(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 626 527**

(51) Int. CI.:

C12N 15/40 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2007 E 14187925 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2881468**

(54) Título: **Especies de pestivirus**

(30) Prioridad:

21.04.2006 AU 2006902089

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.07.2017

(73) Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL

(72) Inventor/es:

FROST, MELINDA JANE;
KIRKLAND, PETER DANIEL y
FINLAISON, DEBORAH SUSAN

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

DESCRIPCIÓN

Especies de pestivirus.

Campo de la invención

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

Técnica anterior

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

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

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

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

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

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

Sumario de la invención

La invención proporciona una secuencia de nucleótidos aislada de ARN correspondiente a la secuencia de nucleótidos del virus PMC representada en la SEC ID Nº 1, o secuencias sustancialmente homólogas a la SEC ID Nº 1, o fragmentos de la misma.

La invención también proporciona la secuencia de nucleótidos aislada de ADN del virus PMC de la SEC ID Nº 1, o secuencias sustancialmente homólogas a la SEC ID Nº 1, o fragmentos de la misma.

La invención proporciona además polipéptidos codificados por las secuencias de nucleótidos de ARN y ADN anteriores y fragmentos de las mismas, y/o una secuencia de aminoácidos aislada del virus PMC que se muestra en SEC ID Nº 2 y fragmentos de la misma.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

b) detectar los ácidos nucleicos amplificados.

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

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

b) lavar en condiciones apropiadas, y

c) detectar los híbridos formados.

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

a) proporcionar una secuencia de polipeptídica de virus PMC a un sujeto; y

b) recoger los anticuerpos generados en el sujeto contra el polipéptido.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(a) una cantidad predeterminada de al menos un componente inmunoquímicamente reactivo marcado obtenido por la unión directa o indirecta de la presente secuencia de aminoácidos del virus PMC o un compañero de unión específico para la misma, a un marcador detectable;

(b) otros reactivos; y

(c) instrucciones para usar dicho kit.

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

(a) una cantidad predeterminada de al menos un anticuerpo marcado contra el virus PMC;

(b) otros reactivos; y

(c) instrucciones para usar dicho kit.

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

(a) una cantidad predeterminada de al menos un polipéptido marcado derivado del virus PMC;

(b) otros reactivos; y

(c) instrucciones para usar dicho kit.

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

(a) una cantidad predeterminada de al menos una secuencia marcada de ácido nucleico derivada del virus PMC;

(b) otros reactivos; y

(c) instrucciones para usar dicho kit.

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

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

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

a) transformar un hospedador celular apropiado con un vector recombinante, en que una secuencia polinucleotídica del virus PMC o una parte de la misma se ha insertado bajo el control de elementos reguladores apropiados,

b) cultivar dicho hospedador celular transformado en condiciones que posibiliten la expresión de dicho inserto, y,

c) recoger dicho polipéptido.

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

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

(b) recuperar la secuencia expresada del virus PMC.

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

la **Figura 4** muestra un gel al 0,8 % teñido con bromuro de etidio de SISPA aplicado a ADN y ARN de PCR adaptadora (procesada en máquinas cicladoras Corbett y Eppendorf). Las flechas indican el lugar donde se cortó

el gel para recoger las bandas para purificación y clonación (por ejemplo, ER1 = máquina de PCR Eppendorf, preparación de ARN, posición de gel 1). Carril 1 de la máquina Eppendorf ARN SISPA 10 ul de producto de PCR; carril 2 de la máquina Eppendorf ADN SISPA 10 ul de producto de PCR; carril 3 de la máquina Eppendorf ARN SISPA 40 ul de producto de PCR; carril 4 de la máquina Eppendorf ADN SISPA 40 ul de producto de PCR; carril 5 de la máquina Eppendorf blanco 40 ul de control de PCR; carril 6 de la máquina Corbett ARN SISPA 40 ul de producto de PCR; carril 7 de la máquina Corbett ADN SISPA 40 ul de producto de PCR; carril 8 de la máquina Corbett blanco 40 ul de producto de PCR; carril 9 marcador de 100 pb.

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

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

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

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

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

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

Descripción detallada de la invención

Nuevo pestivirus

De acuerdo con esta invención, se ha descubierto un nuevo pestivirus que difiere genéticamente de pestivirus conocidos. El nuevo virus se caracteriza por la secuencia de ARN correspondiente a la mostrada en la SEC ID Nº 1. La secuencia se ha depositado como la referencia EF100713 de Genbank.

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

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

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

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

La secuencia de nucleótidos de la SEC ID Nº 1 codifica una única ORF que codifica varios genes diferentes. Los genes codificados por la SEC ID Nº 1 corresponden a los genes Npro, de la cápsida, E0, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B de otros pestivirus.

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

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

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

Tabla 2: Localización de proteínas dentro del marco de lectura abierta de las proteínas de PMC.

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

Secuencias de ácido nucleico

ARN

La invención proporciona una secuencia de nucleótidos aislada de ARN correspondiente a la secuencia de nucleótidos del virus PMC representada en la SEC ID Nº 1, o secuencias sustancialmente homólogas a la SEC ID Nº 1, o fragmentos de la misma. La invención proporciona además una secuencia de ARN que comprende el complemento del genoma de ARN del virus PMC, o fragmentos del mismo.

La secuencia de ARN también puede corresponder a un fragmento de la SEC ID Nº 1. Preferiblemente, el fragmento se selecciona entre las siguientes localizaciones de la SEC ID Nº 1: posición 419-922, 923-1219, 1220-1885, 1886-2473, 2474-3604, 3605-3820, 3821-5224, 5225-7252, 7253-7441, 7442-8482, 8483-9997, 9998-12077. Como alternativa, el fragmento se puede seleccionar entre una cualquiera de las SEC ID Nº 3 - 15.

Existe homología o identidad sustancial cuando una secuencia polinucleotídica del virus PMC o fragmento de la misma hibrida con otro polinucleótido del virus PMC (o una hebra complementaria del mismo) en condiciones selectivas de hibridación.

La hibridación selectiva puede ser en condiciones de rigurosidad baja, moderada o elevada, pero preferiblemente es en condiciones de rigurosidad elevada.

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

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

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

Los fragmentos de la secuencia polinucleotídica del virus PMC de la invención serán preferiblemente de al menos 100 ó 200 nucleótidos de longitud. Generalmente, cuanto más corta sea la longitud de la secuencia polinucleotídica, mayor será la homología necesaria para obtener hibridación selectiva.

Las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que son homólogas a las secuencias representadas por una SEC ID Nº 1 puede caracterizarse y aislarse de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica, tales como amplificación mediante cebadores específicos de secuencia, hibridación con sondas específicas de secuencia en condiciones más o menos rigurosas, métodos de el cribado serológico o mediante el sistema de tipificación LiPA.

ADN

También se proporciona el ADN del nuevo virus PMC. La secuencia de ADN se obtiene preferiblemente de las secuencias de ARN descritas anteriormente. Más preferiblemente, la secuencia de ADN es la mostrada en la SEC ID Nº 1 o fragmentos de la misma.

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

La secuencia de ADN también puede ser un fragmento de la SEC ID Nº 1. Preferiblemente, el fragmento se selecciona entre las siguientes localizaciones de la SEC ID Nº 1: posición 419-922, 923-1219, 1220-1885, 1886-2473, 2474-3604, 3605-3820, 3821-5224, 5225-7252, 7253-7441, 7442-8482, 8483-9997, 9998-12077.

Ácidos nucleicos variantes

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

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

También se incluyen dentro de la presente invención variantes de secuencia de la secuencia de ADN de la SEC ID Nº 1 o la correspondiente secuencia de ARN o fragmentos de las mismas, que contienen deleciones y/o inserciones de uno o más nucleótidos, especialmente inserciones o deleciones de 1 o más codones.

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

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

Sondas y cebadores

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

La presente invención también se refiere a un cebador oligonucleotídico que comprende parte de la SEC ID Nº 1, siendo capaz dicho cebador de actuar como cebador para amplificar específicamente el ácido nucleico del virus PMC. Preferiblemente, el cebador es una secuencia oligonucleotídica de ADN monocatenario capaz de actuar como un punto de inicio para la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a la hebra de

ácido nucleico a copiar. La longitud específica y secuencia del cebador usado dependerán de la complejidad de las dianas de ADN o ARN requeridas, así como de las condiciones de uso del cebador, tales como la temperatura y fuerza iónica. El hecho de que los cebadores de amplificación no tengan que aparear exactamente con la secuencia molde correspondiente para garantizar una amplificación apropiada está ampliamente documentado en la bibliografía (Kwok et al., 1990).

El método de amplificación usado puede ser la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki et al., 1988), reacción en cadena de la ligasa (LCR; Landgren et al., 1988; Wu y Wallace, 1989; Barnay, 1991), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA; Guatelli et al., 1990; Compton, 1991), sistema de amplificación basado en transcripción (TAS; Kwoh et al., 1989), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA; Duck, 1990; Walker et al., 1992) o amplificación mediante Qβ replicasa (Lizardi et al., 1988 Lomeli et al., 1989) o cualquier otro método adecuado para amplificar moléculas de ácido nucleico usando extensión de cebador. Durante la amplificación, los productos amplificados pueden marcarse convenientemente usando cebadores marcados o incorporando nucleótidos marcados. Los marcadores pueden ser isotópicos (^{32}P, ^{35}S, etc.) o no isotópicos (biotina, digoxigenina, etc.). La reacción de amplificación se repite entre 20 y 70 veces, ventajosamente entre 25 y 45 veces.

La presente invención también se refiere a una sonda oligonucleotídica que comprende parte de la SEC ID Nº 1, siendo capaz dicha sonda de actuar como sonda de hibridación para el virus PMC. Preferiblemente, la sonda se puede usar para la detección y/o clasificación específica en tipos y/o subtipos de virus PMC. Preferiblemente, la sonda es una secuencia oligonucleotídica específica de secuencia monocatenaria que tiene una secuencia que es complementaria a la secuencia diana del virus PMC a detectar.

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

Opcionalmente, la sonda de la invención está marcada y/o unida a un sustrato sólido. El sustrato sólido puede referirse a cualquier sustrato al cual pueda acoplarse una sonda oligonucleotídica, siempre que conserve sus características de hibridación y siempre que el nivel de fondo de hibridación se mantenga bajo. Habitualmente el sustrato sólido será una placa de microtitulación, una membrana (por ejemplo, nylon o nitrocelulosa) o una microesfera (perla). Antes de la aplicación a la membrana o fijación puede ser conveniente modificar la sonda de ácido nucleico para facilitar la fijación o mejorar la eficacia de hibridación. Dichas modificaciones pueden abarcar adición de una cola homopolimérica, acoplamiento con diferentes grupos reactivos tales como grupos alifáticos, grupos NH_2, grupos SH, grupos carboxílicos, o acoplamiento con biotina o haptenos.

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

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

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

Series de ácidos nucleicos

Las secuencias polinucleotídicas de virus PMC (preferiblemente en forma de sondas) también se pueden inmovilizar en un soporte en fase sólida para la detección del virus PMC. Como alternativa, las secuencias polinucleotídicas de virus PMC formarán parte de una biblioteca de moléculas de ADN que puede usarse para detectar simultáneamente varios genes diferentes del virus PMC. En una forma alternativa adicional de la invención, las secuencias

polinucleotídicas de virus PMC junto con otras secuencias polinucleotídicas (tales como de otras bacterias o virus) se pueden inmovilizar en un soporte sólido en tal manera que permita la identificación de la presencia del virus PMC y/o cualquiera de las otras secuencias polinucleotídicas unidas al soporte sólido.

Las técnicas para producir bibliotecas de moléculas inmovilizadas de ADN se han descrito en la técnica. Generalmente, la mayoría de los métodos de la técnica anterior describen la síntesis de bibliotecas de moléculas de ácido nucleico monocatenario, usando por ejemplo técnicas de enmascaramiento para construir diversas permutaciones de secuencias en las diversas posiciones discretas sobre el sustrato sólido. La patente de Estados Unidos Nº 5.837.832 describe un método mejorado para la producir series de ADN inmovilizadas en sustratos de silicio basado en la tecnología de integración a escala muy grande. En particular, la patente de Estados Unidos Nº 5.837.832 describe una estrategia llamada "mosaico" para sintetizar conjuntos específicos de sondas en localizaciones espacialmente definidas en un sustrato que puede usarse para producir las bibliotecas de ADN inmovilizado de la presente invención. La patente de Estados Unidos Nº 5.837.832 también proporciona referencias para técnicas anteriores que también pueden usarse. Por tanto, las sondas de secuencias polinucleotídicas pueden sintetizarse *in situ* sobre la superficie del sustrato.

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

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

Preferiblemente, el sustrato sólido es generalmente un material que tiene una superficie rígida o semi-rígida. En realizaciones preferidas, al menos una superficie del sustrato será sustancialmente plana, aunque en algunas realizaciones puede ser deseable separar físicamente regiones para diferentes polímeros con, por ejemplo, regiones elevadas o zanjas grabadas. También se prefiere que el sustrato sólido sea adecuado para la aplicación de alta densidad de secuencias de ADN en áreas discretas de normalmente 50 a 100 μm, dando una densidad de 10000 a 40000 puntos/cm^{-2}.

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

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

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

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

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

Ácidos nucleicos antisentido y ribozimas

La presente invención también se extiende a la preparación de nucleótidos antisentido y ribozimas que pueden usarse para interferir con la expresión de secuencias de aminoácidos del virus PMC a nivel traduccional. Este enfoque utiliza ácido nucleico antisentido y ribozimas para bloquear la traducción de un ARNm específico, ya sea enmascarando ese ARNm con un ácido nucleico antisentido o escindiéndolo con una ribozima.

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

Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad de escindir específicamente otras moléculas de ARN monocatenario de una manera algo análoga a las endonucleasas de restricción de ADN. Las ribozimas se descubrieron a partir de la observación de que ciertos ARNm tienen la capacidad de escindir sus propios intrones. Modificando la secuencia de nucleótidos de estos ARN, los investigadores han sido capaces de diseñar moléculas que reconocen secuencias de nucleótidos específicas en una molécula de ARN y las escinden [Cech, (1988) J. Am. Med. Assoc., 260: 3030-3034]. Como son específicos de secuencia, sólo los ARNm con secuencias particulares se inactivan.

Los investigadores han identificado dos tipos de ribozimas, tipo *Tetrahymena* y tipo "cabeza de martillo". Las ribozimas de tipo *Tetrahymena* reconocen secuencias de cuatro bases, mientras que las de tipo "cabeza de martillo" reconocen secuencias de once a dieciocho bases. Cuanto más larga es la secuencia de reconocimiento, mayor probabilidad existirá de que se produzca exclusivamente en las especies de ARNm diana. Por lo tanto, las ribozimas de tipo cabeza de martillo son preferibles a las ribozimas de tipo *Tetrahymena* para inactivar una especie de ARNm específico y son preferibles secuencias de reconocimiento de dieciocho bases a secuencias de reconocimiento más cortas.

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

Secuencias polipeptídicas

Polipéptidos

La invención también cubre polipéptidos codificados por las secuencias anteriores de nucleótidos de ARN y ADN y fragmentos de las mismas. La invención proporciona además una secuencia aislada de aminoácidos del virus PMC como se muestra en SEC ID Nº 2 y fragmentos de la misma. De forma más deseable, la secuencia de aminoácidos del virus PMC se proporciona en forma sustancialmente purificada. Además se proporcionan fragmentos polipeptídicos que tienen pesos moleculares más bajos y que tienen secuencias o fragmentos peptídicos en común con aquellos mostrados en la SEC ID Nº 2.

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

La invención contempla además fragmentos de la secuencia de aminoácidos del virus PMC. Un fragmento de la

secuencia de aminoácidos del virus PMC es un tramo de restos de aminoácido de al menos aproximadamente cinco a siete aminoácidos contiguos, a menudo al menos aproximadamente siete a nueve aminoácidos contiguos, normalmente al menos aproximadamente nueve a 13 aminoácidos contiguos y, más preferiblemente, al menos aproximadamente 20 a 30 o más aminoácidos contiguos.

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

Como se usa en este documento, "epítopo" se refiere a un determinante antigénico de un polipéptido. Un epítopo podría comprender tres aminoácidos en una conformación espacial que es única para el epítopo. Generalmente, un epítopo consiste en al menos cinco aminoácidos, y más habitualmente consiste en al menos 8-10 aminoácidos. Se conocen en la técnica métodos de determinar la conformación espacial de dichos aminoácidos.

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

Preferiblemente, los fragmentos de la secuencia de aminoácidos del virus PMC de longitud completa SEC ID Nº 2 se eligen entre las siguientes localizaciones en la SEC ID Nº 2: 1-167, 168-267, 268-489, 490-685, 686-1062, 1063-1134, 1135-1602, 1603-2278, 2279-2341, 2342-2688, 2689-3193, 3194 a 3886. Como alternativa, el fragmento se puede seleccionar entre una cualquiera de las SEC ID Nº 16-27.

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

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

Polipéptidos variantes

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

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

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

En una forma muy preferida de la invención, un análogo de secuencia de aminoácidos del virus PMC tendrá un 80 % o mayor identidad de secuencia de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos del virus PMC expuesta en la SEC ID Nº 2. Ejemplos de análogos de secuencia de aminoácidos del virus PMC dentro del alcance de la invención incluyen la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 2 donde: (a) uno o más restos de ácido aspártico están sustituidos con ácido glutámico; (b) uno o más restos de isoleucina están sustituidos con leucina; (c) uno o

más restos de glicina o valina están sustituidos con alanina; (d) uno o más restos de arginina están sustituidos con histidina; o (e) uno o más restos de tirosina o fenilalanina están sustituidos con triptófano.

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

En una forma de la invención, los restos químicos adecuados para derivatización se seleccionan entre polímeros solubles en agua. El polímero seleccionado debe ser soluble en agua de modo que la proteína a la que está unido no precipite en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. Preferiblemente, para uso terapéutico de la preparación de producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable. Un especialista en la técnica será capaz de seleccionar el polímero deseado basándose en consideraciones tales como si el conjugado de polímero/proteína se usará terapéuticamente, y si es así, la dosificación deseada, el tiempo en circulación, la resistencia a la proteolisis y otras consideraciones. Para las presentes proteínas y péptidos, éstas pueden determinarse usando los ensayos proporcionados en este documento.

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

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

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

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

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

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

Diagnóstico

De acuerdo con otra realización, la invención proporciona métodos de diagnóstico y pronóstico para detectar la presencia de virus PMC usando glucoproteínas, proteínas y otros péptidos y polipéptidos de virus PMC (se obtengan

en un estado purificado a partir de preparaciones de virus PMC, o por síntesis química) y/o anticuerpos derivados de los mismos y/o secuencias polinucleotídicas de virus PMC.

Los métodos de diagnóstico y pronóstico generalmente se realizarán usando una muestra biológica obtenida de un animal, tal como un cerdo. Una "muestra" se refiere a una muestra de tejido o fluido sospechoso de contener un polinucleótido o polipéptido PMC de un animal, aunque sin limitación, por ejemplo, sangre completa, células sanguíneas, plasma, suero, leche, muestras fecales, tejidos y muestras de constituyentes de cultivos celulares *in vitro*.

Diagnóstico basado en polipéptido/anticuerpo

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

c) lavar el soporte sólido con un tampón apropiado;

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

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

Preferiblemente, el anticuerpo usado en estos métodos se deriva de un anticuerpo policlonal purificado por afinidad, y más preferiblemente un mAb. Además, es preferible que las moléculas de anticuerpo usadas en este documento estén en forma de porciones Fab, Fab', $F(ab')_2$ o F(v) o moléculas de anticuerpo completas.

Métodos particularmente preferidos para detectar virus PMC basados en los métodos anteriores incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas, radioinmunoensayos, ensayos inmunorradiométricos y ensayos

inmunoenzimáticos, incluyendo ensayos tipo sándwich usando anticuerpos monoclonales y/o policlonales.
Tres de estos procedimientos que son especialmente útiles utilizan secuencias de aminoácidos del PMC virus (o fragmentos de las mismas) marcadas con un marcador detectable, anticuerpo Ab_1 marcado con un marcador detectable, o anticuerpo Ab_2 marcado con un marcador detectable. Los procedimientos pueden resumirse mediante las siguientes ecuaciones donde el asterisco indica que la partícula está marcada y "AA" representa la secuencia de aminoácidos del virus PMC:

A. $AA^* + Ab_1 = AA^*Ab_1$

B. $AA + Ab^*1 = AA\ Ab1^*$

C. $AA + Ab_1 + Ab_2^* = Ab_1\ AA\ Ab_2^*$

Los procedimientos y su aplicación son todos familiares para los especialistas en la técnica y en consecuencia puede utilizarse dentro del alcance de la presente invención. El procedimiento "competitivo" o "de bloqueo", Procedimiento A, se describe en las patentes de Estados Unidos Nº 3.654.090 y 3.850.752. El Procedimiento B es representativo de técnicas de ensayo competitivo conocidos. El Procedimiento C, el procedimiento tipo "sándwich", se describe en las patentes de Estados Unidos Nº RE 31.006 y 4.016.043. Otros procedimientos más son conocidos, tales como el procedimiento de "doble anticuerpo" o "DASP".

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

Se observará a partir de lo anterior que una propiedad característica de Ab_2 es que reaccionará con Ab_1. Esto se debe a que Ab_1, creado en una especie de mamífero, se ha usado en otras especies como antígeno para producir el anticuerpo, Ab_2. Por ejemplo, Ab_2 puede crearse en cabras usando anticuerpos de conejo como antígenos. Ab2, por lo tanto, sería anticuerpo anti-conejo producido en cabras. Para los propósitos de esta descripción y las reivindicaciones, Ab_1 se mencionará como anticuerpo primario, y Ab_2 se mencionará como anticuerpo secundario o anti-Ab_1.

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

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

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

Asimismo son útiles los marcadores enzimáticos, y pueden detectarse por cualquiera de las técnicas colorimétrica, espectrofotométrica, fluoroespectrofotométrica, amperométricas o gasométrica actualmente utilizadas. La enzima se conjuga con la partícula seleccionada por reacción con moléculas puente tales como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldehído y similares. Muchas enzimas, que pueden usarse en estos procedimientos, son conocidas y pueden utilizarse. Las enzimas preferidas son peroxidasa, β-glucuronidasa, β-D-glucosidasa, β-D-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa más peroxidasa y fosfatasa alcalina. Las patentes de Estados Unidos Nº 3.654.090, 3.850.752 y 4.016.043 se mencionan a modo de ejemplo por su descripción de material y métodos de marcaje alternativo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los complejos formados que comprenden anticuerpo anti-virus PMC (o en el caso de ensayos competitivos, la cantidad de anticuerpo de competición) se detectan por cualquiera de varias técnicas conocidas, dependiendo del

formato. Por ejemplo, los anticuerpos no marcados contra el virus PMC en el complejo pueden detectarse usando un conjugado de Ig anti-xenogénica en complejo con un marcador (por ejemplo, un marcador enzimático).

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

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

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

Diagnóstico basado en ácido nucleico

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

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

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

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

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

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

d) detectar los ácidos nucleicos amplificados.

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

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

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

e) lavar en condiciones apropiadas, y

f) detectar los híbridos formados.

Preferiblemente, las condiciones de hibridación son condiciones desnaturalizadas.

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

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

Los métodos de ensayo adecuados para los propósitos de la presente invención para detectar híbridos formados entre las sondas oligonucleotídicas y las secuencias de ácido nucleico en una muestra pueden comprender

cualquiera de los formatos de ensayo conocidos en la técnica, tales como el formato dot-blot convencional, la hibridación tipo sándwich o la hibridación inversa. Por ejemplo, la detección puede conseguirse usando un formato dot-blot, uniéndose la muestra amplificada no marcada a una membrana, incorporándose la membrana con al menos una sonda marcada en condiciones adecuadas de hibridación y lavado, y controlándose la presencia de sonda unida.

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

En una forma de la invención, la secuencia de ácido nucleico diana se amplifica por PCR y después se detecta usando cualquiera de los métodos específicos mencionados anteriormente. Otras técnicas de diagnóstico útiles para detectar la presencia de secuencias polinucleotídicas del virus PMC incluyen, aunque sin limitación: 1) PCR específica de alelo; 2) análisis de conformación monocatenaria; 3) electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante; 4) ensayos de protección contra RNasa; 5) el uso de proteínas que reconocen desapareamientos de nucleótidos, tal como la proteína mutS de *E. coli*; 6) oligonucleótidos específicos de alelo; y 7) hibridación fluorescente *in situ*.

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

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

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

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

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

a) inmovilizar virus PMC sobre un soporte (por ejemplo, un filtro de nitrocelulosa);

b) alterar el virión; y

c) hibridar con una sonda.

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

La presente invención también proporciona un método para la exploración rápida de ADN genómico derivado del

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

a) extraer ADN de tejido;

b) escindir con enzimas de restricción dicho ADN;

c) electroforesis de los fragmentos; y

d) transferencia de Southern de ADN genómico de los tejidos y posterior hibridación con ADN del virus PMC clonado marcado.

También puede usarse hibridación *in situ*.

PRODUCCIÓN DE POLIPÉPTIDO ANTIGÉNICO

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

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

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

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

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

ANTICUERPOS

Anticuerpos contra proteínas PMC

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

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

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

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

Una molécula es "antigénica" cuando es capaz de interactuar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígeno del sistema inmune, tal como una inmunoglobulina (anticuerpo) o receptor de antígeno de células T. Una secuencia de aminoácidos antigénica contiene al menos aproximadamente 5, y preferiblemente al menos

aproximadamente 10, aminoácidos. Una parte antigénica de una molécula puede ser esa parte que es inmunodominante para el reconocimiento por el anticuerpo o el receptor de células T, o puede ser una parte usada para generar un anticuerpo contra la molécula conjugando la parte antigénica con una molécula vehículo para la inmunización. Una molécula que es antigénica no necesita ser inmunogénica en sí misma, es decir, capaz de provocar una respuesta inmune sin un vehículo.

Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se une a un epítopo específico. El término abarca anticuerpos policlonales, monoclonales, y quiméricos, los últimos mencionados descritos con mayor detalle en las patentes de Estados Unidos Nº 4.816.397 y 4.816.567, así como partes de unión a antígeno de anticuerpos, incluyendo Fab, $F(ab')_2$ y F(v) (incluyendo anticuerpos de cadena sencilla). Por consiguiente, la expresión "molécula de anticuerpo" en sus diversas formas gramaticales como se usa en este documento contempla tanto una molécula de inmunoglobulina intacta como una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina que contiene el sitio de combinación de anticuerpo. Un "sitio de combinación de anticuerpo" es la parte estructural de una molécula de anticuerpo compuesta de regiones variables e hipervariables de cadena pesada y ligera que se une específicamente al antígeno.

Moléculas de anticuerpo a modo de ejemplo son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y aquellas partes de una molécula de inmunoglobulina que contienen el parátopo, incluyendo aquellas partes conocidas en la técnica como Fab, Fab', $F(ab')_2$ y F(v), que son partes preferidas para su uso en los métodos terapéuticos descritos en este documento.

Las partes Fab y $F(ab')_2$ de moléculas de anticuerpo se preparan mediante la reacción proteolítica de papaína y pepsina, respectivamente, sobre moléculas de anticuerpo sustancialmente intactas por métodos que son bien conocidos. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 4.342.566 de Theofilopolous et al. Las partes de moléculas de anticuerpo Fab' también son bien conocidas y se producen a partir de partes $F(ab')_2$ seguido por reducción con mercaptoetanol de los enlaces disulfuro que unen las dos partes de cadena pesada, y seguido por alquilación del mercaptano de proteína resultante con un reactivo tal como yodoacetamida. En este documento se prefiere un anticuerpo que contenga moléculas de anticuerpo intactas.

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

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

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

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

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

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

La proporción de polipéptido inmunogénico y adyuvante se puede variar sobre un amplio intervalo siempre que

ambos estén presentes en cantidades eficaces. Por ejemplo, el hidróxido de aluminio puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 0,5 % de la mezcla de vacuna (base de Al_2O_3). Convenientemente, las vacunas se formulan para que contengan una concentración final de inmunógeno en el intervalo de 0,2 a 200 μg/ml, preferiblemente de 5 a 50 μg/ml, más preferiblemente 15 μg/ml.

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

Las vacunas se administran convencionalmente por vía parenteral, por inyección, por ejemplo, por vía subcutánea o por vía intramuscular. Formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para supositorios, los aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo del 0,5 % al 10 %, preferiblemente del 1 % al 2 %. Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen del 10 % al 95 % de ingrediente activo, preferiblemente del 25 % al 70 %. Cuando se liofiliza la composición de vacuna, el material liofilizado puede reconstituirse antes de la administración, por ejemplo, como una suspensión. La reconstitución se efectúa preferiblemente en tampón.

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

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

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

El término "citoquina" se refiere a cualquier polipéptido secretado que influye en la función de otras células mediando una respuesta inmune. Algunos ejemplos de citoquinas incluyen, aunque sin limitación, interleuquina-1α (IL-1α), interleuquina-1β (IL-1β), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-5 (IL-5), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-7 (IL-7), interleuquina-8 (IL-8), interleuquina-9 (IL-9), interleuquina-10 (IL-10), interleuquina-11 (IL-11), interleuquina-12 (IL-12), interferón-α (IFN-α), interferón-β (IFN-β), interferón-γ (IFN-γ), factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), factor de necrosis tumoral-β (TNF-β), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), y factor de crecimiento transformante-β (TGF-β).

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

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

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

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

Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia las secuencias de aminoácidos del virus PMC, o fragmentos, análogos o derivados de las mismas, puede usarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Éstas incluyen, aunque sin limitación, la

técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler et al., (1975) Nature, 256: 495-497, la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas [Kozbor et al., (1983) Immunology Today, 4:72], y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos [Cole et al., (1985) en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pág. 77-96, Alan R. Liss, Inc.]. Pueden crearse líneas celulares inmortales productoras de anticuerpos por técnicas diferentes a la fusión, tales como transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o transfección con el virus Epstein-Barr. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 4.341.761; 4.399.121; 4.427.783; 4.444.887; 4451, 570; 4.466.917; 4.472.500; 4491, 632; y 4.493.890.

En una realización adicional de la invención, los anticuerpos monoclonales se pueden producir en animales libres de gérmenes. De acuerdo con la invención, pueden usarse anticuerpos de cerdos y se pueden obtener usando hibridomas porcinos o transformando células B con virus PMC *in vitro*. De hecho, de acuerdo con la invención, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" [Morrison et al., (1984) J. Bacteriol, 159-870; Neuberger et al., (1984) Nature, 312: 604-608; Takeda et al., (1985) Nature, 314: 452-454] por corte y ayuste de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón específica para una secuencia de aminoácidos de PMC junto con genes de una molécula de anticuerpo de actividad biológica apropiada; dichos anticuerpos están dentro del alcance de esta invención. Dichos anticuerpos quiméricos se prefieren para uso en terapia de enfermedades o trastornos intestinales, ya que los anticuerpos son mucho menos propensos que los anticuerpos xenogénicos a inducir una respuesta inmune, en particular una respuesta alérgica, por sí mismos.

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

Los fragmentos de anticuerpo, que contienen el idiotipo de la molécula de anticuerpo, se pueden generar por técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, aunque sin limitación: el fragmento F $(ab')_2$ que puede producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab' que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro del fragmento F $(ab')_2$, y los fragmentos Fab que pueden generarse tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.

El cribado de anticuerpos

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

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

Marcaje de anticuerpos

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

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

Fragmentos que albergan epítopo

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

Conjugación para aumentar la inmunogenicidad

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

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

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

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

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

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

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

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

Vacunas

La invención también se refiere a composiciones de vacuna cuyo principio activo es un polipéptido o fragmento del mismo de la presente invención, es decir, los polipéptidos descritos anteriormente del virus PMC, polipéptidos de fusión u oligopéptidos, en asociación con un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable. La presente

invención proporciona además polipéptidos inmunogénicos, y más particularmente polipéptidos de protección, para su uso en la preparación de composiciones de vacuna contra PMC o síndromes relacionados.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Suministro parenteral

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

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

Suministro oral

Se contemplan para uso en este documento formas sólidas de dosificación oral, que se describen en líneas generales en Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. (1990 Mack Publishing Co. Easton PA 18042) en el Capítulo 89. Las formas sólidas de dosificación incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, trociscos o grageas, obleas o gránulos. Además, puede usarse encapsulación liposómica o proteinoide para formular las presentes composiciones (como, por ejemplo, las microesferas proteinoides presentadas en la patente de Estados Unidos Nº 4.925.673). Puede usarse encapsulación liposómica y los liposomas pueden derivatizarse con diversos polímeros (por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.013.556). Se da una descripción de posibles formas sólidas de dosificación para el agente terapéutico por Marshall, en Modern Pharmaceutics, Capítulo 10, Banker y Rhodes ed.,

(1979). En general, la formulación incluirá un polipéptido o polinucleótido del virus PMC, e ingredientes inertes que permiten la protección contra el entorno del estómago, y la liberación del material biológicamente activo en el intestino.

También se contemplan específicamente formas orales de dosificación de polipéptidos o polinucleótidos del virus PMC. A este respecto los polipéptidos o polinucleótidos del virus PMC se pueden modificar químicamente para que la administración oral sea eficaz. Generalmente, la modificación química contemplada es la unión de al menos un resto a la propia molécula de proteína (o péptido), donde dicho resto permite (a) la inhibición de la proteolisis; y (b) la absorción en el torrente sanguíneo desde el estómago o el intestino. También se desea el aumento en la estabilidad global de la proteína y el aumento del tiempo en circulación en el cuerpo. Ejemplos de dichos restos incluyen: polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y poliprolina. Abuchowski et al., 1981, supra; Newmark et al., J. Appl. Biochem., 4: 185-189 (1982). Otros polímeros que podrían usarse son poli-1,3-dioxolano y poli-1,3,6-tioxocano. Se prefieren para uso farmacéutico, como se ha indicado anteriormente, restos de polietilenglicol.

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

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

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

El agente terapéutico se puede incluir en la formulación como multiparticulados finos en forma de gránulos o bolitas de tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm. La formulación del material para administración en cápsulas también podría ser como un polvo, tapones ligeramente comprimidos o incluso como comprimidos. El agente terapéutico podría prepararse por compresión.

Pueden incluirse colorantes y agentes aromatizantes. Por ejemplo, pueden formularse (tal como mediante encapsulación en liposomas o microesferas) polipéptidos o polinucleótidos del virus PMC y después introducirse adicionalmente dentro de un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene colorantes y agentes aromatizantes.

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

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

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

Puede incluirse un agente antifricción en la formulación del agente terapéutico para evitar que se pegue durante el

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

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

Para ayudar a la disolución del agente terapéutico en el entorno acuoso, puede añadirse un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como lauril sulfato de sodio, sulfosuccinato de dioctil sodio y sulfonato de dioctil sodio. Pueden usarse detergentes catiónicos y podrían incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. La lista de detergentes no iónicos potenciales que podrían incluirse en la formulación como tensioactivos son lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso de sacarosa, metil celulosa y carboximetil celulosa. Estos tensioactivos podrían estar presentes en la formulación del complejo en solitario o como una mezcla en diferentes proporciones.

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

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

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

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

Suministro pulmonar

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

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

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

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

Las formulaciones adecuadas para su uso con un nebulizador, de chorro o ultrasónico, comprenderán normalmente el complejo suspendido en agua a una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 mg de proteína biológicamente

activa por ml de solución. La formulación también puede incluir un tampón y un azúcar simple (por ejemplo, para la estabilización y regulación de la presión osmótica de las proteínas). La formulación del nebulizador puede contener también un tensioactivo, para reducir o prevenir la agregación superficial inducida de la proteína causada por la atomización de la solución en la formación del aerosol.

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

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

Suministro nasal

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

COMPOSICIONES TERAPÉUTICAS

Terapias basadas en polipéptidos

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

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

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

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

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

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen una reacción alérgica o desfavorable de manera similar, tal como malestar gástrico y similares, cuando se administra a un animal. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser

líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se emplean preferiblemente el agua o soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos, particularmente para soluciones inyectables. Dichos vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990).

En una forma más específica de la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de secuencia de aminoácidos del virus PMC o un análogo, fragmento o producto derivado de la misma junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones incluyen diluyentes de diverso contenido de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica y aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, Tween 80, Polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, Thimersol, alcohol bencílico) y sustancias de aumento de volumen (por ejemplo, lactosa, manitol). El material se puede incorporar en preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc., o en liposomas. También puede usarse ácido hialurónico. Dichas composiciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, tasa de liberación *in vivo*, y tasa de eliminación *in vivo* de las presentes proteínas y derivados. Véase, por ejemplo, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA, pág. 1435-1712. Las composiciones pueden prepararse en forma líquida, o pueden estar en polvo seco, tal como forma liofilizada.

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

Agentes terapéuticos basados en anticuerpos

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

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

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

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

Terapia basada en polinucleótido

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

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

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

También se aborda por la presente invención el uso de secuencias polinucleotídicas de la invención, así como secuencias polinucleotídicas antisentido y de ribozima que pueden hibridar con una secuencia polinucleotídica que

codifica una secuencia de aminoácidos del virus PMC de acuerdo con la invención, para la fabricación de un medicamento para la modulación de una enfermedad asociada con el virus PMC.

