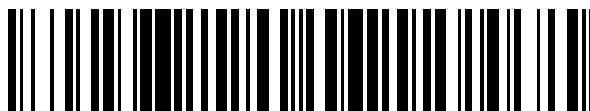


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 436**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2015 PCT/EP2015/001399**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16005054**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2015 E 15745146 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3167078**

54 Título: **Secuencias HCBI, MSBI, MSSI y CMI como marcador temprano para el futuro desarrollo del cáncer y enfermedades del snc y como diana para el tratamiento y la prevención de estas enfermedades**

30 Prioridad:

10.07.2014 EP 14176624

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

11.05.2020

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(100.0%)**

**Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**DE VILLIERS-ZUR HAUSEN, ETHEL-MICHELE;
ZUR HAUSEN, HARALD;
GUNST, KARIN;
WHITLEY, CORINNA y
PÉREZ, IRANZU LAMBERTO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 759 436 T3

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

DESCRIPCIÓN

Secuencias HCBI, MSBI, MSSI y CMI como marcador temprano para el futuro desarrollo del cáncer y enfermedades del SNC y como diana para el tratamiento y la prevención de estas enfermedades

La presente invención se refiere a secuencias de nucleótidos de MSBI (aislado cerebral de esclerosis múltiple), así como sondas y cebadores que comprenden parte de dichas secuencias de nucleótidos y anticuerpos contra polipéptidos codificados por dichas secuencias de nucleótidos. Finalmente, la presente invención se refiere al uso de dichos compuestos como un marcador temprano para el futuro desarrollo de enfermedades tales como esclerosis múltiple y como diana para el tratamiento y la prevención de estas enfermedades.

Antecedentes

Varios análisis epidemiológicos realizados en las últimas décadas indican que el consumo a largo plazo de carne "roja" procesada de diferentes maneras (incluyendo carne ahumada o secada al aire y carne como componente de embutito consumido infrecuentemente, poco cocinada o asada) puede considerarse un factor de riesgo para cáncer de colon (World Cancer Report 2007, zur Hausen 2012). La carne "roja" se considera que comprende vacuno, cerdo, cordero, cordero lechal y cabra, en contraste con la carne "blanca" (carne de ave de corral/pescado).

Hasta ahora, las sustancias químicas carcinógenas que se producen durante el horneado, asado, a la barbacoa, ahumado y secado al aire se atribuyeron como factores de riesgo para cáncer. Sin embargo, a menudo el hecho se desechó ya que las mismas sustancias también se producen en concentraciones comparables durante maneras análogas de preparación de carne de ave de corral/pescado. Por consiguiente, esto no apoya la suposición de que estas sustancias químicas desempeñen una función exclusiva con respecto al desarrollo del cáncer de colon. Como, además, los análisis epidemiológicos actuales sugieren que el vacuno es el factor de riesgo principal, se ha postulado que un factor específico de especie adicional, supuestamente infeccioso, contribuye a activar este tipo de cáncer (zur Hausen, 2012). Los resultados de la correlación de los análisis de la propagación global de especies bovinas domesticadas con la incidencia global de cáncer de colon parecen sugerir que el consumo de carne de especies bovinas procedentes de ganado bovino de Europa/Asia (*Bos taurus*), pero no de las razas cebú, búfalo de agua o yak podrían ser de importancia como factor de riesgo principal (zur Hausen, 2015).

Por tanto, el problema técnico subyacente de la presente invención es identificar secuencias de nucleótidos específicas que pudieran asociarse con enfermedades tales como esclerosis múltiple y, por tanto, proporcionar un medio para diagnóstico y tratamiento.

Breve descripción de la presente invención

La solución a dicho problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las realizaciones.

Durante los experimentos que produjeron la presente invención, se cribaron sueros de ganado bovino en busca de agentes infecciosos, partiendo de la suposición de que la presencia en suero también es indicativa de la presencia de estos agentes en carne "roja". Se cribaron sueros de vacas sanas y pudieron aislarse nuevos componentes de ácido nucleico víricos. Las secuencias de ADN y los marcos abiertos de lectura de varios de estos componentes mostraron una relación reconocible con dos secuencias que ya se describieron para la encefalopatía espongiforme transmisible (TSE) para enfermedades de TSE de ovejas, ganado bovino y seres humanos.

También se ha sospechado que los aislados de TSE desempeñan una función en la inducción del cáncer (Manuelidis, 2011), por tanto, es razonable asumir que las secuencias víricas descritas podrían estar asociadas con el desarrollo de enfermedades como cáncer, específicamente cáncer de colon y de mama, pero también en enfermedad de Hodgkin y otras, y enfermedades del SNC (esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica, encefalopatías espongiformes transmisibles/enfermedades ligadas a priones, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer).

Breve descripción de los dibujos

Abreviaturas para las figuras 1-4: Rep = proteína de replicación; CP =proteína de la cápsida

CMI: aislado de leche de ganado bovino

HCBI: aislado de sangre de ganado bovino sano

MSCI: aislado cerebral con EM

MSSI: aislado de suero con EM

Sphinx: infección oculta progresiva lenta de latencia variable (X)

Figura 1:

Grupo 1 - Aislados de suero bovino, leche bovina y muestras cerebrales de esclerosis múltiple (EM) (después de la muerte), todos relacionados con Sphinx1.76

- (a) HCBI6.252 (2522 pb) (Aislado de sangre de ganado bovino sano; idéntico a CMI1.252 (Aislado de leche de vaca)).
- (b) HCBI6.159 (1591 pb): Una eliminación en HCBI6.252 aparentemente producía HCBI6.159, ambos se rescataban independientemente del suero bovino usando cebador consecutivo, es decir, moléculas de ADN circulares y no un artefacto. Esto podría indicar que estos organismos infecciosos tienen 2 formas, una molécula grande y una pequeña relacionadas o que se complementan entre sí
- (c) MSBI1.176 (Aislado cerebral de esclerosis múltiple) (1766 pb), un 98 % idéntico a Sphinx1.76
- (d) MSBI2.176 (1766 pb), aislado de la misma muestra cerebral de EM que MSB1.176
- (e) CMI1.252 (2523 pb) (Aislado de leche de vaca; idéntico a HCBI6.252)
- (f) CMI2.214 (2148 pb)
- (g) CMI3.168 (1687 pb)
- (h) CMI4.158 (1583 pb)

Los aislados se generaron todos usando cebadores consecutivos diseñados sobre el gen de replicación de Sphinx1.76.

Cebadores (varios aislados se aislaron dos veces aplicando ambos pares de cebadores independientemente).

- Nn (directo GGATTAATGCCAATGATCC), Xn (inverso CTTGCCTGTTTCTCTCG) y/o No (directo GAGGACGAATTAATATTACAAGTC), Xo (inverso GTTCTCGTTTTCTTGTTAA)

Figura 2:

- Grupo 2: Aislado HCBI7.228 (2280 pb) (Aislado de sangre de ganado bovino sano) relacionado con Sphinx2.36

Esta muestra se generó por PCR a partir de suero bovino usando cebadores consecutivos

Cebadores: Nd (directo CAGATTGCAAAGCCTGTAATTCAT), Xd (inverso CTAAGGCAGATCAACACAGGGATA)

- Figura 3:

Grupo 3: Aislados de suero bovino y suero de esclerosis múltiple y muestras cerebrales de EM (después de la muerte), relacionados de forma distante con virus de ADNmc conocidos

- Secuencias de nucleótido de (a) HCBI8.215 (2152 pb) y (b) HCBI9.212 (2121 pb) (Aislado de sangre de ganado bovino sano) así como (c) MSSI2.225 (2259 pb) (Aislado de suero de esclerosis múltiple). También se aisló una secuencia idéntica (MSBI3.224) a MSSI2.225 de una muestra cerebral de EM.
- Estos aislados HCBI se generaron de la siguiente manera:
- Las muestras de suero se sometieron a ultracentrifugación en centrifugación con gradiente de Optiprep. El gradiente se fraccionó, se extrajo el ADN de las fracciones y se sometió a amplificación por círculo rodante. Los productos se digirieron con las enzimas BamHI o EcoRI. Los productos se clonaron y se secuenciaron. Se obtuvieron genomas completos por amplificación de muestras de ADN originales con cebadores consecutivos diseñados sobre los clones de gradiente respectivos. Los genomas completos se secuenciaron por completo.
- El aislado MSSI (así como el clon MSB13.224 del cerebro de EM) se obtuvo después de amplificación por círculo rodante del ADN extraído de suero de EM y cerebro de EM, digestión con enzimas de restricción, clonación del producto y posterior secuenciación. El genoma completo se obtuvo por amplificación con cebadores consecutivos diseñados sobre el clon original. El genoma completo se secuenció por completo.

- Figura 4:

Grupo 4: relacionado de forma distante con el plásmido de *Psychrobacter* spp.: Secuencia de nucleótidos de MSSI1.162 y supuestos marcos abiertos de lectura

- El aislado de suero de EM MSSI1.162 (grupo 4) se generó por amplificación por círculo rodante de una muestra de suero de EM múltiple. El producto se digirió con la enzima de restricción HindIII, se clonó y se secuenció.

Figura 5:

Organización genómica de 4 grupos de aislados

Los aislados se agrupan de acuerdo con su similitud de secuencia respecto al genoma Sphinx1.76 (grupo 1), Sphinx2.36 (grupo 2), gemicircularvirus de tipo micovirus (grupo 3) y plásmido de *Psychrobacter* spp. (grupo 4).

- (A) grupo 1
- (B) grupos 2, 3 y 4

Figura 6:

Alineamiento de un gen de replicación/región de repetición de tipo iterón entre 8 aislados y Sphinx1.76

Figura 7:

Resumen esquemático de infección latente de diferentes tipos de células cerebrales con genomas de tipo herpes y factor BMF

Figura 8:

Reactivación espontánea del ADN de herpes en una célula infectada simultáneamente por ADN de herpes y BMF

Amplificación de BMF e inhibición de la replicación del ADN de herpes.

Figura 9:

Resumen esquemático del reconocimiento de antígenos exógenos por el sistema inmunitario, respuesta de linfocitos T

Figura 10:

Células inflamatorias mononucleares que rodean una pequeña vena en una lesión inicial

Linfocitos, monocitos, células plasmáticas y macrófagos ocasionales.

Figura 11:

El avance de la edad de la lesión (placa) a la izquierda con materia blanca normal a la derecha

Hay macrófagos presentes en la lesión (flechas) y en la interfase.

Figura 12:

Resumen esquemático del concepto de patogenia para esclerosis múltiple

Se usa EBV como ejemplo para la función de virus de tipo herpes.

Figura 13:

Esquema provisional de la patogenia de EM

Descripción detallada de la presente invención

En la presente solicitud, se presenta un nuevo concepto para la patogenia de esclerosis múltiple: interacción de un virus de amplificación y el ADN amplificado de un factor de leche (o suero) bovino (BMF)

Introducción

La incidencia de esclerosis múltiple (EM) aumentó en varias partes del mundo (*revisado en Kurtzke, 2000, Alcalde-Cabero et al., 2013*). Este aumento se ha atribuido principalmente a factores ambientales. Los migrantes de zonas de alto riesgo a zonas de menor riesgo retienen el riesgo de EM de su propio lugar de nacimiento únicamente si tienen al menos 15 años en el momento de migrar, que frecuentemente se interpreta debido a una infección adquirida durante la primera infancia (*revisado en Kurtzke, 2000*). La agrupación de casos y la epidemiología geográfica también se ha analizado ampliamente: Se apreció una incidencia creciente de EM en mujeres ligada a la urbanización (*Kotzamani et al., 2012*).

La desmielinización es un rasgo característico de las lesiones de EM. Se encontraron cuatro patrones fundamentalmente diferentes de desmielinización, definidos basándose en la proteína mielina perdida, la ubicación y la extensión de placas, los patrones de destrucción de oligodendrocitos y la evidencia inmunopatológica de la activación del complemento (*Lucchinetti et al., 2000, Metz et al., 2014*). En un punto temporal dado de la enfermedad, los patrones de desmielinización eran heterogéneos entre los pacientes; pero eran homogéneos dentro de múltiples lesiones activas del mismo paciente, lo que apunta potencialmente a diferentes factores contribuyentes.

Dos de los factores de riesgo parece que merecen especial atención: los resultados relativamente coherentes que apuntan a una posible función de diferentes virus predominantemente del grupo de herpes y el consumo de leche de

vaca fresca, potencialmente incluyendo otros productos lácteos (véase a continuación). Además, la deficiencia de vitamina D desempeña una función como factor de riesgo.

- Factores de riesgo víricos

Aparentemente todos los tipos de virus del herpes comparten dos propiedades que parecen ser relevantes para el posterior análisis:

Durante su persistencia en una fase latente, puede producirse reactivación espontánea, en parte regulada por funciones génicas específicas, parcialmente también por mecanismos epigenéticos (revisado en Nicoll et al., 2012, Grinde, 2013). La reactivación también puede activarse por interacción con citocinas extracelulares, tales como el factor de crecimiento transformante β .

Se ha observado inducción espontánea de un ciclo lítico para casi todos los tipos de virus de herpes patógenos humanos. Los altos títulos de anticuerpo contra proteínas estructurales del virus de Epstein-Barr en linfoma de Burkitt positivo a EBV y cánceres nasofaríngeos (revisado en Henle, W. y Henle, G., 1977) puede servir aquí como un ejemplo. Las reactivaciones de virus de herpes humano de tipo 6, virus de la varicela-zóster, virus del herpes simple y otros no son eventos infrecuentes y pueden afectar a varios tipos celulares diferentes (Hu Knox et al., 2000).

Una segunda propiedad notable de infección por virus del herpes representa la amplificación de diversos genomas víricos de ADN pequeño bicatenario o monocatenario tras la infección de células que contienen dichos ADN en un estado latente. Esto se ha apreciado para virus de poliooma humano y de mono, JC y SV40, para virus de papiloma humano y bovino, así como para virus adenoasociados monocatenarios (AAV) y anelovirus/virus TT (Schlehofer y zur Hausen, 1990, Heilbronn et al., 1993, Borkosky et al., 2012). Los virus del grupo de los herpes usados en estos estudios eran virus del herpes simple, citomegalovirus humano y virus de Epstein-Barr. El potencial de inducir amplificación de genomas de ADN víricos pequeños latentes también está compartido por los adenovirus y los virus de variolovacuna (Schlehofer y zur Hausen, 1990). El efecto auxiliar de la amplificación inducida por virus del herpes y adenovirus de los parvovirus se ha estudiado intensivamente para los virus adenoasociados. La replicación de los últimos parece depender de este efecto auxiliar, pero a su vez da lugar a una reducción de la replicación del virus del herpes o adenovirus debido a la amplificación preferente del ADN vírico pequeño (Schlehofer et al., 1983, Matz et al., 1984, Bantel-Schaal y zur Hausen, 1988, Schmitt et al., 1989, Schlehofer y zur Hausen, 1990, Heilbronn et al., 1990a, Heilbronn et al., 1990b).

La inducción espontánea de virus del grupo del herpes y la amplificación del ADN vírico pequeño latente forma la base de la posterior postulación del mecanismo subyacente al desarrollo de EM.

- Factor de leche bovina

Varios informes indicaron una correlación entre el consumo de leche de vaca no pasteurizada y el desarrollo de EM (Murray T.J. 1976, Sepcic et al., 1993, Malosse y Perron, 1993), mientras que otros resaltaron el consumo a largo plazo de leche de vaca como factor de riesgo, en particular cuando la consumían en una fase inicial de la vida (Agranoff y Goldberg, 1974, Christensen, 1975, Warren, 1984, Butcher, 1976, 1986, Winer et al., 2001, Munger et al., 2011a).

Si existe un factor específico en la leche de vaca que aumente el riesgo de desarrollo de EM, se puede anticipar una función protectora de la lactancia a largo plazo. La lactancia a largo plazo (durante seis meses y más) de hecho se ha presentado repetidamente con un efecto protector para el desarrollo de EM (Christensen, 1975, Warren, 1984, Tarrats et al., 2002, Conradi et al., 2013). La existencia de un factor de leche de vaca tampoco excluiría una predisposición genética específica para el desarrollo de EM. Una predisposición monogenética para EM se ha presentado en una ubicación cromosómica cerca de BRCA1 (Holzmann et al., 2013).

- Deficiencia de vitamina D

Se ha implicado repetidamente una función de la de vitamina D para el inicio de EM (revisado en Ascherio et al. 2012, 2013).

Una relación convincente entre la deficiencia de vitamina D y la reactivación del virus de Epstein Barr se origina en estudios iniciales sobre la reactivación de EBV mediante el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Un factor sérico, purificado y marcado como factor inductor del virus de Epstein-Barr (EIF) (Bauer et al., 1982) demostró ser idéntico a la molécula TGF- β descrita posteriormente (Frolík et al., 1983, Bauer et al., 1991). TGF- β , a su vez, está regulada negativamente por receptores de vitamina D activados (Isik et al., 2012, Itoet al., 2013, Zerr et al., 2014). Esto podría explicar muy bien la aparición preferente relacionada con la estación de EM y de las exacerbaciones. La relación entre la baja concentración de vitamina D y la reactivación de EBV se respalda adicionalmente por estudios que describen una correlación entre las bajas concentraciones de vitamina D y la inmunorreactividad elevada contra el virus de Epstein-Barr antes de la manifestación clínica de esclerosis múltiple (Munger et al., 2011b, Decard et al., 2012) y una tasa mayor de excreción de EBV en pacientes con EM positivos a EBV-en comparación con controles sanos positivos a EBV(Yea et al., 2013).

Por tanto, se han implicado al menos dos factores como contribuyentes etiológicos potenciales para ambas enfermedades del SNC (por ejemplo, EM) y cáncer (por ejemplo, cáncer de colon y de mama): la deficiencia de vitamina D y la reactivación de diversos virus del grupo del herpes, principalmente virus de Epstein-Barr (EBV), virus del herpes humano de tipo 6 y virus de la varicela-zóster. De acuerdo con la presente invención, la identificación de varios tipos novedosos de ADN monocatenarios circulares pequeños, supuestamente de origen vírico, de sueros de ganado bovino de la presente invención y productos lácteos disponibles en el mercado, muestra un concepto unificador. Los autores de la invención han demostrado en la presente invención que la coinfección de células con virus del grupo del herpes y virus de ADN monocatenario o bicatenario provoca una amplificación sustancial del ADN vírico pequeño con inhibición parcial del virus del herpes. Algunas de las moléculas identificadas en suero y leche de ganado bovino lechero están relacionadas de forma distante con el ADN presentado en lesiones cerebrales ligadas a priones y se han encontrado en dos lesiones de autopsia de pacientes con esclerosis múltiple. La amplificación de estas moléculas de ADN bicatenario por reactivación de un genoma de virus de herpes colatentemente persistente podría provocar la amplificación y la producción de una respuesta inmunitaria local que produce destrucción de las células cerebrales afectadas. Este modelo en parte podría explicar el gradiente de incidencia de norte a sur de la esclerosis múltiple, que se cree que está ligado a la deficiencia de vitamina D y la reactivación del virus del herpes (véase la fig. 12 y 13).

Además, los genomas de longitud completa de los aislados de cerebros y sueros con EM se aislaron y recircularizaron antes de la transfección en la línea celular humana 293TT. Se recogieron células transfectadas en el día 3 y el ARN total se extrajo usando el kit miRNA Easy (Qiagen). Las muestras se purificaron adicionalmente (digestión con DNasa, eliminación del ribosoma) y se sometieron a secuenciación de ARN de alto rendimiento. Se han obtenido transcritos de ARN para MSBI1.176, MSBI2.176 (Grupo 1), MSSI2.225 (Grupo 3) y MSSI1.162 (Grupo 4). Los transcritos de ARN muestran claramente que los aislados se replican en células humanas.

Los autores de la invención consideran la deficiencia de vitamina D y la reactivación del virus del herpes como factores de riesgo también para cáncer de mama y de colon. La reactivación de infecciones latentes dobles dentro de la misma célula, resumido anteriormente para la patogenia de esclerosis múltiple, por lo tanto, también podría desempeñar una función importante particular en la etiología de estos cánceres.

