

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 626**

51 Int. Cl.:

**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 16190159 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019** EP 3147365

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:

**18.06.2020**

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**

**ES 2 767 626 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Especies de pestivirus

5 **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.

10

**Técnica antecedente**

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.

15

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).

20

25

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).

30

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).

35

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.

40

45

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

50

**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 N° 1, o secuencias sustancialmente homólogas a la SEC ID N° 1, o fragmentos de la misma.

55

La invención también proporciona la secuencia de nucleótidos aislada de ADN del virus PMC de la SEC ID N° 1, o secuencias sustancialmente homólogas a la SEC ID N° 1, o fragmentos de la misma.

60

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 N° 2 y fragmentos de la misma.

65

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:

- 5 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.
- 10 La invención también proporciona métodos para detectar la presencia de un anticuerpo anti-virus PMC en una muestra, que comprende las etapas de:
- 15 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.
- 20 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:
- 25 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.
- 30 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:
- 35 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.
- 40 La presente invención proporciona además métodos para detectar la presencia o ausencia de virus PMC en una muestra biológica, que comprende las etapas de:
- 45 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:
- 50 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:
- 55 a) hibridar los ácidos nucleicos de la muestra biológica en condiciones apropiadas con una o más sondas como se ha definido anteriormente,
- 60 b) lavar en condiciones apropiadas, y
- c) detectar los híbridos formados.
- 65 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para la generación de anticuerpos que comprende las etapas de:

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

5 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.

10 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.

15 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.

20 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

25 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:

30 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:

35 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.

40 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para cribar 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

45 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 cribar ligandos de las proteínas del virus PMC que comprende las etapas de:

50 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.

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

60 (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.

65

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

- 5
- (a) una cantidad predeterminada de al menos un anticuerpo marcado contra el virus PMC;
  - (b) otros reactivos; y
  - (c) instrucciones para usar dicho kit.

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

- 15
- (a) una cantidad predeterminada de al menos un polipéptido marcado derivado del virus PMC;
  - (b) otros reactivos; y
  - (c) instrucciones para usar dicho kit.

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

- 25
- (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.

30 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.

35 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:

- 40
- 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,
  - 45 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:

- 50
- (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.

### 55 **Breve descripción de los dibujos**

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

60 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;

65 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 cribar 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 cribar 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 cribar 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 cribar 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 N° 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.

#### Fases de lectura abierta, genes codificados, características del genoma de ARN

La secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 1 codifica una única ORF que codifica varios genes diferentes. Los genes codificados por la SEC ID N° 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 de la fase 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 de la fase 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****5 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 N° 1, o secuencias sustancialmente homólogas a la SEC ID N° 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 N° 1. Preferiblemente, el fragmento se selecciona entre las siguientes localizaciones de la SEC ID N° 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 N° 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 o 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 N° 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 o 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 N° 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 selección serológica 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 N° 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 N° 1. Preferiblemente, el fragmento se selecciona entre las siguientes localizaciones de la SEC ID N° 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 las 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 N° 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.

#### 50 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 N° 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; Kwok et al., 1989), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA; Duck, 1990; Walker et al., 1992) o amplificación mediante Q $\beta$  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 (<sup>32</sup>P, <sup>35</sup>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 N° 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 °C, normalmente en exceso de 37 °C, y preferiblemente en exceso de 45 °C. 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 °C 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<sub>2</sub>, 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 procariontas 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  $\mu\text{m}$ , dando una densidad de 10000 a 40000 puntos/ $\text{cm}^2$ .

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 solo 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 una diversidad de 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, solo 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 N° 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 N° 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 epítomos inmunológicos consistentes con los presentes en secuencias nativas de aminoácidos de virus PMC.

5 Como se usa en este documento, "epítomo" se refiere a un determinante antigénico de un polipéptido. Un epítomo podría comprender tres aminoácidos en una conformación espacial que es única para el epítomo. Generalmente, un epítomo 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.

10 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.

15 Preferiblemente, los fragmentos de la secuencia de aminoácidos del virus PMC de longitud completa SEC ID N° 2 se eligen entre las siguientes localizaciones en la SEC ID N° 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 N° 16-27.

20 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.

25 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 de síntesis 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.

### 35 **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.

40 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 o 90 % homóloga, preferiblemente al menos un 95 o 98 % homóloga a nivel de aminoácidos sobre al menos 20, 50, 100 o 200 aminoácidos, con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 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.

45 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 o 95 % de identidad.

50 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 N° 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 N° 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.

65 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.

- 5 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
- 10 polímero/proteína se usará terapéuticamente, y si es así, la dosificación deseada, el tiempo en circulación, la resistencia a la proteólisis y otras consideraciones. Para las presentes proteínas y péptidos, éstas pueden determinarse usando los ensayos proporcionados en este documento.

15 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 propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados y alcohol polivinílico. El polietilenglicol propionaldehído puede proporcionar ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua.

20 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.

25 Cuando la secuencia de aminoácidos del virus PMC debe proporcionarse en una forma marcada, es bien conocida una diversidad de métodos para marcar secuencias de aminoácidos en la técnica e incluyen isótopos radiactivos tales como  $^{32}\text{P}$ , 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

30 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)].

35 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.

40 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

45 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.

50 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

55 sintetizarse químicamente.

### Diagnóstico

60 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.

65 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**

5 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.

10 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:

15 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

20 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.

25 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 epítipo 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.

30 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:

35 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.

40 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;

45 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;

50 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.

55 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')<sub>2</sub> o F(v) o moléculas de anticuerpo completas.

60 Métodos particularmente preferidos para detectar virus PMC basados en los métodos anteriores incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas, radioinmunoensayos, ensayos inmunoradiométricos y ensayos inmunoenzimáticos, incluyendo ensayos tipo sándwich usando anticuerpos monoclonales y/o policlonales.

65 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<sub>1</sub> marcado con un marcador detectable, o anticuerpo Ab<sub>2</sub> 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.

$$AA^* + Ab_1 = AA^*Ab_1$$

5 B.

$$AA + Ab^*1 = AA Ab1^*$$

C.

$$AA + Ab_1 + Ab_2^* = Ab_1 AA Ab_2^*$$

10 Los procedimientos y su aplicación son todos conocidos para los especialistas en la técnica y en consecuencia pueden utilizarse dentro del alcance de la presente invención. El procedimiento "competitivo" o "de bloqueo", Procedimiento A, se describe en las patentes de Estados Unidos N° 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 N° RE 31.006 y 4.016.043. Otros procedimientos más son conocidos, 15 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 20 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 25 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.  $Ab_2$ , 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 30 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, 35 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 40 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  $^3H$ ,  $^{14}C$ ,  $^{32}P$ ,  $^{35}S$ ,  $^{36}Cl$ ,  $^{51}Cr$ ,  $^{57}Co$ ,  $^{58}Co$ ,  $^{59}Fe$ ,  $^{90}Y$ ,  $^{125}I$ ,  $^{131}I$ , y  $^{186}Re$ .

Asimismo son útiles los marcadores enzimáticos, y pueden detectarse por cualquiera de las técnicas colorimétrica, 45 espectrofotométrica, fluoroespectrofotométrica, amperométricas o gasométricas 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,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -D-glucosidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa, ureasa, 50 glucosa oxidasa más peroxidasa y fosfatasa alcalina. Las patentes de Estados Unidos N° 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 55 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 60 anteriormente; y

55 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, 60 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 65 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 65 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.

5 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.

10 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.

15 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 epítomos 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.

20 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 epítomo conformacional del virus PMC.

25 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.

35 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.

40 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 Immunolon™ 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.

50 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.

55 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 epítomo 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.

60 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).

65

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.

5 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  
10 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  
15 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  
20 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
- 25 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  
30 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:

- 35 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.  
40

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:

- 45 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
- 50 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  
55 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.  
60

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  
65 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.

5 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 marcadas 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.

10 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*.

20 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.

30 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.

35 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.

45 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, o 5 secuencias diferentes de sonda de ácido nucleico.

50 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);

55 b) alterar el virión; y

c) hibridar con una sonda.

60 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).

65 La presente invención también proporciona un método para el cribado rápido 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 cribar 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 selección apropiados por una diversidad de 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 proviral en vectores de expresión procariotas para generar polipéptidos de fusión. Los recombinantes, que producen proteínas de fusión antigénicamente competentes, pueden identificarse simplemente cribando 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 fases 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.

5 Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se une a un epítipo específico. El término abarca anticuerpos policlonales, monoclonales, y quiméricos, los últimos mencionados descritos con mayor detalle en las patentes de Estados Unidos N° 4.816.397 y 4.816.567, así como partes de unión a antígeno de anticuerpos, incluyendo Fab, F(ab')<sub>2</sub> 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  
10 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.

15 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 parátipo, incluyendo aquellas partes conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y F(v), que son partes preferidas para su uso en los métodos terapéuticos descritos en este documento.

20 Las partes Fab y F(ab')<sub>2</sub> 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 N° 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')<sub>2</sub> 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  
25 prefiere un anticuerpo que contenga moléculas de anticuerpo intactas.

30 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.

35 Para la producción de hibridomas que secretan dichos anticuerpos monoclonales, pueden usarse métodos convencionales de producción y cribado. 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.

40 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.

45 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-hidroxisforiloxi)-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.  
50

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 inmunoestimulantes (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).  
55

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

65 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<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). 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 °C, 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-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), 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- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), interferón- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), factor de necrosis tumoral- $\beta$  (TNF- $\beta$ ), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), y factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ).

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 N° 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.

5 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  
10 corte y ajuste 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  
15 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  
20 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')<sub>2</sub> 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')<sub>2</sub>, y los fragmentos Fab que pueden generarse tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.

### 30 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 inmunoradiométricos, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (usando oro  
35 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.

40 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 cribar anticuerpos que reconozcan un epítipo específico de una secuencia de  
45 aminoácidos del virus PMC, se pueden ensayar hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento de la secuencia de aminoácidos del virus PMC que contiene dicho epítipo. Para el cribado de un anticuerpo específico para una secuencia de aminoácidos del virus PMC de una especie particular de animal, se puede cribar basándose en la unión positiva con la secuencia de aminoácidos del virus PMC expresada por o aislada de células de esa especie de animal.

50 **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.

60 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.

### 65 Fragmentos que albergan epítipo

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 epítipo 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 epítipo 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 epítipo 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 epítipo. Los fragmentos polipeptídicos foráneos son preferiblemente inertes inmunogénicamente y/o no interfieren con las propiedades inmunogénicas del polipéptido que alberga epítipo.

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 epítipo expresable bajo el control de un promotor o replicón adecuado en un hospedador adecuado.

Dichos polipéptidos que albergan epítipo, 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 [*Applied 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, HCl), 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-dimetilaminopropil)-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 epítipo 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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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.

30 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.

40 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.

45 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.

50 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.

55 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.

60 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.

65 La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de polipéptido que alberga epítipo 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 solo 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- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , 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.

#### 40 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 proteínicas presentadas en la patente de Estados Unidos N° 4.925.673). Puede usarse encapsulación liposómica y los liposomas pueden derivatizarse con diversos polímeros (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 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 proteólisis; 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 trimetilato 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.

5 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.

10 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.

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

20 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.

30 Pueden usarse otros recubrimientos para la formulación. Éstos incluyen una diversidad de 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, hidroxipropilmetil celulosa, carboxi-metilcelulosa sódica, providona y los polietilenglicoles. El segundo grupo consiste en los materiales entéricos que son comúnmente ésteres de ácido ftálico.

35 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

40 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.

45 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.

50 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.

55 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.

60 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.

65

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 hidroc fluorocarbono, 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 solo 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 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 cribar fármacos que comprende las etapas de:

- 5 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.

10 La presente invención también proporciona un método para cribar 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  
15 b) ensayar la presencia de un complejo entre la secuencia de aminoácidos del virus PMC o fragmento y un ligando.

20 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.

25 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.  
30

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.

35 La unión de la secuencia de aminoácidos del virus PMC a la sustancia candidata puede determinarse por una diversidad de 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.  
40

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.  
45

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 complejo) 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.  
50

Otra técnica para el cribado de fármacos proporciona selección 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.  
55

60 Esta invención también contempla el uso de ensayos de selección 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.  
65

**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.

**60 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 epítipo. 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 epítipos 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 una diversidad de diferentes soportes sólidos 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 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 epítipo.

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 unirlos 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.

5 Preferiblemente, dicho anticuerpo está unido a un soporte sólido. El anticuerpo se puede unir a una diversidad de diferentes soportes sólidos 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.

10 El anticuerpo anti-virus PMC puede unirse al soporte sólido mediante una diversidad de 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  
15 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.

20 Preferiblemente, la proteína a detectar usando el presente kit es un antígeno o una región que alberga epítipo 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**

25 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:

- 30 (a) una cantidad predeterminada de al menos una secuencia de ácido nucleico marcada derivada del virus PMC;  
(b) otros reactivos; y  
35 (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.

#### **40 VECTORES, CÉLULAS HOSPEDADORAS ETC.**

##### **Vectores**

45 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.

50 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:

- 55 (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.

60 Este procedimiento también puede estar acompañado por la etapa de:

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

65 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,

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

c) recoger dicho polipéptido.

10 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 procariontas, 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 procarionta o eucariota o en mamíferos vivos cuando se inyecta como ARN o ADN desnudo.

20 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.

25 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.

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

35 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 ajuste 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).

45 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.

50 Pueden usarse promotores tales como los promotores trp, lac y de fagos, promotores de ARNt y promotores de enzimas glicolíticas en hospedadores procariontas. 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.

55 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.

60 Los vectores de expresión y clonación contendrán probablemente un marcador de selección, 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 solo aquellas células hospedadoras que expresan los insertos. Los genes de selección 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 selección 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 hospedadora 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 solo 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.

## 20 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 aviarias, 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.

## 50 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.

- 5 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.

## 10 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

20 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:

- 30 a) Obtener al menos 240  $\mu$ l del sobrenadante de un homogeneizado tisular o suero y dividir en lotes 2x 120  $\mu$ l
- b) A cada 120  $\mu$ l de muestra añadir 240  $\mu$ l de PBS o H<sub>2</sub>O (o tomar 50  $\mu$ l de suero + 100  $\mu$ l de PBS)
- 35 c) Filtrar la muestra diluida a través de dos filtros de 0,2  $\mu$ m diferentes por centrifugación a 2000 x g (lavar la parte superior del filtro y mantenerla a -20 °C)
- d) Añadir 25  $\mu$ l de DNasa I (250 U) a cada tubo de muestra filtrada e incubar a 37 °C durante 2 horas
- 40 e) Añadir 1  $\mu$ l 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  $\mu$ l) para la extracción de ARN y un tubo para la extracción de ADN (añadir 500  $\mu$ l de DNAeasy AL + 50  $\mu$ l de proteinasa K, etc. y eluir en 50  $\mu$ l de agua).

#### 2. Extracción de ARN:

- 45 a) Dividir la muestra en lotes de 90  $\mu$ l y añadir 600  $\mu$ l de RLT, es decir, 4 x 690  $\mu$ l
- b) Homogeneizar pasando a través de una jeringa 21 G al menos 5 veces
- 50 c) Añadir 690  $\mu$ l de etanol al 70 % a cada tubo de muestra y mezclar por pipeteo
- d) Aplicar 700  $\mu$ l 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 °C.
- 55 e) Añadir 700  $\mu$ l 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  $\mu$ l de RPE, centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm, deseche el material de flujo
- 60 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.
- 65 i) Eluir el ARN en 20  $\mu$ l 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 °C hasta que sea necesario.

5 **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 °C durante 10 minutos.

10 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 °C.

15 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.

20 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.

25 g) Almacenar el ADN a -80 °C 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.

35 **4. Síntesis de la primera hebra de ADNc**

a) Mezclar lo siguiente:

1 ul de hexámeros aleatorios (10 pmol)  
8 ul - 9 ul de ARN (en H<sub>2</sub>O)

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

45	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

50 Tampón de 1ª hebra: Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM

d) Mezclar, centrifugar y calentar a 50 °C durante 30 minutos

e) Añadir otro 1 ul de SSIII y dejar durante otros 30 minutos a 50 °C

f) Inactivar por calor a 70 °C durante 10 minutos y después colocar en hielo

55 **5. Síntesis de la segunda hebra de ADNc**

a) En la mezcla de hielo:

60	H <sub>2</sub> O	87 ul
	tampón de 2ª hebra 5X	30 ul
	dNTP 5 mM	6 ul
	ADN polimerasa (40U)	4 ul
	ADN ligasa de <i>E. coli</i> (10 U)	1 ul
	RNasa H (2 U)	2 ul
65	mezcla de ADN de 1ª hebra (etapa 1)	20 ul

Tampón de 2ª hebra: Tris-HCl 20 mM (pH 6,9), MgCl<sub>2</sub> 4,6 mM, KCl 90 mM, b-NAD<sup>+</sup> 0,15 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM

b) Mezclar, centrifugar e incubar a 16 °C 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 °C durante 15 min.

5 d) Calentar la síntesis de 2ª hebra a 72 °C 10 minutos, dejar enfriar a 37 °C.