Administración de composiciones terapéuticas

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

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas para administración se administran por inyección, por vía oral, o por vía pulmonar, o nasal.

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

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

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

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

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

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

Agente de suministro de vector vivo

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

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

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

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

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

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

Ensayos de el cribado de fármacos

La presente invención también proporciona ensayos que son adecuados para identificar sustancias tales como

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

antigénicos de la secuencia de aminoácidos del virus PMC.

KITS

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

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

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

(a) una cantidad predeterminada de al menos un componente inmunoquímicamente reactivo marcado obtenido mediante la unión directa o indirecta de la presente secuencia de aminoácidos del virus PMC o un compañero de unión específico para la misma, a un marcador detectable;

(b) otros reactivos; y

(c) instrucciones para usar dicho kit.

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

(a) una cantidad conocida de la secuencia de aminoácidos del virus PMC como se ha descrito anteriormente (o un compañero de unión) generalmente unida a una fase sólida para formar un inmunosorbente, o como alternativa, unida a un marcador adecuado, o existe una pluralidad de dichos productos finales, etc.;

(b) si es necesario, otros reactivos; y

(c) instrucciones para usar dicho kit de ensayo.

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

(a) un componente marcado que se ha obtenido mediante el acoplamiento de la secuencia de aminoácidos del virus PMC con un marcador detectable;

(b) uno o más reactivos inmunoquímicos adicionales de los cuales al menos un reactivo es un ligando o un ligando inmovilizado, estando dicho ligando seleccionado entre el grupo que consiste en:

(i) un ligando capaz de unirse con el componente marcado (a);

(ii) un ligando capaz de unirse con un compañero de unión del componente marcado (a);

(iii) un ligando capaz de unirse con al menos uno de los componentes a determinar; o

(iv) un ligando capaz de unirse con al menos uno de los compañeros de unión de al menos uno de los componentes a determinar; y

(c) instrucciones para la realización de un protocolo para la detección y/o determinación de uno o más componentes de una reacción inmunoquímica entre la secuencia de aminoácidos del virus PMC y un compañero de unión específico para la misma.

Kits para detectar anticuerpos

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

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

(a) una cantidad predeterminada de al menos un anticuerpo marcado contra el virus PMC;

(b) otros reactivos; y

(c) instrucciones para usar dicho kit.

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

Los kits preferidos comprenden todos los reactivos necesarios para realizar ensayos ELISA. Por tanto los kits preferidos incluirán, además de cualquiera de dichos polipéptidos, tampones adecuados e inmunoglobulinas anti-especie, estando las inmunoglobulinas anti-especie marcadas por una molécula inmunofluorescente o por una enzima. En el último ejemplo, los kits preferidos comprenden también un sustrato hidrolizable por la enzima y que proporciona una señal, particularmente la absorción modificada de una radiación, al menos en una longitud de onda determinada, cuya señal es entonces indicativa de la presencia de anticuerpo en el fluido biológico a ensayar con dicho kit. Los kits también pueden incluir anticuerpos monoclonales o policlonales marcados que están dirigidos contra epítopos del virus PMC y estos anticuerpos marcados se pueden usar para bloquear o competir con anticuerpos de la muestra de ensayo. Si se bloquea la actividad del anticuerpo marcado, no habrá reacción o habrá una reacción reducida y se puede deducir que la muestra de ensayo contiene anticuerpos contra el virus PMC.

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

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

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

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

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

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

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

Kits para detectar polipéptidos y antígenos

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

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

(a) una cantidad predeterminada de al menos un polipéptido marcado derivado del virus PMC;

(b) otros reactivos; y

(c) instrucciones para usar dicho kit.

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

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

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

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

Kits para detectar secuencias de ácido nucleico

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

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

(a) una cantidad predeterminada de al menos una secuencia de ácido nucleico marcada derivada del virus PMC;

(b) otros reactivos; y

(c) instrucciones para usar dicho kit.

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

VECTORES, LAS CÉLULAS HOSPEDADORAS ETC.

Vectores

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

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

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

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

(b) recuperar la secuencia del virus PMC expresada.

Este procedimiento también puede estar acompañado por la etapa de:

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

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

a) transformar un hospedador celular apropiado con un vector recombinante, en que una secuencia

polinucleotídica del virus PMC o una parte de la misma se ha insertado bajo el control de elementos reguladores apropiados,

b) cultivar dicho hospedador celular transformado en condiciones que posibiliten la expresión de dicho inserto, y,

c) recoger dicho polipéptido.

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

El vector puede comprender un plásmido, un cósmido, un fago, o un virus o un animal transgénico no humano. Puede ser particularmente útil para el desarrollo de vacunas el BCG o vectores adenovirales, así como virus recombinantes de la viruela aviar. Ejemplos de dichos vectores de expresión se describen en Sambrook et al., (1989) supra o Ausubel et al., (2001) supra. Muchos vectores útiles son conocidos en la técnica y se pueden obtener de proveedores tales como Stratagene, New England Biolabs, Promega Biotech, y otros.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Células hospedadoras

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

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

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

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

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

GENERAL

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

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

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

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

enteros.

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

Ejemplos

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

Ejemplo 1

Preparación de la muestra

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

1. Preparación de muestras de suero:

a) Obtener al menos 240 µl del sobrenadante de un homogeneizado tisular o suero y dividir en lotes 2x 120 ul

b) A cada 120 ul de muestra añadir 240 ul de PBS o H_2O (o tomar 50 ul de suero + 100 ul de PBS)

c) Filtrar la muestra diluida a través de dos filtros de 0,2 um diferentes por centrifugación a 2000 x g (lavar la parte superior del filtro y mantenerla a -20 ºC)

d) Añadir 25 ul de DNasa I (250 U) a cada tubo de muestra filtrada e incubar a 37 ºC durante 2 horas

e) Añadir 1 ul de cóctel de RNasa (500 U de RNasa A, 20000 U de RNasa T1) a cada tubo e incubar a TA durante 1 h.

f) Tomar 1 tubo de muestra tratada (360 ul) para la extracción de ARN y un tubo para la extracción de ADN (añadir 500 ul de DNAeasy AL + 50 ul de proteinasa K, etc. y eluir en 50 ul de agua).

2. Extracción de ARN:

a) Dividir la muestra en lotes de 90 ul y añadir 600 ul de RLT, es decir, 4 x 690 ul

b) Homogeneizar pasando a través de una jeringa 21 G al menos 5 veces

c) Añadir 690 ul de etanol al 70 % a cada tubo de muestra y mezclar por pipeteo

d) Aplicar 700 ul de la muestra a la columna a la vez y centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm. Colocar los desechos de flujo en un recipiente de 5 ml y mantener a -80 ºC.

e) Añadir 700 ul de tampón RW1 a la columna y centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm. Desechar el material de flujo y el tubo de recogida.

f) Transferir la columna a un nuevo tubo y añadir 500 ul de RPE, centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm, deseche el material de flujo

g) Repetir la etapa (f) usando el mismo tubo, pero centrifugar durante 2 minutos a 10.000 rpm.

h) Transferir la columna a un nuevo tubo y centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm.

i) Eluir el ARN en 20 ul de agua libre de RNasa, dejar que reposar el agua en la columna durante 1 minuto antes de centrifugar. Reutilizar el producto eluido y centrifugar durante 1 minuto a 10.000 rpm para recoger cualquier ARN sobrante en la columna.

j) Almacenar a -80 ºC hasta que sea necesario.

3. Extracción de ADN:

a) A 360 ul de muestra añadir 36 ul de proteinasa K y 360 ul de tampón AL, mezclar por vórtice, incubar a 70 ºC durante 10 minutos.

b) Añadir 360 ul de etanol al 100 %, mezclar por vórtice

c) Pipetear la mezcla de la etapa (b) en la columna DNAeasy y centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto. Colocar el flujo en un tubo y almacenar a -80 ºC.

d) Colocar la columna en un nuevo tubo y añadir 500 ul de AW1, agitar a 8.000 rpm durante 1 minuto. Desechar el flujo y el tubo.

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

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

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

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

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

4. Síntesis de ADNc de primera hebra

a) Mezclar lo siguiente:

1 ul de hexámeros aleatorios (10 pmol)
8 ul - 9 ul de ARN (en H_2O)

b) Mezclar, calentar a 90 ºC 3 minutos, centrifugar y poner en hielo
c) En hielo añadir:

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

Tampón de 1ª hebra: Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, $MgCl_2$ 3 mM
d) Mezclar, centrifugar y calentar a 50 ºC durante 30 minutos
e) Añadir otro 1 ul de SSIII y dejar durante otros 30 minutos a 50 ºC
f) Inactivar por calor a 70 ºC durante 10 minutos y después colocar en hielo

5. Síntesis de ADNc de segunda hebra

a) En la mezcla de hielo:

H_2O	87 ul
tampón de 2ª hebra 5X	30 ul
dNTP 5 mM	6 ul
ADN polimerasa (40U)	4 ul
ADN ligasa de E. coli (10 U)	1 ul
RNasa H (2 U)	2 ul
mezcla de ADN de 1ª hebra (etapa 1)	20 ul

Tampón de 2ª hebra: Tris-HCl 20 mM (pH 6,9), $MgCl_2$ 4,6 mM, KCl 90 mM, b-NAD+ 0,15 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 10 mM
b) Mezclar, centrifugar e incubar a 16 ºC durante 2 horas. *NOTA: se puede comenzar SISPA de ADN mientras esta incubación está en marcha.*

c) Añadir 10 ul (10 U) de ADN polimerasa T4 (1 u/ul) e incubar a 16 ºC durante 15 min.
d) Calentar la síntesis de 2ª hebra a 72 ºC 10 minutos, dejar enfriar a 37 ºC.

6. Limpieza de ADN

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

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

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

d) Agitar ligeramente

e) Centrifugar a 13000 rpm 5 minutos, 4 ºC

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

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

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

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

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

SISPA de ADN

7. Síntesis de segundo hebra de ADN

a) Mezclar lo siguiente:

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

b) Dejar a 37 ºC durante 1 hora

8. Limpieza de ADN

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

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

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

d) Agitar ligeramente

e) Centrifugar a 13.000 rpm 5 minutos, 4 ºC

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

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

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

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

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

Generación de secuencias de ácido nucleico recombinantes

9. Digestión de restricción

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

b) Incubar a 37 ºC durante 2 horas

c) Inactivar a 65 ºC durante 20 minutos

10. ADN digerido con desfosforilato

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

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

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

b) Incubar a 37 ºC durante 30 minutos

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

11. Limpieza de ADN

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

b) Añadir 60 uI de ADN desfosforilado

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

d) Agitar ligeramente

e) Centrifugar a 13.000 rpm 5 minutos, 4 ºC

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

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

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

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

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

k) Reconstituir en 5,8 ul de H_2O.

12. Ligamiento de adaptador

a) Mezclar:

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

Tampón de ligasa 5X: Tris-HCl 330 mM, $MgCl_2$ 25 mM, DTT 25 mM, ATP 5 mM, pH 7,5
b) Incubar a 4 ºC durante 1 hora y 16 ºC durante una noche

13. Reacción de PCR (Figura 2 resultados)

a) Establecer la siguiente mezcla:

ADN ligado (etapa 4)	2 ul
50 pmol de NBam24	1 ul
dNTP 5 mM	2 ul
$MgCl_2$ 2 mM	2 ul
tampón de PCR 10X	5 ul
H_2O	38 ul

Tampón de PCR 10X: Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM (pH 8,3)
b) Calentar a 72 ºC durante 3 minutos
c) Añadir 0,5 ul de ADN polimerasa Taq (5 U/ul)
d) Ejecutar ciclo:

72 ºC durante 5 minutos

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

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

14. Clonación del producto de PCR

a) Secciones cortadas de la región esparcida de gel como un lote de las bandas dominantes puede ser una secuencia contaminante de los productos usados en los métodos, en lugar de la muestra real. Las bandas también pueden ser difíciles de ver si se encuentran en las regiones esparcidas.
b) Limpiar el ADN de la agarosa usando el Kit de extracción de gel MiniElute (Qiagen)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12. Desechar el flujo y centrifugar la columna MinElute durante 1 min adicional a ≥ 10.000 xg (~13.000 rpm).

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

14. Para eluir el ADN, añadir 10 μl de tampón EB (Tris.Cl 10 mM, pH 8,5) o H_2O al centro de la membrana, dejar reposar la columna durante 1 min., y centrifugar durante 1 min.

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

Producto de PCR fresco	6 μl
Tampón de ligamiento 10X	1 μl
Vector PCR®2.1 (25 ng/μl)	2 μl

ADN ligasa T4 (4,0 unidades Weiss) 1 µl

Incubar la reacción de ligamiento a 14 ºC durante una noche, o a -20 ºC hasta estar listos para la transformación.
d) Transformar células competentes One Shot®.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Para hacer las soluciones madre M13-20f (50 pmol) y M13R (50 pmol): mezclar 0,5 ul de cebador 100 uM con 12 ul de agua es decir 500 ul de cebador de reserva 100 uM + 1200 ul de agua (del HotStarTaq Kit).
b) Colocar papel de aluminio estéril sobre la placa que contiene la HotStar TaqMaster Mix. Punzar a través de la lámina para hacer un agujero, y después punzar apuñalar una colonia bacteriana en cada pocillo de la placa.
c) Retirar el papel de aluminio y añadir capuchos de cinta para sellar la placa.
d) Ejecutar el protocolo de PCR:

95 ºC durante 5min

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

4 ºC mantenimiento.

e) Ejecutar 5-10ul de PCR en gel
f) Usa Qiagen Mini, eluir para limpiar el producto de la PCR restante para secuenciar.

Ejemplo 2

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

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

2. Recubrir con "medio de unión" microplacas de 96 pocillos (50 µl por pocillo) con antígeno diluido en tampón carbonato (tampón carbonato 0,05 M 1x (pH 9,6): Na_2CO_3 (1,59 g); $NaHCO_3$ (2,93 g) de agua hasta 1 l). Mantener durante una noche a temperatura ambiente (18-25 ºC).

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

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

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

6. Incubar a 37 ºC durante 1 hora en un recipiente humidificado.

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

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

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

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

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

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

13. Leer los valores de DO a 450 nm.

14. Calcular los resultados.

Ejemplo 3

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para detectar antígenos de virus PMC

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

- Materiales

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

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

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

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

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

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

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

- Método

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

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

3. Recubrir microplacas de 96 pocillos con antisuero policlonal purificado contra antígenos del virus PMC (100 ul/pocillo). Como alternativa, puede usarse una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-virus PMC. Cada placa de 96 pocillos se recubre durante una noche a temperatura ambiente con 0,1 ml por pocillo de una solución que contiene anticuerpo purificado a 5 μg/ml y albúmina de suero bovino a 10 μg/ml en tampón carbonato (pH 9,6). Después del recubrimiento, cada placa se lava tres veces con tampón de lavado ELISA y se deja secar durante una noche a 4 ºC. Se usa una bolsa de aluminio para envolver cada placa después del secado, y se incluye un desecante dentro de cada bolsa para eliminar la humedad.
4. Lavar las placas ELISA 3 veces pipeteando 0,2 ml de tampón de lavado ELISA en cada pocillo y sacar o pipetear para secar antes de la adición de la muestra.

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

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

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

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

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

10 Lavar las placas de ELISA 5 veces.

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

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

13. Lavar las placas 5 veces.

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

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

16. Lavar las placas 10 veces.

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

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

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

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

21. Calcular los resultados.

Ejemplo 4

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

a) Extraer el ARN de la muestra de ensayo como se ha descrito en el Ejemplo 1. Incluir en todas las etapas de las reacciones controles positivos y negativos conocidos y un "blanco".
b) Transcribir de forma inversa (RT) el ARN del siguiente modo:
1. Mezclar lo siguiente:

hexámeros aleatorios (50 pmol)	1 ul
ARN (en H_2O)	9ul

2. Calentar a 90 ºC durante 3 minutos, centrifugar y poner en hielo
3. En hielo añadir:

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

4. Mezclar, centrifugar, calentar a 45 ºC durante 60 minutos.
5. Inactivar por calor a 70 ºC durante 10 minutos
6. Colocar en hielo.

c) Configurar 1ª ronda de PCR.
1. Mezclar los siguientes reactivos de PCR

RT	5 ul
Cebador directo 4 uM	1 ul
Cebador inverso 4 uM	1 ul
mezcla de PCR Hotstart (Qiagen)	12,5 ul
Agua	5,5ul

(véase la Tabla 3 para los cebadores de la 1ª reacción de PCR)
2. Ciclar la máquina de PCR en:

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

4 ºC mantenimiento

d) Configurar PCR anidada
1. Mezclar los siguientes reactivos de PCR:

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

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

95 ºC durante 15 minutos

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

72 ºC durante 1 min

4 ºC mantenimiento

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

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

Clon	Virus	*Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' a 3')	Tamaño del producto anidado
CR3 9	Pestivirus	CR39F (63) CR39R (190) CR39FN (87)	CACATCTAGCAGCAGACTATGA GTACCAGTTGCACCACCC TGAAAAGGATTCACGG	103pb
ER5 10	Pestivirus	ER510F (7) ER510R (213) ER510FN (68) ER510RN (182)	AAACCGACGAAGTAGACC AGACGAGAACATAGTGGC GAAACAGTAAAGCCAACG CTGGTAATCGGAAACATC	114pb

ER6 2	Pestivirus	ER62F (203) ER62FN (373) ER62R (637) ER62RN (516)	GGGACCGAGGGATACGA AGAGGTAATTGGGTAT CAGCAGGTTGATTTCTTCAT TTGCCAAGTTTCAC	98pb
ER5 5	Pestivirus	ER55F (31) ER55R (214) ER55FN (64) ER55RN (162)	AAACCGCCGAAGTAAACC CTGGAGCCCTGGTAATGG GACGGGAATGGGTTCA TAGGTGCTTCTTATTGGTAT	143pb
*F = cebador directo, R = cebador inverso, FN = cebador anidado directo, RN = cebador anidado inverso				

Ejemplo 5

Determinación de la secuencia viral de longitud completa

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

1. Reacción de RT:

a) Mezclar lo siguiente:

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

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

c) En hielo añadir

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

d) Mezclar, centrifugar, calentar a 42 ºC durante 60 minutos.

e) Inactivar por calor a 70 ºC durante 10 minutos

f) Colocar en hielo

2. Reacción de PCR:

a) Mezclar los siguientes reactivos de PCR

RT	1 ul
Cebador directo 20 uM	1 ul
Cebador inverso 20 uM	1 ul
Mezcla de PCR Hotstart (Qiagen)	12,5 ul
Agua	13,5 ul

(véase la Tabla 4 para los cebadores de PCR)

b) Ciclar la máquina de PCR en:

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

3. Método de RT-PCR de una etapa

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

Mezcla de reacción 2x	25 ul
Cebador directo 30 uM	1 ul
Cebador inverso 30 uM	1 ul
Mezcla SSIII RT/Platinum	2ul para productos de 2,5 kb o menos
	4 ul para productos de 2,5 kb o más
Agua	15,8 ul para productos de 2,5 kb o menos
	13,8 ul para productos 2,5 kb o más

(véase la Tabla 4 para los cebadores de PCR)

b) Ciclar la máquina de PCR en:

50 ºC durante 50 minutos
94 ºC durante 2 min
(94 ºC durante 15 segundos, 50 ºC durante 30 segundos, 68 ºC durante 1 min/kb) x40
68 ºC durante 5 min
4 ºC - mantenimiento

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

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

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

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

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

Tabla 5. Cebadores diseñados para secuenciación

Localización en la proteína del cebador	***Nombre del cebador**	**Secuencia del cebador (5' a 3')**
5 UTR	5utr (140)R	GGTGTACTCACCGCTTAGCC
NPRO	NPRO(630)RS	TTGCTACAATCGCCCTTCTT
NPRO	NPRO(779)FS	AGGGAGAATGACAGGGTCTG
Cápsida	capsid(927)FS	ACAAAGGAGCAAAACCCAAG
ERNS	EO(1365)RS	GTCACGTTGGTGGACCCTAC
E1	E1(2402)RS	AGCCAGAAATGCCACAGC
E1	E1(2606)FS	ACCTGTGTGGGTGCTAACAT
E2	E2(3086)RS	TTACTTTGTCTTCCCGTTGC
NS2	NS2(4409)FS	CCAAGAAACTTCCCCATACG
NS2	ns2(4460)RS	TTCCACATCCTCTTTCTTCTTTT
NS3	NS3(5170)RS	GCTGGCCCTCGAATGATCCA
NS3	NS3(5468)FS	GTTCCCTGTGTCCTTGCTGA

NS3	NS3(5670)RS	TG TTTTTGTCTTGGCACTGG
NS3	NS3(6296)FS	GAGCACAACAGGGCAGAAAT
NS3	NS3(6479)RS	CCATCTTCCTTGTAGGCACA
NS3	NS3F(6525)F	GTCAGGCCTGCCTATCTTTG
NS3	NS3(7153)FS	GGAGAAGTCACTGACGCACA
NS3	NS3(7241)RS	GCCATTTCAATCCCAGTATG
NS4B	NS4B(7715)FS	GGGGTCCACACAGCATTGTA
NS4B	NS4B (7893)RS	CCCTTGATACTCACGCCTGT
NS4B	NS4B(8532)FS	GCCGACTCAAAATGGAGAAA
NS5A	NS5A(8810)RS	GCCACCCTATTCTTGGATCTC
NS5B	NS5B(10889)FS	AAATGAGAAGAGGGCAGTGG
NS5B	NS5BF-10936	AAGGCCACCACTCAAATCAC
NS5B	NS5BR-12039	AGGCTTCTGCTTGACCCAGT
* FS = cebador directo, RS= cebador inverso		

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

Ejemplo 6

Secuencias UTR

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

1. Método 5 'RACE

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

2. Método 3 'RACE

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

Ejemplo 7

PCR a tiempo real

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

Cebador directo: CAGTTGGTGTGATCCATGATCCT

Cebador inverso: GGCCTCACCCTGCAACTTT

Sonda: 6FAMAAGTCTTCAGCAGTTAACTMGBNFQ

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

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

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

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

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

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

Ciclar la máquina de PCR en:

Fase 1: Repetir 1x

48 ºC durante 30 minutos
95 ºC durante 10 minutos

Fase 2: Repetir 45x

95 ºC durante 15 segundos
58 ºC durante 30 segundos cada vez

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

Ejemplo 8

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

1. Clonación de fragmentos de PCR

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

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

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

Los ligamientos se transforman en la cepa de *E. coli* competente Top 10 (Invitrogen Corporation), Genotipo: F^-mcrA D(mrr-hsdRMS-McrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoRrecA1 araD139 D(ara-leu) 7697 galU galK rpsL endA1 nupG, y/o *E. coli* Sure® (Stratagene), Genotipo: $e14^-$(McrA$^-$)D (mcrCB-hsdSMR-mrr) 171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 rel A1 lac recB recJ sbcc umuC::Tn5 (kan^r) uurC[F' proAB $lacI^qZ$ D m15 Tn10 (Tet^r)]^c. Los protocolos para la preparación de células competentes y la transformación de las bacterias se toman del Invitrogen MaxBac Baculovirus Expression System Manual Versión 1.8.

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

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

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

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

4. Purificación en placa de baculovirus recombinantes

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

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

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

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

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

6. Optimización de la producción de proteínas recombinantes

Se usan suspensiones de células de insecto Sf9, adaptadas a medio sin suero Sf-900 II de acuerdo con el protocolo descrito por Gibco BRL (1995), para optimizar la expresión de la proteína recombinante. Se infectan dos matraces cónicos, que contienen 50 ml de células ($1,5x10^6$ células por ml), con baculovirus recombinante a una MOI alta y baja, entre 0,1 y 5,0. Un tercer matraz actúa como cultivo de control no infectado. Los 3 matraces se incuban con agitación a 28 ºC, y se retiran alícuotas de 5 ml a intervalos de 24 horas durante un máximo de 7 días.

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

<120> Especies de pestivirus
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 12077
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 1
Descripción de la secuencia: nucleótido del virus PMC
<213> Nombre del organismo: virus PMC

gtataacgac agtagttcaa gtgtcgttat gcatcattgg ccataacaaa ttatctaatt 60
tggaataggg acctgcgacc tgtacgaagg ccgagcgtcg gtagccattc cgactagtag 120
gactagtaca aataggtcaa ctggttgagc aggtgagtgt gctgcagcgg ctaagcggtg 180
agtacaccgt attcgtcaac aggtgctact ggaaaggatc acccactagc gatgcctgtg 240
tggacgagga catgtccaag ccaatgttat cagtagcggg ggtcgttact gagaaagctg 300
cccagaatgg gtagttgcac atacagtctg ataggatgcc ggcggatgcc ctgtattttg 360
accagtataa atattatccg ttgtaaagca tatgaatact tttacttta atacatatgg 420
agggagtgag gaaggaaaca tgttctttag aactgcaccc acgccgccac cagggtgcca 480
agaaccggtt tacacaagca caatgagacc aatttttggc gaaccccatc cacctctaca 540
caaacacagc acgttaaaat tgccacattg gaggggggatc aaaacaatta gagttaagaa 600
gagagaattg ccaaagaagg gcgattgtag caactcaaca acagctccca cttcgggggt 660
gtacgttgaa ttaggggctg tgttctataa agattacacg ggcacggtat accatcgtgt 720
accgctagaa ctttgtacaa accaagagag gtgcgaggga tccaagtgtg tagggagaat 780
gacagggtct gatggcaggt tgtacaacgt tttagtatgt ccggacgatt gtatcctctt 840
tgagagacac tgtagaggtc aaacagtcgt cctgaaatgg atttccaacc ccttgacatc 900
accactttgg gtccagagtt gttctgacga caaaggagca aaacccaagg tgaaaccaaa 960
agacgacagg atgaagcaag gaaaaatagt gacaaagcct aaagagactg aagcagatca 1020
aaaaactaga ccaccagatg ccacgatagt ggttgacggg cagaagtatc aggtgaggaa 1080
gaaggggaaa gcgaaaccca agactcaaga cggcttatac cacaacaaga acaaaccaga 1140
agcgtccagg aagaagcttg agaaggcctt gctagcatgg gcaatattag cctgcctatt 1200
ggtggtaccg gtagggtcca ccaacgtgac acaatggaac ttatgggaca ataaaagtac 1260
tacagacata catagcgtca tgttttctag agggattaaa aggagtctgc atggaatttg 1320
gcccacacaa atctgcaaag ggatccctac acatctagca gcagactatg aactgaaaag 1380
gattcacggg atggtggatg caagccccat gaccaacttc acatgttgta ggctacagag 1440
acatgagtgg aacaagcatg ggtggtgcaa ctggtacaat atagagccgt ggatcaatct 1500
catgaataat acccaaggac tattaaacac tggagacaat ttcactgagt gcgcagtcac 1560
atgcaggtat gatgcagact taggggtgaa tatagtgact caagccagga ctactccaac 1620
tatcctgact ggctgtaaga aagggcacaa cttctctttc tcaggggagg tcagggcctc 1680
accctgcaac tttgagttaa ctgctgaaga cttgctcagg atcatggatc acaccaactg 1740
cgagggattt acctacttcg gggaaggaat cgttgacggt tacaccgagg tagtagagaa 1800
ggccaggtca agtggtttca gggctctcac atggttgtcg agtaagattg aaaacaccaa 1860
gaaaaaaata ttcggagctg aagccagtcc ttactgccca gtggctaaga gggtcttcaa 1920
cattatttat accaacaatt gcaccccgct tggactgcca gataagtcaa aaattatagg 1980
accaggaacc tttgacatca gtggcaggga tgaattcata tttccaaaac tcccctacca 2040
cgtagatgac ttcattctac tgagcttaat tgcaatgtct gattttgctc cagagacatc 2100
aagtataatc tacctggctt tgcactacct aatgccaagt aatgacaaca gggacttcgt 2160
gatggacctg gacccaaata aactaaacct tactgcaact aaatccgtgg caagtgtggt 2220
ccctacatcg gtgaatgtgt taggtgaatg ggtgtgcgtc aaaccaagtt ggtggcctta 2280
ttccgccgaa atcactaatc tgataggagg tgtcatcacc gtggcagact tagttatcaa 2340
gaccattgaa gaattgctaa atttgtggac cgaagcaaca gctgtggcat ttctggctgc 2400

tctaataaaa atttttagag gccagccgat ccaagcggta gcatggttaa tcatcatagg 2460
gggagcacaa gcccaaacct gcaaccctga attcatgtac gcattagcga aaaataccag 2520
cataggttca ttaggaccag aatcactgac gacaaggtgg taccaactaa ccagcggttt 2580
caaactcact gacagcacga ttgaagtcac ctgtgtgggt gctaacatga ggattcatgt 2640
agtgtgccca cttgtaagtg acagatattt ggccataaac caccctagag cactgccaac 2700
aacggcgtgg ttcaggaaaa tacacactca gcatgaggta ccaagagaaa gaatcatgag 2760
tgagtcaaaa aggaggtaca cttgtccttg tggttctaaa ccagtggtga ggtcaacaac 2820
acaattcaac ccaatatcta tatctacccc aagctttgaa cttgaatgcc ctaggggttg 2880
gactggggct gtagagtgta cactagtctc cccatcaact ctgacaacag agactatatt 2940
cacatacagg aagcccaaac cattcggact tgaaaactgg tgcaagtata cagtggtgga 3000
gaaagggatc ctgtattctt gtaaatttgg gggcaattca acatgcatca aagggcttat 3060
agttaaaggg caacgggaag acaaagtaag gtactgtgaa tggtgtggtt ataagttcag 3120
ttcaccaaat ggactgcctc agtatccact gggattgtgt gagaaagaac aatcagaagg 3180
actcagggat tatggtgact tcccatgctg caacaacggc acttgtattg acaaagaagg 3240
tagtgtgcaa tgctacatag gggataagaa agttaccgtg aagctgtata atgcctcact 3300
attggccccc atgccctgca aacccatagt gtataactcc caggggcccc cagcgcctaa 3360
gacctgcact tataggtggg cctcaacatt agaaaataaa tattatgaac ccagggacag 3420
ctactaccag caatacatta taaagtcagg gtatcaatat tggtttgatc tcacagcaaa 3480
ggatcatgtg gcagactgga tcacaaaata ctttccaata ataatagtgg ccttgttagg 3540
gggcagaggc accttgtggg tgttgatagc ttatgagttg ctaactcagt atgaggtagt 3600
aggagacgag aacatagtgg ctcaagctga agccctggta atcggaaaca tcttgatgag 3660
tttagactta gagataatta gctgcttcct tctgttgttg atcgtggtga aaaaacaagc 3720
tgtcaggaga acgttggctt tactgtttca ttggataact atgaacccat tccagtcagt 3780
aatgatcaca gtggtctact tcgtcggttt ggtgagggcc gaagagggaa ctaaagaggg 3840
tagtacaagc gggccaccaa tccatgtagt tgcaatactg ttattcctct tgtaccacac 3900
agtgaagtat aaggacttta acatagcaat gatcttactt ataacattgt ccctgaaaag 3960
ctcatcctac atacatacca gcttgtatga aattccattg cttgtggctg taataagtct 4020
cacatgctcc atatacattt ttgacttgca ggtaaagagc aagctagtgg ccccaactat 4080
aggtataatt ggagttaccc tagcaatgag agttttgtgg ctggtaaggc aaatgactat 4140
accaaccccc tctgtgtcca ttagtctgat agatccaaag atggtcataa tactctactt 4200
gatatcccta actattacag tcaatcacaa cctagaccta gcaagttatt gcttgaaact 4260
gggacctttt atcctatcat tcctaacaat gtgggtggat gttgtcatcc tcctgctcat 4320
gctgccttgg tacgaactag taaaagtcta ctacctaaaa aagaagaaag aggatgtgga 4380
aacatggttc caaaattcag gaatatccac ccaagaaact tccccatacg gatttgattt 4440
ttctagcccc ggggagggag tgcacacact accaatgcaa aataaaacca aattttgtag 4500
gactgcttac atgactgtac taagggcttt ggtgataaca gccatcagca gtgtctggaa 4560
accaataatt ttagcagaac tcctaataga ggcagtgtat tggacacaca ttaaaatagc 4620
caaagaattg gcggggtcaa gcaggttcgt tgctaggttc attgcatcta ttatagagtt 4680
gaattgggcc atggacgaaa aagaagcatc tcggtacaaa agattttacc tattatcatc 4740
caaaataaca gatctaatgg ttaagcacaa aatccaaaat gagacagtaa aatcctggtt 4800
tgaagaaact gaaatatttg gaatacaaaa agtggcaatg gtgataaggg ctcattctct 4860
gagtttggag ccaaatgcca tcctttgctc cgtttgtgaa gaaaaacaaa atcaaaaagc 4920
caaaaggccc tgccctaagt gtggtagtag aggcactcaa ataaagtgtg ggctgacact 4980
ggccgagttt gaggaagaac attacaaaaa aatatacatc ctcgaaggcc aagatgaaac 5040
tcccatgagg aaagaagaaa gacagcaagt aacttatgtc tctaggggtg ctctgttcct 5100

taggaatctt cctatcttag cttcaaaaaa caaataccta cttgtaggca atctgggtat 5160
ggaattgcaa gatttggaaa gtatgggatg gatcattcga gggccagccg tctgcaagaa 5220
gataatacac catgagaaat gcaggccttc aataccagac aaactcatgg cattcttcgg 5280
gattatgcct aggggagtta caccaagagc ccctacacgg ttccctgtgt ccttgctgaa 5340
gataagacgg ggttttgaga ccggctgggc ctacacacac cctggagggg taagtagtgt 5400
gatgcatgtc accgctgggt cggatatata tgtcaatgac tcaataggga ggacaaaaat 5460
ccagtgccaa gacaaaaaca ctacaacaga tgagtgtgaa tatggtgtga aaacagactc 5520
agggtgctct gatggagctc ggtgctatgt catcaaccct gaagcaacca acatagcagg 5580
gaccaagggg gccatggtac acctgaggaa agctggagga gagttcaact gcgtgactgc 5640
ccagggtacc cccgccttct ataatctaaa gaacttaaaa ggatggtcag gcctgcctat 5700
ctttgaagct gccacaggaa gagtggtagg aagggtaaaa gcaggaaaaa acactgacaa 5760
tgctccaaca accattatgt cagggacgca agtggcaaaa ccatcagagt gtgacctaga 5820
atcagtggtg aggaaactag agacaatgaa cagaggggaa ttcaaacaag tgactctggc 5880
tacaggcgca ggaaagacaa ccatgctacc aaagctgtta atagaatcca taggcaggca 5940
taagagagtg ttagtactga tcccgttgag agctgcagcg gaggggtgt accagtacat 6000
gagaaccaaa cacccaagca tatctttcaa cttgaggata ggggatctga aagaaggtga 6060
catggcaact gggatcacct atgcctctta tgggtacttc tgccaaatgg acatgcctag 6120
actggagaat gcaatgaagg aataccacta tattttcttg gatgaatatc actgtgccac 6180
accagaacag ttggcagtga tgtcaaaaat acataggttc ggtgaatcag ttagggtaat 6240
agccatgacc gccacgccat ccgggactgt gagcacaaca gggcagaaat tcacaattga 6300
ggaggtggta gtacctgaag tgatgaaggg ggaggacctt gctgatgatt acatcgaaat 6360
agcagggttg aaggtgccaa agaaagagtt agagggtaac gtactgactt ttgtgcctac 6420
aaggaagatg gcatcggaaa cagcaaaaaa attaaccaca cagggataca atgctggata 6480
ctacttcagt ggagaagatc catcatccct gcggacaact acttctaagt caccatatat 6540
agtagttgca accaatgcca ttgaatccgg ggtaacctta ccggaccttg atacagtaat 6600
agatacaggc atgaagtgtg aaaagagact aagaatcgaa aacaaagctc cctacatcgt 6660
aacaggactg aaaagaatgg ctataacaac gggggagcaa gctcaaagaa aaggtagggt 6720
aggcagggtt aaacctggga ggtacttgag aggacctgaa aacactgcag gtgaaaagga 6780
ctatcactat gacctttttac aggcacagag gtacggcatc caagactcaa taaacatcac 6840
caagtctttc agggagatga actatgattg ggcattatat gaggaagacc cgttaaagat 6900
tgcccaatta gagttgctaa acacactcct gatctcaagg gatctgccag tagtaacaaa 6960
aaatctgatg gcccgcacaa cacatcccga acctatacaa ttggcttaca atagtttaga 7020
aacccctgta ccggtggcat tcccaaaagt gaaaaatgga gaagtcactg acgcacatga 7080
aacttacgag ttgatgacct gtaggaagct tgagaaagac ccccctatat acctgtatgc 7140
aacagaagaa gaagatctcg tagtggacat actgggattg aaatggccag acgccacaga 7200
gagggctgtc ttggaagtgc aagacgccct gggccagatc acaggtttat ctgcagggga 7260
gacagcttta ctcatagccc tattagggtg ggtgggctac gaagccttgg tgaagaggca 7320
cgtgcctatg gtgacagaca tatacaccct agaagatgaa aaattggaag acactacaca 7380
cctacaattt gccccagatg atctgaacaa ttcagatacc attgagctcc aagacttatc 7440
gaatcaccaa atccaacaaa ttctagaagg tgggaaggaa tatgtcggcc aagcctacca 7500
attcctcagg ttgcaagctg agagggctgc caactcagac aaaggcaaga aagcaatggc 7560
agcggcccca ttactagccc acaagttcct ggaatacttg caagagcatg caggtgacat 7620
aaagaagtat ggtctatggg gggtccacac agcattgtat aacagcataa aagaaagact 7680
gggtcacgaa actgcattcg catctctggt tataaaatgg attgcctttt cctcagatgg 7740
agtcccgggg atgattaagc aagcagcagt agacttggtg gtatactata taatcaacag 7800

