugaua	gcuuguugac	300
	cuccaagcuc	uagcacagcu	cucuucugau	cagugcuuaa	accagaaagg	aaga	354
55	<210>	3					
	<211>	207					
	<212>	ARN					
60	<213>	Neumovirus felino					
	<400>	3					
	gauuggggaug	aacugugcau	uggcugcuua	cgauGCCUGA	uguagcaaug	cuccuacugc	60
	ugcaggccau	uauCAGCGCA	cacacugugu	ugauaacagc	gcaugcaagg	aggagagcug	120
65	ucagggcuag	uguaauguau	gugccaauac	ggcugcuggu	cauguugauc	ucaaaguga	180
	ucugguguga	ggucauguua	ggaucCa				207

ES 2 584 861 T3

<210> 4
 <211> 8598
 5 <212> ARN
 <213> Neumovirus canino

 <400> 4
 10 ccaaaccac cacuccgaaa aaguuaggac aaguggagac aacuagucuu aaagaccaga 60
 aucaugggcu guaaugugau gauggagcuu gguuauggug gaagagcugc augguuggca 120
 uuccacauaa ccaacuuaa uaggucagau uuggaaacga ucuuaagagg ugcuaugggug 180
 15 ugcaguacau ggcaagauca gagacucucc guguaaccucg ugggaagggg cugcaacuug 240
 uugagaccu uugugcaagc ugccaaauuc auccauaaua cuagaagagg ccaaacauua 300
 acacauuggu ucacaaaaga uaucguguuu aguccuacag ggcaagagau agagccuccc 360
 20 auugaccca caugugagcu auuggcagag cugaucagug guuaaaauga cagcacauua 420
 uguaguuaau uaaaacaaag gguaggaca auccuaaugu ccacagcuau gaacaaguuc 480
 25 acucagacca uuucuaaac ugcuacuauc uugaacauuu cagacaguga agagucgagu 540
 gaugaagcag ggaugggcaa ggugucccg accacacaga gcucagagag guggcuugac 600
 30 uugcucauug aaaaauucca gccgagcuua caaaacauca cuagauacau caaccggaac 660
 uucaucagga ucugcaauga uagacuuaaa aaggaaaaaa ugggguacau ugaggccaag 720
 cauaugugg aagacauggc uuggauggua auggcaucug aggcagacag cauugagugg 780
 35 aagugcauaa ggaggcagaa gaaaguaacu ggggagaaau acccaaaguu cuucuuugua 840
 cagcaciaag aagacuggau ugagugcaca ggaugcauuc uguacccagg ccaugacuug 900
 aucuguaaug aggaugauga ugacugagcu gauucagauc gcuccaacca gcagagaauc 960
 40 ccaccaccua uagcaaguga uacaguauuu agucuaugau uaguuauga aaaauuuag 1020
 gauaaaauaca cauccuaagc cgggccaaa ugcucuauga caaguugaag cucaaugaug 1080
 45 ucucaaaca ggauagccug cuguccaacu gcaauacag uguuaccaga uccacaggcg 1140
 auguaaccag uguaucuggu caugcuaugc agaaggcccu ugcaaggaca cuuggcaugu 1200
 50 uccuacuuaug ugcuuuaac cgcugcgaag aaguggcaga gauagggcuc cauaugcca 1260
 uguccuuguu aggcagagau gacagcauca aaauacugag agaagccggc uacaauguaa 1320
 aaugugugga cacacagcuc aaggacuua caaucaauu acaaggaaa gacuauaaa 1380
 55 uacaaguuccu agauauagug ggaauagau cggccaauuu agcugaucug gagauacaag 1440
 ccagaggagu gguagcaaaa gaacucaaaa caggagccgg guuaccugau aaucggaggc 1500
 60 augaugcacc agauuguggu guaauguuc ucuguguugc agcauuaguu guuuccaaau 1560
 uagcugcagg agacagagga ggacuugaug cuguggaaaag aagggcuuua aaugucuga 1620
 aagccgagaa agccagauau cccaaccugg aggucaagca gauagcugaa agcuuuuug 1680
 65 accuguuuga aaggaagccu uauuacauug augucuucau cacuuuuggc cuggcccagu 1740
 cuagugucua ggguggcagc aagguugagg ggcuguuuuc uggucucuuc augaauugcau 1800