## 6. Limpieza de ADN

- 10 a) Bloquear la fase centrifugado a 13.000 rpm durante 30 segundos a 4 °C
- b) Añadir 150 ul de la reacción de la etapa 2
- c) Añadir un volumen igual de fenol/cloroformo 160 ul
- 15 d) Agitar ligeramente
- e) Centrifugar a 13000 rpm 5 minutos, 4 °C
- 20 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 °C durante 2 horas o O/N
- 25 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 °C
- 30 j) Recoger el sedimento en 35 ul de agua \*NOTA: se puede parar aquí y congelar a -80 °C hasta que la muestra de SISPA de ADN también esté lista.\*

### SISPA de ADN

## 7. Síntesis de la segunda hebra de ADN

- 35 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  |

45 b) Dejar a 37 °C durante 1 hora

## 8. Limpieza de ADN

- a) Bloquear la fase de centrifugación a 13.000 rpm durante 30 segundos a 4 °C
- 50 b) Añadir 60 ul de la reacción de la etapa 1
- c) Añadir un volumen igual de fenol/cloroformo 60 ul
- d) Agitar ligeramente
- 55 e) Centrifugar a 13.000 rpm 5 minutos, 4 °C
- f) Transferir la fase superior a un nuevo tubo de ~60 ul
- 60 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 °C durante 2 horas o durante una noche
- h) Centrifugar a 13.000 rpm durante 20 minutos, retirar el sobrenadante del sedimento
- 65 i) Lavar el sedimento 1 x etanol al 70 % 13.000 rpm 5 min a 4 °C

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

Generación de secuencias de ácido nucleico recombinantes

5

**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

10

b) Incubar a 37 °C durante 2 horas

c) Inactivar a 65 °C durante 20 minutos

15

**10. ADN digerido con desfosforilato**

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

20

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

25

b) Incubar a 37 °C durante 30 minutos

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

30

**11. Limpieza de ADN**

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

b) Añadir 60 ul de ADN desfosforilado

35

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

d) Agitar ligeramente

40

e) Centrifugar a 13.000 rpm 5 minutos, 4 °C

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

45

g) Precipitar el ADN, añadir 2,5 volúmenes de etanol al 100 % (150 ul) y 1 ul de glucógeno (20 mg/ml). Dejar a -20 °C 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 °C

50

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

k) Reconstituir en 5,8 ul de H<sub>2</sub>O.

55

**12. Ligamiento de adaptador**

a) Mezclar:

60

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<sub>2</sub> 25 mM, DTT 25 mM, ATP 5 mM, pH 7,5

65

b) Incubar a 4 °C durante 1 hora y 16 °C durante una noche

**13. Reacción de PCR (Figura 2 resultados)**

a) Establecer la siguiente mezcla:

5	ADN ligado (etapa 4)	2 ul
	50 pmol de NBam24	1 ul
	dNTP 5 mM	2 ul
	MgCl <sub>2</sub> 2 mM	2 ul
	tampón de PCR 10X	5 ul
10	H <sub>2</sub> O	38 ul

Tampón de PCR 10X: Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM (pH 8,3)

b) Calentar a 72 °C durante 3 minutos

c) Añadir 0,5 ul de ADN polimerasa Taq (5 U/ul)

15 d) Ejecutar ciclo:

72 °C durante 5 minutos

20 (94 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 3 minutos) 40 X mantenimiento a 4 °C

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**

25 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.

30 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.

35 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 °C 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.

40 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.

45 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.

50 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.

55 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).

60 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<sub>2</sub>O al centro de la membrana, dejar reposar la columna durante 1 min., y centrifugar durante 1 min.

65 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:

## ES 2 767 626 T3

	Producto de PCR fresco	6 µl
	Tampón de ligamiento 10X	1 µl
	Vector PCR®2.1 (25 ng/µl)	2 µl
5	ADN ligasa T4 (4,0 unidades Weiss)	1 µl

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

- 10 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).
- 15 3. Pipetear 2 µl de cada reacción de ligamiento en 25 µl 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 °C.
- 20 5. Aplicar choque térmico de las células durante 30 segundos a 42 °C sin agitación. Transferir inmediatamente los viales a hielo.
6. Añadir 125 µl de medio SOC a temperatura ambiente a cada vial.
- 25 7. Agitar los viales horizontalmente a 37 °C 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.
- 30 9. Incubar las placas durante una noche a 37 °C. Colocar las placas a 4 °C durante 2-3 horas para permitir el desarrollo del color apropiado.

### 15. Selección de colonias para insertos y secuenciación (resultados Figura 3)

- 35 a) Usar HotStarTaqMaster Mix (50 µl/pocillo de placa):

	1 X	110X (suficiente para una placa)
	25 µl HotStarTaqMaster Mix (vórtice)	2750 µl
40	12,5 µl M13-20f (50 pmol)	1375 µl
	12,5 µl M13-20f (50 pmol)	1375 µl
	añadir 50 µl por pocillo de la placa	

Para hacer las soluciones madre M13-20f (50 pmol) y M13R (50 pmol): mezclar 0,5 µl de cebador 100 µM con 12 µl de agua es decir 500 µl de cebador de reserva 100 µM + 1200 µl de agua (del HotStarTaq Kit).

- 45 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:

50 95 °C durante 5min

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

4 °C mantenimiento.

55

e) Ejecutar 5-10µl de PCR en gel

f) Usa Qiagen Mini, eluir para limpiar el producto de la PCR restante para secuenciar.

### Ejemplo 2

60

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

- 65 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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,59 g); NaHCO<sub>3</sub> (2,93 g) de agua hasta 1 l). Mantener durante una noche a temperatura ambiente (18-25 °C).
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 °C 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 °C 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 °C 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.

### 35 Ejemplo 3

#### Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para detectar antígenos de virus PMC

40 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 °C.

#### Materiales

45 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 %.

50 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.

55 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).

60 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.

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

## ES 2 767 626 T3

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  $\mu$ M en PBS (pH 7,4).

### 5 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.

10

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

15

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  $\mu$ g/ml y albúmina de suero bovino a 10  $\mu$ g/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 °C. 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.

20

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.

25

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

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

30

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

35

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.

40

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

13. Lavar las placas 5 veces.

45

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 °C en un recipiente humidificado.

50

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).

55

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).

60

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

21. Calcular los resultados.

### Ejemplo 4

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

## ES 2 767 626 T3

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:

5	hexámeros aleatorios (50 pmol)	1 ul
	ARN (en H <sub>2</sub> O)	9 ul

2. Calentar a 90 °C durante 3 minutos, centrifugar y poner en hielo

10 3. En hielo añadir:

15	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 °C durante 60 minutos.

5. Inactivar por calor a 70 °C durante 10 minutos

6. Colocar en hielo.

20 c) Configurar 1ª ronda de PCR.

1. Mezclar los siguientes reactivos de PCR

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

(véase la Tabla 3 para los cebadores de la 1ª reacción de PCR)

30 2. Ciclar la máquina de PCR en:

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

35 4 °C mantenimiento

d) Configurar PCR anidada

1. Mezclar los siguientes reactivos de PCR:

40	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

45 (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

50 95 °C durante 15 minutos

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

72 °C durante 1 min

55 4 °C 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.

60

**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 TGAAAAGGATTACGG	103 pb

(CONTINUACIÓN)

Clon	Virus	*Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' a 3')	Tamaño del producto anidado
ER5 10	Pestivirus	ER510F (7) ER510R (213) ER510FN (68) ER510RN (182)	AAACCGACGAAGTAGACC AGACGAGAACATAGTGCC GAAACAGTAAAGCCAACG CTGGTAATCGGAAACATC	114 pb
ER6 2	Pestivirus	ER62F (203) ER62FN (373) ER62R (637) ER62RN (516)	GGGACCGAGGGATACGA AGAGGTAATTGGGTAT CAGCAGGTTGATTTCTTCAT TTGCCAAGTTTCAC	98 pb
ER5 5	Pestivirus	ER55F (31) ER55R (214) ER55FN (64) ER55RN (162)	AAACCGCCGAAGTAAACC CTGGAGCCCTGGTAATGG GACGGGAATGGGTTCA TAGGTGCTTCTTATTGGTAT	143 pb

\*F = cebador directo, R = cebador inverso, FN = cebador anidado directo, RN = cebador anidado inverso

**Ejemplo 5**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:

- 15 1 ul de hexámeros aleatorios (50 pmol)
- 4 ul de ARN
- 4 ul de agua libre de RNasa

20 b) Calentar a 70 °C 10 minutos, centrifugar y poner en hielo

c) En hielo añadir

- 25 4 ul de tampón de 1ª hebra
- 2 ul de DTT 0,1 M
- 2 ul de dNTP 5 mM
- 2 ul de SSIII (400 U)

30 d) Mezclar, centrifugar, calentar a 42 °C durante 60 minutos.

e) Inactivar por calor a 70 °C 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

45 (véase la Tabla 4 para los cebadores de PCR)

b) Ciclar la máquina de PCR en:

- 50 95 °C durante 15 minutos
- (94 °C durante 30 segundos, 47 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 2 min) x 40
- 72 °C durante 1 min
- 4 °C - mantenimiento

**3. Método de RT-PCR de una etapa**

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

5	Mezcla de reacción 2x	25 ul
	Cebador directo 30 uM	1 ul
	Cebador inverso 30 uM	1 ul
10	Mezcla SSIII RT/Platinum	2 ul 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:

15	50 °C durante 50 minutos
	94 °C durante 2 min
20	(94 °C durante 15 segundos, 50 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 1 min/kb) x40
	68 °C durante 5 min
	4 °C - 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 cóntigos 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	1338 pb
Erns-P7	CR39-Er55PCRF ER55-510-512 R	AGGGCTCTCACATGGTTGTC CCATTACCAGGGCTCCAG	1810 pb
Erns-NS5A	CR39F(63) ER55RN(162)	CACATCTAGCAGCAGACTATGA TAGGTGCTTCTTATTGGTAT	2349 pb
P7-NS5A	ER55-510-512 F CR316-CR24R	CGTTGGCTTTACTGTTTCATTG TCCCCGAAGCTTGGTTTAAT	5560 pb
NS3-NS5A	NS3F CR316-CR24R	GTCAGGCCTGCCTATCTTTG TCCCCGAAGCTTGGTTTAAT	4431 pb
NS5A-NS5B	CR316-CR24F ER62-ER63R	CGGGACCATTAAVVAAGC CAGGGGGTTCCAAGAATACA	2440 pb

\* 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	cápsid(927)FS	ACAAAGGAGCAAAACCCAAG
ERNS	EO(1365)RS	GTCACGTTGGTGGACCTAC
E1	E1(2402)RS	AGCCAGAAATGCCACAGC
E1	E1(2606)FS	ACCTGTGTGGGTGCTAACAT
E2	E2(3086)RS	TACTTTGTCTTCCCGTTGC
NS2	NS2(4409)FS	CCAAGAACTTCCCCATACG
NS2	ns2(4460)RS	TTCCACATCCTCTTCTTCTTTT
NS3	NS3(5170)RS	GCTGGCCCTCGAATGATCCA
NS3	NS3(5468)FS	GTTCCCTGTGTCCTTGCTGA

(Continuación)

Localización en la proteína del cebador	*Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' a 3')
NS3	NS3(5670)RS	TG TTTTGTCTTGGCACTGG
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	GGGTCCACACAGCATTGTA
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.

## 5 Ejemplo 6

### Secuencias UTR

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

10

### 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 Clontech con las siguientes modificaciones.

15

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 °C y un tiempo de extensión de 2 minutos. Se usaron el cebador específico de virus PMC N<sup>Pro</sup>(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 °C y un tiempo de extensión de 2 minutos. Productos anidados de PCR se limpiaron, clonaron y secuenciaron.

20

### 2. Método 3 'RACE

25

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 Clontech 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 °C 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 °C y un tiempo de extensión de 2 minutos. Los productos anidados de PCR se limpiaron, clonaron y secuenciaron.

30

## 35 Ejemplo 7

### PCR a tiempo real

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

40

**Cebador directo:** CAGTTGGTGTGATCCATGATCCT

**Cebador inverso:** GGCCTCACCCCTGCAACTTT

45

**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:

50

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:

5	2x Mastermix (Roche)	12,5 ul
	40x Multiscribe	0,625 ul
	Cebador directo	1 ul
	Cebador inverso	1 ul
	Sonda Taqman	1 ul
10	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)

15

Ciclar la máquina de PCR en:

Fase 1: Repetir 1x

20

48 °C durante 30 minutos  
95 °C durante 10 minutos

Fase 2: Repetir 45x

25

95 °C durante 15 segundos  
58 °C 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.

30

### Ejemplo 8

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

#### 35 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).

40

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 fases de lectura diferentes para conseguir la expresión de proteínas en el sistema de expresión de baculovirus.

45

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

50 Los ligamientos se transforman en la cepa de *E. coli* competente Top 10 (Invitrogen Corporation), Genotipo: F<sup>+</sup>mcrA D(mrr-hsdRMS-McrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoRecA1 araD139 D(ara-leu) 7697 galU galK rpsL endA1 nupG, y/o *E. coli* Sure® (Stratagene), Genotipo: e14<sup>+</sup>(McrA<sup>-</sup>)D (mcrCB-hsdSMR-mrr) 171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 rel A1 lac recB recJ sbcc umuC<sup>+</sup>:Tn5 (kan<sup>r</sup>) uurC[F<sup>+</sup> proAB lacI<sup>a</sup>Z D m15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]<sup>c</sup>. 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.

55

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

60

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.

65

### 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 establecen 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 °C. Después se añade solución de anticuerpo (50 µl/pocillo). El anticuerpo usado es antisero de cabra anti-pestivirus biotinilado o anticuerpos monoclonales anti-virus PMC individuales (mAb). La placa se incuba durante una noche a 22 °C, después se revela como describen Shannon et al. (1991), omitiendo la incubación con IgG anti-ratón biotinilada para muestras que se hacen reaccionar con el antisero 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 ufp/ml. Todas las reservas de virus se almacenan a 4 °C para su uso en la producción de vacunas. Para almacenamiento a largo plazo de las reservas maestra, de siembra y de trabajo, cada virus recombinante es envasado en ampollas y se congela a -80 °C.

### 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<sup>6</sup> 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 °C, 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 °C 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 xg. 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.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Intervet International BV

<120> ESPECIES DE PESTIVIRUS

<130> 2006-042-EP-D2

<150> AU2006902089

<151> 21/04/2006

<160> 86

# ES 2 767 626 T3

<170> SeqWin99

<210> 1  
<211> 12077  
5 <212> ADN  
<213> Pestivirus Bungowannah

<220>  
10 <221> 5' UTR  
<222> <1...418>  
<223> 5' UTR

<220>  
15 <221> gen  
<222> <419...922>  
<223> Npro

<220>  
20 <221> gen  
<222> <923...1219>  
<223> Cápsida

<220>  
25 <221> gen  
<222> <1220...1885>  
<223> E0

<220>  
30 <221> gen  
<222> <1886...2473>  
<223> E1

<220>  
35 <221> gen  
<222> <2474...3604>  
<223> E2

<220>  
40 <221> gen  
<222> <3605...3820>  
<223> P7

<220>  
45 <221> gen  
<222> <3821...5224>  
<223> NS2

<220>  
50 <221> gen  
<222> <5225...7252>  
<223> NS3

<220>  
55 <221> gen  
<222> <7253...7441>  
<223> NS4A

<220>  
60 <221> gen  
<222> <7442...8482>  
<223> NS4B

<220>  
65 <221> gen  
<222> <8483...9997>  
<223> NS5A

ES 2 767 626 T3

<220>  
 <221> gen  
 <222> <9998...12077>  
 5 <223> NS5B  
 <400> 1

```

gtataacgac agtagttcaa gtgtcgttat gcatcattgg ccataacaaa ttatctaatt 60
tggaataggg acctgcgacc tgtacgaagg ccgagcgtcg gtagccattc cgactagtag 120
gactagtaca aataggtcaa ctggttgagc aggtgagtgt gctgcagcgg ctaagcgggtg 180
agtacaccgt attcgtcaac aggtgctact ggaaaggatc acccactagc gatgcctgtg 240
tggacgagga catgtccaag ccaatgttat cagtagcggg ggtegttact gagaaagctg 300
cccagaatgg gtagttgcac atacagtctg ataggatgcc ggcggtatgcc ctgtattttg 360
accagtataa atattatccg ttgtaaagca tatgaatact tttactttta atacatatgg 420
agggagtggag gaaggaaaca tgttctttag aactgcaccc acgccgccac cagggtgcca 480
agaaccgggtt tacacaagca caatgagacc aatttttggc gaaccccatc cacctctaca 540
caaacacagc acgttaaaat tgccacattg gaggggggatc aaaacaatta gagttaagaa 600
gagagaattg ccaaagaagg gcgattgtag caactcaaca acagctocca cttcgggggt 660
gtacgttgaa ttaggggctg tgttctataa agattacacg ggcacgggat accatcgtgt 720
accgctagaa ctttgtacaa accaagagag gtgcgagggg tccaagtgtg tagggagaat 780
gacagggctc gatggcaggt tgtacaacgt tttagtatgt ccggacgatt gtatcctctt 840
tgagagacac tgtagaggtc aaacagtcgt cctgaaatgg atttccaacc ccttgacatc 900
accactttgg gtccagagtt gtctgacga caaaggagca aaacccaagg tgaaaccaa 960
agacgacagg atgaagcaag gaaaaatagt gacaaagcct aaagagactg aagcagatca 1020
aaaaactaga ccaccagatg ccacgatagt ggttgacggg cagaagtatc aggtgaggaa 1080
gaaggggaaa gcgaaaccca agactcaaga cggcttatac cacaacaaga acaaaccaga 1140
agcgtccagg aagaagcttg agaagcctt gctagcatgg gcaatattag cctgcctatt 1200
ggtggtaccg gtagggtcca ccaacgtgac acaatggaac ttatgggaca ataaaagtac 1260
tacagacata catagcgtca tgttttctag agggattaaa aggagtctgc atggaatttg 1320
gccacacaaa atctgcaaag ggatccctac acatctagca gcagactatg aactgaaaag 1380
gattcacggg atggtggatg caagcccat 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 aagggcacia cttctctttc tcaggggagg tcagggcctc 1680
accctgcaac tttgagttaa ctgctgaaga cttgctcagg atcatggatc acaccaactg 1740
cgaggggattt acctacttcg gggaaggaat cgttgacggg tacaccgagg tagtagagaa 1800
ggccaggtca agtggtttca gggctctcac atggttgtcg agtaagattg aaaacaccaa 1860
gaaaaaataa ttcggagctg aagccagtcc ttactgcccga gtggctaaga gggcttcaa 1920
cattattht atccaacaatt gcaccccgct tggactgcca gataagtcaa aaattatagg 1980
accaggaacc tttgacatca gtggcagga tgaattcata tttccaaaac tcccctacca 2040
cgtagatgac ttcattctac tgagcttaat tgcaatgctt gattttgctc cagagacatc 2100
aagtataatc tacctggctt tgcaactacct aatgccaagt aatgacaaca gggactcgt 2160
gatggacctg gacccaataa aactaaacct tactgcaact aaatccgtgg caagtgtggt 2220
coctacatcg gtgaatgtgt taggtgaatg ggtgtgcgtc aaaccaagtt ggtggcctta 2280
ttccgccgaa atcactaatc tgataggagg tgtcatcacc gtggcagact tagttatcaa 2340
    
```