gcctgagtat caaggggata aggagacaca gaatgcaggt agacaatttg ttggctccct 7860
ttttgtttca tgtctagcag agtacacatt caaaaacttc aataaatcag cattagaagg 7920
attgatcgag cctgccttaa gctatctacc ctacgcttca agcgcactaa agttattcct 7980
accgactaga cttgaaagtg tagtgatact gtccactact atatacagaa catacttatc 8040
aatcaggaaa ggatctagtc agggtttagc cgggctggca gttagctcag cgatggagat 8100
catgaaccag aacccaatca gcgtggctat tgcactggca ctaggagtcg gagcaatagc 8160
ggcacataat gccattgaga gcagtgaggc aaaaaggact ctcctgatga aggtctttgt 8220
taagaacttt ttggaccaag cagccactga tgagcttgtg aaagagaacc ctgagaagat 8280
cataatggca gtgtttgagg gcattcaaac agctggaaat ccattgagac ttgtatacca 8340
tctatatgca atgttctaca aagggtggac tgccgcggaa atagctgaaa aaaccgctgg 8400
taggaacatt tttgtgttaa caatatttga aggattggaa atgttaggcc tggatgccga 8460
ctcaaaatgg agaaatctga gctctaatta tcttattgat gcagtgaaga aaatcattga 8520
aaaaatgact aaaacagcaa caagcttcac ctacagcttt ttgaaatctt tgcttcctgc 8580
ccccttctcg tgtactaaat cagaaagaga tccaagaata gggtggcccc aaaaagacta 8640
cgactacctc gaggtccgat gcgcttgtgg gtataacagg agagctataa aaagagactc 8700
aggacctgtg ttatgggaga ccttagagga gacgggtcca gagtactgcc acaacagagg 8760
tgaaaggggg ctcagcaatg tgaagactac tagatgcttt gtccaaggag aggaaatccc 8820
tccaattgca ctgaggaaag gagtaggtga gatgttggtc aagggtgttt cattcagaat 8880
agattttgat aaagacaaga tactttcaac agacaagtgg aaggtaccac atagggcagt 8940
tacatcaatc tttgaggatt ggcagggtat tggttacaga gaggcttacc tagggaccaa 9000
accagactat gggggtctgg tgcccagatc ttgtgtaact gtaacaaaac aagggttaac 9060
attcttgaaa actgccagag gcatggcttt cacgactgac ctgaccatcc agaacatcaa 9120
aatgctgata gctacatgct tcaagaacaa ggtgaaggaa ggggagatac cagctacgat 9180
tgaaggggaa acatggatca acataccact agtgaatgag gacaccggga ccattaaacc 9240
aagcttcggg gaaagagtga ttcccgaacc atatgaggag gacccacttg aaggcccaag 9300
tgtaatcgtt gaaacaggag gcatagccat caaccaaata ggggtcaatc cacaatccag 9360
tacatgtgga acagttttta cagcagtgaa ggatctgtgc caaacagtta gtaataaagc 9420
caagaatatc aaaattgggt tttcggaagg ccaataccca ggtccagggg ttgcaaagaa 9480
gacactgaac cagctcatac aagatgaaga cccaaaacca ttcatatttg tttgtggctc 9540
tgacaagtca atgtctaatc gggcaaaaac tgcgaggaac atcaagagaa tcaccaccac 9600
aacacctgag aaattcagag acttggcaaa aaacaagaaa ttgataattg tgctgttagg 9660
tgatagatac catgaagata tagaaaagta tgcagacttc aagggcacct tcttgaccag 9720
acaaaccttg gaagcactag caagtgccaa agctgtagag aaggacatga ccaagaaaga 9780
agcagcaaga gtattggcaa tggaagaaaa ggatgaacta gaactcccag ggtggctgca 9840
tacagatgca cccaaattcc tagacattac taaggacaac atcacacatc acctaatagg 9900
ggacatgcag agtctgagag aaagagcagg ggagatagga gcaaaggcca ccactcaaat 9960
cactaagaaa gggagtgtat acacaatcaa tctgagtacg tggtgggagt cagagaggtt 10020
ggcatctttg gaacctttgt tccgggaact actatctaaa tgcaggccag tggacaggga 10080
gacatataag aattgtcatt ttgcaacagc agcccaactt gccggaggaa actgggtacc 10140
ggtagcacca gttgtacatc ttggggaaat tccggtaaag aagaaaaaga ctctccccta 10200
cgaggcatac aagctcctaa aagagatggt tgactcggag aaggaattcc ataaaccagt 10260
gagcagggaa aaacaccaat ggatactgaa caaagtgaaa actggtggtg acctcggctt 10320
aaaaaatcta gtatgtccag gtagggttgg agaaccaatc ctaagagaga agaagaaatt 10380
caacatttac aacaagagga ttaccagtac tatgttatca gtagggataa ggccagaaaa 10440
attgccagtg gtaagagccc agaccagtac caaagaattt catgaagcaa taagggacaa 10500

```
aatagacaaa aaagcaaaca cacagacccc aggcctacac aaagaattgt tggagatatt   10560
caactcaata tgtgccatcc ccgaacttag aaatacctac aaagaggttg attgggacgt   10620
tctaacctca ggcataaata ggaaaggtgc agccgggtac ttcgaaaaaa tgaacatagg   10680
ggagatcata gatagtgaca aaaaatcagt ggaacaactc ataaagagaa tgaaatcagg   10740
gctagaattc aactactatg agactgcaat accaaaaaat gagaagaggg cagtggtaga   10800
tgattggatg gaaggtgact atgtagaaga aaaaagacca agagtcatac agtatcctga   10860
ggcaaagatg agattagcta taaccaaagt aatgtataac tgggtcaagc agaagcctat   10920
agtaatccct ggatacgaag gtaagactcc tttgtttcat gttttcgaca aggtccacaa   10980
agaatggaaa aatttcaaca gtccagttgc agtcagtttt gacactaaag cctgggacac   11040
acaagtaaca cccaaagacc ttctcctcat atcagaaatc caaaagtatt attacaagaa   11100
agaataccat agattcatag ataatttgac cgagaaaatg gtggaggtac cagtggtttg   11160
tgaagacgga aacgtctaca taagagaagg tcagagggga agtggtcaac cagacactag   11220
cgcaggtaat agtatgttga atgtactgac tatgatatat gccttctgca aagctaactc   11280
catcccttac tcagccttcc acagggtagc aaagatacat gtgtgtggag atgatggttt   11340
cttgataact gagaaaagtt ttggtgaggc ctttgcgatc aaggggcctc aaattttgat   11400
ggaagcagga aaaccacaaa aacttatagg tgaatttgga ctgaaattgg catataaatt   11460
tgatgacatt gaattttgct cgcatacacc aataaaggtc aggtgggctg acaacaacac   11520
atcatacatg cccggaagag acacagctac cattctagct aaaatggcaa cccgccttga   11580
ctctagtggg gagaggggga ccgagggata cgagctggcc gtggccttca gtttcttact   11640
aatgtattct tggaaccccc tggtaagaag aatatgcctg cttgtcatgt ctacaattga   11700
cacaaaagaa gctagccaaa ataacactat atatacattt agggggggatc ccataggtgc   11760
ctacacagag gtaattgggt ataggctgga ccaactaaaa cagacagagt tctctaaatt   11820
ggctcagctg aatttgtcaa tggcaatact tcaaatatac aataaaaaca caaccaagag   11880
actcatcgaa gattgtgtga aacttggcaa ccaaaataag caaatattgg tgaatgcaga   11940
ccgtttgatc agcaagaaaa cgggctacac atatgagcca acagctggcc acactaagat   12000
aggcaagcac tatgaagaaa tcaacctgct gaaagataca ccacaaaaaa ctgtctacca   12060
aggaactgaa aggtata                                                  12077
```

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

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

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

Característica
Secuencia: SEC ID Nº: 1:
<221> Clave característica: gen
<222> Localización de: 1220
<222> Localización a: 1885

Otra información: E0

Característica
Secuencia: SEC ID Nº: 1:
<221> Clave característica: gen
<222> Localización de: 1886
<222> Localización a: 2473
Otra información: E1

Característica
Secuencia: SEC ID Nº: 1:
<221> Clave característica: gen
<222> Localización de: 2474
<222> Localización a: 3604
Otra información: E2

Característica
Secuencia: SEC ID Nº: 1:
<221> Clave característica: gen
<222> Localización de: 3605
<222> Localización a: 3820
Otra información: P7

Característica
Secuencia: SEC ID Nº: 1:
<221> Clave característica: gen
<222> Localización de: 3821
<222> Localización a: 5224
Otra información: NS2

Característica
Secuencia: SEC ID Nº: 1:
<221> Clave característica: gen
<222> Localización de: 5225
<222> Localización a: 7252
Otra información: NS3

Característica
Secuencia: SEC ID Nº: 1:
<221> Clave característica: gen
<222> Localización de: 7253
<222> Localización a: 7441
Otra información: NS4A

Característica
Secuencia: SEC ID Nº: 1:
<221> Clave característica: gen
<222> Localización de: 7442
<222> Localización a: 8482
Otra información: NS4B

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

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

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

```
GGSEEGNMFF RTAPTPPPGC QEPVYTSTMR PIFGEPHPPL HKHSTLKLPH WRGIKTIRVK      60
KRELPKKGDC SNSTTAPTSG VYVELGAVFY KDYTGTVYHR VPLELCTNQE RCEGSKCVGR     120
MTGSDGRLYN VLVCPDDCIL FERHCRGQTV VLKWISNPLT SPLWVQSCSD DKGAKPKVKP     180
KDDRMKQGKI VTKPKETEAD QKTRPPDATI VVDGQKYQVR KKGKAKPKTQ DGLYHNKNKP     240
EASRKKLEKA LLAWAILACL LVVPVGSTNV TQWNLWDNKS TTDIHSVMFS RGIKRSLHGI     300
WPTQICKGIP THLAADYELK RIHGMVDASP MTNFTCCRLQ RHEWNKHGWC NWYNIEPWIN     360
LMNNTQGLLN TGDNFTECAV TCRYDADLGV NIVTQARTTP TILTGCKKGH NFSFSGEVRA     420
SPCNFELTAE DLLRIMDHTN CEGFTYFGEG IVDGYTEVVE KARSSGFRAL TWLSSKIENT     480
KKKIFGAEAS PYCPVAKRVF NIIYTNNCTP LGLPDKSKII GPGTFDISGR DEFIFPKLPY     540
HVDDFILLSL IAMSDFAPET SSIIYLALHY LMPSNDNRDF VMDLDPNKLN LTATKSVASV     600
VPTSVNVLGE WVCVKPSWWP YSAEITNLIG GVITVADLVI KTIEELLNLW TEATAVAFLA     660
ALIKIFRGQP IQAVAWLIII GGAQAQTCNP EFMYALAKNT SIGSLGPESL TTRWYQLTSG     720
FKLTDSTIEV TCVGANMRIH VVCPLVSDRY LAINHPRALP TTAWFRKIHT QHEVPRERIM     780
SESKRRYTCP CGSKPVVRST TQFNPISIST PSFELECPRG WTGAVECTLV SPSTLTTETI     840
FTYRKPKPFG LENWCKYTVV EKGILYSCKF GGNSTCIKGL IVKGQREDKV RYCEWCGYKF     900
SSPNGLPQYP LGLCEKEQSE GLRDYGDFPC CNNGTCIDKE GSVQCYIGDK KVTVKLYNAS     960
LLAPMPCKPI VYNSQGPPAP KTCTYRWAST LENKYYEPRD SYYQQYIIKS GYQYWFDLTA    1020
KDHVADWITK YFPIIIVALL GGRGTLWVLI AYELLTQYEV VGDENIVAQA EALVIGNILM    1080
SLDLEIISCF LLLLIVVKKQ AVRRTLALLF HWITMNPFQS VMITVVYFVG LVRAEEGTKE    1140
GSTSGPPIHV VAILLFLLYH TVKYKDFNIA MILLITLSLK SSSYIHTSLY EIPLLVAVIS    1200
LTCSIYIFDL QVKSKLVAPT IGIIGVTLAM RVLWLVRQMT IPTPSVSISL IDPKMVIILY    1260
LISLTITVNH NLDLASYCLK LGPFILSFLT MWVDVVILLL MLPWYELVKV YYLKKKKEDV    1320
ETWFQNSGIS TQETSPYGFD FSSPGEGVHT LPMQNKTKFC RTAYMTVLRA LVITAISSVW    1380
KPIILAELLI EAVYWTHIKI AKELAGSSRF VARFIASIIE LNWAMDEKEA SRYKRFYLLS    1440
SKITDLMVKH KIQNETVKSW FEETEIFGIQ KVAMVIRAHS LSLEPNAILC SVCEEKQNQK    1500
AKRPCPKCGS RGTQIKCGLT LAEFEEEHYK KIYILEGQDE TPMRKEERQQ VTYVSRGALF    1560
LRNLPILASK NKYLLVGNLG MELQDLESMG WIIRGPAVCK KIIHHEKCRP SIPDKLMAFF    1620
GIMPRGVTPR APTRFPVSLL KIRRGFETGW AYTHPGGVSS VMHVTAGSDI YVNDSIGRTK    1680
IQCQDKNTTT DECEYGVKTD SGCSDGARCY VINPEATNIA GTKGAMVHLR KAGGEFNCVT    1740
AQGTPAFYNL KNLKGWSGLP IFEAATGRVV GRVKAGKNTD NAPTTIMSGT QVAKPSECDL    1800
ESVVRKLETM NRGEFKQVTL ATGAGKTTML PKLLIESIGR HKRVLVLIPL RAAAEGVYQY    1860
MRTKHPSISF NLRIGDLKEG DMATGITYAS YGYFCQMDMP RLENAMKEYH YIFLDEYHCA    1920
TPEQLAVMSK IHRFGESVRV IAMTATPSGT VSTTGQKFTI EEVVVPEVMK GEDLADDYIE    1980
IAGLKVPKKE LEGNVLTFVP TRKMASETAK KLTTQGYNAG YYFSGEDPSS LRTTTSKSPY    2040
IVVATNAIES GVTLPDLDTV IDTGMKCEKR LRIENKAPYI VTGLKRMAIT TGEQAQRKGR    2100
```

```
VGRVKPGRYL RGPENTAGEK DYHYDLLQAQ RYGIQDSINI TKSFREMNYD WALYEEDPLK    2160
IAQLELLNTL LISRDLPVVT KNLMARTTHP EPIQLAYNSL ETPVPVAFPK VKNGEVTDAH    2220
ETYELMTCRK LEKDPPIYLY ATEEEDLVVD ILGLKWPDAT ERAVLEVQDA LGQITGLSAG    2280
ETALLIALLG WVGYEALVKR HVPMVTDIYT LEDEKLEDTT HLQFAPDDLN NSDTIELQDL    2340
SNHQIQQILE GGKEYVGQAY QFLRLQAERA ANSDKGKKAM AAAPLLAHKF LEYLQEHAGD    2400
IKKYGLWGVH TALYNSIKER LGHETAFASL VIKWIAFSSD GVPGMIKQAA VDLVVYYIIN    2460
RPEYQGDKET QNAGRQFVGS LFVSCLAEYT FKNFNKSALE GLIEPALSYL PYASSALKLF    2520
LPTRLESVVI LSTTIYRTYL SIRKGSSQGL AGLAVSSAME IMNQNPISVA IALALGVGAI    2580
AAHNAIESSE AKRTLLMKVF VKNFLDQAAT DELVKENPEK IIMAVFEGIQ TAGNPLRLVY    2640
HLYAMFYKGW TAAEIAEKTA GRNIFVLTIF EGLEMLGLDA DSKWRNLSSN YLIDAVKKII    2700
EKMTKTATSF TYSFLKSLLP APFSCTKSER DPRIGWPQKD YDYLEVRCAC GYNRRAIKRD    2760
SGPVLWETLE ETGPEYCHNR GERGLSNVKT TRCFVQGEEI PPIALRKGVG EMLVKGVSFR    2820
IDFDKDKILS TDKWKVPHRA VTSIFEDWQG IGYREAYLGT KPDYGGLVPR SCVTVTKQGL    2880
TFLKTARGMA FTTDLTIQNI KMLIATCFKN KVKEGEIPAT IEGETWINIP LVNEDTGTIK    2940
PSFGERVIPE PYEEDPLEGP SVIVETGGIA INQIGVNPQS STCGTVFTAV KDLCQTVSNK    3000
AKNIKIGFSE GQYPGPGVAK KTLNQLIQDE DPKPFIFVCG SDKSMSNRAK TARNIKRITT    3060
TTPEKFRDLA KNKKLIIVLL GDRYHEDIEK YADFKGTFLT RQTLEALASA KAVEKDMTKK    3120
EAARVLAMEE KDELELPGWL HTDAPKFLDI TKDNITHHLI GDMQSLRERA GEIGAKATTQ    3180
ITKKGSVYTI NLSTWWESER LASLEPLFRE LLSKCRPVDR ETYKNCHFAT AAQLAGGNWV    3240
PVAPVVHLGE IPVKKKKTLP YEAYKLLKEM VDSEKEFHKP VSREKHQWIL NKVKTGGDLG    3300
LKNLVCPGRV GEPILREKKK FNIYNKRITS TMLSVGIRPE KLPVVRAQTS TKEFHEAIRD    3360
KIDKKANTQT PGLHKELLEI FNSICAIPEL RNTYKEVDWD VLTSGINRKG AAGYFEKMNI    3420
GEIIDSDKKS VEQLIKRMKS GLEFNYYETA IPKNEKRAVV DDWMEGDYVE EKRPRVIQYP    3480
EAKMRLAITK VMYNWVKQKP IVIPGYEGKT PLFHVFDKVH KEWKNFNSPV AVSFDTKAWD    3540
TQVTPKDLLL ISEIQKYYYK KEYHRFIDNL TEKMVEVPVV CEDGNVYIRE GQRGSGQPDT    3600
SAGNSMLNVL TMIYAFCKAN SIPYSAFHRV AKIHVCGDDG FLITEKSFGE AFAIKGPQIL    3660
MEAGKPQKLI GEFGLKLAYK FDDIEFCSHT PIKVRWADNN TSYMPGRDTA TILAKMATRL    3720
DSSGERGTEG YELAVAFSFL LMYSWNPLVR RICLLVMSTI DTKEASQNNT IYTFRGDPIG    3780
AYTEVIGYRL DQLKQTEFSK LAQLNLSMAI LQIYNKNTTK RLIEDCVKLG NQNKQILVNA    3840
DRLISKKTGY TYEPTAGHTK IGKHYEEINL LKDTPQKTVY QGTERY                    3886
```

Secuencia
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 418
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 3
Descripción de la secuencia: 5'UTR
<213> Nombre del organismo: virus PMC

```
gtataacgac agtagttcaa gtgtcgttat gcatcattgg ccataacaaa ttatctaatt      60
tggaataggg acctgcgacc tgtacgaagg ccgagcgtcg gtagccattc cgactagtag     120
gactagtaca aataggtcaa ctggttgagc aggtgagtgt gctgcagcgg ctaagcggtg     180
agtacaccgt attcgtcaac aggtgctact ggaaaggatc acccactagc gatgcctgtg     240
tggacgagga catgtccaag ccaatgttat cagtagcggg ggtcgttact gagaaagctg     300
cccagaatgg gtagttgcac atacagtctg ataggatgcc ggcggatgcc ctgtattttg     360
accagtataa atattatccg ttgtaaagca tatgaatact tttacttta atacatat        418
```

Secuencia
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 504
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 4
Descripción de la secuencia: NPro
<213> Nombre del organismo: virus PMC

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

tcaccacttt gggtccagag ttgt                                            504
```

Secuencia
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 297
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 5
Descripción de la secuencia: Cápsida
<213> Nombre del organismo: virus PMC

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

Secuencia
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 666
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 6
Descripción de la secuencia: E0
<213> Nombre del organismo: virus PMC

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

Secuencia
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 588
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 7
Descripción de la secuencia: E1
<213> Nombre del organismo: virus PMC

```
agtccttact gcccagtggc taagagggtc ttcaacatta tttataccaa caattgcacc      60
ccgcttggac tgccagataa gtcaaaaatt ataggaccag gaacctttga catcagtggc     120
agggatgaat tcatatttcc aaaactcccc taccacgtag atgacttcat tctactgagc     180
ttaattgcaa tgtctgattt tgctccagag acatcaagta taatctacct ggctttgcac     240
tacctaatgc caagtaatga caacagggac ttcgtgatgg acctggaccc aaataaacta     300
aaccttactg caactaaatc cgtggcaagt gtggtcccta catcggtgaa tgtgttaggt     360
gaatgggtgt gcgtcaaacc aagttggtgg ccttattccg ccgaaatcac taatctgata     420
ggaggtgtca tcaccgtggc agacttagtt atcaagacca ttgaagaatt gctaaatttg     480
tggaccgaag caacagctgt ggcatttctg gctgctctaa taaaaatttt tagaggccag     540
ccgatccaag cggtagcatg gttaatcatc atagggggag cacaagcc                  588
```

Secuencia
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 1131
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 8
Descripción de la secuencia: E2
<213> Nombre del organismo: virus PMC

```
caaacctgca accctgaatt catgtacgca ttagcgaaaa ataccagcat aggttcatta      60
```

```
ggaccagaat cactgacgac aaggtggtac caactaacca gcggtttcaa actcactgac     120
agcacgattg aagtcacctg tgtgggtgct aacatgagga ttcatgtagt gtgcccactt     180
gtaagtgaca gatatttggc cataaaccac cctagagcac tgccaacaac ggcgtggttc     240
aggaaaatac acactcagca tgaggtacca agagaaagaa tcatgagtga gtcaaaaagg     300
aggtacactt gtccttgtgg ttctaaacca gtggtgaggt caacaacaca attcaaccca     360
atatctatat ctaccccaag ctttgaactt gaatgcccta ggggttggac tggggctgta     420
gagtgtacac tagtctcccc atcaactctg acaacagaga ctatattcac atacaggaag     480
cccaaaccat tcggacttga aaactggtgc aagtatacag tggtggagaa agggatcctg     540
tattcttgta aatttggggg caattcaaca tgcatcaaag ggcttatagt taaagggcaa     600
cgggaagaca aagtaaggta ctgtgaatgg tgtggttata agttcagttc accaaatgga     660
ctgcctcagt atccactggg attgtgtgag aaagaacaat cagaaggact cagggattat     720
ggtgacttcc catgctgcaa caacggcact tgtattgaca aagaaggtag tgtgcaatgc     780
tacatagggg ataagaaagt taccgtgaag ctgtataatg cctcactatt ggcccccatg     840
ccctgcaaac ccatagtgta taactcccag gggcccccag cgcctaagac ctgcacttat     900
aggtgggcct caacattaga aaataaatat tatgaaccca gggacagcta ctaccagcaa     960
tacattataa agtcagggta tcaatattgg tttgatctca cagcaaagga tcatgtggca    1020
gactggatca caaaatactt tccaataata atagtggcct tgttaggggg cagaggcacc    1080
ttgtgggtgt tgatagctta tgagttgcta actcagtatg aggtagtagg a              1131
```

Secuencia
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 216
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 9
Descripción de la secuencia: P7
<213> Nombre del organismo: virus PMC

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

Secuencia
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 1404
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 10
Descripción de la secuencia: NS2
<213> Nombre del organismo: virus PMC

```
gaagagggaa ctaaagaggg tagtacaagc gggccaccaa tccatgtagt tgcaatactg      60
ttattcctct tgtaccacac agtgaagtat aaggacttta acatagcaat gatcttactt     120
ataacattgt ccctgaaaag ctcatcctac atacatacca gcttgtatga aattccattg     180
cttgtggctg taataagtct cacatgctcc atatacattt ttgacttgca ggtaaagagc     240
aagctagtgg ccccaactat aggtataatt ggagttaccc tagcaatgag agttttgtgg     300
ctggtaaggc aaatgactat accaaccccc tctgtgtcca ttagtctgat agatccaaag     360
atggtcataa tactctactt gatatcccta actattacag tcaatcacaa cctagaccta     420
gcaagttatt gcttgaaact gggacctttt atcctatcat tcctaacaat gtgggtggat     480
gttgtcatcc tcctgctcat gctgccttgg tacgaactag taaaagtcta ctacctaaaa     540
aagaagaaag aggatgtgga aacatggttc caaaattcag gaatatccac ccaagaaact     600
tccccatacg gatttgattt ttctagcccc ggggagggag tgcacacact accaatgcaa     660
aataaaacca aattttgtag gactgcttac atgactgtac taagggcttt ggtgataaca     720
gccatcagca gtgtctggaa accaataatt ttagcagaac tcctaataga ggcagtgtat     780
tggacacaca ttaaaatagc caaagaattg gcggggtcaa gcaggttcgt tgctaggttc     840
attgcatcta ttatagagtt gaattgggcc atggacgaaa aagaagcatc tcggtacaaa     900
agattttacc tattatcatc caaaataaca gatctaatgg ttaagcacaa aatccaaaat     960
gagacagtaa aatcctggtt tgaagaaact gaaatatttg gaatacaaaa agtggcaatg    1020
gtgataaggg ctcattctct gagtttggag ccaaatgcca tcctttgctc cgtttgtgaa    1080
gaaaaacaaa atcaaaaagc caaaaggccc tgccctaagt gtggtagtag aggcactcaa    1140
ataaagtgtg ggctgacact ggccgagttt gaggaagaac attacaaaaa aatatacatc    1200
ctcgaaggcc aagatgaaac tcccatgagg aaagaagaaa gacagcaagt aacttatgtc    1260
tctaggggtg ctctgttcct taggaatctt cctatcttag cttcaaaaaa caaataccta    1320
cttgtaggca atctgggtat ggaattgcaa gatttggaaa gtatgggatg gatcattcga    1380

gggccagccg tctgcaagaa gata                                           1404
```

Secuencia
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 2028
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 11
Descripción de la secuencia: NS3
<213> Nombre del organismo: virus PMC

```
atacaccatg agaaatgcag gccttcaata ccagacaaac tcatggcatt cttcgggatt      60
atgcctaggg gagttacacc aagagcccct acacggttcc ctgtgtcctt gctgaagata     120
agacggggtt ttgagaccgg ctgggcctac acacaccctg gaggggtaag tagtgtgatg     180
catgtcaccg ctgggtcgga tatatatgtc aatgactcaa tagggaggac aaaaatccag     240
tgccaagaca aaaacactac aacagatgag tgtgaatatg gtgtgaaaac agactcaggg     300
tgctctgatg gagctcggtg ctatgtcatc aaccctgaag caaccaacat agcagggacc     360
aaggggggcca tggtacacct gaggaaagct ggaggagagt tcaactgcgt gactgcccag     420
ggtacccccg ccttctataa tctaaagaac ttaaaaggat ggtcaggcct gcctatcttt     480
gaagctgcca caggaagagt ggtaggaagg gtaaaagcag gaaaaaacac tgacaatgct     540
ccaacaacca ttatgtcagg gacgcaagtg gcaaaaccat cagagtgtga cctagaatca     600
gtggtgagga aactagagac aatgaacaga ggggaattca aacaagtgac tctggctaca     660
ggcgcaggaa agacaaccat gctaccaaag ctgttaatag aatccatagg caggcataag     720
agagtgttag tactgatccc gttgagagct gcagcggagg gggtgtacca gtacatgaga     780
accaaacacc caagcatatc tttcaacttg aggatagggg atctgaaaga aggtgacatg     840
gcaactggga tcacctatgc ctcttatggg tacttctgcc aaatggacat gcctagactg     900
gagaatgcaa tgaaggaata ccactatatt ttcttggatg aatatcactg tgccacacca     960
gaacagttgg cagtgatgtc aaaaatacat aggttcggtg aatcagttag ggtaatagcc    1020
atgaccgcca cgccatccgg gactgtgagc acaacagggc agaaattcac aattgaggag    1080
gtggtagtac ctgaagtgat gaaggggggag gaccttgctg atgattacat cgaaatagca    1140
gggttgaagg tgccaaagaa agagttagag ggtaacgtac tgacttttgt gcctacaagg    1200
aagatggcat cggaaacagc aaaaaaatta accacacagg gatacaatgc tggatactac    1260
ttcagtggag aagatccatc atccctgcgg acaactactt ctaagtcacc atatatagta    1320
gttgcaacca atgccattga atccggggta accttaccgg accttgatac agtaatagat    1380
acaggcatga agtgtgaaaa gagactaaga atcgaaaaca aagctcccta catcgtaaca    1440
ggactgaaaa gaatggctat aacaacgggg gagcaagctc aaagaaaagg tagggtaggc    1500
agggttaaac ctgggaggta cttgagagga cctgaaaaca ctgcaggtga aaaggactat    1560
cactatgacc ttttacaggc acagaggtac ggcatccaag actcaataaa catcaccaag    1620
tctttcaggg agatgaacta tgattgggca ttatatgagg aagacccgtt aaagattgcc    1680
caattagagt tgctaaacac actcctgatc tcaagggatc tgccagtagt aacaaaaaat    1740
ctgatggccc gcacaacaca tcccgaacct atacaattgg cttacaatag tttagaaacc    1800
cctgtaccgg tggcattccc aaaagtgaaa aatggagaag tcactgacgc acatgaaact    1860
tacgagttga tgacctgtag gaagcttgag aaagaccccc ctatatacct gtatgcaaca    1920
gaagaagaag atctcgtagt ggacatactg ggattgaaat ggccagacgc cacagagagg    1980
gctgtcttgg aagtgcaaga cgccctgggc cagatcacag gtttatct                 2028
```

Secuencia
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 189
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 12
Descripción de la secuencia: NS4A
<213> Nombre del organismo: virus PMC

```
gcaggggaga cagctttact catagcccta ttagggtggg tgggctacga agccttggtg      60
aagaggcacg tgcctatggt gacagacata tacaccctag aagatgaaaa attggaagac     120
actacacacc tacaatttgc cccagatgat ctgaacaatt cagataccat tgagctccaa     180
gacttatcg                                                             189
```

Secuencia
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 1041
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 13
Descripción de la secuencia: NS4B
<213> Nombre del organismo: virus PMC

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

Secuencia
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 1515
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 14
Descripción de la secuencia: NS5A
<213> Nombre del organismo: virus PMC

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

Secuencia
<212> Tipo: ADN
<211> Longitud: 2080
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 15
Descripción de la secuencia: NS5B
<213> Nombre del organismo: virus PMC

```
acgtggtggg agtcagagag gttggcatct ttggaacctt tgttccggga actactatct      60
aaatgcaggc cagtggacag ggagacatat aagaattgtc attttgcaac agcagcccaa     120
cttgccggag gaaactgggt accggtagca ccagttgtac atcttgggga aattccggta     180
aagaagaaaa agactctccc ctacgaggca tacaagctcc taaaagagat ggttgactcg     240
gagaaggaat tccataaacc agtgagcagg gaaaaacacc aatggatact gaacaaagtg     300
aaaactggtg gtgacctcgg cttaaaaaat ctagtatgtc caggtagggt tggagaacca     360
atcctaagag agaagaagaa attcaacatt tacaacaaga ggattaccag tactatgtta     420
tcagtaggga taaggccaga aaaattgcca gtggtaagag cccagaccag taccaaagaa     480
tttcatgaag caataaggga caaaatagac aaaaaagcaa acacacagac cccaggccta     540
cacaaagaat tgttggagat attcaactca atatgtgcca tccccgaact tagaaatacc     600
tacaaagagg ttgattggga cgttctaacc tcaggcataa ataggaaagg tgcagccggg     660
tacttcgaaa aaatgaacat aggggagatc atagatagtg acaaaaaatc agtggaacaa     720
ctcataaaga gaatgaaatc agggctagaa ttcaactact atgagactgc aataccaaaa     780
aatgagaaga gggcagtggt agatgattgg atggaaggtg actatgtaga agaaaaaaga     840
ccaagagtca tacagtatcc tgaggcaaag atgagattag ctataaccaa agtaatgtat     900
aactgggtca agcagaagcc tatagtaatc cctggatacg aaggtaagac tcctttgttt     960
catgttttcg acaaggtcca caaagaatgg aaaaatttca acagtccagt tgcagtcagt    1020
tttgacacta aagcctggga cacacaagta acacccaaag accttctcct catatcagaa    1080
atccaaaagt attattacaa gaaagaatac catagattca tagataattt gaccgagaaa    1140
atggtggagg taccagtggt ttgtgaagac ggaaacgtct acataagaga aggtcagagg    1200
ggaagtggtc aaccagacac tagcgcaggt aatagtatgt tgaatgtact gactatgata    1260
tatgccttct gcaaagctaa ctccatccct tactcagcct tccacagggt agcaaagata    1320
catgtgtgtg gagatgatgg tttcttgata actgagaaaa gttttggtga ggcctttgcg    1380
atcaaggggc ctcaaatttt gatggaagca ggaaaaccac aaaaacttat aggtgaattt    1440
ggactgaaat tggcatataa atttgatgac attgaatttt gctcgcatac accaataaag    1500
gtcaggtggg ctgacaacaa cacatcatac atgcccggaa gagacacagc taccattcta    1560
gctaaaatgg caacccgcct tgactctagt ggggagaggg ggaccgaggg atacgagctg    1620
gccgtggcct tcagtttctt actaatgtat tcttggaacc ccctggtaag aagaatatgc    1680
ctgcttgtca tgtctacaat tgacacaaaa gaagctagcc aaaataacac tatatataca    1740
tttaggggggg atcccatagg tgcctacaca gaggtaattg ggtataggct ggaccaacta    1800
aaacagacag agttctctaa attggctcag ctgaatttgt caatggcaat acttcaaata    1860
tacaataaaa acacaaccaa gagactcatc gaagattgtg tgaaacttgg caaccaaaat    1920
aagcaaatat tggtgaatgc agaccgtttg atcagcaaga aaacgggcta cacatatgag    1980
ccaacagctg gccacactaa gataggcaag cactatgaag aaatcaacct gctgaaagat    2040
acaccacaaa aaactgtcta ccaaggaact gaaaggtata                          2080
```

Secuencia
<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 167
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 16
Descripción de la secuencia: proteína NPro
<213> Nombre del organismo: virus PMC

```
GGSEEGNMFF RTAPTPPPGC QEPVYTSTMR PIFGEPHPPL HKHSTLKLPH WRGIKTIRVK      60
KRELPKKGDC SNSTTAPTSG VYVELGAVFY KDYTGTVYHR VPLELCTNQE RCEGSKCVGR     120
MTGSDGRLYN VLVCPDDCIL FERHCRGQTV VLKWISNPLT SPLWVQS                    167
```

Secuencia
<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 99
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 17
Descripción de la secuencia: proteína cápsida
<213> Nombre del organismo: virus PMC

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

Secuencia
<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 222
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 18
Descripción de la secuencia: proteína E0
<213> Nombre del organismo: virus PMC

```
TNVTQWNLWD NKSTTDIHSV MFSRGIKRSL HGIWPTQICK GIPTHLAADY ELKRIHGMVD      60
ASPMTNFTCC RLQRHEWNKH GWCNWYNIEP WINLMNNTQG LLNTGDNFTE CAVTCRYDAD     120
LGVNIVTQAR TTPTILTGCK KGHNFSFSGE VRASPCNFEL TAEDLLRIMD HTNCEGFTYF     180
GEGIVDGYTE VVEKARSSGF RALTWLSSKI ENTKKKIFGA EA                        222
```

Secuencia
<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 196
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 19
Descripción de la secuencia: proteína E1
<213> Nombre del organismo: Virus PMC

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

Secuencia
<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 377
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 20
Descripción de la secuencia: proteína E2
<213> Nombre del organismo: Virus PMC

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

Secuencia
<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 72
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 21
Descripción de la secuencia: proteína P7
<213> Nombre del organismo: Virus PMC

```
DENIVAQAEA LVIGNILMSL DLEIISCFLL LLIVVKKQAV RRTLALLFHW ITMNPFQSVM      60
ITVVYFVGLV RA                                                         72
```

Secuencia
<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 468
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 22
Descripción de la secuencia: proteína NS2
<213> Nombre del organismo: Virus PMC

```
EEGTKEGSTS GPPIHVVAIL LFLLYHTVKY KDFNIAMILL ITLSLKSSSY IHTSLYEIPL      60
LVAVISLTCS IYIFDLQVKS KLVAPTIGII GVTLAMRVLW LVRQMTIPTP SVSISLIDPK     120
MVIILYLISL TITVNHNLDL ASYCLKLGPF ILSFLTMWVD VVILLLMLPW YELVKVYYLK     180
KKKEDVETWF QNSGISTQET SPYGFDFSSP GEGVHTLPMQ NKTKFCRTAY MTVLRALVIT     240
AISSVWKPII LAELLIEAVY WTHIKIAKEL AGSSRFVARF IASIIELNWA MDEKEASRYK     300
RFYLLSSKIT DLMVKHKIQN ETVKSWFEET EIFGIQKVAM VIRAHSLSLE PNAILCSVCE     360
EKQNQKAKRP CPKCGSRGTQ IKCGLTLAEF EEEHYKKIYI LEGQDETPMR KEERQQVTYV     420
SRGALFLRNL PILASKNKYL LVGNLGMELQ DLESMGWIIR GPAVCKKI                   468
```

Secuencia
<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 676
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 23
Descripción de la secuencia: proteína NS3
<213> Nombre del organismo: Virus PMC

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

Secuencia
<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 63
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 24
Descripción de la secuencia: proteína NS4A
<213> Nombre del organismo: Virus PMC