ES 2 584 861 T3

	acggggcagg	acaaguuaug	cugagguggg	guuuacuggc	aaaaucuguc	aagaauauca	1860
	ugcuaggcca	ugcuaguguu	caagcugaga	uggaacaggu	gguugagguu	uacgaauaug	1920
5	cccagaagca	aggaggggag	gcaggauucu	aucauuuuag	aaauaaucca	aaagcuucac	1980
	uccucucuuu	gaccaauugu	ccuaauuuca	ccagugucgu	gcuuggcaau	gcugcagguu	2040
10	uaggcaucau	aggguucuau	aaggguucuc	cuaagaauag	agaacucuuu	gaugcugcua	2100
	aagauuaugc	agaaagauua	aaggacaaca	auguaauuaa	cuacagugca	uugaacuuga	2160
	cuacagaaga	aagagagcug	aucagccaac	agcugagcau	uguugaugac	acuccugaug	2220
15	augauuuua	auuaaaaaacu	ggaaaauua	ggauaaaauu	ggagaaauuu	gccccugaau	2280
	uugucgguga	ggaugccaac	aagaaggcag	aggaguuuuc	caaacauaga	uccuucccuu	2340
20	cggaaaaacc	acuagcuggu	auaccgaaca	cugccacuca	ugucaccaa	uauaacaugc	2400
	cccccauuu	gcgcagcuca	uucaaacucu	ccccccaag	agccgccgca	aaacucacua	2460
	aaccuccac	uccccccucc	acuccaccac	ccacaccucc	ccaaaacaag	gaagagcagc	2520
25	ccaaagaauc	ugaugcugac	auagagacca	uacaugucua	ugagguuccu	gacaauccgg	2580
	aacacaguaa	gaagccaugc	ugcucagaug	auaccgauac	uaagaaaacu	aggaagccga	2640
30	uggucaccuu	uguggaaccc	gaagagaagu	uugucggauu	gggagccagc	cuguacaagg	2700
	agaccaugca	aacuuuugcc	gcugaugguu	augaugaaga	aagcaaucua	ucauuugagg	2760
	agacuaacca	agagccgggc	ucuucaucug	uagaacaaag	acuagauaga	auagaggaga	2820
35	aauguccua	cauaauaggc	cuuuuaaaca	ccauuauggu	agcaacugcu	ggaccaacca	2880
	cugcuagaga	ugagauuaga	gaugcccuua	uaggcacuag	agaagaacuu	auugagauga	2940
40	ucaagucuga	caucuugacu	gucaaugaca	gaguggcggc	cauggagaag	cucagagaug	3000
	aggaaugcuc	uagagcugaa	acugaugaug	gaucagccug	uuuuuaaca	gacagagcaa	3060
	ggauacuaga	uaagauagug	uccagcaaug	cugaggaggc	uaaggaagac	uuggauguug	3120
45	augacaucau	gggcauuauu	uuuuaguuaa	uuaaaauaac	aggacaaaua	auaggaggccu	3180
	acuugguaga	gauguaccu	ggcgucccau	auacagcugc	aaucagcua	aacuugguug	3240
50	aaaaacauuc	agccaacaua	ucacuaacug	uguggauacc	aauguuucaa	acaucucucac	3300
	caaggaacuc	ugucauggac	cugcuacaug	auguuacagu	caucuguaca	caaauaucaa	3360
	cuguacaugg	ucccaugauc	aagguagauc	ugagcucuuc	caaugcaggc	cuagccacca	3420
55	ugccaaggca	auucuugaua	aaugcuauca	uagccuugga	ugacuggggc	aacauggaau	3480
	acgaaguacc	uguugcuuuu	gauaaaaaga	gcuucugugu	gacaauucuu	aagccuaaaa	3540
60	acaugcuuaa	cacugugccc	agcauuacuc	cuacuaaucg	accuacucau	gagcugauag	3600
	cugucugcuc	uuuccauaac	aggguuacau	uaaagucuuu	cacuaauaccu	gucuucauca	3660
	gagcacuguc	uaucaagacag	caggaccuug	auagugugga	gcaggcuaua	agcuccgaug	3720
65	uggaccaugc	uauaacaaca	gcuagggugg	cucccuauuc	aggacucaca	cuugugauca	3780
	acaucacauc	caccaaaggu	gcauucaaac	ugcuaaaggc	agguugucua	auucuugcag	3840

ES 2 584 861 T3

	aacugggucc	cuaucugacu	caggugagcc	uacaugaugu	gauuaugaac	uggaaacaua	3900
	caggcaciuc	cuacauacuc	aagaguuccu	caacaagugg	augaaaaau	agaaagucac	3960
5	cauugaucag	cucaauccau	aacuacaacc	ccacgacuuc	accuagcaca	acaacuauug	4020
	ccaccaacau	ccauaugaca	accacauaua	cacaccuaca	uauauccaca	cacauaucuu	4080
10	aguuaaaaua	aacaggauaa	guaauggauc	cuaacaugac	cucauaccag	aucacuuuug	4140
	agaUCAACAU	gaccagcagc	cguauuggua	cauauuuac	acuagcccug	acagcucuuc	4200
	uccuugcaug	cgCUGUUaUC	aacacagugu	gugcgCUGaU	aauggccugc	agcaguagga	4260
15	gcauugcuac	aucaggcauc	gcuagcagcc	aaugcacggu	ucaucccaau	caccuccac	4320
	caaguuaugg	aaUCAaUGua	acuagucugc	cgggcaaccu	guacucaagg	aacacuacau	4380
20	aauguuauaa	acagcaaaaa	ccaucuuca	auaaaccccg	agccagacag	ccccacucug	4440
	cuaggugauu	caucagccc	uuguaguaug	ucgucuaguU	aacaaaaau	uaggauaagu	4500
	acuaucuuau	uggaaucuga	ugagaacugu	agagcagcuc	auacaagaga	acuacaaguU	4560
25	gacuucacuu	aguaugggaa	ggaacuuuga	aguggguggc	agcauuacua	auuugaacuu	4620
	ugagagaacu	caguauccug	acacauuuag	gacuguugua	aaagugaacc	aaauguguaa	4680
30	gcuuauugca	ggugugcuca	caagugcugc	uguggcaguU	uguguggggg	ucauaaugua	4740
	uucuguaUUC	acaUCAaaUC	acaaggccaa	cuccacgcag	aacgccacaa	uccggaacag	4800
	cacaUCCGCC	ccuccccaac	caaccgccgg	ccugcccacc	acagagcaag	ggaccacccc	4860
35	caaacucacc	aaacccccca	ccaaaaccac	caccaccau	gagaucacag	agccugucaa	4920
	aauggugaca	cccucagagg	aucccuacca	augcuccagc	aaugguuauU	uagaccgacc	4980
40	ugauuuaccu	gaagauuUCA	agcucguauU	ggauuguUCA	ugcaagccuc	cagguccuga	5040
	acaucacagc	accaacuguu	augagaaacg	ugagaUCAac	uuaggaagug	uuugcccuga	5100
	ucUUGuaaca	augaagggcaa	acaugggcuU	aaacaauuggu	gguggagaag	aagcugcacc	5160
45	uuauauagag	guuaucaccc	uuucUacgua	cuccaacaAAA	agggcaaugu	guguccacaa	5220
	ugggugugau	cagggcuucU	guuuCUuccu	uucugguuua	agcacugauc	agaagagagc	5280
50	cgugcuagag	cuuggagguc	aacaaguUau	cauggaaUug	cauuaugauU	ccuauuggaa	5340
	acacuauugg	aguaacucua	auuguguugu	ucccagaaca	aacugcaacc	ugacagacca	5400
	aacugugauU	uuguuuccua	guuuuaaca	caagaucag	ucucagugua	ccaccugugc	5460
55	agacucagcu	ggccuagaua	acaaauuuua	ucucacaugu	gaugggcuuu	caagaaaccu	5520
	uccucuaguU	ggacuaccCa	gccuaagucc	ucaagcccac	aaagcugcac	ucaaaacauc	5580
60	cacaggcacc	accacggcac	caacaccgga	gacaaggaac	ccaacccccg	caccuaggag	5640
	guccaaaccu	cucagucgga	agaaaagagc	uuuauugugga	guaggcucaa	gcagagaacc	5700
	caaaccaaca	augcccuauU	gguguccuau	gcuccaaUua	uuuccaagga	ggucuaauuc	5760
65	uugagugacc	uauaccCGaa	ucaacuucag	aaUaaguacc	aaccuuauca	guaguuaaug	5820
	aaaaauaagc	uaugauauaa	uaggacaaau	augauuccug	gcaggauCUU	ucUaguucuu	5880