Por tanto, los autores de la invención consideran que la esclerosis múltiple (EM) y también las otras enfermedades mencionadas a continuación son el resultado de

- Infecciones latentes de la misma célula con dos agentes infecciosos diferentes, uno de ellos muy probablemente un virus de tipo herpes (en particular, EBV, HHV-6, VZV, pero también HSV, HHV-7), el otro uno adquirido por consumo de leche bovina (factor de leche bovina, BMF) como el primer evento. Cada uno de ellos infecta de forma latente células individuales, pero ocasionalmente genomas de ambos agentes existen dentro de la misma célula.
- Reactivación del virus de tipo herpes muy frecuentemente, pero no únicamente, virus de Epstein Barr (EBV) a un ciclo lítico como segunda condición previa. Para EBV esto está probablemente ligado a niveles aumentados de factor de crecimiento transformante β (TGF β) que está regulado negativamente por receptores de vitamina D activados;
- Como tercer evento, amplificación de BMF, que provoca supresión parcial de síntesis de ADN de tipo herpes y formación de partículas de BMF o propagación de su ácido nucleico a las células adyacentes mediante interconexiones neuronales;
- Esto está seguido por una infección de las células adyacentes con expresión de la proteína BMF;
- Finalmente, la respuesta de linfocitos T contra BMF da lugar a la destrucción de las células afectadas y en el caso de EM a formación de placas. Esto apoya la observación clínica de la aparición focal de lesiones, habitualmente partiendo de una vena central y la respuesta inmunitaria localizada intensiva en lesiones iniciales.

Las transmisiones de agentes presentes en la leche o en productos lácteos puede dar lugar a infecciones latentes en células de cerebro humano seguidas de amplificación de estos agentes en caso de colatenia e inducción espontánea de un ADN de virus del herpes o ADN de tipo virus del herpes. Se describen agentes candidatos de BMF potenciales en los ejemplos 2-5 y las figuras adjuntas.

La presencia de ADN supuestamente monocatenario circular relacionado con secuencias Sphinx, familias de anelovirus, circovirus y gemicircularvirus, así como especies de *Psychrobacter* en sueros de ganado bovino (véanse los ejemplos 2-5), en muestras de leche disponibles en el mercado, así como en lesiones de EM floridas y suero de EM permite el desarrollo de un concepto para la patogenia de EM. Integra las observaciones de la implicación de los virus de tipo herpes, muy prominentemente de EBV, de su propiedad de amplificar virus de ADN bicatenario y monocatenario pequeño, de factores de leche de vaca víricos, de deficiencia de vitamina D, la propiedad inductora de EBV de TGF β y la dependencia parcial de la estación de la aparición de EM y de la exacerbación en la evolución de la enfermedad. Este concepto se resume esquemáticamente en las figuras 7-13.

Una infección latente doble inicial de las mismas células o células flanqueantes cercanas por un genoma de virus del herpes y el BMF postulado, seguida de una activación para la reactivación del virus del herpes y la posterior amplificación preferente de ADN monocatenario se definen como el evento principal. En el caso de infección latente por EBV, la deficiencia de vitamina D con la posterior regulación por aumento de TNF- β como factor inductor de EBV podría ser el activador importante para la regulación por aumento. Probablemente la infección fallida de células adyacentes con expresión de antígenos víricos provoca una respuesta de linfocitos T activa y la destrucción de las células afectadas. La estacionalidad frecuentemente descrita de la aparición de EM y de nuevas rondas de exacerbaciones de EM, el gradiente de norte a sur repetidamente presentado de la incidencia de EM podría reflejar el grado de exposición a luz solar, que correlaciona negativamente con los niveles de vitamina D con la concentración de TGF β y la reactivación de EBV.

Por tanto, los autores de la invención prevén la presencia de diferentes secuencias de BMF también en células cerebrales humanas normales susceptibles en una forma latente. La heterogeneidad notable de los aislados de BMF también encuentra su reflejo en variaciones de características patológicas de EM en seres humanos (*Lucchinetti et al., 2000, Metz et al., 2014*). No sería demasiado sorprendente si finalmente se identificaran tipos de "alto" y "bajo" riesgo, en una determinada analogía a la patogenia del virus del papiloma humano (*zur Hausen, 1985*). La mayoría de esos portadores no desarrollará EM, ya que lo último debe requerir coinfección latente de una célula positiva a BMF con un virus de tipo herpes y la inducción espontánea del último. Esto debe ser un evento infrecuente, que aumenta, sin embargo, en condiciones que provocan frecuentes reactivaciones de virus del herpes.

Como punto final, debe ser de interés aplicar también este concepto a otras enfermedades supuestamente autoinmunitarias y determinados cánceres que se producen a una frecuencia aumentada en condiciones de deficiencia de vitamina D. En cuanto a lo que se refiere a los cánceres, esto representa específicamente cáncer de colon y de mama, y posiblemente cáncer de ovario, de próstata, pancreático y pulmonar.

El riesgo de diabetes *mellitus* insulino dependiente se ha ligado repetidamente al consumo de leche de vaca y la deficiencia de vitamina D (*revisado en Scott, 1990, en Grant, 2006, en Hyppönen et al, 2010*). El último sistema parece particularmente cercano a la situación de EM.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a ácido nucleico MSBI1.176 o MSBI2.176, que comprende:

- (a) una secuencia de nucleótidos representada en una cualquiera de la figura 1(c) o 1(d);
- (b) una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de (a);
- (c) una secuencia de nucleótidos que es redundante como resultado de la degeneración del código genético en comparación con cualquiera de las secuencias de nucleótidos dadas anteriormente.

La expresión "ácido polinucleico" se refiere a una secuencia de ácido nucleico monocatenaria o bicatenaria. Un ácido polinucleico puede consistir en desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, análogos nucleotídicos o nucleótidos modificados o puede haberse adaptado con fines de diagnóstico o terapéuticos. Un ácido polinucleico también puede comprender un clon de ADNc bicatenario que puede usarse, por ejemplo, con fines de clonación.

Los ácidos polinucleicos MSBI1.176 o MSBI2.176 de la invención pueden prepararse de acuerdo con métodos rutinarios bien conocidos, por ejemplo, por (a) aislamiento del ADN o ARN completo de una muestra, (b) detección de la secuencia MSBI1.176 o MSBI2.176 por hibridación o PCR y (c) clonación de la secuencia MSBI1.176 o MSBI2.176 en un vector.

También se incluyen dentro de la presente invención variantes de secuencia del ácido polinucleico de la invención que contiene eliminaciones y/o inserciones de uno o más nucleótidos, especialmente inserciones o eliminaciones de uno o más codones, principalmente en los extremos de oligonucleótidos (3' o 5') y que muestran al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o un 99 % de identidad con dichas secuencias de ácido polinucleico de la invención. Las secuencias de ácido polinucleico de acuerdo con la presente invención que son similares a las secuencias mostradas en la figura 1(c) o 1(d) pueden caracterizarse y aislarse de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica, tales como amplificación mediante cebadores específicos de secuencia, hibridación con sondas específicas de secuencia en condiciones más o menos rigurosas, determinación de la secuencia de la información genética de MSBI1.176 o MSBI2.176, etc.

La presente invención también proporciona fragmentos de las secuencias de nucleótidos de la presente invención descritas anteriormente que albergan un gen de replicación que codifica una proteína de replicación. Una secuencia de nucleótidos de replicación autónoma comprende una secuencia de nucleótidos del gen de replicación o un fragmento del mismo que puede inducir replicación autónoma. La proteína de replicación representa una endonucleasa que se une a ADN monocatenario que induce un corte monocatenario en o cerca del origen de replicación (*Wolds, 1997*). Los expertos en la materia pueden obtener dichos fragmentos que pueden inducir replicación autónoma sin experimentación excesiva. Dichos fragmentos pueden tener una longitud de al menos 45, al menos 55 o al menos 65 nt.

Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente las secuencias de ácido nucleico que están relacionadas con una secuencia de nucleótidos de la figura 1(c) o 1(d) a 4 o los fragmentos que aún pueden replicarse de forma autónoma usando ensayos convencionales.

5 La presente invención también proporciona secuencias de ácido polinucleico que son redundantes como resultado de la degeneración del código genético en comparación con cualquiera de las secuencias de nucleótidos dadas anteriormente. Estas secuencias de ácido polinucleico variantes, por tanto, codificarán la misma secuencia de aminoácidos que los ácidos polinucleicos de los que derivan.

10 Los ácidos polinucleicos MSBI1.176 o MSBI2.17 de la invención podrían estar presentes como episoma extracromosómico, podrían integrarse en el genoma del hospedador y/o podrían ligarse a un ADN de la célula hospedadora.

15 La presente divulgación también se refiere a un cebador oligonucleotídico que comprende o consiste en parte de un ácido polinucleico como se define anteriormente, pudiendo dicho cebador actuar como cebador para secuenciar específicamente o amplificar específicamente el ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 de la invención.

20 El término "cebador" divulgado en este documento se refiere a una secuencia oligonucleotídica de ADN monocatenario que puede actuar como punto de inicio para la síntesis de un producto de prolongación de cebador que es complementario a la hebra de ácido nucleico a copiar. La longitud y la secuencia del cebador deben ser tales que permitan cebar la síntesis de los productos de prolongación. Preferiblemente, el cebador es de aproximadamente 5-50 nucleótidos. La longitud y secuencia específicas dependerán de la complejidad de las dianas de ADN y ARN requeridas, así como de las condiciones del uso del cebador tales como la temperatura y fuerza iónica.

25 El hecho de que los cebadores de amplificación no tengan que coincidir exactamente con una secuencia de molde correspondiente para garantizar la amplificación apropiada está ampliamente documentado en la bibliografía. El método de amplificación usado puede ser, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), sistema de amplificación basado en transcripción (TAS), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) o amplificación mediante replicasa Qb o cualquier otro método adecuado para amplificar moléculas de ácido nucleico usando prolongación de cebador. Durante la amplificación, los productos amplificados pueden marcarse usando cebadores marcados o incorporando nucleótidos marcados.

30 Los marcadores pueden ser isotópicos (^{32}P , ^{35}S , etc.) o no isotópicos (biotina, digoxigenina, etc.). La reacción de amplificación se repite entre 20 y 70 veces, ventajosamente entre 25 y 45 veces.

35 Cualquiera de una diversidad de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica puede usarse para secuenciar directamente la información genética vírica y determinar el ORF traduciendo la secuencia de la muestra en la secuencia de aminoácidos correspondiente. Las reacciones de secuenciación ejemplares incluyen las basadas en técnicas desarrolladas por Sanger o Maxam y Gilbert. También se contempla que puede utilizarse una diversidad de procedimientos de secuenciación automatizados cuando se realizan los presente ensayos, incluyendo secuenciación por espectrometría de masas (véase, por ejemplo: publicación PCT WO 94/16101). Será evidente para un experto en la materia, por ejemplo, que la aparición de únicamente dos o tres bases nucleotídicas tiene que determinarse en la reacción de secuenciación.

40 Preferiblemente, estos cebadores divulgados en este documento son de aproximadamente 5 a 50 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 10 a 25 nucleotídicos. Muy preferiblemente son cebadores divulgados en este documento que tienen una longitud de al menos 13 bases.

45 La presente invención también se refiere a una sonda oligonucleotídica que comprende o consiste en parte de un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 como se define anteriormente, pudiendo dicha sonda actuar como sonda de hibridación para la detección específica de un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 de acuerdo con la invención.

50 La sonda puede marcarse o adherirse a un soporte sólido.

El término "sonda" se refiere a oligonucleótidos específicos de secuencia monocatenarios que tienen una secuencia que es complementaria a la secuencia diana de un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 a detectar.

55 Preferiblemente, estas sondas son de aproximadamente 5 a 50 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 10 a 25 nucleotídicos. Muy preferiblemente son sondas que tienen una longitud de al menos 13 bases.

60 La expresión "soporte sólido" puede referirse a cualquier sustrato al que pueda acoplarse una sonda oligonucleotídica, con la condición de que retenga sus características de hibridación y con la condición de que el nivel de fondo de hibridación permanezca bajo. Habitualmente, el sustrato sólido será una placa de microvaloración, una membrana (por

ejemplo, nailon o nitrocelulosa) o una microesfera (perla). Antes de su aplicación a la membrana o su fijación puede ser conveniente modificar la sonda de ácido nucleico para facilitar la fijación o mejorar la eficacia de hibridación. Dichas modificaciones pueden englobar la adición de colas homopoliméricas, acoplamiento con diferentes grupos reactivos tales como grupos alifáticos, grupos NH₂, grupos SH, grupos carboxílicos o acoplamiento con biotina o haptenos.

Los oligonucleótidos de acuerdo con la presente divulgación, usados como cebadores o sondas también pueden contener o consistir en análogos nucleotídicos tales fosforotioatos, alquilfosforiatos o ácidos peptidonucleicos o pueden contener agentes intercalantes. Estas modificaciones necesitarán adaptaciones con respecto a las condiciones en las que debe usarse el oligonucleótido para obtener la especificidad y sensibilidad requeridas. Sin embargo, los resultados finales serán esencialmente los mismos que los obtenidos con los oligonucleótidos no modificados.

La introducción de estas modificaciones puede ser ventajosa para influir positivamente en las características tales como cinética de hibridación, capacidad reversible de la formación de híbridos, estabilidad biológica de las moléculas oligonucleotídicas, etc.

Los ácidos polinucleicos de la invención pueden estar comprendidos en una composición de cualquier tipo. Dicha composición divulgada en este documento puede ser para uso diagnóstico, terapéutico o profiláctico.

La presente invención también se refiere a un vector de expresión recombinante que comprende un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 de la invención como se define anteriormente unido de forma funcional a elementos de control de la transcripción y la traducción procariotas, eucariotas o víricos, así como células hospedadoras que contienen dicho vector.

El término "vector" puede comprender un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial, un fago o un virus o un animal no humano transgénico. Puede ser particularmente útil para el desarrollo de vacunas moléculas recombinantes MSBI1.176 o MSBI2.176, vectores BCG o adenovíricos, así como virus recombinantes de la viruela aviar.

La expresión "expresión recombinante" usada dentro del contexto de la presente invención se refiere al hecho de que los polipéptidos de la presente invención se producen mediante métodos de expresión recombinante que es en procariotas, o eucariotas inferiores o superiores como se analiza en detalle a continuación.

La expresión "célula hospedadora" se refiere a células que pueden usarse o se han usado como destinatarios de un vector recombinante u otro polinucleótido de transferencia, e incluyen la descendencia de la célula original que se ha transfectado.

Se entiende que la descendencia de una única célula precursora puede no ser completamente idéntica necesariamente en la morfología o en el complemento genómico o de ADN total que el precursor original, debido a mutación o recombinación natural, accidental o deliberada.

La expresión "eucariota inferior" se refiere a células hospedadoras tales como levaduras, hongos y similares. Los eucariotas inferiores en general son (pero no necesariamente) unicelulares. Los eucariotas inferiores preferidos son levaduras, particularmente especies de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluiveromyces*, *Pichia* (por ejemplo, *Pichia pastoris*), *Hansenula* (por ejemplo, *Hansenula polymorph*), *Schwaniomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces* y similares. *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis* y *K. lactis* son los hospedadores de levadura más habitualmente usados, y son hospedadores fúngicos convenientes.

La expresión "eucariota superior" se refiere a células hospedadoras derivadas de animales superiores, tales como mamíferos, reptiles, insectos y similares. Las células hospedadoras eucariotas superiores actualmente preferidas se obtienen de hámster chino (por ejemplo, CHO), mono (por ejemplo, células COS y Vero), riñón de cría de hámster (BHK), riñón de cerdo (PK15), células 13 de riñón de conejo (RK13), la línea celular de osteosarcoma humano 143 B, la línea celular humana HeLa y las líneas celulares de hepatoma humano como Hep G2, la línea celular 293TT (Buck *et al.*, 2004) y líneas celulares de insecto (por ejemplo, *Spodoptera frugiperda*). Las células hospedadoras pueden proporcionarse en cultivos en suspensión o en matraz, cultivos tisulares, cultivos orgánicos y similares. Como alternativa las células hospedadoras también pueden ser animales no humanos transgénicos.

El término "procariotas" se refiere a hospedadores tales como *E. coli*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Bacillus subtilis* o *Streptomyces*. También estos hospedadores se contemplan dentro de la presente invención.

El segmento del ADN MSBI1.176 o MSBI2.176 D que codifica la secuencia deseada insertada en la secuencia del vector puede adherirse a una secuencia señal. Dicha secuencia señal puede ser la de una fuente que no es MSBI1.176 o MSBI2.176, pero las construcciones particularmente preferidas de acuerdo con la presente invención contienen secuencias señal que aparecen en el genoma MSBI1.176 o MSBI2.176 antes de sus respectivos puntos de inicio de las proteínas.

Los eucariotas superiores pueden transformarse con vectores, o pueden infectarse con un virus recombinante, por

ejemplo, un virus de la variolovacuna recombinante. Las técnicas y vectores para la inserción de ADN exógeno en virus de la variolovacuna son bien conocidos en la técnica, y utilizan, por ejemplo, recombinación homóloga. Una amplia diversidad de secuencias promotoras víricas, posiblemente secuencias terminadoras y secuencias de adición de poli(A), posiblemente secuencias potenciadoras y posiblemente secuencias de amplificación, todas necesarias para la expresión en mamífero, están disponibles en la técnica. El virus de la variolovacuna es particularmente preferido ya que el virus de la variolovacuna detiene la expresión de las proteínas de la célula hospedadora. Para la vacunación de seres humanos, el virus de la viruela aviar y el virus modificado de Ankara (AMV) son vectores particularmente útiles.

También se conocen vectores de transferencia de expresión de insectos derivados del baculovirus, virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), que es un vector de expresión vírico independiente de auxiliar. Los vectores de expresión derivados de este sistema habitualmente usan el promotor del gen de la polihedrina vírica fuerte para dirigir la expresión de genes heterólogos. Diferentes vectores, así como métodos para la introducción de ADN heterólogo en el sitio deseado del baculovirus están disponible para los expertos en la materia para la expresión de baculovirus. También se conocen en la técnica diferentes señales para la modificación postraducciona reconocida por células de insecto.

La presente invención también se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido polinucleico MSB11.176 o MSB12.176 como se define anteriormente, o una parte o un análogo del mismo que es sustancialmente similar y biológicamente equivalente.

El término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto. Por tanto, péptidos, oligopéptidos y proteínas se incluyen dentro de la definición de polipéptido. Este término tampoco se refiere a o excluye las modificaciones tras la expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. Se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, ácido peptidonucleico (APN), etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural.

Los polipéptidos de acuerdo con la presente invención contienen preferiblemente al menos 3, preferiblemente 4 o 5 aminoácidos de MSB11.176 o MSB12.176 contiguos, 6 o 7, preferiblemente, sin embargo, al menos 8 aminoácidos de MSB11.176m o MSB12.176 contiguos, al menos 10 o al menos 15.

Los polipéptidos de la invención, y particularmente los fragmentos, pueden prepararse por síntesis química clásica. La síntesis puede realizarse en solución homogénea o en fase sólida. Los polipéptidos de acuerdo con esta invención también pueden prepararse mediante técnicas de ADN recombinante. La presente invención también se refiere a un método para la producción de un polipéptido recombinante como se define anteriormente, que comprende: (a) transformación de un hospedador celular apropiado con un vector recombinante, en que un ácido polinucleico o una parte del mismo como se define anteriormente se ha insertado bajo el control de los elementos reguladores apropiados, (b) cultivo de dicho hospedador celular transformado en condiciones que posibilitan la expresión de dicho inserto y (c) recolección de dicho polipéptido.

La presente invención también se refiere a un anticuerpo generado tras la inmunización con al menos un polipéptido como se define anteriormente, siendo dicho polipéptido específicamente reactivo con cualquiera de dichos polipéptidos, y siendo dicho anticuerpo preferiblemente un anticuerpo monoclonal. El término "anticuerpo", preferiblemente, se refiere a anticuerpos que consisten esencialmente en anticuerpo monoclonales combinados con diferentes especificidades epitópicas, así como distintas preparaciones de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de un antígeno que contiene, por ejemplo, un polipéptido codificado por un ácido polinucleico MSB11.176 o MSB12.176 de la invención o un fragmento del mismo por métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Como se usa en este documento, se entiende que el término "anticuerpo" (Ab) o "anticuerpo monoclonal" (Mab) incluye moléculas intactas, así como fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que pueden unirse específicamente a la proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión a tejido no específico que un anticuerpo intacto. Por tanto, estos fragmentos son preferidos, así como los productos de un FAB u otra colección de expresión de inmunoglobulina. Además, los anticuerpos útiles para los fines de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, monocatenarios y humanizados.