```
AGETALLIAL LGWVGYEALV KRHVPMVTDI YTLEDEKLED TTHLQFAPDD LNNSDTIELQ      60
DLS                                                                    63
```

Secuencia
<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 347
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 25
Descripción de la secuencia: proteína NS4B
<213> Nombre del organismo: Virus PMC

```
NHQIQQILEG GKEYVGQAYQ FLRLQAERAA NSDKGKKAMA AAPLLAHKFL EYLQEHAGDI      60
KKYGLWGVHT ALYNSIKERL GHETAFASLV IKWIAFSSDG VPGMIKQAAV DLVVYYIINR     120
PEYQGDKETQ NAGRQFVGSL FVSCLAEYTF KNFNKSALEG LIEPALSYLP YASSALKLFL     180
PTRLESVVIL STTIYRTYLS IRKGSSQGLA GLAVSSAMEI MNQNPISVAI ALALGVGAIA     240
AHNAIESSEA KRTLLMKVFV KNFLDQAATD ELVKENPEKI IMAVFEGIQT AGNPLRLVYH     300
LYAMFYKGWT AAEIAEKTAG RNIFVLTIFE GLEMLGLDAD SKWRNLS                   347
```

Secuencia
<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 505
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 26
Descripción de la secuencia: proteína NS5A
<213> Nombre del organismo: Virus PMC

```
SNYLIDAVKK IIEKMTKTAT SFTYSFLKSL LPAPFSCTKS ERDPRIGWPQ KDYDYLEVRC      60
ACGYNRRAIK RDSGPVLWET LEETGPEYCH NRGERGLSNV KTTRCFVQGE EIPPIALRKG     120
VGEMLVKGVS FRIDFDKDKI LSTDKWKVPH RAVTSIFEDW QGIGYREAYL GTKPDYGGLV     180
PRSCVTVTKQ GLTFLKTARG MAFTTDLTIQ NIKMLIATCF KNKVKEGEIP ATIEGETWIN     240
IPLVNEDTGT IKPSFGERVI PEPYEEDPLE GPSVIVETGG IAINQIGVNP QSSTCGTVFT     300
AVKDLCQTVS NKAKNIKIGF SEGQYPGPGV AKKTLNQLIQ DEDPKPFIFV CGSDKSMSNR     360
AKTARNIKRI TTTTPEKFRD LAKNKKLIIV LLGDRYHEDI EKYADFKGTF LTRQTLEALA     420
SAKAVEKDMT KKEAARVLAM EEKDELELPG WLHTDAPKFL DITKDNITHH LIGDMQSLRE     480
RAGEIGAKAT TQITKKGSVY TINLS                                           505
```

Secuencia
<212> Tipo: PRT
<211> Longitud: 693
Nombre de la secuencia: SEC ID Nº: 27
Descripción de la secuencia: proteína NS5B
<213> Nombre del organismo: Virus PMC

```
TWWESERLAS LEPLFRELLS KCRPVDRETY KNCHFATAAQ LAGGNWVPVA PVVHLGEIPV      60
KKKKTLPYEA YKLLKEMVDS EKEFHKPVSR EKHQWILNKV KTGGDLGLKN LVCPGRVGEP     120
ILREKKKFNI YNKRITSTML SVGIRPEKLP VVRAQTSTKE FHEAIRDKID KKANTQTPGL     180
HKELLEIFNS ICAIPELRNT YKEVDWDVLT SGINRKGAAG YFEKMNIGEI IDSDKKSVEQ     240
LIKRMKSGLE FNYYETAIPK NEKRAVVDDW MEGDYVEEKR PRVIQYPEAK MRLAITKVMY     300
NWVKQKPIVI PGYEGKTPLF HVFDKVHKEW KNFNSPVAVS FDTKAWDTQV TPKDLLLISE     360
IQKYYYKKEY HRFIDNLTEK MVEVPVVCED GNVYIREGQR GSGQPDTSAG NSMLNVLTMI     420
YAFCKANSIP YSAFHRVAKI HVCGDDGFLI TEKSFGEAFA IKGPQILMEA GKPQKLIGEF     480
GLKLAYKFDD IEFCSHTPIK VRWADNNTSY MPGRDTATIL AKMATRLDSS GERGTEGYEL     540
AVAFSFLLMY SWNPLVRRIC LLVMSTIDTK EASQNNTIYT FRGDPIGAYT EVIGYRLDQL     600
KQTEFSKLAQ LNLSMAILQI YNKNTTKRLI EDCVKLGNQN KQILVNADRL ISKKTGYTYE     660
PTAGHTKIGK HYEEINLLKD TPQKTVYQGT ERY                                  693
```

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Intervet International BV

<120> ESPECIES DE PESTIVIRUS

<130> 2006-042-EP-D2

<150> AU2006902089
<151> 21/04/2006

<160> 86

<170> SeqWin99

<210> 1
<211> 12077
<212> ADN
<213> Pestivirus Bungowannah

<220>
<221> 5'UTR
<222> <1...418>
<223> 5' UTR

<220>
<221> gen
<222> <419...922>
<223> Npro

<220>
<221> gen
<222> <923...1219>
<223> Cápsida

<220>
<221> gen
<222> <1220...1885>
<223> E0

<220>
<221> gen
<222> <1886...2473>
<223> E1

<220>
<221> gen
<222> <2474...3604>
<223> E2

<220>
<221> gen

<222> <3605...3820>
<223> P7

<220>
<221> gen
<222> <3821...5224>
<223> NS2

<220>
<221> gen
<222> <5225...7252>
<223> NS3

<220>
<221> gen
<222> <7253...7441>
<223> NS4A

<220>
<221> gen
<222> <7442...8482>
<223> NS4B

<220>
<221> gen
<222> <8483...9997>
<223> NS5A

<220>
<221> gen
<222> <9998...12077>
<223> NS5B

<400> 1

```
gtataacgac agtagttcaa gtgtcgttat gcatcattgg ccataacaaa ttatctaatt   60
tggaataggg acctgcgacc tgtacgaagg ccgagcgtcg gtagccattc cgactagtag  120
gactagtaca aataggtcaa ctggttgagc aggtgagtgt gctgcagcgg ctaagcggtg  180
agtacaccgt attcgtcaac aggtgctact ggaaaggatc acccactagc gatgcctgtg  240
tggacgagga catgtccaag ccaatgttat cagtagcggg ggtcgttact gagaaagctg  300
cccagaatgg gtagttgcac atacagtctg ataggatgcc ggcggatgcc ctgtattttg  360
accagtataa atattatccg ttgtaaagca tatgaatact tttacttta atacatatgg   420
agggagtgag gaaggaaaca tgttctttag aactgcaccc acgccgccac cagggtgcca  480
agaaccggtt tacacaagca caatgagacc aatttttggc gaaccccatc cacctctaca  540
caaacacagc acgttaaaat tgccacattg gaggggggatc aaaacaatta gagttaagaa  600
gagagaattg ccaaagaagg gcgattgtag caactcaaca acagctccca cttcgggggt  660
gtacgttgaa ttaggggctg tgttctataa agattacacg ggcacggtat accatcgtgt  720
accgctagaa ctttgtacaa accaagagag gtgcgaggga tccaagtgtg tagggagaat  780
gacagggtct gatggcaggt tgtacaacgt tttagtatgt ccggacgatt gtatcctctt  840
tgagagacac tgtagaggtc aaacagtcgt cctgaaatgg atttccaacc ccttgacatc  900
accactttgg gtccagagtt gttctgacga caaaggagca aaacccaagg tgaaaccaaa  960
agacgacagg atgaagcaag gaaaaatagt gacaaagcct aaagagactg aagcagatca 1020
aaaaactaga ccaccagatg ccacgatagt ggttgacggg cagaagtatc aggtgaggaa 1080
gaaggggaaa gcgaaaccca agactcaaga cggcttatac cacaacaaga acaaaccaga 1140
agcgtccagg aagaagcttg agaaggcctt gctagcatgg gcaatattag cctgcctatt 1200
ggtggtaccg gtagggtcca ccaacgtgac acaatggaac ttatgggaca ataaaagtac 1260
tacagacata catagcgtca tgttttctag agggattaaa aggagtctgc atggaatttg 1320
gcccacacaa atctgcaaag ggatcgctac acatctagca gcagactatg aactgaaaag 1380
gattcacggg atggtggatg caagccccat gaccaacttc acatgttgta ggctacagag 1440
acatgagtgg aacaagcatg ggtggtgcaa ctggtacaat atagagccgt ggatcaatct 1500
catgaataat acccaaggac tattaaacac tggagacaat ttcactgagt gcgcagtcac 1560
atgcaggtat gatgcagact taggggtgaa tatagtgact caagccagga ctactccaac 1620
tatcctgact ggctgtaaga aagggcacaa cttctctttc tcaggggagg tcagggcctc 1680
accctgcaac tttgagttaa ctgctgaaga cttgctcagg atcatggatc acaccaactg 1740
cgagggattt acctacttcg gggaaggaat cgttgacggt tacaccgagg tagtagagaa 1800
ggccaggtca agtggtttca gggctctcac atggttgtcg agtaagattg aaaacaccaa 1860
gaaaaaaata ttcggagctg aagccagtcc ttactgccca gtggctaaga gggtcttcaa 1920
cattatttat accaacaatt gcaccccgct tggactgcca gataagtcaa aaattatagg 1980
accaggaacc tttgacatca gtggcaggga tgaattcata tttccaaaac tcccctacca 2040
cgtagatgac ttcattctac tgagcttaat tgcaatgtct gattttgctc cagagacatc 2100
aagtataatc tacctggctt tgcactacct aatgccaagt aatgacaaca gggacttcgt 2160
gatggacctg gacccaaata aactaaacct tactgcaact aaatccgtgg caagtgtggt 2220
ccctacatcg gtgaatgtgt taggtgaatg ggtgtgcgtc aaaccaagtt ggtggcctta 2280
ttccgccgaa atcactaatc tgataggagg tgtcatcacc gtggcagact tagttatcaa 2340
```

gaccattgaa gaattgctaa atttgtggac cgaagcaaca gctgtggcat ttctggctgc 2400
tctaataaaa atttttagag gccagccgat ccaagcggta gcatggttaa tcatcatagg 2460
gggagcacaa gcccaaacct gcaaccctga attcatgtac gcattagcga aaaataccag 2520
cataggttca ttaggaccag aatcactgac gacaaggtgg taccaactaa ccagcggttt 2580
caaactcact gacagcacga ttgaagtcac ctgtgtgggt gctaacatga ggattcatgt 2640
agtgtgccca cttgtaagtg acagatattt ggccataaac caccctagag cactgccaac 2700
aacggcgtgg ttcaggaaaa tacacactca gcatgaggta ccaagagaaa gaatcatgag 2760
tgagtcaaaa aggaggtaca cttgtccttg tggttctaaa ccagtggtga ggtcaacaac 2820
acaattcaac ccaatatcta tatctacccc aagctttgaa cttgaatgcc ctaggggttg 2880
gactggggct gtagagtgta cactagtctc cccatcaact ctgacaacag agactatatt 2940
cacatacagg aagcccaaac cattcggact tgaaaactgg tgcaagtata cagtggtgga 3000
gaaagggatc ctgtattctt gtaaatttgg gggcaattca acatgcatca aagggcttat 3060
agttaaaggg caacgggaag acaaagtaag gtactgtgaa tggtgtggtt ataagttcag 3120
ttcaccaaat ggactgcctc agtatccact gggattgtgt gagaaagaac aatcagaagg 3180
actcagggat tatggtgact tcccatgctg caacaacggc acttgtattg acaaagaagg 3240
tagtgtgcaa tgctacatag gggataagaa agttaccgtg aagctgtata atgcctcact 3300
attggccccc atgccctgca aacccatagt gtataactcc caggggcccc cagcgcctaa 3360
gacctgcact tataggtggg cctcaacatt agaaaataaa tattatgaac ccagggacag 3420
ctactaccag caatacatta taaagtcagg gtatcaatat tggtttgatc tcacagcaaa 3480
ggatcatgtg gcagactgga tcacaaaata ctttccaata ataatagtgg ccttgttagg 3540
gggcagaggc accttgtggg tgttgatagc ttatgagttg ctaactcagt atgaggtagt 3600
aggagacgag aacatagtgg ctcaagctga agccctggta atcggaaaca tcttgatgag 3660
tttagactta gagataatta gctgcttcct tctgttgttg atcgtggtga aaaaacaagc 3720
tgtcaggaga acgttggctt tactgtttca ttggataact atgaacccat tccagtcagt 3780
aatgatcaca gtggtctact tcgtcggttt ggtgagggcc gaagagggaa ctaaagaggg 3840
tagtacaagc gggccaccaa tccatgtagt tgcaatactg ttattcctct tgtaccacac 3900
agtgaagtat aaggacttta acatagcaat gatcttactt ataacattgt ccctgaaaag 3960
ctcatcctac atacatacca gcttgtatga aattccattg cttgtggctg taataagtct 4020
cacatgctcc atatacattt ttgacttgca ggtaaagagc aagctagtgg ccccaactat 4080
aggtataatt ggagttaccc tagcaatgag agttttgtgg ctggtaaggc aaatgactat 4140
accaaccccc tctgtgtcca ttagtctgat agatccaaag atggtcataa tactctactt 4200
gatatcccta actattacag tcaatcacaa cctagaccta gcaagttatt gcttgaaact 4260
gggacctttt atcctatcat tcctaacaat gtgggtggat gttgtcatcc tcctgctcat 4320
gctgccttgg tacgaactag taaaagtcta ctacctaaaa aagaagaaag aggatgtgga 4380
aacatggttc caaaattcag gaatatccac ccaagaaact tccccatacg gatttgattt 4440
ttctagcccc ggggagggag tgcacacact accaatgcaa aataaaacca aattttgtag 4500
gactgcttac atgactgtac taagggcttt ggtgataaca gccatcagca gtgtctggaa 4560
accaataatt ttagcagaac tcctaataga ggcagtgtat tggacacaca ttaaaatagc 4620
caaagaattg gcggggtcaa gcaggttcgt tgctaggttc attgcatcta ttatagagtt 4680
gaattgggcc atggacgaaa aagaagcatc tcggtacaaa agattttacc tattatcatc 4740
caaaataaca gatctaatgg ttaagcacaa aatccaaaat gagacagtaa aatcctggtt 4800
tgaagaaact gaaatatttg gaatacaaaa agtggcaatg gtgataaggg ctcattctct 4860
gagtttggag ccaaatgcca tcctttgctc cgtttgtgaa gaaaaacaaa atcaaaaagc 4920
caaaaggccc tgccctaagt gtggtagtag aggcactcaa ataaagtgtg ggctgacact 4980
ggccgagttt gaggaagaac attacaaaaa aatatacatc ctcgaaggcc aagatgaaac 5040
tcccatgagg aaagaagaaa gacagcaagt aacttatgtc tctaggggtg ctctgttcct 5100
taggaatctt cctatcttag cttcaaaaaa caaataccta cttgtaggca atctgggtat 5160
ggaattgcaa gatttggaaa gtatgggatg gatcattcga gggccagccg tctgcaagaa 5220
gataatacac catgagaaat gcaggccttc aataccagac aaactcatgg cattcttcgg 5280
gattatgcct aggggagtta caccaagagc ccctacacgg ttccctgtgt ccttgctgaa 5340
gataagacgg ggttttgaga ccggctgggc ctacacacac cctggagggg taagtagtgt 5400
gatgcatgtc accgctgggt cggatatata tgtcaatgac tcaataggga ggacaaaaat 5460
ccagtgccaa gacaaaaaca ctacaacaga tgagtgtgaa tatggtgtga aaacagactc 5520
agggtgctct gatggagctc ggtgctatgt catcaaccct gaagcaacca acatagcagg 5580
gaccaagggg gccatggtac acctgaggaa agctggagga gagttcaact gcgtgactgc 5640
ccagggtacc cccgccttct ataatctaaa gaacttaaaa ggatggtcag gcctgcctat 5700
ctttgaagct gccacaggaa gagtggtagg aagggtaaaa gcaggaaaaa acactgacaa 5760
tgctccaaca accattatgt cagggacgca agtggcaaaa ccatcagagt gtgacctaga 5820
atcagtggtg aggaaactag agacaatgaa cagaggggaa ttcaaacaag tgactctggc 5880
tacaggcgca ggaaagacaa ccatgctacc aaagctgtta atagaatcca taggcaggca 5940
taagagagtg ttagtactga tcccgttgag agctgcagcg gagggggtgt accagtacat 6000
gagaaccaaa cacccaagca tatctttcaa cttgaggata ggggatctga aagaaggtga 6060
catggcaact gggatcacct atgcctctta tgggtacttc tgccaaatgg acatgcctag 6120

actggagaat gcaatgaagg aataccacta tattttcttg gatgaatatc actgtgccac 6180
accagaacag ttggcagtga tgtcaaaaat acataggttc ggtgaatcag ttagggtaat 6240
agccatgacc gccacgccat ccgggactgt gagcacaaca gggcagaaat tcacaattga 6300
ggaggtggta gtacctgaag tgatgaaggg ggaggacctt gctgatgatt acatcgaaat 6360
agcagggttg aaggtgccaa agaaagagtt agagggtaac gtactgactt ttgtgcctac 6420
aaggaagatg gcatcggaaa cagcaaaaaa attaaccaca cagggataca atgctggata 6480
ctacttcagt ggagaagatc catcatccct gcggacaact acttctaagt caccatatat 6540
agtagttgca accaatgcca ttgaatccgg ggtaacctta ccggaccttg atacagtaat 6600
agatacaggc atgaagtgtg aaaagagact aagaatcgaa aacaaagctc cctacatcgt 6660
aacaggactg aaaagaatgg ctataacaac gggggagcaa gctcaaagaa aaggtagggt 6720
aggcagggtt aaacctggga ggtacttgag aggacctgaa aacactgcag gtgaaaagga 6780
ctatcactat gacctttac aggcacagag gtacggcatc caagactcaa taaacatcac 6840
caagtctttc agggagatga actatgattg ggcattatat gaggaagacc cgttaaagat 6900
tgcccaatta gagttgctaa acacactcct gatctcaagg gatctgccag tagtaacaaa 6960
aaatctgatg gcccgcacaa cacatcccga acctatacaa ttggcttaca atagtttaga 7020
aacccctgta ccggtggcat tcccaaaagt gaaaaatgga gaagtcactg acgcacatga 7080
aacttacgag ttgatgacct gtaggaagct tgagaaagac ccccctatat acctgtatgc 7140
aacagaagaa gaagatctcg tagtggacat actgggattg aaatggccag acgccacaga 7200
gagggctgtc ttggaagtgc aagacgccct gggccagatc acaggtttat ctgcagggga 7260
gacagcttta ctcatagccc tattagggtg ggtgggctac gaagccttgg tgaagaggca 7320
cgtgcctatg gtgacagaca tatacaccct agaagatgaa aaattggaag acactacaca 7380
cctacaattt gccccagatg atctgaacaa ttcagatacc attgagctcc aagacttatc 7440
gaatcaccaa atccaacaaa ttctagaagg tgggaaggaa tatgtcggcc aagcctacca 7500
attcctcagg ttgcaagctg agagggctgc caactcagac aaaggcaaga aagcaatggc 7560
agcggcccca ttactagccc acaagttcct ggaatacttg caagagcatg caggtgacat 7620
aaagaagtat ggtctatggg gggtccacac agcattgtat aacagcataa aagaaagact 7680
gggtcacgaa actgcattcg catctctggt tataaaatgg attgcctttt cctcagatgg 7740
agtcccgggg atgattaagc aagcagcagt agacttggtg gtatactata taatcaacag 7800
gcctgagtat caaggggata aggagacaca gaatgcaggt agacaatttg ttggctccct 7860
ttttgtttca tgtctagcag agtacacatt caaaaacttc aataaatcag cattagaagg 7920
attgatcgag cctgccttaa gctatctacc ctacgcttca agcgcactaa agttattcct 7980
accgactaga cttgaaagtg tagtgatact gtccactact atatacagaa catacttatc 8040
aatcaggaaa ggatctagtc agggtttagc cgggctggca gttagctcag cgatggagat 8100
catgaaccag aacccaatca gcgtggctat tgcactggca ctaggagtcg gagcaatagc 8160
ggcacataat gccattgaga gcagtgaggc aaaaaggact ctcctgatga aggtctttgt 8220
taagaacttt ttggaccaag cagccactga tgagcttgtg aaagagaacc ctgagaagat 8280
cataatggca gtgtttgagg gcattcaaac agctggaaat ccattgagac ttgtatacca 8340
tctatatgca atgttctaca aagggtggac tgccgcggaa atagctgaaa aaaccgctgg 8400
taggaacatt tttgtgttaa caatatttga aggattggaa atgttaggcc tggatgccga 8460
ctcaaaatgg agaaatctga gctctaatta tcttattgat gcagtgaaga aaatcattga 8520
aaaaatgact aaaacagcaa caagcttcac ctacagcttt ttgaaatctt tgcttcctgc 8580
ccccttctcg tgtactaaat cagaaagaga tccaagaata gggtggcccc aaaaagacta 8640
cgactacctc gaggtccgat gcgcttgtgg gtataacagg agagctataa aaagagactc 8700
aggacctgtg ttatgggaga ccttagagga gacgggtcca gagtactgcc acaacagagg 8760
tgaaaggggg ctcagcaatg tgaagactac tagatgcttt gtccaaggag aggaaatccc 8820
tccaattgca ctgaggaaag gagtaggtga gatgttggtc aagggtgttt cattcagaat 8880
agattttgat aaagacaaga tactttcaac agacaagtgg aaggtaccac atagggcagt 8940
tacatcaatc tttgaggatt ggcagggtat tggttacaga gaggcttacc tagggaccaa 9000
accagactat gggggtctgg tgcccagatc ttgtgtaact gtaacaaaac aagggttaac 9060
attcttgaaa actgccagag gcatggcttt cacgactgac ctgaccatcc agaacatcaa 9120
aatgctgata gctacatgct tcaagaacaa ggtgaaggaa ggggagatac cagctacgat 9180
tgaaggggaa acatggatca acataccact agtgaatgag gacaccggga ccattaaacc 9240
aagcttcggg gaaagagtga ttcccgaacc atatgaggag gacccacttg aaggcccaag 9300
tgtaatcgtt gaaacaggag gcatagccat caaccaaata ggggtcaatc cacaatccag 9360
tacatgtgga acagttttta cagcagtgaa ggatctgtgc caaacagtta gtaataaagc 9420
caagaatatc aaaattgggt tttcggaagg ccaataccca ggtccagggg ttgcaaagaa 9480
gacactgaac cagctcatac aagatgaaga cccaaaacca ttcatatttg tttgtggctc 9540
tgacaagtca atgtctaatc gggcaaaaac tgcgaggaac atcaagagaa tcaccaccac 9600
aacacctgag aaattcagag acttggcaaa aaacaagaaa ttgataattg tgctgttagg 9660
tgatagatac catgaagata tagaaaagta tgcagacttc aagggcacct tcttgaccag 9720
acaaaccttg gaagcactag caagtgccaa agctgtagag aaggacatga ccaagaaaga 9780
agcagcaaga gtattggcaa tggaagaaaa ggatgaacta gaactcccag ggtggctgca 9840
tacagatgca cccaaattcc tagacattac taaggacaac atcacacatc acctaatagg 9900

ggacatgcag agtctgagag aaagagcagg ggagatagga gcaaaggcca ccactcaaat 9960
cactaagaaa gggagtgtat acacaatcaa tctgagtacg tggtgggagt cagagaggtt 10020
ggcatctttg gaacctttgt tccgggaact actatctaaa tgcaggccag tggacaggga 10080
gacatataag aattgtcatt ttgcaacagc agcccaactt gccggaggaa actgggtacc 10140
ggtagcacca gttgtacatc ttggggaaat tccggtaaag aagaaaaaga ctctccccta 10200
cgaggcatac aagctcctaa aagagatggt tgactcggag aaggaattcc ataaaccagt 10260
gagcagggaa aaacaccaat ggatactgaa caaagtgaaa actggtggtg acctcggctt 10320
aaaaaatcta gtatgtccag gtagggttgg agaaccaatc ctaagagaga agaagaaatt 10380
caacatttac aacaagagga ttaccagtac tatgttatca gtagggataa ggccagaaaa 10440
attgccagtg gtaagagccc agaccagtac caaagaattt catgaagcaa taagggacaa 10500
aatagacaaa aaagcaaaca cacagacccc aggcctacac aaagaattgt tggagatatt 10560
caactcaata tgtgccatcc ccgaacttag aaatacctac aaagaggttg attgggacgt 10620
tctaacctca ggcataaata ggaaaggtgc agccgggtac ttcgaaaaaa tgaacatagg 10680
ggagatcata gatagtgaca aaaaatcagt ggaacaactc ataaagagaa tgaaatcagg 10740
gctagaattc aactactatg agactgcaat accaaaaaat gagaagaggg cagtggtaga 10800
tgattggatg gaaggtgact atgtagaaga aaaaagacca agagtcatac agtatcctga 10860
ggcaaagatg agattagcta taaccaaagt aatgtataac tgggtcaagc agaagcctat 10920
agtaatccct ggatacgaag gtaagactcc tttgtttcat gttttcgaca aggtccacaa 10980
agaatggaaa aatttcaaca gtccagttgc agtcagtttt gacactaaag cctgggacac 11040
acaagtaaca cccaaagacc ttctcctcat atcagaaatc caaaagtatt attacaagaa 11100
agaataccat agattcatag ataatttgac cgagaaaatg gtggaggtac cagtggtttg 11160
tgaagacgga aacgtctaca taagagaagg tcagagggga agtggtcaac cagacactag 11220
cgcaggtaat agtatgttga atgtactgac tatgatatat gccttctgca aagctaactc 11280
catcccttac tcagccttcc acagggtagc aaagatacat gtgtgtggag atgatggttt 11340
cttgataact gagaaaagtt ttggtgaggc ctttgcgatc aaggggcctc aaattttgat 11400
ggaagcagga aaaccacaaa aacttatagg tgaatttgga ctgaaattgg catataaatt 11460
tgatgacatt gaattttgct cgcatacacc aataaaggtc aggtgggctg acaacaacac 11520
atcatacatg cccggaagag acacagctac cattctagct aaaatggcaa cccgccttga 11580
ctctagtggg gagaggggga ccgagggata cgagctggcc gtggccttca gtttcttact 11640
aatgtattct tggaaccccc tggtaagaag aatatgcctg cttgtcatgt ctacaattga 11700
cacaaaagaa gctagccaaa ataacactat atatacattt agggggggatc ccataggtgc 11760
ctacacagag gtaattgggt ataggctgga ccaactaaaa cagacagagt tctctaaatt 11820
ggctcagctg aatttgtcaa tggcaatact tcaaatatac aataaaaaca caaccaagag 11880
actcatcgaa gattgtgtga aacttggcaa ccaaaataag caaatattgg tgaatgcaga 11940
ccgtttgatc agcaagaaaa cgggctacac atatgagcca acagctggcc acactaagat 12000
aggcaagcac tatgaagaaa tcaacctgct gaaagataca ccacaaaaaa ctgtctacca 12060
aggaactgaa aggtata 12077

<210> 2
<211> 3886
<212> PRT
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 2

```
Gly Gly Ser Glu Glu Gly Asn Met Phe Phe Arg Thr Ala Pro Thr Pro
1               5                  10                  15

Pro Pro Gly Cys Gln Glu Pro Val Tyr Thr Ser Thr Met Arg Pro Ile
            20                  25                  30

Phe Gly Glu Pro His Pro Pro Leu His Lys His Ser Thr Leu Lys Leu
        35                  40                  45

Pro His Trp Arg Gly Ile Lys Thr Ile Arg Val Lys Lys Arg Glu Leu
    50                  55                  60

Pro Lys Lys Gly Asp Cys Ser Asn Ser Thr Thr Ala Pro Thr Ser Gly
65                  70                  75                  80

Val Tyr Val Glu Leu Gly Ala Val Phe Tyr Lys Asp Tyr Thr Gly Thr
                85                  90                  95

Val Tyr His Arg Val Pro Leu Glu Leu Cys Thr Asn Gln Glu Arg Cys
```

```
            100                 105                 110

Glu Gly Ser Lys Cys Val Gly Arg Met Thr Gly Ser Asp Gly Arg Leu
        115                 120                 125

Tyr Asn Val Leu Val Cys Pro Asp Asp Cys Ile Leu Phe Glu Arg His
    130                 135                 140

Cys Arg Gly Gln Thr Val Val Leu Lys Trp Ile Ser Asn Pro Leu Thr
145                 150                 155                 160

Ser Pro Leu Trp Val Gln Ser Cys Ser Asp Asp Lys Gly Ala Lys Pro
                165                 170                 175

Lys Val Lys Pro Lys Asp Asp Arg Met Lys Gln Gly Lys Ile Val Thr
            180                 185                 190

Lys Pro Lys Glu Thr Glu Ala Asp Gln Lys Thr Arg Pro Pro Asp Ala
        195                 200                 205

Thr Ile Val Val Asp Gly Gln Lys Tyr Gln Val Arg Lys Lys Gly Lys
    210                 215                 220

Ala Lys Pro Lys Thr Gln Asp Gly Leu Tyr His Asn Lys Asn Lys Pro
225                 230                 235                 240

Glu Ala Ser Arg Lys Lys Leu Glu Lys Ala Leu Leu Ala Trp Ala Ile
                245                 250                 255

Leu Ala Cys Leu Leu Val Val Pro Val Gly Ser Thr Asn Val Thr Gln
            260                 265                 270

Trp Asn Leu Trp Asp Asn Lys Ser Thr Thr Asp Ile His Ser Val Met
        275                 280                 285

Phe Ser Arg Gly Ile Lys Arg Ser Leu His Gly Ile Trp Pro Thr Gln
    290                 295                 300

Ile Cys Lys Gly Ile Pro Thr His Leu Ala Ala Asp Tyr Glu Leu Lys
305                 310                 315                 320

Arg Ile His Gly Met Val Asp Ala Ser Pro Met Thr Asn Phe Thr Cys
                325                 330                 335

Cys Arg Leu Gln Arg His Glu Trp Asn Lys His Gly Trp Cys Asn Trp
            340                 345                 350

Tyr Asn Ile Glu Pro Trp Ile Asn Leu Met Asn Asn Thr Gln Gly Leu
        355                 360                 365

Leu Asn Thr Gly Asp Asn Phe Thr Glu Cys Ala Val Thr Cys Arg Tyr
    370                 375                 380

Asp Ala Asp Leu Gly Val Asn Ile Val Thr Gln Ala Arg Thr Thr Pro
385                 390                 395                 400

Thr Ile Leu Thr Gly Cys Lys Lys Gly His Asn Phe Ser Phe Ser Gly
                405                 410                 415

Glu Val Arg Ala Ser Pro Cys Asn Phe Glu Leu Thr Ala Glu Asp Leu
            420                 425                 430

Leu Arg Ile Met Asp His Thr Asn Cys Glu Gly Phe Thr Tyr Phe Gly
```

```
        435                 440                 445

Glu Gly Ile Val Asp Gly Tyr Thr Glu Val Val Glu Lys Ala Arg Ser
    450                 455                 460

Ser Gly Phe Arg Ala Leu Thr Trp Leu Ser Ser Lys Ile Glu Asn Thr
465                 470                 475                 480

Lys Lys Lys Ile Phe Gly Ala Glu Ala Ser Pro Tyr Cys Pro Val Ala
                485                 490                 495

Lys Arg Val Phe Asn Ile Ile Tyr Thr Asn Asn Cys Thr Pro Leu Gly
            500                 505                 510

Leu Pro Asp Lys Ser Lys Ile Ile Gly Pro Gly Thr Phe Asp Ile Ser
        515                 520                 525

Gly Arg Asp Glu Phe Ile Phe Pro Lys Leu Pro Tyr His Val Asp Asp
    530                 535                 540

Phe Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Met Ser Asp Phe Ala Pro Glu Thr
545                 550                 555                 560

Ser Ser Ile Ile Tyr Leu Ala Leu His Tyr Leu Met Pro Ser Asn Asp
                565                 570                 575

Asn Arg Asp Phe Val Met Asp Leu Asp Pro Asn Lys Leu Asn Leu Thr
            580                 585                 590

Ala Thr Lys Ser Val Ala Ser Val Val Pro Thr Ser Val Asn Val Leu
        595                 600                 605

Gly Glu Trp Val Cys Val Lys Pro Ser Trp Trp Pro Tyr Ser Ala Glu
    610                 615                 620

Ile Thr Asn Leu Ile Gly Gly Val Ile Thr Val Ala Asp Leu Val Ile
625                 630                 635                 640

Lys Thr Ile Glu Glu Leu Leu Asn Leu Trp Thr Glu Ala Thr Ala Val
                645                 650                 655

Ala Phe Leu Ala Ala Leu Ile Lys Ile Phe Arg Gly Gln Pro Ile Gln
            660                 665                 670

Ala Val Ala Trp Leu Ile Ile Ile Gly Gly Ala Gln Ala Gln Thr Cys
        675                 680                 685

Asn Pro Glu Phe Met Tyr Ala Leu Ala Lys Asn Thr Ser Ile Gly Ser
    690                 695                 700

Leu Gly Pro Glu Ser Leu Thr Thr Arg Trp Tyr Gln Leu Thr Ser Gly
705                 710                 715                 720

Phe Lys Leu Thr Asp Ser Thr Ile Glu Val Thr Cys Val Gly Ala Asn
                725                 730                 735

Met Arg Ile His Val Val Cys Pro Leu Val Ser Asp Arg Tyr Leu Ala
            740                 745                 750

Ile Asn His Pro Arg Ala Leu Pro Thr Thr Ala Trp Phe Arg Lys Ile
        755                 760                 765

His Thr Gln His Glu Val Pro Arg Glu Arg Ile Met Ser Glu Ser Lys
```

```
    770                 775                 780

Arg Arg Tyr Thr Cys Pro Cys Gly Ser Lys Pro Val Val Arg Ser Thr
785                 790                 795                 800

Thr Gln Phe Asn Pro Ile Ser Ile Ser Thr Pro Ser Phe Glu Leu Glu
                805                 810                 815

Cys Pro Arg Gly Trp Thr Gly Ala Val Glu Cys Thr Leu Val Ser Pro
            820                 825                 830

Ser Thr Leu Thr Thr Glu Thr Ile Phe Thr Tyr Arg Lys Pro Lys Pro
        835                 840                 845

Phe Gly Leu Glu Asn Trp Cys Lys Tyr Thr Val Val Glu Lys Gly Ile
    850                 855                 860

Leu Tyr Ser Cys Lys Phe Gly Gly Asn Ser Thr Cys Ile Lys Gly Leu
865                 870                 875                 880

Ile Val Lys Gly Gln Arg Glu Asp Lys Val Arg Tyr Cys Glu Trp Cys
                885                 890                 895

Gly Tyr Lys Phe Ser Ser Pro Asn Gly Leu Pro Gln Tyr Pro Leu Gly
            900                 905                 910

Leu Cys Glu Lys Glu Gln Ser Glu Gly Leu Arg Asp Tyr Gly Asp Phe
        915                 920                 925

Pro Cys Cys Asn Asn Gly Thr Cys Ile Asp Lys Glu Gly Ser Val Gln
    930                 935                 940

Cys Tyr Ile Gly Asp Lys Lys Val Thr Val Lys Leu Tyr Asn Ala Ser
945                 950                 955                 960

Leu Leu Ala Pro Met Pro Cys Lys Pro Ile Val Tyr Asn Ser Gln Gly
                965                 970                 975

Pro Pro Ala Pro Lys Thr Cys Thr Tyr Arg Trp Ala Ser Thr Leu Glu
            980                 985                 990

Asn Lys Tyr Tyr Glu Pro Arg Asp Ser Tyr Tyr Gln Gln Tyr Ile Ile
        995                 1000                1005

Lys Ser Gly Tyr Gln Tyr Trp Phe Asp Leu Thr Ala Lys Asp His Val
    1010                1015                1020

Ala Asp Trp Ile Thr Lys Tyr Phe Pro Ile Ile Ile Val Ala Leu Leu
1025                1030                1035                1040

Gly Gly Arg Gly Thr Leu Trp Val Leu Ile Ala Tyr Glu Leu Leu Thr
                1045                1050                1055

Gln Tyr Glu Val Val Gly Asp Glu Asn Ile Val Ala Gln Ala Glu Ala
            1060                1065                1070

Leu Val Ile Gly Asn Ile Leu Met Ser Leu Asp Leu Glu Ile Ile Ser
        1075                1080                1085

Cys Phe Leu Leu Leu Leu Ile Val Val Lys Lys Gln Ala Val Arg Arg
    1090                1095                1100

Thr Leu Ala Leu Leu Phe His Trp Ile Thr Met Asn Pro Phe Gln Ser
```

```
1105                1110                1115                1120

Val Met Ile Thr Val Val Tyr Phe Val Gly Leu Val Arg Ala Glu Glu
                1125                1130                1135