ES 2 584 861 T3

	cuguugaucu	ucaacaccaa	accaauucac	ccaaauacau	uaacagaaaa	auucuaugag	5940
	uccacaugua	guguugagac	ugcagguuuau	aagagugccc	uuagaacugg	uuggcacaug	6000
5	acaguuaugu	caauuaaguu	gucucaaaau	aaauuugagu	caugcaagag	cagcaacucg	6060
	uuauuggcuc	augagcuugc	aaucuauagu	aaugcagugg	augaauugag	aacguuauca	6120
	uccaaugcuu	ugaaguccaa	aaggaagaag	agguuccucg	guuugauucu	uggucucggg	6180
10	gcugcaguca	cugccggggg	ggcuuuagcc	aagacagugc	aacuugaaag	ugagauugca	6240
	uugauuagag	aagcagugag	aaauacaaau	gaggcuguug	uuagccuaac	caacggcaug	6300
15	ucaguguuag	cuaaaguggu	agaugauuug	aaaaacuuca	uaucaaaaga	auuacuccca	6360
	aaaauaaacc	gagucucuug	ugaugugcac	gacaucacug	ccgucuuuag	auuccaacag	6420
	cucaacaaaa	gacuuuugga	agugucucgu	gaauuuuacau	cuaaugcagg	auuaacacac	6480
20	acuguuucau	cuuuuauuu	aacagaccgg	gaacucaccu	ccauaguagg	cggcauggcu	6540
	guuucagcag	gccaaaaaga	gauaaugcua	ucuaguagag	cuauaaugag	aagaaacggg	6600
25	uuagcauuau	uaaguucagu	caaugcugac	acacugguuu	auauaaauaca	acucccguaa	6660
	uuugguguuu	uggacacaga	uuguugggua	auaagaaguu	ccauagacug	ucauaacaua	6720
	gcagacaaa	augcuuguuu	ggcuagagcu	gauaauggcu	gguaauugca	caaugcaggc	6780
30	ucauuaucau	acuucccauc	accaacagau	ugugagaucc	acaauuggua	uguuuucugu	6840
	gacacucuga	aaagucuaac	uguaccugua	acaucacgag	aaugcaacuc	aaacauguau	6900
35	accacuaacu	acgauuguaa	gauuuccaca	aguaaaacau	augugaguac	agcaguacug	6960
	acuacaauug	guugcuuggu	gucuuugcua	ggccaauaaca	guugcacagu	caucaauaau	7020
	gacaaaggua	uaauaaggac	ucugccagau	gguuugcacu	acaucuccaa	caaaggggug	7080
40	gacaagguuc	aaguaggaaa	cacugucua	uaucuuagca	aagaaguugg	caagucauu	7140
	guagucagag	gggaaccguu	ggucuuugaa	uauagccuu	ugaauuuucc	ugacgauaaa	7200
45	uuugauguug	cuauaagaga	uguggagcau	agcaucaauc	agacacgcac	auucuugaag	7260
	gccucugauc	aguuaauugga	cuuaagugaa	aacagaguga	auaaaaguuu	aaccaaguca	7320
	uauauacuaa	caacucugcu	caucguugua	augcuuauua	uaauaauggu	ugucauaggg	7380
50	uucuuucugu	auaagguauc	gaaaauuau	agggacaaca	gguuugaauc	caaaaguaca	7440
	ccuggccuca	caguuuuau	augacaauug	uaccaaauca	uaauugagu	aguuaauuaa	7500
55	aaaacuauag	auaagugaca	auccagacc	aacacuucc	ucgacucuca	aggacagggu	7560
	aggaugagug	ugagaccuug	caauuuugag	guucaagggu	uuuguuccag	agggaggaau	7620
	ugcaaguaua	gucauaaaau	uugggaauug	ccuuugaaaa	cucuuaugcu	caggcagaac	7680
60	uauaugcuca	auaggauuuu	uagguuccuc	gauaccaaca	cagaugcaau	gaccgauguc	7740
	aguggauuug	augcaccaca	aaggacugcu	gaguaugcuu	ugggaaccu	aggugugcug	7800
65	aaaaguuacc	uggaaaaaac	uaacaacau	acuaagucga	uagcuugugg	caguuuugau	7860
	acuguguuac	agaacuugga	uguuggucug	guaauacaag	caagagauag	caacgcagag	7920

ES 2 584 861 T3

gacgucaauu auuugagaag uugcaacacu auacuaucuu auauagacaa gauacacaag 7980
aagagacaag uuauucacau ucucaagaaa cugccaguag gaguauuug cagucugauc 8040
5 caaucuguca ucuccaucga ggagaagaua aaucuucua ugaaaacaga augauaaggc 8100
ugccuaaaaua cuauccagcc auacugcaua agauguauau uauuggagua aaugaaacc 8160
10 ucacuuacga ugggucuaga ccauccacaa uaauagaugc agggagugcu guggugugga 8220
accgugucga ugugauagcc ugugugaaag aggccuugug cugcauagaa cucagcugga 8280
guaaucaagu gaucauagac uuugauuaua gucaggccag augaugugga cuguauuccu 8340
15 ucaucuguca gcuaucaguc auuaaccuca aaugucaau cguguagauu ccaagucaac 8400
caacuucaug uuaauucaau aguuauaua aaauaaucaa uuaggaucaa uauggauccu 8460
20 auugaugaac aagaaguaaa uguguacuua ccagauagcu acuuaaaggg uguuauaucu 8520
uuuagugaaa cuaaugcucu uggcagcugu aucauuggua gaccuuucuu gaaagacgac 8580
uucaccgcca ccaccucc 8598