ES 2 767 626 T3

gaccattgaa	gaattgctaa	atttgtggac	cgaagcaaca	gctgtggcat	ttctggctgc	2400
tctaataaaa	atTTTTtagag	gccagccgat	ccaagcggta	gcatggttaa	tcatcatagg	2460
gggagcacia	gccccaacct	gcaaccctga	attcatgtac	gcattagcga	aaaataccag	2520
cataggttca	ttaggaccag	aatcactgac	gacaaggTgg	taccaactaa	ccagcggttt	2580
caaactcact	gacagcacga	ttgaagtcac	ctgtgtgggt	gctaacatga	ggattcatgt	2640
agtgtgcccc	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	cccataaact	ctgacaacag	agactatatt	2940
cacatacagg	aagcccaaac	cattoggact	tgaaaactgg	tgcaagtata	cagtggTgga	3000
gaaagggatc	ctgtattctt	gtaaatttgg	gggcaattca	acatgcatca	aagggcttat	3060
agttaaaggg	caacgggaag	acaagtaag	gtactgtgaa	tggtgtggTt	ataagttcag	3120
ttcaccaaat	ggactgcctc	agtatccact	gggattgtgt	gagaaaagac	aatcagaagg	3180
actcagggat	tatggtgact	tcccatgctg	caacaacggc	acttGtattg	acaaagagg	3240
tagtgtgcaa	tgctacatag	gggataagaa	agttaccgtg	aagctgtata	atgcctcact	3300
attggcccc	atgccctgca	aoccoatagt	gtataaactcc	caggggcccc	cagcgcctaa	3360
gacctgcact	tataggtggg	cctcaacatt	agaaaataaa	tattatgaac	ccagggacag	3420
ctactaccag	caatacatta	taaagtcagg	gtatcaatat	tggtttgatc	tcacagcaaa	3480
ggatcatgtg	gcagactgga	tcacaaaata	ctttccaata	ataatagtgg	cctgttagg	3540
gggcagaggc	accttGtggg	tgttgatagc	ttatgagttg	ctaactcagt	atgaggtagt	3600
aggagacgag	aacatagtgg	ctcaagctga	agccctggta	atcggaaaca	tcttgatgag	3660
tttagactta	gagataatta	gctgcttctc	tctgttgTtg	atcgtggTga	aaaaacaagc	3720
tgtcaggaga	acgttggcct	tactgtttca	ttggataact	atgaaccctat	tccagtCagt	3780
aatgatcaca	gtggTctact	tcgtcggTtt	ggtgagggcc	gaagagggaa	ctaagagggg	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	ccccactat	4080
aggtataatt	ggagttacc	tagcaatgag	agttttgtgg	ctggtaaagg	aatgactat	4140
accaaccccc	tctgtgtcca	ttagtctgat	agatccaaaag	atggtcataa	tactctactt	4200
gattccctca	actattacag	tcaatcacia	cctagaccta	gcaagttatt	gcttGaaact	4260
ggaccccttt	atcctatcat	tcctaacaat	gtgggtggat	gTtGtcatoc	ccctgctcat	4320
gctgccttgg	tacgaactag	taaaagtcta	ctacctaaaa	aagaagaaag	aggatgtgga	4380
aacatggttc	caaaattcag	gaatatccac	ccaagaaact	tccccatacg	gatttgattt	4440
ttctagcccc	ggggagggag	tgcacacact	accaatgcaa	aataaaaacca	aattttgtag	4500
gactgcttac	atgactgtac	taagggcttt	ggtgataaca	gccatcagca	gtgtctggaa	4560
accaataatt	ttagcagaac	tcctaataga	ggcagtgtat	tgacacacac	ttaaaatagc	4620
caaagaattg	gcggggtcaa	gcaggTtctg	tgttaggttc	attgcatcta	ttatagagtt	4680
gaattgggcc	atggacgaaa	aagaagcatc	tcggtacaaa	agattttacc	tattatcatc	4740
caaaataaca	gatctaattg	ttaagcacia	aatccaaaat	gagacagtaa	aatcctggTt	4800
tgaagaaact	gaaatatttg	gaatacaaaa	agtggcaatg	gtgataaggg	ctcattctct	4860
gagtttgag	ccaaatgccca	tcccttGctc	cgTtTgtgaa	gaaaaacaaa	atcaaaaagc	4920
caaaagggcc	tgccctaagt	gtggtagtag	aggcactcaa	ataaagtgtg	ggctgacact	4980
ggccgagttt	gaggaagaac	attacaataat	aatatacatc	ctcgaaggcc	aagatgaaac	5040
tcccagaggt	aaagaagaaa	gacagcaagt	aaacttatgtc	tctaggggtg	cctgttctct	5100
taggaatctt	cctatcttag	cttcaaaaaa	caaataccta	cttgtaggca	atctgggtat	5160
ggaattgcaa	gatttgGaaa	gtatgggatg	gatcattcga	ggccagcccg	tctgcaagaa	5220
gataatacac	catgagaaat	gcaggccttc	aataccagac	aaactcatgg	cattctctgg	5280
gattatgcct	aggggagttt	caccaagagc	ccctacacgg	ttccctgtgt	ccttGctgaa	5340
gataagacgg	ggttttgaga	ccggctgggc	ctacacacac	cctggagggg	taagtagtgt	5400
gatgcatgtc	accgctgggt	cggatataata	tgtcaatgac	tcaatagggg	ggacaaaaat	5460
ccagtGCCaa	gacaaaaaca	ctacaacaga	tgagtgtgaa	tatggtgtga	aaacagactc	5520
agggTgctct	gatggagctc	ggtgctatgt	catcaaccct	gaagcaacca	acatagcagg	5580
gaccaagggg	gccatggtac	acctgaggaa	agctggagga	gagttcaact	gcgtgactgc	5640
ccaggtacc	cccgccttct	ataatctaaa	gaacttaaaa	ggatggTcag	gcctgcctat	5700
ctttgaact	gccacaggaa	gagtggtagg	aagggtaaaa	gcaggaaaaa	acactgacaa	5760
tgctccaaca	accattatgt	cagggacgca	agTggcaaaa	ccatcagagt	gtgacctaga	5820
atcagtggTg	aggaacttag	agacaatgaa	cagaggggaa	ttcaaaacaag	tgactctggc	5880
tacaggcgca	ggaaagacaa	ccatgctacc	aaagctgtta	atagaatcca	taggcaggca	5940
taagagagtg	ttagtactga	tcccgTtgag	agctgcagcg	gagggggTgt	accagtacat	6000
gagaacccaa	cacccaagca	tatctttcaa	cttgaggata	ggggatctga	aagaaggtga	6060
catggcaact	gggatcacct	atgctcttta	tgggtacttc	tgccaaatgg	acatgcctag	6120

ES 2 767 626 T3

actggagaat	gcaatgaag	aataaccacta	tattttcttg	gatgaatatic	actgtgccac	6180
accagaacag	ttggcagtg	tgtcaaaaat	acataggttc	ggtgaatcag	ttagggtaat	6240
agccatgacc	gccacgccat	ccgggactgt	gagcacaaca	gggcagaaat	tcacaattga	6300
ggaggtggt	gtacctgaag	tgatgaagg	ggaggacctt	gctgatgatt	acatcgaat	6360
agcagggtt	aaggtgccaa	agaaagagtt	agagggtaac	gtactgactt	ttgtgcctac	6420
aaggaagat	gcatcggaaa	cagcaaaaaa	attaaccaca	cagggataca	atgctggata	6480
ctacttcagt	ggagaagatc	catcatccct	gcggacaact	acttctaagt	caccatata	6540
agtagttgca	accaatgcc	ttgaatccgg	ggtaacctta	ccggaccttg	atacagtaat	6600
agatacaggc	atgaagtgtg	aaaagagact	aagaatcgaa	aacaaagctc	cctacatcgt	6660
aacaggactg	aaaagaatgg	ctataacaac	gggggagcaa	gctcaaagaa	aaggtagggt	6720
aggcagggtt	aaacctggga	ggtacttgag	aggacctgaa	aacctgcag	gtgaaaagga	6780
ctatcactat	gaccttttac	aggcacagag	gtacggcatc	caagactcaa	taaactcac	6840
caagcttttc	agggagatga	actatgattg	ggcattatat	gaggaagacc	cgtaaagat	6900
tgcccaatta	gagttgctaa	acacactcct	gatctcaagg	gatctgccag	tagtaacaaa	6960
aaatctgatg	gccccacaaa	cacatcccga	acctatacaa	ttggcttaca	atagtttaga	7020
aaccctgtga	ccggtggcat	tcccaaaagt	gaaaaatgga	gaagtcactg	acgcacatga	7080
aacttacgag	ttgatgacct	gtaggaagct	tgagaaagac	ccccctatat	acctgtatgc	7140
aacagaagaa	gaagatctcg	tagtggacat	actgggattg	aatggccag	acgccacaga	7200
gagggctgtc	ttggaagtgc	aagacgccct	gggccagatc	acaggtttat	acaggggga	7260
gacagcttta	ctcatagccc	tattaggggtg	ggtgggctac	gaagccttgg	tgaagaggca	7320
cgtgcctatg	gtgacagaca	tatacacccct	agaagatgaa	aaattggaag	acactacaca	7380
cctacaatth	gccccagatg	atctgaacaa	ttcagatacc	attgagctcc	aagacttatc	7440
gaatcaccoaa	atccaacaaa	ttctagaagg	tggaagggaa	tatgtcggcc	aagcctacca	7500
attcctcag	ttgcaagctg	agagggctgc	caactcagac	aaaggcaaga	aagcaatggc	7560
aggggcccca	ttactagccc	acaagttcct	ggaatacttg	caagagcatg	caggtgacat	7620
aaagaagtat	ggtctatggg	gggtccacac	agcattgtat	aacagcataa	aagaaagact	7680
gggtcacgaa	actgcattcg	catctctggt	tataaaatgg	attgcctttt	cctcagatgg	7740
agtcccgggg	atgattaagc	aagcagcagt	agacttgggtg	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	cattactatc	8040
aatcaggaaa	ggatctagtc	agggttttagc	cggctggcca	gtagctcag	cgatggagat	8100
catgaaccag	aacccaatca	gcgtggctat	tgcaactggca	ctaggagtog	gagcaatagc	8160
ggcacataat	gccattgaga	gcagtgaggc	aaaaggact	ctcctgatga	aggctcttgt	8220
taagaacttt	ttggaccaag	cagccactga	tgagcttgtg	aaagagaacc	ctgagaagat	8280
cataatggca	gtgtttgagg	gcattcaaac	agctggaat	ccattgagac	ttgtatacca	8340
tctatatgca	atgttctaca	aaggggtggac	ttccgcgga	atagctgaaa	aaaccgctgg	8400
taggaacatt	tttgtgttaa	caatatttga	aggattggaa	atgttaggcc	tggatgccga	8460
ctcaaaatgg	agaaatctga	gctctaatta	tcttattgat	gcagtgaaga	aatcattga	8520
aaaaatgact	aaaacagcaa	caagcttcac	ctacagcttt	ttgaaatctt	tgcttccctgc	8580
ccccttctcg	tgtactaaat	cagaaagaga	tccaagaata	gggtggcccc	aaaaagacta	8640
cgactacctc	gggtccgat	gcgcttgtgg	gtataacagg	agagctataa	aaagagactc	8700
aggacctgtg	ttatgggaga	ccttagagga	gacgggtcca	gagtactgcc	acaacagagg	8760
tgaaaggggg	ctcagcaatg	tgaagactac	tagagtcttt	gtccaaggag	aggaatccc	8820
tccaattgca	ctgaggaaag	gagttaggtga	gatgttggtc	aaggtgtttt	cattcagaat	8880
agatthttgat	aaagacaaga	tactttcaac	agacaagtgg	aaggtaccac	atagggcagt	8940
tacatcaatc	tttgaggatt	ggcagggtat	tggttacaga	gaggttacc	tagggaccac	9000
accgactat	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	gacctacttg	aaggcccaag	9300
tgtaatcgtt	gaaacaggag	gcatagccat	caaccacata	gggtcaatc	cacaatccag	9360
tacatgtgga	acagttttta	cagcagtgaa	ggatctgtgc	caaacagtta	gtaataaagc	9420
caagaatatic	aaaattgggt	tttcggaagg	ccaataccca	ggtccagggg	ttgcaagaa	9480
gacactgaac	cagctcatic	aagatgaaga	ccccaaaacca	ttcatatttg	tttgtgctc	9540
tgacaagtca	atgtctaatic	gggcaaaaac	tgcgaggaac	atcaagagaa	tcaccaccac	9600
aacacctgag	aaattcagag	acttggcaaa	aaacaagaaa	ttgataattg	tgctgttagg	9660
tgatagatac	catgaagata	tagaaaagta	tgcaagacttc	aagggcacct	tcttgaccag	9720
acaaaccttg	gaagcactag	caagtgccaa	agctgtagag	aaggacatga	ccaagaaaga	9780
agcagcaaga	gtattggcaa	tggaagaaaa	ggatgaacta	gaactcccag	ggtggctgca	9840
tacagatgca	cccaaattcc	tagacattac	taaggacaac	atcacacatc	acctaatagg	9900

ES 2 767 626 T3

ggacatgcag	agtctgagag	aaagagcagg	ggagatagga	gcaaaggcca	ccactcaaat	9960
cactaagaaa	gggagtgtat	acacaatcaa	tctgagtacg	tggtgggagt	cagagagggt	10020
ggcatccttg	gaacctttgt	tccgggaact	actatctaaa	tgcaggccag	tggacaggga	10080
gacatataag	aattgtcatt	ttgcaacagc	agcccaactt	gccggaggaa	actgggtacc	10140
gtagcacca	gttgtagatc	ttggggaaat	tccggtaaag	aagaaaaaga	ctctccccta	10200
cgaggcatac	aagctcctaa	aagagatggt	tgactcggag	aaggaattcc	ataaaccagt	10260
gagcagggaa	aaacaccaat	ggatactgaa	caaagtgaaa	actggtggtg	acctcggtt	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	tgaatcagg	10740
gctagaattc	aactactatg	agactgcaat	acaaaaaaat	gagaagaggg	cagtggtaga	10800
tgattggatg	gaaggtgact	atgtagaaga	aaaaagacca	agagtcatac	agtatcctga	10860
ggcaaaagatg	agattagcta	taaccaaagt	aatgtataac	tgggtcaagc	agaagcctat	10920
agtaatccct	ggatacgaag	gtaagactcc	tttgtttcat	gttttcgaca	aggtccacaa	10980
agaaatggaaa	aatttcaaca	gtccagttgc	agtcagtttt	gacactaaag	cctgggacac	11040
acaagtaaca	cccaaagacc	ttctcctcat	atcagaaatc	caaaagtatt	attacaagaa	11100
agaataccat	agattcatag	ataatttgac	cgagaaaatg	gtggagggtac	cagtggtttg	11160
tgaagacgga	aacgtctaca	taagagaagg	tcagagggga	agtgggtcaac	cagacactag	11220
cgcaggtaat	agtatggtga	atgtactgac	tatgatatat	gccttctgca	aagctaactc	11280
catcccttac	tcagccttcc	acagggtagc	aaagatacat	gtgtgtggag	atgatggttt	11340
cttgataaact	gagaaaagtt	ttggtgaggc	ctttgcgatc	aaggggcctc	aaattttgat	11400
ggaagcagga	aaaccacaaa	aacttatagg	tgaatttgga	ctgaaattgg	catataaatt	11460
tgatgacatt	gaattttgct	cgcatacacc	aataaaggtc	aggtgggctg	acaacaacac	11520
atcatacatg	cccgggaagag	acacagctac	cattctagct	aaaatggcaa	cccgccttga	11580
ctctagtggg	gagaggggga	ccgagggata	cgagctggcc	gtggccttca	gtttcttact	11640
aatgtattct	tggaaccccc	tggtagaag	aatatgcctg	cttgtcatgt	ctacaattga	11700
cacaaaagaa	gctagccaaa	ataacactat	atatacattt	aggggggatc	ccataggtgc	11760
ctacacagag	gtaattgggt	ataggctgga	ccaactaaaa	cagacagagt	tctctaaatt	11820
ggctcagctg	aatttgtcaa	tggcaatact	tcaaatatac	aataaaaaaca	caaccaagag	11880
actcatcgaa	gatttgtgtga	aacttgcaa	caaaaataag	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