Gly Thr Lys Glu Gly Ser Thr Ser Gly Pro Pro Ile His Val Val Ala
            1140                1145                1150

Ile Leu Leu Phe Leu Leu Tyr His Thr Val Lys Tyr Lys Asp Phe Asn
        1155                1160                1165

Ile Ala Met Ile Leu Leu Ile Thr Leu Ser Leu Lys Ser Ser Ser Tyr
    1170                1175                1180

Ile His Thr Ser Leu Tyr Glu Ile Pro Leu Leu Val Ala Val Ile Ser
1185                1190                1195                1200

Leu Thr Cys Ser Ile Tyr Ile Phe Asp Leu Gln Val Lys Ser Lys Leu
                1205                1210                1215

Val Ala Pro Thr Ile Gly Ile Ile Gly Val Thr Leu Ala Met Arg Val
            1220                1225                1230

Leu Trp Leu Val Arg Gln Met Thr Ile Pro Thr Pro Ser Val Ser Ile
        1235                1240                1245

Ser Leu Ile Asp Pro Lys Met Val Ile Ile Leu Tyr Leu Ile Ser Leu
    1250                1255                1260

Thr Ile Thr Val Asn His Asn Leu Asp Leu Ala Ser Tyr Cys Leu Lys
1265                1270                1275                1280

Leu Gly Pro Phe Ile Leu Ser Phe Leu Thr Met Trp Val Asp Val Val
                1285                1290                1295

Ile Leu Leu Leu Met Leu Pro Trp Tyr Glu Leu Val Lys Val Tyr Tyr
            1300                1305                1310

Leu Lys Lys Lys Lys Glu Asp Val Glu Thr Trp Phe Gln Asn Ser Gly
        1315                1320                1325

Ile Ser Thr Gln Glu Thr Ser Pro Tyr Gly Phe Asp Phe Ser Ser Pro
    1330                1335                1340

Gly Glu Gly Val His Thr Leu Pro Met Gln Asn Lys Thr Lys Phe Cys
1345                1350                1355                1360

Arg Thr Ala Tyr Met Thr Val Leu Arg Ala Leu Val Ile Thr Ala Ile
                1365                1370                1375

Ser Ser Val Trp Lys Pro Ile Ile Leu Ala Glu Leu Leu Ile Glu Ala
            1380                1385                1390

Val Tyr Trp Thr His Ile Lys Ile Ala Lys Glu Leu Ala Gly Ser Ser
        1395                1400                1405

Arg Phe Val Ala Arg Phe Ile Ala Ser Ile Ile Glu Leu Asn Trp Ala
    1410                1415                1420

Met Asp Glu Lys Glu Ala Ser Arg Tyr Lys Arg Phe Tyr Leu Leu Ser
1425                1430                1435                1440

Ser Lys Ile Thr Asp Leu Met Val Lys His Lys Ile Gln Asn Glu Thr
```

```
                1445                1450                1455

Val Lys Ser Trp Phe Glu Glu Thr Glu Ile Phe Gly Ile Gln Lys Val
            1460                1465                1470

Ala Met Val Ile Arg Ala His Ser Leu Ser Leu Glu Pro Asn Ala Ile
        1475                1480                1485

Leu Cys Ser Val Cys Glu Glu Lys Gln Asn Gln Lys Ala Lys Arg Pro
    1490                1495                1500

Cys Pro Lys Cys Gly Ser Arg Gly Thr Gln Ile Lys Cys Gly Leu Thr
1505                1510                1515                1520

Leu Ala Glu Phe Glu Glu Glu His Tyr Lys Lys Ile Tyr Ile Leu Glu
                1525                1530                1535

Gly Gln Asp Glu Thr Pro Met Arg Lys Glu Glu Arg Gln Gln Val Thr
            1540                1545                1550

Tyr Val Ser Arg Gly Ala Leu Phe Leu Arg Asn Leu Pro Ile Leu Ala
        1555                1560                1565

Ser Lys Asn Lys Tyr Leu Leu Val Gly Asn Leu Gly Met Glu Leu Gln
    1570                1575                1580

Asp Leu Glu Ser Met Gly Trp Ile Ile Arg Gly Pro Ala Val Cys Lys
1585                1590                1595                1600

Lys Ile Ile His His Glu Lys Cys Arg Pro Ser Ile Pro Asp Lys Leu
                1605                1610                1615

Met Ala Phe Phe Gly Ile Met Pro Arg Gly Val Thr Pro Arg Ala Pro
            1620                1625                1630

Thr Arg Phe Pro Val Ser Leu Leu Lys Ile Arg Arg Gly Phe Glu Thr
        1635                1640                1645

Gly Trp Ala Tyr Thr His Pro Gly Gly Val Ser Ser Val Met His Val
    1650                1655                1660

Thr Ala Gly Ser Asp Ile Tyr Val Asn Asp Ser Ile Gly Arg Thr Lys
1665                1670                1675                1680

Ile Gln Cys Gln Asp Lys Asn Thr Thr Thr Asp Glu Cys Glu Tyr Gly
                1685                1690                1695

Val Lys Thr Asp Ser Gly Cys Ser Asp Gly Ala Arg Cys Tyr Val Ile
            1700                1705                1710

Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ile Ala Gly Thr Lys Gly Ala Met Val His
        1715                1720                1725

Leu Arg Lys Ala Gly Gly Glu Phe Asn Cys Val Thr Ala Gln Gly Thr
    1730                1735                1740

Pro Ala Phe Tyr Asn Leu Lys Asn Leu Lys Gly Trp Ser Gly Leu Pro
1745                1750                1755                1760

Ile Phe Glu Ala Ala Thr Gly Arg Val Val Gly Arg Val Lys Ala Gly
                1765                1770                1775

Lys Asn Thr Asp Asn Ala Pro Thr Thr Ile Met Ser Gly Thr Gln Val
```

```
            1780                1785                1790

Ala Lys Pro Ser Glu Cys Asp Leu Glu Ser Val Val Arg Lys Leu Glu
        1795                1800                1805

Thr Met Asn Arg Gly Glu Phe Lys Gln Val Thr Leu Ala Thr Gly Ala
    1810                1815                1820

Gly Lys Thr Thr Met Leu Pro Lys Leu Leu Ile Glu Ser Ile Gly Arg
1825                1830                1835                1840

His Lys Arg Val Leu Val Leu Ile Pro Leu Arg Ala Ala Ala Glu Gly
                1845                1850                1855

Val Tyr Gln Tyr Met Arg Thr Lys His Pro Ser Ile Ser Phe Asn Leu
            1860                1865                1870

Arg Ile Gly Asp Leu Lys Glu Gly Asp Met Ala Thr Gly Ile Thr Tyr
        1875                1880                1885

Ala Ser Tyr Gly Tyr Phe Cys Gln Met Asp Met Pro Arg Leu Glu Asn
    1890                1895                1900

Ala Met Lys Glu Tyr His Tyr Ile Phe Leu Asp Glu Tyr His Cys Ala
1905                1910                1915                1920

Thr Pro Glu Gln Leu Ala Val Met Ser Lys Ile His Arg Phe Gly Glu
                1925                1930                1935

Ser Val Arg Val Ile Ala Met Thr Ala Thr Pro Ser Gly Thr Val Ser
            1940                1945                1950

Thr Thr Gly Gln Lys Phe Thr Ile Glu Glu Val Val Val Pro Glu Val
        1955                1960                1965

Met Lys Gly Glu Asp Leu Ala Asp Asp Tyr Ile Glu Ile Ala Gly Leu
    1970                1975                1980

Lys Val Pro Lys Lys Glu Leu Glu Gly Asn Val Leu Thr Phe Val Pro
1985                1990                1995                2000

Thr Arg Lys Met Ala Ser Glu Thr Ala Lys Lys Leu Thr Thr Gln Gly
                2005                2010                2015

Tyr Asn Ala Gly Tyr Tyr Phe Ser Gly Glu Asp Pro Ser Ser Leu Arg
            2020                2025                2030

Thr Thr Thr Ser Lys Ser Pro Tyr Ile Val Val Ala Thr Asn Ala Ile
        2035                2040                2045

Glu Ser Gly Val Thr Leu Pro Asp Leu Asp Thr Val Ile Asp Thr Gly
    2050                2055                2060

Met Lys Cys Glu Lys Arg Leu Arg Ile Glu Asn Lys Ala Pro Tyr Ile
2065                2070                2075                2080

Val Thr Gly Leu Lys Arg Met Ala Ile Thr Thr Gly Glu Gln Ala Gln
                2085                2090                2095

Arg Lys Gly Arg Val Gly Arg Val Lys Pro Gly Arg Tyr Leu Arg Gly
            2100                2105                2110

Pro Glu Asn Thr Ala Gly Glu Lys Asp Tyr His Tyr Asp Leu Leu Gln
```

```
        2115                2120                2125

Ala Gln Arg Tyr Gly Ile Gln Asp Ser Ile Asn Ile Thr Lys Ser Phe
    2130                2135                2140

Arg Glu Met Asn Tyr Asp Trp Ala Leu Tyr Glu Glu Asp Pro Leu Lys
2145                2150                2155                2160

Ile Ala Gln Leu Glu Leu Leu Asn Thr Leu Leu Ile Ser Arg Asp Leu
                2165                2170                2175

Pro Val Val Thr Lys Asn Leu Met Ala Arg Thr Thr His Pro Glu Pro
            2180                2185                2190

Ile Gln Leu Ala Tyr Asn Ser Leu Glu Thr Pro Val Pro Val Ala Phe
        2195                2200                2205

Pro Lys Val Lys Asn Gly Glu Val Thr Asp Ala His Glu Thr Tyr Glu
    2210                2215                2220

Leu Met Thr Cys Arg Lys Leu Glu Lys Asp Pro Pro Ile Tyr Leu Tyr
2225                2230                2235                2240

Ala Thr Glu Glu Glu Asp Leu Val Val Asp Ile Leu Gly Leu Lys Trp
                2245                2250                2255

Pro Asp Ala Thr Glu Arg Ala Val Leu Glu Val Gln Asp Ala Leu Gly
            2260                2265                2270

Gln Ile Thr Gly Leu Ser Ala Gly Glu Thr Ala Leu Leu Ile Ala Leu
        2275                2280                2285

Leu Gly Trp Val Gly Tyr Glu Ala Leu Val Lys Arg His Val Pro Met
    2290                2295                2300

Val Thr Asp Ile Tyr Thr Leu Glu Asp Glu Lys Leu Glu Asp Thr Thr
2305                2310                2315                2320

His Leu Gln Phe Ala Pro Asp Asp Leu Asn Asn Ser Asp Thr Ile Glu
                2325                2330                2335

Leu Gln Asp Leu Ser Asn His Gln Ile Gln Gln Ile Leu Glu Gly Gly
            2340                2345                2350

Lys Glu Tyr Val Gly Gln Ala Tyr Gln Phe Leu Arg Leu Gln Ala Glu
        2355                2360                2365

Arg Ala Ala Asn Ser Asp Lys Gly Lys Lys Ala Met Ala Ala Ala Pro
    2370                2375                2380

Leu Leu Ala His Lys Phe Leu Glu Tyr Leu Gln Glu His Ala Gly Asp
2385                2390                2395                2400

Ile Lys Lys Tyr Gly Leu Trp Gly Val His Thr Ala Leu Tyr Asn Ser
                2405                2410                2415

Ile Lys Glu Arg Leu Gly His Glu Thr Ala Phe Ala Ser Leu Val Ile
            2420                2425                2430

Lys Trp Ile Ala Phe Ser Ser Asp Gly Val Pro Gly Met Ile Lys Gln
        2435                2440                2445

Ala Ala Val Asp Leu Val Val Tyr Tyr Ile Ile Asn Arg Pro Glu Tyr
```

```
    2450                2455                2460

Gln Gly Asp Lys Glu Thr Gln Asn Ala Gly Arg Gln Phe Val Gly Ser
2465                2470                2475                2480

Leu Phe Val Ser Cys Leu Ala Glu Tyr Thr Phe Lys Asn Phe Asn Lys
                2485                2490                2495

Ser Ala Leu Glu Gly Leu Ile Glu Pro Ala Leu Ser Tyr Leu Pro Tyr
            2500                2505                2510

Ala Ser Ser Ala Leu Lys Leu Phe Leu Pro Thr Arg Leu Glu Ser Val
        2515                2520                2525

Val Ile Leu Ser Thr Thr Ile Tyr Arg Thr Tyr Leu Ser Ile Arg Lys
    2530                2535                2540

Gly Ser Ser Gln Gly Leu Ala Gly Leu Ala Val Ser Ser Ala Met Glu
2545                2550                2555                2560

Ile Met Asn Gln Asn Pro Ile Ser Val Ala Ile Ala Leu Ala Leu Gly
                2565                2570                2575

Val Gly Ala Ile Ala Ala His Asn Ala Ile Glu Ser Ser Glu Ala Lys
            2580                2585                2590

Arg Thr Leu Leu Met Lys Val Phe Val Lys Asn Phe Leu Asp Gln Ala
        2595                2600                2605

Ala Thr Asp Glu Leu Val Lys Glu Asn Pro Glu Lys Ile Ile Met Ala
    2610                2615                2620

Val Phe Glu Gly Ile Gln Thr Ala Gly Asn Pro Leu Arg Leu Val Tyr
2625                2630                2635                2640

His Leu Tyr Ala Met Phe Tyr Lys Gly Trp Thr Ala Ala Glu Ile Ala
                2645                2650                2655

Glu Lys Thr Ala Gly Arg Asn Ile Phe Val Leu Thr Ile Phe Glu Gly
            2660                2665                2670

Leu Glu Met Leu Gly Leu Asp Ala Asp Ser Lys Trp Arg Asn Leu Ser
        2675                2680                2685

Ser Asn Tyr Leu Ile Asp Ala Val Lys Lys Ile Ile Glu Lys Met Thr
    2690                2695                2700

Lys Thr Ala Thr Ser Phe Thr Tyr Ser Phe Leu Lys Ser Leu Leu Pro
2705                2710                2715                2720

Ala Pro Phe Ser Cys Thr Lys Ser Glu Arg Asp Pro Arg Ile Gly Trp
                2725                2730                2735

Pro Gln Lys Asp Tyr Asp Tyr Leu Glu Val Arg Cys Ala Cys Gly Tyr
            2740                2745                2750

Asn Arg Arg Ala Ile Lys Arg Asp Ser Gly Pro Val Leu Trp Glu Thr
        2755                2760                2765

Leu Glu Glu Thr Gly Pro Glu Tyr Cys His Asn Arg Gly Glu Arg Gly
    2770                2775                2780

Leu Ser Asn Val Lys Thr Thr Arg Cys Phe Val Gln Gly Glu Glu Ile
```

```
2785                2790                2795                2800

Pro Pro Ile Ala Leu Arg Lys Gly Val Gly Glu Met Leu Val Lys Gly
                2805                2810                2815

Val Ser Phe Arg Ile Asp Phe Asp Lys Asp Lys Ile Leu Ser Thr Asp
            2820                2825                2830

Lys Trp Lys Val Pro His Arg Ala Val Thr Ser Ile Phe Glu Asp Trp
        2835                2840                2845

Gln Gly Ile Gly Tyr Arg Glu Ala Tyr Leu Gly Thr Lys Pro Asp Tyr
    2850                2855                2860

Gly Gly Leu Val Pro Arg Ser Cys Val Thr Val Thr Lys Gln Gly Leu
2865                2870                2875                2880

Thr Phe Leu Lys Thr Ala Arg Gly Met Ala Phe Thr Thr Asp Leu Thr
                2885                2890                2895

Ile Gln Asn Ile Lys Met Leu Ile Ala Thr Cys Phe Lys Asn Lys Val
            2900                2905                2910

Lys Glu Gly Glu Ile Pro Ala Thr Ile Glu Gly Glu Thr Trp Ile Asn
        2915                2920                2925

Ile Pro Leu Val Asn Glu Asp Thr Gly Thr Ile Lys Pro Ser Phe Gly
    2930                2935                2940

Glu Arg Val Ile Pro Glu Pro Tyr Glu Glu Asp Pro Leu Glu Gly Pro
2945                2950                2955                2960

Ser Val Ile Val Glu Thr Gly Gly Ile Ala Ile Asn Gln Ile Gly Val
                2965                2970                2975

Asn Pro Gln Ser Ser Thr Cys Gly Thr Val Phe Thr Ala Val Lys Asp
            2980                2985                2990

Leu Cys Gln Thr Val Ser Asn Lys Ala Lys Asn Ile Lys Ile Gly Phe
        2995                3000                3005

Ser Glu Gly Gln Tyr Pro Gly Pro Gly Val Ala Lys Lys Thr Leu Asn
    3010                3015                3020

Gln Leu Ile Gln Asp Glu Asp Pro Lys Pro Phe Ile Phe Val Cys Gly
3025                3030                3035                3040

Ser Asp Lys Ser Met Ser Asn Arg Ala Lys Thr Ala Arg Asn Ile Lys
                3045                3050                3055

Arg Ile Thr Thr Thr Thr Pro Glu Lys Phe Arg Asp Leu Ala Lys Asn
            3060                3065                3070

Lys Lys Leu Ile Ile Val Leu Leu Gly Asp Arg Tyr His Glu Asp Ile
        3075                3080                3085

Glu Lys Tyr Ala Asp Phe Lys Gly Thr Phe Leu Thr Arg Gln Thr Leu
    3090                3095                3100

Glu Ala Leu Ala Ser Ala Lys Ala Val Glu Lys Asp Met Thr Lys Lys
3105                3110                3115                3120

Glu Ala Ala Arg Val Leu Ala Met Glu Glu Lys Asp Glu Leu Glu Leu
```

```
                3125                3130                3135

Pro Gly Trp Leu His Thr Asp Ala Pro Lys Phe Leu Asp Ile Thr Lys
            3140                3145                3150

Asp Asn Ile Thr His His Leu Ile Gly Asp Met Gln Ser Leu Arg Glu
        3155                3160                3165

Arg Ala Gly Glu Ile Gly Ala Lys Ala Thr Thr Gln Ile Thr Lys Lys
    3170                3175                3180

Gly Ser Val Tyr Thr Ile Asn Leu Ser Thr Trp Trp Glu Ser Glu Arg
3185                3190                3195                3200

Leu Ala Ser Leu Glu Pro Leu Phe Arg Glu Leu Leu Ser Lys Cys Arg
                3205                3210                3215

Pro Val Asp Arg Glu Thr Tyr Lys Asn Cys His Phe Ala Thr Ala Ala
            3220                3225                3230

Gln Leu Ala Gly Gly Asn Trp Val Pro Val Ala Pro Val Val His Leu
        3235                3240                3245

Gly Glu Ile Pro Val Lys Lys Lys Lys Thr Leu Pro Tyr Glu Ala Tyr
    3250                3255                3260

Lys Leu Leu Lys Glu Met Val Asp Ser Glu Lys Glu Phe His Lys Pro
3265                3270                3275                3280

Val Ser Arg Glu Lys His Gln Trp Ile Leu Asn Lys Val Lys Thr Gly
                3285                3290                3295

Gly Asp Leu Gly Leu Lys Asn Leu Val Cys Pro Gly Arg Val Gly Glu
            3300                3305                3310

Pro Ile Leu Arg Glu Lys Lys Lys Phe Asn Ile Tyr Asn Lys Arg Ile
        3315                3320                3325

Thr Ser Thr Met Leu Ser Val Gly Ile Arg Pro Glu Lys Leu Pro Val
    3330                3335                3340

Val Arg Ala Gln Thr Ser Thr Lys Glu Phe His Glu Ala Ile Arg Asp
3345                3350                3355                3360

Lys Ile Asp Lys Lys Ala Asn Thr Gln Thr Pro Gly Leu His Lys Glu
                3365                3370                3375

Leu Leu Glu Ile Phe Asn Ser Ile Cys Ala Ile Pro Glu Leu Arg Asn
            3380                3385                3390

Thr Tyr Lys Glu Val Asp Trp Asp Val Leu Thr Ser Gly Ile Asn Arg
        3395                3400                3405

Lys Gly Ala Ala Gly Tyr Phe Glu Lys Met Asn Ile Gly Glu Ile Ile
    3410                3415                3420

Asp Ser Asp Lys Lys Ser Val Glu Gln Leu Ile Lys Arg Met Lys Ser
3425                3430                3435                3440

Gly Leu Glu Phe Asn Tyr Tyr Glu Thr Ala Ile Pro Lys Asn Glu Lys
                3445                3450                3455

Arg Ala Val Val Asp Asp Trp Met Glu Gly Asp Tyr Val Glu Glu Lys
```

```
            3460                3465                3470

Arg Pro Arg Val Ile Gln Tyr Pro Glu Ala Lys Met Arg Leu Ala Ile
        3475                3480                3485

Thr Lys Val Met Tyr Asn Trp Val Lys Gln Lys Pro Ile Val Ile Pro
    3490                3495                3500

Gly Tyr Glu Gly Lys Thr Pro Leu Phe His Val Phe Asp Lys Val His
3505                3510                3515                3520

Lys Glu Trp Lys Asn Phe Asn Ser Pro Val Ala Val Ser Phe Asp Thr
                3525                3530                3535

Lys Ala Trp Asp Thr Gln Val Thr Pro Lys Asp Leu Leu Leu Ile Ser
            3540                3545                3550

Glu Ile Gln Lys Tyr Tyr Tyr Lys Lys Glu Tyr His Arg Phe Ile Asp
        3555                3560                3565

Asn Leu Thr Glu Lys Met Val Glu Val Pro Val Val Cys Glu Asp Gly
    3570                3575                3580

Asn Val Tyr Ile Arg Glu Gly Gln Arg Gly Ser Gly Gln Pro Asp Thr
3585                3590                3595                3600

Ser Ala Gly Asn Ser Met Leu Asn Val Leu Thr Met Ile Tyr Ala Phe
                3605                3610                3615

Cys Lys Ala Asn Ser Ile Pro Tyr Ser Ala Phe His Arg Val Ala Lys
            3620                3625                3630

Ile His Val Cys Gly Asp Asp Gly Phe Leu Ile Thr Glu Lys Ser Phe
        3635                3640                3645

Gly Glu Ala Phe Ala Ile Lys Gly Pro Gln Ile Leu Met Glu Ala Gly
    3650                3655                3660

Lys Pro Gln Lys Leu Ile Gly Glu Phe Gly Leu Lys Leu Ala Tyr Lys
3665                3670                3675                3680

Phe Asp Asp Ile Glu Phe Cys Ser His Thr Pro Ile Lys Val Arg Trp
                3685                3690                3695

Ala Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Met Pro Gly Arg Asp Thr Ala Thr Ile
            3700                3705                3710

Leu Ala Lys Met Ala Thr Arg Leu Asp Ser Ser Gly Glu Arg Gly Thr
        3715                3720                3725

Glu Gly Tyr Glu Leu Ala Val Ala Phe Ser Phe Leu Leu Met Tyr Ser
    3730                3735                3740

Trp Asn Pro Leu Val Arg Arg Ile Cys Leu Leu Val Met Ser Thr Ile
3745                3750                3755                3760

Asp Thr Lys Glu Ala Ser Gln Asn Asn Thr Ile Tyr Thr Phe Arg Gly
                3765                3770                3775

Asp Pro Ile Gly Ala Tyr Thr Glu Val Ile Gly Tyr Arg Leu Asp Gln
            3780                3785                3790

Leu Lys Gln Thr Glu Phe Ser Lys Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ser Met
```

```
                3795                3800                3805

Ala Ile Leu Gln Ile Tyr Asn Lys Asn Thr Thr Lys Arg Leu Ile Glu
    3810                3815                3820

Asp Cys Val Lys Leu Gly Asn Gln Asn Lys Gln Ile Leu Val Asn Ala
3825                3830                3835                3840

Asp Arg Leu Ile Ser Lys Lys Thr Gly Tyr Thr Tyr Glu Pro Thr Ala
                3845                3850                3855

Gly His Thr Lys Ile Gly Lys His Tyr Glu Glu Ile Asn Leu Leu Lys
            3860                3865                3870

Asp Thr Pro Gln Lys Thr Val Tyr Gln Gly Thr Glu Arg Tyr
        3875                3880                3885
```

<210> 3
<211> 418
<212> ADN
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 3

```
gtataacgac agtagttcaa gtgtcgttat gcatcattgg ccataacaaa ttatctaatt   60
tggaataggg acctgcgacc tgtacgaagg ccgagcgtcg gtagccattc cgactagtag   120
gactagtaca aataggtcaa ctggttgagc aggtgagtgt gctgcagcgg ctaagcggtg   180
agtacaccgt attcgtcaac aggtgctact ggaaaggatc acccactagc gatgcctgtg   240
tggacgagga catgtccaag ccaatgttat cagtagcggg ggtcgttact gagaaagctg   300
cccagaatgg gtagttgcac atacagtctg ataggatgcc ggcggatgcc ctgtattttg   360
accagtataa atattatccg ttgtaaagca tatgaatact tttacttta atacatat      418
```

<210> 4
<211> 504
<212> ADN
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 4

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

<210> 5
<211> 297
<212> ADN
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 5

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

<210> 6
<211> 666
<212> ADN

<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 6

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

<210> 7
<211> 588
<212> ADN
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 7

agtccttact gcccagtggc taagagggtc ttcaacatta tttataccaa caattgcacc 60
ccgcttggac tgccagataa gtcaaaaatt ataggaccag gaacctttga catcagtggc 120
agggatgaat tcatatttcc aaaactcccc taccacgtag atgacttcat tctactgagc 180
ttaattgcaa tgtctgattt tgctccagag acatcaagta taatctacct ggctttgcac 240
tacctaatgc caagtaatga caacagggac ttcgtgatgg acctggaccc aaataaacta 300
aaccttactg caactaaatc cgtggcaagt gtggtcccta catcggtgaa tgtgttaggt 360
gaatgggtgt gcgtcaaacc aagttggtgg ccttattccg ccgaaatcac taatctgata 420
ggaggtgtca tcaccgtggc agacttagtt atcaagacca ttgaagaatt gctaaatttg 480
tggaccgaag caacagctgt ggcatttctg gctgctctaa taaaaatttt tagaggccag 540
ccgatccaag cggtagcatg gttaatcatc atagggggag cacaagcc 588

<210> 8
<211> 1131
<212> ADN
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 8

caaacctgca accctgaatt catgtacgca ttagcgaaaa ataccagcat aggttcatta 60
ggaccagaat cactgacgac aaggtggtac caactaacca gcggtttcaa actcactgac 120
agcacgattg aagtcacctg tgtgggtgct aacatgagga ttcatgtagt gtgcccactt 180
gtaagtgaca gatatttggc cataaaccac cctagagcac tgccaacaac ggcgtggttc 240
aggaaaatac acactcagca tgaggtacca agagaaagaa tcatgagtga gtcaaaaagg 300
aggtacactt gtccttgtgg ttctaaacca gtggtgaggt caacaacaca attcaaccca 360
atatctatat ctaccccaag ctttgaactt gaatgcccta ggggttggac tggggctgta 420
gagtgtacac tagtctcccc atcaactctg acaacagaga ctatattcac atacaggaag 480
cccaaaccat tcggacttga aaactggtgc aagtatacag tggtggagaa agggatcctg 540
tattcttgta aatttggggg caattcaaca tgcatcaaag ggcttatagt taaagggcaa 600
cgggaagaca aagtaaggta ctgtgaatgg tgtggttata agttcagttc accaaatgga 660
ctgcctcagt atccactggg attgtgtgag aaagaacaat cagaaggact cagggattat 720
ggtgacttcc catgctgcaa caacggcact tgtattgaca aagaaggtag tgtgcaatgc 780
tacatagggg ataagaaagt taccgtgaag ctgtataatg cctcactatt ggccccccatg 840
ccctgcaaac ccatagtgta taactcccag gggcccccag cgcctaagac ctgcacttat 900
aggtgggcct caacattaga aaataaatat tatgaaccca gggacagcta ctaccagcaa 960
tacattataa agtcagggta tcaatattgg tttgatctca cagcaaagga tcatgtggca 1020
gactggatca caaaatactt tccaataata atagtggcct tgttaggggg cagaggcacc 1080
ttgtgggtgt tgatagctta tgagttgcta actcagtatg aggtagtagg a 1131

<210> 9
<211> 216
<212> ADN

<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 9

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

<210> 10
<211> 1404
<212> ADN
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 10

gaagagggaa ctaaagaggg tagtacaagc gggccaccaa tccatgtagt tgcaatactg 60
ttattcctct tgtaccacac agtgaagtat aaggacttta acatagcaat gatcttactt 120
ataacattgt ccctgaaaag ctcatcctac atacatacca gcttgtatga aattccattg 180
cttgtggctg taataagtct cacatgctcc atatacattt ttgacttgca ggtaaagagc 240
aagctagtgg ccccaactat aggtataatt ggagttaccc tagcaatgag agttttgtgg 300
ctggtaaggc aaatgactat accaaccccc tctgtgtcca ttagtctgat agatccaaag 360
atggtcataa tactctactt gatatcccta actattacag tcaatcacaa cctagaccta 420
gcaagttatt gcttgaaact gggacctttt atcctatcat tcctaacaat gtgggtggat 480
gttgtcatcc tcctgctcat gctgccttgg tacgaactag taaaagtcta ctacctaaaa 540
aagaagaaag aggatgtgga aacatggttc caaaattcag gaatatccac ccaagaaact 600
tccccatacg gatttgattt ttctagcccc ggggagggag tgcacacact accaatgcaa 660
aataaaacca aattttgtag gactgcttac atgactgtac taagggcttt ggtgataaca 720
gccatcagca gtgtctggaa accaataatt ttagcagaac tcctaataga ggcagtgtat 780
tggacacaca ttaaaatagc caaagaattg gcggggtcaa gcaggttcgt tgctaggttc 840
attgcatcta ttatagagtt gaattgggcc atggacgaaa aagaagcatc tcggtacaaa 900
agattttacc tattatcatc caaaataaca gatctaatgg ttaagcacaa aatccaaaat 960
gagacagtaa aatcctggtt tgaagaaact gaaatatttg gaatacaaaa agtggcaatg 1020
gtgataaggg ctcattctct gagtttggag ccaaatgcca tcctttgctc cgtttgtgaa 1080
gaaaaacaaa atcaaaaagc caaaaggccc tgccctaagt gtggtagtag aggcactcaa 1140
ataaagtgtg ggctgacact ggccgagttt gaggaagaac attacaaaaa aatatacatc 1200
ctcgaaggcc aagatgaaac tcccatgagg aaagaagaaa gacagcaagt aacttatgtc 1260
tctaggggtg ctctgttcct taggaatctt cctatcttag cttcaaaaaa caaataccta 1320
cttgtaggca atctgggtat ggaattgcaa gatttggaaa gtatgggatg gatcattcga 1380
gggccagccg tctgcaagaa gata 1404

<210> 11
<211> 2028
<212> ADN
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 11

atacaccatg agaaatgcag gccttcaata ccagacaaac tcatggcatt cttcgggatt 60
atgcctaggg gagttacacc aagagcccct acacggttcc ctgtgtcctt gctgaagata 120
agacggggtt ttgagaccgg ctgggcctac acacaccctg gaggggtaag tagtgtgatg 180
catgtcaccg ctgggtcgga tatatatgtc aatgactcaa tagggaggac aaaaatccag 240
tgccaagaca aaaacactac aacagatgag tgtgaatatg gtgtgaaaac agactcaggg 300
tgctctgatg gagctcggtg ctatgtcatc aaccctgaag caaccaacat agcagggacc 360
aaggggggcca tggtacacct gaggaaagct ggaggagagt tcaactgcgt gactgcccag 420
ggtacccccg ccttctataa tctaaagaac ttaaaaggat ggtcaggcct gcctatcttt 480
gaagctgcca caggaagagt ggtaggaagg gtaaaagcag gaaaaaacac tgacaatgct 540
ccaacaacca ttatgtcagg gacgcaagtg gcaaaaccat cagagtgtga cctagaatca 600
gtggtgagga aactagagac aatgaacaga ggggaattca aacaagtgac tctggctaca 660
ggcgcaggaa agacaaccat gctaccaaag ctgttaatag aatccatagg caggcataag 720
agagtgttag tactgatccc gttgagagct gcagcggagg gggtgtacca gtacatgaga 780
accaaacacc caagcatatc tttcaacttg aggatagggg atctgaaaga aggtgacatg 840
gcaactggga tcacctatgc ctcttatggg tacttctgcc aaatggacat gcctagactg 900
gagaatgcaa tgaaggaata ccactatatt ttcttggatg aatatcactg tgccacacca 960
gaacagttgg cagtgatgtc aaaaatacat aggttcggtg aatcagttag ggtaatagcc 1020
atgaccgcca cgccatccgg gactgtgagc acaacagggc agaaattcac aattgaggag 1080
gtggtagtac ctgaagtgat gaaggggggag gaccttgctg atgattacat cgaaatagca 1140
gggttgaagg tgccaaagaa agagttagag ggtaacgtac tgacttttgt gcctacaagg 1200
aagatggcat cggaaacagc aaaaaaatta accacacagg gatacaatgc tggatactac 1260
ttcagtggag aagatccatc atccctgcgg acaactactt ctaagtcacc atatatagta 1320
gttgcaacca atgccattga atccggggta accttaccgg accttgatac agtaatagat 1380
acaggcatga agtgtgaaaa gagactaaga atcgaaaaca aagctcccta catcgtaaca 1440
ggactgaaaa gaatggctat aacaacgggg gagcaagctc aaagaaaagg tagggtaggc 1500
agggttaaac ctgggaggta cttgagagga cctgaaaaca ctgcaggtga aaaggactat 1560
cactatgacc ttttacaggc acagaggtac ggcatccaag actcaataaa catcaccaag 1620
tctttcaggg agatgaacta tgattgggca ttatatgagg aagacccgtt aaagattgcc 1680
caattagagt tgctaaacac actcctgatc tcaagggatc tgccagtagt aacaaaaaat 1740
ctgatggccc gcacaacaca tcccgaacct atacaattgg cttacaatag tttagaaacc 1800
cctgtaccgg tggcattccc aaaagtgaaa aatggagaag tcactgacgc acatgaaact 1860
tacgagttga tgacctgtag gaagcttgag aaagaccccc ctatatacct gtatgcaaca 1920
gaagaagaag atctcgtagt ggacatactg ggattgaaat ggccagacgc cacagagagg 1980
gctgtcttgg aagtgcaaga cgccctgggc cagatcacag gtttatct 2028

<210> 12
<211> 189
<212> ADN
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 12

gcaggggaga cagctttact catagcccta ttagggtggg tgggctacga agccttggtg 60
aagaggcacg tgcctatggt gacagacata tacaccctag aagatgaaaa attggaagac 120
actacacacc tacaatttgc cccagatgat ctgaacaatt cagataccat tgagctccaa 180
gacttatcg 189

<210> 13
<211> 1041
<212> ADN
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 13

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

<210> 14
<211> 1515
<212> ADN
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 14

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

<210> 15
<211> 2080
<212> ADN
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 15

```
acgtggtggg agtcagagag gttggcatct ttggaacctt tgttccggga actactatct   60
aaatgcaggc cagtggacag ggagacatat aagaattgtc attttgcaac agcagcccaa   120
cttgccggag gaaactgggt accggtagca ccagttgtac atcttgggga aattccggta   180
aagaagaaaa agactctccc ctacgaggca tacaagctcc taaaagagat ggttgactcg   240
gagaaggaat tccataaacc agtgagcagg gaaaaacacc aatggatact gaacaaagtg   300
aaaactggtg gtgacctcgg cttaaaaaat ctagtatgtc caggtagggt tggagaacca   360
atcctaagag agaagaagaa attcaacatt tacaacaaga ggattaccag tactatgtta   420
tcagtaggga taaggccaga aaaattgcca gtggtaagag cccagaccag taccaaagaa   480
tttcatgaag caataaggga caaaatagac aaaaaagcaa acacacagac cccaggccta   540
cacaaagaat tgttggagat attcaactca atatgtgcca tccccgaact tagaaatacc   600
tacaaagagg ttgattggga cgttctaacc tcaggcataa ataggaaagg tgcagccggg   660
tacttcgaaa aaatgaacat aggggagatc atagatagtg acaaaaaatc agtggaacaa   720
ctcataaaga gaatgaaatc agggctagaa ttcaactact atgagactgc aataccaaaa   780
aatgagaaga gggcagtggt agatgattgg atggaaggtg actatgtaga agaaaaaaga   840
ccaagagtca tacagtatcc tgaggcaaag atgagattag ctataaccaa agtaatgtat   900
aactgggtca agcagaagcc tatagtaatc cctggatacg aaggtaagac tcctttgttt   960
catgttttcg acaaggtcca caaagaatgg aaaaatttca acagtccagt tgcagtcagt   1020
tttgacacta aagcctggga cacacaagta acacccaaag accttctcct catatcagaa   1080
atccaaaagt attattacaa gaaagaatac catagattca tagataattt gaccgagaaa   1140
atggtggagg taccagtggt ttgtgaagac ggaaacgtct acataagaga aggtcagagg   1200
ggaagtggtc aaccagacac tagcgcaggt aatagtatgt tgaatgtact gactatgata   1260
tatgccttct gcaaagctaa ctccatccct tactcagcct tccacagggt agcaaagata   1320
catgtgtgtg gagatgatgg tttcttgata actgagaaaa gttttggtga ggcctttgcg   1380
atcaaggggc ctcaaatttt gatggaagca ggaaaaccac aaaaacttat aggtgaattt   1440
ggactgaaat tggcatataa atttgatgac attgaatttt gctcgcatac accaataaag   1500
gtcaggtggg ctgacaacaa cacatcatac atgcccggaa gagacacagc taccattcta   1560
gctaaaatgg caacccgcct tgactctagt ggggagaggg ggaccgaggg atacgagctg   1620
gccgtggcct tcagtttctt actaatgtat tcttggaacc ccctggtaag aagaatatgc   1680
ctgcttgtca tgtctacaat tgacacaaaa gaagctagcc aaaataacac tatatataca   1740
tttaggggggg atcccatagg tgcctacaca gaggtaattg ggtataggct ggaccaacta   1800
aaacagacag agttctctaa attggctcag ctgaatttgt caatggcaat acttcaaata   1860
tacaataaaa acacaaccaa gagactcatc gaagattgtg tgaaacttgg caaccaaaat   1920
aagcaaatat tggtgaatgc agaccgtttg atcagcaaga aaacgggcta cacatatgag   1980
ccaacagctg gccacactaa gataggcaag cactatgaag aaatcaacct gctgaaagat   2040
acaccacaaa aaactgtcta ccaaggaact gaaaggtata                          2080
```

<210> 16
<211> 167
<212> PRT
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 16