25
<210> 5
<211> 116
<212> PRT
<213> Neumovirus felino

30
<400> 5

35
Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asp Gln Lys Arg Ala Val Leu Glu Leu Gly
1 5 10 15

40
Gly Gln Gln Ala Ile Met Glu Leu His Tyr Asp Ser Tyr Trp Lys His
20 25 30

45
Tyr Trp Ser Asn Phe Asn Cys Val Val Pro Arg Thr Asn Cys Asn Leu
35 40 45

50
Thr Asp Gln Thr Val Ile Leu Phe Pro Ser Phe Asn Asn Lys Asn Gln
50 55 60

55
Ser Gln Cys Thr Thr Cys Ala Asp Ser Ala Gly Leu Asp Asn Lys Phe
65 70 75 80

60
Tyr Leu Thr Cys Asp Gly Leu Ser Arg Asn Leu Pro Leu Val Gly Leu
85 90 95

65
Pro Ser Leu Ser Pro Gln Ala His Lys Ala Glu Leu Lys Gln Ser Thr
100 105 110

70
Gly Thr Thr Thr
115

75
<210> 6
<211> 68
<212> PRT
<213> Neumovirus felino

ES 2 584 861 T3

<400> 6

5 Asp Pro Asn Met Thr Ser His Gln Ile Thr Phe Glu Ile Asn Met Thr
 1 5 10 15
 10 Ser Ser Arg Ile Gly Thr Tyr Ile Thr Leu Ala Leu Thr Ala Leu Leu
 20 25 30
 15 Leu Ala Cys Ala Val Ile Asn Thr Val Cys Ala Leu Ile Met Ala Cys
 35 40 45
 20 Ser Ser Arg Ser Ile Ala Thr Ser Gly Ile Val Ser Ser Gln Cys Thr
 50 55 60
 25 Val His Pro Asn
 65

<210> 7
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Neumovirus canino

<400> 7

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

<210> 8
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> Neumovirus canino

<400> 8

ES 2 584 861 T3

1 Met Ser Thr Ala Met Asn Lys Phe Thr Gln Thr Ile Ser Lys Pro Ala
 5 Thr Ile Leu Asn Ile Ser Asp Ser Glu Glu Ser Ser Asp Glu Ala Gly
 10 Met Gly Lys Val Ser Arg Thr Thr Gln Ser Ser Glu Arg Trp Leu Asp
 15 Leu Leu Ile Glu Lys Phe Gln Pro Ser Leu Gln Asn Ile Thr Arg Tyr
 20 Ile Asn Arg Asn Phe Ile Arg Ile Cys Asn Asp Arg Leu Lys Lys Glu
 25 Lys Met Gly Tyr Ile Glu Ala Lys Gln Tyr Val Glu Asp Met Ala Trp
 30 Met Val Met Ala Ser Glu Ala Asp Ser Ile Glu Trp Lys Cys Ile Arg
 35 Arg Gln Lys Lys Val Thr Gly Glu Lys Tyr Pro Lys Phe Phe Phe Val
 40 Gln His Lys Glu Asp Trp Ile Glu Cys Thr Gly Cys Ile Leu Tyr Pro
 45 Gly His Asp Leu Ile Cys Asn Glu Asp Asp Asp Asp
 <210> 9
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> Neumovirus canino
 <400> 9
 50 Met Ser Leu Asp Lys Leu Lys Leu Asn Asp Val Ser Asn Lys Asp Ser
 55 Leu Leu Ser Asn Cys Lys Tyr Ser Val Thr Arg Ser Thr Gly Asp Val
 60 Thr Ser Val Ser Gly His Ala Met Gln Lys Ala Leu Ala Arg Thr Leu
 65 Gly Met Phe Leu Leu Thr Ala Phe Asn Arg Cys Glu Glu Val Ala Glu
 70 Ile Gly Leu Gln Tyr Ala Met Ser Leu Leu Gly Arg Asp Asp Ser Ile
 75 80

ES 2 584 861 T3

Lys Ile Leu Arg Glu Ala Gly Tyr Asn Val Lys Cys Val Asp Thr Gln
 85 90 95
 5 Leu Lys Asp Phe Thr Ile Lys Leu Gln Gly Lys Asp Tyr Lys Ile Gln
 100 105 110
 10 Val Leu Asp Ile Val Gly Ile Asp Ala Ala Asn Leu Ala Asp Leu Glu
 115 120 125
 15 Ile Gln Ala Arg Gly Val Val Ala Lys Glu Leu Lys Thr Gly Ala Gly
 130 135 140
 20 Leu Pro Asp Asn Arg Arg His Asp Ala Pro Asp Cys Gly Val Ile Val
 145 150 155 160
 25 Leu Cys Val Ala Ala Leu Val Val Ser Lys Leu Ala Ala Gly Asp Arg
 165 170 175
 30 Gly Gly Leu Asp Ala Val Glu Arg Arg Ala Leu Asn Val Leu Lys Ala
 180 185 190
 35 Glu Lys Ala Arg Tyr Pro Asn Leu Glu Val Lys Gln Ile Ala Glu Ser
 195 200 205
 40 Phe Tyr Asp Leu Phe Glu Arg Lys Pro Tyr Tyr Ile Asp Val Phe Ile
 210 215 220
 45 Thr Phe Gly Leu Ala Gln Ser Ser Val Lys Gly Gly Ser Lys Val Glu
 225 230 235 240
 50 Gly Leu Phe Ser Gly Leu Phe Met Asn Ala Tyr Gly Ala Gly Gln Val
 245 250 255
 55 Met Leu Arg Trp Gly Leu Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met Leu
 260 265 270
 60 Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val Tyr
 275 280 285
 65 Glu Tyr Ala Gln Lys Gln Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile Arg
 290 300
 70 Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Asn Cys Pro Asn Phe
 305 310 315 320
 75 Thr Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Ile Gly Ser
 325 330 335
 80 Tyr Lys Gly Ala Pro Lys Asn Arg Glu Leu Phe Asp Ala Ala Lys Asp
 340 345 350

