



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 326 703**

51 Int. Cl.:

C12N 15/40 (2006.01)	C12N 15/11 (2006.01)
C07K 14/08 (2006.01)	C12P 21/02 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)	C12Q 1/70 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)	A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)	A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **96918115 .5**

96 Fecha de presentación : **07.06.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **0835315**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.04.1998**

54 Título: **Vacuna para el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.**

30 Prioridad: **07.06.1995 US 478316**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2009

73 Titular/es:
**Iowa State University Research Foundation, Inc.
310 Lab of Mechanics
Ames, Iowa 50011-2131, US**

72 Inventor/es: **Paul, Prem S.;
Meng, Xiang-Jin;
Halbur, Patrick y
Mozorov, Igor**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Vacuna para el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino.

5 La presente invención se refiere a ácidos polinucleicos aislados a partir del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), a una proteína y/o un polipéptido codificado por los ácidos polinucleicos, a una vacuna que protege a los cerdos del PRRSV basada en la proteína o en los ácidos polinucleicos, a métodos para fabricar las proteínas, polipéptidos y ácidos polinucleicos, a un anticuerpo contra los polipéptidos, al uso del anticuerpo en la preparación de un medicamento para tratar a un cerdo con PRRS, a un método para producir la vacuna y a un método para detectar el PRRSV.

10 El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), una enfermedad nueva y grave en el ganado porcino, se presentó por primera vez en los Estados Unidos en 1987 y se reconoció rápidamente en muchos países de Europa occidental (revisado por Goyal, J. Vet. Diagn. Invest., 1993, 5: 656-664; y en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435). La enfermedad se caracteriza por fallo reproductivo en cerdas de vientre y cerdas primerizas, neumonía en cerdos jóvenes en crecimiento y un aumento en la mortalidad antes del destete (Wensvoort *et al.*, Vet. Q., 13: 121-130, 1991; Christianson *et al.*, 1992, Am. J. Vet. Res. 53: 485-488, Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.405).

20 El agente causante del PRRS, el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), se identificó por primera vez en Europa y después en los Estados Unidos (Collins *et al.*, 1992, J. Vet. Diagn. Invest. 4: 117-126). La cepa europea de PRRSV, que se conoce como virus Lelystad (LV), se ha clonado y secuenciado (Meulenberg *et al.*, 1993, Virology, 192: 62-72 y J. Gen. Virol., 74: 1697-1701; Conzelmann *et al.*, 1993, Virology, 193: 329-339).

25 El PRRSV se clasificó provisionalmente en la nueva familia de virus propuesta *Arteriviridae*, que incluye el virus de la arteritis equina (EAV), el virus de elevación de la lactato deshidrogenasa (LDV) y el virus de la fiebre hemorrágica del simio (SHFV) (Plagemann y Moennig, 1992, Adv. Virus. Res., 41: 99-192; Godeny *et al.*, 1993, Virology, 194: 585-596; Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435). Este grupo de virus de ARN con una sola cadena positiva comparte muchas características, tales como la organización del genoma, la estrategia de replicación, la morfología y el tropismo de macrófagos (Meulenberg *et al.*, 1993; Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435). También son propiedades histopatológicas características de los arterivirus infecciones subclínicas y una viremia persistente con la producción concurrente de anticuerpos.

35 Se han notificado variaciones antigénicas, genéticas y patogénicas entre los aislados de PRRSV (Wensvoort *et al.*, 1992, J. Vet. Diagn. Invest., 4: 134-138; Mardassi *et al.*, 1994, J. Gen. Virol., 75: 681-685; Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435). Además, los PRRSV estadounidenses y europeos representan dos genotipos distintos (Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435). También existe variabilidad antigénica entre diferentes aislados norteamericanos (Wensvoort *et al.*, 1992). Se han demostrado notables diferencias en la patogenicidad no sólo entre los aislados estadounidenses y europeos, sino también entre diferentes aislados estadounidenses (Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435).

45 La organización genómica de los arterivirus se parece a la de los coronavirus y torovirus ya que su replicación implica la formación de una serie anidada 3'-coterminal de ARNm subgenómicos (ARNm sg) (Chen *et al.*, 1993, J. Gen. Virol., 74: 643-660; Den Boon *et al.*, 1990, J. Virol., 65: 2910-2920; De Vries *et al.*, 1990, Nucleic Acids Res., 18: 3241-3247; Kuo *et al.*, 1991, J. Virol., 65: 5118-5123; Kuo *et al.*, 1992; Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435). También se han determinado secuencias parciales de varios aislados norteamericanos (Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435; Mardassi *et al.*, 1994, J. Gen. Virol., 75: 681-685).

50 El genoma del PRRSV está poliadenilado, tiene una longitud de aproximadamente 15 kb y contiene ocho fases de lectura abierta (ORF; Meulenberg *et al.*, 1993; Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435). Las ORF 1a y 1b probablemente codifican la ARN polimerasa viral (Meulenberg *et al.*, 1993). Se descubrió que las ORF 5, 6 y 7 codificaban una proteína de membrana glicosilada (E), una proteína de membrana no glicosilada (M) y una proteína de la nucleocápsida (N), respectivamente (Meulenberg *et al.*, 1995). Las ORF 2 a 4 parecen tener las características de proteínas asociadas a la membrana (Meulenberg *et al.*, 1993; Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435). Sin embargo, los productos de traducción de las ORF 2 a 4 no se detectaron en lisados de células infectadas con virus ni en viriones (Meulenberg *et al.*, 1995).

60 La glicoproteína principal de la envuelta de EAV codificada por la ORF 5 puede ser la proteína de unión al virus, y se dirigen anticuerpos monoclonales (MAb) neutralizadores contra esta proteína (de Vries, J. Virol. 1992; 66: 6294-6303; Faaberg, J. Virol. 1995; 69: 613-617). La glicoproteína primaria de la envuelta de LDV, un miembro estrechamente relacionado de PRRSV, también se codifica por la ORF 5, y se descubrió que varios MAb neutralizadores diferentes inmunoprecipitaban específicamente la proteína de la ORF 5 (Cafruny *et al.*, Vir. Res., 1986; 5: 357-375). Por lo tanto, es probable que la proteína principal de la envuelta de PRRSV codificada por la ORF 5 pueda inducir anticuerpos neutralizadores contra PRRSV.

Se ha propuesto que la variación antigénica de los virus es el resultado de la selección directa de variantes por las respuestas inmunes del hospedador (revisado por Domingo *et al.*, *J. Gen. Virol.* 1993, 74: 2039-2045). De esta manera, estas regiones hipervariables probablemente se deben a la presión de selección inmune del hospedador y pueden explicar la diversidad antigénica observada entre los aislados de PRRSV.

Las proteínas M y N de los aislados de PRRSV de Estados Unidos, incluyendo ISU 3927, están muy conservadas (Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435). Las proteínas M y N son integrales para conservar la estructura de los viriones de PRRSV, y la proteína N puede estar bajo limitaciones funcionales estrictas. Por lo tanto, es poco probable que (a) las proteínas M y N estén sometidas a una presión de selección de anticuerpos importante o que (b) las ORF 6 y 7, que probablemente codifican las proteínas M y N, sean responsables o estén correlacionadas con la virulencia viral. Sin embargo, de manera interesante, se observó una mayor variación de secuencia de la proteína M de LDV entre aislados de LDV con diferente neurovirulencia (Kuo *et al.*, 1992, *Vir. Res.* 23: 55-72).

Se predice que las ORF 1a y 1b se traducen en una sola proteína (polimerasa viral) por desplazamiento de fase. Las ORF 2 a 6 pueden codificar las proteínas asociadas con la membrana viral.

Además del ARN genómico, muchos virus animales producen una o más especies de ARNm sg para permitir la expresión de genes virales de una forma regulada. En células infectadas con PRRSV, se sintetizan siete especies de ARNm con especificidad de virus que representan una serie anidada 3'-coterminal (ARNm 1 a 7, en orden decreciente de tamaño). El ARNm 1 representa el ARNm genómico. Cada uno de los ARNm sg contiene una secuencia líder procedente del extremo 5' del genoma viral.

Los números de los ARNm sg difieren entre los arterivirus e incluso entre diferentes aislados del mismo virus. Se detectó una serie anidada de 6 ARNm sg en células infectadas con EAV y en células infectadas con PRRSV europeo. Sin embargo, en células infectadas con el LDV está presente una serie anidada de seis (LDV-C) o siete (LDV-P) ARNm sg. El ARNm sg adicional 1-1 de LDV-P contiene el extremo 3' de la ORF 1b y puede traducirse en una proteína que representa el extremo C de la polimerasa viral. El análisis de la secuencia de los ARNm sg de LDV y EAV indica que se conserva el motivo de unión líder-ARNm. Recientemente, también se demostró que las secuencias de unión líder-ARNm del LV europeo también contenían un motivo común, UCAACC, o una secuencia muy similar.

Se ha demostrado que los ARNm sg se empaquetan en los viriones en algunos coronavirus, tales como el coronavirus bovino (BCV) y el virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV). Sin embargo, sólo se detectaron pequeñas cantidades de los ARNm sg en viriones purificados del virus de la hepatitis de ratón (MHV), otro coronavirus. Los ARNm sg de LDV, un miembro muy relacionado de PRRSV, tampoco se empaquetan en los viriones, y sólo se detectó el ARN genómico en viriones de LDV purificado.

Los ARNm sg de LDV y EAV se han caracterizado con detalle. Sin embargo, la información en relación con los ARNm sg de las cepas de PRRSV, especialmente el PRRSV estadounidense, está muy limitada. De esta manera, se siente la necesidad de una caracterización molecular más minuciosa de los ARNm sg del PRRSV estadounidense.

La señal de empaquetamiento del MHV se localiza en el extremo 3' de la ORF 1b, de esta manera sólo se empaqueta el ARN genómico de MHV. Los ARNm sg de BCV y TGEV, sin embargo, se encuentran en viriones purificados. La señal de empaquetamiento de BCV y TGEV no se ha determinado. El ARNm sg del alfavirus Aura se empaqueta eficazmente en los viriones, supuestamente porque la señal de empaquetamiento está presente en el ARNm sg. El ARNm sg 26S del virus sindbis no se empaqueta en viriones porque la señal de empaquetamiento está localizada en el segmento del genoma (no presente en el ARNm sg). Los ARNm sg de LDV, un miembro muy relacionado de PRRSV, tampoco se empaquetan en los viriones.

En la generación de los ARNm sg están implicados muchos mecanismos. Se ha propuesto que los coronavirus utilizan un único mecanismo de transcripción cebado por ARN líder en el que un ARN líder se transcribe desde el extremo 3' del ARN de plantilla de cadena negativa de tamaño de genoma, se disocia de la plantilla y después se vuelve unir al ARN de plantilla en regiones intergénicas cadena abajo para cebar la transcripción de los ARNm sg. El modelo predice que el líder 5' contiene una secuencia específica en su extremo 3' que se repite adicionalmente cadena abajo en el genoma, que precede a cada una de las ORF 2 a 7. El líder se une al cuerpo de cada uno de los ARNm sg a través del segmento de unión líder-ARNm.

El PRRSV es una causa importante de neumonía en cerdos lactantes y destetados. El PRRSV produce pérdidas económicas significativas por neumonía en cerdos lactantes (el grado exacto no se conoce completamente). La enfermedad reproductiva fue el resultado clínico predominante de las infecciones por PRRSV durante los últimos años, debido a la precoz prevalencia de cepas de PRRSV con una virulencia relativamente baja. La enfermedad respiratoria ahora se ha convertido en el problema principal asociado con el PRRSV, debido a la prevalencia creciente de cepas de PRRSV de virulencia relativamente elevada. Se siente la necesidad de una vacuna para proteger contra la enfermedad producida por las diversas cepas de PRRSV.

Sorprendentemente, el mercado para las vacunas animales en los Estados Unidos y en todo el mundo es mayor que el mercado para las vacunas humanas. De esta manera, existe un incentivo económico para desarrollar nuevas vacunas veterinarias, además de los beneficios sustanciales para la salud pública derivados de la protección de los animales de granja de la enfermedad.

ES 2 326 703 T3

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un ácido polinucleico aislado a partir del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), aislado VR 2430, que codifica una proteína de PRRSV.

5 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una proteína de PRRSV, aislada a partir de PRRSV o codificada por un ácido polinucleico de PRRSV.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una vacuna basada en ácido polinucleico o en proteína que proteja a un cerdo frente al PRRS.

10 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para detectar el PRRSV.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo que se une inmunológicamente a una proteína de PRRSV o a una región antigénica de dicha proteína.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso del anticuerpo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cerdo con PRRS.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un kit de diagnóstico para ensayar o detectar un PRRSV.

20 Estos y otros objetos, que se harán evidentes durante la siguiente descripción de las realizaciones preferidas, se han proporcionado por una preparación purificada de acuerdo con la reivindicación 1 mostrada más adelante.

La presente invención también proporciona un polipéptido purificado de acuerdo con la reivindicación 8, vacunas de acuerdo con las reivindicaciones 9 y 10, un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 11, el uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13, un kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 14, un método para producir un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 15 y un vector de expresión que contiene el ácido polinucleico bajo el control operativo de un promotor de acuerdo con la reivindicación 16.

30 A continuación se proporciona una descripción a modo de ejemplo únicamente haciendo referencia a los dibujos adjuntos de realizaciones de la presente invención. En los dibujos:

la Figura 1 muestra una comparación de secuencias de nucleótidos de las ORF 2 a 5 de los aislados estadounidenses VR 2474 (ISU 79), VR 2475 (ISU 1894), VR 2431 (ISU 3927), VR 2429 (ISU 22) y VR 2430 (ISU 55) con otros aislados de PRRSV conocidos;

35 las Figuras 2A, 2B, 2C y 2D respectivamente muestran el alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de las ORF 2, ORF 3, ORF 4 y ORF 5 de los aislados estadounidenses VR 2474 (ISU 79), VR 2475 (ISU 1894), VR 2429 (ISU 22), VR 2430 (ISU 55) y VR 2431 (ISU 3927) con otros aislados de PRRSV conocidos;

40 la Figura 3 muestra un árbol filogenético basado en las secuencias de nucleótidos de las ORF 2 a 7 de siete aislados de PRRSV estadounidenses con diferente virulencia;

la Figura 4 muestra un análisis de transferencia de Northern de ARN aislados a partir de células CRL 11171 infectadas con VR 2431 (ISU 3927) (calle 1) y aislados a partir de viriones purificados de VR 2431 (ISU 3927) (calle 2);

50 la Figura 5 muestra un análisis de transferencia de Northern de ARN intracelulares totales aislados a partir de células CRL 11171 infectadas con VR 2429 (ISU 22) (calle 1), VR 2430 (ISU 55) (calle 2), VR 2474 (ISU 79) (calle 3), VR 2475 (ISU 1894) (calle 4) y VR 2431 (ISU 3927) (calle 5), respectivamente;

las Figuras 6A y 6B muestran una hibridación de Northern de ARN totales aislados a partir de células CRL 11171 infectadas con VR 2474 (ISU 79) a diferentes multiplicidades de infección (m.d.i.) (A) y ARN poliadenilado procedente de células infectadas con aislados de PRRSV VR 2430 (ISU 55) y VR 2474 (ISU 79) (B);

55 las Figuras 7A y 7B muestran un análisis de transferencia de Northern de ARNm intracelulares totales aislados a partir de células CRL 11171 infectadas con VR 2475 (ISU 1894) (A) y VR 2474 (ISU 79) (B);

60 las Figuras 8A y 8B muestran la amplificación por RT-PCR de las secuencias 5'-terminales de los ARNm sg y 4 de ISU 1894 (calle 1) y los ARNm sg 3, 4 y 4-1 de VR 2474 (ISU 79) (calle 2) (A) donde la calle L es un marcador de 1 kb; y las secuencias de unión líder-ARNm de los ARNm sg 3 y 4 de VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894) y del ARNm sg 4-1 de VR 2474 (ISU 79) (B), donde las localizaciones de las secuencias de unión líder-ARNm en los genomas con respecto al codón de iniciación de cada ORF se indicaron por números negativos (-) de nucleótidos cadena arriba de las ORF; y

65 la Figura 9 muestra el alineamiento de secuencias de las ORF 2 a 7 de VR 2475 (ISU 1894) y VR 2474 (ISU 79), donde el codón de iniciación de cada ORF está indicado por +>, el codón de terminación de cada ORF está indicado por asteriscos (*), las secuencias de unión líder-ARNm determinadas o previstas están subrayadas y las localizaciones

de las secuencias de unión líder-ARNm con respecto al codón de iniciación de cada ORF están indicadas por números negativos (-) de nucleótidos cadena arriba de cada ORF.

En la presente solicitud, se han determinado las secuencias de nucleótidos de las ORF 2 a 5 de un aislado de baja virulencia y cuatro aislados distintos de PRSSV de la cepa Iowa con una virulencia “moderada” y elevada. Basándose en comparaciones de las ORF 2 a 7 de diversos aislados de PRSSV, el aislado estadounidense menos virulento conocido VR 2431 (ISU 3927) tiene variaciones de secuencia relativamente altas en las ORF 2 a 4, en comparación con las variaciones en otros aislados estadounidenses. Además, basándose en el análisis de las secuencias de las ORF, existen al menos tres genotipos minoritarios dentro del genotipo principal del PRSSV estadounidense.

El análisis de la secuencia de la proteína de la ORF 5 de diferentes aislados de PRSSV revela tres regiones hipervariables que contenían sustituciones de aminoácidos no conservadas. Estas regiones son hidrófilas y también son antigénicas según se predice por análisis informático.

En la presente invención, un “virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino” o “PRRSV” se refiere a un virus que produce las enfermedades PRRS, PEARS, SIRS, MSD y/o PIP (el término “PIP” ahora parece estar en desuso), incluyendo la cepa Iowa de PRSSV, otras cepas de PRSSV encontradas en los Estados Unidos (por ejemplo, VR 2332), cepas de PRSSV encontradas en Canadá (por ejemplo, IAF-exp91), cepas de PRSSV encontradas en Europa (por ejemplo, virus Lelystad, PRSSV-10) y variantes muy relacionadas de estos virus que pueden haber surgido y que surgirán en el futuro.

La “cepa Iowa” de PRSSV incluye (a) aislados de PRSSV depositados en la Colección Americana de Cultivo Tipo por los presentes inventores y/o descritos en esta solicitud y/o en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435, (b) virus de PRRS que producen más de seis ARNm sg cuando se cultivan o se someten a pases en células CRL 11171, (c) PRSSV que producen al menos 40% de lesiones pulmonares macroscópicas o consolidación pulmonar en lechones privados de calostro, nacidos por cesárea, de 5 semanas de edad, 10 días después de la infección, (d) un aislado de PRSSV que tiene un genoma que codifica una proteína que tiene la homología mínima con una ORF de PRSSV descrita en la Tabla 2 presentada más adelante, y/o (d) cualquier aislado de PRSSV que tenga las características de identificación de dicho virus.

La vacuna de la presente invención es eficaz si protege a un cerdo frente a una infección por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV). Una vacuna protege a un cerdo frente a una infección por un PRRSV si, después de la administración de la vacuna a uno o más cerdos no afectados, una exposición posterior a un aislado de virus biológicamente puro (por ejemplo, VR 2385, VR 2386 u otro aislado de virus descrito más adelante) produce menos gravedad de cualquier cambio macroscópico o histopatológico (por ejemplo, lesiones en el pulmón) y/o de los síntomas de la enfermedad, en comparación con los cambios o síntomas producidos típicamente por el aislado en cerdos similares que no están protegidos (es decir, con respecto a un control apropiado). Más particularmente, la eficacia de la vacuna de la presente invención puede demostrarse administrando la vacuna a uno o más cerdos adecuados que la necesitan, y después de un periodo de tiempo apropiado (por ejemplo, 1-4 semanas), exponiendo a los cerdos a una muestra grande (10^{3-7} TCID₅₀) de un aislado de PRRSV biológicamente puro. Posteriormente, se extrae una muestra de sangre del cerdo expuesto después de aproximadamente una semana, y se intenta aislar el virus de la muestra de sangre (por ejemplo, véase el procedimiento de aislamiento de virus ejemplificado en el Experimento VIII mostrado más adelante). El aislamiento del virus es una indicación de que es posible que la vacuna no sea eficaz y la incapacidad de aislar el virus es una indicación de que la vacuna puede ser eficaz.

De esta manera, la eficacia de la vacuna de la presente invención puede evaluarse cuantitativamente (es decir, una reducción en el porcentaje de tejido pulmonar consolidado en comparación con un grupo de control apropiado) o cualitativamente (por ejemplo, el aislamiento de PRRSV de la sangre, la detección del antígeno de PRRSV en una muestra de tejido de pulmón, amígdala o ganglio linfático por medio de un método de ensayo de inmunoperoxidasa [descrito más adelante], etc.). Los síntomas de la enfermedad reproductiva y respiratoria porcina pueden evaluarse cuantitativamente (por ejemplo, temperatura/febre), semicuantitativamente (por ejemplo, gravedad de la insuficiencia respiratoria [explicado con detalle más adelante] o cualitativamente (por ejemplo, la presencia o ausencia de uno o más síntomas o una reducción en la gravedad de uno o más síntomas, tal como cianosis, neumonía, lesiones cardíacas y/o cerebrales, etc.).