```
Gly Gly Ser Glu Glu Gly Asn Met Phe Phe Arg Thr Ala Pro Thr Pro
1               5                  10                  15

Pro Pro Gly Cys Gln Glu Pro Val Tyr Thr Ser Thr Met Arg Pro Ile
            20                  25                  30

Phe Gly Glu Pro His Pro Pro Leu His Lys His Ser Thr Leu Lys Leu
        35                  40                  45

Pro His Trp Arg Gly Ile Lys Thr Ile Arg Val Lys Lys Arg Glu Leu
    50                  55                  60

Pro Lys Lys Gly Asp Cys Ser Asn Ser Thr Thr Ala Pro Thr Ser Gly
65                  70                  75                  80

Val Tyr Val Glu Leu Gly Ala Val Phe Tyr Lys Asp Tyr Thr Gly Thr
                85                  90                  95

Val Tyr His Arg Val Pro Leu Glu Leu Cys Thr Asn Gln Glu Arg Cys
            100                 105                 110

Glu Gly Ser Lys Cys Val Gly Arg Met Thr Gly Ser Asp Gly Arg Leu
        115                 120                 125

Tyr Asn Val Leu Val Cys Pro Asp Asp Cys Ile Leu Phe Glu Arg His
    130                 135                 140

Cys Arg Gly Gln Thr Val Val Leu Lys Trp Ile Ser Asn Pro Leu Thr
145                 150                 155                 160

Ser Pro Leu Trp Val Gln Ser
                165
```

<210> 17
<211> 99
<212> PRT
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 17

```
Ser Asp Asp Lys Gly Ala Lys Pro Lys Val Lys Pro Lys Asp Asp Arg
1               5                  10                  15

Met Lys Gln Gly Lys Ile Val Thr Lys Pro Lys Glu Thr Glu Ala Asp
            20                  25                  30

Gln Lys Thr Arg Pro Pro Asp Ala Thr Ile Val Val Asp Gly Gln Lys
        35                  40                  45

Tyr Gln Val Arg Lys Lys Gly Lys Ala Lys Pro Lys Thr Gln Asp Gly
    50                  55                  60

Leu Tyr His Asn Lys Asn Lys Pro Glu Ala Ser Arg Lys Lys Leu Glu
65                  70                  75                  80

Lys Ala Leu Leu Ala Trp Ala Ile Leu Ala Cys Leu Leu Val Val Pro
                85                  90                  95

                    Val Gly Ser
```

<210> 18
<211> 222

<212> PRT
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 18

```
Thr Asn Val Thr Gln Trp Asn Leu Trp Asp Asn Lys Ser Thr Thr Asp
1               5                  10                  15

Ile His Ser Val Met Phe Ser Arg Gly Ile Lys Arg Ser Leu His Gly
            20                  25                  30

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

Asp Tyr Glu Leu Lys Arg Ile His Gly Met Val Asp Ala Ser Pro Met
    50                  55                  60

Thr Asn Phe Thr Cys Cys Arg Leu Gln Arg His Glu Trp Asn Lys His
65                  70                  75                  80

Gly Trp Cys Asn Trp Tyr Asn Ile Glu Pro Trp Ile Asn Leu Met Asn
                85                  90                  95

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

Val Thr Cys Arg Tyr Asp Ala Asp Leu Gly Val Asn Ile Val Thr Gln
        115                 120                 125

Ala Arg Thr Thr Pro Thr Ile Leu Thr Gly Cys Lys Lys Gly His Asn
    130                 135                 140

Phe Ser Phe Ser Gly Glu Val Arg Ala Ser Pro Cys Asn Phe Glu Leu
145                 150                 155                 160

Thr Ala Glu Asp Leu Leu Arg Ile Met Asp His Thr Asn Cys Glu Gly
                165                 170                 175

Phe Thr Tyr Phe Gly Glu Gly Ile Val Asp Gly Tyr Thr Glu Val Val
            180                 185                 190

Glu Lys Ala Arg Ser Ser Gly Phe Arg Ala Leu Thr Trp Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Lys Ile Glu Asn Thr Lys Lys Lys Ile Phe Gly Ala Glu Ala
    210                 215                 220
```

<210> 19
<211> 196
<212> PRT
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 19

```
Ser Pro Tyr Cys Pro Val Ala Lys Arg Val Phe Asn Ile Ile Tyr Thr
1               5                  10                  15

Asn Asn Cys Thr Pro Leu Gly Leu Pro Asp Lys Ser Lys Ile Ile Gly
            20                  25                  30

Pro Gly Thr Phe Asp Ile Ser Gly Arg Asp Glu Phe Ile Phe Pro Lys
        35                  40                  45

Leu Pro Tyr His Val Asp Asp Phe Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Met
    50                  55                  60

Ser Asp Phe Ala Pro Glu Thr Ser Ser Ile Ile Tyr Leu Ala Leu His
65                  70                  75                  80

Tyr Leu Met Pro Ser Asn Asp Asn Arg Asp Phe Val Met Asp Leu Asp
                85                  90                  95

Pro Asn Lys Leu Asn Leu Thr Ala Thr Lys Ser Val Ala Ser Val Val
            100                 105                 110

Pro Thr Ser Val Asn Val Leu Gly Glu Trp Val Cys Val Lys Pro Ser
        115                 120                 125

Trp Trp Pro Tyr Ser Ala Glu Ile Thr Asn Leu Ile Gly Gly Val Ile
    130                 135                 140

Thr Val Ala Asp Leu Val Ile Lys Thr Ile Glu Glu Leu Leu Asn Leu
145                 150                 155                 160

Trp Thr Glu Ala Thr Ala Val Ala Phe Leu Ala Ala Leu Ile Lys Ile
                165                 170                 175

Phe Arg Gly Gln Pro Ile Gln Ala Val Ala Trp Leu Ile Ile Ile Gly
            180                 185                 190

Gly Ala Gln Ala
        195
```

<210> 20
<211> 377
<212> PRT
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 20

```
Gln Thr Cys Asn Pro Glu Phe Met Tyr Ala Leu Ala Lys Asn Thr Ser
1               5                  10                  15

Ile Gly Ser Leu Gly Pro Glu Ser Leu Thr Thr Arg Trp Tyr Gln Leu
            20                  25                  30

Thr Ser Gly Phe Lys Leu Thr Asp Ser Thr Ile Glu Val Thr Cys Val
        35                  40                  45

Gly Ala Asn Met Arg Ile His Val Val Cys Pro Leu Val Ser Asp Arg
    50                  55                  60

Tyr Leu Ala Ile Asn His Pro Arg Ala Leu Pro Thr Thr Ala Trp Phe
65                  70                  75                  80

Arg Lys Ile His Thr Gln His Glu Val Pro Arg Glu Arg Ile Met Ser
                85                  90                  95

Glu Ser Lys Arg Arg Tyr Thr Cys Pro Cys Gly Ser Lys Pro Val Val
            100                 105                 110

Arg Ser Thr Thr Gln Phe Asn Pro Ile Ser Ile Ser Thr Pro Ser Phe
        115                 120                 125
```

```
Glu Leu Glu Cys Pro Arg Gly Trp Thr Gly Ala Val Glu Cys Thr Leu
    130                 135                 140

Val Ser Pro Ser Thr Leu Thr Thr Glu Thr Ile Phe Thr Tyr Arg Lys
145                 150                 155                 160

Pro Lys Pro Phe Gly Leu Glu Asn Trp Cys Lys Tyr Thr Val Val Glu
                165                 170                 175

Lys Gly Ile Leu Tyr Ser Cys Lys Phe Gly Gly Asn Ser Thr Cys Ile
            180                 185                 190

Lys Gly Leu Ile Val Lys Gly Gln Arg Glu Asp Lys Val Arg Tyr Cys
        195                 200                 205

Glu Trp Cys Gly Tyr Lys Phe Ser Ser Pro Asn Gly Leu Pro Gln Tyr
    210                 215                 220

Pro Leu Gly Leu Cys Glu Lys Glu Gln Ser Glu Gly Leu Arg Asp Tyr
225                 230                 235                 240

Gly Asp Phe Pro Cys Cys Asn Asn Gly Thr Cys Ile Asp Lys Glu Gly
                245                 250                 255

Ser Val Gln Cys Tyr Ile Gly Asp Lys Lys Val Thr Val Lys Leu Tyr
            260                 265                 270

Asn Ala Ser Leu Leu Ala Pro Met Pro Cys Lys Pro Ile Val Tyr Asn
        275                 280                 285

Ser Gln Gly Pro Pro Ala Pro Lys Thr Cys Thr Tyr Arg Trp Ala Ser
    290                 295                 300

Thr Leu Glu Asn Lys Tyr Tyr Glu Pro Arg Asp Ser Tyr Tyr Gln Gln
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Ile Lys Ser Gly Tyr Gln Tyr Trp Phe Asp Leu Thr Ala Lys
                325                 330                 335

Asp His Val Ala Asp Trp Ile Thr Lys Tyr Phe Pro Ile Ile Ile Val
            340                 345                 350

Ala Leu Leu Gly Gly Arg Gly Thr Leu Trp Val Leu Ile Ala Tyr Glu
        355                 360                 365

Leu Leu Thr Gln Tyr Glu Val Val Gly
    370                 375
```

<210> 21
<211> 72
<212> PRT
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 21

```
Asp Glu Asn Ile Val Ala Gln Ala Glu Ala Leu Val Ile Gly Asn Ile
1               5                  10                  15

Leu Met Ser Leu Asp Leu Glu Ile Ile Ser Cys Phe Leu Leu Leu Leu
            20                  25                  30

Ile Val Val Lys Lys Gln Ala Val Arg Arg Thr Leu Ala Leu Leu Phe
        35                  40                  45

His Trp Ile Thr Met Asn Pro Phe Gln Ser Val Met Ile Thr Val Val
    50                  55                  60

Tyr Phe Val Gly Leu Val Arg Ala
65                  70
```

<210> 22
<211> 468
<212> PRT
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 22

```
Glu Glu Gly Thr Lys Glu Gly Ser Thr Ser Gly Pro Pro Ile His Val
1               5                  10                  15

Val Ala Ile Leu Leu Phe Leu Leu Tyr His Thr Val Lys Tyr Lys Asp
            20                  25                  30

Phe Asn Ile Ala Met Ile Leu Leu Ile Thr Leu Ser Leu Lys Ser Ser
        35                  40                  45

Ser Tyr Ile His Thr Ser Leu Tyr Glu Ile Pro Leu Leu Val Ala Val
    50                  55                  60

Ile Ser Leu Thr Cys Ser Ile Tyr Ile Phe Asp Leu Gln Val Lys Ser
65                  70                  75                  80

Lys Leu Val Ala Pro Thr Ile Gly Ile Ile Gly Val Thr Leu Ala Met
                85                  90                  95

Arg Val Leu Trp Leu Val Arg Gln Met Thr Ile Pro Thr Pro Ser Val
            100                 105                 110

Ser Ile Ser Leu Ile Asp Pro Lys Met Val Ile Ile Leu Tyr Leu Ile
        115                 120                 125

Ser Leu Thr Ile Thr Val Asn His Asn Leu Asp Leu Ala Ser Tyr Cys
    130                 135                 140

Leu Lys Leu Gly Pro Phe Ile Leu Ser Phe Leu Thr Met Trp Val Asp
145                 150                 155                 160

Val Val Ile Leu Leu Leu Met Leu Pro Trp Tyr Glu Leu Val Lys Val
                165                 170                 175

Tyr Tyr Leu Lys Lys Lys Lys Glu Asp Val Glu Thr Trp Phe Gln Asn
            180                 185                 190

Ser Gly Ile Ser Thr Gln Glu Thr Ser Pro Tyr Gly Phe Asp Phe Ser
        195                 200                 205

Ser Pro Gly Glu Gly Val His Thr Leu Pro Met Gln Asn Lys Thr Lys
    210                 215                 220

Phe Cys Arg Thr Ala Tyr Met Thr Val Leu Arg Ala Leu Val Ile Thr
225                 230                 235                 240

Ala Ile Ser Ser Val Trp Lys Pro Ile Ile Leu Ala Glu Leu Leu Ile
                245                 250                 255

Glu Ala Val Tyr Trp Thr His Ile Lys Ile Ala Lys Glu Leu Ala Gly
            260                 265                 270
```

```
Ser Ser Arg Phe Val Ala Arg Phe Ile Ala Ser Ile Ile Glu Leu Asn
        275                 280                 285

Trp Ala Met Asp Glu Lys Glu Ala Ser Arg Tyr Lys Arg Phe Tyr Leu
    290                 295                 300

Leu Ser Ser Lys Ile Thr Asp Leu Met Val Lys His Lys Ile Gln Asn
305                 310                 315                 320

Glu Thr Val Lys Ser Trp Phe Glu Glu Thr Glu Ile Phe Gly Ile Gln
                325                 330                 335

Lys Val Ala Met Val Ile Arg Ala His Ser Leu Ser Leu Glu Pro Asn
            340                 345                 350

Ala Ile Leu Cys Ser Val Cys Glu Glu Lys Gln Asn Gln Lys Ala Lys
        355                 360                 365

Arg Pro Cys Pro Lys Cys Gly Ser Arg Gly Thr Gln Ile Lys Cys Gly
    370                 375                 380

Leu Thr Leu Ala Glu Phe Glu Glu Glu His Tyr Lys Lys Ile Tyr Ile
385                 390                 395                 400

Leu Glu Gly Gln Asp Glu Thr Pro Met Arg Lys Glu Glu Arg Gln Gln
                405                 410                 415

Val Thr Tyr Val Ser Arg Gly Ala Leu Phe Leu Arg Asn Leu Pro Ile
            420                 425                 430

Leu Ala Ser Lys Asn Lys Tyr Leu Leu Val Gly Asn Leu Gly Met Glu
        435                 440                 445

Leu Gln Asp Leu Glu Ser Met Gly Trp Ile Ile Arg Gly Pro Ala Val
    450                 455                 460

Cys Lys Lys Ile
465
```

<210> 23
<211> 676
<212> PRT
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 23

```
Ile His His Glu Lys Cys Arg Pro Ser Ile Pro Asp Lys Leu Met Ala
1               5                  10                  15

Phe Phe Gly Ile Met Pro Arg Gly Val Thr Pro Arg Ala Pro Thr Arg
            20                  25                  30

Phe Pro Val Ser Leu Leu Lys Ile Arg Arg Gly Phe Glu Thr Gly Trp
        35                  40                  45

Ala Tyr Thr His Pro Gly Gly Val Ser Ser Val Met His Val Thr Ala
    50                  55                  60

Gly Ser Asp Ile Tyr Val Asn Asp Ser Ile Gly Arg Thr Lys Ile Gln
65                  70                  75                  80

Cys Gln Asp Lys Asn Thr Thr Thr Asp Glu Cys Glu Tyr Gly Val Lys
                85                  90                  95
```

```
Thr Asp Ser Gly Cys Ser Asp Gly Ala Arg Cys Tyr Val Ile Asn Pro
            100                 105                 110

Glu Ala Thr Asn Ile Ala Gly Thr Lys Gly Ala Met Val His Leu Arg
        115                 120                 125

Lys Ala Gly Gly Glu Phe Asn Cys Val Thr Ala Gln Gly Thr Pro Ala
    130                 135                 140

Phe Tyr Asn Leu Lys Asn Leu Lys Gly Trp Ser Gly Leu Pro Ile Phe
145                 150                 155                 160

Glu Ala Ala Thr Gly Arg Val Val Gly Arg Val Lys Ala Gly Lys Asn
                165                 170                 175

Thr Asp Asn Ala Pro Thr Thr Ile Met Ser Gly Thr Gln Val Ala Lys
            180                 185                 190

Pro Ser Glu Cys Asp Leu Glu Ser Val Val Arg Lys Leu Glu Thr Met
        195                 200                 205

Asn Arg Gly Glu Phe Lys Gln Val Thr Leu Ala Thr Gly Ala Gly Lys
    210                 215                 220

Thr Thr Met Leu Pro Lys Leu Leu Ile Glu Ser Ile Gly Arg His Lys
225                 230                 235                 240

Arg Val Leu Val Leu Ile Pro Leu Arg Ala Ala Ala Glu Gly Val Tyr
                245                 250                 255

Gln Tyr Met Arg Thr Lys His Pro Ser Ile Ser Phe Asn Leu Arg Ile
            260                 265                 270

Gly Asp Leu Lys Glu Gly Asp Met Ala Thr Gly Ile Thr Tyr Ala Ser
        275                 280                 285

Tyr Gly Tyr Phe Cys Gln Met Asp Met Pro Arg Leu Glu Asn Ala Met
    290                 295                 300

Lys Glu Tyr His Tyr Ile Phe Leu Asp Glu Tyr His Cys Ala Thr Pro
305                 310                 315                 320

Glu Gln Leu Ala Val Met Ser Lys Ile His Arg Phe Gly Glu Ser Val
                325                 330                 335

Arg Val Ile Ala Met Thr Ala Thr Pro Ser Gly Thr Val Ser Thr Thr
            340                 345                 350

Gly Gln Lys Phe Thr Ile Glu Glu Val Val Val Pro Glu Val Met Lys
        355                 360                 365

Gly Glu Asp Leu Ala Asp Asp Tyr Ile Glu Ile Ala Gly Leu Lys Val
    370                 375                 380

Pro Lys Lys Glu Leu Glu Gly Asn Val Leu Thr Phe Val Pro Thr Arg
385                 390                 395                 400

Lys Met Ala Ser Glu Thr Ala Lys Lys Leu Thr Thr Gln Gly Tyr Asn
                405                 410                 415

Ala Gly Tyr Tyr Phe Ser Gly Glu Asp Pro Ser Ser Leu Arg Thr Thr
            420                 425                 430
```

```
Thr Ser Lys Ser Pro Tyr Ile Val Val Ala Thr Asn Ala Ile Glu Ser
        435                 440                 445

Gly Val Thr Leu Pro Asp Leu Asp Thr Val Ile Asp Thr Gly Met Lys
    450                 455                 460

Cys Glu Lys Arg Leu Arg Ile Glu Asn Lys Ala Pro Tyr Ile Val Thr
465                 470                 475                 480

Gly Leu Lys Arg Met Ala Ile Thr Thr Gly Glu Gln Ala Gln Arg Lys
                485                 490                 495

Gly Arg Val Gly Arg Val Lys Pro Gly Arg Tyr Leu Arg Gly Pro Glu
            500                 505                 510

Asn Thr Ala Gly Glu Lys Asp Tyr His Tyr Asp Leu Leu Gln Ala Gln
        515                 520                 525

Arg Tyr Gly Ile Gln Asp Ser Ile Asn Ile Thr Lys Ser Phe Arg Glu
    530                 535                 540

Met Asn Tyr Asp Trp Ala Leu Tyr Glu Glu Asp Pro Leu Lys Ile Ala
545                 550                 555                 560

Gln Leu Glu Leu Leu Asn Thr Leu Leu Ile Ser Arg Asp Leu Pro Val
                565                 570                 575

Val Thr Lys Asn Leu Met Ala Arg Thr Thr His Pro Glu Pro Ile Gln
            580                 585                 590

Leu Ala Tyr Asn Ser Leu Glu Thr Pro Val Pro Val Ala Phe Pro Lys
        595                 600                 605

Val Lys Asn Gly Glu Val Thr Asp Ala His Glu Thr Tyr Glu Leu Met
    610                 615                 620

Thr Cys Arg Lys Leu Glu Lys Asp Pro Pro Ile Tyr Leu Tyr Ala Thr
625                 630                 635                 640

Glu Glu Glu Asp Leu Val Val Asp Ile Leu Gly Leu Lys Trp Pro Asp
                645                 650                 655

Ala Thr Glu Arg Ala Val Leu Glu Val Gln Asp Ala Leu Gly Gln Ile
            660                 665                 670

Thr Gly Leu Ser
        675
```

<210> 24
<211> 63
<212> PRT
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 24

```
Ala Gly Glu Thr Ala Leu Leu Ile Ala Leu Leu Gly Trp Val Gly Tyr
1               5                  10                  15

Glu Ala Leu Val Lys Arg His Val Pro Met Val Thr Asp Ile Tyr Thr
            20                  25                  30

Leu Glu Asp Glu Lys Leu Glu Asp Thr Thr His Leu Gln Phe Ala Pro
        35                  40                  45

  Asp Asp Leu Asn Asn Ser Asp Thr Ile Glu Leu Gln Asp Leu Ser
      50                  55                  60
```

<210> 25
<211> 347
<212> PRT
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 25

```
Asn His Gln Ile Gln Gln Ile Leu Glu Gly Gly Lys Glu Tyr Val Gly
1               5                  10                  15

Gln Ala Tyr Gln Phe Leu Arg Leu Gln Ala Glu Arg Ala Ala Asn Ser
            20                  25                  30

Asp Lys Gly Lys Lys Ala Met Ala Ala Ala Pro Leu Leu Ala His Lys
        35                  40                  45

Phe Leu Glu Tyr Leu Gln Glu His Ala Gly Asp Ile Lys Lys Tyr Gly
    50                  55                  60

Leu Trp Gly Val His Thr Ala Leu Tyr Asn Ser Ile Lys Glu Arg Leu
65                  70                  75                  80

Gly His Glu Thr Ala Phe Ala Ser Leu Val Ile Lys Trp Ile Ala Phe
                85                  90                  95

Ser Ser Asp Gly Val Pro Gly Met Ile Lys Gln Ala Ala Val Asp Leu
            100                 105                 110

Val Val Tyr Tyr Ile Ile Asn Arg Pro Glu Tyr Gln Gly Asp Lys Glu
        115                 120                 125

Thr Gln Asn Ala Gly Arg Gln Phe Val Gly Ser Leu Phe Val Ser Cys
    130                 135                 140

Leu Ala Glu Tyr Thr Phe Lys Asn Phe Asn Lys Ser Ala Leu Glu Gly
145                 150                 155                 160

Leu Ile Glu Pro Ala Leu Ser Tyr Leu Pro Tyr Ala Ser Ser Ala Leu
                165                 170                 175

Lys Leu Phe Leu Pro Thr Arg Leu Glu Ser Val Val Ile Leu Ser Thr
            180                 185                 190

Thr Ile Tyr Arg Thr Tyr Leu Ser Ile Arg Lys Gly Ser Ser Gln Gly
        195                 200                 205

Leu Ala Gly Leu Ala Val Ser Ser Ala Met Glu Ile Met Asn Gln Asn
    210                 215                 220

Pro Ile Ser Val Ala Ile Ala Leu Ala Leu Gly Val Gly Ala Ile Ala
225                 230                 235                 240

Ala His Asn Ala Ile Glu Ser Ser Glu Ala Lys Arg Thr Leu Leu Met
                245                 250                 255

Lys Val Phe Val Lys Asn Phe Leu Asp Gln Ala Ala Thr Asp Glu Leu
            260                 265                 270

Val Lys Glu Asn Pro Glu Lys Ile Ile Met Ala Val Phe Glu Gly Ile
        275                 280                 285
```

```
Gln Thr Ala Gly Asn Pro Leu Arg Leu Val Tyr His Leu Tyr Ala Met
290                 295                 300

Phe Tyr Lys Gly Trp Thr Ala Ala Glu Ile Ala Glu Lys Thr Ala Gly
305                 310                 315                 320

Arg Asn Ile Phe Val Leu Thr Ile Phe Glu Gly Leu Glu Met Leu Gly
                325                 330                 335

Leu Asp Ala Asp Ser Lys Trp Arg Asn Leu Ser
            340                 345
```

<210> 26
<211> 505
<212> PRT
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 26

```
Ser Asn Tyr Leu Ile Asp Ala Val Lys Lys Ile Ile Glu Lys Met Thr
1               5                  10                  15

Lys Thr Ala Thr Ser Phe Thr Tyr Ser Phe Leu Lys Ser Leu Leu Pro
            20                  25                  30

Ala Pro Phe Ser Cys Thr Lys Ser Glu Arg Asp Pro Arg Ile Gly Trp
        35                  40                  45

Pro Gln Lys Asp Tyr Asp Tyr Leu Glu Val Arg Cys Ala Cys Gly Tyr
    50                  55                  60

Asn Arg Arg Ala Ile Lys Arg Asp Ser Gly Pro Val Leu Trp Glu Thr
65                  70                  75                  80

Leu Glu Glu Thr Gly Pro Glu Tyr Cys His Asn Arg Gly Glu Arg Gly
                85                  90                  95

Leu Ser Asn Val Lys Thr Thr Arg Cys Phe Val Gln Gly Glu Glu Ile
            100                 105                 110

Pro Pro Ile Ala Leu Arg Lys Gly Val Gly Glu Met Leu Val Lys Gly
        115                 120                 125

Val Ser Phe Arg Ile Asp Phe Asp Lys Asp Lys Ile Leu Ser Thr Asp
    130                 135                 140

Lys Trp Lys Val Pro His Arg Ala Val Thr Ser Ile Phe Glu Asp Trp
145                 150                 155                 160

Gln Gly Ile Gly Tyr Arg Glu Ala Tyr Leu Gly Thr Lys Pro Asp Tyr
                165                 170                 175

Gly Gly Leu Val Pro Arg Ser Cys Val Thr Val Thr Lys Gln Gly Leu
            180                 185                 190

Thr Phe Leu Lys Thr Ala Arg Gly Met Ala Phe Thr Thr Asp Leu Thr
        195                 200                 205

Ile Gln Asn Ile Lys Met Leu Ile Ala Thr Cys Phe Lys Asn Lys Val
    210                 215                 220

Lys Glu Gly Glu Ile Pro Ala Thr Ile Glu Gly Glu Thr Trp Ile Asn
225                 230                 235                 240
```

```
Ile Pro Leu Val Asn Glu Asp Thr Gly Thr Ile Lys Pro Ser Phe Gly
                245                 250                 255

Glu Arg Val Ile Pro Glu Pro Tyr Glu Glu Asp Pro Leu Glu Gly Pro
            260                 265                 270

Ser Val Ile Val Glu Thr Gly Gly Ile Ala Ile Asn Gln Ile Gly Val
        275                 280                 285

Asn Pro Gln Ser Ser Thr Cys Gly Thr Val Phe Thr Ala Val Lys Asp
    290                 295                 300

Leu Cys Gln Thr Val Ser Asn Lys Ala Lys Asn Ile Lys Ile Gly Phe
305                 310                 315                 320

Ser Glu Gly Gln Tyr Pro Gly Pro Gly Val Ala Lys Lys Thr Leu Asn
                325                 330                 335

Gln Leu Ile Gln Asp Glu Asp Pro Lys Pro Phe Ile Phe Val Cys Gly
            340                 345                 350

Ser Asp Lys Ser Met Ser Asn Arg Ala Lys Thr Ala Arg Asn Ile Lys
        355                 360                 365

Arg Ile Thr Thr Thr Thr Pro Glu Lys Phe Arg Asp Leu Ala Lys Asn
    370                 375                 380

Lys Lys Leu Ile Ile Val Leu Leu Gly Asp Arg Tyr His Glu Asp Ile
385                 390                 395                 400

Glu Lys Tyr Ala Asp Phe Lys Gly Thr Phe Leu Thr Arg Gln Thr Leu
                405                 410                 415

Glu Ala Leu Ala Ser Ala Lys Ala Val Glu Lys Asp Met Thr Lys Lys
            420                 425                 430

Glu Ala Ala Arg Val Leu Ala Met Glu Glu Lys Asp Glu Leu Glu Leu
        435                 440                 445

Pro Gly Trp Leu His Thr Asp Ala Pro Lys Phe Leu Asp Ile Thr Lys
    450                 455                 460

Asp Asn Ile Thr His His Leu Ile Gly Asp Met Gln Ser Leu Arg Glu
465                 470                 475                 480

Arg Ala Gly Glu Ile Gly Ala Lys Ala Thr Thr Gln Ile Thr Lys Lys
                485                 490                 495

Gly Ser Val Tyr Thr Ile Asn Leu Ser
            500                 505
```

<210> 27
<211> 693
<212> PRT
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 27

```
Thr Trp Trp Glu Ser Glu Arg Leu Ala Ser Leu Glu Pro Leu Phe Arg
1               5                  10                  15

Glu Leu Leu Ser Lys Cys Arg Pro Val Asp Arg Glu Thr Tyr Lys Asn
            20                  25                  30
```

```
Cys His Phe Ala Thr Ala Ala Gln Leu Ala Gly Gly Asn Trp Val Pro
        35                  40                  45

Val Ala Pro Val Val His Leu Gly Glu Ile Pro Val Lys Lys Lys Lys
    50                  55                  60

Thr Leu Pro Tyr Glu Ala Tyr Lys Leu Leu Lys Glu Met Val Asp Ser
65                  70                  75                  80

Glu Lys Glu Phe His Lys Pro Val Ser Arg Glu Lys His Gln Trp Ile
                85                  90                  95

Leu Asn Lys Val Lys Thr Gly Gly Asp Leu Gly Leu Lys Asn Leu Val
            100                 105                 110

Cys Pro Gly Arg Val Gly Glu Pro Ile Leu Arg Glu Lys Lys Lys Phe
        115                 120                 125

Asn Ile Tyr Asn Lys Arg Ile Thr Ser Thr Met Leu Ser Val Gly Ile
    130                 135                 140

Arg Pro Glu Lys Leu Pro Val Val Arg Ala Gln Thr Ser Thr Lys Glu
145                 150                 155                 160

Phe His Glu Ala Ile Arg Asp Lys Ile Asp Lys Lys Ala Asn Thr Gln
                165                 170                 175

Thr Pro Gly Leu His Lys Glu Leu Leu Glu Ile Phe Asn Ser Ile Cys
            180                 185                 190

Ala Ile Pro Glu Leu Arg Asn Thr Tyr Lys Glu Val Asp Trp Asp Val
        195                 200                 205

Leu Thr Ser Gly Ile Asn Arg Lys Gly Ala Ala Gly Tyr Phe Glu Lys
    210                 215                 220

Met Asn Ile Gly Glu Ile Ile Asp Ser Asp Lys Lys Ser Val Glu Gln
225                 230                 235                 240

Leu Ile Lys Arg Met Lys Ser Gly Leu Glu Phe Asn Tyr Tyr Glu Thr
                245                 250                 255

Ala Ile Pro Lys Asn Glu Lys Arg Ala Val Val Asp Asp Trp Met Glu
            260                 265                 270

Gly Asp Tyr Val Glu Glu Lys Arg Pro Arg Val Ile Gln Tyr Pro Glu
        275                 280                 285

Ala Lys Met Arg Leu Ala Ile Thr Lys Val Met Tyr Asn Trp Val Lys
    290                 295                 300

Gln Lys Pro Ile Val Ile Pro Gly Tyr Glu Gly Lys Thr Pro Leu Phe
305                 310                 315                 320

His Val Phe Asp Lys Val His Lys Glu Trp Lys Asn Phe Asn Ser Pro
                325                 330                 335

Val Ala Val Ser Phe Asp Thr Lys Ala Trp Asp Thr Gln Val Thr Pro
            340                 345                 350

Lys Asp Leu Leu Leu Ile Ser Glu Ile Gln Lys Tyr Tyr Tyr Lys Lys
        355                 360                 365
```

```
Glu Tyr His Arg Phe Ile Asp Asn Leu Thr Glu Lys Met Val Glu Val
    370                 375                 380

Pro Val Val Cys Glu Asp Gly Asn Val Tyr Ile Arg Glu Gly Gln Arg
385                 390                 395                 400

Gly Ser Gly Gln Pro Asp Thr Ser Ala Gly Asn Ser Met Leu Asn Val
                405                 410                 415

Leu Thr Met Ile Tyr Ala Phe Cys Lys Ala Asn Ser Ile Pro Tyr Ser
            420                 425                 430

Ala Phe His Arg Val Ala Lys Ile His Val Cys Gly Asp Asp Gly Phe
        435                 440                 445

Leu Ile Thr Glu Lys Ser Phe Gly Glu Ala Phe Ala Ile Lys Gly Pro
    450                 455                 460

Gln Ile Leu Met Glu Ala Gly Lys Pro Gln Lys Leu Ile Gly Glu Phe
465                 470                 475                 480

Gly Leu Lys Leu Ala Tyr Lys Phe Asp Asp Ile Glu Phe Cys Ser His
                485                 490                 495

Thr Pro Ile Lys Val Arg Trp Ala Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Met Pro
            500                 505                 510

Gly Arg Asp Thr Ala Thr Ile Leu Ala Lys Met Ala Thr Arg Leu Asp
        515                 520                 525

Ser Ser Gly Glu Arg Gly Thr Glu Gly Tyr Glu Leu Ala Val Ala Phe
    530                 535                 540

Ser Phe Leu Leu Met Tyr Ser Trp Asn Pro Leu Val Arg Arg Ile Cys
545                 550                 555                 560

Leu Leu Val Met Ser Thr Ile Asp Thr Lys Glu Ala Ser Gln Asn Asn
                565                 570                 575

Thr Ile Tyr Thr Phe Arg Gly Asp Pro Ile Gly Ala Tyr Thr Glu Val
            580                 585                 590

Ile Gly Tyr Arg Leu Asp Gln Leu Lys Gln Thr Glu Phe Ser Lys Leu
        595                 600                 605

Ala Gln Leu Asn Leu Ser Met Ala Ile Leu Gln Ile Tyr Asn Lys Asn
    610                 615                 620

Thr Thr Lys Arg Leu Ile Glu Asp Cys Val Lys Leu Gly Asn Gln Asn
625                 630                 635                 640

Lys Gln Ile Leu Val Asn Ala Asp Arg Leu Ile Ser Lys Lys Thr Gly
                645                 650                 655

Tyr Thr Tyr Glu Pro Thr Ala Gly His Thr Lys Ile Gly Lys His Tyr
            660                 665                 670

Glu Glu Ile Asn Leu Leu Lys Asp Thr Pro Gln Lys Thr Val Tyr Gln
        675                 680                 685