ES 2 584 861 T3

Tyr Ala Glu Arg Leu Lys Asp Asn Asn Val Ile Asn Tyr Ser Ala Leu
 355 360 365
 5 Asn Leu Thr Thr Glu Glu Arg Glu Leu Ile Ser Gln Gln Leu Ser Ile
 370 375 380
 10 Val Asp Asp Thr Pro Asp Asp Asp Ile
 385 390
 15 <210> 10
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> Neumovirus canino
 <400> 10
 20 Met Glu Lys Phe Ala Pro Glu Phe Val Gly Glu Asp Ala Asn Lys Lys
 1 5 10 15
 25 Ala Glu Glu Phe Leu Lys His Arg Ser Phe Pro Ser Glu Lys Pro Leu
 20 25 30
 30 Ala Gly Ile Pro Asn Thr Ala Thr His Val Thr Lys Tyr Asn Met Pro
 35 40 45
 35 Pro Ile Leu Arg Ser Ser Phe Lys Leu Ser Pro Pro Arg Ala Ala Ala
 50 55 60
 40 Lys Leu Thr Lys Pro Ser Thr Pro Pro Ser Thr Pro Pro Pro Thr Pro
 65 70 75 80
 45 Pro Gln Asn Lys Glu Glu Gln Pro Lys Glu Ser Asp Ala Asp Ile Glu
 85 90 95
 50 Thr Ile His Val Tyr Glu Val Pro Asp Asn Pro Glu His Ser Lys Lys
 100 105 110
 55 Pro Cys Cys Ser Asp Asp Thr Asp Thr Lys Lys Thr Arg Lys Pro Met
 115 120 125
 60 Val Thr Phe Val Glu Pro Glu Glu Lys Phe Val Gly Leu Gly Ala Ser
 130 135 140
 65 Leu Tyr Lys Glu Thr Met Gln Thr Phe Ala Ala Asp Gly Tyr Asp Glu
 145 150 155 160
 70 Glu Ser Asn Leu Ser Phe Glu Glu Thr Asn Gln Glu Pro Gly Ser Ser
 165 170
 75 Ser Val Glu Gln Arg Leu Asp Arg Ile Glu Glu Lys Leu Ser Tyr Ile
 180 185 190
 80 Ile Gly Leu Leu Asn Thr Ile Met Val Ala Thr Ala Gly Pro Thr Thr