La presente invención también se refiere a estrategias de diagnóstico y terapéuticas que usan respuestas inmunitarias mediadas por células.

Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo porta un marcador detectable. El anticuerpo/fragmento puede marcarse de forma detectable directa o indirectamente, por ejemplo, con un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante de metales o una enzima. Los expertos en la materia conocerán otros marcadores adecuados para la unión al anticuerpo, o podrán averiguarlos, usando experimentación rutinaria.

La presente divulgación también se refiere a un kit de diagnóstico para su uso en la determinación de la presencia de un ácido polinucleico HCBI, MSBI o CMI o polipéptido de la invención, comprendiendo dicho kit un cebador, una sonda y/o un anticuerpo de la invención. Dicho kit puede tener cualquier formato bien conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, puede ser un kit basado en ELISA.

La presente invención también se refiere a un método para la detección de un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 de acuerdo con la invención, presente en una muestra biológica, que comprende: (a) extraer opcionalmente ácido polinucleico de muestra, (b) amplificar el ácido polinucleico como se describe anteriormente con al menos un cebador como se divulga anteriormente, opcionalmente un cebador marcado y (c) detectar los ácidos polinucleicos amplificados.

La expresión "ácido polinucleico" también puede mencionarse como hebra de analito y corresponde a una molécula de ácido polinucleico monocatenaria o bicatenaria.

El término "marcado" se refiere al uso de ácidos nucleicos marcados. Esto puede incluir el uso de nucleótidos marcados incorporados durante la etapa de la polimerasa de la amplificación o cebadores marcados, o mediante cualquier otro método conocido por los expertos en la materia.

La presente invención también se refiere a un método para la detección de un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 de acuerdo con la invención, presente en una muestra biológica, que comprende: (a) extraer opcionalmente ácido polinucleico de muestra, (b) hibridar el ácido polinucleico como se describe anteriormente con al menos una sonda como se define anteriormente y (c) detectar los ácidos polinucleicos hibridados.

Las condiciones de hibridación y lavado tienen que entenderse como rigurosas y en general son conocidas en la técnica. Sin embargo, de acuerdo con la solución de hibridación (SSC, SSPE, etc.), estas sondas deben hibridar a su temperatura apropiada para obtener suficiente especificidad.

De acuerdo con la solución de hibridación (SSC, SSPE, etc.), estas sondas deben hibridar de forma rigurosa a su temperatura apropiada para obtener suficiente especificidad. Sin embargo, modificando ligeramente las sondas de ADN, añadiendo a eliminando uno o unos pocos nucleótidos en sus extremos (3' o 5') o sustituyendo algunos nucleótidos no esenciales (es decir, nucleótidos no esenciales para discriminar entre tipos) por otros (incluyendo nucleótidos modificados o inosina) puede causarse que estas sondas o variantes de las mismas hibriden específicamente a las mismas condiciones de hibridación (es decir, la misma temperatura y la misma solución de hibridación). También cambiar la cantidad (concentración) de la sonda usada puede ser beneficioso para obtener resultados de hibridación más específicos. Debe apreciarse en este contexto, que sondas de la misma longitud, independientemente de su contenido de GC, hibridarán específicamente a aproximadamente la misma temperatura en soluciones de TMACI.

Los métodos de ensayo adecuados para los fines de la presente invención para detectar híbridos formados entre las sondas oligonucleotídicas y las secuencias de ácido polinucleico en MSBI1.176 o MSBI2.176 en una muestra pueden comprender cualquiera de los formatos de ensayo conocidos en la técnica, tal como el formato de transferencia puntual convencional, hibridación en emparejado o hibridación inversa. Por ejemplo, la detección puede conseguirse usando un formato de transferencia puntual, uniéndose la muestra amplificada no marcada a una membrana, incorporándose a la membrana al menos una sonda marcada en condiciones adecuadas de hibridación y lavado y controlándose la presencia de sonda unida.

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

La presente invención también se refiere a un método para detectar un polipéptido codificado por un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 de la presente invención o un anticuerpo contra dicho polipéptido presente en una muestra biológica, que comprende: (a) poner en contacto la muestra biológica para la presencia de dicho polipéptido o anticuerpo como se define anteriormente y (b) detectar el complejo inmunológico formado entre dicho anticuerpo y dicho polipéptido.

Los métodos de inmunoensayo de acuerdo con la presente de invención pueden utilizar antígenos de diferentes dominios de las secuencias polipeptídicas nuevas y únicas de la presente invención. Pertenece al alcance de la invención el uso, por ejemplo, de antígenos oligoméricos individuales o específicos, antígenos diméricos, así como combinaciones de antígenos oligoméricos individuales o específicos. Los antígenos MSBI1.176 o MSBI2.176 de la presente invención pueden emplearse en casi cualquier formato de ensayo que emplee un antígeno conocido para detectar anticuerpos o respuestas inmunitarias mediadas por células. Por tanto, la presente invención también engloba la detección de respuestas inmunitarias mediadas por células contra antígenos MSBI1.176 o MSBI2.176 y la aplicación de interferencias terapéuticas en respuestas inmunitarias mediadas por células contra antígenos MSBI1.176

o MSBI2.176.

Por supuesto, un formato de ensayo que desnaturalice el epítipo conformacional MSBI1.176 o MSBI2.176 debe evitarse o adaptarse. Una característica común de todos estos ensayos es que el antígeno se pone en contacto con el componente corporal sospechoso de contener anticuerpos HCBI, MSBI, MSSI o CMI en condiciones que permitan que el antígeno se una a cualquiera de dichos anticuerpos presente en el componente. Dichas condiciones típicamente serán temperatura, pH y fuerza iónica fisiológicas usando un exceso de antígeno. La incubación del antígeno con la muestra va seguida de la detección de complejos inmunitarios compuestos del antígeno.

El diseño de los inmunoensayos está sometido a una gran variación y se conocen muchos formatos en la técnica. Los protocolos pueden, por ejemplo, usar soportes sólidos o inmunoprecipitación. La mayoría de ensayos implican el uso de anticuerpo o polipéptido marcado; los marcadores pueden ser, por ejemplo, enzimáticos, fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivos o moléculas de tinte. También se conocen ensayos que amplifican las señales del complejo inmunitario; cuyos ejemplos son ensayos que utilizan biotina y avidina o estreptavidina, e inmunoensayos marcados y mediados por enzima, tales como ensayos ELISA.

El inmunoensayo puede estar en un formato heterogéneo o en uno homogéneo, y ser de un tipo convencional o competitivo. En un formato heterogéneo, el polipéptido típicamente se une a una matriz o soporte sólido para facilitar la separación de la muestra del polipéptido después de la incubación. Ejemplos de soportes sólidos que pueden usarse son microcelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pocillo de microvaloración), poli(cloruro de vinilo) (por ejemplo, en láminas o pocillos de microvaloración), látex de poliestireno (por ejemplo, en microesferas o placas de microvaloración, poli(fluoruro de vinilideno) (conocido como Immunolon), papel diazotizado, membranas de nailon, microesferas activadas y microesferas de proteína A. El soporte sólido que contiene los polipéptidos antigénicos típicamente se lava después de separarlo de la muestra de ensayo y antes de la detección de los anticuerpos unidos. Se conocen en la técnica tanto formatos convencionales como competitivos.

En un formato homogéneo, la muestra de ensayo se incuba con la combinación de antígenos en solución. Por ejemplo, puede ser en condiciones que precipitarán cualquier complejo de antígeno-anticuerpo que se forme. Se conocen en la técnica tanto formatos convencionales como competitivos para estos ensayos.

En un formato convencional, la cantidad de anticuerpos contra MSBI1.176 o MSBI2.176 en los complejos de anticuerpo-antígeno se controla directamente. Esto puede conseguirse determinando si anticuerpos (marcados) antixenogénicos (por ejemplo, antihumanos) que reconocen un epítipo en anticuerpos anti-MSBI1.176 o anti-MSBI2.176 se unirán debido a la formación de complejos. En un formato competitivo, la cantidad de anticuerpos contra MSBI1.176 o MSBI2.176 en la muestra se deduce controlando el efecto competitivo sobre la unión de una cantidad conocida de anticuerpo marcado (u otro ligando competidor) en el complejo.

Los complejos formados que comprenden anticuerpo anti-MSBI1.176 o anti-MSBI2.176 (o en el caso de ensayos competitivos, la cantidad de anticuerpo competidor), se detectan por cualquiera de varias técnicas conocidas, dependiendo del formato. Por ejemplo, pueden detectarse anticuerpos no marcados contra MSBI1.176 o MSBI2.17 en el complejo usando un conjugado de Ig antixenogénica en complejo con un marcador (por ejemplo, un marcador enzimático).

En un formato de ensayo de inmunoprecipitación o aglutinación, la reacción entre los antígenos MSBI1.176 o MSBI2.176 y el anticuerpo forma una red que precipita en la solución o suspensión y forma una capa visible o película de precipitado. Si no hay anticuerpo anti-MSBI1.176 o anti-MSBI2.176 presente en la muestra de ensayo, no se forma precipitado visible.

Actualmente existen tres tipos específicos de ensayos de aglutinación de partículas (PA). Estos ensayos se usan para la detección de anticuerpos contra diversos antígenos cuando se recubren en un soporte. Un tipo de este ensayo es el ensayo de hemaglutinación que usa glóbulos rojos (RBC) que se sensibilizan por adsorción pasiva de antígeno (o anticuerpo) en los RBC. La adición de antígeno específico/anticuerpos presentes en el componente corporal, si lo hay, causa que los RBC recubiertos con el antígeno purificado se aglutinen.

Para eliminar las potenciales reacciones no específicas en el ensayo de hemaglutinación, pueden usarse dos vehículos artificiales en lugar de RBC en la PA. Los más comunes de estos con las partículas de látex.

La fase sólida seleccionada puede incluir microesferas poliméricas o de vidrio, nitrocelulosa, micropartículas, micropocillos de una placa de reacción, tubos de ensayo y microesferas magnéticas. El compuesto que genera señal puede incluir una enzima, un compuesto luminiscente, un cromógeno, un elemento radioactivo y un compuesto quimioluminiscente. Ejemplos de enzimas incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano rústico y beta-galactosidasa. Ejemplos de compuestos potenciadores incluyen biotina, antibiotina y avidina. Ejemplos de miembros que se unen a compuestos potenciadores incluyen biotina, antibiotina y avidina.

Los métodos anteriores son útiles para evaluar el riesgo de desarrollar enfermedades como cáncer o una enfermedad autoinmunitaria debida a los efectos perjudiciales de la presencia de una secuencia polinucleotídica HCBI, MSBI, MSSI

o CMI subgenómica por sí misma o ligada a un gen o fragmento génico del hospedador particular dentro de las células del paciente y permite tomar contramedidas apropiadas.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un oligonucleótido de antisentido o ARNi específico para el ácido polinucleico vírico MSBI1.176 o MSBI2.176 de la invención.

La generación de oligonucleótidos de antisentido adecuados o ARNi incluye la determinación de un sitio o sitios dentro del ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 para que se produzca la interacción de antisentido de modo que se produzca el efecto deseado, por ejemplo, inhibición de la expresión del polipéptido. Un sitio intragénico preferido es (a) la región que engloba el codón de inicio o terminación de la traducción del marco abierto de lectura (ORF) del gen o (b) una región del ARNm que es un "bucle" o "protuberancia", es decir, no es parte de una estructura secundaria. Una vez se ha identificado uno o más sitios diana, se eligen los oligonucleótidos que son suficientemente complementarios a la diana, es decir, hibridan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para proporcionar el efecto deseado. En el contexto de la presente invención, "hibridación" significa enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, de Hoogsteen o de Hoogsteen inversos, entre las bases nucleosídicas o nucleotídicas complementarias. "Complementario" como se usa en este documento, se refiere a la capacidad de emparejamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una determinada posición de un oligonucleótido puede formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido en la misma posición de una molécula de ADN o ARN, entonces el oligonucleótido y el ADN o ARN se consideran complementarios entre sí en esa posición. El oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. Por tanto, "específicamente hibridable" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de complementariedad o emparejamiento preciso de modo que se produzca unión estable y específica entre el oligonucleótido y la diana de ADN o ARN. Se entiende en la técnica que la secuencia de un compuesto de antisentido no tiene que ser un 100 % complementario a la de su ácido nucleico diana para que sea específicamente hibridable. Un compuesto de antisentido es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o ARN diana impide la función normal del ADN o ARN diana causando una pérdida de utilidad, y hay un suficiente grado de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto de antisentido a una secuencia inespecífica en condiciones en que se desea unión específica, es decir, en el caso de tratamiento terapéutico.

"Oligonucleótido" (en particular en el contexto de compuestos de antisentido) se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases de origen natural, glúcidos y enlaces internucleosídicos covalentes (cadena principal), así como oligonucleótidos que tienen partes que no son de origen natural que funcionan de forma similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos a menudo se prefieren sobre las formas nativas a causa de propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por la diana de ácido nucleico y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas. Aunque los oligonucleótidos de antisentido son una forma preferida del compuesto de antisentido, la presente invención comprende otros compuestos de antisentido oligoméricos, incluyendo, aunque sin limitación, miméticos oligonucleotídicos tales como los descritos a continuación. Los compuestos de antisentido de acuerdo con esta invención comprenden de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleobases (es decir, de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleósidos unidos). Compuestos de antisentido particularmente preferidos son oligonucleótidos de antisentido, incluso más preferiblemente aquellos que comprenden de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleobases. Los compuestos de antisentido incluyen ribozimas, secuencias de guía externas (EGS), oligonucleótidos (oligozimas) y otros ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que hibridan con el ácido nucleico diana e inhiben su expresión. Los compuestos de antisentido también incluyen un ARNi que comprende una secuencia con sentido y una secuencia de antisentido, en el que las secuencias con sentido y de antisentido forman una doble hélice de ARN y en el que la secuencia de antisentido comprende una secuencia de nucleótidos suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos de un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 de la presente invención.

Como alternativa, la invención proporciona un vector que permite transcribir un oligonucleótido de antisentido de la invención, por ejemplo, en un hospedador de mamífero. Preferiblemente, dicho vector es un vector útil para genoterapia. Los vectores preferidos útiles para genoterapia son vectores víricos, por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes simple, virus de la varicelavacuna o un virus de ARN tal como un retrovirus. Preferiblemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Ejemplos de dichos vectores retrovirales que pueden usarse en la presente invención son: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murina de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV) y virus del sarcoma de Rous (RSV). Mucho más preferiblemente, se emplea un vector retroviral de primates no humanos, tal como el virus de la leucemia del mono gibbon (GaLV), que proporciona un rango de hospedador más amplio en comparación con los vectores murinos. Como los retrovirus recombinantes son defectuosos, se requiere asistencia para producir partículas infecciosas. Dicha asistencia puede proporcionarse, por ejemplo, usando líneas celulares auxiliares que contienen plásmidos que codifican todos los genes estructurales del retrovirus bajo el control de secuencias reguladoras dentro de la LTR. Las líneas celulares auxiliares adecuadas son bien conocidas por los expertos en la materia. Dichos vectores pueden contener adicionalmente un gen que codifica un marcador de selección de modo que puedan identificarse las células transducidas. Además, los vectores retrovirales pueden modificarse de tal manera que lleguen a ser específicos de diana. Esto puede conseguirse, por ejemplo, insertando un polinucleótido que codifica un glúcido,

- un glucolípido o una proteína, preferiblemente un anticuerpo. Los expertos en la materia conocen métodos adicionales para generar vectores específicos de diana. Vectores y métodos adecuados adicionales para genoterapia *in vitro* o *in vivo* se describen en la bibliografía y son conocidos por los expertos en la materia; véase, por ejemplo, el documento WO 94/29469 o el documento WO 97/00957. Las secuencias polinucleotídicas MSB1.176 o MSB2.176 de la invención también pueden servir como un vector adecuado en sí mismo, compuesto únicamente de secuencias MSB1.176 o MSB2.176 reordenadas o de secuencias de ADN de célula hospedadora de MSB1.176 o MSB2.176 quiméricas. Además, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden usarse para la construcción de cromosomas artificiales.
- Para conseguir la expresión únicamente en el órgano diana, las secuencias de ADN para la transcripción de los oligonucleótidos de antisentido pueden unirse a un promotor específico de tejido y usarse para genoterapia. Dichos promotores son bien conocidos por los expertos en la materia.
- Dentro de una estructura oligonucleotídica, los grupos fosfato a menudo se denominan formando la cadena principal internucleosídica del oligonucleótido. El enlace normal o cadena principal de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'. Ejemplos específicos de compuestos de antisentido preferidos útiles en la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen cadenas principales modificadas o enlaces internucleosídicos no naturales. Los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen los que retienen un átomo de fósforo en la cadena principal y los que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Las cadenas principales oligonucleotídicas modificadas que pueden producir estabilidad aumentada son conocidas por los expertos en la materia, preferiblemente dicha modificación es un enlace fosforotioato.
- Un mimético oligonucleotídico preferido es un mimético oligonucleotídico que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación, y se denomina ácido peptidonucleico (APN). En compuestos de APN, la cadena principal glucídica de un oligonucleótido se reemplaza con una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza de la parte amida de la cadena principal.
- Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos glucídicos sustituidos o modificados. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; u O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ o alqueno C₂ a C₁₀ y alquino sustituido o no sustituido. Un resto glucídico modificado particularmente preferido es un resto glucídico con 2'-O-metoxietilo.
- Los oligonucleótidos de antisentido de la invención también pueden incluir modificaciones o sustituciones de las nucleobases. Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil-citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metilo y otros de derivados de alquilo de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, etc., prefiriéndose las sustituciones de 5-metilcitosina ya que estas modificaciones han demostrado aumentar la estabilidad de la doble hélice del ácido nucleico.
- Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica unión química al oligonucleótido de uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecandiol o undecilo, un fosfolípido, una poliamina o una cadena de polietilenglicol o ácido adamantanoacético, un resto de palmitilo o un resto de octadecilamina o de hexilamino-carbonil-oxicolesterol.
- La presente invención también incluye compuesto de antisentido que son compuestos quiméricos. Los compuestos de antisentido "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son compuestos de antisentido, particularmente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta de al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleotídico. Estos oligonucleótidos típicamente contienen al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado para conferir al oligonucleótido resistencia aumentada a degradación por nucleasas, captación celular aumentada y/o afinidad de unión aumentada por el ácido nucleico diana. Una región adición del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas que pueden escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de una doble hélice de ARN:ADN. La activación de la RNasa H, por lo tanto, provoca la escisión de la diana de ARN, potenciando enormemente de ese modo la eficacia de la inhibición por el oligonucleótido de la expresión génica. Por consiguiente, a menudo pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxioligonucleótidos de fosforotioato que hibridan con la misma región diana. Los compuestos de antisentido quiméricos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos oligonucleotídicos como se describe anteriormente. Dichos compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gámperos.
- La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo u oligonucleótido de antisentido de la invención y un excipiente, diluyente o vehículo adecuado. Preferiblemente, en una

composición farmacéutica, dicho compuesto como se describe anteriormente se combina con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se entiende que "farmacéuticamente aceptable" engloba cualquier vehículo, que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el hospedador al que se administra. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Dichos vehículos pueden formularse por métodos convencionales y el compuesto activo puede administrarse al sujeto a una dosis eficaz.

Una "dosis eficaz" se refiere a una cantidad del ingrediente activo que es suficiente para prevenir la enfermedad o para afectar a la evolución y la gravedad de la enfermedad, dando lugar a la reducción o remisión de dicha patología. Una "dosis eficaz" útil para tratar y/o prevenir estas enfermedades o trastornos puede determinarse usando métodos conocidos por los expertos en la materia.