Gly Thr Glu Arg Tyr
    690
```

<210> 28
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR CR39F (63) en el ejemplo 4

<400> 28
cacatctagc agcagactat ga 22

<210> 29
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR CR39R (190) en el ejemplo 4

<400> 29
gtaccagttg caccaccc 18

<210> 30
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anidado directo de PCR CR39FN (87) en el ejemplo 4

<400> 30
tgaaaaggat tcacgg 16

<210> 31
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR ER510F (7) en el ejemplo 4

<400> 31
aaaccgacga agtagacc 18

<210> 32
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR ER510R (213) en el ejemplo 4

<400> 32
agacgagaac atagtggc 18

<210> 33
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anidado directo de PCR ER510FN (68) en el ejemplo 4

<400> 33
gaaacagtaa agccaacg 18

<210> 34
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anidado inverso de PCR ER510RN (182) en el ejemplo 4

<400> 34
ctggtaatcg gaaacatc 18

<210> 35
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR ER62F (203) en el ejemplo 4

<400> 35
gggaccgagg gatacga 17

<210> 36
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anidado directo de PCR ER62FN (373) en el ejemplo 4

<400> 36
agaggtaatt gggtat 16

<210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR ER62R (637) en el ejemplo 4

<400> 37
cagcaggttg atttcttcat 20

<210> 38
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anidado inverso de PCR ER62RN (516) en el ejemplo 4

<400> 38
ttgccaagtt tcac 14

<210> 39
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR ER55F (31) en el ejemplo 4

<400> 39
aaaccgccga agtaaacc 18

<210> 40
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR ER55R (214) en el ejemplo 4

<400> 40
ctggagccct ggtaatgg 18

<210> 41
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anidado directo de PCR ER55FN (64) en el ejemplo 4

<400> 41
gacgggaatg ggttca 16

<210> 42
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anidado inverso de PCR ER55RN (162) en el ejemplo 4

<400> 42
taggtgcttc ttattggtat 20

<210> 43
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR JFP1F en el ejemplo 5

<400> 43
catgcccata gtaggac 17

<210> 44
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR JFRR3R en el ejemplo 5

<400> 44
accagttrca ccamccat 18

<210> 45
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR CR39-ER55PCRF en el ejemplo 5

<400> 45
agggctctca catggttgtc 20

<210> 46
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR ER55-510-512 R en el ejemplo 5

<400> 46
ccattaccag ggctccag 18

<210> 47
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador directo de PCR CR39F(63) en el ejemplo 5

<400> 47
cacatctagc agcagactat ga 22

<210> 48
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR ER55RN (162) en el ejemplo 5

<400> 48
taggtgcttc ttattggtat 20

<210> 49
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR ER55-510-512F en el ejemplo 5

<400> 49
cgttggcttt actgtttcat tg 22

<210> 50
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR CR316-CR24R en el ejemplo 5

<400> 50
tccccgaagc ttggtttaat 20

<210> 51
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR NS3F en el ejemplo 5

<400> 51
gtcaggcctg cctatctttg 20

<210> 52

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de CR316-CR24R en el ejemplo 5

<400> 52
tccccgaagc ttggtttaat 20

<210> 53
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR CR316-CR24F en el ejemplo 5

<400> 53
cgggaccatt aaaccaagc 19

<210> 54
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR ER62-ER63R en el ejemplo 5

<400> 54
caggggttc caagaataca 20

<210> 55
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR 5utr (140)R en el ejemplo 5

<400> 55
ggtgtactca ccgcttagcc 20

<210> 56
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR NPRO(630)RS en el ejemplo 5

<400> 56
ttgctacaat cgcccttctt 20

<210> 57
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR NPRO(779)FS en el ejemplo 5

<400> 57
agggagaatg acagggtctg 20

<210> 58

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR Cápside (927)FS en el ejemplo 5

<400> 58
acaaaggagc aaaacccaag 20

<210> 59
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR EO(1365)RS en el ejemplo 5

<400> 59
gtcacgttgg tggaccctac 20

<210> 60
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR E1(2402)RS en el ejemplo 5

<400> 60
agccagaaat gccacagc 18

<210> 61
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR E1(2606)FS en el ejemplo 5

<400> 61
acctgtgtgg gtgctaacat 20

<210> 62
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR E2(3086)RS en el ejemplo 5

<400> 62
ttactttgtc ttcccgttgc 20

<210> 63
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR NS2(4409)FS en el ejemplo 5

<400> 63
ccaagaaact tccccatacg 20

<210> 64

<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de PCR ns2(4460)RS en el ejemplo 5

<400> 64
ttccacatcc tctttcttct ttt 23

<210> 65
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR NS3(5170)RS en el ejemplo 5

<400> 65
gctggccctc gaatgatcca 20

<210> 66
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR NS3(5468)FS en el ejemplo 5

<400> 66
gttccctgtg tccttgctga 20

<210> 67
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR NS3(5670)RS en el ejemplo 5

<400> 67
tgtttttgtc ttggcactgg 20

<210> 68
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR NS3(6296)FS en el ejemplo 5

<400> 68
gagcacaaca gggcagaaat 20

<210> 69
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR NS3(6479)RS en el ejemplo 5

<400> 69
ccatcttcct tgtaggcaca 20

<210> 70
<211> 20

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR NS3F(6525)F en el ejemplo 5

<400> 70
gtcaggcctg cctatctttg 20

<210> 71
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR NS3(7153)FS en el ejemplo 5

<400> 71
ggagaagtca ctgacgcaca 20

<210> 72
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR NS3(7241)RS en el ejemplo 5

<400> 72
gccatttcaa tcccagtatg 20

<210> 73
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR NS4B(7715)FS en el ejemplo 5

<400> 73
ggggtccaca cagcattgta 20

<210> 74
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR NS4B(7893)RS en el ejemplo 5

<400> 74
cccttgatac tcacgcctgt 20

<210> 75
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR NS4B(8532)FS en el ejemplo 5

<400> 75
gccgactcaa aatggagaaa 20

<210> 76
<211> 21

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR NS5A(8810)RS en el ejemplo 5

<400> 76
gccaccctat tcttggatct c 21

<210> 77
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR NS5B(10889)FS en el ejemplo 5

<400> 77
aaatgagaag agggcagtgg 20

<210> 78
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR NS5BF-10936 en el ejemplo 5

<400> 78
aaggccacca ctcaaatcac 20

<210> 79
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR NS5BR-12039 en el ejemplo 5

<400> 79
aggcttctgc ttgacccagt 20

<210> 80
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR CR24R en el ejemplo 6

<400> 80
tccccgaagc ttggtttaat 20

<210> 81
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador 1 de PCR mezclado con cebador A Universal BD en el ejemplo 6

<400> 81
ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt 45

<210> 82
<211> 22

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador 2 de PCR mezclado con cebador A Universal BD en el ejemplo 6

<400> 82
ctaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 83
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR cebador A Universal anidado BD en el ejemplo 6

<400> 83
aagcagtggt atcaacgcag at 22

<210> 84
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR de Taqman en el ejemplo 7

<400> 84
cagttggtgt gatccatgat cct 23

<210> 85
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de PCR de Taqman en el ejemplo 7

<400> 85
ggcctcaccc tgcaacttt 19

<210> 86
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda Taqman en el ejemplo 7

<220>
<221> misc_feature
<222> <1...1>
<223> 6-Carboxifluoresceína (6F)

<220>
<221> misc_feature
<222> <19...19>
<223> Aglutinantes del surco menor/inactivador no fluorescente (MGBNFQ)

<400> 86
aagtcttcag cagttaact 19

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia aislada de nucleótidos de ARN o ADN del virus PMC que se une al ácido nucleico de PMC en condiciones rigurosas de hibridación **caracterizada porque** dicha secuencia aislada de nucleótidos de ARN o ADN del virus PMC consiste en:

a) la SEC ID Nº 6, en la que cuando la secuencia aislada de nucleótidos de ARN o ADN es una secuencia de nucleótidos de ARN, los nucleótidos de timidina (t) están sustituidos con nucleótidos de uridina (u);
b) una secuencia de ARN o ADN que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia sobre al menos 100 nucleótido con la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID Nº 6; o
c) una secuencia de nucleótidos de ARN o ADN que comprende el complemento de la secuencia de nucleótidos de (a) o (b).

2. Un método para detectar la presencia o la ausencia de ácidos nucleicos del virus PMC en una muestra biológica, incluyendo el método las etapas de:

a) poner la muestra biológica que contiene ácido nucleico en contacto con una sonda polinucleotídica o un cebador que comprende una secuencia aislada de nucleótidos de ARN o ADN de acuerdo con la reivindicación 1, en condiciones rigurosas de hibridación; y
b) detectar cualquier dúplex formado entre la sonda o el cebador y los ácidos nucleicos en la muestra.

3. Un método para la detección de ácidos nucleicos del virus PMC presentes en una muestra biológica, incluyendo el método las etapas de:

a) amplificar los ácidos nucleicos con al menos un cebador que comprende una secuencia aislada de nucleótidos de ARN o ADN de acuerdo con la reivindicación 1, y
b) detectar las secuencias de nucleótidos amplificadas.

4. Un método para la detección de ácidos nucleicos del virus PMC presentes en una muestra biológica, incluyendo el método las etapas de:

a) hibridar los ácidos nucleicos de la muestra biológica en condiciones rigurosas de hibridación con una o más sondas que comprenden una secuencia aislada de nucleótidos de ARN o ADN de acuerdo con la reivindicación 1,
b) lavar en condiciones apropiadas, y
c) detectar los híbridos formados.

5. Un método para cribar el tejido de sujetos para ácidos nucleicos del virus PMC, comprendiendo el método las etapas de:

a) extraer el ADN del tejido *ex vivo*;
b) escindir con enzimas de restricción dicho ADN;
c) someter a electroforesis los fragmentos; y
d) realizar transferencia de Southern del ADN genómico de los tejidos y posterior hibridación en condiciones rigurosas de hibridación con una secuencia de nucleótidos de ADN clonada marcada de acuerdo con la reivindicación 1.

Figura 1

```
gtataacgac agtagttcaa gtgtcgttat gcatcattgg ccataacaaa ttatctaatt      60
tggaataggg acctgcgacc tgtacgaagg ccgagcgtcg gtagccattc cgactagtag     120
gactagtaca aataggtcaa ctggttgagc aggtgagtgt gctgcagcgg ctaagcggtg     180
agtacaccgt attcgtcaac aggtgctact ggaaaggatc acccactagc gatgcctgtg     240
tggacgagga catgtccaag ccaatgttat cagtagcggg ggtcgttact gagaaagctg     300
cccagaatgg gtagttgcac atacagtctg ataggatgcc ggcggatgcc ctgtattttg     360
accagtataa atattatccg ttgtaaagca tatgaatact tttacttta atacatatgg      420
agggagtgag gaaggaaaca tgttctttag aactgcaccc acgccgccac cagggtgcca     480
agaaccggtt tacacaagca caatgagacc aatttttggc gaaccccatc cacctctaca     540
caaacacagc acgttaaaat tgccacattg gaggggggatc aaaacaatta gagttaagaa     600
gagagaattg ccaaagaagg gcgattgtag caactcaaca acagctccca cttcgggggt     660
gtacgttgaa ttaggggctg tgttctataa agattacacg ggcacggtat accatcgtgt     720
accgctagaa ctttgtacaa accaagagag gtgcgaggga tccaagtgtg tagggagaat     780
gacagggtct gatggcaggt tgtacaacgt tttagtatgt ccggacgatt gtatcctctt     840
tgagagacac tgtagaggtc aaacagtcgt cctgaaatgg atttccaacc ccttgacatc     900
accactttgg gtccagagtt gttctgacga caaaggagca aaacccaagg tgaaaccaaa     960
agacgacagg atgaagcaag gaaaaatagt gacaaagcct aaagagactg aagcagatca    1020
aaaaactaga ccaccagatg ccacgatagt ggttgacggg cagaagtatc aggtgaggaa    1080
gaaggggaaa gcgaaaccca agactcaaga cggcttatac cacaacaaga acaaaccaga    1140
agcgtccagg aagaagcttg agaaggcctt gctagcatgg gcaatattag cctgcctatt    1200
ggtggtaccg gtagggtcca ccaacgtgac acaatggaac ttatgggaca ataaaagtac    1260
tacagacata catagcgtca tgttttctag agggattaaa aggagtctgc atggaatttg    1320
gcccacacaa atctgcaaag ggatccctac acatctagca gcagactatg aactgaaaag    1380
gattcacggg atggtggatg caagccccat gaccaacttc acatgttgta ggctacagag    1440
acatgagtgg aacaagcatg ggtggtgcaa ctggtacaat atagagccgt ggatcaatct    1500
catgaataat acccaaggac tattaaacac tggagacaat ttcactgagt gcgcagtcac    1560
atgcaggtat gatgcagact taggggtgaa tatagtgact caagccagga ctactccaac    1620
tatcctgact ggctgtaaga aagggcacaa cttctctttc tcaggggagg tcagggcctc    1680
accctgcaac tttgagttaa ctgctgaaga cttgctcagg atcatggatc acaccaactg    1740
cgagggattt acctacttcg gggaaggaat cgttgacggt tacaccgagg tagtagagaa    1800
ggccaggtca agtggtttca gggctctcac atggttgtcg agtaagattg aaaacaccaa    1860
gaaaaaaata ttcggagctg aagccagtcc ttactgccca gtggctaaga gggtcttcaa    1920
cattatttat accaacaatt gcaccccgct tggactgcca gataagtcaa aaattatagg    1980
accaggaacc tttgacatca gtggcaggga tgaattcata tttccaaaac tcccctacca    2040
cgtagatgac ttcattctac tgagcttaat tgcaatgtct gattttgctc cagagacatc    2100
aagtataatc tacctggctt tgcactacct aatgccaagt aatgacaaca gggacttcgt    2160
gatggacctg gacccaaata aactaaacct tactgcaact aaatccgtgg caagtgtggt    2220
ccctacatcg gtgaatgtgt taggtgaatg ggtgtgcgtc aaaccaagtt ggtggcctta    2280
ttccgccgaa atcactaatc tgataggagg tgtcatcacc gtggcagact tagttatcaa    2340
gaccattgaa gaattgctaa atttgtggac cgaagcaaca gctgtggcat ttctggctgc    2400
tctaataaaa atttttagag gccagccgat ccaagcggta gcatggttaa tcatcatagg    2460
gggagcacaa gcccaaacct gcaaccctga attcatgtac gcattagcga aaaataccag    2520
cataggttca ttaggaccag aatcactgac gacaaggtgg taccaactaa ccagcggttt    2580
caaactcact gacagcacga ttgaagtcac ctgtgtgggt gctaacatga ggattcatgt    2640
agtgtgccca cttgtaagtg acagatattt ggccataaac caccctagag cactgccaac    2700
aacggcgtgg ttcaggaaaa tacacactca gcatgaggta ccaagagaaa gaatcatgag    2760
tgagtcaaaa aggaggtaca cttgtccttg tggttctaaa ccagtggtga ggtcaacaac    2820
acaattcaac ccaatatcta tatctacccc aagctttgaa cttgaatgcc ctaggggttg    2880
gactggggct gtagagtgta cactagtctc cccatcaact ctgacaacag agactatatt    2940
cacatacagg aagcccaaac cattcggact tgaaaactgg tgcaagtata cagtggtgga    3000
gaaagggatc ctgtattctt gtaaatttgg gggcaattca acatgcatca aagggcttat    3060
agttaaaggg caacgggaag acaaagtaag gtactgtgaa tggtgtggtt ataagttcag    3120
ttcaccaaat ggactgcctc agtatccact gggattgtgt gagaaagaac aatcagaagg    3180
actcagggat tatggtgact tcccatgctg caacaacggc acttgtattg acaaagaagg    3240
tagtgtgcaa tgctacatag gggataagaa agttaccgtg aagctgtata atgcctcact    3300
attggccccc atgccctgca aacccatagt gtataactcc caggggcccc cagcgcctaa    3360
gacctgcact tataggtggg cctcaacatt agaaaataaa tattatgaac ccagggacag    3420
ctactaccag caatacatta taaagtcagg gtatcaatat tggtttgatc tcacagcaaa    3480
ggatcatgtg gcagactgga tcacaaaata ctttccaata ataatagtgg ccttgttagg    3540
gggcagaggc accttgtggg tgttgatagc ttatgagttg ctaactcagt atgaggtagt    3600
```

aggagacgag aacatagtgg ctcaagctga agccctggta atcggaaaca tcttgatgag 3660
tttagactta gagataatta gctgcttcct tctgttgttg atcgtggtga aaaaacaagc 3720
tgtcaggaga acgttggctt tactgtttca ttggataact atgaacccat tccagtcagt 3780
aatgatcaca gtggtctact tcgtcggttt ggtgagggcc gaagagggaa ctaaagaggg 3840
tagtacaagc gggccaccaa tccatgtagt tgcaatactg ttattcctct tgtaccacac 3900
agtgaagtat aaggacttta acatagcaat gatcttactt ataacattgt ccctgaaaag 3960
ctcatcctac atacatacca gcttgtatga aattccattg cttgtggctg taataagtct 4020
cacatgctcc atatacattt ttgacttgca ggtaaagagc aagctagtgg ccccaactat 4080
aggtataatt ggagttaccc tagcaatgag agttttgtgg ctggtaaggc aaatgactat 4140
accaaccccc tctgtgtcca ttagtctgat agatccaaag atggtcataa tactctactt 4200
gatatcccta actattacag tcaatcacaa cctagaccta gcaagttatt gcttgaaact 4260
gggacctttt atcctatcat tcctaacaat gtgggtggat gttgtcatcc tcctgctcat 4320
gctgccttgg tacgaactag taaaagtcta ctacctaaaa aagaagaaag aggatgtgga 4380
aacatggttc caaaattcag gaatatccac ccaagaaact tccccatacg gatttgattt 4440
ttctagcccc ggggagggag tgcacacact accaatgcaa aataaaacca aattttgtag 4500
gactgcttac atgactgtac taagggcttt ggtgataaca gccatcagca gtgtctggaa 4560
accaataatt ttagcagaac tcctaataga ggcagtgtat tggacacaca ttaaaatagc 4620
caaagaattg gcggggtcaa gcaggttcgt tgctaggttc attgcatcta ttatagagtt 4680
gaattgggcc atggacgaaa aagaagcatc tcggtacaaa agattttacc tattatcatc 4740
caaaataaca gatctaatgg ttaagcacaa aatccaaaat gagacagtaa aatcctggtt 4800
tgaagaaact gaaatatttg gaatacaaaa agtggcaatg gtgataaggg ctcattctct 4860
gagtttggag ccaaatgcca tcctttgctc cgtttgtgaa gaaaaacaaa atcaaaaagc 4920
caaaaggccc tgccctaagt gtggtagtag aggcactcaa ataaagtgtg ggctgacact 4980
ggccgagttt gaggaagaac attacaaaaa aatatacatc ctcgaaggcc aagatgaaac 5040
tcccatgagg aaagaagaaa gacagcaagt aacttatgtc tctaggggtg ctctgttcct 5100
taggaatctt cctatcttag cttcaaaaaa caaataccta cttgtaggca atctgggtat 5160
ggaattgcaa gatttggaaa gtatgggatg gatcattcga gggccagccg tctgcaagaa 5220
gataatacac catgagaaat gcaggccttc aataccagac aaactcatgg cattcttcgg 5280
gattatgcct aggggagtta caccaagagc ccctacacgg ttccctgtgt ccttgctgaa 5340
gataagacgg ggttttgaga ccggctgggc ctacacacac cctggagggg taagtagtgt 5400
gatgcatgtc accgctgggt cggatatata tgtcaatgac tcaataggga ggacaaaaat 5460
ccagtgccaa gacaaaaaca ctacaacaga tgagtgtgaa tatggtgtga aaacagactc 5520
agggtgctct gatggagctc ggtgctatgt catcaaccct gaagcaacca acatagcagg 5580
gaccaagggg gccatggtac acctgaggaa agctggagga gagttcaact gcgtgactgc 5640
ccagggtacc cccgccttct ataatctaaa gaacttaaaa ggatggtcag gcctgcctat 5700
ctttgaagct gccacaggaa gagtggtagg aagggtaaaa gcaggaaaaa acactgacaa 5760
tgctccaaca accattatgt cagggacgca agtggcaaaa ccatcagagt gtgacctaga 5820
atcagtggtg aggaaactag agacaatgaa cagaggggaa ttcaaacaag tgactctggc 5880
tacaggcgca ggaaagacaa ccatgctacc aaagctgtta atagaatcca taggcaggca 5940
taagagagtg ttagtactga tcccgttgag agctgcagcg gaggggggtgt accagtacat 6000
gagaaccaaa cacccaagca tatctttcaa cttgaggata ggggatctga aagaaggtga 6060
catggcaact gggatcacct atgcctctta tgggtacttc tgccaaatgg acatgcctag 6120
actggagaat gcaatgaagg aataccacta tattttcttg gatgaatatc actgtgccac 6180
accagaacag ttggcagtga tgtcaaaaat acataggttc ggtgaatcag ttagggtaat 6240
agccatgacc gccacgccat ccgggactgt gagcacaaca gggcagaaat tcacaattga 6300
ggaggtggta gtacctgaag tgatgaaggg ggaggacctt gctgatgatt acatcgaaat 6360
agcagggttg aaggtgccaa agaaagagtt agagggtaac gtactgactt ttgtgcctac 6420
aaggaagatg gcatcggaaa cagcaaaaaa attaaccaca cagggataca atgctggata 6480
ctacttcagt ggagaagatc catcatccct gcggacaact acttctaagt caccatatat 6540
agtagttgca accaatgcca ttgaatccgg ggtaacctta ccggaccttg atacagtaat 6600
agatacaggc atgaagtgtg aaaagagact aagaatcgaa aacaaagctc cctacatcgt 6660
aacaggactg aaaagaatgg ctataacaac gggggagcaa gctcaaagaa aaggtagggt 6720
aggcagggtt aaacctggga ggtacttgag aggacctgaa aacactgcag gtgaaaagga 6780
ctatcactat gacctttttac aggcacagag gtacggcatc caagactcaa taaacatcac 6840
caagtctttc agggagatga actatgattg ggcattatat gaggaagacc cgttaaagat 6900
tgcccaatta gagttgctaa acacactcct gatctcaagg gatctgccag tagtaacaaa 6960
aaatctgatg gcccgcacaa cacatcccga acctatacaa ttggcttaca atagtttaga 7020
aacccctgta ccggtggcat tcccaaaagt gaaaaatgga gaagtcactg acgcacatga 7080
aacttacgag ttgatgacct gtaggaagct tgagaaagac ccccctatat acctgtatgc 7140
aacagaagaa gaagatctcg tagtggacat actgggattg aaatggccag acgccacaga 7200
gagggctgtc ttggaagtgc aagacgccct gggccagatc acaggtttat ctgcagggga 7260
gacagcttta ctcatagccc tattagggtg ggtgggctac gaagccttgg tgaagaggca 7320
cgtgcctatg gtgacagaca tatacaccct agaagatgaa aaattggaag acactacaca 7380
cctacaattt gccccagatg atctgaacaa ttcagatacc attgagctcc aagacttatc 7440

```
gaatcaccaa atccaacaaa ttctagaagg tgggaaggaa tatgtcggcc aagcctacca   7500
attcctcagg ttgcaagctg agagggctgc caactcagac aaaggcaaga aagcaatggc   7560
agcggcccca ttactagccc acaagttcct ggaatacttg caagagcatg caggtgacat   7620
aaagaagtat ggtctatggg gggtccacac agcattgtat aacagcataa aagaaagact   7680
gggtcacgaa actgcattcg catctctggt tataaaatgg attgcctttt cctcagatgg   7740
agtcccgggg atgattaagc aagcagcagt agacttggtg gtatactata taatcaacag   7800
gcctgagtat caaggggata aggagacaca gaatgcaggt agacaatttg ttggctccct   7860
ttttgtttca tgtctagcag agtacacatt caaaaacttc aataaatcag cattagaagg   7920
attgatcgag cctgccttaa gctatctacc ctacgcttca agcgcactaa agttattcct   7980
accgactaga cttgaaagtg tagtgatact gtccactact atatacagaa catacttatc   8040
aatcaggaaa ggatctagtc agggtttagc cgggctggca gttagctcag cgatggagat   8100
catgaaccag aacccaatca gcgtggctat tgcactggca ctaggagtcg gagcaatagc   8160
ggcacataat gccattgaga gcagtgaggc aaaaaggact ctcctgatga aggtctttgt   8220
taagaacttt ttggaccaag cagccactga tgagcttgtg aaagagaacc ctgagaagat   8280
cataatggca gtgtttgagg gcattcaaac agctggaaat ccattgagac ttgtatacca   8340
tctatatgca atgttctaca aagggtggac tgccgcggaa atagctgaaa aaaccgctgg   8400
taggaacatt tttgtgttaa caatatttga aggattggaa atgttaggcc tggatgccga   8460
ctcaaaatgg agaaatctga gctctaatta tcttattgat gcagtgaaga aaatcattga   8520
aaaaatgact aaaacagcaa caagcttcac ctacagcttt ttgaaatctt tgcttcctgc   8580
ccccttctcg tgtactaaat cagaaagaga tccaagaata gggtggcccc aaaaagacta   8640
cgactacctc gaggtccgat gcgcttgtgg gtataacagg agagctataa aaagagactc   8700
aggacctgtg ttatgggaga ccttagagga gacgggtcca gagtactgcc acaacagagg   8760
tgaaaggggg ctcagcaatg tgaagactac tagatgcttt gtccaaggag aggaaatccc   8820
tccaattgca ctgaggaaag gagtaggtga gatgttggtc aagggtgttt cattcagaat   8880
agattttgat aaagacaaga tactttcaac agacaagtgg aaggtaccac atagggcagt   8940
tacatcaatc tttgaggatt ggcagggtat tggttacaga gaggcttacc tagggaccaa   9000
accagactat gggggtctgg tgcccagatc ttgtgtaact gtaacaaaac aagggttaac   9060
attcttgaaa actgccagag gcatggcttt cacgactgac ctgaccatcc agaacatcaa   9120
aatgctgata gctacatgct tcaagaacaa ggtgaaggaa ggggagatac cagctacgat   9180
tgaaggggaa acatggatca acataccact agtgaatgag gacaccggga ccattaaacc   9240
aagcttcggg gaaagagtga ttcccgaacc atatgaggag gacccacttg aaggcccaag   9300
tgtaatcgtt gaaacaggag gcatagccat caaccaaata ggggtcaatc cacaatccag   9360
tacatgtgga acagttttta cagcagtgaa ggatctgtgc caaacagtta gtaataaagc   9420
caagaatatc aaaattgggt tttcggaagg ccaataccca ggtccagggg ttgcaaagaa   9480
gacactgaac cagctcatac aagatgaaga cccaaaacca ttcatatttg tttgtggctc   9540
tgacaagtca atgtctaatc gggcaaaaac tgcgaggaac atcaagagaa tcaccaccac   9600
aacacctgag aaattcagag acttggcaaa aaacaagaaa ttgataattg tgctgttagg   9660
tgatagatac catgaagata tagaaaagta tgcagacttc aagggcacct tcttgaccag   9720
acaaaccttg gaagcactag caagtgccaa agctgtagag aaggacatga ccaagaaaga   9780
agcagcaaga gtattggcaa tggaagaaaa ggatgaacta gaactcccag ggtggctgca   9840
tacagatgca cccaaattcc tagacattac taaggacaac atcacacatc acctaatagg   9900
ggacatgcag agtctgagag aaagagcagg ggagatagga gcaaaggcca ccactcaaat   9960
cactaagaaa gggagtgtat acacaatcaa tctgagtacg tggtgggagt cagagaggtt  10020
ggcatctttg gaacctttgt tccgggaact actatctaaa tgcaggccag tggacaggga  10080
gacatataag aattgtcatt ttgcaacagc agcccaactt gccggaggaa actgggtacc  10140
ggtagcacca gttgtacatc ttggggaaat tccggtaaag aagaaaaaga ctctccccta  10200
cgaggcatac aagctcctaa aagagatggt tgactcggag aaggaattcc ataaaccagt  10260
gagcagggaa aaacaccaat ggatactgaa caaagtgaaa actggtggtg acctcggctt  10320
aaaaaatcta gtatgtccag gtagggttgg agaaccaatc ctaagagaga agaagaaatt  10380
caacatttac aacaagagga ttaccagtac tatgttatca gtagggataa ggccagaaaa  10440
attgccagtg gtaagagccc agaccagtac caaagaattt catgaagcaa taagggacaa  10500
aatagacaaa aaagcaaaca cacagacccc aggcctacac aaagaattgt tggagatatt  10560
caactcaata tgtgccatcc ccgaacttag aaatacctac aaagaggttg attgggacgt  10620
tctaacctca ggcataaata ggaaaggtgc agccgggtac ttcgaaaaaa tgaacatagg  10680
ggagatcata gatagtgaca aaaaatcagt ggaacaactc ataaagagaa tgaaatcagg  10740
gctagaattc aactactatg agactgcaat accaaaaaat gagaagaggg cagtggtaga  10800
tgattggatg gaaggtgact atgtagaaga aaaaagacca agagtcatac agtatcctga  10860
ggcaaagatg agattagcta taaccaaagt aatgtataac tgggtcaagc agaagcctat  10920
agtaatccct ggatacgaag gtaagactcc tttgtttcat gttttcgaca aggtccacaa  10980
agaatggaaa aatttcaaca gtccagttgc agtcagtttt gacactaaag cctgggacac  11040
acaagtaaca cccaaagacc ttctcctcat atcagaaatc caaaagtatt attacaagaa  11100
agaataccat agattcatag ataatttgac cgagaaaatg gtggaggtac cagtggtttg  11160
tgaagacgga aacgtctaca taagagaagg tcagagggga agtggtcaac cagacactag  11220
cgcaggtaat agtatgttga atgtactgac tatgatatat gccttctgca aagctaactc  11280
```

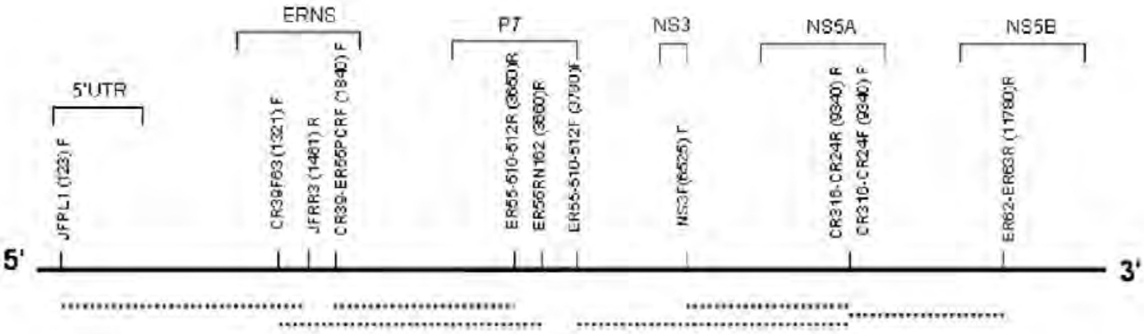
```
catcccttac tcagccttcc acagggtagc aaagatacat gtgtgtggag atgatggttt   11340
cttgataact gagaaaagtt ttggtgaggc ctttgcgatc aaggggcctc aaattttgat   11400
ggaagcagga aaaccacaaa aacttatagg tgaatttgga ctgaaattgg catataaatt   11460
tgatgacatt gaattttgct cgcatacacc aataaaggtc aggtgggctg acaacaacac   11520
atcatacatg cccggaagag acacagctac cattctagct aaaatggcaa cccgccttga   11580
ctctagtggg gagaggggga ccgagggata cgagctggcc gtggccttca gtttcttact   11640
aatgtattct tggaaccccc tggtaagaag aatatgcctg cttgtcatgt ctacaattga   11700
cacaaaagaa gctagccaaa ataacactat atatacattt agggggggatc ccataggtgc   11760
ctacacagag gtaattgggt ataggctgga ccaactaaaa cagacagagt tctctaaatt   11820
ggctcagctg aatttgtcaa tggcaatact tcaaatatac aataaaaaca caaccaagag   11880
actcatcgaa gattgtgtga aacttggcaa ccaaaataag caaatattgg tgaatgcaga   11940
ccgtttgatc agcaagaaaa cgggctacac atatgagcca acagctggcc acactaagat   12000
aggcaagcac tatgaagaaa tcaacctgct gaaagataca ccacaaaaaa ctgtctacca   12060
aggaactgaa aggtata                                                  12077
```

Figura 2

```
GGSEEGNMFF RTAPTPPPGC QEPVYTSTMR PIFGEPHPPL HKHSTLKLPH WRGIKTIRVK      60
KRELPKKGDC SNSTTAPTSG VYVELGAVFY KDYTGTVYHR VPLELCTNQE RCEGSKCVGR     120
MTGSDGRLYN VLVCPDDCIL FERHCRGQTV VLKWISNPLT SPLWVQSCSD DKGAKPKVKP     180
KDDRMKQGKI VTKPKETEAD QKTRPPDATI VVDGQKYQVR KKGKAKPKTQ DGLYHNKNKP     240
EASRKKLEKA LLAWAILACL LVVPVGSTNV TQWNLWDNKS TTDIHSVMFS RGIKRSLHGI     300
WPTQICKGIP THLAADYELK RIHGMVDASP MTNFTCCRLQ RHEWNKHGWC NWYNIEPWIN     360
LMNNTQGLLN TGDNFTECAV TCRYDADLGV NIVTQARTTP TILTGCKKGH NFSFSGEVRA     420
SPCNFELTAE DLLRIMDHTN CEGFTYFGEG IVDGYTEVVE KARSSGFRAL TWLSSKIENT     480
KKKIFGAEAS PYCPVAKRVF NIIYTNNCTP LGLPDKSKII GPGTFDISGR DEFIFPKLPY     540
HVDDFILLSL IAMSDFAPET SSIIYLALHY LMPSNDNRDF VMDLDPNKLN LTATKSVASV     600
VPTSVNVLGE WVCVKPSWWP YSAEITNLIG GVITVADLVI KTIEELLNLW TEATAVAFLA     660
ALIKIFRGQP IQAVAWLIII GGAQAQTCNP EFMYALAKNT SIGSLGPESL TTRWYQLTSG     720
FKLTDSTIEV TCVGANMRIH VVCPLVSDRY LAINHPRALP TTAWFRKIHT QHEVPRERIM     780
SESKRRYTCP CGSKPVVRST TQFNPISIST PSFELECPRG WTGAVECTLV SPSTLTTETI     840
FTYRKPKPFG LENWCKYTVV EKGILYSCKF GGNSTCIKGL IVKGQREDKV RYCEWCGYKF     900
SSPNGLPQYP LGLCEKEQSE GLRDYGDFPC CNNGTCIDKE GSVQCYIGDK KVTVKLYNAS     960
LLAPMPCKPI VYNSQGPPAP KTCTYRWAST LENKYYEPRD SYYQQYIIKS GYQYWFDLTA    1020
KDHVADWITK YFPIIIVALL GGRGTLWVLI AYELLTQYEV VGDENIVAQA EALVIGNILM    1080
SLDLEIISCF LLLLIVVKKQ AVRRTLALLF HWITMNPFQS VMITVVYFVG LVRAEEGTKE    1140
GSTSGPPIHV VAILLFLLYH TVKYKDFNIA MILLITLSLK SSSYIHTSLY EIPLLVAVIS    1200
LTCSIYIFDL QVKSKLVAPT IGIIGVTLAM RVLWLVRQMT IPTPSVSISL IDPKMVIILY    1260
LISLTITVNH NLDLASYCLK LGPFILSFLT MWVDVVILLL MLPWYELVKV YYLKKKKEDV    1320
ETWFQNSGIS TQETSPYGFD FSSPGEGVHT LPMQNKTKFC RTAYMTVLRA LVITAISSVW    1380
KPIILAELLI EAVYWTHIKI AKELAGSSRF VARFIASIIE LNWAMDEKEA SRYKRFYLLS    1440
SKITDLMVKH KIQNETVKSW FEETEIFGIQ KVAMVIRAHS LSLEPNAILC SVCEEKQNQK    1500
AKRPCPKCGS RGTQIKCGLT LAEFEEEHYK KIYILEGQDE TPMRKEERQQ VTYVSRGALF    1560
LRNLPILASK NKYLLVGNLG MELQDLESMG WIIRGPAVCK KIIHHEKCRP SIPDKLMAFF    1620
GIMPRGVTPR APTRFPVSLL KIRRGFETGW AYTHPGGVSS VMHVTAGSDI YVNDSIGRTK    1680
IQCQDKNTTT DECEYGVKTD SGCSDGARCY VINPEATNIA GTKGAMVHLR KAGGEFNCVT    1740
AQGTPAFYNL KNLKGWSGLP IFEAATGRVV GRVKAGKNTD NAPTTIMSGT QVAKPSECDL    1800
ESVVRKLETM NRGEFKQVTL ATGAGKTTML PKLLIESIGR HKRVLVLIPL RAAAEGVYQY    1860
MRTKHPSISF NLRIGDLKEG DMATGITYAS YGYFCQMDMP RLENAMKEYH YIFLDEYHCA    1920
TPEQLAVMSK IHRFGESVRV IAMTATPSGT VSTTGQKFTI EEVVVPEVMK GEDLADDYIE    1980
IAGLKVPKKE LEGNVLTFVP TRKMASETAK KLTTQGYNAG YYFSGEDPSS LRTTTSKSPY    2040
IVVATNAIES GVTLPDLDTV IDTGMKCEKR LRIENKAPYI VTGLKRMAIT TGEQAQRKGR    2100
VGRVKPGRYL RGPENTAGEK DYHYDLLQAQ RYGIQDSINI TKSFREMNYD WALYEEDPLK    2160
IAQLELLNTL LISRDLPVVT KNLMARTTHP EPIQLAYNSL ETPVPVAFPK VKNGEVTDAH    2220
ETYELMTCRK LEKDPPIYLY ATEEEDLVVD ILGLKWPDAT ERAVLEVQDA LGQITGLSAG    2280
ETALLIALLG WVGYEALVKR HVPMVTDIYT LEDEKLEDTT HLQFAPDDLN NSDTIELQDL    2340
SNHQIQQILE GGKEYVGQAY QFLRLQAERA ANSDKGKKAM AAAPLLAHKF LEYLQEHAGD    2400
IKKYGLWGVH TALYNSIKER LGHETAFASL VIKWIAFSSD GVPGMIKQAA VDLVVYYIIN    2460
RPEYQGDKET QNAGRQFVGS LFVSCLAEYT FKNFNKSALE GLIEPALSYL PYASSALKLF    2520
LPTRLESVVI LSTTIYRTYL SIRKGSSQGL AGLAVSSAME IMNQNPISVA IALALGVGAI    2580
AAHNAIESSE AKRTLLMKVF VKNFLDQAAT DELVKENPEK IIMAVFEGIQ TAGNPLRLVY    2640
HLYAMFYKGW TAAEIAEKTA GRNIFVLTIF EGLEMLGLDA DSKWRNLSSN YLIDAVKKII    2700
EKMTKTATSF TYSFLKSLLP APFSCTKSER DPRIGWPQKD YDYLEVRCAC GYNRRAIKRD    2760
SGPVLWETLE ETGPEYCHNR GERGLSNVKT TRCFVQGEEI PPIALRKGVG EMLVKGVSFR    2820
IDFDKDKILS TDKWKVPHRA VTSIFEDWQG IGYREAYLGT KPDYGGLVPR SCVTVTKQGL    2880
TFLKTARGMA FTTDLTIQNI KMLIATCFKN KVKEGEIPAT IEGETWINIP LVNEDTGTIK    2940
PSFGERVIPE PYEEDPLEGP SVIVETGGIA INQIGVNPQS STCGTVFTAV KDLCQTVSNK    3000
AKNIKIGFSE GQYPGPGVAK KTLNQLIQDE DPKPFIFVCG SDKSMSNRAK TARNIKRITT    3060
TTPEKFRDLA KNKKLIIVLL GDRYHEDIEK YADFKGTFLT RQTLEALASA KAVEKDMTKK    3120
EAARVLAMEE KDELELPGWL HTDAPKFLDI TKDNITHHLI GDMQSLRERA GEIGAKATTQ    3180
ITKKGSVYTI NLSTWWESER LASLEPLFRE LLSKCRPVDR ETYKNCHFAT AAQLAGGNWV    3240
PVAPVVHLGE IPVKKKKTLP YEAYKLLKEM VDSEKEFHKP VSREKHQWIL NKVKTGGDLG    3300
LKNLVCPGRV GEPILREKKK FNIYNKRITS TMLSVGIRPE KLPVVRAQTS TKEFHEAIRD    3360
KIDKKANTQT PGLHKELLEI FNSICAIPEL RNTYKEVDWD VLTSGINRKG AAGYFEKMNI    3420
GEIIDSDKKS VEQLIKRMKS GLEFNYYETA IPKNEKRAVV DDWMEGDYVE EKRPRVIQYP    3480
EAKMRLAITK VMYNWVKQKP IVIPGYEGKT PLFHVFDKVH KEWKNFNSPV AVSFDTKAWD    3540
TQVTPKDLLL ISEIQKYYYK KEYHRFIDNL TEKMVEVPVV CEDGNVYIRE GQRGSGQPDT    3600
```