ES 2 584 861 T3

5 Val Cys Ser Phe His Asn Arg Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Ile Pro
145 150 155 160

10 Val Phe Ile Arg Ala Leu Ser Ile Arg Gln Gln Asp Leu Asp Ser Val
165 170 175

15 Val Ala Pro Tyr Ala Gly Leu Thr Leu Val Ile Asn Ile Thr Ser Thr
195 200 205

20 Lys Gly Ala Phe Lys Leu Leu Lys Ala Gly Cys Gln Ile Leu Ala Glu
210 215 220

25 Leu Gly Pro Tyr Leu Thr Gln Val Ser Leu His Asp Val Ile Met Asn
225 230 235 240

30 Trp Lys His Thr Gly Thr Ser Tyr Ile Leu Lys Ser Ser Ser Thr Ser
245 250 255

35 <210> 12
<211> 92
<212> PRT
<213> Neumovirus canino

40 <400> 12

Met Asp Pro Asn Met Thr Ser Tyr Gln Ile Thr Phe Glu Ile Asn Met
1 5 10 15

45 Thr Ser Ser Arg Ile Gly Thr Tyr Ile Thr Leu Ala Leu Thr Ala Leu
20 25 30

50 Leu Leu Ala Cys Ala Val Ile Asn Thr Val Cys Ala Leu Ile Met Ala
35 40 45

55 Cys Ser Ser Arg Ser Ile Ala Thr Ser Gly Ile Ala Ser Ser Gln Cys
50 55 60

60 Thr Val His Pro Asn His Pro Pro Pro Ser Tyr Gly Ile Asn Val Thr
65 70 75 80

Ser Leu Pro Gly Asn Leu Tyr Ser Arg Asn Thr Thr
85 90

65 <210> 13
<211> 414
<212> PRT

ES 2 584 861 T3

<213> Neumovirus canino

<400> 13

5 Met Arg Thr Val Glu Gln Leu Ile Gln Glu Asn Tyr Lys Leu Thr Ser
 1 5 10 15

10 Leu Ser Met Gly Arg Asn Phe Glu Val Gly Gly Ser Ile Thr Asn Leu
 20 25 30

15 Asn Phe Glu Arg Thr Gln Tyr Pro Asp Thr Phe Arg Thr Val Val Lys
 35 40 45

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

25 Val Ala Val Cys Val Gly Val Ile Met Tyr Ser Val Phe Thr Ser Asn
 65 70 75 80

30 His Lys Ala Asn Ser Thr Gln Asn Ala Thr Ile Arg Asn Ser Thr Ser
 85 90 95

35 Ala Pro Pro Gln Pro Thr Ala Gly Leu Pro Thr Thr Glu Gln Gly Thr
 100 105 110

40 Thr Pro Lys Leu Thr Lys Pro Pro Thr Lys Thr Thr Thr His His Glu
 115 120 125

45 Ile Thr Glu Pro Val Lys Met Val Thr Pro Ser Glu Asp Pro Tyr Gln
 130 135 140

50 Cys Ser Ser Asn Gly Tyr Leu Asp Arg Pro Asp Leu Pro Glu Asp Phe
 145 150 155 160

55 Lys Leu Val Leu Asp Val Leu Cys Lys Pro Pro Gly Pro Glu His His
 165 170 175

60 Ser Thr Asn Cys Tyr Glu Lys Arg Glu Ile Asn Leu Gly Ser Val Cys
 180 185 190

65 Pro Asp Leu Val Thr Met Lys Ala Asn Met Gly Leu Asn Asn Gly Gly
 195 200 205

70 Gly Glu Glu Ala Ala Pro Tyr Ile Glu Val Ile Thr Leu Ser Thr Tyr
 210 215 220

75 Ser Asn Lys Arg Ala Met Cys Val His Asn Gly Cys Asp Gln Gly Phe
 225 230 235 240

80 Cys Phe Phe Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asp Gln Lys Arg Ala Val Leu
 245 250 255

ES 2 584 861 T3

Glu Leu Gly Gly Gln Gln Val Ile Met Glu Leu His Tyr Asp Ser Tyr
 260 265 270
 5 Trp Lys His Tyr Trp Ser Asn Ser Asn Cys Val Val Pro Arg Thr Asn
 275 280 285
 10 Cys Asn Leu Thr Asp Gln Thr Val Ile Leu Phe Pro Ser Phe Asn Asn
 290 295 300
 15 Lys Asn Gln Ser Gln Cys Thr Thr Cys Ala Asp Ser Ala Gly Leu Asp
 305 310 315
 20 Asn Lys Phe Tyr Leu Thr Cys Asp Gly Leu Ser Arg Asn Leu Pro Leu
 325 330 335
 25 Val Gly Leu Pro Ser Leu Ser Pro Gln Ala His Lys Ala Ala Leu Lys
 340 345 350
 30 Gln Ser Thr Gly Thr Thr Thr Ala Pro Thr Pro Glu Thr Arg Asn Pro
 355 360 365
 35 Thr Pro Ala Pro Arg Arg Ser Lys Pro Leu Ser Arg Lys Lys Arg Ala
 370 375 380
 40 Leu Cys Gly Val Gly Ser Ser Arg Glu Pro Lys Pro Thr Met Pro Tyr
 385 390 395 400
 45 Trp Cys Pro Met Leu Gln Leu Phe Pro Arg Arg Ser Asn Ser
 405 410
 50 <210> 14
 <211> 537
 <212> PRT
 <213> Neumovirus canino
 <400> 14
 Met Ile Pro Gly Arg Ile Phe Leu Val Leu Leu Leu Ile Phe Asn Thr
 1 5 10 15
 55 Lys Pro Ile His Pro Asn Thr Leu Thr Glu Lys Phe Tyr Glu Ser Thr
 20 25 30
 60 Cys Ser Val Glu Thr Ala Gly Tyr Lys Ser Ala Leu Arg Thr Gly Trp
 35 40 45
 65 His Met Thr Val Met Ser Ile Lys Leu Ser Gln Ile Asn Ile Glu Ser
 50 55 60
 70 Cys Lys Ser Ser Asn Ser Leu Leu Ala His Glu Leu Ala Ile Tyr Ser
 65 70 75 80
 85 Asn Ala Val Asp Glu Leu Arg Thr Leu Ser Ser Asn Ala Leu Lys Ser

ES 2 584 861 T3

	85					90					95					
5	Lys	Arg	Lys	Lys 100	Arg	Phe	Leu	Gly	Leu 105	Ile	Leu	Gly	Leu	Gly 110	Ala	Ala
10	Val	Thr	Ala 115	Gly	Val	Ala	Leu	Ala 120	Lys	Thr	Val	Gln	Leu 125	Glu	Ser	Glu
15	Ile	Ala 130	Leu	Ile	Arg	Glu	Ala 135	Val	Arg	Asn	Thr	Asn 140	Glu	Ala	Val	Val
20	Ser 145	Leu	Thr	Asn	Gly	Met 150	Ser	Val	Leu	Ala	Lys 155	Val	Val	Asp	Asp	Leu 160
25	Lys	Asn	Phe	Ile	Ser 165	Lys	Glu	Leu	Leu	Pro 170	Lys	Ile	Asn	Arg	Val 175	Ser
30	Cys	Asp	Val	His 180	Asp	Ile	Thr	Ala	Val 185	Ile	Arg	Phe	Gln	Gln 190	Leu	Asn
35	Lys	Arg	Leu 195	Leu	Glu	Val	Ser	Arg 200	Glu	Phe	Ser	Ser	Asn 205	Ala	Gly	Leu
40	Thr	His 210	Thr	Val	Ser	Ser	Phe 215	Met	Leu	Thr	Asp	Arg 220	Glu	Leu	Thr	Ser
45	Ile 225	Val	Gly	Gly	Met	Ala 230	Val	Ser	Ala	Gly	Gln 235	Lys	Glu	Ile	Met	Leu 240
50	Ser	Ser	Arg	Ala	Ile 245	Met	Arg	Arg	Asn	Gly 250	Leu	Ala	Ile	Leu	Ser 255	Ser
55	Val	Asn	Ala	Asp 260	Thr	Leu	Val	Tyr	Ile 265	Ile	Gln	Leu	Pro	Leu 270	Phe	Gly
60	Val	Met	Asp 275	Thr	Asp	Cys	Trp	Val 280	Ile	Arg	Ser	Ser	Ile 285	Asp	Cys	His
65	Asn	Ile 290	Ala	Asp	Lys	Tyr	Ala 295	Cys	Leu	Ala	Arg	Ala 300	Asp	Asn	Gly	Trp
70	Tyr 305	Cys	His	Asn	Ala	Gly 310	Ser	Leu	Ser	Tyr	Phe 315	Pro	Ser	Pro	Thr	Asp 320
75	Cys	Glu	Ile	His	Asn 325	Gly	Tyr	Val	Phe	Cys 330	Asp	Thr	Leu	Lys	Ser 335	Leu
80	Thr	Val	Pro	Val 340	Thr	Ser	Arg	Glu	Cys 345	Asn	Ser	Asn	Met	Tyr 350	Thr	Thr
85	Asn	Tyr	Asp	Cys	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Lys	Thr	Tyr	Val	Ser	Thr	Ala