Un cerdo no afectado es un cerdo que no se ha expuesto a un agente infeccioso de la enfermedad reproductiva y respiratoria porcina, o que se ha expuesto a un agente infeccioso de la enfermedad reproductiva y respiratoria porcina pero no muestra síntomas de la enfermedad. Un cerdo afectado es uno que muestra síntomas de PRRS o a partir del cual se puede aislar PRRSV.

Los signos clínicos o síntomas de PRRS pueden incluir letargo, insuficiencia respiratoria, palpitaciones (“thumping”) (espiración forzada), fiebre, pelo áspero, estornudos, tos, edema ocular y ocasionalmente conjuntivitis. Las lesiones pueden incluir lesiones pulmonares macroscópicas y/o microscópicas, miocarditis, linfadenitis, encefalitis y rinitis. Además, se han encontrado formas menos virulentas y no virulentas de PRRSV y de la cepa Iowa, que pueden producir una subserie de los síntomas anteriores o no producir ningún síntoma. Sin embargo, las formas menos virulentas y no virulentas de PRRSV pueden usarse de acuerdo con la presente invención para proporcionar protección frente a las enfermedades reproductivas y respiratorias porcinas.

La frase “ácido polinucleico” se refiere a ARN o ADN, así como al ARNm y ADNc correspondiente o complementario al ARN o ADN aislado a partir del virus o el agente infeccioso. Una “ORF” se refiere a una fase de lectura abierta, un segmento que codifica un polipéptido, aislada a partir de un genoma viral, incluyendo el genoma de PRRSV. En el ácido polinucleico de la presente invención puede estar incluida una ORF en parte (como un fragmento) o en su totalidad, y puede solapar con la secuencia 5’ o 3’ de una ORF adyacente (véase, por ejemplo, la Fig. 1 y el Experimento 1 mostrado más adelante). Un “polinucleótido” es equivalente a un ácido polinucleico, pero puede definir una molécula o grupo de moléculas distinto (por ejemplo, como una subserie de un grupo de ácidos polinucleicos).

En los Experimentos descritos más adelante se determinaron el aislamiento, clonación y secuenciación de las ORF 2 a 5 de (a) un aislado de PRRSV estadounidense de baja virulencia y (b) dos aislados de PRRSV estadounidense distintos de virulencia variable. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida de estos tres aislados estadounidenses se compararon con las secuencias correspondientes de otros aislados de PRRSV conocidos (véase, por ejemplo, la Solicitud de Estados Unidos con el N° de serie 08/301.435). Los resultados indican que existen variaciones genéticas considerables no sólo entre el PRRSV estadounidense y el PRRSV europeo, sino también entre los aislados estadounidenses.

La identidad de las secuencias de aminoácidos entre los siete aislados de PRRSV estadounidenses estudiados fue de 91-99% en la ORF 2, 86-98% en la ORF 3, 92-99% en la ORF 4 y 88-97% en la ORF 5. El aislado estadounidense menos virulento conocido VR 2431 (ISU 3927) tiene mayores variaciones de secuencia en las ORF 2 a 4 que en las ORF 5 a 7, en comparación con otros aislados estadounidenses. En la glicoproteína de la envuelta principal codificada por la ORF 5 se han identificado tres regiones hipervariables que podrían ser antigénicas.

La comparación por parejas de las secuencias de las ORF 2 a 7 y el análisis de árbol filogenético implicaba la existencia de al menos tres grupos de variantes de PRRSV (o genotipos minoritarios) dentro del genotipo principal de PRRSV estadounidense. El aislado estadounidense menos virulento conocido forma una rama distinta de otros aislados estadounidenses con diferente virulencia. Los resultados de ese estudio tienen implicaciones para la taxonomía del PRRSV y el desarrollo de vacunas.

En un experimento adicional, se caracterizaron los ARNm sg en células infectadas con PRRSV. Los datos demostraron que en células infectadas con diferentes aislados de PRRSV se forma una serie anidada 3’-coterminale de seis o siete ARNm sg. Sin embargo, a diferencia de algunos de los coronavirus y alfavirus, los ARNm sg de PRRSV no se empaquetan en el virión, y sólo se detectaba el ARNm genómico de PRRSV en viriones purificados. También se observaron variaciones en los números de ARNm sg entre diferentes aislados de PRRSV con diferente virulencia. Un análisis adicional de la secuencia de las ORF 2 a 7 de dos aislados estadounidenses y su comparación con el LV europeo revelan la naturaleza heterogénea de las secuencias de unión líder-ARNm de PRRSV.

Como se demuestra en el Experimento 2 mostrado más adelante, se forma una serie anidada 3’-coterminale de seis o más ARNm sg en células infectadas con diferentes aislados de PRRSV. La presencia de una serie anidada de ARNm sg también indica que el PRRSV estadounidense, a diferencia del aislado europeo conocido como virus Lelystad (LV), pertenece a la familia *Arteriviridae* propuesta recientemente que incluye LDV, EAV y SHFV. El análisis de transferencia de Northern con sondas con especificidad de ORF indica que la estructura del ARNm sg de PRRSV es policistónico, y cada uno de los ARNm sg con la excepción del ARNm sg 7 contiene múltiples ORF. Por lo tanto, la secuencia de cada ARNm sg está contenida dentro de la parte 3’ del siguiente ARNm sg más grande, y no todos los extremos 5’ de los ARNm sg solapan con las secuencias de los ARNm sg más pequeños.

Sin embargo, no hay una correlación aparente entre los números de ARNm sg y la neumovirulencia viral. Se descubrió que una especie adicional, ARNm sg 4-1, contenía una ORF pequeña (ORF 4-1) con una capacidad de codificación de 45 aminoácidos en su extremo 5’.

En el Experimento 2 mostrado más adelante se demuestra que los ARNm sg de PRRSV no se empaquetan en los viriones. El hecho de que los ARNm sg se empaqueten en viriones puede depender de si los ARNm sg contienen una señal de empaquetamiento. Como los ARNm sg de PRRSV no se empaquetan en viriones, probablemente la señal de encapsidación de PRRSV se localiza en la región de la ORF 1 que es única para el genoma viral, pero que no está presente en los ARNm sg.

En el Experimento 2 mostrado más adelante se determinan los segmentos de unión (las secuencias de unión líder-ARNm) de los ARNm sg 3 y 4 de dos aislados estadounidenses de PRRSV, VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894). El conocimiento de las identidades de las secuencias de unión líder-ARNm proporciona medios para producir eficazmente (a) virus quiméricos a usar como un clon infeccioso y/o como una vacuna, y (b) vectores para insertar o “lanzar” uno o más genes en un hospedador infectable adecuado. Se conocen métodos para diseñar y producir estos virus quiméricos, clones infecciosos y vectores (véase, por ejemplo, *Sambrook et al*, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York).

La secuencia de unión líder-ARNm de los ARNm sg 3 y 4 de los dos aislados son diferentes (TTGACC para el ARNm 4-1 de ISU 79, GTAACC para el ARNm 3 y TTCACC para el ARNm 4). La mayoría de las diferencias de nucleótidos en las uniones están presentes en los 3 primeros nucleótidos. Los últimos 3 nucleótidos son invariables, lo que sugiere que la unión de la secuencia líder a los cuerpos de los ARNm sg se produce dentro del extremo 5’ de la secuencia de unión líder-ARNm. Se han notificado observaciones similares para LV, EAV y LDV.

La adquisición del ARNm sg 4-1 adicional en el aislado VR 2474 (ISU 49) se debe a una sola sustitución de nucleótidos que genera una nueva secuencia de unión líder-ARNm. Esta sustitución se produce en el último nucleótido del segmento de unión, lo que sugiere que el último nucleótido del motivo de unión líder-ARNm es crítico para la unión del líder y para el inicio de la transcripción.

Aunque la homología de secuencia entre el líder y las regiones intergénicas de los coronavirus condujo a la hipótesis de que la formación de pares de bases podría ser esencial en la transcripción cebada por el líder, no se ha documentado ninguna prueba experimental de la necesidad de formación de pares de bases en la transcripción de los ARNm sg. Por ejemplo, aún no se conoce la secuencia en el extremo 3' del líder de los coronavirus y arterivirus que está implicada en el proceso de fusión.

Varias líneas de evidencia confirman el mecanismo de transcripción cebado por líder para los coronavirus, pero la presencia de ARNm sg de cadena negativa e intermedios replicativos sg (IR sg) en células infectadas con coronavirus sugiere que el mecanismo implicado en la síntesis del ARNm sg es más complejo que la simple formación de pares de bases de la secuencia líder con una secuencia de unión. Sin embargo, no se han detectado ARNm sg de cadena negativa en arterivirus, excepto en LDV, y sólo se han detectado IR sg en células infectadas con EAV. Por lo tanto, la síntesis de ARNm sg en arterivirus, y particularmente en PRRSV, puede ser menos complicada que en coronavirus.

El análisis de la secuencia de las ORF 2 a 7 de dos aislados de PRRSV estadounidenses y la comparación de la secuencia con LV revela la heterogeneidad de las secuencias de unión líder-ARNm. La presencia de los motivos de unión líder-ARNm en las posiciones que no corresponden a un ARNm sg suscita la cuestión de si el tramo corto de sólo seis nucleótidos que está conservado en la secuencia líder y de unión en los genomas de PRRSV y otros arterivirus es suficiente para conseguir una unión eficaz del líder a estos sitios de unión específica cadena arriba de las ORF. Esta discrepancia aparente, sin embargo, puede explicarse por las dos siguientes posibilidades.

En primer lugar, es de esperar que otros elementos estructurales, tales como estructuras secundarias o las secuencias que rodean al segmento de unión líder-ARNm, estén implicados en la fusión (unión) del líder a los sitios específicos. Se ha demostrado que, en MHV, la secuencia que flanquea la secuencia consenso (secuencia de unión líder-ARNm) de UCUAAAC afecta a la eficacia de la transcripción de ARN de DI sg, y que la secuencia consenso era necesaria pero no suficiente en y por sí misma por la síntesis del ARNm de DI.

En segundo lugar, la distancia entre dos regiones de unión líder-ARNm puede afectar a la transcripción de los ARNm sg. Se ha demostrado que la región de unión líder-ARNm cadena abajo era supresora de la síntesis de ARN de DI sg de MHV a partir de la región de unión líder-ARNm cadena arriba. La supresión era significativa cuando la separación de las dos secuencias de unión líder-ARNm era menor de 35 nucleótidos. Sin embargo, no se observaba una inhibición significativa de la síntesis de ARN de DI sg más grande (a partir de la secuencia de unión líder-ARNm cadena arriba) cuando las dos regiones de unión líder-ARNm estaban separadas por más de 100 nucleótidos.

Los resultados experimentales presentados previamente son coherentes con las observaciones notificadas en el Experimento 2 presentado más adelante, donde se observa una especie adicional de ARNm sg 4-1, además del ARNm sg 4, en algunos de los aislados de PRRSV. Las secuencias de unión líder-ARNm de los ARNm sg 4 y 4-1 en la cepa Iowa de PRRSV están separadas por aproximadamente 226 nucleótidos. Por lo tanto, la síntesis del ARNm sg 4-1 de mayor tamaño a partir de la secuencia de unión líder-ARNm cadena arriba no se reprime por la presencia de la secuencia de unión líder-ARNm 4 cadena abajo.

Por el contrario, se encontraron múltiples posibles secuencias de unión líder-ARNm en diferentes posiciones cadena arriba de las ORF 3, 5, 6 y 7, pero no había ningún ARNm sg correspondiente a estos motivos de unión líder-ARNm en el análisis de transferencia de Northern. La mayoría de estas secuencias de unión líder-ARNm están separadas por menos de 50 nucleótidos desde la región de unión líder-ARNm cadena abajo, con la excepción de la ORF 7 (en la que las dos posibles secuencias de unión líder-ARNm están separadas por 114 nucleótidos). Sin embargo, el ARNm sg 7 en el análisis de transferencia de Northern mostró una banda muy difusa. Por lo tanto, la transcripción del ARNm sg 7 de mayor tamaño a partir de la secuencia de unión líder-ARNm cadena arriba puede no reprimirse de forma significativa por la secuencia de unión cadena abajo, pero no se puede distinguir fácilmente del ARNm sg 7 abundante por análisis de transferencia de Northern.

En la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de serie 08/301.435 se describen con detalle las ORF 2-7 del aislado del PRRSV purificado en placa ISU-12 (depositado el 30 de octubre de 1992 en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos, con los números de acceso VR 2385 [purificación en placa 3 veces] y VR 2386 [no purificado en placa] y las ORF 6-7 de los aislados de PRRSV ISU-22, ISU-55, ISU-3927 (depositados el 29 de septiembre de 1993 en la Colección Americana de Cultivos Tipo con los números de acceso VR 2429, VR 2430 y VR 2431, respectivamente), ISU-79 e ISU-1894 (depositados el 31 de agosto de 1994 en la Colección Americana de Cultivos Tipo con los números de acceso VR 2474 y VR 2475, respectivamente). Sin embargo, las técnicas usadas para aislar, clonar y secuenciar estos genes también pueden aplicarse al aislamiento, clonación y secuenciación de los ácidos polinucleicos genómicos de cualquier PRRSV.

Por ejemplo, pueden diseñarse cebadores para obtener cantidades relativamente grandes de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (y si se desea, para obtener ARN por transcripción y/o proteínas por traducción de acuerdo con métodos *in vivo* o *in vitro* conocidos) basándose en la información de secuencia cuando se ha determinado más de una secuencia obtenida a partir de un genoma de PRRSV (por ejemplo, las ORF 2-7 de VR 2385, VR 2429, VR 2430, VR 2431, VR 2474, VR 2475 (ISU 1894), VR 2332 y virus Lelystad). A partir de las secuencias determinadas se selecciona una región con una longitud de aproximadamente 15 a 50 nucleótidos que tenga una identidad de al menos 80% y preferiblemente de al menos 90%. Como base para preparar un cebador selectivo para una amplificación selectiva del ácido polinucleico de una cepa o tipo de PRRSV con respecto a otro (por ejemplo, para el diagnóstico diferencial de las cepas de PRRSV norteamericanas y europeas) puede usarse una región en la que se produce una delección en una de las secuencias (por ejemplo, de al menos 5 nucleótidos).

Una vez que el ácido polinucleico genómico se ha amplificado y clonado en un hospedador adecuado por métodos conocidos, los clones pueden seleccionarse con una sonda diseñada basándose en la información de secuencia descrita en la presente memoria. Por ejemplo, se selecciona una región de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 nucleótidos de longitud basándose en un alto grado de identidad (por ejemplo, de al menos 90%) entre dos o más secuencias (por ejemplo, en las ORF 6-7 de las cepas Iowa de PRRSV descritas en el Experimento III mostrado más adelante) y se prepara un polinucleótido de longitud e identidad de secuencia adecuada por métodos conocidos (tales como síntesis automática o restricción de un fragmento adecuado a partir de un ácido polinucleico que contiene la región seleccionada, amplificación por PCR usando cebadores que hibridan específicamente con el polinucleótido y aislamiento por electroforesis). El polinucleótido puede marcarse, por ejemplo con ³²P (para la identificación radio-métrica) o con biotina (para detección por fluorometría). La sonda después se hibrida con los ácidos polinucleicos de los clones y se detecta de acuerdo con métodos conocidos.

Los presentes inventores han descubierto que una o más de las ORF 2-4 pueden estar relacionadas con la virulencia de PRRSV. Por ejemplo, al menos un aislado de PRRSV que muestra una virulencia relativamente baja también parece tener una delección en la ORF 4 (véanse, por ejemplo, los Experimentos VIII-XI en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435). Además, el aislado menos virulento conocido (VR 2431) muestra un grado relativamente alto de varianza en la información tanto de las secuencias de nucleótidos como de la secuencia de aminoácidos en las ORF 2-4, en comparación con otros aislados de PRRSV estadounidenses.

En una realización, la presente invención se refiere a un ácido polinucleico obtenido a partir de un aislado de PRRSV que confiere protección inmunogénica directa o indirectamente contra una exposición posterior a un PRRSV, pero en el que el ácido polinucleico se ha delecionado o mutado en un grado que haría a un PRRSV que contiene el ácido polinucleico menos virulento (es decir, un fenotipo de “baja virulencia” (Iv); véase la explicación correspondiente en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435) o sin virulencia (un denominado “mutante de delección”). Preferiblemente, una o más de las ORF 2-4 se delecionan o mutan en tal medida que un virus de PRRSV se vuelve no virulento. Sin embargo, en el ácido polinucleico de la presente invención puede ser deseable conservar regiones de una o más de las ORF 2-4 que (i) codifiquen un fragmento peptídico antigénico y/o inmunoprotector y que (ii) no confieran virulencia a un virus de PRRSV que contiene el ácido polinucleico.

La presente invención también incluye un PRRSV *per se* en el que una o más de las ORF 2-4 se han delecionado o mutado en tal medida que se vuelve poco virulento o no virulento. Dicho virus es útil como una vacuna o como un vector para transformar un hospedador adecuado (por ejemplo, MA-104, PSP 36, CRL 11171, MARC-145 o células de macrófagos alveolares porcinos) con un gen heterólogo. Los genes heterólogos preferidos que pueden expresarse usando el mutante de delección de la presente invención pueden incluir los que codifican una proteína o un antígeno distinto del antígeno del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (por ejemplo, proteínas y/o antígenos que contienen polipéptidos del virus de la pseudorabia y/o del virus de la gripe porcina, una hormona de crecimiento porcina, etc.) o un adyuvante basado en polipéptidos (tal como los descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435 para una composición de vacuna).

En ciertas realizaciones también puede ser deseable que el ácido polinucleico de la presente invención contenga, por ejemplo, la región 3' terminal de una ORF de PRRSV (por ejemplo, con una longitud de 200 a 700 nucleótidos), de la que al menos parte puede solapar con la región 5' de la ORF inmediatamente cadena abajo. De forma similar, cuando la región 3' terminal de una ORF puede solapar con la región 5' terminal de ORF cadena abajo inmediata, puede ser deseable conservar la región 5' de la ORF que solapa con la ORF inmediatamente cadena abajo.

Los presentes Inventores también han descubierto que la ORF 5 en el genoma de PRRSV parece estar relacionada con la replicación del virus en células hospedadoras de mamífero capaces de mantener un cultivo mientras están infectadas con PRRSV. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a ácidos polinucleicos obtenidos a partir de un genoma de PRRSV en el que la ORF 5 puede estar presente en múltiples copias (un denominado “mutante de superproducción”). Por ejemplo, el ácido polinucleico de la presente invención puede contener al menos dos y más preferiblemente de 2 a 10 copias de la ORF 5 de un aislado de PRRSV de fenotipo de alta replicación (hr).

De manera interesante, el aislado de PRRSV VR 2385 (ISU-12) tiene un número sorprendentemente grande de posibles codones de iniciación (secuencias ATG/AUG) cerca del extremo 5' de la ORF 5, posiblemente indicando sitios de inicio alternos de este gen. De esta manera, pueden existir formas alternas de la proteína codificada por

la ORF 5 de un aislado de PRRSV, particularmente cuando las ORF alternas codifican una proteína que tiene un peso molecular similar al determinado experimentalmente (por ejemplo, con una longitud de aproximadamente 150 a aproximadamente 250 aminoácidos). La región codificante más probable para la ORF 5 de VR 2385 (ISU-12) se indica en la Figura 1.

Se pueden preparar mutantes de delección y superproducción de acuerdo con métodos conocidos. Por ejemplo, se puede preparar un ácido polinucleico mutante que contiene un cambio “silencioso” o degenerado en la secuencia de una región que codifica un polipéptido. Por medio de la selección y obtención de una mutación degenerada apropiada, se puede sustituir una secuencia de ácido polinucleico reconocida por una enzima de restricción conocida (véase, por ejemplo, el Experimento 2 mostrado más adelante). De esta manera, si se realiza una mutación silenciosa, degenerada en uno o dos de los extremos 3’ de una ORF y el extremo 5’ de una ORF cadena abajo, se puede insertar un ácido polinucleico sintético (un denominado “casete”) que puede contener un ácido polinucleico que codifica una o múltiples copias de un producto proteico de la ORF 5 hr de un PRRSV u otra proteína de la envuelta viral y/o un fragmento antigénico de una proteína de PRRSV. El “casete” puede ir precedido por un codón de iniciación adecuado (ATG) y puede terminarse convenientemente con un codón de terminación en el extremo 3’ (TAA, TAG o TGA). Por supuesto, puede insertarse una secuencia oligonucleotídica que no codifica un polipéptido o, como alternativa, es posible no insertar ningún casete. Al hacer esto, se puede proporcionar un denominado mutante de delección.

El presente polipéptido aislado y/o purificado puede ser uno o más codificados por una “mutación de baja virulencia” de una o más de las ORF 2, 3 y 4 de VR 2430 (ISU-55) (o un fragmento de baja virulencia del mismo con una longitud de al menos 5 aminoácidos) donde una o más de las posiciones 12-14 del polipéptido codificado por la ORF 2 son RGV (donde “R”, “G” y “V” son las abreviaturas de una letra para los aminoácidos correspondientes), las posiciones 44-46 son LPA, la posición 88 es A, la posición 92 es R, la posición 141 es G, la posición 183 es H, la posición 218 es S, la posición 240 es S y las posiciones 252-256 son PSSSW, o cualquier combinación de las mismas. Otras identidades de restos aminoacídicos que pueden combinarse adicionalmente con una o más de las identidades de posiciones de aminoácidos anteriores incluyen las de la posición 174 (I) y la posición 235 (M).