La administración de las composiciones adecuadas puede lograrse por diferentes vías, por ejemplo, por administración intravenosa, intraperitoneal, oral, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La vía de administración, por supuesto, depende del tipo de tratamiento y el tipo de compuesto contenido en la composición farmacéutica. La pauta posológica la determinará el médico a cargo y mediante otros factores clínicos. Como es bien sabido en las técnicas médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área superficial corporal, la edad, el sexo, el compuesto particular a administrar, el tiempo y vía de administración, el tipo de tratamiento, la salud general y otros fármacos que se estén administrando simultáneamente.

En una realización preferida de la presente divulgación, la enfermedad que puede prevenirse/tratarse es cáncer, preferiblemente cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer pulmonar, cáncer de próstata, cáncer pancreático, enfermedad de Hodgkin, cáncer colorrectal o cáncer de colon o una enfermedad del SNC, preferiblemente enfermedad de Alzheimer o esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson o encefalopatías espongiiformes transmisibles/enfermedades ligadas a priones. Además, debido a una similitud de los factores de riesgo entre EM y diabetes *mellitus*, también se incluye la última afección. Las expresiones "cáncer" y "enfermedad den SNC" divulgadas en este documento también comprenden los estadios iniciales de dichas enfermedades.

La presente divulgación también se refiere a una vacuna para inmunizar a un mamífero contra una infección por HCBI, MSBI, MSSI o CMI, que comprende al menos un polipéptido o ácido polinucleico de HCBI MSBI, MSSI o CMI como se define anteriormente o VLP (partícula de tipo virus) correspondiente o complejos de péptido/proteína/ADN, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. También implica ensayos moleculares e inmunológicos en animales (en particular ganado bovino) y en sus productos (por ejemplo, leche y productos lácteos).

También puede incluir productos químicos pequeños para tratamiento dirigido derivados del análisis de los componentes estructurales de estos agentes.

Una "vacuna" divulgada en este documento es una composición inmunógena que puede provocar protección contra HCBI, MSBI, MSSI o CMI, ya sea parcial o completa. Una vacuna también puede ser útil para el tratamiento de un individuo ya infectado, en cuyo caso se llama vacuna terapéutica.

El término "terapéutico" divulgado en este documento, se refiere a una composición que puede tratar la infección por HCBI, MSBI, MSSI o CMI o enfermedades ligadas a esta infección. La expresión "cantidad eficaz" divulgada en este documento se refiere a una cantidad de polipéptido que alberga epítipo suficiente para inducir una respuesta inmunogénica en el individuo al que se administra, o para que inmunorreaccione de forma detectable de otro modo en su sistema pretendido (por ejemplo, inmunoensayo). Preferiblemente, la cantidad eficaz es suficiente para lograr el tratamiento, como se define anteriormente. La cantidad exacta necesaria variará de acuerdo con la aplicación. Para aplicaciones de vacuna o para la generación de antisuero/anticuerpos policlonales, por ejemplo, la cantidad eficaz puede variar dependiendo de la especie, edad y estado general del individuo, de la gravedad de la afección que se está tratando, el polipéptido particular seleccionado y su modo de administración, etc. Se encontrarán cantidades eficaces dentro de un intervalo no crítico relativamente grande. Una cantidad eficaz apropiada puede determinarse fácilmente usando experimentación rutinaria. Los intervalos preferidos de proteínas divulgadas en este documento para la profilaxis de enfermedades causadas por HCBI, MSBI, MSSI o CMI son de 0,01 a 100 µg/dosis, preferiblemente de 0,1 a 50 µg/dosis. Pueden necesitarse varias dosis por individuo para conseguir una respuesta inmunitaria suficiente y la posterior protección contra una infección por MSBI1.176 o MSBI2.176 y una enfermedad ligada a MSBI1.176 o MSBI2.176, respectivamente.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cualquier vehículo que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la vacuna. Los vehículos adecuados son normalmente macromoléculas grandes, que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos. Dichos vehículos son bien conocidos por los expertos en la materia.

Los adyuvantes preferidos para potenciar la eficacia de la composición incluyen, aunque sin limitación: hidróxido de aluminio (alumbre), N-acetil-muramyl-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP) como se encuentra en la patente de Estados

Unidos n.º 4606918, N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D. isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE) y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de pared celular (MPL +TDM + CWS) en una emulsión al 2 % de escualeno/Tween 80. Cualquiera de los 3 componentes MPL, TDM o CWS también puede

usarse en solitario o combinados de 2 en 2. Adicionalmente, pueden usarse adyuvantes tales como Stimulon (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) o SAF-1 (Syntex). Además, puede usarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA) para aplicaciones que no son en seres humanos y con propósitos de investigación.

Las composiciones inmunógenas típicamente contendrán vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como agua, solución salina, glicerol, etanol, etc. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH, conservantes y similares, pueden incluirse en dichos vehículos.

Típicamente, las composiciones inmunógenas se preparan como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas para un efecto adyuvante potenciado. Las proteínas también pueden incorporarse en complejos inmunoestimuladores junto con saponinas, por ejemplo Quil A (ISCOMS).

Las composiciones inmunógenas usadas como vacunas divulgadas en este documento comprenden una "cantidad suficiente" o "una cantidad inmunológicamente eficaz" de las proteínas de la presente invención, así como cualquier otro de los componentes mencionados anteriormente, según lo necesario. "Cantidad inmunológicamente eficaz" significa que la administración de esa cantidad a un individuo, en una sola dosis o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento, como se define anteriormente. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y estado físico del individuo a tratar, la capacidad del sistema inmunitario del individuo de sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico a cargo de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios. Habitualmente, la cantidad variará de 0,01 a 1000 µg/dosis, más particularmente de 0,1-100 µg/dosis.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar, pero no a limitar la invención. Aunque dichos ejemplos son típicos de los que podrían usarse, como alternativa puede utilizarse otros métodos conocidos por los expertos en la materia.

Ejemplo 1

Material y métodos

(A) Fraccionamiento de suero bovino en gradientes de sedimentación por densidad con posterior clonación

Inicialmente, se sometieron combinaciones de 5 sueros de un total de 120 sueros bovinos a ultracentrifugación en gradiente de densidad de Optiprep-(iodixanol) después de tratamiento previo con benzonasa para eliminar todo el ADN y ARN libre (Buck *et al.*, 2005). El ADN asociado a proteína se extrajo de las fracciones (kit de purificación de PCR Qiagen) y 1 µl de la fracción de ADN se sometió a RCA (amplificación por círculo rodante) en una solución de cebadores aleatorios Exo resistentes 50 µM (Thermo Scientific), 3,2 pmol de cada dNTP (Takara) y 10 U de polimerasa phi 29 (Biolabs). Los productos digeridos de restricción (EcoR1 o BamH1) se separaron por la electroforesis en gel de agarosa, se eluyeron y se clonaron en el vector pUC19 antes de la secuenciación.

(B) Amplificación por círculo rodante del ADN extraído de sueros, leche de vaca o tejido cerebral: El ADN se extrajo mediante fenolcloroformo de leche y tejido cerebral después de la muerte y sueros de pacientes con EM. El ADN de todas las muestras de suero se extrajo usando el kit de ácido nucleico vírico High Pure (Roche). Se realizó RCA (amplificación por círculo rodante) con cebadores aleatorios en el ADN de fracciones asociadas a proteínas, digestión de restricción, clonaron y se secuenciación de los fragmentos resultantes (remítase a anteriormente). Se diseñaron cebadores abutting usados en las secuencias de ADN aisladas individuales, así como en los genes de replicación de Sphinx1.76 o Sphinx2.36 y se usaron en PCR invertida sobre el ADN amplificado por RCA de sueros bovinos individuales y leche de vaca, así como sueros de pacientes con esclerosis múltiple y muestras cerebrales de esclerosis múltiple después de la muerte.

Ejemplo 2

Concepto para la patogenia de esclerosis múltiple: Aislamiento de moléculas de ADN circular (agentes bovinos) de suero bovino, leche de vaca y cerebro con esclerosis múltiple (grupo 1)

La epidemiología del cáncer de colon sugirió la implicación de un factor infeccioso presente en carne roja derivado de ganado bovino de descendencia europea/asiática (zur Hausen, 2012; zur Hausen, 2015) y consumo de leche de vaca que se ha sospechado que desempeña una función en esclerosis múltiple. En intentos por aislar estos supuestos factores, se obtuvieron sueros de 120 vacas sanas de 5 años de edad de la Facultad de Veterinaria de la Universidad

de Leipzig y se analizaron para la presencia de ADN episómico circular. Desde el principio los aislados HCB16.252 (Healthy Cattle Blood Isolate - aislado de sangre de ganado bovino sano) (2522 pb) y HCB16.159 (1591 pb) revelaron una relación distante con el ADN relacionado con secuencias encontradas en lesiones cerebrales de animales ligadas a afecciones asociadas a priones (Manuelidis, 2011). Los autores de la invención analizaron simultáneamente 8 sueros (de pacientes en recidiva), 2 CSF y 1 PBMC de pacientes con EM, así como 12 biopsias de tejido cerebral después de la muerte de secuencias relacionadas con Sphinx. Se aislaron dos moléculas de ADN circular relacionadas con Sphinx1.76 (1758 pb n.º de acceso HQ444404) de una muestra cerebral con EM - MSB11.176 (Multiple Sclerosis Brain Isolate - aislado de cerebro de esclerosis múltiple) (1766 pb) y MS2.176 (1766 pb). Como hay un riesgo elevado de EM después de consumo de leche de vaca, los autores de la invención investigaron la leche pasteurizada disponible en el mercado para la presencia de ADN relacionado. De hecho, aislaron moléculas de ADN monocatenario episómicas de las 4 muestras de leche (CMI1.252 (Cow Milk Isolate - aislado de leche de vaca), CMI2.214, CMI3.168 y CMI4.158) (HCB16.252 y CMI1.252 son casi idénticas). Esto se aceptó como una indicación de que la excreción en leche de estos agentes de hecho se está produciendo.

Los autores de la invención usaron 2 pares de cebadores diseñados sobre Sphinx1.76 para PCR invertida en todas las muestra humanas y bovinas. Estos pares de cebadores eran: directo 5'-GGATTAATGCCAATGATCC-3' (nt 721-739), inverso 5'-CGAGAGAAACAGGCAAAG-3' (nt703-720) y directo 5'-GAGGACGAATTAATATTACAAGTC-3' (nt868-891), inverso 5'-TTACCAAGAAAAGCGAGAAC-3' (nt848-867). Las secuencias resultantes son todas similares de forma distante (que varían de un 79 %-98 %) al aislado Sphinx1.76. HCB16.159 aparentemente evolucionó a partir de una eliminación en HCB16.252 (eliminación de nt 1129-2060 en HCB16.252) ya que sus secuencias solapantes son idénticas. HCB16.159 se aisló independientemente de HCB16.252 y, por lo tanto, es muy poco probable que sea un artefacto. MSB11.176 es un 98 % idéntico a Sphinx1.76, pero la naturaleza (patrones) de las diferencias de secuencia individuales son tales que estas pueden considerarse como dos agentes diferentes. Como la construcción Sphinx1.76 no estaba disponible en el laboratorio del autor de la invención, no puede haber sido producto de contaminación de laboratorio. Los autores de la invención aislaron una segunda molécula de ADN circular relacionada con Sphinx1.76 de forma muy distante (pero de tamaño idéntico) MSB12.176 de la misma muestra cerebral.

Los ORF grandes del aislado del grupo 1 codifican la proteína de replicación (ProtSweep, del Val *et al.*, 2007) que comparten alta similitud entre ellos. Otra característica común es la presencia de repeticiones en tándem de tipo iterón (3x22nt más 17/18nt de la repetición en cada aislado). La alineación de esta región de repetición indica una variación de únicamente un nucleótido en el núcleo (figura 6). Estas repeticiones de tipo iterón pueden constituir sitios de unión para proteína Rep (Chattoraj, 2000, Dziewit *et al.*, 2013).

Número de acceso a secuencia de nucleótidos: Las secuencias completas de 8 aislados se han depositado en el EMBL Databank con el número de acceso:

CMI1.2522	n.º de acceso	LK931487
CMI2.214	n.º de acceso	LK931488
CMI3.168	n.º de acceso	LK931489
CMI4.158	n.º de acceso	LK931490
MSB11.17	n.º de acceso	LK931491
MSB12.176	n.º de acceso	LK931492
HCB16.252	n.º de acceso	LK931493
HCB16.159	n.º de acceso	LK931494

En este contexto, las enfermedades del SNC (por ejemplo, esclerosis múltiple EM, esclerosis lateral amiotrófica, encefalopatías espongiformes transmisibles/enfermedades ligadas a priones, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer) son también muy interesantes ya que las secuencias similares descritas por Manuelidis se encuentran principalmente en el SNC.

Ejemplo 3

Aislamiento de un factor bovino de suero bovino (grupo 2)

Se extrajo el ADN de suero bovino seguido de amplificación por círculo rodante del ADN. La amplificación por PCR usando cebadores colindantes (directo (nt2313-2336) 5' CTAATGCAGATCAACACAGGGATA-3' e inverso (nt2312-2291) 5'-GAATTACAGGCTTTGCAATCTG-3') diseñados sobre el gen de replicación de Sphinx2.36 (2364 pb, n.º de acceso HQ444405) (Manuelidis 2011) produjo un aislado de ADN circular HCB17.228 (2280 pb, n.º de acceso LK931498) (grupo 2).

Ejemplo 4

Aislamiento de secuencias de sueros bovinos y suero de esclerosis múltiple relacionados de forma distante con un grupo novedoso de virus de ADN monocatenario, los gemicircularvirus de tipo micovirus (grupo 3)

Recientemente se ha identificado un gran número de virus de ADNmc circular por análisis metagenómicos (Rosario *et*

al., 2012a). El grupo de gemicircularvirus se ha aislado de hongos, heces de diversos animales y hojas de plantas (Rosario *et al.*, 2012b; Sikorski *et al.* 2013). Los autores de la invención informan del aislamiento de los genomas de 3 virus novedosos relacionados de forma distante con este grupo de virus.

Dos secuencias HCB18.215 (2152 pb) y HCB19.2112 (2121 pb) se aislaron después de fraccionamiento en gradiente de densidad de combinaciones de suero bovino. Los fragmentos obtenidos después de la digestión de restricción (BamH1 y EcoR1) se clonaron en pUC19. Sus genomas de longitud completa se verificaron por PCR invertida usando cebadores colindantes. Un aislado de suero de esclerosis múltiple MSS12.225 rescatado usando cebadores colindantes y PCR invertida se relacionó con los gemicircularvirus de tipo micovirus aislados de sueros de ganado bovino (HCB18.215 y HCB19.212). Los autores de la invención posteriormente aislaron una secuencia MSB13.224 de un tejido cerebral afectado por EM después de la muerte que demostró ser idéntico a MSS12.225.

La organización genómica de los 3 aislados reveló una supuesta proteína de replicación con ayuste codificada en la hebra negativa y la proteína de cubierta (CP) en la hebra positiva. La CP era rica en arginina y se indicó una similitud con la proteína TTV ORF1 en un análisis de DomainSweep (del Val *et al.*, 2007). Los supuestos motivos de círculo rodante I, II y III y un motivo Walker B de cada uno se identificaron de la siguiente manera: HCB18.215 (LLTYA, HLHAFVD, YAIKD; VFD-DI), para HCB19.212 (LLKMP, HYHIYLG, YVGKD; VFDDI) y para MSS12.225 (LLTYP, HLHAFVD, YAIKD; IFDDF). Los motivos GRS fueron AVFDVGGFHPNISITK, TAFDYFGAHGNISIR y RAFDVEGCHPNVSPSR, respectivamente. El motivo nonanucleotídico tanto para HCB18.215 como para MSS12.225 es (TAATGTTAT) y para HCB19.212 (TAATATTAT).

Estos 3 aislados probablemente constituyen un grupo novedoso de virus ya que sus proteínas de la cápsida comparten similitudes con el ORF1 de virus TT de la familia *Anelloviridae*, y no con las de la familia de virus de plantas *Geminiviridae* como en los gemicircularvirus. El aislamiento de estos 3 genomas relacionados con gemicircularvirus directamente de tejido animal y humano enfermo los vincula a tener alguna relevancia etiológica para enfermedades tales como esclerosis múltiple.

HCB18.215	n.º de acceso	LK931483
HCB19.212	n.º de acceso	LK931484
MSS12.225	n.º de acceso	LK931485

Ejemplo 5

ADN circular relacionado con plásmido bacteriano de suero humano (grupo 4)

Las especies de *Psychrobacter* están frecuentemente presentes como contaminantes de alimentos y se han aislado de tejidos humanos incluyendo cerebro, líquido cefalorraquídeo y sangre. Se considera como un patógeno humano oportunista (Caspar *et al.*, 2013; Lloyd-Puryear *et al.*, 1991). Los autores de la invención informan del aislamiento de una molécula de ADN circular, MSS11.162, de suero recogido de un paciente con esclerosis múltiple durante recidiva.

Se realizó amplificación por círculo rodante y digestión de restricción en ADN extraído de sueros de pacientes con esclerosis múltiple. El fragmento resultante se clonó en el vector pUC19. El genoma de longitud completo se verificó por amplificación por PCR invertida usando cebadores diseñados sobre la secuencia identificada inicialmente: cebador directo 5'-GACTTCTGATTGATTGATGCCTG-3' e inverso 5'-CCTGTTGAATACCGCTTAAATACT-3'. Todos los productos se secuenciaron por paseo de cebador. MSS11.162 (aislado de suero de esclerosis múltiple) (1627 pb) (n.º de acceso LK931486) comparte un 66 % de similitud de nucleótidos por análisis BlastN con el plásmido pRWF102 de la especie de *Psychrobacter* PRwf-1. La supuesta proteína (321 aminoácidos) codificada por el ORF grande muestra similitud débil con la familia de proteína de replicación de *E. coli* analizada por ProtSweep (del Val *et al.*, 2007).

Este nuevo aislado está relacionado únicamente de forma distante con las especies conocidas de *Psychrobacter* y sus plásmidos. Por lo tanto puede representar un patógeno humano aún desconocido.

Sumario:

La presencia de agentes supuestamente infecciosos y sus ácidos nucleicos en el suero de vacas sanas debe implicar que las mismas partículas también están presentes en carne roja.

Los autores de la invención aislaron 13 moléculas de ADN monocatenario novedosas de suero de ganado bovino y leche y tejido cerebral y suero de EM. Estos aislados se agruparon en 4 grupos de acuerdo con su similitud de secuencia respecto al genoma de Sphinx1.76 (grupo 1), genoma de Sphinx2.36 (grupo 2), gemicircularvirus de tipo micovirus (grupo 3) y plásmido de *Psychrobacter* spp. (grupo 4). Sus organizaciones genómicas se presentan en la figura 5 A, B. La característica principal de todas las secuencias es la presencia de un ORF que codifica proteína asociada a replicación.

Todos los aislados son supuestamente ADN monocatenario a causa de la desviación de RCA hacia la amplificación de ADN monocatenario (del Solar *et al.*, 1998). Una clasificación taxonómica de los aislados en esta fase no es posible.

Únicamente el grupo 3 puede definirse como claramente relacionado con los gemicircularvirus de tipo micovirus. Este grupo relativamente novedoso de virus se ha identificado por metagenómica y se ha aislado principalmente de heces de una diversidad muy grande de animales e insectos, así como plantas y hongos. Comparten algunas características con los geminivirus de plantas (Sikorski et al 2013). Su aislamiento en tejidos de animales o de seres humanos aún no se ha descrito. La supuesta proteína asociada a replicación de los 3 aislados descritos en esta solicitud tiene una región rica en arginina con una similitud con virus TT monocatenarios humanos.

La infección de células humanas por dichos agentes debe provocar una fuerte reacción inmunitaria, bastante distinta de los virus TT humanos, donde se han obtenido evidencias razonables de transmisión vertical (revisado en zur Hausen y de Villiers, 2014). Esto podría explicar la alta susceptibilidad a factores ambientales para el desarrollo de EM durante los primeros 15 años de vida: la infección primaria puede dar lugar inicialmente a rondas de replicación y de propagación de BMF probablemente mediante células sanguíneas, provocando finalmente infección de células cerebrales latente. Esta infección inicial debe inducir una respuesta inmunitaria, que probablemente neutraliza el agente en posteriores rondas de infección antes de la entrada al cerebro. Los aislados presentados aquí parecen representar excelentes candidatos para el factor de leche bovina (BMF) postulado.