ES 2 584 861 T3

5 Pro Gln Arg Thr Ala Glu Tyr Ala Leu Gly Thr Ile Gly Val Leu Lys
 65 70 75 80
 Ser Tyr Leu Glu Lys Thr Asn Asn Ile Thr Lys Ser Ile Ala Cys Gly
 85 90 95
 10 Ser Leu Ile Thr Val Leu Gln Asn Leu Asp Val Gly Leu Val Ile Gln
 100 105 110
 15 Ala Arg Asp Ser Asn Ala Glu Asp Val Asn Tyr Leu Arg Ser Cys Asn
 115 120 125
 20 Thr Ile Leu Ser Tyr Ile Asp Lys Ile His Lys Lys Arg Gln Val Ile
 130 135 140
 25 His Ile Leu Lys Lys Leu Pro Val Gly Val Leu Cys Ser Leu Ile Gln
 145 150 155 160
 30 Ser Val Ile Ser Ile Glu Glu Lys Ile Asn Ser Ser Met Lys Thr Glu
 165 170 175
 35 <210> 16
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Neumovirus canino
 <400> 16
 40 Met Gln Ser Asp Pro Ile Cys His Leu His Arg Gly Glu Asp Lys Phe
 1 5 10 15
 Phe Tyr Glu Asn Arg Met Ile Arg Leu Pro Lys Tyr Tyr Pro Ala Ile
 20 25 30
 45 Leu His Lys Met Tyr Ile Ile Gly Val Asn Arg Asn Leu Thr Tyr Asp
 35 40 45
 50 Gly Ser Arg Pro Ser Thr Ile Ile Asp Ala Gly Lys Ser Val Val Trp
 50 55
 55 Asn Arg Val Asp Val Ile Ala Cys Val Lys Glu Ala Leu Cys Cys Ile
 65 70 75 80
 60 Glu Leu Ser Trp Ser Asn Gln Val Ile Ile Asp Phe Asp Tyr Ser Gln
 85 90 95
 Ala Arg
 65 <210> 17
 <211> 49
 <212> PRT

ES 2 584 861 T3

<213> Neumovirus canino
 <400> 17

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

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

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

Ser

20
 <210> 18
 <211> 13
 <212> ARN
 <213> Neumovirus canino

25
 <400> 18
 uaguuaauua aaa 13

30
 <210> 19
 <211> 14
 <212> ARN
 <213> Neumovirus canino

35
 <400> 19
 uaguuauga aaaa 14

40
 <210> 20
 <211> 14
 <212> ARN
 <213> Neumovirus canino

45
 <400> 20
 uauuaauua aaaa 14

50
 <210> 21
 <211> 13
 <212> ARN
 <213> Neumovirus canino

55
 <400> 21
 uaguuaaua aaa 13

60
 <210> 22
 <211> 14
 <212> ARN
 <213> Neumovirus canino

65
 <400> 22
 uaguuaaca aaaa 14

65
 <210> 23
 <211> 14
 <212> ARN

	<213> Neumovirus canino	
5	<400> 23 uaguuaauga aaaa	14
10	<210> 24 <211> 11 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
15	<400> 24 cuggaaaaua u	11
20	<210> 25 <211> 16 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
25	<400> 25 uaagcuauga uauaau	16
30	<210> 26 <211> 10 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
35	<400> 26 aggacaagug	10
40	<210> 27 <211> 10 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
45	<400> 27 aggacaauc	10
50	<210> 28 <211> 10 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
55	<400> 28 aggauaaaua	10
60	<210> 29 <211> 10 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
65	<400> 29 aggacaaaua	10
	<210> 30 <211> 10 <212> ARN <213> Neumovirus canino	
	<400> 30 aggauaagua	10

	<210> 31		
	<211> 10		
	<212> ARN		
5	<213> Neumovirus canino		
	<400> 31		
	aggauaagug		10
10	<210> 32		
	<211> 10		
	<212> ARN		
	<213> Neumovirus canino		
15	<400> 32		
	aggaucaaua		10
20	<210> 33		
	<211> 15		
	<212> ARN		
	<213> Neumovirus canino		
25	<400> 33		
	uaguuaauua aaaaa		15
30	<210> 34		
	<211> 14		
	<212> ARN		
	<213> Neumovirus canino		
35	<400> 34		
	uaguuaaua aaaa		14
40	<210> 35		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> secuencia de cebadores degenerados		
45	<400> 35		
	tccgtgcagg ccgaratgga rcarg		25
50	<210> 36		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> cebador degenerado		
60	<400> 36		
	ggaactcggg ggcgaaytty tccat		25
65	<210> 37		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> primer		

<220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (19)..(19)
 <223> n e s a , c , g , o t

 <400> 37
 10 ccggatcttc ggccayccna tgggt 24

 <210> 38
 <211> 29
 <212> ADN
 15 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador degenerado

 <400> 38
 20 ttcttaggag gggagatggc yttrtcrtt 29

 <210> 39
 <211> 30
 <212> ADN
 25 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador degenerado

 <400> 39
 30 catcaccgac ctgtccaagt tyaaycargc 30

 <210> 40
 <211> 29
 <212> ADN
 35 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador degenerado

 <400> 40
 40 ttgaagtcgt ccaggatggg rttdatcca 29

 <210> 41
 <211> 23
 <212> ADN
 50 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 41
 55 ggcttctgtt tcttcctttc tgg 23

 <210> 42
 <211> 17
 <212> ADN
 60 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 42
 65

	ccgtggtggt gcctgtg	17
5	<210> 43 <211> 24 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador degenerado	
	<400> 43 atggatccta acatgacctc ayac	24
15	<210> 44 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador degenerado	
25	<400> 44 gattgggatg aacygtgcat tg	22
30	<210> 45 <211> 23 <212> ADN <213> secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
	<400> 45 tgtaaaagtg aaccaaagt gta	23
40	<210> 46 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador	
50	<400> 46 aatcttcag gtaaatacagg tc	22
55	<210> 47 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
60	<400> 47 ttttaacaac aagaatcagt c	21
65	<210> 48 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial	

<220>

<223> cebador

<400> 48

5 ctcctaggtg cgggggttgg

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende un polinucleótido de ARN aislado; en la que dicho polinucleótido de ARN aislado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 ó 3, o una secuencia que es al menos un 96% idéntica sobre la longitud completa de la secuencia de SEQ ID NO: 2 ó 3.
- 10 2. Composición, según la reivindicación 1, en la que el polinucleótido de ARN comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2, o una secuencia que es al menos un 96% idéntica sobre la longitud completa de la secuencia de SEQ ID NO: 2.
3. Composición, según la reivindicación 1, en la que el polinucleótido de ARN comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3, o una secuencia que es al menos un 96% idéntica sobre la longitud completa de la secuencia de SEQ ID NO: 3.
- 15 4. Composición que comprende el equivalente de ADN del polinucleótido de ARN aislado, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que cada uracilo en el polinucleótido está sustituido por timina.
- 20 5. Procedimiento *in vitro* de determinación de si un canino o felino está infectado con un neumovirus, que comprende determinar la presencia de un polinucleótido en una muestra biológica obtenida del canino o felino, en el que la presencia del polinucleótido es indicativa de que el canino o felino está infectado con un virus de neumonía; en el que el polinucleótido es un polinucleótido de ARN que es al menos un 96% idéntico sobre la longitud completa de la secuencia de SEQ ID NO: 2 ó 3; o el equivalente de ADN del mismo en el que cada uracilo en el polinucleótido está sustituido por timina.
- 25 6. Procedimiento *in vitro* de determinación de si un felino está infectado con un neumovirus, que comprende determinar la presencia de una proteína codificada por el complemento inverso de la SEQ ID NO: 2 ó 3 en una muestra biológica obtenida del felino, en el que la presencia de la proteína es indicativa de que el felino está infectado con un virus de neumonía.