5

<400> 2

ES 2 767 626 T3

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

ES 2 767 626 T3

				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		

ES 2 767 626 T3

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

ES 2 767 626 T3

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





ES 2 767 626 T3

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			
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	
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	
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	
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





ES 2 767 626 T3

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



ES 2 767 626 T3

			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
Lys	Glu	Trp	Lys	Asn	Phe	Asn	Ser	Pro	Val	Ala	Val	Ser	Phe	Asp	Thr					
										3525										3530
Lys	Ala	Trp	Asp	Thr	Gln	Val	Thr	Pro	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	Ile	Ser					
										3540										3545
Glu	Ile	Gln	Lys	Tyr	Tyr	Tyr	Lys	Lys	Glu	Tyr	His	Arg	Phe	Ile	Asp					
										3555										3560
Asn	Leu	Thr	Glu	Lys	Met	Val	Glu	Val	Pro	Val	Val	Cys	Glu	Asp	Gly					
										3570										3575
Asn	Val	Tyr	Ile	Arg	Glu	Gly	Gln	Arg	Gly	Ser	Gly	Gln	Pro	Asp	Thr					
										3585										3590
Ser	Ala	Gly	Asn	Ser	Met	Leu	Asn	Val	Leu	Thr	Met	Ile	Tyr	Ala	Phe					
										3595										3600
Cys	Lys	Ala	Asn	Ser	Ile	Pro	Tyr	Ser	Ala	Phe	His	Arg	Val	Ala	Lys					
										3605										3610
Ile	His	Val	Cys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Leu	Ile	Thr	Glu	Lys	Ser	Phe					
										3615										3620
Gly	Glu	Ala	Phe	Ala	Ile	Lys	Gly	Pro	Gln	Ile	Leu	Met	Glu	Ala	Gly					
										3625										3630
Lys	Pro	Gln	Lys	Leu	Ile	Gly	Glu	Phe	Gly	Leu	Lys	Leu	Ala	Tyr	Lys					
										3635										3640
Phe	Asp	Asp	Ile	Glu	Phe	Cys	Ser	His	Thr	Pro	Ile	Lys	Val	Arg	Trp					
										3645										3650
Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Ser	Tyr	Met	Pro	Gly	Arg	Asp	Thr	Ala	Thr	Ile					
										3655										3660
Leu	Ala	Lys	Met	Ala	Thr	Arg	Leu	Asp	Ser	Ser	Gly	Glu	Arg	Gly	Thr					
										3665										3670
Glu	Gly	Tyr	Glu	Leu	Ala	Val	Ala	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Met	Tyr	Ser					
										3675										3680
Trp	Asn	Pro	Leu	Val	Arg	Arg	Ile	Cys	Leu	Leu	Val	Met	Ser	Thr	Ile					
										3685										3690
Asp	Thr	Lys	Glu	Ala	Ser	Gln	Asn	Asn	Thr	Ile	Tyr	Thr	Phe	Arg	Gly					
										3695										3700
Asp	Pro	Ile	Gly	Ala	Tyr	Thr	Glu	Val	Ile	Gly	Tyr	Arg	Leu	Asp	Gln					
										3705										3710
Leu	Lys	Gln	Thr	Glu	Phe	Ser	Lys	Leu	Ala	Gln	Leu	Asn	Leu	Ser	Met					
										3715										3720

ES 2 767 626 T3

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
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

5

<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 gtagtgtcac atacagtctg ataggatgcc ggcggtatgcc ctgtattttg	360
accagtataa atattatccg ttgtaaagca tatgaatact tttactttta atacatat	418

10

<210> 4  
 <211> 504  
 <212> ADN  
 <213> Pestivirus Bungowannah

15

<400> 4

ggagggagtg aggaaggaaa catgttcttt agaactgcac ccacgccgcc accaggggtgc	60
caagaaccgg tttacacaag cacaatgaga ccaatttttg gcgaacccca tccacctcta	120
cacaaacaca gcacgtataa attgccacat tggaggggga tcaaaacaat tagagttaag	180
aagagagaat tgccaaagaa gggcgattgt agcaactcaa caacagctcc cacttcgggg	240
gtgtacgctt aattaggggc tgtgttctat aaagattaca cgggcacggt ataccatcgt	300
gtaccgctag aactttgtac aaaccaagag aggtgcgagg gatccaagtg tgtagggaga	360
atgacagggc ctgatggcag gttgtacaac gtttttagtat gtccggacga ttgtatcctc	420
tttgagagac actgtagagg tcaaacagtc gtccctgaaat ggatttccaa ccccttgaca	480
tcaccacttt gggccagag ttgt	504

20

<210> 5  
 <211> 297  
 <212> ADN  
 <213> Pestivirus Bungowannah

25

<400> 5

tctgacgaca aaggagcaaa acccaaggtg aaaccaaag 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 tgcctatttg tggtaccggt agggctcc	297

ES 2 767 626 T3

<210> 6  
 <211> 666  
 <212> ADN  
 <213> Pestivirus Bungowannah

5 <400> 6

```

accaacgtga cacaatggaa cttatgggac aataaaagta ctacagacat acatagcgtc 60
atgttttcta gagggattaa aaggagtctg catggaattt ggccacaca 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 actactcaa 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 agaaaaaat attcggagct 660
gaagcc 666
    
```

10 <210> 7  
 <211> 588  
 <212> ADN  
 <213> Pestivirus Bungowannah

15 <400> 7

```

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

20 <210> 8  
 <211> 1131  
 <212> ADN  
 <213> Pestivirus Bungowannah

25 <400> 8

ES 2 767 626 T3

```

caaacctgca accctgaatt catgtacgca ttagcgaaaa ataccagcat aggttcatta 60
ggaccagaat cactgacgac aagggtgtac 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 attcaacca 360
atatctatat ctaccccaag ctttgaactt gaatgcccta ggggttggac tggggctgta 420
gagtgtacac tagtctcccc atcaactctg acaacagaga ctatattcac atacaggaag 480
cccaaaccat tcggacttga aaactggtgc aagtatacag tgggtggagaa agggatcctg 540
tattcttgta aatttggggg caattcaaca tgcatacaag ggcttatagt taaagggcaa 600
cggaagaca 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 ggccccatg 840
ccctgcaaac ccatagtgta taactcccag gggccccag cgctaagac ctgcacttat 900
aggtgggcct caacattaga aaataaatat tatgaacca gggacagcta ctaccagcaa 960
tacattataa agtcagggtg tcaatattgg tttgatctca cagcaaagga tcatgtggca 1020
gactggatca caaataactt tccaataata atagtggcct tgttaggggg cagaggcacc 1080
ttgtgggtgt tgatagctta tgagttgcta actcagtatg aggtagtagg a 1131

```

<210> 9

<211> 216

5 <212> ADN

<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 9

```

gacgagaaca tagtggctca agctgaagcc ctggtaatcg gaaacatctt gatgagttta 60
gacttagaga taattagctg ctcccttctg ttggtgatcg tggtgaaaaa acaagctgtc 120
aggagaacgt tggtcttact gtttcattgg ataactatga acccattcca gtcagtaatg 180
atcacagtgg tctacttcgt cggtttggtg agggcc 216

```

10

<210> 10

<211> 1404

<212> ADN

15 <213> Pestivirus Bungowannah

<400> 10

ES 2 767 626 T3

gaagagggaa	ctaagagggg	tagtacaagc	gggccaccaa	tccatgtagt	tgcaatactg	60
ttattcctct	tgtaccacac	agtgaagtat	aaggacttta	acatagcaat	gatcttactt	120
ataacattgt	cctgaaaag	ctcatcctac	atacatacca	gcttgtatga	aattccattg	180
cttgtggctg	taataagtct	cacatgctcc	atatacattt	ttgacttgca	ggtaaagagc	240
aagctagtgg	ccccaactat	aggtataaatt	ggagttaccc	tagcaatgag	agttttgtgg	300
ctggtaaggc	aaatgactat	accaaccccc	tctgtgtcca	ttagtctgat	agatccaaag	360
atggtcataa	tactctactt	gatatcccta	actattacag	tcaatcacia	cctagaccta	420
gcaagttatt	gcttgaaact	gggacctttt	atcctatcat	tcctaacaat	gtgggtggat	480
gttgtcatcc	tctgtctcat	gctgccttgg	tacgaactag	taaaagtcta	ctacctaaaa	540
aagaagaaag	aggatgtgga	aacatgggtc	caaaattcag	gaatatccac	ccaagaaact	600
tccccatacg	gatttgattt	ttctagcccc	ggggagggag	tgcacacact	accaatgcaa	660
aataaaaacca	aattttgtag	gactgcttac	atgactgtac	taagggcttt	ggtgataaca	720
gccatcagca	gtgtctggaa	accaataaatt	ttagcagaac	tcctaataga	ggcagtgtat	780
tggacacaca	ttaaaatagc	caaagaattg	goggggtcaa	gcaggttcgt	tgtaggttc	840
attgcatcta	ttatagagtt	gaattgggcc	atggacgaaa	aagaagcatc	tcggtacaaa	900
agattttacc	tattatcatc	caaaataaca	gatctaattg	ttaagcacia	aatccaaaat	960
gagacagtaa	aatcctgggt	tgaagaaact	gaaatatttg	gaatacaaaa	agtggcaatg	1020
gtgataaggg	ctcattctct	gagtttgag	ccaaatgcca	tcctttgctc	cgtttgtaa	1080
gaaaaacaaa	atcaaaaagc	caaaaggccc	tgccctaagt	gtggtagtag	aggcactcaa	1140
ataaagtgtg	ggctgacact	ggccgagttt	gaggaagaac	attacaaaa	aatatacatc	1200
ctcgaaggcc	aagatgaaac	tcccatgagg	aaagaagaaa	gacagcaagt	aacttatgtc	1260
tctaggggtg	ctctgttctt	taggaatctt	cctatcttag	cttcaaaaa	caaataccta	1320
cttgtaggca	atctgggtat	ggaattgcaa	gatttgaaaa	gtatgggatg	gatcattcga	1380
gggccagccg	tctgcaagaa	gata				1404

<210> 11

<211> 2028

5 <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	ctgggtcggg	tatatatgtc	aatgactcaa	tagggaggac	aaaaatccag	240
tgccaagaca	aaaacactac	aacagatgag	tgtgaatatg	gtgtgaaaa	agactcaggg	300
tgctctgatg	gagctcgggt	ctatgtcatc	aaccctgaag	caaccaacat	agcagggacc	360
aagggggcca	tggtacacct	gaggaagct	ggaggagagt	tcaactgcgt	gactgccag	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	ttcttgggatg	aatatcactg	tgccacacca	960
gaacagttgg	cagtgatgtc	aaaaatacat	aggttcgggtg	aatcagttag	ggtaatagcc	1020
atgaccgcca	cgccatccgg	gactgtgagc	acaacagggc	agaaattcac	aattgaggag	1080
gtggtagtac	ctgaagtgat	gaagggggag	gaccttgctg	atgattacat	cgaaatagca	1140
gggttgaagg	tgccaaagaa	agagttagag	ggtaacgtac	tgacttttgt	gcctacaagg	1200

10

ES 2 767 626 T3

aagatggcat	cggaacacagc	aaaaaatta	accacacagc	gatacaatgc	tggatactac	1260
ttcagtggag	aagatccatc	atccctgagg	acaactactt	ctaagtcacc	atataatagta	1320
gttgcaacca	atgccattga	atccggggta	accttaccgg	accttgatac	agtaatagat	1380
acaggcacga	agtgtgaaaa	gagactaaga	atcgaaaaa	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	tgccattccc	aaaagtgaaa	aatggagaag	tactgacgc	acatgaaact	1860
tacgagttga	tgacctgtag	gaagcttgag	aaagaccccc	ctatatacct	gtatgcaaca	1920
gaagaagaag	atctogtagt	ggacatactg	ggattgaaat	ggccagacgc	cacagagagg	1980
gctgtcttgg	aagtgcgaaga	cgccctgggc	cagatcacag	gtttatct		2028

<210> 12

<211> 189

5 <212> ADN

<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 12

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

10

<210> 13

<211> 1041

15 <212> ADN

<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 13

aatcaocaaa	tccaacaaat	tctagaaggt	gggaaggaat	atgtcggcca	agcctaccaa	60
ttcctcaggt	tgcaagctga	gagggctgcc	aactcagaca	aaggcaagaa	agcaatggca	120
gogggcccat	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	aatgcaggtg	gacaatttgt	tggctccctt	420
tttgtttcat	gtctagcaga	gtacacattc	aaaaacttca	ataaatcagc	attagaagga	480
ttgatcgagc	ctgccttaag	ctatctaccc	tacgcttcaa	gcgactaaa	gttattccta	540
ccgactagac	ttgaaagtgt	agtgatactg	tccactacta	tatacagaac	atacttatca	600
atcaggaaag	gatctagtca	gggtttagcc	ggctggcag	ttagctcagc	gatggagatc	660
atgaaccaga	acccaatcag	cgtggctatt	gcactggcac	taggagtcgg	agcaatagcg	720
gcacataatg	ccattgagag	cagtgaggca	aaaaggactc	tctgatgaa	ggtctttggt	780
aagaactttt	tggaaccaagc	agccactgat	gagcttgtga	aagagaaccc	tgagaagatc	840
ataatggcag	tgtttgaggg	cattcaaaca	gctggaaatc	cattgagact	tgtataccat	900
ctatatgcaa	tgttctacaa	aggggtggact	gcccgggaaa	tagctgaaaa	aaccgctggg	960
aggaacattt	ttgtgttaac	aatatttgaa	ggattggaaa	tgttaggcct	ggatgccgac	1020
tcaaaatgga	gaaatctgag	c				1041

20

<210> 14

<211> 1515

25 <212> ADN

<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 14

ES 2 767 626 T3

tctaattatc	ttattgatgc	agtgaagaaa	atcattgaaa	aatgactaa	aacagcaaca	60
agcttcacct	acagcttttt	gaaatctttg	cttcctgccc	ccttctogtg	tactaaatca	120
gaaagagatc	caagaatagg	gtggcccca	aaagactacg	actacctcga	ggtccgatgc	180
gcttgtgggt	ataacaggag	agctataaaa	agagactcag	gacctgtgtt	atgggagacc	240
ttagaggaga	cgggtccaga	gtactgccac	aacagaggtg	aaagggggct	cagcaatgtg	300
aagactacta	gatgctttgt	ccaaggagag	gaaatccttc	caattgcact	gaggaaagga	360
gtaggtgaga	tgttggtcaa	gggtgtttca	ttcagaatag	atthtgataa	agacaagata	420
ctttcaacag	acaagtggaa	ggtaccacat	agggcagtta	catcaatctt	tgaggattgg	480
cagggatttg	gttacagaga	ggcttaccta	gggaccaa	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	attaaacca	gcttcgggga	aagagtgatt	780
cccgaacct	atgaggagga	cccacttgaa	ggcccaagtg	taatcgttga	aacaggaggc	840
atagccatca	accaaatagg	ggtcaatcca	caatccagta	catgtggaac	agtttttaca	900
gcagtgaagg	atctgtgcca	aacagttagt	aataaagcca	agaatatcaa	aattggggtt	960
togggaaggcc	aatacccagg	tccaggggtt	gcaaagaaga	cactgaacca	gctcatacaa	1020
gatgaagacc	caaaaccatt	catatthgtt	tgtggctctg	acaagtcaat	gtctaatecg	1080
gcaaaaactg	cgaggaaat	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	actcccagg	tggctgcata	cagatgcacc	caaattccta	1380
gacattacta	aggacaacat	cacacatcac	ctaatagggg	acatgcagag	tctgagagaa	1440
agagcagggg	agataggagc	aaaggccacc	actcaaatca	ctaagaaagg	gagtgatatac	1500
acaatcaatc	tgagt					1515

<210> 15  
 <211> 2080  
 <212> ADN  
 <213> Pestivirus Bungowannah

<400> 15

5

10

ES 2 767 626 T3

acgtggtggg	agtcagagag	gttggcatct	ttggaacctt	tgttccggga	actactatct	60
aaatgcaggc	cagtggacag	ggagacatat	aagaattgtc	atthttgcaac	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	caataagggg	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	gaatgaatc	agggctagaa	ttcaactact	atgagactgc	aatcccaaaa	780
aatgagaaga	gggcagtggt	agatgattgg	atggaaagggtg	actatgtaga	agaaaaaaga	840
ccaagagtca	tacagtatcc	tgaggcaaag	atgagattag	ctataaccaa	agtaatgtat	900
aactgggtca	agcagaagcc	tatagtaatc	cctggatagc	aaggtaagac	tcctttgttt	960
catgttttcg	acaaggtcca	caaagaatgg	aaaaatthca	acagtccagt	tgcagtcagt	1020
tttgacacta	aagcctggga	cacacaagta	acacccaaag	accttctcct	catatcagaa	1080
atccaaaagt	attattacaa	gaaagaatac	catagattca	tagataatth	gaccgagaaa	1140
atggtggagg	taccagtggt	ttgtgaagac	ggaaacctct	acataagaga	aggtcagagg	1200
ggaagtggtc	aaccagacac	tagcgcaggt	aatagtatgt	tgaatgtact	gactatgata	1260
tatgccttct	gcaaagctaa	ctccatccct	tactcagcct	tccacagggg	agcaaagata	1320
catgtgtgtg	gagatgatgg	tttcttgata	actgagaaaa	gttttggtga	ggcctttgcg	1380
atcaaggggc	ctcaaatttt	gatggaagca	ggaaaaccac	aaaaacttat	aggtgaatth	1440
ggactgaaat	tggcatataa	atthgatgac	atthaattht	gctcgcatac	accaataaag	1500
gtcaggtggg	ctgacaacaa	cacatcatac	atgcccggaa	gagacacagc	taccattcta	1560
gctaaaatgg	caaccgcct	tgactctagt	ggggagaggg	ggaccgaggg	atagcagctg	1620
gccgtggcct	tcagtttctt	actaatgtat	tcttggaaac	ccctggtaag	aagaatatgc	1680
ctgcttgtca	tgtctacaat	tgacacaaaa	gaagctagcc	aaaataacac	tatatataca	1740
tttagggggg	atcccatagg	tgccacacaa	gaggtaatth	ggtataggct	ggaccaacta	1800
aaacagacag	agttctctaa	attggctcag	ctgaatthgt	caatggcaat	acttcaataa	1860
tacaataaaa	acacaaccaa	gagactcadc	gaagattgtg	tgaaacttgg	caaccaaaat	1920
aagcaaatat	tggatgaatgc	agaccgtttg	atcagcaaga	aaacgggcta	cacatatgag	1980
ccaacagctg	gccacactaa	gataggcaag	cactatgaag	aaatcaacct	gctgaaagat	2040
acaccacaaa	aaactgtcta	ccaaggaact	gaaaggtata			2080

<210> 16

<211> 167

5 <212> PRT

<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 16

ES 2 767 626 T3

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

5

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

10

ES 2 767 626 T3

<210> 18  
 <211> 222  
 <212> PRT  
 <213> Pestivirus Bungowannah

5

<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
    
```