El polipéptido aislado y/o purificado de la presente invención también puede ser uno codificado por una ORF 3 de VR 2430 (ISU-55) en el que una o más de las identidades de aminoácidos especificadas puede seleccionarse entre las de las posiciones 11 (L), 23 (V), 26-28 (TDA), 65-66 (QI), 70 (N), 79 (N), 93 (T), 100-102 (KEV), 134 (K), 140 (N), 223-227 (RQRIS), 234 (A) y 235 (M), o cualquier combinación de las mismas, que pueden combinarse adicionalmente con una o más de las posiciones 32 (F), 38 (M), 96 (P), 143 (L), 213-217 (FQTS), 231 (R) y 252 (A).

El polipéptido aislado y/o purificado de la presente invención también puede ser uno codificado por la ORF 4 de VR 2430 (ISU-55) en el que una o más de las identidades de aminoácidos especificadas pueden seleccionarse entre las de las posiciones 13 (E), 43 (N), 56 (G), 58-59 (TT), 134 (T), 139 (I) y cualquier combinación de las mismas, que pueden combinarse adicionalmente con una o más de las posiciones 2-3 (AA), 51 (G) y 63 (P).

Preferiblemente el ácido nucleico de la presente invención codifica al menos una región antigénica de una proteína de la membrana (de la envuelta) de PRRSV. Más preferiblemente, el ácido nucleico de la presente invención codifica una región hipervariable de un producto proteico de la ORF 5 de PRRSV (véase la descripción presentada más adelante) o (b) contiene al menos una copia del gen de la ORF 5 de un aislado de fenotipo de alta virulencia (hv) de PRRSV (véase la descripción de “fenotipo de hv” en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435) y un fragmento, región o secuencia suficientemente larga de al menos una de las ORF-2, ORF-3, ORF-4, ORF-5 y/u ORF-6 del genoma de un aislado de PRRSV para codificar una región antigénica de la proteína o proteínas correspondientes y estimular de forma eficaz la protección contra una exposición posterior, por ejemplo, a un aislado de PRRSV de fenotipo de hv.

En el ácido polinucleico de la presente invención puede estar contenida al menos una proteína de la envuelta entera codificada por la ORF-2, ORF-3 u ORF-5 de un PRRSV, y el ácido polinucleico de la presente invención excluye o modifica una parte suficientemente larga de una de las ORF 2-4 procedente de un PRRSV para proporcionar un PRRSV que la contenga con baja virulencia o sin virulencia.

ES 2 326 703 T3

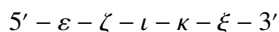
Otra realización preferida de la presente invención incluye un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de una región hipervariable de la ORF 5 de PRRSV. De esta manera, estos polinucleótidos codifican una (o más) de las siguientes secuencias de aminoácidos:

TABLA 1

	Región Hipervariable 1	Región Hipervariable 2	Región Hipervariable 3
	<u>(posiciones 32-38)</u>	<u>(posiciones 57-66)</u>	<u>(posiciones 120-128)</u>
	NGNSGSN	ANKFDWAVET	LICFVIRLA
	SNDSSSH	ANKFDWAVEP	LTCTVIRFA
	SSSNSSH	AGEFDWAVET	LICFVIRFT
	SANSSSH	ADKFDWAVEP	LACFVIRFA
	HSNSSSH	ADRFDWAVEP	LTCFVIRFV
	SNSSSSH	SSHFGWAVET	LTCHIIIRFA
	NNSSSSH		FICFVIRFA
	NGGDSST (Y)		FVCFVIRAA

En esta realización, el polinucleótido puede codificar secuencias de aminoácidos adicionales de una ORF 5 de PRRSV (como se describe en la Figura 3 o en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 o 08/301.435), siempre que se incluyan una o más de las regiones hipervariables en las posiciones 32-38, 57-66 y/o 120-128. (La presente invención excluye específicamente las proteínas y polinucleótidos de la ORF 5 de LV y VR 2332).

La presente invención también puede referirse a una preparación purificada que puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en un ácido polinucleico, un vector de expresión o un plásmido que tiene una secuencia de la fórmula (V)



donde ε , que está presente opcionalmente, es una secuencia polinucleotídica 5' terminal que proporciona un medio para expresar operativamente los polinucleótidos α, β, γ y δ ; ζ es un polinucleótido de la fórmula KTVACC, donde K es T, G o U, y V es A, G o C; ι es un polinucleótido que tiene como máximo aproximadamente 130 (preferiblemente como máximo 100) nucleótidos de longitud; κ es un polinucleótido que comprende uno o más genes seleccionados entre el grupo consistente en un marcador o gen indicador convencional, α, β, γ y las combinaciones de los mismos unidas operativamente, donde α codifica dicho al menos un polipéptido y β es al menos una copia de una ORF 5 de una cepa Iowa de PRRSV o un fragmento antigénico de la misma (por ejemplo, una o más regiones hipervariables), preferiblemente una copia de longitud completa procedente de un fenotipo de alta replicación (hr); y γ codifica al menos un polipéptido o fragmento antigénico del mismo codificado por un polinucleótido seleccionado entre el grupo consistente en la ORF 6 y ORF 7 de una cepa Iowa de PRRSV y regiones de las mismas que codifican el fragmento antigénico; y ξ , que está presente opcionalmente, es una secuencia polinucleotídica 3' terminal que no reprime la expresión operativa de los polinucleótidos α, β, γ y δ , y que puede estar unida operativamente a ε (por ejemplo, en un plásmido), donde el ácido polinucleico no consiste en la secuencia mostrada en la SEC ID N°: 13 del documento WO 96/06619.

Los genes marcadores o indicadores adecuados, incluyen, por ejemplo, los que proporcionan resistencia a un antibiótico tal como neomicina, eritromicina o cloranfenicol; los que codifican una enzima detectable conocida tal como la β -lactamasa, DHFR, peroxidasa de rábano picante, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, fosfatasa alcalina y enzimas descritas en la Patente de Estados Unidos 4.190.496, col. 32, línea 33 hasta col. 38, línea 44 (incorporada en la presente memoria como referencia), etc.; y los que codifican un anticuerpo conocido (por ejemplo, IgG de ratón, IgG de conejo, IgG de rata, etc.) o una proteína antigénica conocida tal como la Proteína A, Proteína C, albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH), gammaglobulina bovina (BGG), lactalbúmina, polilisina, poliglutamato, lectina, etc.

El polinucleótido preferiblemente es una secuencia polinucleotídica con una homología de al menos 80% con una secuencia polinucleotídica procedente de un genoma de PRRSV localizado entre una secuencia de unión líder-ARNm y el codón de iniciación de la ORF inmediatamente cadena abajo. "Aproximadamente 130" nucleótidos de longitud se refiere a una longitud del polinucleótido que no afecta adversamente a la expresión operativa de κ . Por ejemplo, en

ISU 79, puede encontrarse una secuencia de unión líder-ARNm que no reprime la expresión de la ORF 7 129 bases cadena arriba del codón de iniciación de la ORF 7 (véase el Experimento 2 mostrado más adelante). Pueden deducirse secuencias ilustrativas adecuadas para el polinucleótido *L* a partir de la secuencia mostrada en las Figs. 1 y 9.

El ácido polinucleico de la presente invención también puede comprender, consistir esencialmente o consistir en combinaciones de las secuencias anteriores, como una mezcla de polinucleótidos o unidas covalentemente en una configuración de cabeza a cola (con sentido-antisentido) o de cabeza a cabeza. En la presente invención también se incluyen ácidos polinucleicos complementarios a las secuencias anteriores y combinaciones de los mismos (ácido polinucleico antisentido). De esta manera, además de poseer copias múltiples o variantes de la ORF 5, el ácido polinucleico de la presente invención también puede contener copias múltiples o variantes de una o más de las ORF 1-7, incluyendo regiones antigénicas o hipervariables de la ORF 5 de la cepa Iowa de PRRSV.

De forma similar a los métodos descritos anteriormente y en los Experimentos descritos más adelante y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435, se puede preparar una biblioteca de clones recombinantes (por ejemplo, usando *E. coli* como hospedador) que contenga fragmentos de restricción preparados de forma adecuada de un genoma de PRRSV (por ejemplo, insertados en un plásmido apropiado expresable en el hospedador). Los clones después se exploran con una sonda adecuada (por ejemplo, basada en una secuencia conservada de las ORF 2-3; véase, por ejemplo, la Figura 22 de la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435). Después, los clones positivos pueden seleccionarse y desarrollarse hasta un nivel apropiado. Los ácidos polinucleicos después pueden aislarse a partir de los clones positivos de acuerdo con métodos conocidos. Después, puede diseñarse un cebador adecuado para la PCR y prepararse como se ha descrito anteriormente para amplificar la región deseada del ácido polinucleico. El ácido polinucleico amplificado después puede aislarse y secuenciarse por métodos conocidos.

En el contexto de la presente solicitud, "homología" se refiere al porcentaje de restos nucleotídicos o aminoácidos idénticos en las secuencias de dos o más virus, alineadas de acuerdo con un método convencional para determinar la homología (por ejemplo, los programas informáticos MACVECTOR o GENEWORKS, alineados con el procedimiento descrito en el Experimento III en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435).

Preferiblemente, el ácido polinucleico aislado de la presente invención codifica una proteína, polipéptido o fragmento antigénico del mismo que tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos y en el que ciertos aminoácidos no homólogos que no son esenciales para la antigenicidad pueden estar sustituidos de forma conservativa. Un resto aminoácido en una proteína, polipéptido o fragmento antigénico del mismo está sustituido de forma conservativa si se reemplaza por un miembro de su grupo de polaridad como se define a continuación:

Aminoácidos Básicos:

lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His)

Aminoácidos Ácidos:

ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), glutamina (Gln)

Aminoácidos hidrófilos, no iónicos:

serina (Ser), treonina (Thr), cisteína (Cys), asparagina (Asn) y glutamina (Gln)

Aminoácidos que contienen azufre:

cisteína (Cys), metionina (Met)

Aminoácidos hidrófobos aromáticos:

fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), triptófano (Trp)

Aminoácidos no aromáticos, hidrófobos:

glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile) y prolina (Pro)

Más particularmente, el ácido polinucleico de la presente invención codifica una o más de las proteínas codificadas por la segunda, tercera, cuarta o quinta fases de lectura abierta (ORF 2-5) del aislado de PRRSV.

Las ORF 6 y 7 no son candidatos probables para controlar los fenotipos de virulencia y replicación de PRRSV, ya que las secuencias de nucleótidos de estos genes están muy conservadas entre los aislados de alta virulencia (hv) y de baja virulencia (lv) (véase el Experimento III de la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435). Sin embargo, la ORF 5 en los aislados de PRRSV parece estar menos conservada entre los aislados de alta replicación (hr) y de baja replicación (lr). Por lo tanto, se cree que la presencia de una ORF 5 procedente de un

aislado de PRRSV hr en el ácido polinucleico de la presente invención mejorará la producción y expresión de una vacuna recombinante producida a partir del ácido polinucleico.

Además, la ORF 5 de PRRSV contiene tres regiones hipervariables hidrófilas asociadas típicamente con la antigenicidad en un polipéptido.

Se prefiere que el ácido polinucleico de la presente invención, cuando se usa con fines inmunoprotectores (por ejemplo, en la preparación de una vacuna) contenga al menos una copia de la ORF 5 de VR 2430 (ISU-55) (es decir, un aislado que se desarrolla hasta un título de 10^6 - 10^7 TCID₅₀ en, por ejemplo, células CRL 11171; véanse también las descripciones de los Experimentos VIII-XI de la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435).

Por otra parte, el aislado de lv VR 2431 parece ser un mutante de delección, en relación a los aislados de hv (véanse los Experimentos III y VIII-XI de la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435). La delección parece estar en la ORF 4, basándose en el análisis de transferencia de Northern. Por consiguiente, cuando se usa con fines inmunoprotectores, el ácido polinucleico de la presente invención preferiblemente no contiene una región de ORF 4 de un aislado de hv responsable de alta virulencia; y, más preferiblemente, excluye la región de la ORF 4 que no solapa con las ORF 3 y 5 adyacentes.

También se sabe (al menos en el caso de PRRSV) que ni la proteína de la nucleocápsida ni los anticuerpos contra la misma confieren protección inmunológica contra PRRSV a los cerdos. Por consiguiente, el ácido polinucleico de la presente invención, cuando se usa con fines inmunoprotectores, puede contener una o más copias de una o más regiones de las ORF 2, 3, 4, 5 y 6 de un aislado de PRRSV que codifica una región antigénica de la proteína de envuelta viral, pero que no produce los síntomas o cambios histopatológicos asociados con PRRS cuando se administra a un cerdo. Preferiblemente, esta región presenta reacción inmunológica cruzada con anticuerpos contra la proteína de la envuelta de otros aislados de PRRSV.

De forma similar, la proteína codificada por el ácido polinucleico de la presente invención confiere protección frente a PRRS a un cerdo al que se le ha administrado una composición que comprende la proteína, y los anticuerpos contra esta proteína presentan reacción inmunológica cruzada con las proteínas de la envuelta de otros aislados de PRRSV.

Pueden usarse segmentos relativamente cortos de ácido polinucleico (de aproximadamente 20 pb o de mayor longitud) en el genoma de un virus para seleccionar o identificar muestras de tejidos y/o fluidos biológicos a partir de animales infectados, y/o identificar virus relacionados, por métodos descritos en este documento y conocidos por los especialistas habituales en los campos del diagnóstico veterinario y viral y la medicina veterinaria.

Otra realización de la presente invención se refiere a una o más proteínas o fragmentos antigénicos de las mismas procedentes de VR 2430 (ISU-55).

Como se ha descrito anteriormente, un fragmento antigénico de una proteína procedente de un virus de PRRS tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos, de una forma particularmente preferible de al menos 10 aminoácidos, y proporciona o estimula una respuesta inmunológicamente protectora en un cerdo al que se le ha administrado una composición que contiene el fragmento antigénico.

Los especialistas habituales en la técnica conocen métodos para determinar la parte antigénica de una proteína (véase la descripción anterior). Además, también se puede determinar un fragmento antigénico esencial de una proteína demostrando primero que la proteína de longitud completa es antigénica en un animal hospedador (por ejemplo, un cerdo). Si la proteína aún es antigénica en presencia de un anticuerpo que se une específicamente a una región o secuencia particular de la proteína, entonces esa región o secuencia puede no ser esencial para la inmunoprotección. Por otra parte, si la proteína ya no es antigénica en presencia de un anticuerpo que se une específicamente a una región o secuencia particular de la proteína, entonces esa región o secuencia se considera esencial para la antigenicidad.

Se han identificado tres regiones hipervariables en la ORF 5 del PRRSV comparando las secuencias de aminoácidos del producto de la ORF 5 de todos los aislados de PRRSV disponibles (véase, por ejemplo, la Fig. 2D). Las variaciones de aminoácidos en estas tres regiones son significativas y no se conservan estructuralmente (Fig. 2D). Las tres regiones hipervariables son hidrófilas y antigénicas. De esta manera, estas regiones probablemente se expondrán a la membrana viral y de esta forma estarán bajo presión de selección inmune del hospedador. Las regiones hipervariables se consideran determinantes antigénicos en la proteína de la envuelta de ORF 5.

La presente invención también se refiere a una proteína o fragmento antigénico de la misma codificado por uno o más de los ácidos polinucleicos definidos anteriormente. Las proteínas y fragmentos antigénicos de la presente invención son útiles para inmunizar cerdos contra PRRSV, en ensayos serológicos para seleccionar cerdos para la exposición o infección por PRRSV (particularmente la cepa Iowa de PRRSV), etc.

La proteína de la presente invención puede seleccionarse entre el grupo consistente en las proteínas codificadas por las ORF 2-5, ISU-55 (VR 2430); y regiones antigénicas de al menos una de estas proteínas que tienen una longitud de 5 aminoácidos a menos de la longitud completa de la proteína. Preferiblemente, la proteína de la presente invención tiene

una secuencia codificada por una ORF seleccionada entre el grupo consistente en las ORF 2-5 de VR 2430 (véase, por ejemplo, la Fig. 2A-D); variantes de la misma que proporcionan protección inmunológica eficaz a un cerdo al que se le ha administrado y donde existen de 1 a 100 (preferiblemente de 1 a 50 y más preferiblemente de 1 a 25) delecciones en la secuencia de aminoácidos; y fragmentos antigénicos de la misma con una longitud de al menos y preferiblemente al menos 10 aminoácidos que proporcionan protección inmunológica eficaz a un cerdo al que se le ha administrado.

Más preferiblemente, la variante de proteína o fragmento de proteína de la presente invención tiene una afinidad de unión (o constante de asociación) de al menos 1% y preferiblemente al menos 10% de la afinidad de unión de la proteína natural de longitud completa correspondiente a un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína natural de longitud completa (es decir, la proteína codificada por una ORF de PRRSV).

La presente invención también se refiere a un método para producir un polipéptido que comprende expresar el ácido polinucleico de la presente invención en un sistema de expresión operativo, y purificar el polipéptido expresado a partir del sistema de expresión. Los sistemas de expresión adecuados incluyen los usados convencionalmente para la expresión *in vivo* o *in vitro* de proteínas y polipéptidos, tales como el sistema de reticulocitos de conejo para la expresión *in vitro*, y para la expresión *in vivo*, un PRRSV quimérico o modificado (usado para infectar una línea de células hospedadoras infectable, tal como MA-104, CRL 11171, PSP-36, PSP-36-SAH, MARC-145 y macrófagos alveolares porcinos), o un vector de expresión convencional que contiene el ácido nucleico de la presente invención, bajo el control operativo de un promotor conocido (por ejemplo, el promotor de timidina quinasa, SV40, etc.) para uso en sistemas de expresión convencionales (por ejemplo, plásmidos bacterianos y bacterias hospedadoras correspondientes, sistemas de expresión de levadura y levaduras hospedadoras correspondientes, etc.). El polipéptido o proteína expresada después se purifica o se aísla a partir del sistema de expresión por métodos de purificación y/o aislamiento convencionales.

Otras características de la invención serán evidentes en el transcurso de las siguientes descripciones de realizaciones ilustrativas, que se proporcionan para ilustrar la invención y no pretenden ser limitantes de la misma.

Experimento I

Resumen

Se han determinado y analizado las secuencias de las ORF 2 a 5 de un aislado de PRRSV estadounidense de baja virulencia, un aislado de PRRSV estadounidense de virulencia "moderada" y un aislado de PRRSV estadounidense de alta virulencia. Las comparaciones con secuencias conocidas de otros aislados de PRRSV demuestran que existen considerables variaciones de secuencia tanto a nivel de los nucleótidos como a nivel de los aminoácidos en las ORF 2 a 5 de siete aislados estadounidenses con diferente virulencia. Sin embargo, las ORF 6 y 7 de estos siete aislados estadounidenses están muy conservadas (Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435). También se encontraron variaciones de secuencia extensivas en las ORF 2 a 7 entre el LV europeo y los aislados estadounidenses. El aislado de PRRSV estadounidense menos virulento conocido VR 2431 (ISU-3927) presentó la mayor variación de secuencia, en comparación con otros aislados estadounidenses.

También se analizó la relación filogenética de los aislados estadounidenses. El análisis filogenético de las ORF 2 a 7 de los aislados estadounidenses indicó que hay al menos tres grupos de variantes de PRRSV (o genotipos minoritarios) dentro del genotipo de PRRSV estadounidense principal. Por consiguiente, es muy probable que se examinen varios genotipos mayoritarios o minoritarios adicionales identificados como más aislados de virus de diferentes regiones geográficas.

De forma interesante, el aislado estadounidense menos virulento conocido VR 2431 (ISU 3927) forma una rama distinta de otros aislados estadounidenses. El análisis de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos también demostró que el aislado VR 2431 (ISU 3927) presenta la máxima variación en las ORF 2 a 4, con respecto a otros aislados estadounidenses. Muchas de estas variaciones en el aislado VR 2431 (ISU 3927), producen sustituciones de aminoácidos no conservadas. Sin embargo, estos cambios no conservados en el aislado VR 2431 (ISU 3927), en comparación con otros aislados estadounidenses, no parecen limitarse a una región particular; están presentes a lo largo de las ORF 2 a 4. Por lo tanto, aún no se ha esclarecido completamente una correlación específica entre las variaciones de secuencia y la virulencia viral (aunque ciertas posiciones en la ORF 3 parecen estar posiblemente relacionadas con la virulencia; véase la Fig. 2B, posiciones 30, 48, 54-56, 134, 140, 143, 147, 153, 206 y 215; los aminoácidos en una o más de estas posiciones pueden servir como base para mutar otras proteínas conocidas codificadas por la ORF 3 de PRRSV).