Se apreció una alta variabilidad en el tamaño en el grupo 1. El aislado circular HCBI6.159 parece haber evolucionado de HCBI6.252 a través de eliminación de 931 nucleótidos del último. Los aislados tienen todos un gen de replicación y tienen una región de repetición de tipo iterón en común (Dziewit et al., 2013). La alineación de esta región entre 8 aislados y Sphinx1.76 revela un núcleo idéntico central (figura 6). Los aislados del grupo 2 y 4 no tienen regiones de repetición.

Las secuencias "Sphinx" (Manuelidis, 2011) muestran altas homologías con secuencias plasmídicas de la bacteria *Acinetobacter* (Valenet et al., 2008; Longkumer et al., 2013). Las secuencias obtenidas en la presente invención también muestran homologías llamativas con las secuencias plasmídicas correspondientes. Aunque se ha aislado un gran número de plásmidos y se ha secuenciado a partir de *Acinetobacter*, hasta ahora ninguno de ellos correspondía exactamente a las secuencias bovinas y humanas presentadas en esta invención. De forma interesante, un grupo de científicos en R. U. publicó datos serológicos sobre un periodo de años que apunta a una formación selectiva aumentada de anticuerpos contra proteínas de *Acinetobacter*, pero no contra otros antígenos bacterianos obtenidos de pacientes que padecen esclerosis múltiple (véase el artículo de revisión: Ebringer et al., 2012). Estos resultados no pudieron confirmarse por el grupo de Chapman (Chapman et al., 2005). Sin embargo, tiene que resaltarse que el grupo de Chapman usó una cepa diferente de *Acinetobacter* (*Acinetobacter calcoaceticus*). Se obtuvieron resultados inequívocos por el grupo de Ebringer para tres cepas de *Acinetobacter* (*Acinetobacter 1woffii*, *A. radioesistens* y un aislado específico, A. 11171). Sin embargo, los resultados obtenidos para *A. junii* 17908 fueron menos impresionantes y apenas fue detectable reactividad significativa (Hughes et al., 2001). Estos resultados sugieren que estamos tratando con reactividades específicas de cepa en las que esta serorreactividad se debe a plásmidos específicos de cepa que muestran homologías con las secuencias de ADN obtenidas en la presente invención.

El aislado MSS11.162 (grupo 4) tiene similitud con un plásmido de *Psychrobacter* spp. Las especies de *Psychrobacter* se han considerado patógenos humanos oportunistas (Caspar et al., 2013) y se han aislado de un caso de meningitis (Lloyd-Puryear et al., 1991). Estas bacterias se han presentado repetidamente como contaminantes durante y después del almacenamiento en frío de carne (de Filippis et al., 2013) y se aislaron frecuentemente de leche y de una diversidad de quesos (Coton et al., 2012).

Es de interés observar que Manuelidis informó de dos "estructuras de Sphinx", marcadas como Sphinx "grande" (2,36) y "pequeño" (1,76). Aunque la mayoría de las presentes secuencias diferían sustancialmente de sus aislados, los autores de la invención también obtuvieron secuencias de tipo Sphinx grandes y pequeñas de las mismas sondas. HCBI6.159 circular parece haber evolucionado de HCBI6.252 a través de una eliminación de 931 nucleótidos del último. No puede excluirse que los otros aislados grandes puedan tener equivalentes más pequeños que no se aislaron. Sigue teniendo que determinarse, sin embargo, si las dos estructuras encontradas aquí persisten dentro de la misma cubierta proteínica o se complementan entre sí.

El aislamiento de ADN de ácidos nucleicos circulares monocatenarios similares, en parte incluso idénticos de sueros de ganado bovino, leche de vaca disponible en el mercado y tejidos de EM floridos argumenta a favor del concepto resumido anteriormente.

Referencias

Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. J. Virol. 2004; 78:751-757.

Chapman MD, Hughes LE, Wilson CD, Namnyak S, Thompson EJ, Giovannoni G. No evidence for production of intrathecal immunoglobulin G against *Acinetobacter* or *Pseudomonas* in multiple sclerosis. Eur Neurol. 2005; 53(1):27-31.

de Villiers EM, Borkosky SS, Kimmel R, Gunst K y Fei JW. (2011) The diversity of Torque teno viruses: *In vitro*

replication leads to the formation of additional replication-competent subviral Molecules. *J Virol* 2011; 85(14): 7284-7295

Ebringer A, Hughes L, Rashid T, Wilson C. *Acinetobacter* Immune Responses in Multiple Sclerosis: Etiopathogenetic Role and Its Possible Use as a Diagnostic Marker. *Arch Neurol*. 2005; 62:33-36.

Ebringer A, Rashid T, Wilson C. The role of *Acinetobacter* in the pathogenesis of multiple sclerosis examined by using Popper sequences. *Med Hypotheses*. 2012; 78(6):763-769.

Hughes, L.E., Bonell, S., Natt, R.S., Wilson, C., Tiwana, H., Ebringer, A., Cunningham, P., Chamoun, V., Thompson, E. J., Croker, J. y Vowles, J. Antibody responses to *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in multiple sclerosis: prospects for diagnosis using the myelin-*Acinetobacter*-neurofilament antibody index. *Clin. Diagn. Laboratory Immunol*. 2001; 8: 1181-1188.

Longkumer T, Kamireddy S, Muthyala VR, Akbarpasha S, Pitchika GK, Kodetham G, Ayaluru M, Siddavattam D. *Scientific Reports* 2013; 3:2240.

Manuelidis L. Nuclease resistant circular DNAs copurify with infectivity in scrapie and CJD. *J. Neurovirol*. 2011; 17:131-145.

Wold, MS. Replication protein A: heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Ann. Review Biochem*. 1997; 66:61-92

Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poirol L, Mangenot S, Bataille E, Dossat C, Gas S, Kreimeyer A, Lenoble P, Oztas S, Poulain J, Segurens B, Robert C, Abergel C, Claverie J-M, Raoult D, Medigue C, Weissenbach J, Cruveiller S. Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. *PLoS One* 2008; 3(3):e1805-e1805.

Xu B, Zhi N, Hu G, Wan Z, Zheng X, Liu X., Wong S, Kajigaya S, Zhao K, Mao Q, Young NS. Hybrid DNA virus in Chinese patients with seronegative hepatitis discovered by deep sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110: 10264-9.

zur Hausen H. Red meat consumption and cancer: Reasons to suspect involvement of bovine infectious factors in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2012; 130:2475-2483.

zur Hausen H., de Villiers, E.-M., Prenatal Infections with Subsequent Immune Tolerance could explain the Epidemiology of Common Childhood Cancers, *World Cancer Report*, IARC, Lyon, 2014, pág. 261-265.

Abdel-Hag NM, Asmar BI. Human herpes virus 6 (HHV6) infection. *Indian J Pediatr*. 2004; 71: 89-96.

Agranoff BW, Goldberg D. Diet and the geographical distribution of multiple sclerosis. *Lancet II* 1974; 1061.

Alcalde-Cabero E, Almazan-Isla J, Garcia-Merino A, de Sa J, de Pedro-Cuesta J. Incidence of multiple sclerosis among European Economic Area populations, 1985-2009: the framework for monitoring. *BMC Neurol*. 2013; 13: 58-80.

Alenda R, Alvarez-Lafuente R, Costa-Frossard L, Arroyo R, Mirete S, Alvarez-Cermeno JC, Villar LM. Identification of the major HHV-6 antigen recognized by cerebrospinal fluid IgG in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 12 de abril de 2014. doi: 10.1111/ene.12435.

Almohmeed YH, Avenell A, Aucott L, Vickers MA. Systematic review and meta-analysis of the seroepidemiological association between Epstein Barr virus and multiple sclerosis. *PLoS One*. 2013; 8: e61110.

Angelini DF, Serafini B, Piras E, Severa M, Coccia EM, Rosicarelli B, Ruggieri S, Gasperini C, Buttari F, Centonze D, Mechelli R, Salvetti M, Borsellino G, Aloisi F, Battistini L. Increased CD8+ T cell response to Epstein-Barr virus lytic antigens in the active phase of multiple sclerosis. *PLoS Pathog*. 2013; 9: e1003220.

Ascherio A, Munger KL, Lunemann JD. The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2012; 8: 602-12.

Ascherio A. Environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Rev. Neurother*. 2013; 13 (12s) 3-9.

Ashtari F, Jamshidi F, Shoormasti RS, Pourpak Z, Akbari M. Cow's milk allergy in multiple sclerosis patients. *J Res Med Sci*. 2013; 18 (Supl. 1): S62-5.

Bager P, Nielsen NM, Bihrmann K, Frisch M, Wohlfart J, Koch-Henriksen N, Melbye M, Westergaard T Sibship

- characteristics and risk of multiple sclerosis: a nationwide cohort study in Denmark. *Am J Epidemiol.* 2006; 163: 1112-7.
- 5 Bantel-Schaal U, zur Hausen H. Adeno-associated viruses inhibit SV40 DNA amplification and replication of herpes simplex virus in SV40-transformed hamster cells. *Virology* 1988; 164: 64-74.
- 10 Banwell B, Bar-Or A, Cheung R, Kennedy J, Krupp LB, Becker DJ, Dosch HM; Wadsworth Pediatric Multiple Sclerosis Study Group. Abnormal T-cell reactivities in childhood inflammatory demyelinating disease and type 1 diabetes. *Ann Neurol.* 2008; 63: 98-111.
- 15 Baranzini SE, Mudge J, van Velkinburgh JC, Khankhanian P, Khrebtukova I, Miller NA, Zhang L, Farmer AD, Bell CJ, Kim RW, May GD, Woodward JE, Caillier SJ, McElroy JP, Gomez R, Pando MJ, Clendenen LE, Ganusova EE, Schilkey FD, Ramaraj T, Khan OA, Huntley JJ, Luo S, Kwok PY, Wu TD, Schroth GP, Oksenberg JR, Hauser SL, Kingsmore SF. Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. *Nature.* 2010; 464: 1351-6.
- Bauer G, Höfler P, zur Hausen H. Epstein-Barr virus induction by a serum factor. I. Induction and cooperation with additional inducers. *Virology.* 1982; 121: 184-94.
- 20 Bauer G, Götschl M, Höfler P. Tumor-promoting activity of Epstein-Barr-virus-inducing factor transforming growth factor type beta (EIF/TGF-beta) is due to the induction of irreversible transformation. *Int J Cancer.* 1991; 47: 881-8.
- 25 Ben Fredj N, Rotola A, Nefzi F, Chebel S, Rizzo R, Caselli E, Frih-Ayed M, Di Luca D, Aouni M. Identification of human herpes viruses 1 to 8 in Tunisian multiple sclerosis patients and healthy blood donors. *J Neurovirol.* 2012; 18:12-19.
- 30 Beretich BD, Beretich TM. Explaining multiple sclerosis by ultraviolet exposure: a geospatial analysis. *Mult Scler* 2009; 15: 891-8.
- Birkeland SA, Storm HH, Lamm LU, Barlow L, Blohme I, Forsberg B, Eklund B, Fjeldborg O, Friedberg M, Frödin L, et al., Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer.* 17 de enero de 1995;60(2):183-9.
- 35 Borkosky SS, Whitley C, Kopp-Schneider A, zur Hausen H, de Villiers EM. Epstein-Barr virus stimulates torque teno virus replication: a possible relationship to multiple sclerosis. *PLoS One.* 2012; 7: e32160.
- 40 Brecht I, Weissbrich B, Braun J, Toyka KV, Weishaupt A, Buttmann M. Intrathecal, polyspecific antiviral immune response in oligoclonal band negative multiple sclerosis. *PLoS One.* 2012; 7: e40431.
- Buchanan R, Bonthius DJ. Measles virus and associated central nervous system sequelae. *Semin Pediatr Neurol.* 2012; 19: 107-14.
- 45 Butcher PJ. The distribution of multiple sclerosis in relation to the dairy industry and milk consumption. *N Z Med J.* 1976; 83: 427-30.
- Butcher PJ. Milk consumption and multiple sclerosis- an etiological hypothesis. *Med Hypotheses.* 1986; 19: 169-78. Caserta MT, Mock DJ, Dewhurst S. Human herpes virus 6. *Clin Infect Dis.* 2001; 33: 829-33. Review.
- 50 Christensen JC. Multiple sclerosis: some epidemiological clues to etiology. *Acta Neurol Latinoam.* 1975; 21: 66-85. Review.
- Christensen T. Human herpes viruses in MS. *Int MS J.* 2007; 14: 41-7. Review.
- 55 Conradi S, Malzahn U, Paul F, Quill S, Harms L, Then Bergh F, Ditzenbach A, Georgi T, Heuschmann P, Rosche B. Breastfeeding is associated with lower risk for multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2013; 19: 553-8.
- Cusick MF, Libbey JE, Fujinami RS. Multiple sclerosis: autoimmunity and viruses: *Curr. Opin. Rheumatol.* 2013; 25: 496-501.
- 60 Decard BF, von Ahsen N, Grunwald T, Streit F, Stroet A, Niggemeier P, Schottstedt V, Riggert J, Gold R, Chan A. Low vitamin D and elevated immunoreactivity against Epstein-Barr virus before first clinical manifestation of multiple sclerosis. *J Neurool Neurosurg Psychiatry.* 2012; 83: 1170-3.
- 65 Dewhurst S. Human herpes virus type 6 and human herpes virus type 7 infections of the central nervous system. *Herpes.* 2004; 11 Supl. 2: 105A-111A. Review.

- Disanto G, Morahan JM, Barnett MH, Giovannoni G, Ramagopalan SV. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 2012; 78: 823-32.
- 5 Engels EA, Biggar RJ, Hall HI, Cross H, Crutchfield A, Finch JL, Grigg R, Hylton T, Pawlish KS, McNeel TS, Goedert JJ. Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. *Int J Cancer*. 2008; 123: 187-94.
- 10 Ferro MT, Franciotta D, Prella A, Bestetti A, Cinque P. Active intrathecal herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and human herpes virus-6 (HHV-6) infection at onset of multiple sclerosis. *J Neurovirol*. 2012; 18: 437-4
- Fotheringham J, Jacobson S. Human herpes virus 6 and multiple sclerosis: potential mechanisms for virus-induced disease. *Herpes* 2005; 12: 4-9.
- 15 Fraussen J, Vrolix K, Martinez-Martinez P, Losen M, De Baets MH, Stinissen P, Somers V. B cell characterization and reactivity analysis in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2009; 8: 654-8.
- Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB. Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80: 3676-80.
- 20 Gaitan MI, Sati P, Inati SJ, Reich DS. Initial investigation of the blood-barrier in MS lesions at 7 tesla. *Mult Scler*. 2013; 19: 1068-73.
- 25 Geeraedts F, Wilczak N, van Binnendijk R, De Keyser J. Search for morbillivirus proteins in multiple sclerosis brain tissue. *Neuroreport*. 2004; 19: 15: 27-32.
- Grant WB. Epidemiology of disease risks in relation to vitamin D insufficiency. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006; 92: 65-79.
- 30 Grinde B. Herpes viruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. *J Oral Microbiol*. 2013; doi: 10.3402/jom.v510.22766.
- 35 Guggenmos J, Schubart AS, Ogg S, Andersson M, Olsson T, Mather IH, Linington C. Antibody crossreactivity between myelin oligodendrocyte glycoprotein and the milk protein butyrophilin in multiple sclerosis. *J. Immunol*. 2004; 172: 661-8.
- Hawkes CH, Giovannoni G, Keir G, Cunningham M, Thompson EJ. Seroprevalence of herpes simplex virus type 2 in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2006; 114: 363-7.
- 40 Heilbronn R, Burkle A, Stephan S, zur Hausen H. The adeno-associated virus rep gene suppresses herpes simplex virus-induced DNA amplification. *J Virol*. 1990a; 64: 3012-8.
- 45 Heilbronn R, Weller SK, zur Hausen H. Herpes simplex virus type 1 mutants for the origin-binding protein induce DNA amplification in the absence of viral replication. *Virology*. 1990b; 179: 478-81.
- Heilbronn R, Albrecht I, Stephan S, Burkle A, zur Hausen H. Human cytomegalovirus induces JC virus DNA replication in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 11406-10.
- 50 Henle W, Henle G. Evidence for an etiologic relation of the Epstein-Barr virus to human malignancies. *Laryngoscope*. 1977; 87: 467-73.
- Hollis BW, Roos BA, Draper HH, Lambert PW. Vitamin D and its metabolites in human and bovine milk. *J Nutr*. 1981; 111: 1240-8. Holzmann C, Bauer I, Meyer P. Co-occurrence of multiple sclerosis and cancer in a BRCA1 positive family. *Eur J Med Genet*. 2013; 56: 577-9.
- 55 Hsiao FC, Tai AK, Deglon A, Sutkowski N, Longnecker R, Huber BT. EBV LMP-2A employs a novel mechanism to transactivate the HERV-K18 superantigen through its ITAM. *Virology*. 2009; 385: 261-6.
- 60 Hu Knox KK, Brewer JH, Henry JM, Harrington DJ, Carrigan DR. Human herpes virus 6 and multiple sclerosis: systemic active infections in patients with early disease. *Clin Infect Dis*. 2000; 31: 894-903.
- Hyppönen E. Vitamin D and increasing incidence of type 1 diabetes-evidence for an association? *Diabetes Obes Metab*. 2010; 12: 737-43.
- 65 Isik S, Ozuguz U, Tutuncu YA, Erden G, Berker D, Acar K, Aydin Y, Akbaba G, Helvacı N, Guler S. Serum transforming growth factor-beta levels in patients with vitamin D deficiency. *Eur J Intern Med*. 2012; 23: 93-7.

Ito I, Waku T, Aoki M, Abe R, Nagai Y, Watanabe T, Nakajima Y, Ohkido I, Yokoyama K, Miyachi H, Shimizu T, Murayama A, Kishimoto H, Nagasawa K, Yanagisawa J. A nonclassical vitamin D receptor pathway suppresses renal fibrosis. *Clin Invest*. 2013; 123: 4579-94.

James E, Dobson R, Kuhle J, Baker D, Giovannoni G, Ramagopalan SV. The effect of vitamin D-related interventions on multiple sclerosis relapses: a metaanalysis. *Mult Scler*. 2013; 19: 1571-9.

Kakalacheva K, Munz C, Lunemann JD. Viral triggers of multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812: 132-40.

Karner W, Bauer G. Activation of a varicella-zoster virus-specific IgA response during acute Epstein-Barr virus infection. *J Med Virol*. 1994; 44: 258-62.

Koch-Henriksen N, Sorensen PS. Why does the north-south gradient of incidence of multiple sclerosis seem to have disappeared on the northern hemisphere? *J Neurol Sci*. 2011; 311: 58-63.

Koch-Henriksen N, Stenager E, Laursen B. The use of epidemiological multiple sclerosis registers in research: the Danish MS Registry. *Acta Neurol Scand Supl*. 2012; 195: 7-12.

Kotzamani D, Panou T, Mastorodemos V, Tzagournissakis M, Nikolakaki H, Spanaki C, Plaitakis A. Rising incidence of multiple sclerosis in females associated with urbanization. *Neurology*. 2012; 78: 1728-35.

Kurtzke JF. Multiple sclerosis in time and space-geographic clues to cause. *J Neurovirol*. 2000; 6 Supl 2: S134-40.

Kurtzke JF. Epidemiology in multiple sclerosis: a pilgrim's progress. *Brain*. 2013; 136: 2904-17.

Kuusisto H, Hyöty H, Kares S, Kinnunen E, Elovaara I. Human herpes virus 6 and multiple sclerosis: a Finnish twin study. *Mult Scler*. 2008; 14: 54-8.

Latif N, Rana F, Guthrie T. Breast cancer and HIV in the era of highly active antiretroviral therapy: two case reports and review of the literature. *Breast J*. 2011; 17: 87-92.

Lebrun C, Debouverie M, Vermersch P, Clavelou P, Rumbach L, de Seze J, Wiertlewski S, Defer G, Gout O, Berthier F, Danzon A. Cancer risk and impact of disease-modifying treatments in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008; 14: 399-405.