10

<210> 19  
 <211> 196  
 <212> PRT  
 <213> Pestivirus Bungowannah

15

<400> 19

ES 2 767 626 T3

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

5

ES 2 767 626 T3

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

ES 2 767 626 T3

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

5

<400> 21

ES 2 767 626 T3

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

5 <210> 22  
<211> 468  
<212> PRT  
<213> Pestivirus Bungowannah

<400> 22

ES 2 767 626 T3

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

ES 2 767 626 T3

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

5

<400> 23

ES 2 767 626 T3

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	

ES 2 767 626 T3

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

ES 2 767 626 T3

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

5

<400> 24



ES 2 767 626 T3

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

ES 2 767 626 T3

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
- 5 <212> PRT
- <213> Pestivirus Bungowannah
  
- <400> 26

ES 2 767 626 T3

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

ES 2 767 626 T3

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  
5 <212> PRT  
<213> Pestivirus Bungowannah  
<400> 27

ES 2 767 626 T3

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		

ES 2 767 626 T3

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

ES 2 767 626 T3

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  
 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

<211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Cebador directo de PCR CR39F (63) en el ejemplo 4

<400> 28  
 cacatctagc agcagactat ga 22

10 <210> 29  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <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

25 <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

35 <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

40 <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

55 <220>  
 <223> Cebador anidado directo de PCR ER510FN (68) en el ejemplo 4

<400> 33  
 gaaacagtaa agccaacg 18

60 <210> 34

65

## ES 2 767 626 T3

<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador anidado inverso de PCR ER510RN (182) en el ejemplo 4

<400> 34  
ctggaatcg gaaacatc 18

10 <210> 35  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador directo de PCR ER62F (203) en el ejemplo 4

<400> 35  
gggaccgagg gatacga 17

20 <210> 36  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Cebador anidado directo de PCR ER62FN (373) en el ejemplo 4

30 <400> 36  
agagtaatt gggat 16

<210> 37  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Cebador inverso de PCR ER62R (637) en el ejemplo 4

40 <400> 37  
cagcaggtg atttctcat 20

<210> 38  
<211> 14  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Cebador anidado inverso de PCR ER62RN (516) en el ejemplo 4

<400> 38  
tgccaagtt tcac 14

55 <210> 39  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> Cebador directo de PCR ER55F (31) en el ejemplo 4

<400> 39  
aaaccgccga agtaaacc 18

65 <210> 40

# ES 2 767 626 T3

<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador inverso de PCR ER55R (214) en el ejemplo 4

<400> 40  
ctggagccct ggtaatgg 18

10 <210> 41  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador anidado directo de PCR ER55FN (64) en el ejemplo 4

<400> 41  
gacgggaatg ggttca 16

20 <210> 42  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Cebador anidado inverso de PCR ER55RN (162) en el ejemplo 4

30 <400> 42  
tagtgcttc ttattggtat 20

<210> 43  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Cebador directo de PCR JFP1F en el ejemplo 5

40 <400> 43  
catgcccata gtaggac 17

45 <210> 44  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Cebador inverso de PCR JFRR3R en el ejemplo 5

<400> 44  
accagtrca ccamccat 18

55 <210> 45  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> Cebador directo de PCR CR39-ER55PCRF en el ejemplo 5

<400> 45  
agggtctca catggtgtc 20

65 <210> 46

<211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Cebador inverso de PCR ER55-510-512 R en el ejemplo 5

<400> 46  
 ccattaccag ggctccag 18

10 <210> 47  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Cebador directo de PCR CR39F(63) en el ejemplo 5

<400> 47  
 cacatctagc agcagactat ga 22

20 <210> 48  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Cebador inverso de PCR ER55RN (162) en el ejemplo 5

<400> 48  
 taggtgcttc ttattggtat 20

30 <210> 49  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Cebador directo de PCR ER55-510-512F en el ejemplo 5

<400> 49  
 cgttggcttt actgtttcat tg 22

40 <210> 50  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Cebador inverso de PCR CR316-CR24R en el ejemplo 5

<400> 50  
 tccccgaagc ttggtttaat 20

50 <210> 51  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Cebador directo de PCR NS3F en el ejemplo 5

<400> 51  
 gtcaggcctg cctatctttg 20

60 <210> 52  
 <211> 20

65

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Cebador inverso de CR316-CR24R en el ejemplo 5  
  
 <400> 52  
 tccccgaagc ttggttaat 20  
  
 10 <210> 53  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Cebador directo de PCR CR316-CR24F en el ejemplo 5  
  
 <400> 53  
 20 cgggaccatt aaaccaagc 19  
  
 <210> 54  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Cebador inverso de PCR ER62-ER63R en el ejemplo 5  
  
 <400> 54  
 30 cagggggttc caagaataca 20  
  
 <210> 55  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de PCR 5utr (140)R en el ejemplo 5  
  
 <400> 55  
 40 ggtgtactca ccgcttagcc 20  
  
 <210> 56  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de PCR NPRO(630)RS en el ejemplo 5  
  
 <400> 56  
 50 ttgctacaat cgcccttctt 20  
  
 <210> 57  
 <211> 20  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo de PCR NPRO(779)FS en el ejemplo 5  
  
 <400> 57  
 60 agggagaatg acagggtctg 20  
  
 <210> 58  
 65 <211> 20

# ES 2 767 626 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador directo de PCR Cápside (927)FS en el ejemplo 5

<400> 58  
acaagaggac aaaaccaag 20

10 <210> 59  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador inverso de PCR EO(1365)RS en el ejemplo 5

20 <400> 59  
gtcacgttg tggacctac 20

25 <210> 60  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Cebador inverso de PCR E1(2402)RS en el ejemplo 5

35 <400> 60  
agccagaaat gccacagc 18

40 <210> 61  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Cebador directo de PCR E1(2606)FS en el ejemplo 5

50 <400> 61  
acctgtgtg gtgctaacaat 20

55 <210> 62  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> Cebador inverso de PCR E2(3086)RS en el ejemplo 5

65 <400> 62  
ttactttgtc ttccgttg 20

70 <210> 63  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

75 <220>  
<223> Cebador directo de PCR NS2(4409)FS en el ejemplo 5

80 <400> 63  
ccaagaaact tccccatacg 20

85 <210> 64  
<211> 23

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de PCR ns2(4460)RS en el ejemplo 5  
 5  
 <400> 64  
 ttccacatcc tctttctct ttt 23  
 <210> 65  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de PCR NS3(5170)RS en el ejemplo 5  
 15  
 <400> 65  
 gctggccctc gaatgatcca 20  
 <210> 66  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Cebador directo de PCR NS3(5468)FS en el ejemplo 5  
 25  
 <400> 66  
 gttcctgtg tccttgctga 20  
 30  
 <210> 67  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de PCR NS3(5670)RS en el ejemplo 5  
 <400> 67  
 40 tgttttgtc ttggcactgg 20  
 <210> 68  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Cebador directo de PCR NS3(6296)FS en el ejemplo 5  
 <400> 68  
 50 gagcacaaca gggcagaaat 20  
 <210> 69  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de PCR NS3(6479)RS en el ejemplo 5  
 <400> 69  
 60 ccatcttct ttaggcaca 20  
 <210> 70  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador directo de PCR NS3F(6525)F en el ejemplo 5  
 5  
 <400> 70  
 gtcaggcctg cctatcttg 20  
 <210> 71  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador directo de PCR NS3(7153)FS en el ejemplo 5  
 <400> 71  
 ggagaagtca ctgacgcaca 20  
 20 <210> 72  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador inverso de PCR NS3(7241)RS en el ejemplo 5  
 <400> 72  
 gccatttcaa tcccagtatg 20  
 30 <210> 73  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador directo de PCR NS4B(7715)FS en el ejemplo 5  
 <400> 73  
 40 ggggtccaca cagcattgta 20  
 <210> 74  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de PCR NS4B(7893)RS en el ejemplo 5  
 50 <400> 74  
 cccttgatac tcacgcctgt 20  
 <210> 75  
 <211> 20  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <223> Cebador directo de PCR NS4B(8532)FS en el ejemplo 5  
 <400> 75  
 gccgactcaa aatggagaaa 20  
 <210> 76  
 65 <211> 21  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de PCR NS5A(8810)RS en el ejemplo 5  
 5  
 <400> 76  
 gccaccctat tcttgatct c 21  
 <210> 77  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador directo de PCR NS5B(10889)FS en el ejemplo 5  
 <400> 77  
 aatgagaag agggcagtgg 20  
 20 <210> 78  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador directo de PCR NS5BF-10936 en el ejemplo 5  
 <400> 78  
 aaggcacca ctcaatcac 20  
 30 <210> 79  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador inverso de PCR NS5BR-12039 en el ejemplo 5  
 <400> 79  
 40 aggttctgc tgaccagct 20  
 <210> 80  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso de PCR CR24R en el ejemplo 6  
 50 <400> 80  
 tccccgaagc ttggttaat 20  
 <210> 81  
 <211> 45  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <223> Cebador 1 de PCR mezclado con cebador A Universal BD en el ejemplo 6  
 <400> 81  
 ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt 45  
 65 <210> 82  
 <211> 22  
 <212> ADN

## ES 2 767 626 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador 2 de PCR mezclado con cebador A Universal BD en el ejemplo 6

5 <400> 82  
ctaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 83  
10 <211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
15 <223> Cebador de PCR cebador A Universal anidado BD en el ejemplo 6

<400> 83  
aagcagtggg atcaacgcag at 22

20 <210> 84  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> Cebador directo de PCR de Taqman en el ejemplo 7

<400> 84  
30 cagtgggtg gatccatgat cct 23

<210> 85  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Cebador inverso de PCR de Taqman en el ejemplo 7

<400> 85  
40 ggcctcacc tgcaactt 19

<210> 86  
<211> 19  
<212> ADN  
45 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sonda Taqman en el ejemplo 7

50 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> <1...1>  
<223> 6-Carboxifluoresceína (6F)

55 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> <19...19>  
<223> Aglutinantes del surco menor/inactivador no fluorescente (MGBNFQ)

60 <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 por que** dicha secuencia aislada de nucleótidos de ARN o ADN del virus PMC consiste en:
- 5
- a) la SEC ID N° 8, 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);
  - 10 b) una secuencia de ARN o ADN que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia sobre al menos 100 nucleótidos con la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N° 8; 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 ausencia de virus PMC en una muestra biológica, incluyendo el método las etapas de:
- 15
- a) poner la muestra biológica que contiene ácido nucleico en contacto con una sonda o un cebador polinucleotídicos que comprende una secuencia aislada de nucleótidos de ARN o ADN de acuerdo con la reivindicación 1, en condiciones rigurosas de hibridación; y
  - 20 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:
- 25
- 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 los ácidos nucleicos amplificados.
4. Un método para la detección de ácidos nucleicos del virus PMC presentes en una muestra biológica, incluyendo el método las etapas de:
- 30
- 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,
  - 35 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:
- 40
- a) extraer el ADN del tejido *ex vivo*;
  - b) escindir con enzimas de restricción dicho ADN;
  - c) someter a electroforesis los fragmentos; y
  - 45 d) someter a transferencia de Southern el ADN genómico de los tejidos y a posterior hibridación en condiciones rigurosas de hibridación con una secuencia de nucleótidos de ADN clonada y marcada de acuerdo con la reivindicación 1.

Figura 1

gtataacgac	agtagttcaa	gtgtcgttat	gcatcattgg	ccataacaaa	ttatctaatt	60
tggaataggg	acctgcgacc	tgtacgaagg	ccgagcgtcg	gtagccattc	cgactagtag	120
gactagtaca	aataggtdcaa	ctgggttagc	agggtgagtgt	gctgcagcgg	ctaagcggtg	180
agtacaccgt	attcgtcaac	agggtctact	ggaaaggatc	accocactagc	gatgcctgtg	240
tggacgagga	catgtccaag	ccaatgttat	cagtagcggg	ggtcgttact	gagaaagctg	300
cccagaatgg	gtagttgcac	atacagtcctg	ataggatgcc	ggcggatgcc	ctgtatTTTTg	360
accagtataa	atattatccg	ttgtaaagca	tatgaatact	tttactTTTTa	atacatatgg	420
agggagtgg	gaaggaaaca	tgttcttttag	aactgcaccc	acgcgcgccac	caggggtgcca	480
agaaccgggtt	tacacaagca	caatgagacc	aatttttggc	gaaccccatc	cacctctaca	540
caaacacagc	acgttaaaat	tgccacattg	gagggggatc	aaaacaatta	gagttaagaa	600
gagagaattg	ccaaagaagg	gcgattgtag	caactcaaca	acagctccca	cttcgggggt	660
gtacgttgaa	ttaggggctg	tgttctataa	agattacacg	ggcacgggat	accatcgtgt	720
accgctagaa	ctttgtacaa	accaagagag	gtgcgagggg	tccaagtgtg	tagggagaat	780
gacagggctc	gatggcagggt	tgtacaacgt	tttagtatgt	ccggacgatt	gtatcctctt	840
tgagagacac	tgtagaggtc	aaacagtcgt	cctgaaatgg	atttccaacc	ccttgacatc	900
accactttgg	gtccagagtt	gttctgacga	caaaggagca	aaacccaagg	tgaacccaaa	960
agacgacagg	atgaagcaag	gaaaaatagt	gacaaaagcct	aaagagactg	aagcagatca	1020
aaaaactaga	ccaccagatg	ccacgatagt	ggttgacggg	cagaagtatc	agggtgaggaa	1080
gaaggggaaa	gcaaaccca	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
gccacacaaa	atctgcaaaag	ggatccctac	acatctagca	gcagactatg	aactgaaaag	1380
gattcacggg	atggtgatg	caagcccat	gaccaacttc	acatggtgta	ggctacagag	1440
acatgagtg	aacaagcatg	ggtggtgcaa	ctggtacaat	atagagccgt	ggatcaatct	1500
catgaataat	acccaaggac	tattaaacac	tggagacaat	ttcactgagt	gcgcagtcac	1560
atgcaggat	gatgcagact	taggggtgaa	tatagtact	caagccagga	ctactccaac	1620
tatcctgact	ggctgtaaga	aagggcacia	cttctctttc	tcaggggagg	tcagggcctc	1680
accctgcaac	tttgagttaa	ctgctgaaga	cttgcctcagg	atcatggatc	acaccaactg	1740
cgagggattt	acctacttcg	gggaaggaat	cgttgacgggt	tacaccgagg	tagtagagaa	1800
ggccaggtca	agtggtttca	gggctctcac	atggttgctg	agtaagattg	aaaaccacia	1860
gaaaaaata	ttcggagctg	aagccagtcc	ttactgcca	gtggctaaga	ggtcttcaa	1920
cattatttat	accaacaatt	gcaccccgct	tggactgcca	gataagtcaa	aaattatagg	1980
accaggaacc	tttgacatca	gtggcagggg	tgaattcata	tttccaaaac	tcccctacca	2040
cgtagatgac	ttcattctac	tgagcttaat	tgcaatgtct	gattttgctc	cagagacatc	2100
aagtataatc	tacctggctt	tgcactacct	aatgccaaagt	aatgacaaca	gggacttcgt	2160
gatggacctg	gacccaaata	aactaaacct	tactgcaact	aaatccgtgg	caagtgtggg	2220
ccctacatcg	gtgaatgtgt	taggtgaatg	ggtgtgcctc	aaaccaagtt	ggtggcctta	2280
ttccgcogaa	atcactaatc	tgataggagg	tgtcatcacc	gtggcagact	tagttatcaa	2340
gaccattgaa	gaattgctaa	atltgtggac	gcaagcaaca	gctgtggcat	ttctggetgc	2400
tctaataaaa	atltttagag	gccagccgat	ccaagcggta	gcatggttaa	tcatcatagg	2460
gggagcacia	gccccaaact	gcaacctga	attcatgtac	gcattagcga	aaaataccag	2520
cataggttca	ttaggaccag	aatcactgac	gacaaggtgg	taccaactaa	ccagcggttt	2580
caaactcact	gacagcacga	ttgaagtac	ctgtgtgggt	gctaacatga	ggattcatgt	2640
agtgtgceca	cttgtaagtg	acagatattt	ggccataaac	cacctagag	cactgccaac	2700
aacggcgtgg	ttcaggaaaa	tacacactca	gcatgaggtg	ccaagagaaa	gaatcatgag	2760
tgagtcaaaa	aggaggtaca	cttgtccttg	tggttctaaa	ccagtgggtg	ggtcaacaac	2820
acaattcaac	ccaatatcta	tatctacccc	aagctttgaa	cttgaatgcc	ctaggggttg	2880
gactggggct	gtagagtgtg	cactagtctc	cccatcaact	ctgacaacag	agactatatt	2940
cacatacagg	aagcccaaac	cattcggact	tgaaaactgg	tgcaagtata	cagtgggtgga	3000
gaaagggatc	ctgtattctt	gtaaatttgg	gggcaattca	acatgcatca	aagggcttat	3060
agttaaaggg	caacgggaag	acaaagtaag	gtactgtgaa	tgggtgtgggt	ataagttcag	3120
ttcaccaaat	ggactgcctc	agtatccact	gggattgtgt	gagaaagaac	aatcagaagg	3180
actcagggat	tatggtgact	tcccactctg	acaacaoggc	acttgtattg	acaagaagg	3240
tagtgtgcaa	tgctacatag	gggataagaa	agttaccgtg	aagctgtata	atgcctcact	3300
attggcccc	atgcctgca	aacctatagt	gtataactcc	caggggcccc	cagcgcctaa	3360
gacctgcact	tataggtggg	cctcaacatt	agaaaataaa	tattatgaac	ccagggacag	3420
ctactaccag	caatacatta	taaagtcagg	gtatcaatat	tggtttgatc	tcacagcaaa	3480
ggatcatgtg	gcagactgga	tcacaaaata	ctttccaata	ataatagtg	ccttgttagg	3540
ggcagagggc	accttgtggg	tgttgatagc	ttatgagttg	ctaactcagt	atgaggtagt	3600