30

Figura 1

(Inmunofluorescencia verde)

(Inmunofluorescencia roja producida mediante contratinción)

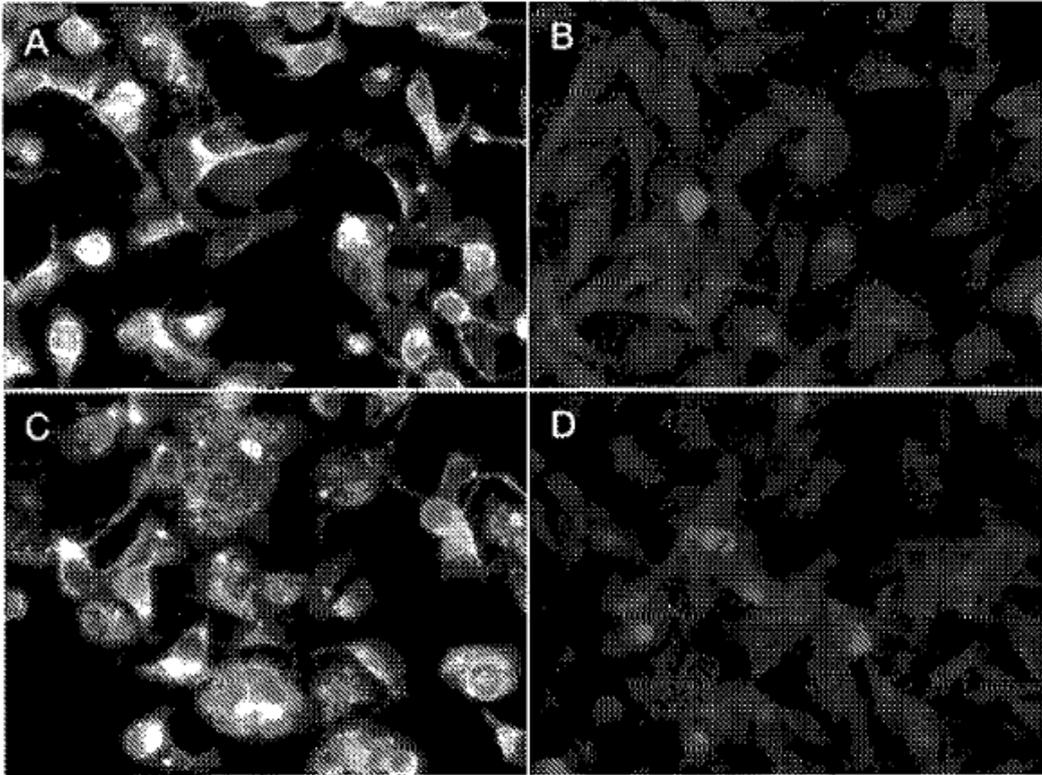
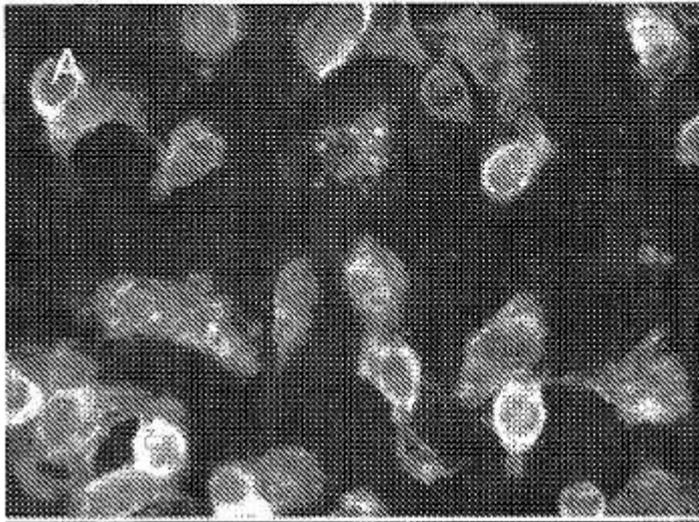


Figura 2

(Inmunofluorescencia verde)



(Inmunofluorescencia roja producida mediante contratinción)

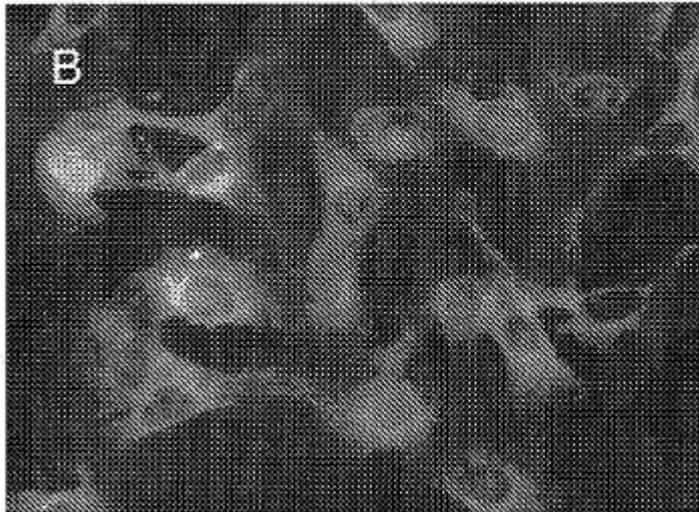


Figura 3