Lemire JM, Adams JS, Sakai R, Jordan SC. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 1984; 74: 657-61.

Libbey JE, Cusick MF, Fujinami RS. Role of pathogens in multiple sclerosis. *Intern Rev Immunol*. Early Online 1-18, 2013; DOI: 10.3/08830185.2013.823422

Liu H, Fu Y, Li B, Yu X, Xie J, Cheng J, Ghabrial SA, Li G, Yi X, Jiang D. Widespread horizontal gene transfer from circular single-stranded DNA viruses to eukaryotic genomes. *BMC Evol Biol*. 26 de septiembre de 2011; 11:276. doi: 10.1186/1471-2148-11-276.

Longkumer T, Kamireddy S, MuthyalaVR, Akbarpasha S, Pitchika GK, Kodetham G, Ayaluru M, Siddavattam D. *Acinetobacter* phage genome is similar to Sphinx 2.36, the circular DNA copurified with TSE infected particles. *Sci Rep* 2013; 3: 2240.doi: 10.1038/srep02240.

Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*. 2000; 47: 707-17.

Magliozzi R, Serafini B, Rosicarelli B, Chiapetta G, Veroni C., Reynolds R, Aloisi F. B-cell enrichment and Epstein-Barr virus infection in inflammatory cortical lesions in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013; 72: 29-41.

Malosse D, Perron H. Correlation analysis between bovine populations, other farm animals, house pets, and multiple sclerosis prevalence, *Neuroepidemiology*. 1993; 12: 15-27.

Marrie RA, Wolfson C. Multiple sclerosis and varicella zoster virus infection: a review. *Epidemiol Infect*. 2001; 127: 315-25. Review.

Matz B, Schlehofer JR, zur Hausen H. Identification of a gene function of herpes simplex virus type 1 essential for amplification of simian virus 40 DNA sequences in transformed hamster cells. *Virology*. 1984; 134: 328-37.

Mesliniene S, Ramrattan L, Goldings S, Sheikh-Ali M. Role of vitamin D in the onset, progression and severity of multiple sclerosis. *Endocr Pract.* 2013; 19: 129-36.

Metz I, Weigand SD, Popescu BF, Frischer JM, Parisi JE, Guo Y, Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. Pathologic heterogeneity persists in early active multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 26 de abril de 2014. doi: 10.1002/ana.24163.

Midgard R, Glatte E, Grønning M, Riise T, Edland A, Nyland H. Multiple sclerosis and cancer in Norway. A retrospective cohort study. *Acta Neurol Scand.* 1996; 93: 411-5.

Mirandola P, Stefan A, Brambilla E, Campadelli-Fiume G, Grimaldi LM. Absence of human herpes virus 6 and 7 from spinal fluid and serum of multiple sclerosis patients. *Neurology.* 1999; 53: 1367-8.

Muller K, Heilmann C, Poulsen LK, Barington T, Bendtzen K. The role of monocytes and T cells in 1,25-dihydroxyvitamin D3 mediated inhibition of B cell function *in vitro*. *Immunopharmacology* 1991; 21: 121-8.

Munger KL, Chitnis T, Frazier AL, Giovannucci E, Spiegelman D, Ascherio A. Dietary intake of vitamin D during adolescence and risk of multiple sclerosis. *J Neurol.* 2011a; 258: 479-85.

Munger KL, Levin LI, O'Reilly EJ, Falk KI, Aschewrio A. Anti-Epstein-Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: a prospective study among United States military personnel. *Mult Scler* 2011b; 17: 1185-93.

Murray TJ. An unusual occurrence of multiple sclerosis in a small rural community. *Can J Neurol Sci.* 1976; 3: 163-6.

Nicoll MP, ProenpaJT, Efstathiou S. The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36: 684-705.

Nielsen NM, Rostgaard K, Rasmussen S, Koch-Henriksen N, Storm HH, Melbye M, Hjalgrim H. Cancer risk among patients with multiple sclerosis: a population-based register study. *Int J Cancer.* 2006; 118: 979-84.

Nora-Krukke Z, Chapenko S, Logina I, Millers A, Platkajis A, Murovska M. Human herpes virus 6 and 7 reactivation and disease activity in multiple sclerosis. *Medicina (Kaunas).* 2011; 47: 527-31.

Nordal HJ, Vandvik B, Norrby E. Multiple sclerosis: local syntheses of electrophoretically restricted measles, rubella, mumps and herpes simplex virus antibodies in the central nervous system. *Scand J Immunol.* 1978; 7: 473-9.

O'Gorman C, Lin R, Stankovich J, Broadley SA, Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology.* 2013; 40: 1-12.

Ohara Y. Multiple sclerosis and measles virus. *Jpn J Infect Dis.* 1999; 52: 198-200. Review.

Olival GS, Lima BM, Sumita LM, Serafim V, Fink MC, Nali LH, Romano CM, Thomaz RB, Cavenaghi VB, Tilbery CP, Penalva-de-Oliveira AC. Multiple sclerosis and herpes virus interaction. *Arq Neuropsiquiatr.* 2013; 71: 727-30.

Ongradi J, Rajda C, Marodi CL, Csiszar A, Vecsei L. A pilot study on the antibodies to HHV-6 variants and HHV-7 in CSF of MS patients. *J Neurovirol.* 1999; 5: 529-32.

Opsahl ML, Kennedy PG Investigating the presence of human herpes virus 7 and 8 in multiple sclerosis and normal control brain tissue. *J Neurol Sci.* 2006; 240: 37-44.

Ordóñez G, Pineda B, García-Navarrete R, Sotelo J. Brief presence of varicella-zoster viral DNA in mononuclear cells during relapses of multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2004; 61: 529-32.

Owens GP, Gilden D, Burgoon MP, Yu X, Bennett JL. Viruses and multiple sclerosis. *Neuroscientist.* 2011; 17: 659-76. Review.

Pakpoor J, Pakpoor J, Disanto G, Giovannoni G, Ramagopalan SV. Cytomegalovirus and multiple sclerosis risk. *J Neurol.* 2013; 260: 1658-60.

Petersen T, Møller-Larsen A, Ellermann-Eriksen S, Thiel S, Christensen T. Effects of interferon-beta therapy on elements in the antiviral immune response towards the human herpes viruses EBV, HSV, and VZV, and to the human endogenous retroviruses HERV-H and HERV-M in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2012; 249: 105-8.

Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Contribution of vitamin D insufficiency to the pathogenesis of multiple

sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord.* 2013; 6: 81-116.

Pisacane A, Impagliazzo N, Russo M, Valiani R, Mandarin A, Florio C, Vivo P. Breast feeding and multiple sclerosis. *BMJ.* 1994; 308: 1411-2.

Pohl D, Rostasy K, Jacobi C, Lange P, Nau R, Krone B, Hanefeld F. Intrathecal antibody production against Epstein-Barr and other neurotropic viruses in pediatric and adult onset multiple sclerosis. *J Neurol.* 2010; 257: 212-6.

Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-binding macromolecules in human B lymphocytes: effects on immunoglobulin production. *J Immunol* 1986; 136: 2734-40.

Rail GF. Measles virus 1998-2002: progress and controversy. *Annu Rev Microbiol.* 2003; 57: 343-67. Review.

Rima BK, Duprex WP. Molecular mechanisms of measles virus persistence. *Virus Res.* 2005; 111: 132-47. Review.

Rosecrans R, Dohnal JC. Seasonal vitamin D changes and the impact on health risk assessment. *Clin Biochem,* 2014; pii: S0009-9120. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.02.004.

Ross RT. The varicella-zoster virus and multiple sclerosis. *J Clin Epidemiol.* 1998; 51: 533-5. Review.

Ruprecht K, Obojes K, Wengel V, Gronen F, Kim KS, Perron H, Schneider-Schaulies J, Rieckmann P. Regulation of human endogenous retrovirus W protein expression by herpes simplex virus type 1: implications for multiple sclerosis. *J Neurovirol.* 2006; 12: 65-71.

Salzer J, Nyström M, Hallmans G, Steenlund H, Wadell G, Sundström P. Epstein-Barr virus antibodies biobank samples. *Mult Scler.* 2013; 19: 1587-91.

Sanders V, Felisan S, Waddell A, Tourtellotte W. Detection of herpesviridae in postmortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. *J Neurovirol.* 1996; 2: 249-58.

Schlehofer JR, Gissmann L, Matz B, zur Hausen H. Herpes simplex virus-induced amplification of SV40 sequences in transformed Chinese hamster embryo cells. *Int J Cancer.* 1983; 32: 99-103.

Schlehofer JR, zur Hausen H. Adenovirus infection induces amplification of persistent viral DNA sequences (simian virus 40, hepatitis B virus, bovine papillomavirus) in human and rodent cells. *Virus Res.* 1990; 17: 53-60.

Schmitt J, Schlehofer JR, Mergener K, Gissmann L, zur Hausen H. Amplification of bovine papillomavirus DNA by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, ultraviolet irradiation, or infection with herpes simplex virus. *Virology* 1989; 172:73-81.

Scott FW. Cow milk and insulin-dependent diabetes mellitus: is there a relationship? *Am J Clin Nutr.* 1990; 51:489-491.

Sepcic J, Mesaros E, Materljan E, Sepic-Grahovac D. Nutritional factors and multiple sclerosis in Gorski Kotar, Croatia. *Neuroepidemiology.* 1993; 12: 234-40.

Simpson S Jr, Taylor B, Dwyer DE, Taylor J, Blizzard L, Ponsonby AL, Pittas F, Dwyer T, van der Mei I. Anti-HHV-6 IgG titer significantly predicts subsequent relapse risk in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2012; 18: 799-806.

Sotelo J, Corona T. Varicella zoster virus and relapsing remitting multiple sclerosis. *Mult Scler Int.* 2011; 2011: 214763.

Sun LM, Lin CL, Chung CJ, Liang JA, Sung FC, Kao CH. Increased breast cancer risk for patients with multiple sclerosis: a nationwide population-based cohort study. *Eur J Neurol.* 19 de septiembre de 2013. doi: 10.1111/ene.12267.

Sundqvist E, Bergström T, Daialhosein H, Nyström M, Sundström P, Hillert J, Alfredsson L, Kockum I, Olsson T. Cytomegalovirus seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2 de septiembre de 2013. [Publicación electrónica previa a la impresión].

Sundström P, Juto P, Wadell G, Hallmans G, Svenningsson A, Nyström L, Dillner J, Forsgren L. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology.* 2004; 62: 2277-82.

Sutkowski N, Chen G, Calderon G, Huber BT. Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP-2A is sufficient for transactivation of the human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen. *Virol.* 2004; 78: 7852-60.

Svejgaard A. The immunogenetics of multiple sclerosis. *Immunogenetics*. 2008; 60: 275-86.

Tai AK, Luka J, Ablashi D, Huber BT. HHV-6A infection induces expression of HERV-K18-encoded superantigen. *J Clin Virol*. 2009; 46: 47-8.

Tan IL, van Schijndel RA, Pouwell PJ, van Walderveen MA, Reichenbach JR, Manoliu RA, Barkhof F. MR venography of multiple sclerosis. *AJNR Am Neuroradiol*. 2000; 21: 1029-42.

Tarrats R, Ordonez G, Rios C, Sotelo J. Varicella, ephemeral breastfeeding and eczema as risk factors for multiple sclerosis in Mexicans. *Acta Neurol Scand*. 2002; 105: 88-94..

Taus C, Pucci E, Cartechini E, Fie A, Giuliani G, Clementi M, Menzo S. Absence of HHV-6 and HHV-7 in cerebrospinal fluid in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2000; 101: 224-8.

Turcanova VL, Bundgaard B, Höllsberg P. Human herpes virus-6B induces expression of the human endogenous retrovirus K18-encoded superantigen. *J Clin Virol*. 2009; 46: 15-9.

Virtanen JO, Jacobson S. Viruses and multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012; 11: 528-44. Review.

Warren TR. The increased prevalence of multiple sclerosis among people who were born and bred in areas where goitre is endemic. *Med Hypotheses*. 1984; 14: 111-4.

Waubant E, Mowry EM, Krupp L, Chitnis T, Yeh EA, Kuntz N, Ness J, Belman A, Milazzo M, Gorman M, Weinstock-Guttman B, Rodriguez M, James JA. Anti-body response to common viruses and human leukocyte antigen-DRB1 in pediatric multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013; 19: 891-5.

Wikström J. Studies on the clustering of multiple sclerosis in Finland. *Riv Patol Nerv Ment*. 1976; 97: 199-204.

Winer S, Astsaturov I, Cheung RK, Schrade K, Gunaratnam L, Wood DD, Moscarello MA, O'Connor P, McKerlie C, Becker DJ, Dosch HM. T cells of multiple sclerosis patients target a common environmental peptide that causes encephalitis in mice. *J Immunol*. 2001; 166: 4751-6.

Wu H, Li T, Zeng M, Peng T. Herpes simplex virus type 1 infection activates the Epstein-Barr virus replicative cycle via a CREB-dependent mechanism. *Cell Microbiol*. 2012; 14: 546-59.

Yea C, Tellier R, Chong P, Westmacott G, Marrie RA, Bar-Or A, Banwell B; Canadian Pediatric Demyelinating Disease Network. Epstein-Barr virus in oral shedding of children with multiple sclerosis. *Neurology*. 2013; 81: 1392-9.

Zerr P, Vollath S, Palumbo-Zerr K, Tomcik M, Huang J., Distler A, Beyer C, Dees C, Gela K, Distler O, Schett G, Distler JH. Vitamin D receptor regulates TGF- β signalling in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 21 de enero de 2014. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204378.

zur Hausen H. Genital papillomavirus infections. *Prog Med Virol*. 1985; 32: 15-21.

zur Hausen, H. y de Villiers, E.M., Dairy cattle serum and milk factors contributing to the risk of colon and breast cancers, *Int. J. Cancer*, 3 de febrero de 2015. doi: 10.1002/ijc.29466

Zwart SR, Mehta SK, Ploutz-Snyder R, Bourbeau Y, Locke JP, Pierson DL, Smith SM. Response to vitamin D supplementation during Antarctic winter is related to BMI, and supplementation can mitigate Epstein-Barr virus reactivation. *J Nutr*. 2011; 141: 692-7.

Referencias (Ejemplos 2-5)

Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schillier JT. 2005. Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. *Methods Mol Med* 119: 445-462.

Caspar Y, Recule C, Pouzol P, Lafeuillade B, Mallaret M, Mairin M, Croize J. *Psychrobacter* *arenosus* bacteremia after blood transfusion, Francia. *Emerging Infectious Diseases* 2013; 19: 1118-1120.

Coton M, Delbes-Paus C, Irlinger F, Desmasures N, Le Fleche A, Stahl V, Montel MC, Coton E. Diversity and assessment of potential risk factors of Gramnegative isolates associated with French cheeses. *Food Microbiol*. 2012; 29:88-98.

- De Filippis F, La Stora A, Villiani F, Ercolini D. Exploring the sources of bacterial spoilers in beefsteaks by culture-independent high-throughput sequencing. PLoS One 2013; 8:e70222.
- 5 del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarria MJ, Espinosa M, Diaz-Orejas R. Replication and control of circular bacterial plasmids. Microbiol Mol. Biol. Rev. 1998; 62:434-464.
- de Villiers EM, Borkosky SS, Kimmel R, Gunst K, Fei JW. The diversity of torque teno viruses: *in vitro* replication leads to the formation of additional replication-competent subviral molecules. J Virol. 2011; 85: 7284-95.
- 10 de Villiers, EM, zur Hausen, H. Concept for the pathogenesis of multiple sclerosis (I): interaction of an amplifying virus and a helper-dependent bovine milk factor. (presentado)
- 15 Funk M, Gunst K, Lucansky V, Muller H, zur Hausen H, de Villiers E-M., Isolation of protein-associated circular DNA from healthy cattle serum, Genome Announcements, 2(4): e00846-14, 2014 Dziewit L, Cegielski A, Romaniuk K, Uhrynowski W, Szych A, Niesiobedzki P, Zmuda-Baranowska MJ, Zdanowski MK, Bartosik D. Plasmid diversity in arctic strains of Psychrobacter spp. Extremophiles. 2013; 17: 433-44
- 20 Ebringer A, Rashid T, Wilson C. Bovine spongiform encephalopathy, multiple sclerosis, and creutzfeldtjakob disease are probably autoimmune diseases evoked by Acinetobacter bacteria. Ann N Y Acad Sci. 2005; 1050: 417-28.
- Lloyd-Puryear M, Wallace D, Baldwin T, Hollis DG. Meningitis caused by Psychrobacter immobilis in an infant. J Clin. Microbiol. 1991; 29: 2041-2042.
- 25 Liu H, Fu Y, Li B, Yu X, Xie J, Cheng J, Ghabrial SA, Li G, Yi X, Jiang D. Widespread horizontal gene transfer from circular single-stranded DNA viruses to eukaryotic genomes. BMC Evol Biol. 2011; 11: 276. doi: 10.1186/1471-2148-11-276.
- 30 Longkumer T, Kamireddy S, MuthyalaVR, Akbarpasha S, Pitchika GK, Kodetham G, Ayaluru M, Siddavattam D. Acinetobacter phage genome is similar to Sphinx 2.36, the circular DNA copurified with TSE infected particles. Sci Rep 2013; 3: 2240.doi: 10.1038/srep02240.
- 35 Martin DP, Biagini P, Lefeuvre P, Golden M, Roumagnac P, Varsani A. Recombination in eukaryotic single stranded DNA viruses. Virus. 2011; 3: 1699-738.
- Rosario K, Duffy S, Breitbart M. 2012a. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. Arch. Virol. 157: 1851-1871.
- 40 Rosario K, Dayaram A, Marinov M, Ware J, Krabberger S, Stainton D, Breitbart M, Varsani A. 2012b. Diverse circular ssDNA viruses discovered in dragonflies (Odonata: Epiprocta). J Gen. Virol. 93:2668-2681.
- Sikorski A, Massaro M, Krabberger S, Young LM, Smalley D, Martin DP, Varsani A. 2013. Novel myco-like DNA viruses discovered in the faecal matter of various animals. Virus Res. 177:209-216.
- 45 zur Hausen H, de Villiers EM. Prenatal Infections with Subsequent Immune Tolerance Could Explain the Epidemiology of Common Childhood Cancers. World Cancer Report 2014, IARC Lyon, pág. 261-265_.
- 50 de Villiers E-M, zur Hausen H. Concept for the pathogenesis of multiple sclerosis (I): Interaction of an amplifying virus and a helper-dependent bovine milk factor. (presentado).
- 55 del Val C, Ernst P, Falkenhahn M, Fladerer C, Glatting KH, Suhai S, Hotz-Wagenblatt A. 2007. ProtSweep, 2DSweep and DomainSweep: protein analysis suite at DKFZ. Nucleic Acids Res. 35 (Web Server i-ssue):W444-450.
- 60 Chattoraj DK. 2000. Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. Mol. Microbiol. 37: 467-476.
- 65 zur Hausen H. 2001. Proliferation-inducing viruses in non-permissive systems as possible causes of human cancers. Lancet 357: 381-384.
- Whitley C, Gunst K, Muller H, Funk M, zur Hausen H, de Villiers E-M., Novel replication-competent circular DNA molecules from healthy cattle serum, milk and multiple sclerosis-affected human brain tissue, Genome Announcements 2(4): e00849-1-4, 2014. Lamberto I, Gunst K, Muller H, zur Hausen H, de Villiers E-M. Mycovirus-like DNA virus sequences from cattle serum, human brain and serum from multiple sclerosis patients, Genome Announcements 2(4): e00848-14, 2014

Gunst K, zur Hausen H, de Villiers E-M., Isolation of bacterial plasmid-related replication-associated circular DNA from serum sample of a multiple sclerosis patient, Genome announcement 2(4), e00847-14, 2014

REIVINDICACIONES

1. Un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 que comprende:
 - 5 (a) una secuencia de nucleótidos representada en la figura 1(c) o 1(d);
 - (b) una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de (a); o
 - (c) una secuencia de nucleótidos que es redundante como resultado de la degeneración del código genético en comparación con cualquiera de las secuencias de nucleótidos dadas anteriormente.
- 10 2. Un cebador oligonucleotídico que comprende parte de un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 de la reivindicación 1, pudiendo dicho cebador actuar como cebador para secuenciar específicamente o amplificar específicamente el ácido nucleico de determinados aislados que contienen una secuencia de nucleótidos como se define en la reivindicación 1.
- 15 3. Una sonda oligonucleotídica que comprende parte de un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 de la reivindicación 1, pudiendo dicha sonda actuar como sonda de hibridación para la detección específica del ácido nucleico de determinados aislados que contienen una secuencia de nucleótidos de la reivindicación 1.
- 20 4. Un vector de expresión que comprende un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, unido de forma funcional a elementos de control de la transcripción y de la traducción procariotas, eucariotas o víricos.
5. Una célula hospedadora transformada o modificada con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4.
- 25 6. Un polipéptido que está codificado por un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 de la reivindicación 1.
7. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un polipéptido de la reivindicación 6.
- 30 8. Un método para la detección de un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 de acuerdo con la reivindicación 1 en una muestra biológica, que comprende: (a) extraer opcionalmente ácido polinucleico de muestra, (b) amplificar el ácido polinucleico como se describe anteriormente con al menos un cebador de acuerdo con la reivindicación 2, opcionalmente un cebador marcado y (c) detectar el ácido polinucleico amplificado.
- 35 9. Un método para la detección de un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 de acuerdo con la reivindicación 1 en una muestra biológica, que comprende: (a) extraer opcionalmente ácido polinucleico de muestra, (b) hibridar el ácido polinucleico como se describe anteriormente con al menos una sonda de acuerdo con la reivindicación 3, opcionalmente una sonda marcada y (c) detectar el ácido polinucleico hibridado.
- 40 10. Un método para detectar un polipéptido de la reivindicación 6 o un anticuerpo de la reivindicación 7 presente en una muestra biológica, que comprende: (a) poner en contacto la muestra biológica para la presencia y/o la concentración de dicho polipéptido o anticuerpo como se define anteriormente y (b) detectar el complejo inmunológico formado entre dicho anticuerpo y/o dicho polipéptido.
- 45 11. Un oligonucleótido de antisentido que reduce o inhibe la expresión de un ácido polinucleico MSBI1.176 o MSBI2.176 de la reivindicación 1 o un vector que contiene dicho oligonucleótido de antisentido.
- 50 12. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 7 o el oligonucleótido de antisentido de la reivindicación 11 y un vehículo farmacéutico adecuado.