ES 2 767 626 T3

aggagacgag aacatagtggt ctcaagctga agccctggta atcggaaaca tcttgatgag 3660  
 tttagactta gagataatta gctgcttct tctgttggtg atcgtgggtg aaaaacaagc 3720  
 tgtcaggaga acgttggctt tactgtttca ttggataact atgaacccat tccagtcagt 3780  
 aatgatcaca gtggtctact tcgtcggttt ggtgagggcc gaagagggaa ctaaagaggg 3840  
 tagtacaagc gggccacca tccatgtagt tgcaatactg ttattcctct tgtaccacac 3900  
 agtgaagtat aaggacttta acatagcaat gatcttactt ataacattgt ccttgaaaag 3960  
 ctcatcttac 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  
 gataatccca actattacag tcaatcacaa gctagagccta gcaagttatt gcttgaact 4260  
 gggacotttt atcctatcat tccaaacaat gtgggtggat gttgtcatcc tccctgctcat 4320  
 gctgcottgg tacgaactag taaaagtota ctacctaaaa aagaagaaag aggatgtgga 4380  
 aacatgggtc caaaattcag gaatatccac ccaagaaact tcccatacag gatttgattt 4440  
 ttctagcccc ggggagggag tgcacacact accaatgcaa aataaaacca aatthttag 4500  
 gactgcttac atgactgtac taagggtctt ggtgataaca gccatcagca gtgtctggaa 4560  
 accaataatt tttagcagaac tccaataga ggcagtgtat tggacacaca ttaaaatagc 4620  
 caaagaattg gcgaaggtcaa gcaggttcgt tgcaggttc attgcatcta ttatagactt 4680  
 gaattgggccc atggacgaaa aagaagcacc tcggtaacaaa agattttacc tattatcacc 4740  
 caaaataaca gatctaattg ttaagcaca aatccaaaat gagacagtaa aatcctggtt 4800  
 tgaagaaact gaaatatttg gaatacaaaa agtggcaatg gtgataaggc ctcatctct 4860  
 gagtttgag ccaaatgccca tcttttgctc cgtttgtgaa gaaaaacaaa atcaaaaagc 4920  
 caaaaggccc tgccctaagt gtggtagtag aggcactcaa ataaagtgtg ggctgacact 4980  
 ggccgagttt gaggaagaac attacaaaaa aatatacacc ctggaaggcc aagatgaaac 5040  
 tcccatgagg aaagaagaaa gacagcaagt aacttatgtc tctaggggtg ctctgtctct 5100  
 taggaatctt cctatcttag cttcaaaaaa caaacacta cttgtaggca atctgggtat 5160  
 ggaattgcaa gatttggaat gtatgggatg gatcattcga gggccagccg tctgcaagaa 5220  
 gataatacac catgagaaat gcaggccttc aataccagac aaactcatgg cattctcgg 5280  
 gattatgcct aggggagtta caccaagagc cctcacacgg tccctgtgt ccttgcctgaa 5340  
 gataagacgg gtttttgaga ccggtggggc ctacacacac cctggagggg taagttagt 5400  
 gatgcattgc accgctgggt cggatatata tgcattgac tcaatagga ggacaaaaat 5460  
 ccagtcgcaa gcaaaaaaca ctacaacaga tgagtgtgaa tatggtgtga aaacagacc 5520  
 aggggtgctc gatggagctc ggtgctatgt catcaaccct gaagcaacca acatagcagg 5580  
 gaccaagggg gccatggtac acctgaggaa agctggagga gagttcaact gcgtgactgc 5640  
 ccaggggtacc cccgccttct ataactctaa gaacttaaaa ggatggtcag gcctgcctat 5700  
 ctttgaagct gccacaggaa gagtggtagg aagggtaaaa gcagyaaaaa acactgacaa 5760  
 tgctccaaca accattatgt cagggagcga agttggcaaaa ccatcagagt gtgacctaga 5820  
 atcagtgggt aggaaactag agacaatgaa cagaggggaa ttcaaaacag tgactctggc 5880  
 tacagtcgca ggaagacaaa ccatgctacc aaagctgtta atagaatcca taggcaggca 5940  
 taagagagtg ttagtactga tcccgttgag agctgcagcg gaggggggtg accagtacat 6000  
 gagaacaaaa cacccaagca tatctttcaa cttgaggata ggggatctga aagaagtgga 6060  
 catggcaact gggatcacc atgcctctta tgggtacttc tgccaaatgg acatgctag 6120  
 actggagaat gcaatgaagg aataccaacta tattttcttg gatgaatato actgtgccac 6180  
 accagaacag ttggcagtgat tgtcaaaaat acataggttc ggtgaatcag ttagggtaat 6240  
 agccatgacc gccacgccat ccgggactgt gagcacaaca gggcagaaat tcacaattga 6300  
 ggaggtggtg gtacctgaag tgatgaaggg ggagagcctt gctgatgatt acatgaaat 6360  
 agcaggggtg aaggtgcaaa agaaagagtt agagggtaac gtactgactt ttgtgcctac 6420  
 aaggaagatg gcatcggaaa cagcaaaaaa attaaccaaca cagggataca atgctggata 6480  
 ctacttcagt ggagaagatc catcatccct gcggacaact acttctaagt caccatatat 6540  
 agtagttgca accaatgccca ttgaatccgg ggtaacctta ccggacctg atacagtaat 6600  
 agatacaggg atgaagtgtg aaaagagact aagaatcgaa aacaaagctc cctacatcgt 6660  
 aacaggactg aaaagaatgg ctataacaac gggggagcaa gctcaagaa aagtgagggt 6720  
 aggcagggtt aaacctggga ggtacttgag aggacctgaa aacactgcag gtgaaaagga 6780  
 ctatcactat gaccttttac aggcacagag gtacggcacc caagactcaa taaacatcac 6840  
 caagtcttcc agggagatga actatgattg ggcattatat gaggaagacc cgttaaagat 6900  
 tgcccaatta gatttgctaa acacactcct gatctcaagg gatctgccag tagtaacaaa 6960  
 aatctgatg gcccgcaaaa cacatccoga acctatacaa ttggcttaca atagtttaga 7020  
 aacccctgta ccggtggcat tcccaaaagt gaaaaatgga gaagtcactg acgcacatga 7080  
 aacttacgg ttgatgacct gttaggaact tgagaaagac ccccctatat acctgatgc 7140  
 aacagaagaa gaagatctcg tagtggacat actgggattg aatggccag acgccacaga 7200  
 gagggctgtc ttggaagtgc aagacgcct gggccagatc acaggtttat ctgcagggga 7260  
 gacagcttta ctcatagccc tattaggggtg ggtgggctac gaagccttgg tgaagaggca 7320  
 cgtgcctatg gtgacagaca tatacaccct agaagatgaa aaattggaag acactacaca 7380  
 ctacaattht gccccagatg atctgaacaa ttcagatacc attgagctcc aagacttatc 7440

ES 2 767 626 T3

gaatcaccaa	atccaacaaa	ttctagaagg	tgggaaggaa	tatgtogggc	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	agacttgggtg	gtatactata	taatcaacag	7800
gcttgagtat	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	catacttata	8040
aatcaggaaa	ggatctagtc	agggtttagc	cggtctggca	gtagctcag	cgatggagat	8100
catgaaccag	aacccaatca	gcgtggctat	tgcactggca	ctaggagtcg	gagcaatagc	8160
ggcacataat	gccattgaga	gcagtggagg	aaaaggact	ctcctgatga	aggctcttgt	8220
taagaacttt	ttggaccaag	cagccactga	tgagcttgtg	aaagagaacc	ctgagaagat	8280
cataatggca	gtggttgagg	gcattcaaac	agctggaaat	ccattgagac	ttgtatacca	8340
tctatattgca	atgttctaca	aaggttggac	tgccgcgga	atagctgaaa	aaaccgctgg	8400
taggaacatt	tttgtgttaa	caatatttga	aggattggaa	atgttagggc	tggatgccga	8460
ctcaaaatgg	agaatctga	gctctaatta	tcttattgat	gcagtgaaga	aaatcattga	8520
aaaaatgact	aaaacagcaa	caagcttcac	ctacagcttt	ttgaaatctt	tgtctcctgc	8580
ccccttctcg	tgtactaaat	cagaaagaga	tccaagaata	gggtggcccc	aaaaagacta	8640
cgactacttc	taggtccgat	gcgcttgtgg	gtataacagg	agagctataa	aaagagactc	8700
aggacctgtg	ttatgggaga	ccttagagga	gacgggtcca	gagtactgcc	acaacagagg	8760
tgaagggggg	ctcagcaatg	tgaagactac	tagatgcttt	gtccaaggag	aggaaatccc	8820
tccaattgca	ctgaggaaag	gagtaggtga	gatgttggtc	aaggtgtttt	cattcagaat	8880
agattttgat	aaagacaaga	tactttcaac	agacaagtgg	aaggtaccac	atagggcagt	8940
tacatcaatc	tttgaggatt	gpcaggggat	tgtttacaga	gaggcttacc	tagggacca	9000
accagactat	gggggtctgg	tgcccagatc	ttgtgtaact	gtaacaaaac	aaggttaaac	9060
attcttggaa	actgccagag	gcatggcttt	caogactgac	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
caagaatata	aaaattgggt	tttcgggaagg	ccaataccca	ggtccagggg	ttgcaaagaa	9480
gacactgaac	cagctcatac	aagatgaaga	cccaaaaaca	ttcatatttg	tttgtggctc	9540
tgactagtca	atgtctaatc	gggcaaaaac	tgcgaaggaa	atcaagagaa	tcaccaccac	9600
aacacctgag	aaattcagag	acttggcaaa	aaacaagaaa	ttgataattg	tgtgttagg	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
cgactaagaaa	gggagtgat	acacaatcaa	tctgagtacg	tgttgggagt	cagagaggtt	10020
ggcatctttg	gaacctttgt	tccgggaact	actatctaaa	tgcaggccag	tggacagggg	10080
gacatataag	aattgtcatt	ttgcaacagc	agcccaactt	gccggaggaa	actgggtacc	10140
ggtagcacca	gttgtacatc	ttggggaaat	tccggtaaag	aagaaaaaga	ctctccccta	10200
cgaggcatac	aagctcctaa	aaagagatgt	tgactcggag	aaggaattcc	ataaaccagt	10260
gagcagggaa	aaacaccaat	ggatactgaa	caaagtgaaa	actggtgggtg	acctcggett	10320
aaaaaatcta	gtatgtccag	gtagggttgg	agaaccaatc	ctaagagaga	agaagaatt	10380
caacattttac	aacaagagga	ttaccagtac	tatgtttatca	gtagggataa	ggccagaaaa	10440
attgocagtg	gtaagagccc	agaccagtac	caaagaattt	catgaagcaa	taagggacaa	10500
aatagacaaa	aaagcaaaaca	cacagacccc	aggctacac	aaagaattgt	tggagatatt	10560
caactcaata	tgtgccatcc	ccgaacttag	aaatacctac	aaagaggttg	attgggacgt	10620
tctaacctca	ggcataaata	ggaaaggtgc	agccgggtac	ttcgaaaaaa	tgaacatagg	10680
ggagatcata	gatagtgaca	aaaaatcagt	ggaacaactc	ataaagagaa	tgaatcagg	10740
gtagaatctc	aactactatg	agactgcaat	accaaataat	gagaagaggg	cagtgttaga	10800
tgtattgatg	gaaggtgact	atgtagaaga	aaaagagacca	agatccatac	agttcctgga	10860
ggcaaagatg	agattagcta	taaccaaaagt	aatgtataac	tgggtcaagc	agaagcctat	10920
agtaatccct	ggatacgaag	gtaagactcc	tttgtttcat	gttttcgaca	aggtccacaa	10980
agaatggaaa	aatttcaaca	gtccagttgc	agtcagtttt	gacactaaag	cctgggacac	11040
acaagtaaca	cccaaagacc	ttctcctcat	atcagaaaatc	caaaagtatt	attacaagaa	11100
agaataccat	agattcatag	ataatttgac	cgagaaaatg	gtggaggtac	cagtggtttg	11160
tgaagacgga	aacgtctaca	taagagaagg	tcagagggga	agtggtcaac	cagacactag	11220
cgacaggaat	agtatgttga	atgtactgac	tatgatatat	gccttctgca	aagctaactc	11280

ES 2 767 626 T3

catcocttac	tcagccttcc	acagggtagc	aaagatacat	gtgtgtggag	atgatggttt	11340
cttgataact	gagaaaagtt	ttggtgaggc	ctttgcgatc	aaggggcctc	aaatthttgat	11400
ggaagcagga	aaaccacaaa	aacttatagg	tgaatthtga	ctgaaattgg	catataaatt	11460
tgatgacatt	gaatthttgct	cgcatacacc	aataaaggtc	aggtgggctg	acaacaacac	11520
atcatacatg	cccggaagag	acacagctac	cattctagct	aaaatggcaa	cccgcttga	11580
ctctagtggg	gagaggggga	ccgagggata	cgagctggcc	gtggccttca	gtttcttact	11640
aatgtattct	tggaaccccc	tggtaagaag	aatatgcctg	cttgtcatgt	ctacaattga	11700
cacaaaagaa	gctagccaaa	ataacactat	atatacattt	aggggggatc	ccataggtgc	11760
ctacacagag	gtaattgggt	ataggctgga	ccaactaaaa	cagacagagt	tctctaaatt	11820
ggctcagctg	aatthttcaa	tggcaatact	tcaaataatac	aataaaaaaca	caaccaagag	11880
actcatcgaa	gattgtgtga	aacttggcaa	ccaaaataag	caaatattgg	tgaatgcaga	11940
ccgthttgatc	agcaagaaaa	cgggctacac	atatgagcca	acagctggcc	acactaagat	12000
aggcaagcac	tatgaagaaa	tcaacctgct	gaaagataca	ccacaaaaaa	ctgtctacca	12060
aggaactgaa	aggtata					12077