Resultados

La identidad de secuencias de aminoácidos entre siete aislados de PRRSV estadounidenses fue de 91-99% en la ORF 2, 86-98% en la ORF 3, 92-99% en la ORF 4 y 88-97% en la ORF 5. El aislado estadounidense menos virulento conocido tiene mayores variaciones de secuencia en las ORF 2 a 4 que en las ORF 5 a 7, en comparación con otros aislados estadounidenses. En la glicoproteína de la envuelta principal codificada por la ORF 5 se identificaron tres regiones hipervariables con potencial antigénico.

La comparación por parejas de las secuencias de las ORF 2 a 7 y el análisis del árbol filogenético dio a entender la existencia de al menos tres grupos de variantes de PRRSV (o genotipos minoritarios) dentro del genotipo principal del PRRSV estadounidense. El aislado estadounidense menos virulento conocido forma una rama distinta de otros aislados estadounidenses con diferente virulencia. Los resultados de este estudio tienen implicaciones para la taxonomía de PRRSV y el desarrollo de vacunas.

La Figura 1 muestra una comparación de secuencias de nucleótidos de las ORF 2 a 5 de los aislados estadounidenses VR 2431 (ISU 3927), VR 2429 (ISU 22) y VR 2430 (ISU 55) con otros aislados de PRRSV conocidos. La secuencia de nucleótidos de VR 2385 (ISU 12) se muestra en la parte superior y sólo se indican las diferencias. El codón de iniciación de cada ORF se indica por +> y el codón de terminación de cada ORF se indica por asteriscos (*). Las secuencias de unión líder-ARNm para los ARNm subgenómicos 3, 4 y 4-1 están subrayadas, y las localizaciones de las secuencias de unión con respecto al codón de iniciación de cada ORF se indican por números negativos (-) de nucleótidos cadena arriba de cada ORF. Las secuencias de VR 2385 (Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435), VR 2332, VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894) (Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435) usada en este alineamiento se presentaron previamente.

Material y métodos

Células y virus

Para propagar el PRRSV se usó la línea celular ATCC CRL 11171. Las células se cultivaron en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y antibióticos 1 X (penicilina G a 10.000 unidades/ml, estreptomycin a 10.000 mg/ml y anfotericina B a 25 mg/ml).

Se aislaron tres aislados estadounidenses de PRRSV usados en este estudio, denominados VR 2429 (ISU 22), VR 2430 (ISU 55) y VR 2431 (ISU 3927) a partir de pulmones de cerdo obtenidos de diferentes granjas de Iowa durante los brotes de PRRS. Los tres aislados se purificaron en placa tres veces en células CRL 11171 antes de la experimentación adicional. Los estudios de patogenicidad comparativos demostraron que el aislado ISU 3927 es el aislado menos virulento entre 10 aislados de PRRSV estadounidenses diferentes. El aislado VR 2429 (ISU 22) es un aislado de alta virulencia y el aislado VR 2430 (ISU 55) es “moderadamente” patogénico. Los tres aislados de virus usados en este experimento se sometieron a siete pases.

Aislamiento de ARN intracelulares de PRRSV

Se infectaron monocapas confluentes de células CRL 11171 con los tres aislados estadounidenses de PRRSV VR 2429 (ISU 22), VR 2430 (ISU 55) y VR2431 (ISU 3927), respectivamente, a una multiplicidad de infección (m.d.i.) de 0,1. A las 24 horas después de la infección, las células infectadas se lavaron tres veces con tampón PBS frío. Después se aislaron los ARN intracelulares totales por extracción con isotiocianato de guanidinio y fenol-cloroformo (Stratagene). La presencia de especies de ARN con especificidad del virus en la preparación de ARN se confirmó por hibridación de transferencia de Northern (datos no mostrados). Los ARN intracelulares totales se cuantificaron espectrofotométricamente.

Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Se sintetizó ADN complementario (c) de primera cadena a partir de los ARN intracelulares totales por transcripción inversa usando cebadores aleatorios como se ha descrito previamente (Meng *et al.*, 1993, J. Vet. Diagn. Invest. 5: 254-258). Para la amplificación de las regiones codificantes de la proteína entera de las ORF 2 a 5 de los tres aislados de PRRSV, se diseñaron dos series de cebadores basándose en las secuencias de VR 2385 y LV. Los cebadores JM259 (5'-GGGGATCCTTTTGTGGAGCCGT-3') y JM260 (5'-GGGGAATTCGGGATAGGAATGTG-3') amplificaron la secuencia de las ORF 4 y 5 y los cebadores XM992 (5'-GGGGGATCCTGTTGG-TAATAG(A)GTCTG-31) y XM993 (5'-GGTGAATTCGTTTATTTCCCTCCGGGC-3') amplificaron la secuencia de las ORF 2 y 3. Se introdujeron sitios de restricción únicos (EcoRI o BamHI) en el extremo 5' de estos cebadores para facilitar la clonación. Se sintetizó una base degenerada, G (A), en el cebador XM 992 basándose en las secuencias de VR 2385 y LV (Meulenber *et al.*, 1993; Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435). La PCR se realizó como se ha descrito previamente (Meng *et al.*, 1993, J. Vet. Diagn. Invest., 5: 254-258).

Clonación y secuenciación de nucleótidos

Los productos de RT-PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Los dos fragmentos de PCR que representan las ORF 2 y 3 así como las ORF 4 y 5, respectivamente, se purificaron por el procedimiento Glassmilk (kit GENECLEAN, BIO 101, Inc.). Cada uno de los fragmentos purificados se digirió con BamHI y EcoRI y se clonó en el vector pSK+ como se ha descrito previamente (Meng *et al.*, 1993). Para la transformación de los plásmidos recombinantes se usaron células *E. coli* DH 5α. Se seleccionaron colonias blancas y se cultivaron el caldo LB que contenía 100 mg/ml de ampicilina. Las células *E. coli* que contenían plásmidos recombinantes se lisaron con lisozima y los plásmidos después se aislaron usando la columna Qiagen (QIAGEN Inc.).

Los plásmidos que contenían insertos virales se secuenciaron con un Secuenciador de ADN automático (Applied Biosystem, Inc.). Se secuenciaron tres o más clones de ADNc independientes que representaban la secuencia entera

de las ORF 2 a 5 de cada uno de los tres aislados de PRRSV con cebadores universales e inversos. También se usaron varios cebadores con especificidad de virus, XM969 (5'-GATAGAGTCTGCCCTTAG-3'), XM970 (5'-GGTTT CACCTAGAATGGC-3'), XM1006 (5'-GCTTCTGAGATGAGTGA-3'), XM077 (5'-CAACCAGGCGTAAACACT-3') y XM078 (5'-CTGAGCAATTACAGAAG-3') para determinar la secuencia de las ORF 2 a 5.

Análisis de la secuencia

Los datos de las secuencias se combinaron y analizaron usando los programas de Software informático MacVector (International Biotechnologies, Inc.) y GeneWorks (IntelliGenetics, Inc.). Se realizaron análisis filogenéticos usando el paquete de software PAUP versión 3.1.1. (David L. Swofford, Illinois Natural History Survey, Champaign, IL). PAUP emplea el algoritmo de máxima parsimonia para construir árboles filogenéticos.

Resultados

Análisis de las secuencias de nucleótidos de las ORF 2 a 5

Se determinaron las secuencias de las ORF 2 a 5 de cinco aislados de PRRSV, VR 2474 (ISU 79), VR 2475 (ISU 1894), VR 2429 (ISU 22), VR 2430 (ISU 55) y VR 2431 (ISU 3927), y se compararon con otros aislados de PRRSV conocidos incluyendo VR 2385, VR 2332 y LV (Meulenber *et al.*, 1993). Las secuencias de las ORF 6 y 7 de los aislados VR 2385, VR 2429 (ISU 22), VR 2430 (ISU 55), VR 2474 (ISU 79), VR 2475 (ISU 1894) y VR 2431 (ISU 3927) se presentaron previamente (Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435). Se ha demostrado que los aislados usados en este experimento difieren en neumovirulencia en cerdos infectados experimentalmente (Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435). VR 2431 (ISU 3927) es el aislado menos virulento entre 10 aislados diferentes de PRRSV (Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/131.625 y Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435).

Al igual que otros aislados de PRRSV estadounidenses, las ORF 2 a 4 de estos aislados solapaban entre sí (Fig. 1). Sin embargo, a diferencia de LV, las ORF 4 y 5 de los aislados estadounidenses están separadas por 10 nucleótidos (Fig. 1). Las ORF 4 y 5 de LV solapaban por un nucleótido. La sustitución de un solo nucleótido desde A del codón de iniciación de la ORF 5 en LV a T en los aislados estadounidenses pone el codón de iniciación de la ORF 5 de los aislados estadounidenses 10 nucleótidos cadena abajo del codón de terminación de la ORF 4. Por lo tanto, aparece una secuencia no codificante de 10 nucleótidos entre las ORF 4 y 5 de los aislados estadounidenses conocidos (Fig. 1).

La ORF 2 de VR 2474 (ISU 79) tiene 3 nucleótidos menos que otros aislados estadounidenses. La sustitución de un solo nucleótido desde TGG a TAG justo antes del codón de terminación de la ORF 2 crea un nuevo codón de terminación de VR 2474 (ISU 79) (Fig. 1). También se encontró una delección de 3 nucleótidos en la ORF 5 de VR 2431 (ISU 3927), en comparación con otros aislados estadounidenses (Fig. 1). Los tamaños de las ORF 2 a 5 de todos los aislados estadounidenses son idénticos, con la excepción de la ORF 2 de VR 2473 (ISU 79) y la ORF 5 de VR 2431 (ISU 3927), teniendo ambas 3 nucleótidos menos que las otras ORF (Fig. 1).

Las comparaciones de secuencia de las ORF 2 a 5 de los 7 aislados de PRRSV estadounidenses mostrados en la Fig. 1 indican que hay variaciones considerables en las secuencias de nucleótidos en las ORF 2 a 5 de los aislados estadounidenses (Fig. 1). La identidad de secuencias de nucleótidos fue de 96-98% en la ORF 2, 92-98% en la ORF 3, 92-99% en la ORF 4 y 90-98% en la ORF 5 entre VR 2385, VR 2332, VR 2429 (ISU 22), VR 2430 (ISU 55), VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894) (Tabla 2).

El aislado menos virulento VR 2431 (ISU 3927) tiene la mayor variación entre los siete aislados estadounidenses (Fig. 1 y Tabla 2). La identidad de secuencias de nucleótidos entre VR 2431 (ISU 3927) y otros aislados estadounidenses fue de 93-94% en la ORF 2, 89-90% en la ORF 3 y 91-93% en la ORF 4 (Tabla 2). Al igual que las ORF 6 y 7 (Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435), la ORF 5 de VR 2431 (ISU 3927) no tiene cambios significativos con la excepción de una delección de 3 nucleótidos (Fig. 1). La ORF 5 de VR 2431 (ISU 3927) comparte una identidad de secuencias de nucleótidos de 91-93% con la ORF 5 de otros aislados estadounidenses (Tabla 2).

Sin embargo, se encontró una variación de secuencias considerable en las ORF 2 a 5 entre LV y los aislados estadounidenses (Fig. 1 y Tabla 2). La identidad de secuencias de nucleótidos entre LV y los aislados estadounidenses fue de 65-67% en la ORF 2, 61-64% en la ORF 3, 63-66% en la ORF 4 y 61-63% en la ORF 5 (Tabla 2). También existen variaciones genéticas considerables en las ORF 6 y 7 entre LV y PRRSV estadounidense (Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435). Estos resultados indican que el aislado menos virulento VR 2431 (ISU 3927) también es el que está relacionado de una forma más distante de los aislados estadounidenses, produciéndose variaciones genéticas principalmente en las ORF 2 a 4.

La sustitución de un solo nucleótido de TGG a TAG antes del codón de terminación en la ORF 2 observada en VR 2474 (ISU 79) también estaba presente en los aislados VR 2430 (ISU 55) y VR 2431 (ISU 3927), produciendo los dos siete ARNm sg, pero no en los aislados VR 2429 (ISU 22), VR 2475 (ISU 1894) o VR 2385, que sintetizan cada uno sólo seis ARNm sg (Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435). Los resultados indican que es muy probable que la secuencia de unión líder-ARNm 4-1 de VR 2430 (ISU 55) y VR 2431 (ISU 3927) sean iguales a VR 2474 (ISU 79) (Fig. 1).

Se determinó que las secuencias de unión líder-ARNm para los ARNm sg 3 y 4 de VR 2474 (ISU 79) y VR 2431 (ISU 1894) eran GUAACC 89 nucleótidos cadena arriba de la ORF 3 para el ARNm sg 3, y UUCACC 10 nucleótidos cadena arriba de la ORF 4 para el ARNm sg 4 (Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.345; véase también el Experimento 2 mostrado más adelante). Una comparación de secuencias de los aislados VR 2429 (ISU 22), VR 2430 (ISU 55) y VR 2431 (ISU 3927) con los aislados VR 2385, VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894) indica que las secuencias de unión líder-ARNm para los ARNm sg 3 y 4 están conservadas entre los aislados estadounidenses (Fig. 1).

Análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas codificadas por las ORF 2 a 5

La Fig. 2 muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de las ORF 2 (A), ORF 3 (B), ORF 4 (C) y ORF 5 (D) de los aislados estadounidenses VR 2429 (ISU 22), VR 2430 (ISU 55) y VR 2431 (ISU 3927) con otros aislados de PRRSV conocidos. La secuencia de VR 2385 se muestra en la parte superior y sólo se indican las diferencias. Las deleciones están indicadas por (-). La secuencia del péptido señal propuesta en la ORF 5 de LV (D) está subrayada (Meulenberg *et al.*, 1995). Se indicaron tres regiones hipervariables con potenciales antigénicos en la ORF 5 (D) por asteriscos (*). Las secuencias publicadas usadas en este alineamiento eran LV (Meulenberg *et al.*, 1993), VR 2385 (Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435), VR 2332, VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1984) (Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435).

Basándose en el alto contenido de aminoácidos básicos y su naturaleza hidrófila, se prevé que el producto de traducción de la ORF 7 sea la proteína de la nucleocápsida (Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435; Meulenberg *et al.*, 1993; Conzelmann *et al.*, 1993; Mardassi *et al.*, 1994). El producto de la ORF 6 carece de una posible secuencia señal amino-terminal y contiene varias regiones hidrófobas que pueden representar los posibles fragmentos transmembrana. Por lo tanto, se predijo que el producto de la ORF 6 era la proteína M (Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435; Meulenberg *et al.*, 1993; Conzelmann *et al.*, 1993).

El análisis informático demuestra que los productos codificados por las ORF 2 a 5 de los aislados estadounidenses tienen características de hidropatía que recuerdan a las proteínas asociadas a la membrana. Los productos de traducción de las ORF 2 a 5 contienen un extremo amino hidrófobo. Las secuencias hidrófobas N-terminales pueden funcionar como una secuencia señal para cada una de estas ORF, y pueden estar implicadas en el transporte de las ORF 2 a 5 al retículo endoplásmico de células infectadas. En el extremo carboxi se encontró al menos un dominio hidrófobo adicional en cada una de las ORF 2 a 5. Estos dominios hidrófobos adicionales pueden funcionar como anclajes de membrana.

Las secuencias de aminoácidos deducidas de las ORF 2 a 5 de los siete aislados estadounidenses examinados también variaban considerablemente (Fig. 2), indicando que la mayoría de las diferencias de nucleótidos observadas en la Fig. 1 no son mutaciones silenciosas. La identidad de secuencias de aminoácidos entre VR 2385, VR 2332, VR 2429 (ISU 22), VR 2430 (ISU 55), VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1984) fue de 95-99% en la ORF 2, 90-98% en la ORF 3, 94-98% en la ORF 4 y 88-97% en la ORF 5 (Tabla 2).

De nuevo, el aislado menos virulento VR 2431 (ISU 3927) presentó más variaciones con otros aislados estadounidenses en las ORF 2 a 4 (Fig. 2 y Tabla 2) que en las ORF 5 a 7 (Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435 y Tabla 2). Las ORF 2 a 5 de LV comparten sólo una identidad de secuencias de aminoácidos de 57-61%, 55-56%, 65-67% y 51-55% con esas ORF de los aislados estadounidenses, respectivamente (Tabla 2). Se encontraron deleciones e inserciones a lo largo de las ORF 2 a 5 en la comparación del aislado de LV europeo y los aislados estadounidenses (Fig. 2).

La comparación de secuencias del producto de la ORF 5 demostró que la región N-terminal de la ORF 5 es extremadamente variable, tanto (a) entre los aislados estadounidenses y LV como (b) entre los diversos aislados estadounidenses (Fig. 2D). En LV, los primeros 32-33 restos aminoacídicos de la ORF 5 pueden representar la secuencia señal (Meulenberg *et al.*, 1995; Fig. 2D). Por lo tanto, la posible secuencia señal de la ORF 5 en todos los aislados de PRRSV es muy heterogénea. Esta heterogeneidad no se debe a ninguna presión de selección inmune del hospedador, porque el péptido señal se escindiría y no estará presente en los viriones maduros.

También se identificaron tres regiones hipervariables adicionales comparando las secuencias de aminoácidos de la ORF 5 de todos los aislados de PRRSV disponibles (Fig. 2D). Las variaciones de aminoácidos en estas tres regiones son significativas y no están conservadas estructuralmente (Fig. 2D). El análisis informático indica que las tres regiones hipervariables son hidrófilas y antigénicas. De esta manera, es probable que estas regiones se expongan a la membrana viral y estén bajo la presión de selección inmune del hospedador. Sin embargo, pueden ser necesarios otros experimentos para confirmar las funciones específicas de estas regiones hipervariables como determinantes antigénicos en la proteína de la envuelta de la ORF 5.

Las relaciones filogenéticas entre los aislados estadounidenses de PRRSV

Previamente se ha demostrado que el PRRSV estadounidense y el PRRSV europeo representan dos genotipos distintos, basándose en el análisis de los genes M y N (Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435). Para determinar las relaciones filogenéticas de los aislados de PRRSV estadounidenses, primero se alinearon las ORF 2 a 7 de los siete aislados de PRRSV estadounidenses mostrados en la Fig. 1 y 2 con el programa

GeneWorks (intelligenetics, Inc.). Después se usó el programa PAUP (David L. Swofford, Illinois Natural History Survey, Champaign, IL) para construir el árbol filogenético que ilustra la relación entre los aislados estadounidenses de PRRSV.

5 El árbol filogenético de la Fig. 3 se construyó por métodos de máxima parsimonia con la ayuda del paquete de software PAUP versión 3.1.1. La rama con la menor longitud (más parsimoniosa) se encontró realizando la opción de búsqueda exhaustiva. Las longitudes de las ramas (números de sustituciones de aminoácidos) se proporcionan encima de cada rama. Las secuencias usadas en el análisis son LV, VR 2385, VR 2332, VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894).

10 El árbol filogenético indica que existen al menos tres grupos de variantes (o genotipos minoritarios) dentro del genotipo de PRRSV estadounidense principal. El aislado de PRRSV estadounidense menos virulento, VR 2431 (ISU 3927), forma una rama distinta de otros aislados estadounidenses (Fig. 3). Los aislados VR 2429 (ISU 22), VR 2474 (ISU 79), VR 2475 (ISU 1894) y VR 2332 forman otra rama que representa un segundo genotipo minoritario. El tercer genotipo minoritario se representa por los aislados VR 2430 (ISU 55) y VR 2385 (Fig. 3). También se obtuvo un árbol
15 muy similar analizando los últimos 60 nucleótidos de la ORF 1b de los siete aislados estadounidenses presentados en la Fig. 1 (datos no mostrados). También se produjo una topología de árbol idéntica por el método de agrupamiento por parejas con media aritmética no ponderada (UPGMA) usando el programa GeneWorks (datos no mostrados).

20 En resumen, los diferentes genotipos de PRRSV se han confirmado y se han esclarecido adicionalmente. Se han identificado al menos tres genotipos minoritarios dentro del genotipo mayoritario de PRRSV estadounidense, basándose en un análisis de la secuencia de las ORF 2 a 7. También se han confirmado variaciones genéticas no sólo entre los PRRSV europeos y los PRRSV estadounidenses, sino también entre los aislados de PRRSV estadounidenses, indicando la naturaleza heterogénea de PRRSV. El aislado de PRRSV estadounidense menos virulento VR 2431 (ISU 3927) tiene variaciones de secuencias inesperadamente elevadas en las ORF 2 a 4 en comparación con otros aislados
25 estadounidenses.