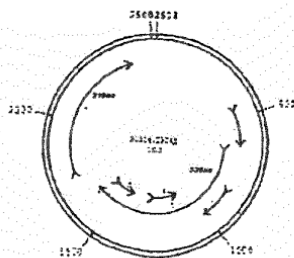
HCBI6.252 (2522pb)

(Idéntico a CMI1.252)

(ri55.NnXn.2300.7)

TTTTGTTTTTCAAAGGAAGTAATTAGCGAGTGTCTACGAGCGACACAATGAAAGTTCGATTATTCCTCCTCTAA
 AAAACCGCTTTTAAAAATATTGGTTGCTAGATGGTTTTAACTATCGTGAGCTTTTGCTTTTAAAAATACACGAGC
 AAAGCGAGTTCATAGTCGCTTTTGATCTGCTCTTACTAACAGCTCATTTTTAATGGGCCGTTAGTAAGAGATGCT
 TTTGGGGTTTCGGGGCTTGCCCTGAACAAGGTCACAAAGTGGGAATTTATCACGGTAGTGAAAAAGTACCTTTG
 TGTATCCTTGCTTTATGCTTTTAAACCTTTGAACCTTTCCCTTAATTTGCAGAAATTGCCCTCGACTAAGCTT
 GCTTAGTCAAAAAAGTTTGAGCAAGCGAAAAACATAGGGCAATTTTCATGATGAAAAATGGGCTTTTAAAGTTTTT
 AAATGCTTTTAAATGCTTTTGAACATGTTGAAATGCAAGCCTAGCAAGGCATACAGAGGACATACCCCTACGTTT
 ACCGATCAATACCCCTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTACGTTGTCAT
 ATCACTACAAACAATATTAATGTAGTAATACTTCAAAATAATAATGTAGGTTATGAGCGATTTAATAGTAAAA
 GATAACGCCCTAATGAACGCTAGTTACAACCTAGCTTTGGTTGAACAGCGTTAATCCTTTAGCTATATTGGAA
 GCGAGAGAAAACAGGCAAGGATTAATGCCAATGATCCCTTAACAGTTCATGCAAGTAGCTATATCAATCAATTT
 AACGTGGAAAGACATACGGCATATCAAGCATTAAAAAGATGCTTGCAAGACTTGTTCACGCTCAATTTAGTTAC
 CAAGAAAAGCGAGAACGTGGACGAATTAATATTACAAGTCGATGGGTTTCACAAATTGGTTATATGGACGATACA
 GCAACCGTTGAAATTATTTTGGCCCTGCGGTTGTTCTTTGATTACACGTTTAGAGGAACAATTCCTCAATAC
 GATATTGAACAAATTAGCGAGTTATCGAGTGCTTATGCTGTCCGCTATATGAGTTACTAATTTGTTGGCGTAGC
 ACAGGAAAAACCCCAATTATTGATCTAACAGAGTTTAGAAAGCGTCTAGGTGTTTTAGATACCGAATACACTAGA
 ACAGATAACTTGAAGATGCGAGTGATTGAGCTAGGACTTAAACAAATCAACGAGCATACGGACATTACAGCAAGC
 TAGGAACAGCACAAAAAGGGCGGACAATCACAGGATTCTCATTCAAGTTTAAGCAGAAGAAGAAAAACAGGGGCG
 GAAATGcCAAAAAATAGCGATTCTAGCCACATATCGAAAAACCTAGTCAATCCCTGCCAACATCGCAAAACAG
 CCTGAAATGcCAAAAAAGATGATTTAGGGCACAGAGCAAGCAAGATTACAGGGTTAATTATGTCTGAATGGTTT
 AGCAGATCGGTTTAAACGTGGTGATGAGTCAGTAATAGACATGATGAAACGCATCAAGAGGAAATTACAACGA
 TACAACAGCAGACCAATGGGAAAACAAGCTAGAAGAATTTGGCGTGATTTTCAGTCATGATCAATTTCCCGAAG
 GACATATAAAAAATATGTAGTTAAATATAGTAGTTATAATATTGACTACAATATTTAACTACTATATTGTAGTC
 TTAATCAACTTACATAGAATTTAAATTATGTCTCTTCGCCAAATTTAGAACAATCTCTCTTTGATCAAACCTGA
 TGAAAGCTCTACTGTGCCACTATCAATTAGACTTCCAAACAACCTGAATAATGAGCTTGAAGAAGTACTATAAC
 ACTAGATAAATCCAAGAGTTTTCTACTCCTAGAGTTTATTAGGCTGGAATTAGTGAGACTAGCAATATGTTAGA
 AGACAAAGCGAAGAACCCTATACTTGAAAGTCCAAGAGATTCTAGTGACTTTACAACCTCATAGAAGTTTATGTT
 GAACACTAATTTCAATAACAATAAAGCATCACACATGACTATGTTGGAGAATCAAGAAGCTGCTGCATTTCTGTA
 AGGTTGGAAAGAATATATCTGTAATTTAGAAGAAGCGGATAGGTTTACCTTTATCAAAGTGGCGTTGGTTTTGT
 AGCATCTGGTATTGTCACTGGTGACTTAATCAAAGTGAGTATCGTGGACAACCAGAAGAAAAATATTCTAAAA
 ATAAAGGATTTTAAATAGGATTTAAAGCAATTTCTGCAAAAGAGTTTAAGACCTTAAGTGGCGGTGGTGCTAGC
 TTTTCGTACAACAATGAGCGAGCTAAAGCCTGAACAATGTAGAAAATTAGATATGGAAATAGAAAAACGGATGAAG
 TCAGTAAGTTAAAAATATGAGTTGTTGTTTTAGTGTGTCACGTAGCAATCACTTAGAAGTTCCCTTTGTATTACT
 TGTCTAGCAATGGTTTTAAAAAGCGTCACTACTGATAGTGACGCTTT

ATACCCCTACGTTTACCGATCA - repetición 3x + 17nt



Similitud de nucleótidos de un 86 % con aislado de ADN circular asociado a TSE Sphinx 1.76

ORF: 326aa-similitud de un 85 % con proteína de tipo replicasa 3 de Sphinx1.76

Figura 1(a)

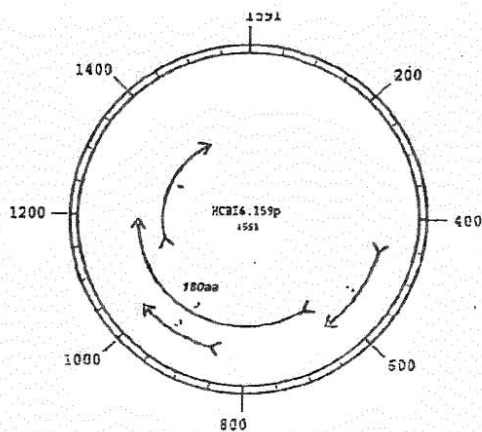
HCB16.159 (1591pb)

(ri55.NnXn.1600.5)

TTTTGTTTTTCAAAGGAAGTAATTGGCGAGTGTCTACGAGCGACACAATGAAAGTTCGATTATTCCCT
CCTCTAAAAAACCGCTTTTAAAAATATTGGTTGCTAGATGGTTTTAACTATCGTGAGCTTTTGCTTTT
AAAAATACACGAGCAAAGCGAGTTCATAGTCGCTTTTGATCTGCTCTTACTAACAGCTCATTTTTAAT
GGGCCGTTAGTAAGAGATGCTTTTGGGGTTTCGGGGCTTGCCCTGAACAAGGTCACAAAGTGGGAATT
TATCACGGTAGTGAAAAAGTACCCTTTGTGTATCCTTGCTTTATGCTTTTTAAACCTTTGAACTTTTC
CCTTAATTTGCAGAAATTGCCCTCGACTAAGCTTGCTTAGTCAAAAAAGTTTGAGCAAAGCGAAAAAC
ATAGGCAATTTTCATGATGAAAATGGGCTTTTAAAGTTTTTAAATGCTTTTAAATGCTTTTAGACAT
GTTGAAATGCAAGCCTAGCAAGGCACACAGAGGACATACCCCTGCGTTTACCGATCAATACCCCTACG
TTTACCGATCAATACCCCTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTACCTTGCATATCACTACAAAC
AATATTAATGTAGTAATAACTTCAAAATAATAAATGTAGGTTATGAGCGATTTAATAGTAAAAGATAA
CGCCCTAATGAACGCTAGTTACAACCTAGCTTTGGTTGAACAGCGTTTAACTCCTTTAGCTATATTGG
AAGCGAGAGAAACAGGCAAAGGGATTAATGCCAATGATCCCTTAACAGTTCATGCAAGTAGCTATATC
AATCAATTTAACGTGGAAGACATACGGCATATCAAGCATTAAAAGATGCTTGCAAAGACTTGTTTGC
ACGTCATTTAGTTACCAAGAAAAGCGAGAACGTGGACGAATTAATATTACAAGTCGATGGGTTTCAC
AAATTGGTTATATGGACGATACAGCAACCGTTGAAATTATTTTTGCCCTGCGGTTGTTCTTTGATT
ACACGTTTAGAGGA "ACAATTCACCTCAATACGATATTGAACAAATTAGCGAGTTATCGAGTGCTTATG
CTGTCCGCCTATATGAGTTACTAATTTGTTGGCGTAGCACAGGACTATGTTGGAGAATCAAGAAGCTG
CTGCATTTTCGTAAGGTTGGAAAAGATATATCTGTAATTTAGAAGAAGGCGATAAGGTTTACCTTTAT
CAAAGTGGCGTTGGTTTTGTAGCATCTGGTATTGTCACTGGTGACTTAATCAAAAGTGAGTATCGTGG
ACAACCAGAAGAAAAATATTCTAAAAAATTAAAGGATTTTAAATAGGATTTAAAGCAATTTCTGCAA
AAGAGTTTAAAGACCTTAACCTGGCGGTGGTGCTAGCTTTTCGTACAACATGAGCGAGCTAAAGCCTGAA
CAATGTAGAAAATTAGATATGGAATAGAAAAACGGATGAAGTCAGTAAGTTAAAAATATGAGTTGTT
GTTTGTAGTGTGTACGTAGCAATCACTTAGAAGTTCCCTTTGTATTACTTGTCTAGCAATGGTTTTAA
AAAGCGTCACTACTGATAGTGACGCTTT

ATACCCCTACGTTTACCGATCA -repetición 3x + 17nt

" - La secuencia de HCB16.159 es igual a HCB16.252 excepto que se han eliminado los nt 1132-2163. Ambas secuencias se generaron por los mismos cebadores consecutivos.



Similitud de nucleótidos de un 89 % con el aislado de ADN circular asociado a TSE Sphinx 1.76

ORF 180aa - Similitud de un 96 % con similitud a la proteína de tipo replicasa 3 de Sphinx1.76

Figura 1(b)

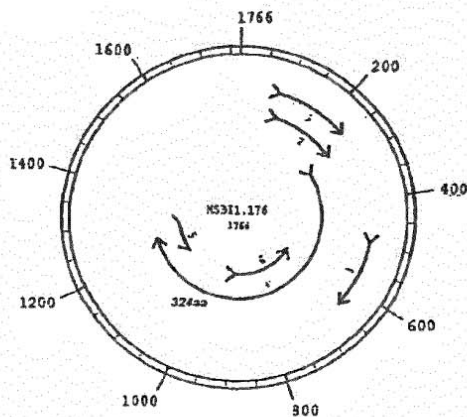
MSBI1.176 (1766pb)

(MSBI = Aislado cerebral de esclerosis múltiple)

(ms36.NnXn.1800.6)

AAGCTTGCTTAGTCAAAAAAGTTTGAGCAAAGCGAAAACATAGGGCAATTTTCATGAAGAAATTGGGCTTTTAAAGTTTTAA
 ATGCTTTTAAATGCTTTTAGACATGCTAAGAAGCCACACAGCAAGGCATACAGAGGACATTCCTCCTACGTTTACCGATCAAT
 ACCCTTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTACGTTGCGTATAACTACAAAGAATACT
 AGTGTAGTAATAACTTCAAAAGAATAATTGTAGGTTATGAGCGATTTAATAGTAAAAGATAACGCCCTAATGAATGCTAGTTA
 TAACCTTAGCTTTGGTTGAACAGAGGTTAATTCATTAGCAATCATAGAAGCGAGAGAAACAGGCAAAGGGATTAATGCCAATG
 ATCCTTTAACAGTTCATGCAAGTAGCTATATCAATCAATTTAACGTAGAAAGGCATACGGCATATCAAGCCCTCAAAGATGCT
 TGTAAAGACTTGTGTTGCCCGTCAATTCAAGTTACCAAGAAAAGCGAGAACGAGGACGAATTAATATTACAAGTCGATGGGTTTC
 GCAAATTGGCTATATGGACGATACAGCAACCGTTGAGATTATTTTGCCCTGCGGTTGTTCTCTGATTACAGGCTAGAGG
 AACAGTTCACCCAGTACGATATTGAGCAAATTAGCGGTTTATCGAGTGCATATGCTGTTCTGATGTACGAAGTCTGATTGTT
 TGGCGTAGCAGGCAAACACCAATTATGAGCTAGACGAGTTAGAAAGCGAATAGGTGTTTATAGATACTGAATACACTAG
 AACAGATAATTTAAGATGCGAGTTATTGAATTAGCCCTAAAACAAATCAACGAACATACAGACATCACAGCAAGCTATGAAC
 AACACAAAAAGGGCGAGTGATTACAGGATTCTCATTCAAGTTTAAGCACAAGAAACAAAACAGCGATAAAACGCCAAAAAAT
 AGCGATTCTAGCCCACGTATCGTAAACATAGTCAAATCCCTACCAACATTGTAACACAGCCTGAAAACGCCAAAAATGAGCGA
 TTTAGAACATAGAGCGAGCGTGTACAGGGGAAATAATGCGAAATCGTCTGTGATCGGTTTAAACAGGCGATGAATCAG
 CAATCGACATGATGAACGTATTCAAAGTGAATAATAACCGATGCAATAGCAGACCAGTGGGAAAGCAAACCTGGAGGAGTTT
 GCGGTGGTTTTTATGTCATGACGATTTCCGGAAGGGCGCACTTAGCCATTGAGAAAAATCTTCGATTTTTCAATGGAAGTCC
 GTGGGGGTAAACCCCTCAACCCCAAAAGCAAACACTGTAAATCAGGGAAAAACATTTTTGATTTTGATCCTTGTGTTGTCAC
 TCGTAGACACTCGTTTTGTTTTGCTCTTTCTAGAATTCAAAAAAGATATTAGCGAGTGTCTACGAGCGACTCAATGAAAGT
 TCGATTATTCCCCCTCTGGAAAACCGCTTTTAAAAATATTGGCTGCTAGATGGTTTTACTATAGTGAGGTTTTGCTTTTAAA
 AAAACACGAGCAAAGCGAGTTTCATAGTTGCTTTTGCTTGTGTTTCGGGTCTTAGGGGAAATCCCTAACAAAGTCTCGAATATC
 AAAATGTGGCTACATTTTGTATATACGGGTAGGCTTGCTTAATTGATTTTTTCTTCTAAACCTTGACTTCTTCCCATTTG
 TTTGCAGAAATTGCCCTCGACT

Repetición— 3x 22nt + 17nt



Similitud de nucleótidos de un 98 % con el aislado de ADN circular asociado a TSE Sphinx 1.76

ORF: 324aa - Similitud de un 97 % con la proteína de replicación de Sphinx 1.76

Figura 1(c)

Blastn - Geall:

>>>nrnuc:GI_313507477 GI|313507477|gb|HQ444404.1| Asociado a TSE... 2491 0,0
 >>>nrnuc:GI_347602273 GI|347602273|gb|JN541306.1| Sin cultivar... 0,0

>>>>nrnuc:GI_313507477 GI|313507477|gb|HQ444404.1| Aislado de ADN circular asociado a TSE
 Sphinx 1,76, secuencia completa. 0/0
 Longitud=1758

Puntuación = 2491 bits (2762), Expectativa = 0,0
 Identidades = 1419/1439 (98%), Huecos = 5/1439 (0%)
 Hebra=Más/Más

Consulta 1	AAGCTTGCTTAGTCAAAAAAGTTTGAGCAAAGCGAAAAACATAGGGCAATTTTCATGAAGA	60
Objeto 325	AAGCTTGCTTAGTCAAAAAAGTTTGAGCAAAGCGAAAAACATAGGGCAATTTTCATGAAGA	384
Consulta 61	AATTGGGCTTTTAAAGTTTTTAAATGCTTTTAAATGCTTTTAGACATGCTAAGAAGCCCA	120
Objeto 385	AATTGGGCTTTTAAAGTTTTTAAATGCTTTTAAATGCTTTTAGACATGCTAAGAAGCCCA	443
Consulta 121	CACAGCAAGGCATACAGAGGACATTCTCCTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTAC	180
Objeto 444	CACAGCAAGGCATACAGAGGACATTCTCCTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTAC	501
Consulta 181	CGATCAATACCCCTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTACCTTGCGTATAACTACA	240
Objeto 502	CGATCAATACCCCTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTACCTTGCGTATAACTACA	561
Consulta 241	AAGAATACTAGTGTAGTAATAACTTCAAAGAATAATTGTAGGTTATGAGCGATTTAATA	300
Objeto 562	AAGAATACTAGTGTAGTA-TAACTTCAAAGAATAATTGTAGGTTATGAGCGATTTAATA	620
Consulta 301	GTAAGAATAACGCCCTAATGAATGCTAGTTATAACTTAGCTTTGGTTGAACAGAGGTTA	360
Objeto 621	GTAAGAATAACGCCCTAATGAATGCTAGTTATAACTTAGCTTTGGTTGAACAGAGGTTA	680
Consulta 361	ATTCTATTAGCAATCATAGAAGCGAGAGAAACAGGCAAGGGATTATGCCAATGATCCT	420
Consulta 681	ATTCTATTAGCAATCATAGAAGCGAGAGAAACAGGCAAGGGATTATGCCAATGATCCT	740
Consulta 421	TTACAGTTCATGCAAGTAGCTATATCAATCAATTTAACGTAGAAAGGCATACGGCATAT	480
Objeto 741	TTACAGTTCATGCAAGTAGCTATATCAATCAATTTAACGTAGAAAGGCATACGGCATAT	800
Consulta 481	CAAGCCCTCAAAGATGCTTGTAAGACTTGTTTGCCCGTCAATTCAGTTACCAAGAAAAG	540
Objeto 801	CAAGCCCTCAAAGATGCTTGTAAGACTTGTTTGCCCGTCAATTCAGTTACCAAGAAAAG	860
Consulta 541	CGAGAACGAGGACGAATTAATATTACAAGTCGATGGGTTTCGCAATTGGCTATATGGAC	600
Objeto 861	CGAGAACGAGGACGAATTAATATTACAAGTCGATGGGTTTCGCAATTGGCTATATGGAC	920
Consulta 601	GATACAGCAACCGTTGAGATTATTTTGGCCCTGCGGTTGTTCTCTGATTACACGGCTA	660
Objeto 921	GATACAGCAACCGTTGAGATTATTTTGGCCCTGCGGTTGTTCTCTGATTACACGGCTA	980