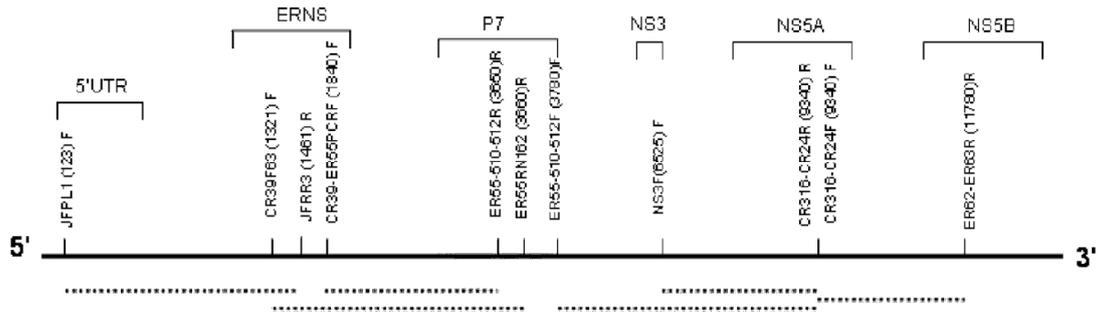
Figura 2

GGSEEGNMFF	RTAPTTPPGC	QEPVYTSTMR	PIFGEPHPL	HKHSTLKLPH	WRGIKTIRVK	60
KRELPKKGDC	SNSTTAPTSG	VYVELGAVFY	KDYTGTVYHR	VPLELCTNQE	RCEGSKCVGR	120
MTGSDGRLYN	VLVCPDDCIL	FERHCRGQTV	VLKWIWNPLT	SPLWVQSCSD	DKGAKPKVKP	180
KDDRMKQKGI	VTKPKETEAD	QKTRPPDATI	VVDGQKYQVR	KKGKAKPKTQ	DGLYHNKNKP	240
EASRKKLEKA	LLAWAILACL	LVPVVGSTNV	TQWNLWDNKS	TTDIHSMVFS	RGIKRSLHGI	300
WPTQICKGIP	THLAADYELK	RIHGMVDASP	MTNFTCCRLO	RHEWNKHGWC	NWYNIEPWIN	360
LMNNTQGLLN	TGDNFTECAV	TCRYDADLGV	NIVTQARTTP	TILTGCKKGH	NFSFSGEVRA	420
SPCNFELTAE	DLLRIMDHTN	CEGFYTFGEG	IVDGYTEVVE	KARSSGFRAL	TWLSSKIENT	480
KKKIFGAEAS	PYCPVAKRVF	NIIYTNNCTP	LGLPDKSKII	GPGTFDISGR	DEFIFPKLPY	540
HVDDFILLSL	IAMSDFAPET	SSIIYLALHY	LMPNSDNDRF	VMDLDPNKLN	LTATKSVASV	600
VPTSVMNLGE	WVCVKPSWWP	YSAEITNLIG	GVITVADLVI	KTIEEELNLW	TEATAVAFLA	660
ALIKIFRGOQ	IQAVAWLIII	GGAQAQTCNP	EFMYALAKNT	SIGSLGPESL	TTRWYQLTSG	720
FKLTDSTIEV	TCVGANMRIH	VVCPVSDRY	LAINHPRALP	TTAWFRKIHT	QHEVPRERIM	780
SESKRRYTCP	CGSKPVVRSR	TQFNPISIST	PSFELECPRG	WTGAVECTLV	SPSTLTTETI	840
FTYRKPKFFG	LENWCKYTVV	EKGILYSCKE	GGNSTCIKGL	IVKQREDKV	RYCEWCGYKF	900
SSPNGLPQYP	LGLCEKEQSE	GLRDYGDFFC	CNNGTCIDKE	GSVQCYIGDK	KVTVKLYNAS	960
LLAPMPCKPI	VYNSQGPAP	KTCTYRWAST	LENKYYEPRD	SYQQYYIIS	GYQYWFDLTA	1020
KDHVADWITK	YFPIIIIVALL	GGRGTWVLI	AYELLTQYEV	VGDENIVAQA	EALVIGNILM	1080
SLDLEIISCF	LLLLIVVKKQ	AVRRTLALLF	HWITMNPFFQ	VMITVVYFVG	LVRREEGTKE	1140
GSTSGPPIHV	VAILLFLLYH	TVKYKDFNIA	MILLITLSLK	SSSYIHSTSLY	EIPLLVAVIS	1200
LTCSEIYIFDL	QVKSKLVAPT	IGIIGVTLAM	RVLWLVROMT	IPTPSVSISL	IDPKMVIILY	1260
LISLTIIVNH	NLDLASYCLK	LGPFILSFLT	MWVDVVILLL	MLPWYELVKV	YYLKKKKEDV	1320
ETWFQNSGIS	TQETSPPYGF	FSSPGEGVHT	LPMQNKTKFC	RTAYMTVLRA	LVITAISSVW	1380
KPIILAEELI	EAVYWTHIKI	AKELAGSSRF	VARFIASIEE	LNWAMDEKEA	SRYKRFYLLS	1440
SKITDLMVKH	KIQNETVKSW	FEETEIFGIQ	KVAMVIRAHS	LSLEPNAILC	SVCEEKQKQK	1500
AKRPCPKCGS	RGTQIKCGLT	LAEEEEEHYK	KIYILEGQDE	TPMRKEERQQ	VTYVSRGALF	1560
LRNLPIILASK	NKYLLVGNLG	MELQDLESMG	WIIRGPAVCK	KIIHHEKCRP	SIPDKLMAFF	1620
GIMPRGVTPR	APTRFPVSL	KIRRGFETGW	AYTHPGGVSS	VMHVTAGSDI	YVNSDIGRTK	1680
IQCQDKNTTT	DECEYGVKTD	SGCSDGARC	VINPEATNIA	GTKGAMVHLR	KAGGEFNCVT	1740
AQGTPAFYNL	KNLKGWSGLP	IFEAAATGRVV	GRVKAGKNTD	NAPTTIMSGT	QVAKPSECDL	1800
ESVVRKLEMT	NRGEFKQVTL	ATGAGKTMTL	PKLLIESIGR	HKRVLVLIPL	RAAAEGVYQY	1860
MRTKHPSISF	NLRIGDLKEG	DMATGITYAS	YGYFCQMDMP	RLENAMKEYH	YIFLDEYHCA	1920
TPEQLAVMSK	IHRFGESVRV	IAMTATPSGT	VSTTGQKFTI	EEVVVPEVMK	GEDLADDYIE	1980
IAGLKVPKKE	LEGNVLTVP	TRKMASETAK	KLTTQGYNAG	YYFSGEDPSS	LRIITTSKSPY	2040
IVVATNAIES	GVTLPLDLTV	IDTGMKCEKR	LRIENKAPYI	VTGLKRMAIT	TGEQAQRKGR	2100
VGRVKPGRYL	RGPENTAGEK	DYHYDLLQAO	RYGIQDSINI	TKSFREMNYD	WALYEEEDPLK	2160
IAQLELLNLT	LISRDLPVVT	KNLMARTTHP	EPIQLAYNSL	ETPVPVAFPK	VKNGEVTDAA	2220
ETYELMTCRK	LEKDPPIYLY	ATEEEDLVVD	ILGLKWPDAT	ERAVLEVQDA	LQGITGLSAG	2280
ETALLIALLG	WVGYEALVKR	HVPMVTDIYT	LEDEKLEDDT	HLQFAPDDL	NSDTIELQDL	2340
SNHQIQQILE	GGKEYVGOAY	QFLRLQAERA	ANSDKGKKAM	AAAPLLAHKF	LEYLQEHAGD	2400
IKKYGLWGVH	TALYNSIKER	LGHETAFAASL	VIKWIAFSSD	GVPGMIKQAA	VDLVVYIIN	2460
RPEYQGDKET	QNAGRQFVGS	LFVSCLAEYT	FKNFNKSALE	GLIEPALSYL	PYASSALKLF	2520
LPTRELSVVI	LSTTIYRXYL	SIRKSSOGL	AGLAVSSAME	IMNONPISVA	IALALGVGAI	2580
AAHNAIESSE	AKRTLLMKVF	VKNFLDQAAT	DELVKENPEK	IIMAVFEGIQ	TAGNPLRLVY	2640
HLYAMFYKGW	TAAEIAEKTA	GRNIFVLTIF	EGLEMLGLDA	DSKWRNLSSN	YLIDAVKKII	2700
EKMTKTATSF	TYSEFLKSLP	APFSCTKSER	DPRIGWPQKD	YDYLEVRCAC	GYNRRAIKRD	2760
SGPVLWETLE	ETCPEYCHNR	GERGLSNVKT	TRCFVQGEI	PPIALRKGVG	EMLVKGVSEF	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	KNKKLIIIVLL	GDRYHEDIEK	YADFKGTFLT	RQTLAALASA	KAVEKDMTKK	3120
EAARVLAMEE	KDELELPGWL	HTDAPKFLDI	TKDNITHHLI	GDMQSLRERA	GEIGAKATTQ	3180
ITKKGSVYTI	NLSTWWESE	LASLEPLFRE	LLSKCRPVDR	ETYKNCHFAT	AAQLAGGNWV	3240
PVAPVVHLGE	IPVKKKKTLP	YEAYKLLKEM	VDSEKEFHKP	VSREKHQWIL	NKVKTGGDLG	3300
LKNLVCPRGV	GEPILREKKK	FNIYNKRITS	TMLSVGIRPE	KLPVVRAQTS	TKEFHFAIRD	3360
KIDKKANTQT	PGLHKELLEI	FNSICAIPEL	RNTYKEVDWD	VLTSGINRKG	AAGYFEKMMI	3420
GEIIDSDDKS	VEQLIKRMKS	GLEFNYYETA	IPKNEKRAVV	DDWMEGDYVE	EKRPRVIQYP	3480
EAKMRLAITK	VMYNWVKQKP	IVI PGYEGKT	PLFHVFDKVV	KEWKNFNSPV	AVSFDTKAWD	3540
TQVTPKDLLL	ISEIQKYYK	KEYHRFIDNL	TEKMEVPPVV	CEDGNVYIRE	GQRGSGQPD	3600

# ES 2 767 626 T3

SAGNSMLNVL	TMIYAFCKAN	SIPYSAFHRV	AKIHVCGDDG	FLITEKSFGE	AFAIKGPQIL	3660
MEAGKPQKLI	GEFGLKLAYK	FDDIEFCSHT	PIKVRWADNN	TSYMPGRDTA	TILAKMATRL	3720
DSSGERGTEG	YELAVAFSFL	LMYSWNPLVR	RICLLVMSTI	DTKEASQNNNT	IYTFRGDPIG	3780
AYTEVIGYRL	DQLKQTEFSK	LAQLNLSMAI	LQIYNKNTTK	RLIEDCVKLG	NQNKQILVNA	3840
DRLISKKTGY	TYEPTAGHTK	IGKHYYEINL	LKDTPQKTIV	QGTERY		3886

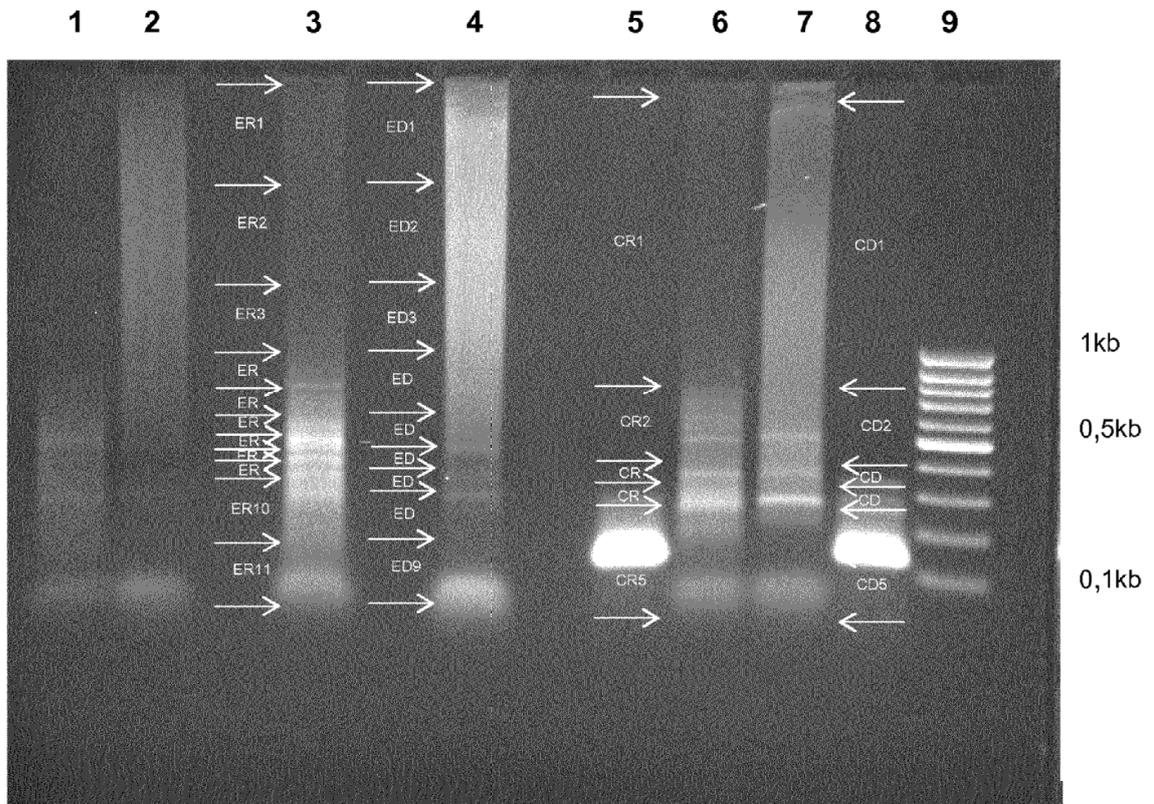
Figura 3



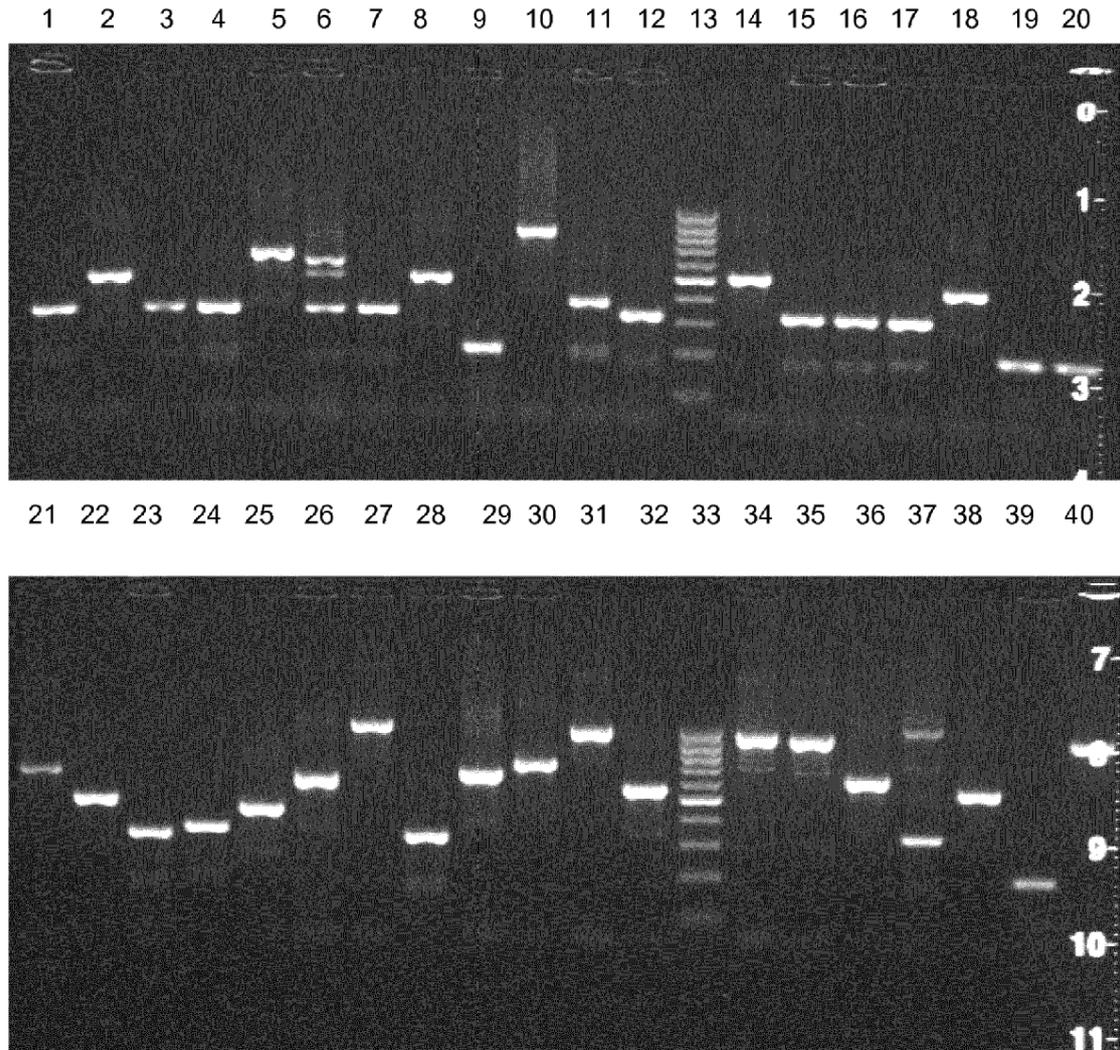
Lista de claves:

- ..... Producto de PCR
- Sequencia de referencia NADL ~~18626649~~
- ...[...]**F** **R** Cebadores [...] indica localizaciones en pb basadas en la secuencia NADL
- R indica cebador inverso
- F indica cebador directo