TABLA 2

Identities (%) de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducidas de las ORF 2 a 5 de PRRSV

30

	ORF2	VR2385	VR2429	VR2430	VR2434	VR2475	VR2431	VR2332	LV
			(ISU22)	(ISU55)	(ISU79)	(ISU21894)	(ISU3927)		
35	VR2385	**	97	96	96	95	91	98	58
	VR2429	97	**	96	98	96	93	99	59
	(ISU22)								
40	VR2430	98	97	**	96	95	91	97	61
	(ISU55)								
	VR2474	96	97	97	**	96	91	98	60
	(ISU79)								
45	VR2475	96	97	96	96	**	93	96	57
	(ISU1894)								
	VR2431	94	94	94	93	93	**	93	58
50	(ISU3927)								
	VR2332	97	98	97	98	97	94	**	59
	LV	65	66	66	67	66	65	66	**
55	ORF3								
	VR2385	**	91	94	92	90	87	91	55
	VR2429	92	**	93	96	96	88	98	56
60	(ISU22)								
	VR2430	94	93	**	94	93	87	94	56
	(ISU55)								
65	VR2474	94	96	94	**	95	87	96	56
	(ISU79)								

ES 2 326 703 T3

	ORF2	VR2385	VR2429	VR2430	VR2434	VR2475	VR2431	VR2332	LV
			(ISU22)	(ISU55)	(ISU79)	(ISU21894)	(ISU3927)		
5	VR2475	92	97	93	96	**	86	96	55
	(ISU1894)								
	VR2431	90	90	89	90	90	**	87	55
10	(ISU3927)								
	VR2332	93	98	94	97	97	90	**	56
	LV	64	63	62	63	63	61	63	**
	ORF4								
15	VR2385	**	94	96	94	95	83	94	66
	VR2429	93	**	94	97	99	93	98	66
	(ISU22)								
20	VR2430	96	94	**	96	96	93	95	67
	(ISU55)								
	VR2474	93	97	94	**	98	92	96	66
25	(ISU79)								
	VR2475	92	98	94	96	**	93	98	66
	(ISU1894)								
30	VR2431	91	93	92	91	91	**	92	67
	(ISU3927)								
	VR2332	94	99	95	97	98	92	**	65
35	LV	66	66	63	65	66	65	65	**
	ORF5								
	VR2385	**	90	91	88	89	91	89	54
40	VR2429	93	**	90	94	96	92	97	52
	(ISU22)								
	VR2430	94	92	**	89	89	90	89	51
	(ISU55)								
45	VR2474	91	95	91	**	95	89	94	53
	(ISU79)								
	VR2475	92	97	90	94	**	91	96	53
50	(ISU1894)								
	VR2431	91	93	91	91	91	**	91	55
	(ISU3927)								
55	VR2332	93	98	91	95	97	92	**	53
	LV	63	63	63	61	62	63	63	**

Nota: Las comparaciones de secuencias de aminoácidos se presentan en la mitad superior derecha y las comparaciones de las secuencias de nucleótidos se presentan en la mitad inferior izquierda.

Experimento 2

Durante la replicación de PRRSV, se sintetizan seis ARNm subgenómicos (ARNm sg), además del ARN genómico. Estos ARNm sg se caracterizan en este experimento.

Los ARNm sg de PRRSV forman una serie anidada 3'-coterminales en células infectadas con PRRSV. Cada uno de estos ARNm sg es policistónico y contiene múltiples fases de lectura abierta, excepto el ARNm sg 7 (como se muestran por análisis de transferencia de Northern usando sondas con especificidad de ORF). Los ARNm sg no se empaquetaron en viriones y sólo se detectó el ARN genómico en viriones purificados, lo que sugiere que la señal de encapsidación de PRRSV probablemente se localiza en la región de la ORF 1.

Los números de ARNm sg en células infectadas con PRRSV varían entre aislados de PRRSV con diferente virulencia. En el Experimento 1 anterior se demostró que una especie adicional de ARNm sg en algunos aislados de PRRSV procedía de la secuencia cadena arriba de la ORF 4, y se ha denominado ARNm sg 4-1.

Las secuencias de unión líder-ARNm de los ARNm sg 3 y 4 de los aislados VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894), así como los ARNm sg 4-1 del aislado VR 2474 (ISU 79), contienen un motivo común de secuencia de seis nucleótidos T(G)TA(G/C)ACC. El análisis de la secuencia del ARN genómico de estos dos aislados estadounidenses y la comparación con el virus Lelystad (LV) reveló heterogeneidad de las secuencias de unión líder-ARNm entre aislados de PRRSV. Los números, localizaciones y las secuencias de las regiones de unión líder-ARNm variaban entre los aislados estadounidenses y LV, así como entre los aislados estadounidenses. Los tres últimos nucleótidos, ACC, de las secuencias de unión líder-ARNm son invariables. Se encontraron variaciones en los tres primeros nucleótidos.

Comparando la secuencia 5' terminal del ARNm sg 4-1 con la secuencia genómica de VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894), se descubrió que una sustitución de un solo nucleótido, de T en VR 2475 (ISU 1894) a C en VR 2474 (ISU 79), conducía a una nueva secuencia de unión líder-ARNm en ISU 79 y, por lo tanto, a una especie adicional de ARNm sg (ARNm sg 4-1). En el extremo 5' del ARNm sg 4-1 se identificó una pequeña ORF, denominada ORF 4-1, con una capacidad de codificación de 45 aminoácidos.

30 Materiales y métodos

Virus y células. Los aislados de PRRSV usados (VR 2429 (ISU 22), VR 2430 (ISU 55), VR 2474 (ISU 79), VR 2475 (ISU 1894) y VR 2431 (ISU 3927) se aislaron a partir de pulmones de cerdo obtenidos de diferentes granjas en Iowa, para el aislamiento y crecimiento (cultivo) de los virus se usó una línea celular continua, ATCC CRL 11171. Estos aislados de PRRSV se clonaron biológicamente por tres vueltas de purificación en placa y se cultivaron en las células CRL 11171. Todos los aislados de virus usados en este estudio estaban en el séptimo pase.

VR 2429 (ISU 22) y VR 2474 (ISU 79) son muy patógenos y producen una consolidación de 50 a 80% de los tejidos pulmonares en cerdos privados de calostro, nacidos por cesárea, de cinco semanas de edad, infectados experimentalmente, de los que se realizaron necropsias a los 10 días después de la inoculación. Por el contrario, VR 2430 (ISU 55), VR 2475 (ISU 1894) y VR 2431 (ISU 3927) tienen baja patogenicidad y producen sólo una consolidación de 10 a 25% de tejidos pulmonares en el mismo experimento (Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435).

Preparación de ARN intracelulares totales con especificidad de virus, ARN poli (A) y ARN de viriones.* Se infectaron monocapas confluentes de células CRL 11171 con diferentes aislados de PRRSV al séptimo pase a una multiplicidad de infección (m.d.i.) de 0,1. Se aislaron ARN intracelulares totales con especificidad para PRRSV a partir de las células infectadas con PRRSV por un método convencional con isotiocianato de guanidinio (Stratagene). El ARN poli (A)* se enriqueció a partir de los ARN intracelulares totales por cromatografía en columna de oligo (dT)-celulosa (Invitrogen).

Para el aislamiento del ARN de los viriones de PRRSV, se infectaron células CRL 11171 confluentes con el aislado VR 2431 (ISU 3927) de PRRSV a una m.d.i. de 0,1. Cuando más de 70% de las células infectadas mostraron un efecto citopático, los cultivos se congelaron y descongelaron tres veces, y el medio de cultivo se clarificó a 1200 x g durante 20 min a 4°C. El virus después se precipitó con polietilenglicol y posteriormente se purificó por centrifugación en gradiente de cloruro de cesio como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/131.625. El virus purificado se trató con RNasa A a una concentración final de 20 µ/ml durante 90 min a 37°C. Después, el virus se sedimentó y el ARN de los viriones se aisló usando un método convencional con isotiocianato de guanidinio.

Síntesis de ADNc y reacción en cadena de la polimerasa. Se sintetizó ADNc a partir de ARN intracelulares totales por transcripción inversa usando cebadores aleatorios y se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) como se ha descrito previamente (Meng *et al.*, 1993, J. Vet. Diagn. Invest., 5: 254-258).

Análisis de transferencia de Northern. Se usaron diez µg de ARN intracelulares totales procedentes de células infectadas con virus y células infectadas de forma simulada por calle en un gel de formaldehído-agarosa. Para la separación del ARN poli (A)* y el ARN de viriones, se cargaron quince ng de ARN de virión y 0,2 µg de ARN poli (A)* por calle. El ARN se desnaturalizó con formaldehído de acuerdo con un método convencional (Sambrook *et al.*,

“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York). La separación electroforética del ARN, la transferencia del ARN y la hibridación se realizaron como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/131.625. En algunos experimentos, también se utilizaron geles de agarosa con glioxal-DMSO como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/131.625.

Para la preparación de las sondas, se generó un fragmento de ADNc específico de cada una de las ORF 1b a 7 por RT-PCR con cebadores con especificidad de ORF. Los cebadores se diseñaron de tal forma que cada par de cebadores amplificara sólo un fragmento específico de una ORF dada, y las ORF vecinas solapantes no se incluyen en ninguna sonda de ADNc dada. Los pares de cebadores para generar sondas de ADNc que representan las ORF 1b a 7 son IM729/IM732 para la ORF 1b, IM312/IM313 para la ORF 2, XM1022/IM258 para la ORF 3, XM1024/XMI023 para la ORF 4, PP287/PP286 para la ORF 5, PP289/XM780 para la ORF 6 y PP285/PP284 para la ORF 7 (Tabla 3).

Clonación, secuenciación y análisis de la secuencia de nucleótidos. Se diseñaron cebadores para RT-PCR basándose en secuencias del aislado de PRRSV VR 2385, que amplificaron las regiones codificantes de proteína entera de las ORF 2 a 5 de los aislados de PRRSV VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894). Se usaron los cebadores JM259 y JM260 para la amplificación de las ORF 4 y 5, y se usaron los cebadores XM992 y XM993 para la amplificación de las ORF 2 y 3 (Tabla 3). Se introdujeron sitios de restricción únicos (EcoRI y BamHI) en los extremos de los productos de la PCR, permitiendo de esta manera una estrategia de casete para reemplazar estas ORF.

Cada uno de los productos de PCR de las ORF 2-3 y ORF 4-5 de VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894) se dirigió con EcoRI y BamHI, y después se purificó y clonó en el vector pSK+ como se ha descrito previamente (Meng et al., 1993, J. Vet. Diagn. Invest., 5, 254-258). Los plásmidos que contenían insertos virales se secuenciaron con un secuenciador de ADN automático convencional (Applied Biosystems, Inc.). Al menos tres clones de ADNc que representaban la secuencia entera de las ORF 2 a 5 de cada aislado de virus se secuenciaron con cebadores universales e inversos, así como otros cebadores de secuenciación con especificidad de virus (XM969, XM970, XM1006, XM078 y XM077; véase la Tabla 3).

Para la determinar las secuencias de unión líder-ARNm de los ARNm sg 3, 4 y 4-1, se usó el par de cebadores IM755 y DP586 (Tabla 3) para RT-PCR para amplificar las secuencias 5' terminales correspondientes. Los productos de PCR resultantes se purificaron y secuenciaron por secuenciación de PCR directa usando cebadores específicos de virus XMD77 y XM141 (Tabla 3). Las secuencias se combinaron y se analizaron por los programas de software informáticos MacVector (International Biotechnologies, Inc.) y GeneWorks (IntelliGenetics, Inc.).

Oligonucleótidos. Los oligonucleótidos sintéticos usados en este estudio se resumen en la Tabla 3. Estos oligonucleótidos se sintetizaron como ADN monocatenario usando un sintetizador de ADN automático (Applied Biosystems) y se purificaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Resultados

Los ARNm sg no se empaquetan en viriones de PRRSV. Para determinar si los ARNm sg de PRRSV se empaquetan, se purificaron viriones del aislado de PRRSV VR 2431 (ISU 3927) por gradiente de CsCl. Los viriones purificados se trataron con RNasa A antes de sedimentar el virión y de extraer el ARN, para retirar cualquier especie de ARN que pueda haberse adherido a la superficie del virión. Se separaron ARN de viriones tratados con RNasa A junto con los ARN intracelulares totales del aislado VR 2431 (ISU 3927) de células infectadas con PRRSV en un gel de formaldehído y se hibridaron con una sonda generada a partir de la secuencia 3' terminal del genoma viral por PCR con cebadores PP284 y PP285 (Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/131.625; Tabla 3).

Sólo se detectó el ARN genómico en los viriones purificados del aislado de PRRSV VR 2431 (ISU 3927) (Fig. 4) y no se observaron cantidades detectables de ARNm sg en los viriones purificados incluso después de 3 semanas de exposición. Por el contrario, se detectaron siete especies de ARNm sg, además del ARN genómico, en las células infectadas con VR 2431 (ISU 3927) (Fig. 4). Se observaron resultados similares con otros dos aislados estadounidenses, VR 2430 (ISU 55) y VR 2474 (ISU 79).

Variación en los números de ARNm sg entre aislados de PRRSV estadounidenses con diferente virulencia. Se ha demostrado que todos los arterivirus conocidos antes de la presente invención, incluyendo el PRRSV estadounidense y el PRRSV europeo, producen seis ARNm sg, excepto tres variantes de LDV (LDV-P, LDV-a y LDV-v), que sintetizan siete ARNm sg. Sin embargo, en la cepa LDV-C se produce una serie anidada de seis ARNm sg.

Para comparar si hay cualquier variación en los ARNm sg entre los aislados de PRRSV estadounidenses, se infectaron monocapas confluentes de células CRL 11171 con cinco aislados diferentes de PRRSV estadounidense con diferente virulencia a una m.d.i. de 0,1. Se aislaron ARN intracelulares totales a partir de las células infectadas con virus 24 h después de la infección. Se generó un fragmento de ADNc a partir del extremo 3' del genoma viral por PCR con los cebadores PP284 y PP285 (Tabla 3). El fragmento de ADNc se marcó con ³²P-dCTP por el método de extensión de cebador aleatorio, y se hibridó con los ARN intracelulares totales (separados en un gel de formaldehído).

Los análisis de los ARN demostraron que en las células infectadas con uno de los cinco aislados de PRRSV estadounidense con diferente virulencia estaba presente una serie anidada de seis o más ARNm sg (Fig. 5). Se obtuvieron

resultados similares cuando los ARN intracelulares totales se separaron en un gel de agarosa con glioxal-DMSO. Los aislados de PRRSV VR 2430 (ISU 55), VR 2474 (ISU 79) y VR 2431 (ISU 3927) produjeron siete ARNm sg fácilmente distinguibles, mientras que los aislados VR 2429 (ISU 22) y VR 2475 (ISU 1894) produjeron seis ARNm sg (Fig. 5). El aislado de PRRSV estadounidense VR 2385 también produce seis ARNm sg (Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/131.625). Se localizó una especie adicional de ARNm sg entre los ARNm sg 3 y 4, y se denominó ARNm sg 4-1. Los ARNm sg diferían poco, si diferían algo, en tamaño entre los cinco aislados de PRRSV (Fig. 5). Sin embargo, no parece haber correlación entre la neumovirulencia y el número de ARNm sg observados en estos cinco aislados.

El ARNm sg 4-1 no es un ARN interferente defectuoso y no es resultado de la unión no específica de las sondas a ARN ribosómicos. Se ha demostrado que, en coronavirus, se generaba una diversidad de ARN interferentes defectuosos (ARN ID) de diferentes tamaños cuando MHV se sometía a pases seriados en cultivos de tejidos a una alta m.d.i. También se observaban ARN ID en células infectadas con torovirus durante el pase no diluido. Por lo tanto, se investigó la posibilidad de que el ARNm sg 4-1 de PRRSV fuera un ARN ID.

Para excluir esta posibilidad, la solución madre de virus original del aislado de PRRSV VR 2474 (ISU 79), que produce la especie adicional de ARNm sg 4-1, se sometió a cuatro pases en células CRL 11171 a diferentes m.d.i. de 0,1, 0,01 y 0,001, respectivamente. En un experimento de control, se realizaron cuatro pases no diluidos de la solución madre de virus original de VR 2474 (ISU 79). Después de cuatro pases, se aislaron los ARN intracelulares totales a partir de células infectadas con el virus y se repitió el análisis de transferencia de Northern con la misma sonda generada a partir del extremo 3' del genoma viral.

Los análisis de los ARNm sg demostraron que la especie adicional de ARNm sg 4-1 aún estaba presente en todas las preparaciones de ARN con diferente m.d.i., así como en preparaciones de ARN procedentes de pases no diluidos (Fig. 6A). Además, no hubo interferencia o reducción en la síntesis de otros ARNm sg en presencia del ARNm sg 4-1, como normalmente ocurre con el ARN ID.

Se ha demostrado que los ARN ID de MHV desaparecían después de dos pases de alta dilución. Por lo tanto, si la solución madre de virus original de VR 2474 (ISU 79) contenía ARN ID, entonces el ARN ID desaparecía después de cuatro pases de alta dilución. Los datos experimentales anteriores sugieren que, a diferencia del ARN ID, la replicación del ARNm sg 4-1 es independiente de la cantidad de virus convencional. De esta manera, el ARNm sg 4-1 no es un ARN ID.

En el análisis de transferencia de Northern de los ARN intracelulares totales, las sondas pueden unirse de manera no específica a los ARN ribosómicos 18S y 28S, que son abundantes en las preparaciones de ARN citoplásmico total. Como alternativa, los ARN ribosómicos abundantes pueden producir retraso de los ARNm sg con especificidad de virus que pueden co-migrar de manera ondulada con los ARN ribosómicos en el gel.

Se han observado dos bandas adicionales debidas a la unión no específica de sondas a los ARN ribosómicos en células infectadas con LV y en células infectadas con LDV. Por lo tanto, es posible que el ARNm sg 4-1 de PRRSV se deba a la unión no específica de sondas a los ARN ribosómicos.

Para descartar esta posibilidad, se aisló ARN poliadenilado a partir de ARN intracelulares totales de células CRL 11171 infectadas con cualquiera de dos aislados de PRRSV, VR 2430 (ISU 55) y VR 2474 (ISU 79). Tanto VR 2430 (ISU 55) como VR 2474 (ISU 79) producen la especie adicional de ARNm sg 4-1 (Fig. 5). El análisis de transferencia de Northern del ARN poliadenilado demostró que aún estaba presente la especie adicional de ARNm sg 4-1 en células infectadas con cualquiera de estos dos aislados (Fig. 6B), indicando que el ARNm sg 4-1 no se debe a la unión no específica de una sonda a los ARN ribosómicos.

Los ARNm sg representan una serie anidada 3'-coterminal y el ARNm sg 4-1 procede de la secuencia cadena arriba de la ORF 4. En células infectadas con VR 2385 se detectan seis ARNm sg, además del ARN genómico, usando una sonda de ADNc del extremo 3' del genoma viral (Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/131.625). De esta manera, al igual que el virus Berne (BEV), LDV, EAV, los coronavirus y LV, la replicación de PRRSV estadounidense también requiere la síntesis de una serie anidada 3'-coterminal de ARNm sg (Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435).

Para analizar estos ARNm sg con más detalle, se amplificaron por PCR siete fragmentos de ADNc específicos para cada una de las ORF 1b a 7. El diseño de los cebadores para la PCR se basó en la secuencia de VR 2385. Las secuencias y localizaciones de los cebadores, IM729 e IM782 para la ORF 1b, IM312 e IM313 para la ORF 2, XM1022 e IM258 para la ORF 3, XM1024 y XM1023 para la ORF 4, PP286 y PP287 para la ORF 5, PP289 y XM780 para la ORF 6 y PP284 y PP285 para la ORF 7 y la región 3' no codificante (NCR), se muestran en la Tabla 3. Los cebadores se diseñaron de tal forma que cada serie de cebadores sólo amplificara un fragmento de una ORF particular, y las secuencias solapantes entre ORF vecinas no se incluyen en ningún fragmento dado. Por lo tanto, cada uno de estos siete fragmentos de ADN representa sólo una ORF particular con la excepción del fragmento 7, que representa tanto la ORF 7 como 3'-NCR.

Estos siete fragmentos de ADN se marcaron con ³²P-dCTP e hibridaron con transferencias de Northern de ARN intracelulares totales extraídos de células infectadas con cualquiera de dos aislados estadounidenses de PRRSV, VR

2475 (ISU 1894) y VR 2474 (ISU 79). Como control se incluyeron los ARN intracelulares totales aislados a partir de células CRL 11171 infectadas de forma simulada.

Los análisis de transferencia de Northern demostraron que la Sonda 1, generada a partir de la ORF 1b, hibridaba sólo con el ARN genómico. Las Sondas 2 a 7 hibridaban cada una con una o más especies de ARN adicionales además del ARN genómico (Fig. 7). Los resultados indican que se forma una serie anidada 3'-coterminal de seis ARNm sg de VR 2475 (ISU 1894) o más ARNm sg de VR 2474 (ISU 79) en las células infectadas con PRRSV (Figs. 7A y 7B), codificando el ARN 3'-terminal más pequeño (ARNm sg 7) la ORF 7. Todos los ARNm sg del PRRSV estadounidense contienen el extremo 3' del ARN genómico, pero se extienden varias distancias hacia el extremo 5' del genoma, dependiendo del tamaño del ARNm sg dado.

El ARNm sg 4-1 del aislado de PRRSV VR 2474 (ISU 79) hibridaba con las sondas 4 a 7, pero no con las sondas 1, 2 y 3 (Fig. 7B), lo que sugiere que el ARNm sg 4-1 contiene las ORF 4 a 7, así como el 3'-NCR. Por lo tanto, el ARNm sg 4-1 se genera a partir de la secuencia cadena arriba de la ORF 4.