```
SAGNSMLNVL TMIYAFCKAN SIPYSAFHRV AKIHVCGDDG FLITEKSFGE AFAIKGPQIL    3660
MEAGKPQKLI GEFGLKLAYK FDDIEFCSHT PIKVRWADNN TSYMPGRDTA TILAKMATRL    3720
DSSGERGTEG YELAVAFSFL LMYSWNPLVR RICLLVMSTI DTKEASQNNT IYTFRGDPIG    3780
AYTEVIGYRL DQLKQTEFSK LAQLNLSMAI LQIYNKNTTK RLIEDCVKLG NQNKQILVNA    3840
DRLISKKTGY TYEPTAGHTK IGKHYEEINL LKDTPQKTVY QGTERY                    3886
```

Figura 3



Lista de claves:

....	**Producto de PCR**
———	**Secuencia de referencia NADL gi6826549**
....(...)F o R	**Cebadores (...) indica localizaciones en pb basadas en la secuencia NADL** **R indica cebador inverso** **F indica cebador directo**

Figura 4

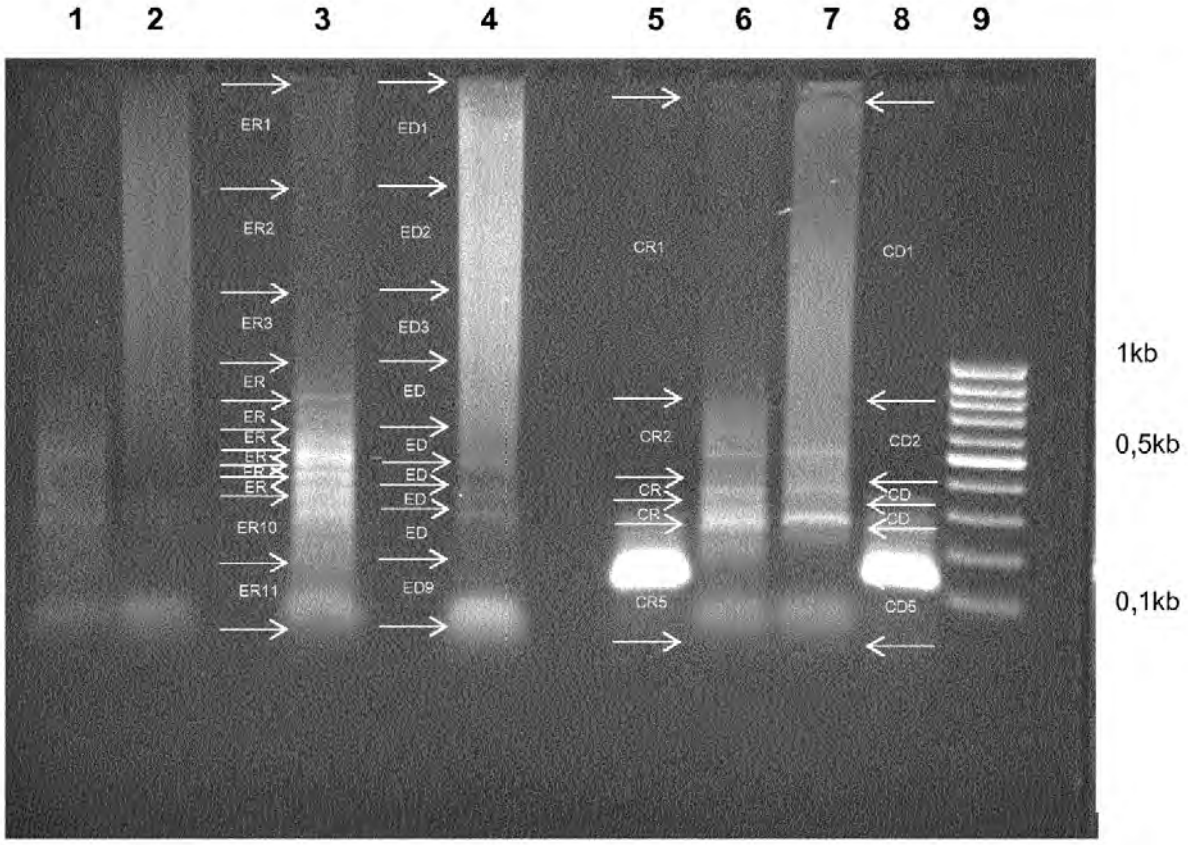

1
2
3
4
5
6
7
8
9
ER1
ED1
ER2
ED2
ER3
ED3
ER
ED
ER
ER
ED
ER
ED
ER
ED
ER10
ED
ER11
ED9
CR1
CD1
CR2
CD2
CR
CR
CD
CD
CR5
CD5
1kb
0,5kb
0,1kb

Figura 5A

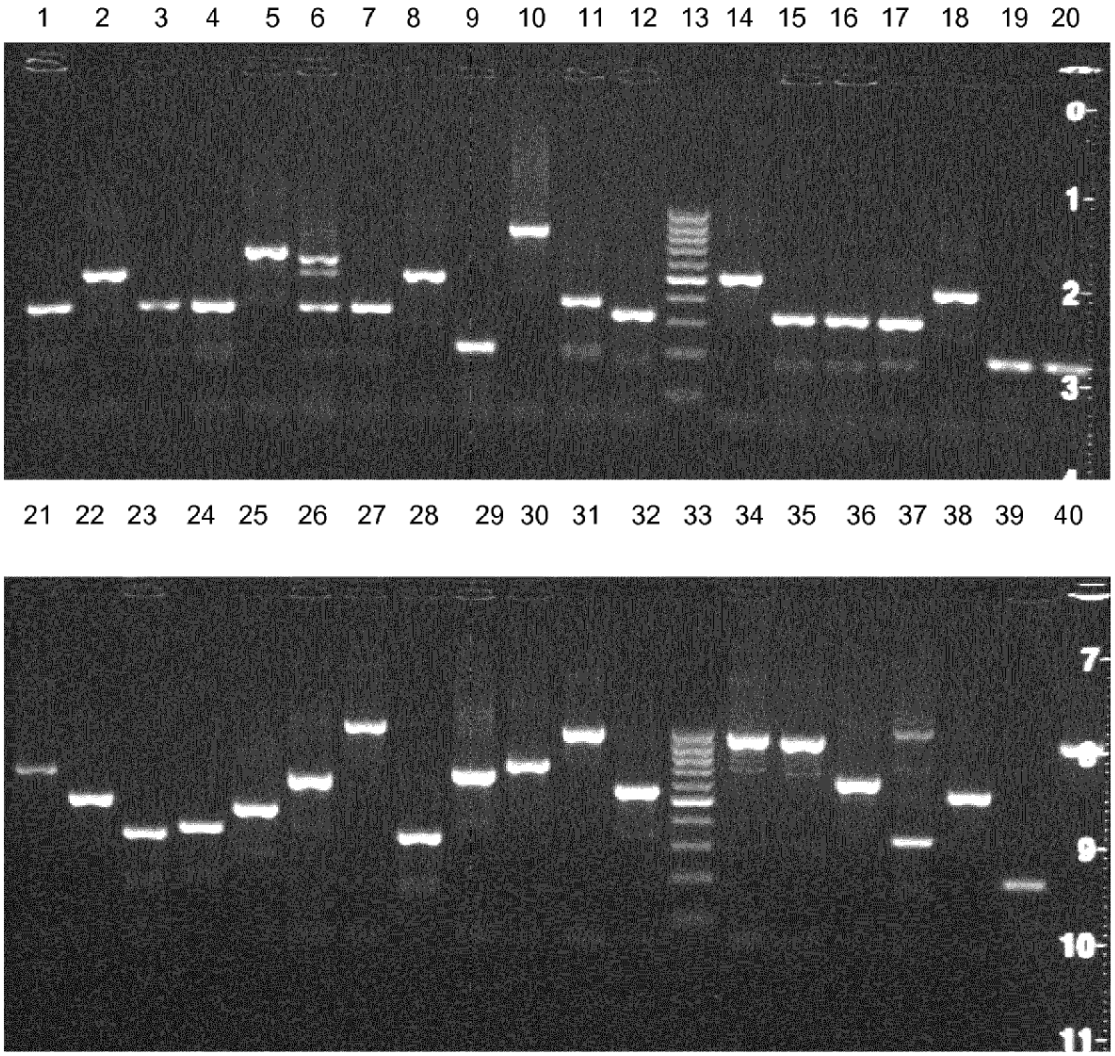

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
0
1
2
3
21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
7
8
9
10
11

Figura 5B

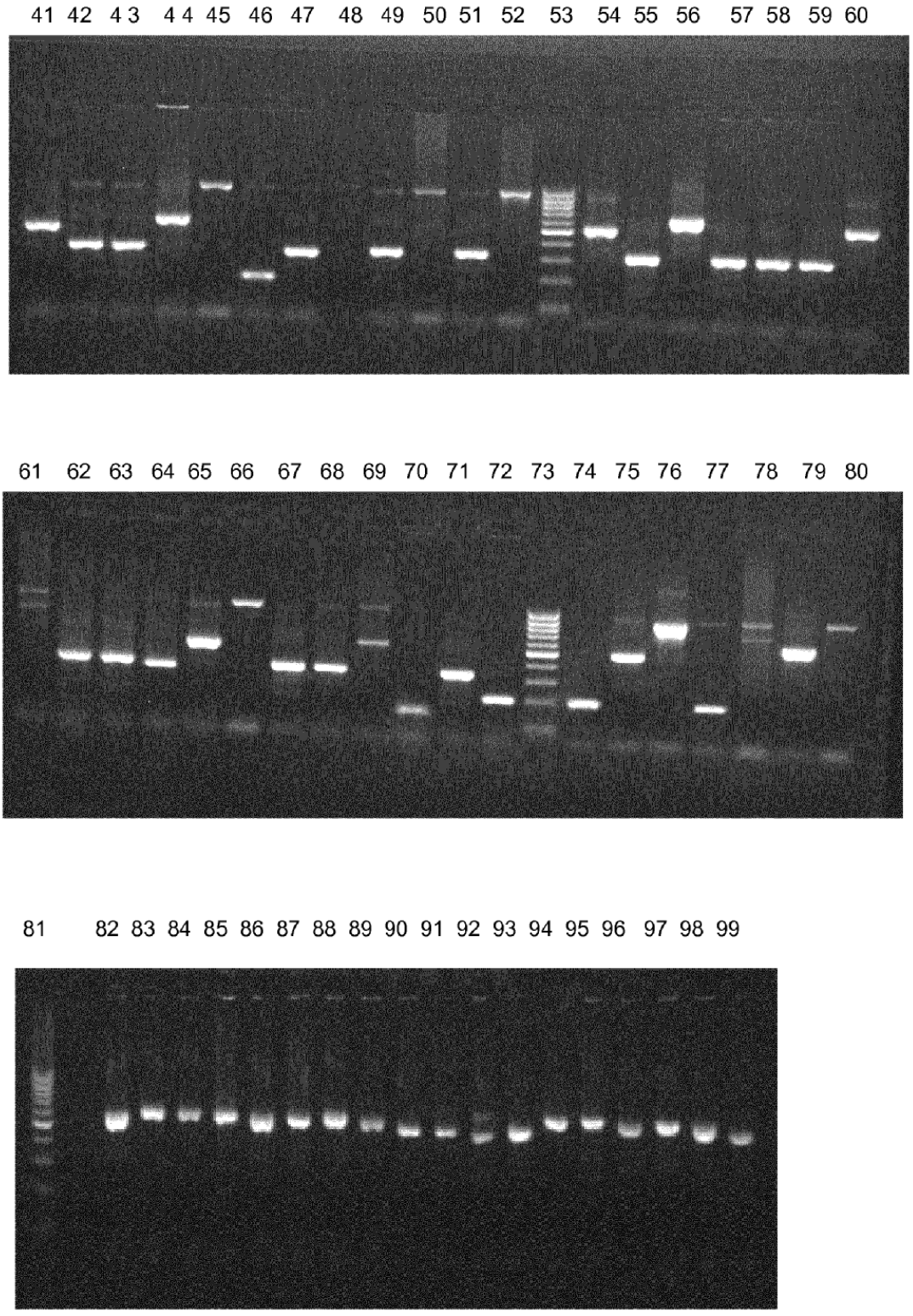

41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99

Figura 6A

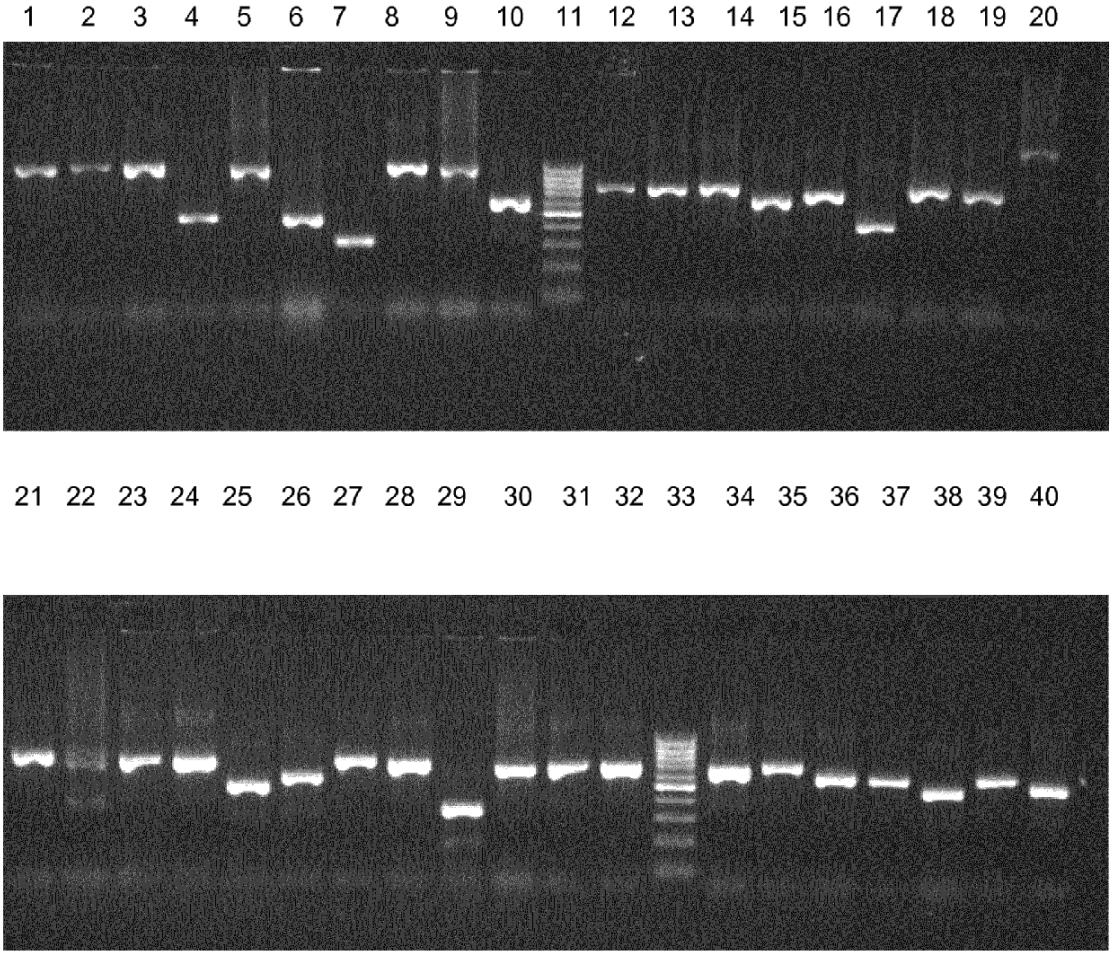

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

Figura 6B

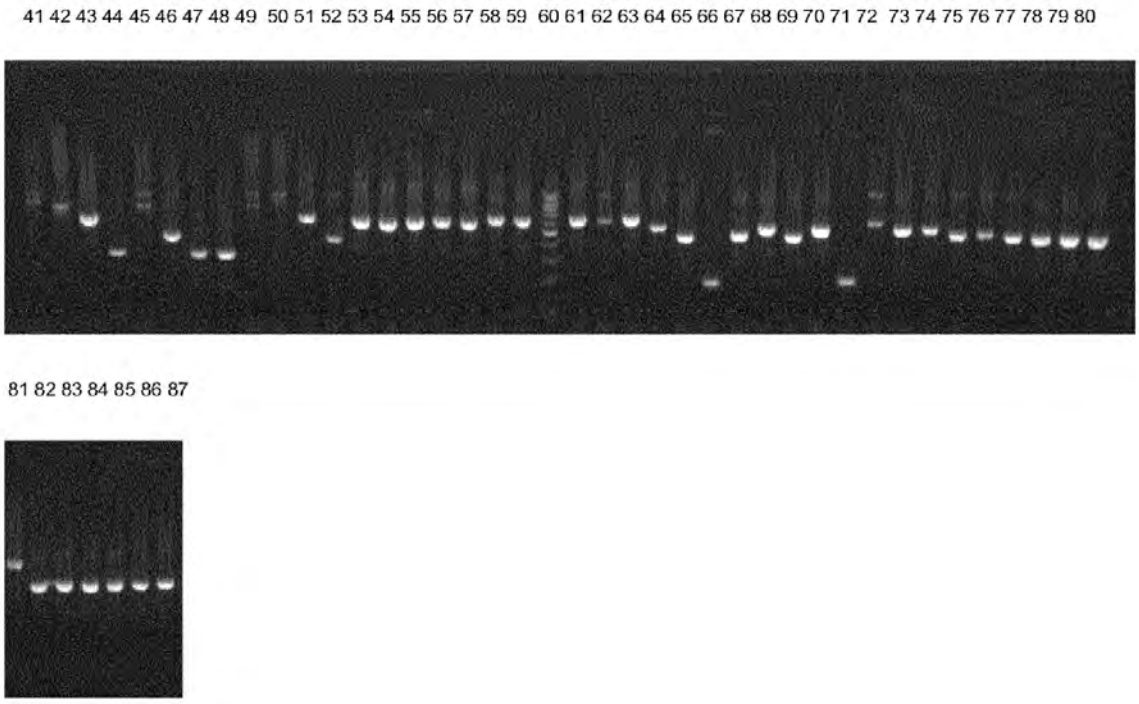

41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
81 82 83 84 85 86 87

Figura 7A

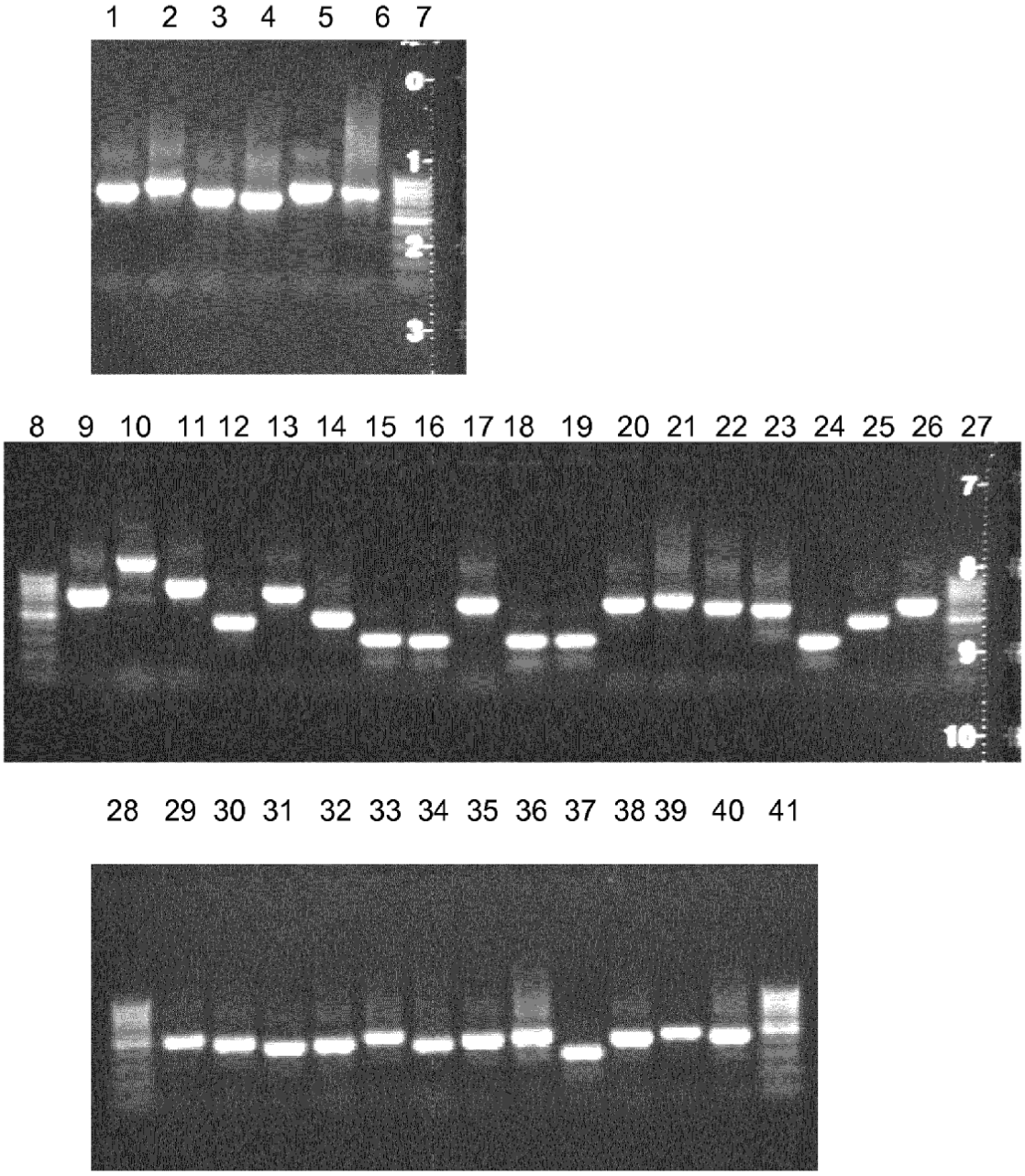

1 2 3 4 5 6 7
8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27
28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41

Figura 7B

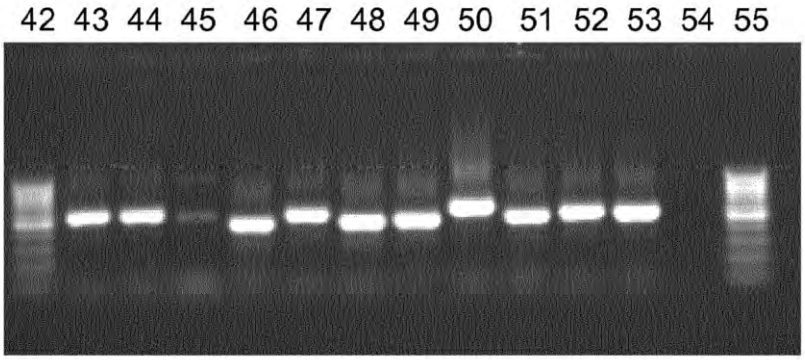


Figura 8A

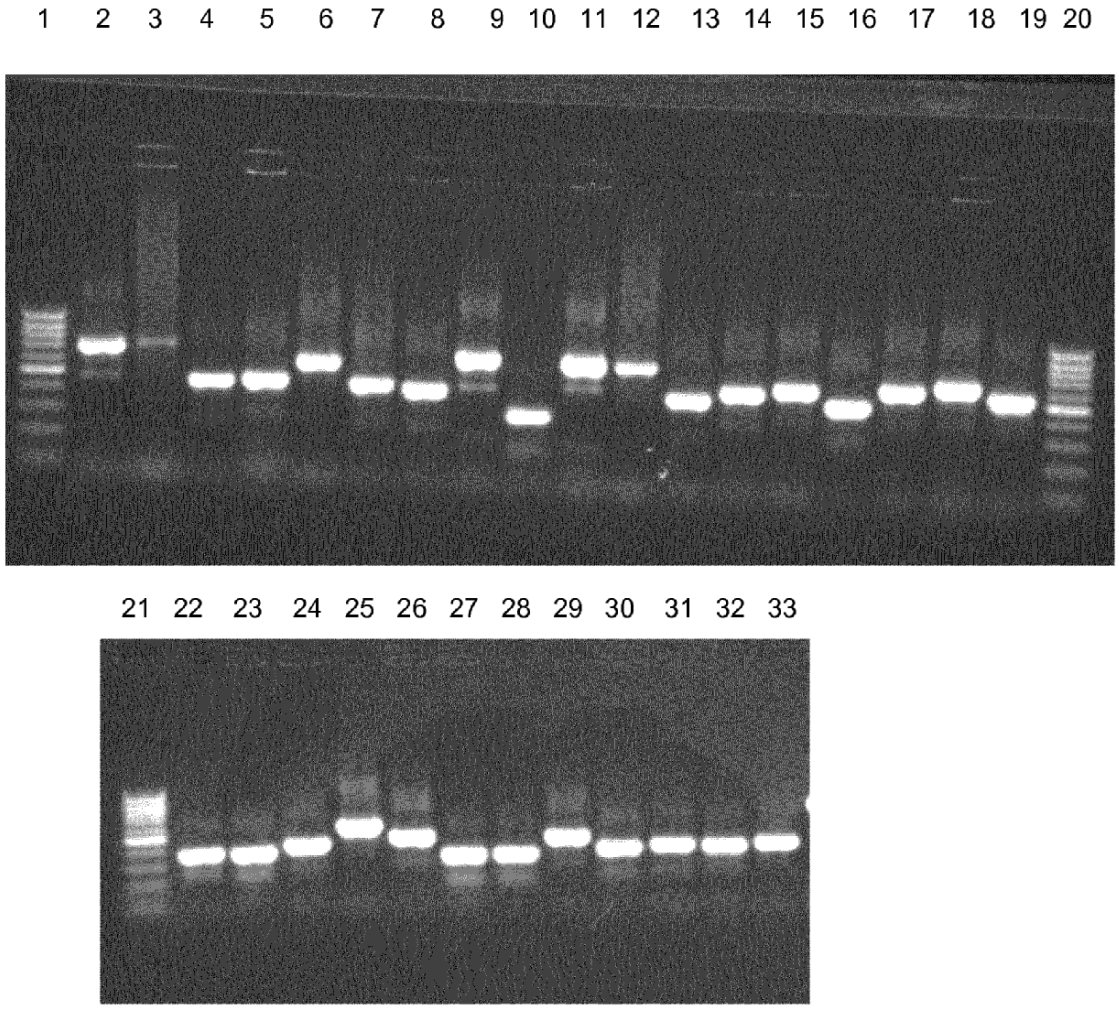

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33

Figura 8B

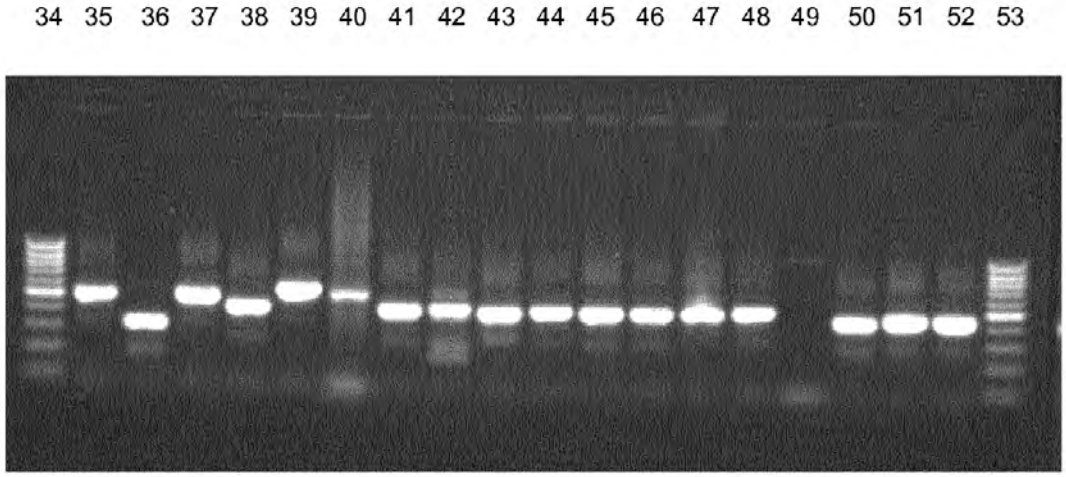


Figura 9

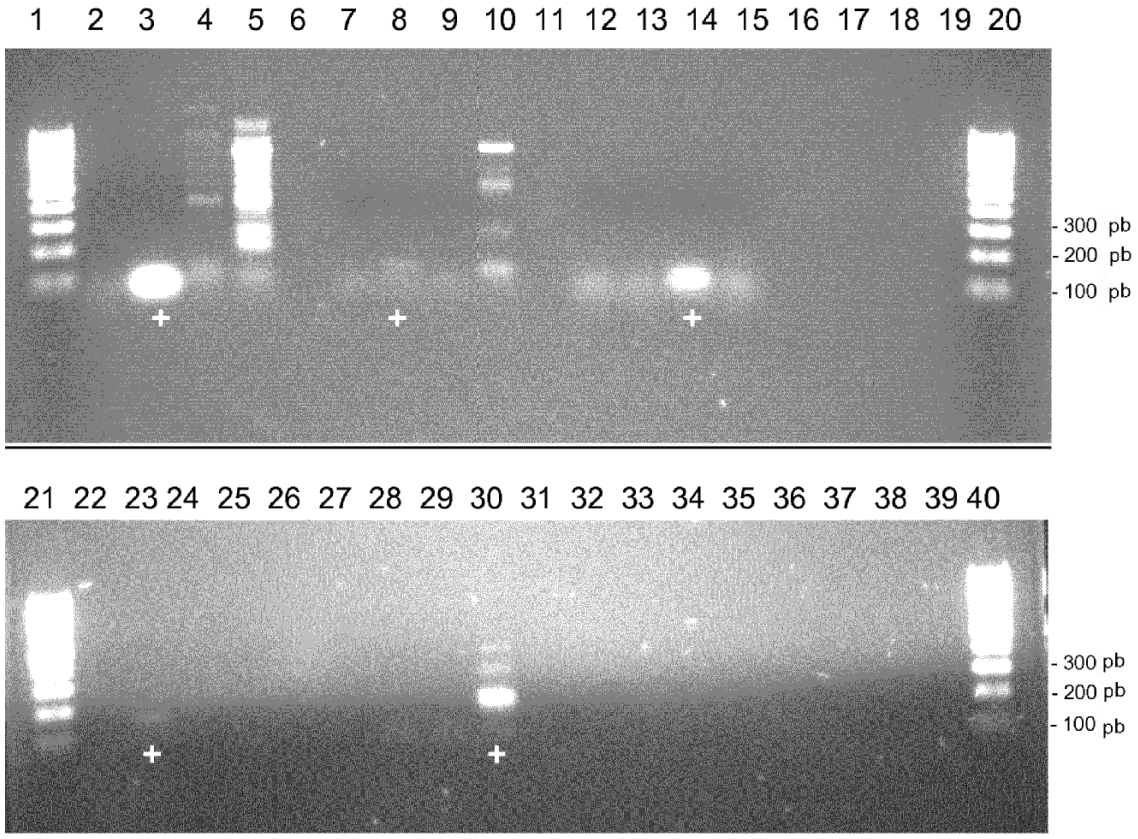
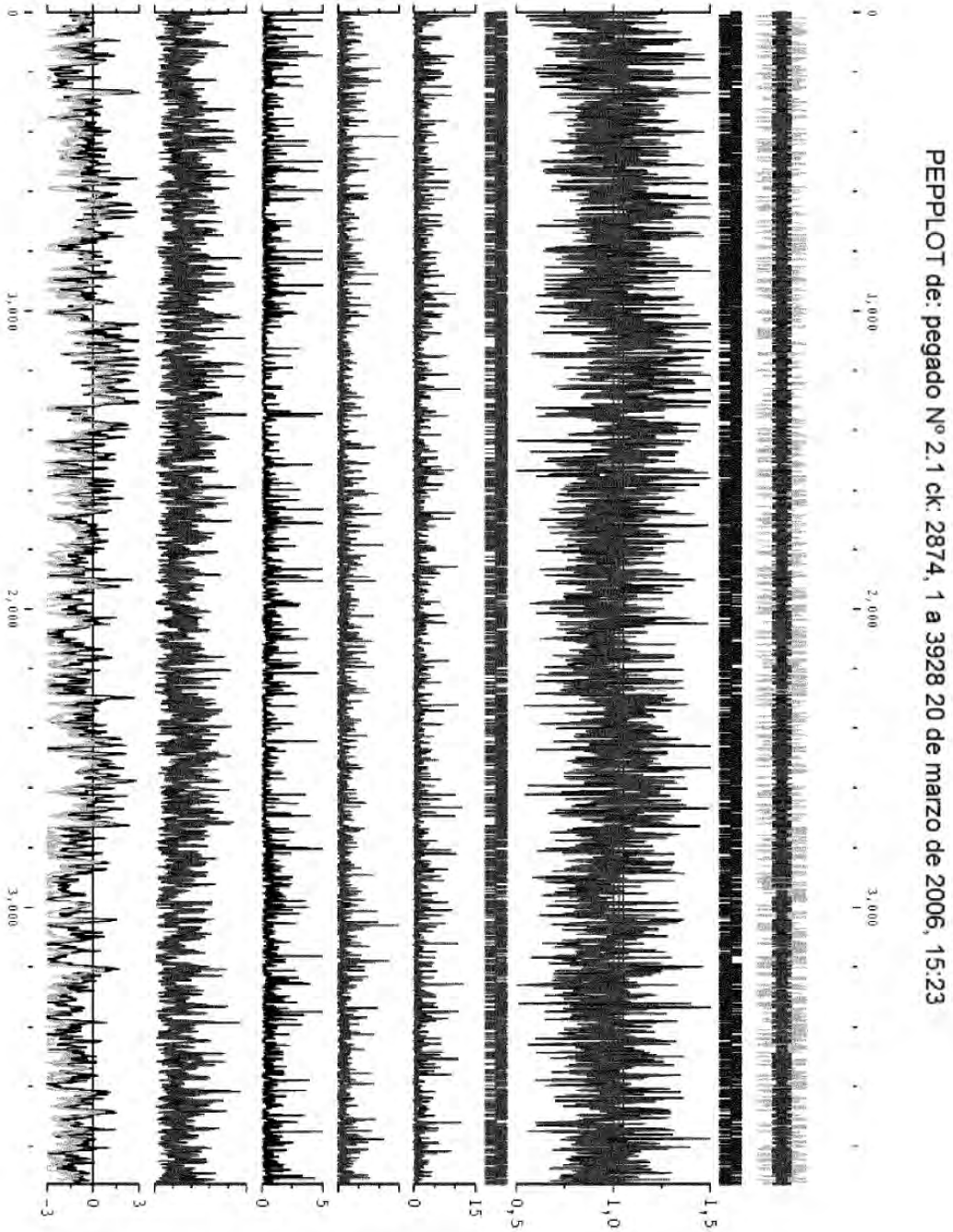

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
- 300 pb
- 200 pb
- 100 pb
21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
- 300 pb
- 200 pb
- 100 pb

Figura 10


PEPPLOT de: pegado Nº 2.1 ck: 2874, 1 a 3928 20 de marzo de 2006, 15:23
Básico
Ácido
Chou y
Fasman
Extremo NH2
Extremo COOH
Giro
Momento
hidrófobo
Goldman et al
Kyte-Doolittle
Hidrófobo
Hidrófilo
formación beta
rotura beta
Beta
Alfa
Beta
Alfa
formación beta
rotura beta
Beta
Alfa
Beta
Alfa
Beta
Alfa
Hidrófobo
Hidrófilo