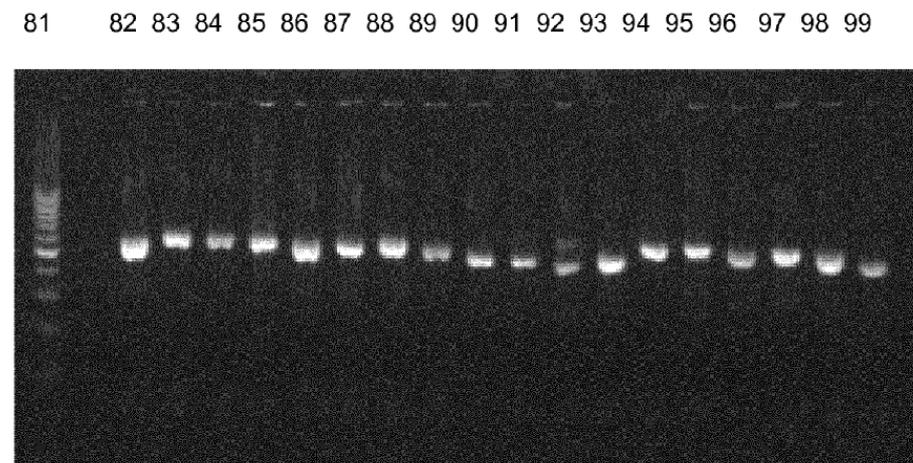
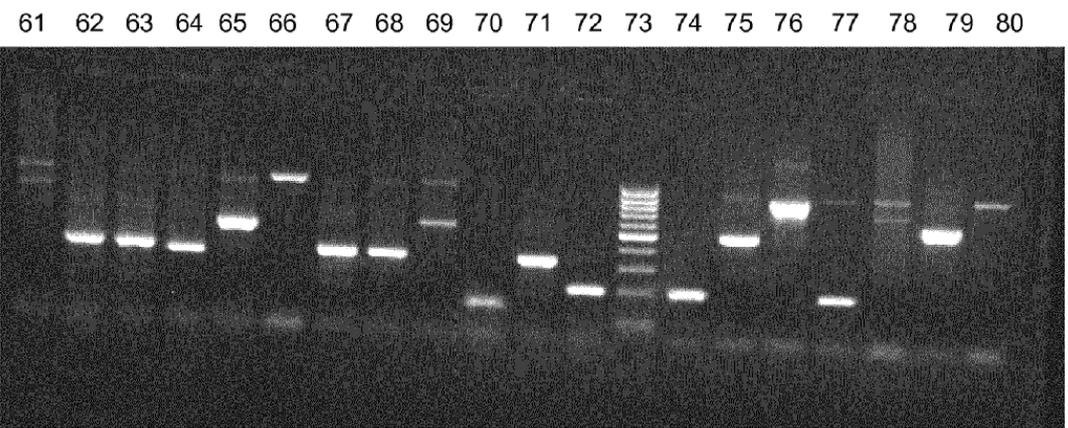
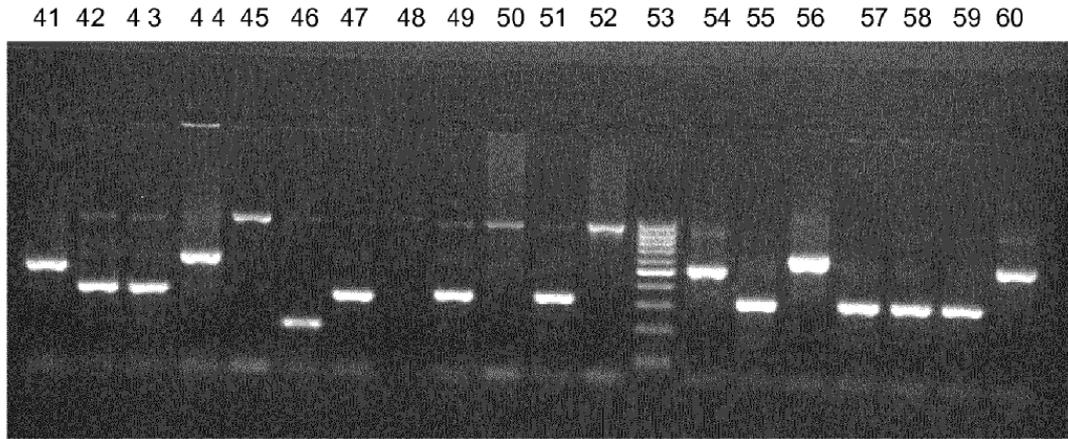
Figura 4



**Figura 5A**

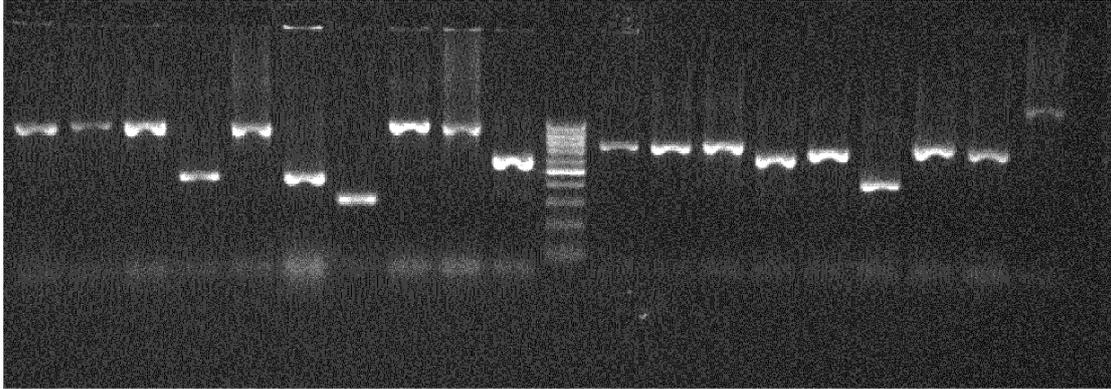


**Figura 5B**

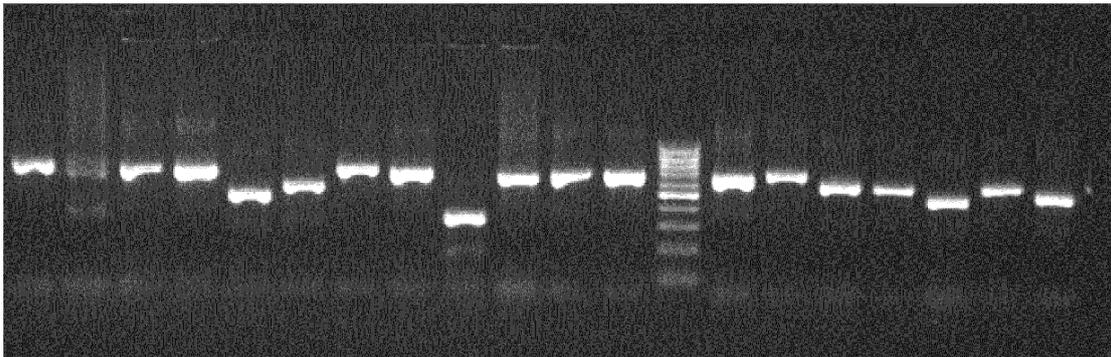


**Figura 6A**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

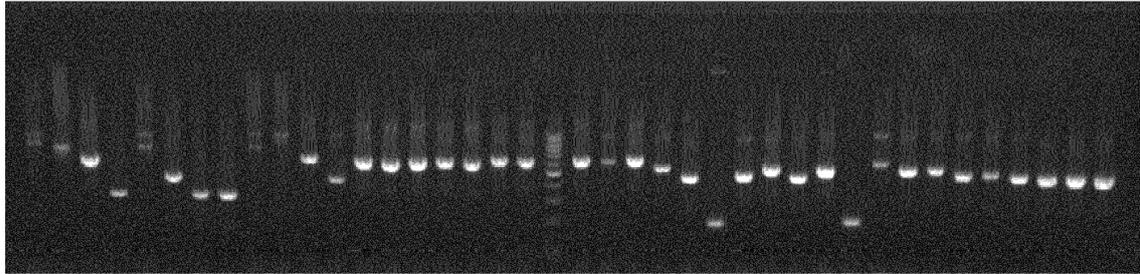


21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

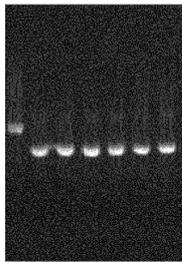


**Figura 6B**

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

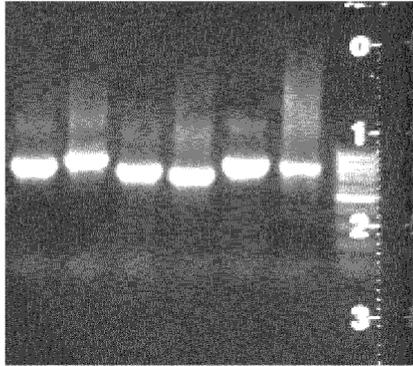


81 82 83 84 85 86 87

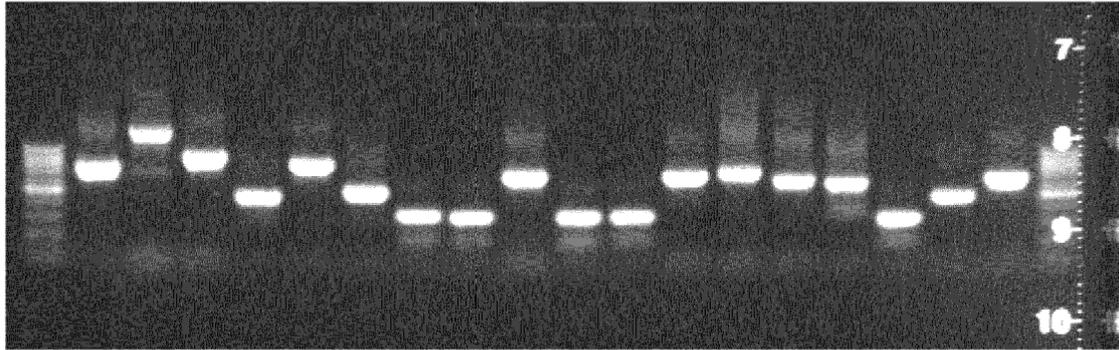


**Figura 7A**

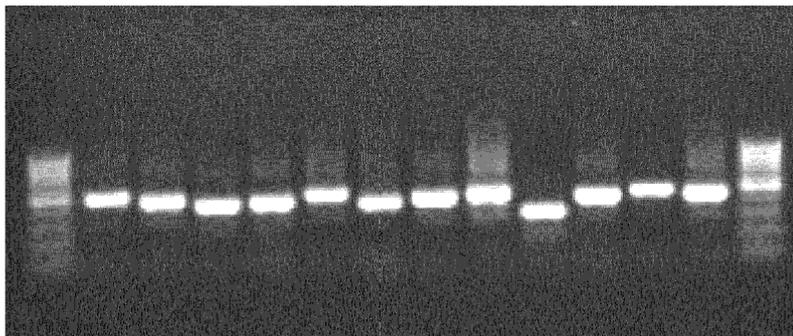
1 2 3 4 5 6 7



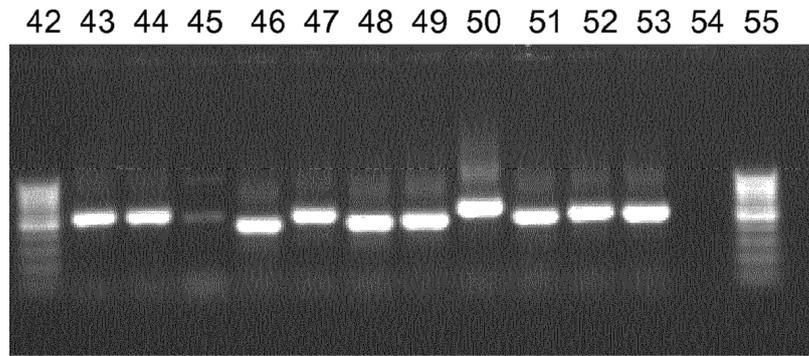
8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27



28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41

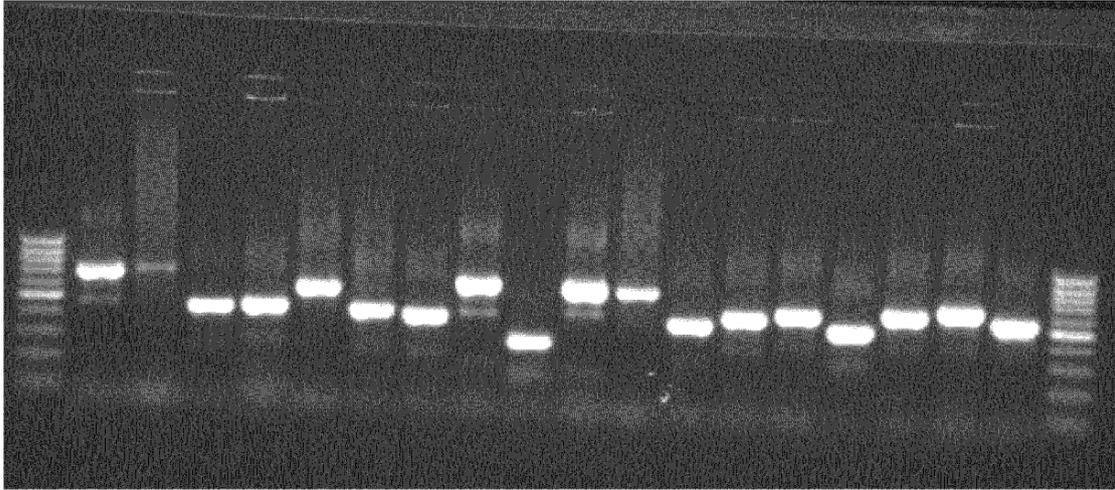


**Figura 7B**

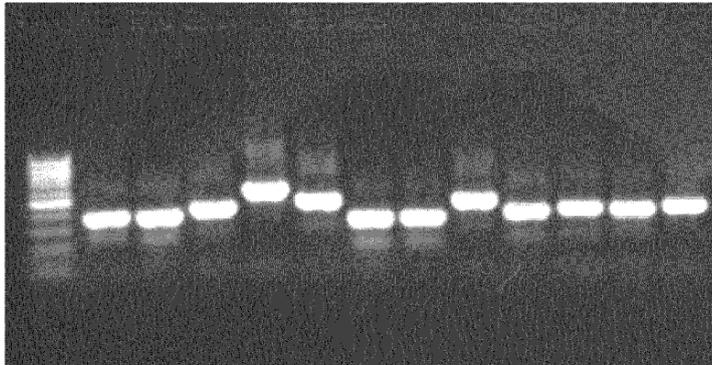


**Figura 8A**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

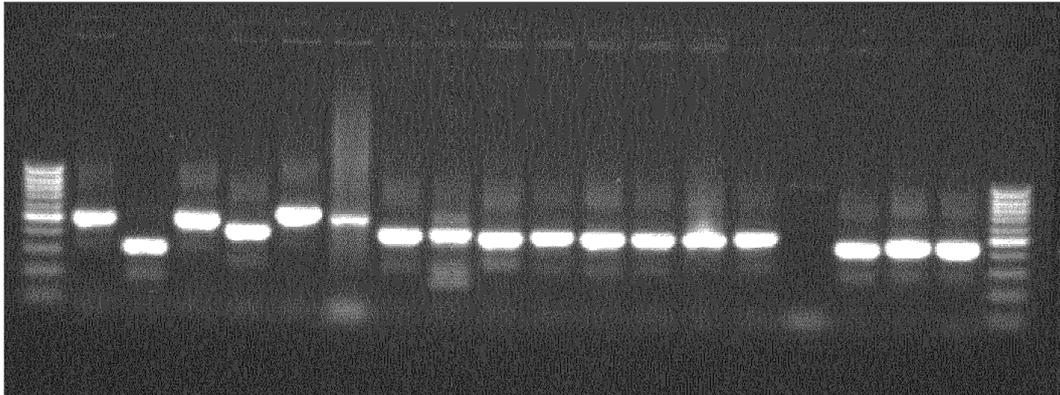


21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33



**Figura 8B**

34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53



**Figura 9**

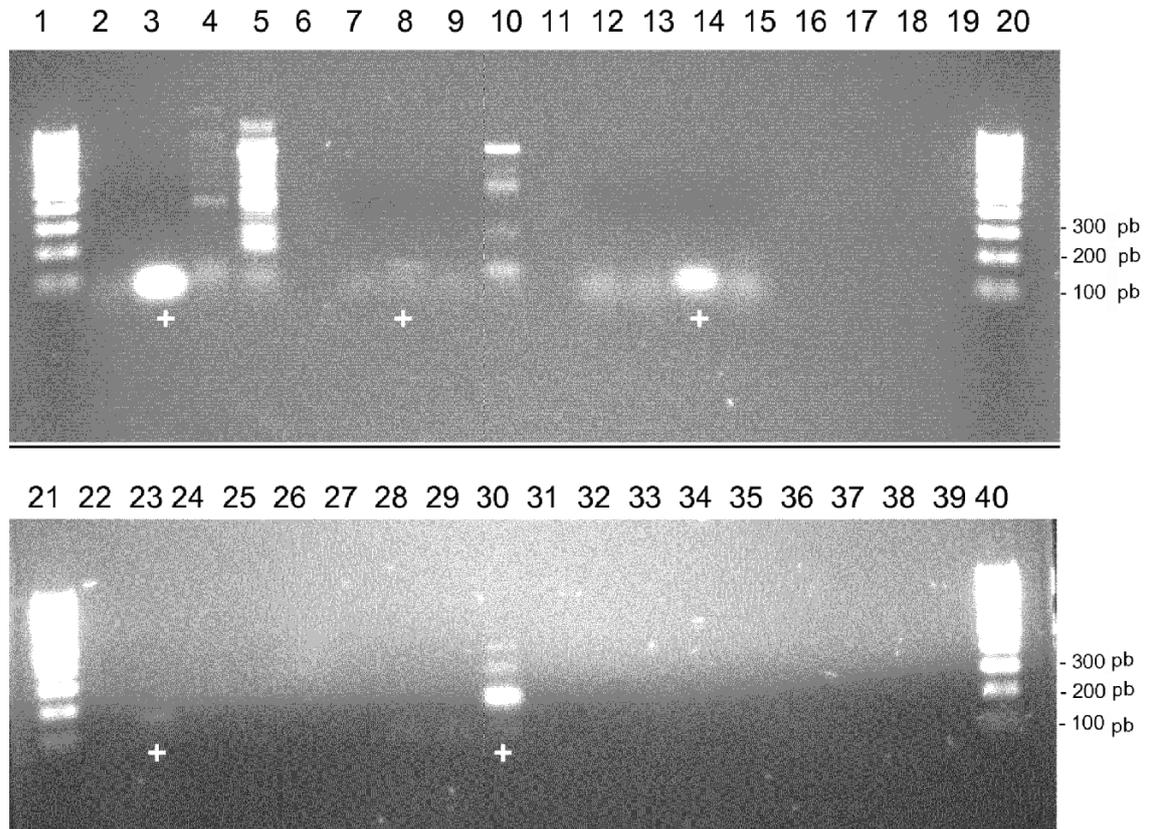


Figura 10