Una sustitución de un solo nucleótido conduce a la adquisición de la especie adicional del ARNm sg 4-1. Los datos de hibridación de transferencia de Northern demostraron que el ARNm sg 4-1 procede de la secuencia cadena arriba de la ORF 4 (Fig. 7B). Para determinar la localización exacta y la secuencia de unión líder-ARNm del ARNm sg 4-1, se diseñó una serie de cebadores, IM755 y DP586 (Tabla 3). El cebador directo IM755 se basó en el extremo 3' de la secuencia líder de VR 2385, y el cebador inverso DP586 se localiza en la ORF 4 (Tabla 3).

La RT-PCR con los cebadores IM755 y DP586 se realizó usando ARN intracelulares totales aislados a partir de células infectadas con VR 2475 (ISU 1894) o VR 2474 (ISU 79). VR 2474 (ISU 79) produce ARNm sg 4-1, pero VR 2475 (ISU 1894) no (Fig. 5). Se aplicó un tiempo de extensión de PCR de 30 segundos para amplificar preferentemente los fragmentos cortos que representaban las secuencias 5' terminales de los ARNm sg 3, 4 y 4-1.

El análisis de los productos de RT-PCR demostró que dos fragmentos con tamaños de aproximadamente 1,1 kb y 0,45 kb se amplificaban a partir de los ARN totales de las células infectadas con virus VR 2475 (ISU 1894) (Fig. 8A). Estos dos fragmentos representan partes 5' de los ARNm sg 3 y 4, respectivamente. Además de los dos fragmentos observados en el aislado VR 2475 (ISU 1894), también se amplificó un tercer fragmento de aproximadamente 0,6 kb que representaba la parte 5' del ARNm sg 4-1 a partir de los ARN totales de células infectadas con VR 2474 (ISU 79) (Fig. 8A).

Para determinar las secuencias de unión líder-ARNm de los ARNm sg 3, 4 y 4-1, los productos de RT-PCR de VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894) se purificaron a partir de un gel de agarosa usando un kit GENECLEAN (Bio 101, Inc.) y se secuenciaron directamente con un Secuenciador de ADN automático (Applied Biosystems). Los cebadores usados para secuenciar el extremo 5' de los productos de RT-PCR (XM141 y XM077, Tabla 3) se diseñaron basándose en las secuencias genómicas de VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894) (Fig. 9). Las secuencias de unión líder-ARNm (en las que el líder une el cuerpo del ARNm durante la síntesis de los ARNm sg) de los ARNm sg 3, 4 y 4-1 de los dos aislados de PRRSV estadounidense se determinaron comparando las secuencias del extremo 5' de los ARNm sg y el ARN genómico de los dos aislados (Fig. 8B).

Las secuencias de unión líder-ARNm de los ARNm sg 3 y 4 de VR 2475 (ISU 1894) y VR 2474 (ISU 79) eran idénticas. Para el ARNm sg 3, la secuencia de unión líder (GUAACC) se localiza 89 nucleótidos cadena arriba de la ORF 3. Para el ARNm sg 4, UUCACC se localiza 10 nucleótidos cadena arriba de la ORF 4 (Fig. 8B y Fig. 9). La secuencia de unión líder-ARNm del ARNm sg 4-1 de VR 2474 (ISU 79) es UUGACC, localizada 236 nucleótidos cadena arriba de la ORF 4 (Figs. 8B y 9).

El alineamiento de las secuencias genómicas de VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894) demuestra que la sustitución de un solo nucleótido, de T en VR 2475 (ISU 1894) a C en VR 2474 (ISU 79), conduce a la adquisición de una secuencia de unión líder-ARNm adicional, UUGACC, en VR 2474 (ISU 79) (Figs. 8B y 9). Por lo tanto, se forma una especie más de ARNm sg (4-1) (Fig. 5). Además de las ORF 4 a 7 contenidas dentro del ARNm sg 4, el ARNm sg 4-1 contiene en el extremo 5' una ORF pequeña adicional (ORF 4-1) con una capacidad codificante de 45 aminoácidos (Fig. 9). Esta pequeña ORF se detiene justo un nucleótido antes del codón de iniciación de la ORF 4.

El análisis de secuencias de las ORF 2 a 7 de dos aislados estadounidenses revela heterogeneidad de las secuencias de unión líder-ARNm. Se clonaron y secuenciaron las ORF 2 a 5 de VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894) (véase el Experimento 1 anterior). VR 2474 (ISU 79) produce siete ARNm sg fácilmente distinguibles, mientras que VR 2475 (ISU 1894) produce seis ARNm sg distinguibles (Figs. 5 y 7). Se secuenciaron al menos tres clones de ADNc en cualquier región dada de las ORF 2 a 5 para cada aislado de virus, usando cebadores universales e inversos, así como cebadores con especificidad de virus XM969, XM970, XM1006, XM078 y XM077 (Tabla 3). En la Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435 se describen las secuencias de las ORF 6 y 7 de VR 2475 (ISU 1894) y VR 2474 (ISU 79).

El análisis de la secuencia demostró que las ORF 2 a 7 de VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894) solapan entre sí, con la excepción de una región no codificante de 10 nucleótidos entre la ORF 4 y la ORF 5. La misma observación se hizo previamente para VR 2385 (Solicitud de Patente de Estados Unidos con el N° de Serie 08/301.435). Esto es muy poco habitual, ya que todos los miembros de la familia *Arteriviridae* propuestos, incluyendo LV, contienen ORF

solapantes. Sin embargo, las ORF de coronavirus se separan por secuencias no codificantes intergénicas. Por lo tanto, el PRRSV estadounidense parece ser algo similar a los coronavirus en términos de la organización genómica en las regiones de unión de las ORF 4 y 5.

La ORF 2 de VR 2475 (ISU 1894) tenía un aminoácido más que la de ISU 79 (Fig. 9). El codón de terminación de la ORF 2, TAG, se cambió por TGG en VR 2475 (ISU 1894) inmediatamente seguido de un nuevo codón de terminación TAG en VR 2475 (ISU 1894) (Fig. 9). Los tamaños de otras ORF de VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894) eran idénticos (Fig. 9). No hubo delecciones o inserciones en las ORF 2 a 7 de estos aislados. Sin embargo, están presentes numerosas sustituciones a lo largo de toda la secuencia de las ORF 2 a 7 entre VR 2474 (ISU 79) y VR 2475 (ISU 1894) (Fig. 9).

Los números y localizaciones de las secuencias de unión líder-ARNm determinadas o previstas variaban entre VR 2475 (ISU 1894) y VR 2474 (ISU 79) (Fig. 9). Además de la secuencia de unión líder-ARNm 4 regular, TTCACC, 10 nucleótidos cadena arriba de la ORF 4, había una secuencia de unión líder-ARNm 4-1 adicional (TTGACC) localizada 236 nucleótidos cadena arriba de la ORF 4 en VR 2474 (ISU 79) (Fig. 9). Las secuencias de unión líder-ARNm de los ARNm sg 4 y 4-1 estaban separadas por 226 nucleótidos, lo cual se correlaciona con los tamaños estimados de los ARNm sg 4 y 4-1 observados en el análisis de transferencia de Northern (Fig. 5) y amplificación por RT-PCR (Fig. 8A).

La secuencia de unión líder-ARNm 3 es idéntica entre VR 2475 (ISU 1894) y VR 2474 (ISU 79) GTAACC, localizada 89 nucleótidos cadena arriba de la ORF 3. Las secuencias de unión líder-ARNm previstas de los ARNm sg 2 y 6 de VR 2475 (ISU 1894) y VR 2474 (ISU 79) también eran iguales (Fig. 9).

Sin embargo, las secuencias de unión líder-ARNm 5 previstas de VR 2475 (ISU 1894) y VR 2474 (ISU 79) son diferentes (Fig. 9). Hay 3 posibles secuencias de unión líder-ARNm 5 para VR 2474 (ISU 79) (GCAACC, GAGACC y TCGACC, localizadas 55, 70 y 105 nucleótidos cadena arriba de la ORF 5, respectivamente). También se encontraron dos secuencias de unión líder-ARNm 5 potenciales en VR 2475 (ISU 1894) (GAAACC y TCGACC, localizadas 70 y 105 nucleótidos cadena arriba de la ORF 5, respectivamente) (Fig. 9). Las diferencias se debían a las sustituciones de dos nucleótidos en las secuencias de unión líder-ARNm 5 previstas de estos aislados (Fig. 9).

Además de la secuencia de unión líder-ARNm 7 15 nucleótidos cadena arriba de la ORF 7, se encontró una secuencia de unión líder-ARNm 7 adicional (ATAACC), localizada 129 nucleótidos cadena arriba de la ORF 7 en cada uno de estos dos aislados (Fig. 9). Sin embargo, el ARNm sg correspondiente a esta secuencia de unión líder-ARNm 7 adicional no se distinguía claramente del ARNm sg 7 abundante que producía una banda muy difusa en la transferencia de Northern (Figs. 5, 6 y 7).

También se encontraron variaciones en los números y localizaciones de las secuencias de unión líder-ARNm entre LV y los dos aislados estadounidenses analizados en este experimento comparando las secuencias de unión líder-ARNm de LV con las de los dos aislados estadounidenses VR 2475 (ISU 1894) y VR 2474 (ISU 79). Considerados conjuntamente, estos datos indican que los ARNm sg de PRRSV son polimórficos y los números y los tamaños exactos de los ARNm sg dependen del aislado de PRRSV particular analizado. Sin embargo, una serie anidada de seis ARNm sg refleja con mayor probabilidad la organización y transcripción del genoma de arterivirus convencional.

TABLA 3

Oligonucleótidos sintéticos usados en el Experimento 2

Nombre Oligo	Secuencia	Localización (nucleótidos) ^a	Polaridad ^b
IN729	5'-GACTGATGGTCTGGAAAG-3'	ORF1b, -507 a -490 cadena arriba de ORF2	+
IN782	5'-CTGTATCCGATTCAAACC-3'	ORF1b, -180 a -163 cadena arriba de ORF2	-
IN312	5'-AGGTTGGCTGGTGGTCTT-3'	ORF2, 131 a 148 cadena abajo de ORF2	+
IN313	5'-TCGGTCACTACCTGTTTC-3'	ORF2, 381 a 398 cadena abajo de ORF2	-
XM1022	5'-TGTGCCCCGCTTGCCTCA-3'	ORF3, 168 a 175 cadena abajo de ORF3	+
IN268	5'-AAACCAATTGCCCCCGTC-3'	ORF3, 520 a 537 cadena abajo de ORF3	-
XM1024	5'-TATATCACTGTACAGCC-3'	ORF4, 232 a 249 cadena abajo de ORF4	+
XM1023	5'-CAAATTGCCAACAGAATG-3'	ORF4, 519 a 536 cadena abajo de ORF4	-
PP287	5'-CAACTTGACGCTATGTGAGC-3'	ORF5, 129 a 148 cadena abajo de ORF5	+
PP286	5'-GCCGCGGAACCATCAAGCAC-3'	ORF5, 538 a 667 cadena abajo de ORF5	-

ES 2 326 703 T3

5	PP289	5'-GACTGCTAGGGCTTCTGCAC-3'	ORF6, 119 a 138 cadena abajo de ORF6	+
	XM780	5'-CGTTGACCGTAGTGGAGC-3'	ORF6, 416 a 433 cadena abajo de ORF6	-
	PP283	5'-CCCCATTTCCCTCTAGCGACTG-3'	ORF7, 137 a 178 cadena abajo de ORF7	+
	PP284	5'-CGGCCGTGTGGTTCTCGCCAAT-3'	3' NCR, -27 a -6 cadena arriba de poli (A)	-
	JM260	5'-GGGGAATTCGGGATAGGGAATGTG-3'	ORF3, 338 a 356 cadena abajo de ORF3	+
	JM259	5'-GGGGATCCTTTTGTGGAGCCGT-3'	ORF6, 34 a 52 cadena abajo de ORF	-
10	XM993	5'-GGTGAATTCGTTTTATTTCCCTCCGGGC-3'	ORF1b, -53 a -35 cadena arriba de ORF2	+
	XM992	5'-GGGGGATCCTGTTGTAATAG/AGTCTG-3'	ORF3, -50 a -34 cadena arriba de ORF4	-
	XM970	5'-GGTTTCACCTAGAATGGC-3'	ORF2, 522 a 550 cadena abajo de ORF2	+
15	XM969	5'-GATAGAGTCTGCCCTTAG-3'	ORF3, 443 a 460 cadena abajo de ORF6	-
	XM1006	5'-GCTTCTGAGATGAGTGA-3'	ORF4, 316 a 332 cadena abajo de ORF4	+
	XM078	5'-CTGAGCAATTACAGAAG-3'	ORF2, 202 a 218 cadena abajo de ORF2	+
	XM077	5'-CAACCAGGGGTAAACACT-3'	ORF3, 316 a 333 cadena abajo de ORF3	-
20	IN755	5'-GACTGCTTTACGGTCTCTC-3'	Líder, 3' final de la secuencia líder	+
	DP586	5'-GATGCCTGACACATTGCC-3'	ORF4, 335 a 372 cadena abajo de ORF4	-
	XM141	5'-CTGCAAGACTCGAACTGAA-3'	ORF4, 78 a 97 cadena abajo de ORF4	-

- a. Los oligonucleótidos se diseñaron basándose en los datos de secuencia presentados en esta solicitud y en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos con los N° de Serie 08/131.625 y 08/301.435.
- b. Los oligonucleótidos complementarios al ARN genómico tienen polaridades negativas (-).

REIVINDICACIONES

1. Una preparación purificada que comprende un ácido polinucleico que codifica al menos un polipéptido seleccionado entre:

una proteína con la secuencia de ISU55 mostrada en la Fig. 2A, codificada por la ORF 2 del aislado de PRRSV depositado en la ATCC con el N° de Acceso VR 2430;

una proteína con la secuencia de ISU55 mostrada en la Fig. 2B, codificada por la ORF 3 de VR 2430;

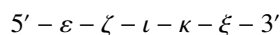
una proteína con la secuencia de ISU55 mostrada en la Fig. 2C, codificada por la ORF 4 de VR 2430;

una proteína con la secuencia de ISU55 mostrada en la Fig. 2D, codificada por la ORF 5 de VR 2430,

donde la preparación purificada no es el virus VR 2430 natural.

2. La preparación purificada de la reivindicación 1, donde dicho ácido polinucleico codifica una proteína con la secuencia de ISU55 mostrada en la Fig. 2D, codificada por la ORF 5 de VR 2430.

3. Una preparación purificada que comprende un ácido polinucleico que tiene la fórmula (V):



en la que

κ , es un polinucleótido que comprende genes que codifican dicho al menos un polipéptido y opcionalmente uno o más genes unidos operativamente al mismo que se seleccionan entre el grupo consistente en (a) un marcador o gen indicador convencional, (b) genes que codifican al menos un polipéptido o fragmento antigénico del mismo, codificado por una ORF 5 de una cepa Iowa de PRRSV; y (c) genes que codifican al menos un polipéptido, o un fragmento antigénico del mismo, codificado por una ORF 6 u ORF 7 de una cepa Iowa de PRRSV;

ε que está presente opcionalmente, es una secuencia polinucleotídica 5' terminal que proporciona un medio para expresar operativamente el polinucleótido κ ;

ζ es un polinucleótido de la fórmula KTV ACC, donde K es T, G o U, y V es A, G o C;

ι es un polinucleótido de aproximadamente 130 nucleótidos de longitud como máximo;

y ξ que está presente opcionalmente y que puede estar unido operativamente a ε , es una secuencia polinucleotídica 3' terminal que no reprime la expresión operativa del polinucleótido κ ,

ES 2 326 703 T3

donde el ácido polinucleico no consiste en la secuencia

5	GGCAGGCTTT GCTGTCTCC AAGACATCAG TTGCCTTAGG CATCGCAACT CGGCCTCTGA	60
	GGCGATTGCG AAAGTCCCTC AGTGCCGCAC GGCGATAGGG ACACCGGTGT ATATCACTGT	120
	CACAGCCAAT GTTACCGATG AGAATTATTT GCATTCTCTT GATCTTCTCA TGCTTTCTTC	180
	TTGCCCTTTT TATGCTTCTG AGATGAGTGA AAAGGGATTT AAGGTGGTAT TTGGCAATGT	240
10	GTGAGGCATC GTGGCAGTGT GCGTCAACTT CACCAGTTAC GTCCAACATG TCAAGGAATT	300
	TACCCAACGT TCCTTGGTAG TTGACCATGT GCGGCTGCTC CATTTCATGA CGCCCGAGAC	360
	CATGAGGTGG GCAACTGTTT TAGCCTGTCT TTTTGGCATT CTGTTGGCAA TTTGAATGTT	420
15	TAAGTATGTT GGGGAAATGC TTGACCGCGG GCTGTTGCTC GCAATTGCTT TTTTGTGGT	480
	GTATCGTGCC GTCTTGTTTT GTTGCGCTCG TCAGCGCCAA CGGGAACAGC GGCTCAAATT	540
	TACAGCTGAT TTCAAACTTG ACGCTATGTG AGCTGAATGG CACAGATTGG CTAGCTAATA	600
	AATTTGACTG GGCAGTGGAG TGTTTTGTCA TTTTTCCTGT GTTGACTCAC ATTGTCTCTT	660
20	ATGGTGCCCT CACTACTAGC CATTTCCTTG ACACAGTCGG TCTGGTCACT GTGTCTACCG	720
	CTGGGTTTGT TCACGGGCGG TATGTTCTGA GTAGCATGTA CGCGTCTGT GCCCTGGCTG	780
	CGTTGATTTG CTTCGTCAAT AGGCTTGCGA AGAATTGCAT GTCCTGGCGC TACTCATGTA	840
25	CCAGATATAC CAACTTTCTT CTGGACACTA AGGGCAGACT CTATCGTTGG CGGTGCGCTG	900
	TCATCATAGA GAAAAGGGGC AAAGTTGAGG TCGAAGGTCA CCTGATCGAC CTCAAAAGAG	960
	TTGTGCTTGA TGGTCCCGG GCTACCCCTG TAACCAGAGT TTCAGCGGAA CAATGGAGTC	1020
	GTCCTTAGAT GACTTCTGTC ATGATAGCAC GGCTCCACAA AAGGTGCTCT TGGCGTTTTT	1080
30	TATTACCTAC ACGCCAGTGA TGATATATGE CCTAAAGGTG AGTCGCGGCC GACTGCTAGG	1140
	GCTTCTGCAC CTTTGTGCTT TCCTGAATTG TGCTTTCACC TTCGGGTACA TGACATTGCT	1200
	GCACTTTTCAG AGTACAAATA AGGTGCGGCT CACTATGGGA GCAGTAGTTG CACTCCTTTG	1260
35	GGGGGTGTAC TCAGCCATAG AAACCTGGAA ATTCAATCACC TCCAGATGCC GTTTGTGCTT	1320
	GCTAGGCCCG AAGTACATTG TGGCCCTGTC CCACCACGTT GAAAGTGCCG CAGGCTTTCA	1380
	TCCGATTGCG GCAAAATGATA ACCAOCGATT TGTCGTCCGG CGTCCCGGCT CCACTACGGT	1440
40	CAACGGCACA TTGGTGCCCG GGTAAAAAAG CCTCGTGTG GGTGGCAGAA AAGCTGTTAA	1500
	ACAGGGAGTG GTAAACCTTG TTAAATATGC CAAATAACAC CGGCAAGCAG CAGAAGAGAA	1560
	AGAAGGGGGA TGGCCAGCCA GTCAATCAGC TGTGCCAGAT GCTGGGTAAG ATCATCGCTC	1620
	ACCAAAACCA GTCCAGAGGC AAGGGACCGG GAAAGAAAAA TAAGAAAGAA AACCCGAGAA	1680
45	AGCCCCATTT CCCTCTAGCG ACTGAAGATG ATGTCAGACA TCACTTTACC CCTAGTGAGC	1740
	GTCAATTGTG TCTGTCTGTA ATCCAGACCG CTTTAAATCA AGGCGCTGGG ACTTGACCCC	1800
	TGTCAGATTG AGGGAGGATA AGTTACACTG TGGAGTTTAG TTTGCCTACG CATCATACTG	1860
50	TGCGCCTGAT CCGCGTCACA GCATCACCTT CAGCATGATG GGCTGGCATT CTTGAGGCAT	1920
	CCCAGTGTTT GAATTGGAAG AATGCGTGGT GAATGGCACT GATTGACATT GTGCCTCTAA	1980
	GTACACCTATT CAATTAGGGC GACCGTGTGG GGGTAAGATT TAATTGGCGA GAACCACAGC	2040
55	GCOGAAATTA AAAAAAAAAA AA	2062.

4. La preparación purificada de la reivindicación 1, donde dicho ácido polinucleico codifica al menos una región hipervariable de una proteína codificada por una ORF 5 de una cepa Iowa de PRRSV.

5. Un ácido polinucleico que codifica al menos un polipéptido que comprende al menos una región hipervariable de la ORF 5 de una cepa Iowa de PRRSV, seleccionado entre:

la región hipervariable 1: SNDSSSH, SSSNSSH, SANSSSH, HSNSSSH, SNSSSH, NNSSSH, NGGDS ST(Y);

la región hipervariable 2: ANKFDWAVET, ANKFDWAVEP, AGEFDWAVET, ADKFDWAVEP, ADRFD WAVEP, SSHFGWAVET; y

ES 2 326 703 T3

la región hipervariable 3: LTCFVIRFA, LICFVIRFT, LACFVIRFA, LTCFVIRFV, LCTFIIRFA, FICFVIRFA, FVCFVIRAA.

5 6. El ácido polinucleico de la reivindicación 5, donde el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos adicionales de una ORF 5 de PRRSV.

7. Un polipéptido purificado codificado por el ácido polinucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

10 8. Una vacuna que comprende (a) una cantidad eficaz del polipéptido de la reivindicación 7 para proteger a un cerdo contra el síndrome reproductivo y respiratorio porcino, y (b) un vehículo fisiológicamente aceptable.

15 9. Una vacuna que comprende (a) una cantidad eficaz del ácido polinucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para proteger a un cerdo contra el síndrome reproductivo y respiratorio porcino, y (b) un vehículo fisiológicamente aceptable.

10. Un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 7.

20 11. El anticuerpo de la reivindicación 10, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

12. Uso de un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en la preparación de un medicamento para tratar a un cerdo que padece el síndrome reproductivo y respiratorio porcino.

25 13. Un kit de diagnóstico para ensayar el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, que comprende el anticuerpo de la reivindicación 10 o la reivindicación 11 y un agente de diagnóstico que indica una reacción inmunológica positiva con dicho anticuerpo.

30 14. Un método para producir un polipéptido, que comprende expresar el ácido polinucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en un sistema de expresión operativo.

15. Un vector de expresión que contiene el ácido polinucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 bajo el control operativo de un promotor.

ES 2 326 703 T3

	+1>ORF2	
VR2385	CCTGTCATTGAACCAACTTTAGGCCTGAATTGAGATGAAATGGGGTCTATGCAAAGCCTT	60
ISU3927	...A.....G..T..AG.C...A...C.....C.....	60
ISU55	...A.....A.....	60
ISU22	A.....G.C.....	60
VR2332	A.....C.....	60
ISU1894	..C.....A.....CG.....	60
ISU79	A.....C.....	60
VR2385	TTTGACAAAATTGGCCAACTTTTGTGGATGCTTTCACGGAGTTCTTGGTGTCCATTGTT	120
ISU3927	G..C..T.....	120
ISU55	C.....	120
ISU22		120
VR2332		120
ISU1894		120
ISU79		120
VR2385	GATATCATTATATTTTGGCCATTTTGTGGCTTCACCATCGCAGGTTGGCTGGTGGTC	180
ISU2927	C.....T..C..C.....	180
ISU55	C.....	180
ISU22	C.....	180
VR2332	C.....	180
ISU1894	C.....C.....	180
ISU79	C.....C.....	180
VR2385	TTTTGCATCAGATTGGTTTGGCTCCGCGATACTCCGTGCGCGCCCTGCCATTCACTCTGAG	240
ISU3297	C.....	240
ISU55	C.....	240
ISU22		240
VR2332	A.....	240
ISU1894	A.....	240
ISU79	A.....	240
VR2385	CAATTACAGAAGATCCTATGAGGCCTTTCTCTCTCAGTGCCAGGTGGACATTCCCACCTG	300
ISU3297	T.....G....	300
ISU55	T.....	300
ISU22	T.....T..C.....A.....	300
VR2332	T.....T..C.....A.....	300
ISU1894	T.....T.A..C.....A.....	300
ISU79	T.....T..C.....A.....	300
VR2385	GGGAACATAACATCCTTTGGGGATGCTTTGGCACCATAAGGTGTCAACCCTGATTGATGA	360
ISU3927	A.G.....A.....C.....	360
ISU55	T.....T.....	360
ISU22	T.G.....	360
VR2332		360
ISU1894	T.....	360
ISU79	T.....	360

FIG. 1A

ES 2 326 703 T3

VR2385	AATGGTGTCCGCTCGAATGTACCGCATCATGGAAAAAGCAGGACAGGCTGCCTGGAACA	420
ISU3927		420
ISU55		420
ISU22	G.....	420
VR2332	G.....	420
ISU1894	C.....G.....	420
ISU79	G.....	420
VR2385	GGTAGTGAGCGAGGCTACGCTGTCTCGCATTAGTAGTTTGGATGTGGTGGCTCATTTTCA	480
ISU3927	...G...T.....G.....C.....	480
ISU55	...G.....C.....	480
ISU22	...G.....	480
VR2332	...G.....	480
ISU1894	...G.....C.....	480
ISU79	...G.....	480
VR2385	GCATCTTGCCGCCATTGAAGCCGAGACCTGTAAATATCTGGCCTCTCGGCTGCCCATGCT	540
ISU3927	...C.....T.....T.....T.....	540
ISU55	T.....	540
ISU22	T.....C.....	540
VR2332	...A.....T.....C.....	540
ISU1894	T.....T.....C.....	540
ISU79	C.....T.....C.....	540
-89 (ARNm3)		
VR2385	ACACCACCTGCGCATGACAGGGTCAAATGTAACCATAGTGATAATAGTACTTTGAATCA	600
ISU3927	...A.....T..T.....C.....	600
ISU55	...A.....	600
ISU22	...A.....	600
VR2332	...A.....C.....	600
ISU1894	...TA.....A.....C.G.G..	600
ISU79	...A.....G	600
+1>		
VR2385	GGTGTGTGCTGTTTTCCCAACCCCTGGTTCGGGCCAAAGCTTCATGATTTCAGCAATG	660
ISU3927	A.....C.....T.....C.....T.....	660
ISU55	...C...A.....T.....	660
ISU22	A.....T.....	660
VR2332	A..T.....T.....	660
ISU1894	A.....T.....	660
ISU79	A.....C..T.....	660
ORF3		
VR2385	GCTAATAGCTGTACATTCTCTATATTTCTCTGTTGCAGCTTCTTGTACTCTTTTGT	720
ISU3927	C...CC.....	720
ISU55		720
ISU22	.T.....C.....C.....	720
VR2332	.T.....C.....	720
ISU1894	.T.....C.....	720
ISU79	G.....C.....C.....	720

FIG. 1B

ES 2 326 703 T3

VR2385	TGTGCTGTGGTTGCGGGTTCCAATGCTACGTACTGTTTTGGTTTCCGCTGGTTAGGGGC	780
ISU3927	T.....A..A.G.....T.....	780
ISU55	T..C.....	780
VR2385		780
ISU22	A.....T.....	780
VR2332	A.....	780
ISU1894	C.....G	780
ISU79	A.....	780
**<ORF2		
VR2385	AATTTTCTTTCGAACTACGGTGAATTACACGGTGTGCCCGCCTTGCCCTACCCGGCAA	840
ISU3927	C....G....T.....A.....G	840
ISU55	A....C.....T..A.....	840
VR2385		840
ISU22	G.....T..A.....	840
VR2332	A.....T..A.....	840
ISU1894	C.....T.....T..A.....	840
ISU79	TA.....A.....	840

VR2385	GCAGCCGCAGAGGCTACGAACCCGGCAGGTCCCTTGGTGCAGGATAGGGCATGATCGA	900
ISU3927	C..AT.....AA.....T.....C..A.....	900
ISU55	A.....T.....T.....T.....C	900
ISU22	AT.....T.....T.....T.....C...	900
VR2332	A....AT.....T.....T.....T.....C...	900
ISU1894	T.....T.....T.....T.....C...	900
ISU79	T.....T.....T..C.....	900
-236 (ARNm4-1)		
VR2385	GGCCACTTGACCACTGCTTACGCCTGGTTGGCGTCCCTGCTCCTCAGCTATACGGCCAG	1020
ISU3927	.T..T.....T.....TT.....T..C.....	1020
ISU55	T.....T.....T.....T..C..A.....	1020
ISU22	T.....T.....TTT.....C.....	1020
VR2332	TG..T.....T.T.....C.....	1020
ISU1894	T.....T.....TTT.....C.....	1020
ISU79	T.....T.T.....C.....	1020
+1>ORF4-1		
VR2385	TTCCATCCCAGATATTCCGGATAGGGAATGTGAGTCGAGTCTATGTTGACATCAAGCAC	1080
ISU3927	..T.....A.....AAG.....T..T	1080
ISU55	T.....A..T.....G..T	1080
ISU22	C.....T.....A..T	1080
VR2332	T.....A..T	1080
ISU1894	T.....A..T	1080
ISU79	C.....T.....A..T	1080

FIG. 1C

VR2385	CAATTCATTTGCGCTGTTTCATGATGGGCAGAACACCACCTTGCCCCACCATGACAACATT	1140
ISU3927	...C.....T.....C.....T.G.....	1140
ISU55	C.....C.....G.....T.....T.G.....T.....	1140
ISU22	...C...C...C.AA...C...A.....T.GT.....	1140
VR2332	...C...C...C.AA...C.....T.GT.....	1140
ISU1894	...C.....C.AA...C..A.....G.....T.GT.....T.....	1140
ISU79	...C...C...C.AA...C.....T.GT.....	1140
-10 (ARNm4)		
VR2385	TCAGCCGTGCTTCAGACCTATTACCAGCATCAGGTCGACGGGGCAATTGGTTTCACCTA	1200
ISU3927	..T.....T.....A..C..A.....T..T...C.....	1200
ISU55	T.C.....T.....A...A.....C.....	1200
ISU22	T.....A...A.....T.....	1200
VR2332	T.....A...A.....C.....	1200
ISU1894	T.....A...A.....T..C.....	1200
ISU79	..G.....T.....A...A.....C.....	1200
+1>ORF4 **		
VR2385	GAATGGGTGCGTCCCTTCTTTCTCTTGGTTGGTTTAAATGTCTCTTGGTTTCTCAGG	1260
ISU3927	C.....G.....C.....	1260
ISU55	C.....	1260
ISU22	C.T.....A.....	1260
VR2332	C.T.....G.....	1260
ISU1894	C.T.....A.....A.....	1260
ISU79	C.....A.....	1260
*<ORF4-1		
VR2385	CGTTCGCTGCAAGCCATGTTTCAGTTCGAGTCTTTCAGACATCAAGACCAACACCACCG	1320
ISU3927	G.....T.....	1320
ISU55	A.....G...T..T.....	1320
ISU22	A.....G...T..T.....	1320
VR2332	A.....G...T..T.....	1320
ISU1894	A...C.....G...T..T.....T.....	1320
ISU79	A.....G...T.....	1320
***<ORF3		
VR2385	CTGAGGCGATTGCGAAAGTCCCTCAGTGCCGCACGGCGATAGGGACACCCGTGTATATCA	1440
ISU3927	T.....A.....	1440
ISU55	T.....A.....T..T.....A.....T.....	1440
ISU22	A.....T.....T.....	1440
VR2332	A.....T.....G.T.....	1440
ISU1894	A.....T.....T.....	1440
ISU79	A.....T.....TA.....T.....	1440

FIG. 1D

ES 2 326 703 T3

VR2385	CTGTCACAGCCAATGTTACCGATGAGAATTATTTGCATTCTCTGATCTTCTCATGCTTT	1500
ISU3927	..A.....A..A.....C.....T.....	1500
ISU55	..G.....A.....C.....	1500
ISU22	.CA.....G..A.....A...T.....C.....	1500
VR2332	.CA.....G..A.....A...T.....C.....	1500
ISU1894	.CA.....G..A.....A...T.....C.....	1500
ISU79	.CA.....G..A...A.....A...T.....C.....C.	1500
VR2385	CTTCTTGCCCTTTTCTATGCTTCTGAGATGAGTGAAAAGGGATTTAAGGTGGTATTTGGCA	1560
ISU3927	.C.....C.....G.....G.....	1560
ISU55	C.....A.....	1560
ISU22	G.....	1560
VR2332		1560
ISU1894	C.....A...C.....	1560
ISU79	G.....T.....	1560
VR2385	ATGTGTCAAGGCATCGTGGCAGTGTGCGTCAACTTCACCAAGTTACGTCCAACATGTCAAGG	1620
ISU3927	C.....T.....A...T..T...C..T.....C.....	1620
ISU55	T.....T...C.....	1620
ISU22	T...T...T..T...C..T.....G..	1620
VR2332	T...T...T..T...C.....	1620
ISU1894	T...T...T..T...C.....G..	1620
ISU79	T...T...T..T...C...T.....G..	1620
VR2385	AATTTACCCAACGTTCTTGGTAGTTGACCATGTGCGGCTGCTCCATTTATGACGCCCG	1680
ISU3927	.G.....C.....A..G..C.....A..T.	1680
ISU55	C.....C.....A..T.	1680
ISU22	.G.....C.....G..C.....T.....A..T.	1680
VR2332	.G.....C...C...G..C.....T.....A..T.	1680
ISU1894	.G.....C...C...G..C.....T.....A..T.	1680
ISU79	.G.....C.....A.G..C.....A..T.	1680
***<ORF4		
VR2385	AGACCATGAGGTGGGCAACTGTTTTAGCCTGTCTTTTACCATTCGTGTTGGCAATTTGAA	1740
ISU3927	.A..T.....CG.....	1740
ISU55	G.....C.....	1740
ISU22	G.....	1740
VR2332	G.....	1740
ISU1894	.A.....G.....C.....	1740
ISU79	C.....G.T.....	1740
+1>ORF5		
VR2385	TGTTTAAGTATGTTGGGGAAATGCTTGACCGCGGGCTGTTGCTCGCAATTGCTTTTTTTA	1800
ISU3927	G..C.....G	1800
ISU55	A.....TC.....G	1800
ISU22	C.....G.....C...G	1800
VR2332	A.....G.....C...G	1800
ISU1894	G.....C...G	1800
ISU79	T.....G.....C...G	1800

FIG. 1E

VR2385	TGGTGTATCGTGCCGTCTTGTTTTGTTGCGCTCGTCAGCGCCAACGGGAACAGCGGCTCA	1860
ISU3927	TC...C...C.....AAC.G...--..C	1860
ISU55	G.....C.....A.C.G..A.A...T	1860
ISU22	...T.....TC.....C..T....C.....G.AAC.G...A...C	1860
VR2332	TC.....C..T....C..A....G.AACG.....A...C	1860
ISU1894	TC.....C..T....C..A....G..CC.....A...C	1860
ISU79	TC.....AC..T....C.GA...C..A.C.....A...T	1860
VR2385	AATTTACAGCTGATTACAACCTGACGCTATGTGAGCTGAATGGCACAGATTGGCTAGCT	1920
ISU3927	C.....T.....T...C.....C....G...	1917
ISU55	C.....T.....T.....T.....	1920
ISU22	C..C.....	1920
VR2332	C..C.....	1920
ISU1894	C..C.....	1920
ISU79	C..C.G..AT.....	1920
VR2385	AATAAATTTGACTGGGCAGTGGAGTGTTTTGTCATTTTTCTGTGTTGACTCACATTGTC	1980
ISU3927	T.....A.....C...C.....T	1977
ISU55	GG.G.....	1980
ISU22	T.....A.....C...C..T.....	1980
VR2332	..C.....T.....A.....C...C..T.....	1980
ISU1894	G.....T.....A.....C...C..T.....	1980
ISU79	G...G.....T.....A.C.....C.....T.....	1980
VR2385	TCTTATGGTGCCCTCACTACTAGCCATTTCTTGACACAGTCGGTCTGGTCACTGTGTCT	2040
ISU3927	..C.....A....C..C.....T.....	2037
ISU55	..C.....C..C.....	2040
ISU22	..C.....C.....C.T.A.....	2040
VR2332	..C.....C.....C.T.A.....	2040
ISU1894	..C.....C.....CCT.A.....	2040
ISU79	..C....C.....C..C.....A.T.C.T.A.....	2040
VR2385	ACCGCTGGGTTTGTTACGGGCGGTATGTTCTGAGTAGCATGTACGCGGTCTGTGCCCTG	2100
ISU3927	C.....CA.....C.....	2097
ISU55	C..C...TCC.....C.....	2100
ISU22	C.....C.....C.....	2100
VR2332	C.....C..A....C.....	2100
ISU1894	C.....C..A....C.....	2100
ISU79	C.....C..A....C.....	2100
VR2385	GCTGCGTTGATTGCTTCGTCATTAGGCTTGCGAAGAATTGCATGTCCTGGCGCTACTCA	2160
ISU3927	T.....T.....C.....T	2157
ISU55	T..A.....	2160
ISU22	C.....A...C..T...A.....G	2160
VR2332	C.....T...A.....G.G	2160
ISU1894	AGC.....T...A.....T..G	2160
ISU79	C.....T..T.....	2160

FIG. 1F

VR2385	TGTACCAGATATACCAACTTTCTTCTGGACACTAAGGGCAGACTCTATCGTTGGCGGTCG	2220
ISU3927	C.....A	2217
ISU55		2220
ISU22	C.....	2220
VR2332		2220
ISU1894	AT...	2220
ISU79	...T.....T.....	2220
VR2385	CCTGTCATCATAGAGAAAAGGGGCAAAGTTGAGGTGGAAGGTCACCTGATCGACCTCAAA	2280
ISU3927	G...T..G.....T.....A...	2277
ISU55	T.....T.....G	2280
ISU22	T.....	2280
VR2332	T.....	2280
ISU1894	T.....	2280
ISU79	G.....T.....T....	2280
VR2385	AGAGTTGTGCTTGATGGTTCCGCGGCTACCCCTGTAACCAGAGTTTCAGCGGAACAATGG	2340
ISU3927	.A.....A.....T.....	2337
ISU55	A.....A.....A.....G.....	2340
VR2385		2340
ISU22	T..A.....A.....	2340
VR2332	T..A.....A.....	2340
ISU1894	C.....T..A.....A.....	2340
ISU79	T..A.....A.....	2340
***<ORF5		
VR2385	AGTCGTCCTTAG	2352
ISU3927	G.....C...	2349
ISU55	G.....	2352
VR2385		2352
ISU22	G.....	2352
VR2332	G.....	2352
ISU1894	G.....	2352
ISU79	G.....	2352

FIG. 1G

A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															</
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

FIG. 2A

FIG. 2B

C	VR2385	MGASLLFLLVGFKCLLVSQAFACKPCFSSSLSDIKTNTTAAAGFAVLQDISCLRHN-SASE---	AIRKVPQCRTAIGTPVYITVTANVT	86
	VR2332	AS.....V.....A.....S.....D.....I.....V.I.....		86
	ISU55	A.....A.....A.....Y.....F.I.....M.....		86
	ISU1894	AS.....M.....A.....S.....I.....I.....		86
	ISU22	AS.....M.....A.....S.....G.....D.....I.....		86
	ISU79	A.....M.....A.....S.....S.....I.....M.I.....		86
	ISU3927	A.....E.....E.....N.....G.....G.....TT.....F.I.....		86
	LV	A.AT..F.A.AQHIM..E.....TH.....E.....M.....N.F.PHGV..AQEKISFG.SS...E.V...Q..I.....		90
	VR2385	DENYLHSSDLLMLSSCLFYASEMSEKGFVKVVFNGVSGIVAVCVNFTSYVQHVKEFTQRSLVVDH-VRLLFHMTPETMRNATVLACLFTIL		175
	VR2332		A..	175
	ISU55		A..	175
	ISU1894		A..	175
	ISU22	R.....	A..	175
	ISU79	E.....R.....M.....	A..	175
	ISU3927	T...I.....	A..	175
	LV	...S..YNA.....A.....I.....V.SA.....D..A..TQH..QHHL.IDHI.....L..SA.....TI.....A..		180
	VR2385	LAI	178	
	VR2332	...	178	
	ISU55	...	178	
	ISU1894	...	178	
	ISU22	...	178	
	ISU79	...	178	
	ISU3927	...	178	
	LV	...	183	

FIG. 2C

D	*****		
VR2385	MLGKCLTAGCCSQLFLWCIVPSCFVA--LVSANGSGSNLQLIYNLTLCELNGTDMLANKFDWAVECFVIFPVLTHIVSYGALTTSHFL		88
VR2332	.E.....R..S.....F..AV--..AN..SND..S..H.....S.....		88
ISU55	Y..S.....W.....A.....SSNS..H.....GE.....		88
ISU1894	R..S.....F..AV--..AN..SA..S..H.....D.....S.....L..		88
ISU79	R..S..F..F..AV--..A..SNS..S..H.....S.....		88
ISU22	V.....R..S.....F..TV--..AD..HS..S..H.....DR.....S.....		88
ISU3927	RS.....F..LA.....S..H.....S.....		87
LV	.RCSHKLGRELTPHSCF.WLFLL.IGLSWSE.D..GDS..TY..Y.....I.....SSH.G....T..LY..A...L..L..F.....F		90
VR2385	DTVGLVTIVSTAGFVHGGRYVLSMAYAVCALAALICFVIRLAKNCMSWRYSCTRYTNFLLDTKGRLYRWSPVIEKRGKVEVEGHLIDLKR		178
VR2332	.A.....I.....T.....F.....A.....		178
ISU55	S.....I.....FT.....		178
ISU1894	.A.....I.....A.....F.....H.....		178
ISU79	.IA.....I.....T.....FV.....		178
ISU22	.A.....I.....T.....I..F.....		178
ISU3927	H.....I.....F.....F.....G.....K		177
LV	.AL..GA.....G.....C..V..GA..F..FV.....A.....AC..AR..F.....IV..DR..VH..K..IVV..L..A..D..N..VTI..H		180
VR2385	VWLDGSAATPVTRVSAEQWSRP	200	
VR2332	V...I.....G...	200	
ISU55	I..K.....G...	200	
ISU1894	V...I.....G...	200	
ISU79	V...I.....G...	200	
ISU22	V...I.....G...	200	
ISU3927	L.....G...	199	
LV	...E.VK.Q.L..T.....EA-	201	

FIG. 2D

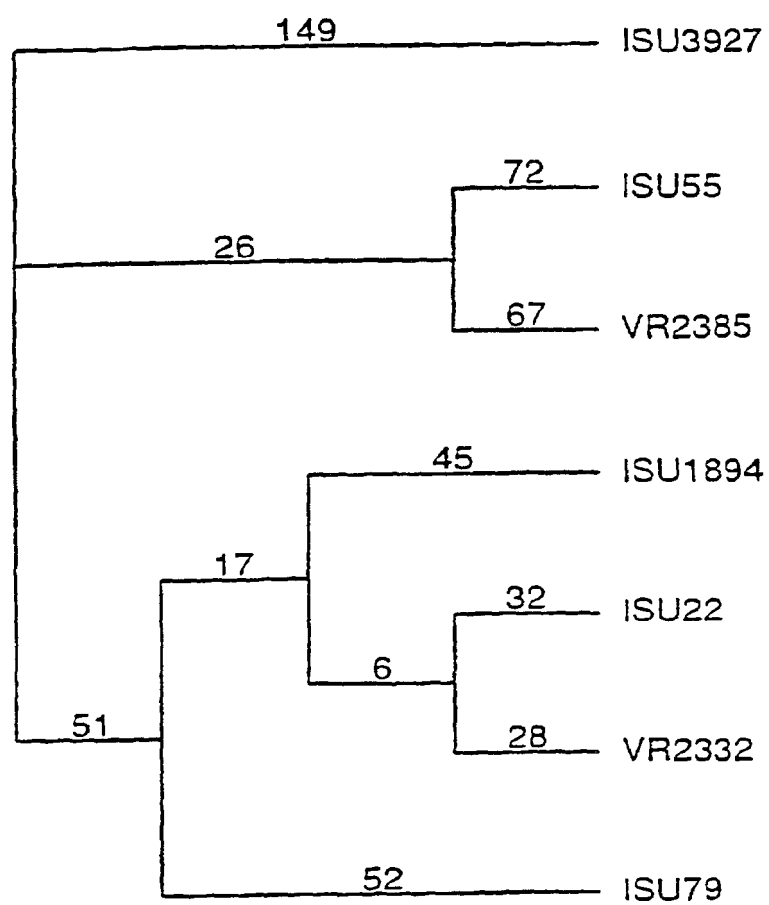
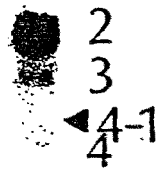
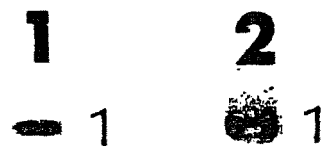


FIG. 3



5

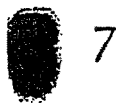
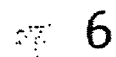


FIG.4

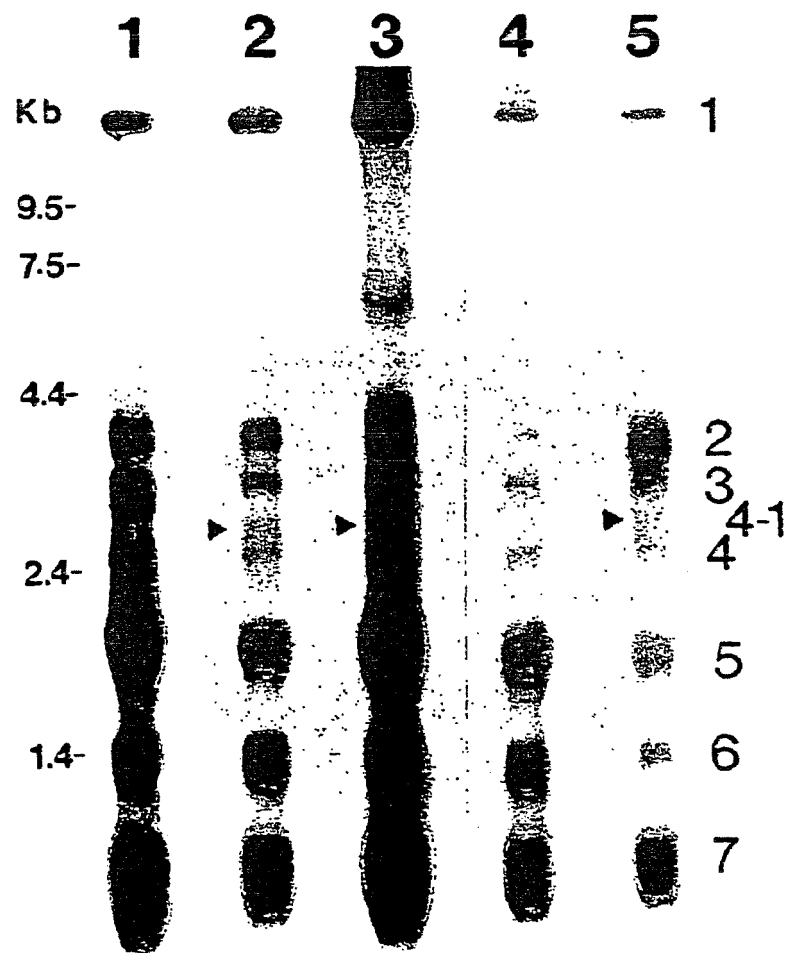


FIG.5

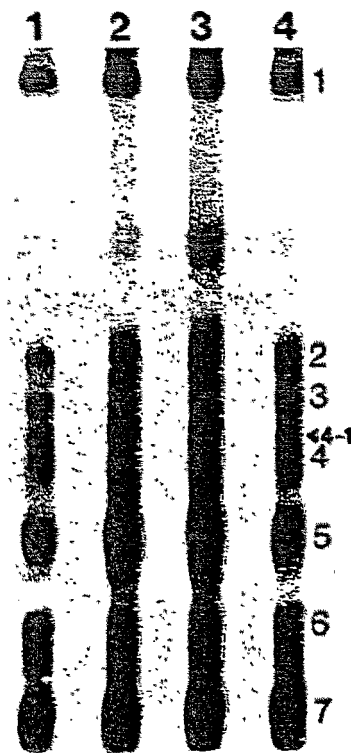


FIG. 6A

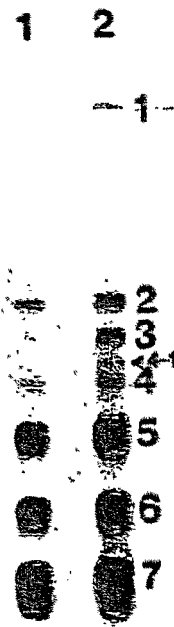


FIG. 6B

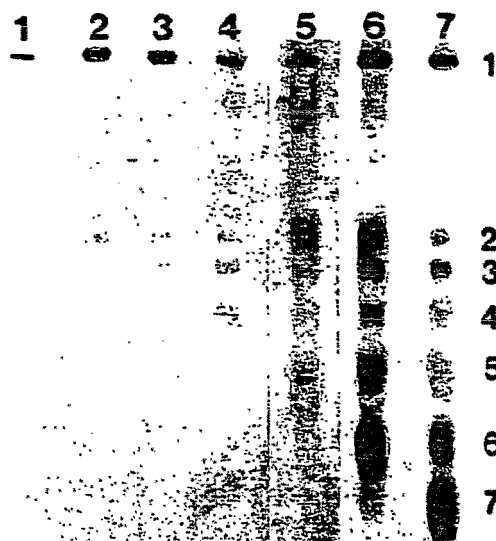


FIG.7A

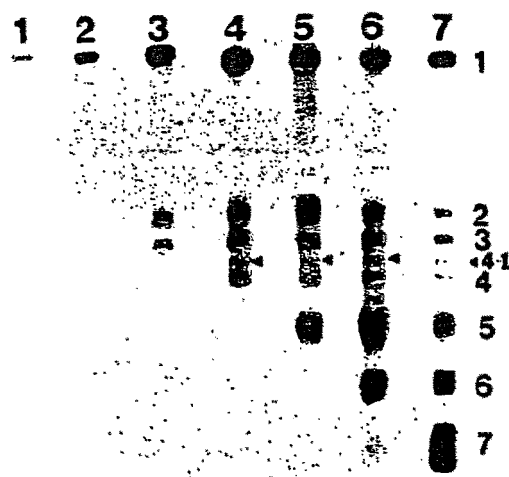


FIG.7B

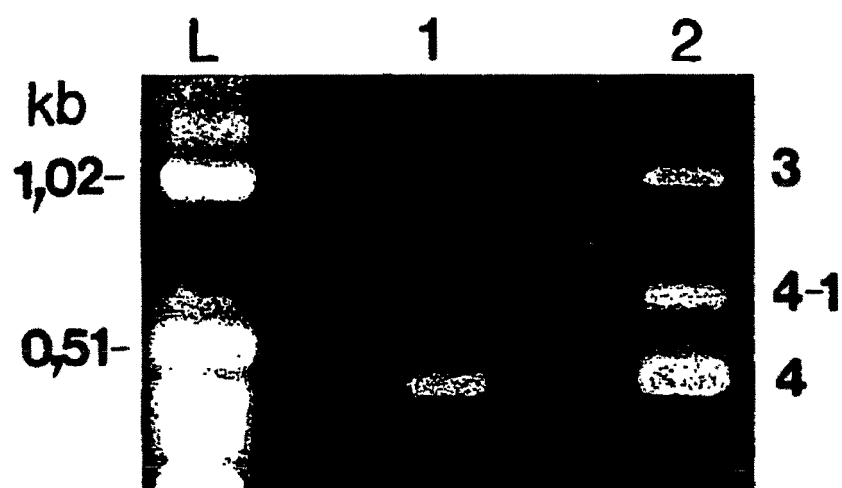


FIG.8A

ISU-1894-ARNm3	-89	+1>ORF3
ISU-79-ARNm3	<u>GUAACC</u> ...	AUG
	<u>GUAACC</u> ...	AUG
ISU-1894	-236	+1>ORF4
ISU-79-ARNm4-1	UUGACu...	AUG
	<u>UUGACC</u> ...	AUG
ISU-1894-ARNm4	-10	+1>ORF4
ISU-79-ARNm4	<u>UUCACC</u> ...	AUG
	<u>UUCACC</u> ...	AUG

FIG.8B

```

                                -26 (ARNm2)                +1>ORF2
ISU79  GTTTTATTTCCCTCCGGGCCCTGTCATTGAACCAACTTTAGGCCTGAATTGAAATGAAAT  60
ISU1894 .....C.....

ISU79  GGGGTCCATGCAAAGCCTTTTGGACAAAATTGGCCAACCTTTTGTGGATGCTTTCACGGA  120
ISU1894 .....G.....

ISU79  GTTCTTGGTGTCCATTGTTGATATCATTATATTCTTGGCCATTTTGTGGCTTCACCAT  180
ISU1894 ....C.....C.....T.....

ISU79  CGCCGGTTGGCTGGTGGTCTTTTGCATCAGATTGGTTTGCTCCGCGATACTCCGTACGCG  240
ISU1894 .....

ISU79  CCCTGCCATTCACCTCTGAGCAATTACAGAAGATCTTATGAGGCCTTTCTTTCCAGTGCC  300
ISU1894 .....T.A.....

ISU79  AAGTGGACATTCACCTGGGGAACCTAAACATCCTTTGGGGATGTTTTGGCACCATAAGG  360
ISU1894 .....

ISU79  TGTCAACCCTGATTGATGAGATGGTGTGCGTGAATGTACCGCATCATGGAAAAAGCAG  420
ISU1894 .....A.....C.....

ISU79  GACAGGCTGCCTGGAAACAGGTGGTGAAGGAGGCTACGCTGTCTCGCATTAGTAGTTTGG  480
ISU1894 .G.....C.....

ISU79  ATGTGGTGGCTCATTTTCAGCATCTTGCCGCCATCGAAGCCGAGACCTGTAAATATTTGG  540
ISU1894 .....T.....T.....

                                -89 (ARNm3)
ISU79  CCTCCCGCTGCCCATGCTACACAACCTGCGCATGACAGGGTCAAATGTAACCATAGTGT  600
ISU1894 .....T.....A.....

ISU79  ATAATAGTACTTTGAATCGGGTGTGCTATTTTCCCAACCCCTGGTTCCCGGCCAAAGC  660
ISU1894 .....C.G.G.A.....

                                +1>ORF3
ISU79  TTCATGACTTTCAGCAATGGCTAATAGCTGTGCATTCTCCATATTTCTCTGTGTCAG  720
ISU1894 .....T.....T.....A.....

ISU79  CTTCTTGTACTCTCTTTGTTGTGCTGTGGTTGCGGGTTCCAATACTACGTACTGTTTTTG  780
ISU1894 .....T.....C.....G.....

                                ***<ORF2 (ISU79)
ISU79  GTTTCGCTGGTTAGGGGCAATTTTCTTTGAACTCATAGTGAATTACACGGTGTGCC  840
ISU1894 .....G.....C.....G.....T.....

                                ***<ORF2 (ISU1894)

```

FIG. 9A

ES 2 326 703 T3

ISU79 ACCTTGCCTCACCCGGCAAGCAGCCGAGAGGCCTACGAACCCGGTAGGTCTCTTTGGTG 900
ISU1894 T..... 900

ISU79 CAGGATAGGGTACGATCGATGTGGAGAGGACGACCATGACGAGCTAGGGTTTATGATACC 960
IAU1894 T..C.....G.....T..... 960
-236 (ARNm4-1 de ISU79)

ISU79 GTCTGGCCTCTCCAGCGAAGGCCACTTGACCAGTGTTTACGCCTGGTTGGCGTTCTTGTC1020
ISU1894 .C.....T.....T.....1020

ISU79 CTTGAGCTACACGGCCAGTTCCACCCGAGATATTCGGGATAGGGAATGTGAGTCGAGT1080
ISU1894 T.....1080
+1>ORF4-1

ISU79 TTATGTTGACATCAAACATCAACTCATCTGCGCCGAACATGACGGGCAGAACACCACCTT1140
ISU1894 T.....A.....G.....1140

ISU79 GCCTCGTCATGACAACATTTGCGCCGTGTTTCAGACCTATTACCAACATCAAGTCGACGG1200
ISU1894 T.....A.....T.....1200
-10 (ARNm4)+1>ORF4

ISU79 CGGCAATTGGTTTCACCTAGAATGGCTGCGTCCCTTCTTTTCTCATGGTTGGTTTTAA1260
ISU1894 T.....1260
***<ORF4-1

ISU79 TGTCTCTTGGTTTCTCAGGCGTTGCGCTGCAAACCATGTTTCAGTTCGAGTCTTGACAGAC1320
ISU1894 A.....C.....T1320

ISU79 ATTAAGACCAACACCACCGCAGCGGCAAGCTTTGCTGTCTCCAAGACATCAGTTGCCTT1380
ISU1894 T.....1380
**

ISU79 AGGCATCGCAACTCGGCCTCTGAGGCGATTGCGAAAATCCCTCAGTGCCGTACGGCGATA1440
ISU1894 1440
*<ORF3

ISU79 GGGACACCTATGTATATTACCATCACAGCCAATGTGACAGATGAAAATTATTTACATTCT1500
ISU1894 CG.....G.....1500

ISU79 TCTGATCTCCTCATGCTCTCTTCTGCCTTTTCTATGCTTCTGAGATGAGTGAAAAGGGA1560
ISU1894 T.....C.....A...1560

ISU79 TTTGAGGTGGTTTTTGGCAATGTGTCAGGCATCGTGGCTGTGTGTGTCAATTTTACCAGC1620
ISU1894 ..CA.....A.....1620
-105

ISU79 TACGTTCAACATGTCAGGGAGTTTACCCAACGCTCCTTGATGGTCGACCATGTGCGGCTG1680
ISU1894 C.....C..G.....T...1680
-70 -55 (ARNm5 de ISU79)

ISU79 CTCCATTTTCATGACACCTGAGACCATGAGGTGGGCAACCGTTTACGCTGTCTTTTGCT1740
ISU1894 A.....T.....C1740
-70 (ARNm5 de ISU1894)

FIG. 9B

```

***<ORF4          +1>ORF5
ISU79  ATTCTGTTGGCAATTTGAATGTTTAAGTATGTTGGGAAATGCTTGACCGTGGGCTGTTG1800
ISU1894 .....C.....C.....1800

ISU79  CTCGCGATTGCTTTCTTTGTGGTGTATCGTGCCGTTCTGTTTACTGTGCTCGCCGACGC1860
ISU1894 .....G.....A....1860

ISU79  CCACAGCAACAGCAGCTCTCATCTGCAATTGATTTACAACTTGACGCTATGTGAGCTGAA1920
ISU1894 .AG.GC.....C....A..GC.....1920

ISU79  TGGCACAGATTGGCTAGCTGATAGATTTGATTGGGCAGTGGAGAGCTTTGTCATCTTTCC1980
ISU1894 .....A.....T.....1980

ISU79  TGTTTTGACTCACATTGTCTCCTATGGCGCCCTCACCACCAGCCATTTCTTGACACAAT2040
ISU1894 C.....T.....T..T.....C.....G.2040

ISU79  TGCTTTAGTCACTGTGTCTACCGCCGGGTTTGTTCACGGGCGGTATGTCCTAAGTAGCAT2100
ISU1894 C..C.....2100

ISU79  CTACGCGGTCTGTGCCCTGGCTGCGTTGACTTGCTTCGTCATTAGGTTTGTGAAGAATTG2160
ISU1894 .....AG.....CA.....2160

ISU79  CATGTCCTGGCGCTACTCATGTACTAGATATACCAACTTTCTTCTGGATACTAAGGGCAG2220
ISU1894 .....T..G....C.....C.....2220

ISU79  ACTCTATCGTTGGCGGTCGCTGTATCATAGAGAAGAGGGGCAAAGTTGAGGTGGAAGG2280
ISU1894 .....AT.....A.....2280

ISU79  TCATCTGATCGATCTCAAAGAGTTGTGCTTGATGGTTCCGTGGCAACCCCTATAACCAG2340
ISU1894 .....C.....C.....2340
          +1>ORF6      ***<ORF5
ISU79  AGTTTCAGCGGAACAATGGGGTCGTCTTAGATGACTTCTGTTATGATAGTACGGCTCCA2400
ISU1894 .....CC.....2400

ISU79  CAAAAGGTGCTTTTGGCATTCTTATTACCTACACGCCAGTAATGATATATGCCCTAAAG2460
ISU1894 .....G.....G.....2460

ISU79  GTGAGTCGCGGCCGACTGCTAGGGCTTCTGCACCTTTTGATTTTCTGAACTGTGCTTTC2520
ISU1894 .....C.....T.....2520

ISU79  ACCTTCGGGTACATGACATTCATGCACTTTCAGAGTACAAATAAGGTCGCGCTCACTATG2580
ISU1894 .....G.....2580

```

FIG. 9C

ISU79 GGAGCAGTAGTTGCACTCCTTTGGGGGGTGTACTCAGCCATAGAAACCTGGAAATTCATC2640
ISU1894 2640

ISU79 ACCTCCAGATGCCGTTTGTGCTTGCTAGGCCGCAAGTACATTCTGGCCCCTGCCACCAC2700
ISU1894 2700

ISU79 GTTGAAAGTGCCGCAGGCTTTCATCCGATTGCGGCAAATGATTAACCACGCATTGTCGTC2760
ISU1894 2760

ISU79 CGGCGTCCCGGCTCCACTACGGTCAACGGCACATTGGTGCCCGGGTTGAAAAGCCTCGTG2820
ISU1894 2820

ISU79 TTGGGTGGCAGAAAAGCTGTTAAACAGGGAGTGGTAAACCTTGTCAAATATGCCAAATAA2880
ISU1894 2880

ISU79 CAACGGCAAGCAGCAGAAGAGAAAGAAGGGGGATGGCCAGCCAGTCAATCAGCTGTGCCA2940
ISU1894 2940

ISU79 GATGCTGGGTAAGATCATCGCCAGCAAAACCAGTCTAGAGGCAAGGGACCGGAAAGAA3000
ISU1894 T.....C.....3000

ISU79 AAATAAGAAGAAAAACCGGAGAAGCCCCATTTTCTCTAGCGACTGAAGATGATGTCAG3060
ISU1894 ...C.....3060

ISU79 ACATCACTTTACCCCTAGTGAGCGGCAATTGTGTCTGTCGTCATCCAACTGCCTTTAA3120
ISU1894 C.....G..C.....3120

ISU79 TCAAGGCGCTGGGACTTGACCCCTGTCAGATTGAGGAGGATAAGTTACACTGTGGAGTT3180
ISU1894 3180

ISU79 TAGTTTGCCTACGCATCATACTGTGCGCTTGATCCGCGTCACAGCATCACCCCTCAGCATG3240
ISU1894 A.....3240

ISU79 ATGGGCTGGCATTCTTGAGGCATCCAGTGTTTGAATTGGAAGAATGCGTGGT 3293
ISU1894 3293

FIG. 9D