Consulta 661	GAGGAACAGTTCACCCAGTACGATATTGAGCAAATTAGCGGTTTATCGAGTGCATATGCT	720
Objeto 981	GAGGAACAGTTCACCCAGTACGATATTGAGCAAATTAGCGGTTTATCGAGTGCATATGCT	1040
Consulta 721	GTTTCGTATGTACGAACTGCTGATTGTTGGCGTAGCACAGGCAAAACACCAATTATTGAG	780
Objeto 1041	GTTTCGTATGTACGAACTGCTGATTGTTGGCGTAGCACAGGCAAAACACCAATTATTGAG	1100
Consulta 781	CTAGACGAGTTTAGAAAGCGAATAGGTGTTTTAGATACTGAATACACTAGAACAGATAAT	840
Objeto 1101	CTAGACGAGTTTAGAAAGCGAATAGGTGTTTTAGATACTGAATACACTAGAACAGATAAT	1160
Consulta 841	TTAAAGATGCGAGTTATTGAATTAGCCCTAAAACAAATCAACGAACATACAGACATCACA	900
Objeto 1161	TTAAAGATGCAAGTTATTGAATTAGCCCTAAAACAAATCAACGAACATACAGACATCACA	1220
Consulta 901	GCAAGCTATGAACAACACAAAAAGGGCGAGTGATTACAGGATTCTCATTCAAGTTTAAG	960
Objeto 1221	GCAAGCTATGAACAACACAAAAAGGGCGAGTGATTACAGGATTCTCATTCAAGTTTAAG	1280
Consulta 961	CACAAGAAACAAAACAGCGATAAAACGCCAAAAATAGCGATTCTAGCCCACGTATCGTA	1020
Objeto 1281	CACAAGAAACAAAACAGCGATAAAACGCCCTGATACTAACGCTTCTAGCCCACGTATCGTA	1340
Consulta 1021	AAACATAGTCAAATCCCTACCAACATTGTAACAGCCTGAAAACGCCAAAATGAGCGAT	1080
Objeto 1341	AAACATAGTCAAATCCCTACCAACATTGTAACAGCCTGAAAACGCCAAAATGAGCGAT	1400
Consulta 1081	TTAGAACATAGAGCGAGCCGTGTTACAGGGGAAATAATGCGAAATCGTCTGTCAGATCGG	1140
Objeto 1401	TTAGAACATAGAGCGAGCCGTGTTACAGGGGAAATAATGCGAAATCGTCTGTCAGATCGG	1460
Consulta 1141	TTTAAACAAGGCGATGAATCAGCAATCGACATGATGAAACGTATTCAAAGTGAATAATA	1200
Objeto 1461	TTTAAACAAGGCGATGAATCAGCAATCGACATGATGAAACGTATTCAAAGTGAATAATA	1520
Consulta 1201	ACCGATGCAATAGCAGACCAGTGGGAAAGCAAACCTGGAGGAGTTTGGCGTGGTTTTTAG	1260
Objeto 1521	ACCGATGCAATAGCAGACCAGTGGGAAAGCAAACCTGGAGGAGTTTGGCGTGGTTTTTAG	1580
Consulta 1261	TCATGACGATTTCCCGAAGGGCGCACTTAGCCATTGAGAAAAATCTTCGATTTTTCAAT	1320
Objeto 1581	TCATGACGATTTCCCGAAGGGCGCACTTAGCCATTGAGAAAAATCTTCGATTTTTCAAT	1640
Consulta 1321	GGAAGTCCGTGGGGGTAAACCCCTCAACCCCAAAAGCAAAAACACTGTAATCAGGGAAAA	1380
Objeto 1641	GGAAGTCCGTGGGGGTAAACCCCTCAACCCCAAAAGCAAAAACACTGTAATCAGGGAAAA	1700
Consulta 1381	AACATTTTGTATTTTGATCCTTGTGTTGCTACTCGTAGACACTCGTTTGTGTTTGTCTT	1439
Objeto 1701	AACATTTTGTATTTTGATCCTTGTGTTGCTACTCGTAGACACTCGTTTGTGTTTGTCTT	1758
Puntuación= 587 bits (650), Expectativa = 2e-163		
Identities = 325/325 (100%), Huecos = 0/325 (0%)		
Hebra = Más/Más		
Consulta 1440	TCTAGAATTCAAAAAAGATATTAGCGAGTGTCTACGAGCGACTCAATGAAAGTTTCGAT	1499
Objeto 1	TCTAGAATTCAAAAAAGATATTAGCGAGTGTCTACGAGCGACTCAATGAAAGTTTCGAT	60
Consulta 1500	TATTCCCCTCTGGAAAACCGCTTTTAAAAATATTGGCTGCTAGATGGTTTTACTATAG	1559
Objeto 61	TATTCCCCTCTGGAAAACCGCTTTTAAAAATATTGGCTGCTAGATGGTTTTACTATAG	120
Consulta 1560	TGAGGTTTGTCTTTTaaaaaaCACGAGCAAAGCGAGTTCATAGTTGCTTTTGCTTGTGTT	1619
Objeto 121	TGAGGTTTGTCTTTTAAAAAACACGAGCAAAGCGAGTTCATAGTTGCTTTTGCTTGTGTT	180
Consulta 1620	TCGGGTCTTAGGGGAAATCCCTTAACAAGTCCCTCGAATATCAAAATGTGGCTACATTTTG	1679
Objeto 181	TCGGGTCTTAGGGGAAATCCCTTAACAAGTCCCTCGAATATCAAAATGTGGCTACATTTTG	240
Consulta 1680	TATATACGGGTAGGCTTGCTTATTTGATtttttttCTTCTAAACCTTTGACTTCTTCCCC	1739
Objeto 241	TATATACGGGTAGGCTTGCTTATTTGATTTTTTTCTTCTAAACCTTTGACTTCTTCCCC	300
Consulta 1740	ATTGTTTGCAGAAATTGCCCTCGA	1764

Objeto 301 |||||
 ATTGTTTGCAGAAATTGCCCTCGA 325

BlastP - Uniprot:

ORF 324aa:



>>>sptrembl:E5LG72_9ZZZZ E5lg72 Subnombre: Completo=de tipo replicasa 3-lin... 658 0,0
 >>>sptrembl:N9LWE7_9GAMM N9lwe7 Subnombre: Completo=sin caracterizar... 569 5e-160

>>>sptrembl:E5LG72_9ZZZZ E5lg72 Subnombre: Completo=proteína de tipo replicasa 3;. 5/2013
 Longitud=324
 Puntuación = 658 bits (1698), Expectativa= 0,0, Método: Ajuste de matriz composicional.
 Identities = 316/324 (97%), Positivos = 319/324 (98%), Huecos= 0/324 (0%)

Consulta 1	MSDLIVKONALMNASYNLALVEQRLILLAIIEARETGKGINANDPLTVHASSYINQFNVE	60
Objeto 1	MSDLIVKONALMNASYNLALVEQRLILLAIIEARETGKGINANDPLTVHAGSYINQFNVE	60
Consulta 61	RHTAYQALKDACKDLFARQFSYQEKREGRINITSRWVSQIGYMDTATVEIIFAPAVVP	120
Objeto 61	RHTAYQALKDACKDLFARQFSYQEKREGRINITSRWVSQIGYMDTATVEIIFAPAVVP	120
Consulta 121	LITRLEEFTQYDIEQISGLSSAYAVRMYELLCWRSTGKTPPIELDEFKRIGVLDTEY	180
Objeto 121	LITRLEEFTQYDIEQISGLSSAYAVRMYELLCWRSTGKTPPIELDEFKRIGVLDTEY	180
Consulta 181	TRTDNLKMRVIELALKQINEHTDITASYEQHKGRVITGFSFKHKKQNSDKTPKNSDS	240
Objeto 181	TRTDNLKMRVIELALKQINEHTDITASYEQHKGRVITGFSFKHKKQNSDKTPKNSDS	240
Consulta 241	SPRIVKHSQIPTNIVKQENAKMSDLEHRASRVTEIMNRNLSDRFKQDESADMMKRI	300
Objeto 241	SPRIVKHSQIPTNIVKQENAKMSDLEHRASRVTEIMNRNLSDRFKQDESADMMKRI	300
Consulta 301	QSEIITDAIADQWESKLEEFVVF 324	
Objeto 301	QSEIITDAIADQWESKLEEFVVF 324	

>>>sptrembl:N9LWE7_9GAMM N9lwe7 Subnombre: Completo=Proteína sin caracterizar;. 12/2013
 Longitud=324

Puntuación = 569 bits (1467), Expectativa = 5e-160, Método: Ajuste de matriz composicional.
 Identities = 272/324 (83%), Positivos = 294/324 (90%), Huecos= 0/324 (0%)

Consulta 1	MSDLIVKONALMNASYNLALVEQRLILLAIIEARETGKGINANDPLTVHASSYINQFNVE	60
Objeto 1	MSDLIVKONALMNASYNLALVEQRLILLAIIEARETGKGINANDPLTVHAGSYINQFNVE	60
Consulta 61	RHTAYQALKDACKDLFARQFSYQEKREGRINITSRWVSQIGYMDTATVEIIFAPAVVP	120
Objeto 61	RHTAYQALKDACKDLFARQFSYQEKREGRINITSRWVSQIGYMDTATVEIIFAPAVVP	120
Consulta 121	LITRLEEFTQYDIEQISGLSSAYAVRMYELLCWRSTGKTPPIELDEFKRIGVLDTEY	180
Objeto 121	LITRLEEFTQYDIEQISGLSSAYAVRMYELLCWRSTGKTPPIELDEFKRIGVLDTEY	180

Objeto 121 LITRLEKQFTQYDIEQISGLSSAYAVRMYELICWRSTGKTPVIELGEFRKRIGVLDTEY 180
 Consulta 181 TRTDNLKMRVIELALKQINEHTDITASIEQHKKGRVITGFSFKFKHKKQNSDKTPKNSDS 240
 RTDNLKMRVIELALKQIN+HTDITA+YEQHKKGR ITGFSFKFK K++ +TPKNSDS
 Objeto 181 IRTDNLKMRVIELALKQINDHTDITATYEQHKKGRITITGFSFKFKQKRKTELETPKNSDS 240
 Consulta 241 SPRIVKHSQIPTNIVKQPENAKMSDLEHRASRVTGEIMRNRLSDRFKQGDSEAIMMKRI 300
 K +IPTN+VKQPEN MSDL+HRAS++TG IM NRLSDRFKQ DES + MM RI
 Objeto 241 DVPKQKSVEIPTNLVKQPENANMSDLQHRASKITGLIMSNRLSDRFKQSDSEIMQMARI 300
 Consulta 301 QSEIITDAIADQWESKLEFGVVF 324
 QSEI +AIA+QWE+KLEFGV+F
 Objeto 301 QSEITDEAIANQWENKLEFGVIF 324

ProtSweep

Una herramienta de identificación de proteínas

Resultados para /home/vir088/rindneu/tsekompl/MSBII.176.324.pep

Número de residuos: 324	Peso molecular: 37,29 kD
Carga: 1	Punto isoelectrico: 8,14
más ...	
Predicción de ubicación de la proteína:	
Citop.	13 %
Citop. nucl.	10,5 %
Extr.	10 %

Proteína y transcrito identificado

Proteína:
 Id: sptrembl:E51G72_92ZZZ
 Valoración: homólogo
 Organismo científico: Tupaia belangeri
 Organismo común: Tupaya común
 Resumen: E51G72 Subnombre: Completo=proteína de tipo replicasa 3 5/2013 Longitud=324
 Isoforma:

Información GO:

Acceso	Grupo	Nombre	Evidencia
GO:0005727	Componente celular	ADN circular extracromosómico	IEA:InterPro
GO:0003887	Función molecular	Actividad de ADN polimerasa dirigida por ADN	IEA:InterPro
GO:0006270	Proceso biológico	Iniciación de replicación de ADN	IEA:InterPro

Información interpro:

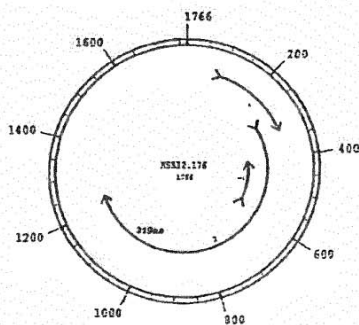
Id	Nombre corto
IPR000525	Initiator_Rep_prot
IPR011991	WHTH_DNA-bd_dom

MSB12.176 (1766pb)

(ms36.NnXn.1800.6)

AAGCTTGCCTTAGTCAAAAAAGTTTGAAGCAAGCGAAAAACATAGGGCAATTTTCGTGATGAAAAATGGGCTTTTAAATGTTTTTAA
 ATGCTTTTAAATGCTTTTACACATGCTGAAACGCTTATATAGCAATGCATACAGAGGACATATGTCACGTTTACCTATCAAT
ATGTCACGTTTACCTATCAATATGTCACGTTTACCTATCAATATGTCACGTTTACCTTCGCTATTTACACACATTTAAAT
 AGTATGGATATATCCAATGAAATTATAATGTGTACTTATGAGCAAAATAGTAGTGAAAGACAATGCCCTAATGAACGCTAGTT
 ACAACTTGGATCTCGTTGAACAGCGTTTAAATCTATTGGCAATCATCGAAGCAAGAGAATCAGGCAAGGAATTAATGCAAAAT
 GACCCGCTTACGGTTTCATGCAGAGAGTTATATCAATCAATTTGGTGTTTCATCGAGTAACATGCATATCAAGCTCTCAAAGATGC
 TTGTGATAACTTGTTCACGTCATTCAGCTACCAATCCAAAAGTGAAAAAGGGAACATACAAAATCATCGTTCACGTTGGG
 TTAGTGAATTTATTTACATTGATACAGAAGCAACAGTAAAAATAATTTGCACCTGCTATTGTCCCACTGATTACAAGGCTA
 GAAGAACAGTTTACCAAGTATGATATTGAGCAAAATAGTGATTTATCGAGTGCTTATGCAATTCGCTTATACGAGTTATTGAT
 TTGCTGGCGTAGCACAGGGAACACCAATTTATGGGCTAGGCGAATTTAGAAATCGGGTTGGTGTGTTAGTAGTAGTAATATC
 ATCGAATTGCACACTTGAAGAAGCGAGTTATTGAACATTCAATTAACAGATTAAACGAGCATACCGACATCACAGCCACCTAC
 GAACAGCACAAAAAGGGCGGACAATCACAGGATTTTCATTCAAGTTTAAGCAGAAGAGCCCAACAAAGCCGAAATTTGCTAC
 AGAAACGCCAAAAACAGCCACGAATGACCCAGACAGCAAAAACCCCTTACAGAGCCTCAGATCGCAAAATACAGCATGATTC
 TGTGCAAACTAGGCAGTATTTAGACTTGAGTAACCTCCAGACTATCCAGCTTTTGCAAAATGGATTGGGAACATTTTGAGG
 AACCCCTGAAAAAGCAGATGAACAAATAGCAAAACGGATTTTCACAGCATTGAAAAACAGAAACCGACTACAGCAAGAAAACTA
 ATTTTTAGTTGTGATGGGTTTCCCGAAATAACATGAAGGGCGCACTTACGCAAAATTTTGCTACGCCAAATTTTGCAAGTA
 CGGTGAGGAAACCCGACACCCCAAGCAAAACACTGTAATCAGGGAAAAACATTTTGAATTTGATCCTTGTGTTGCA
 CTGCTAGACACTCGTTTTGTTTGCTCTTCTAGAATTACAAAAAGATATTAGCGAGTGTCTACGAGCGACTCAATGAAAG
 TTCGATTATTCCCTCTGGAAGAACCGCTTTTAAAAATATTGGCTGCTAGATGGTTTTTACTATAGTGAGGTTTGTCTTTAA
 AAAAAACAGAGCAAGCGAGTTTATAGTTGCTTTTGCTTGTGTTTCGGGCTTAGGGGAATCCCTAACAAGTCTCGAATAT
 CAAAATGTGGCTACATTTGTATATACGGGTAGGCTTGCTTATTGATTTTTTTCTTCTAAACCTTGAATCTTCTCCCAT
 GTTTGCAAGAAATGCCCCCGACC

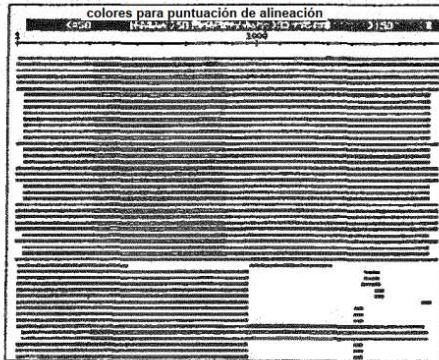
Repetición – 3x 22nt + 18nt



Similitud de nucleótidos de un 78 % en 984nt y de un 95-99 % con 431nt del aislado de ADN circular asociado a TSE Sphinx 1.76

ORF: 319aa-similitud de aminoácidos de un 65 % con proteína B de replicación de inicio con Acinetobacter radioresistens

Figura 1 (d)

Blastn - Geall:

```
>>>nrnuc:GI 462476960 Gi|462476960|gb|APGK01000458.1| Dendro... 1943 0,0
>>>nrnuc:GI 347602255 Gi|347602255|gb|JN541288.1| Sin cultivar... 1449 0,0
>>>nrnuc:GI 462476960 Gi|462476960|gb|APGK01000458.1| Dendroctonus ponderosae Seq01000458,
Secuencia aleatoria de genoma completo 0/0
Longitud=1455
Puntuación = 1943 bits (2154), Expectativa = 0,0
Identidades= 1202/1284 (93%), Huecos = 1/1284 (0%)
Hebra=Más/Menos
```

```
Consulta 11 AGTCAAAAAAGTTTGAGCAAAGCGAAAACATAGGGCAATTTTCGTGATGAAAATGGGCTT 70
Objeto 1318 AGTCAAAAAAGTTTGAGAGAAGCGAAAACATAGGGCAATTT-CATGCTGAGAATGGGCTT 1260

Consulta 71 TTAATGTTTTTAAATGCTTTTAAATGCTTTTAGACATGCTGAAACGCTTATATAGCAATG 130
Objeto 1259 TTAAGGTTTTTAAAGCTTTTAAATGCTTTTAGACATGCTGAAACGACCACACAGCAAGG 1200

Consulta 131 CATACAGAGGACATATGTCCACGTTTACCTATCAATATGTCCACGTTTACCTATCAATAT 190
Objeto 1199 CATACAGAGGACATATGTCCACGTTTACCTATCAATATGTCCACGTTTACCTATCAATAT 1140

Consulta 191 GTCCACGTTTACCTATCAATATGTCCACGTTTACCTTGCGTATTTACACACATTTAAATA 250
Objeto 1139 GTCCACGTTTACCTATCAATATGTCCACGTTTACCTTGCGTATTTACACACATTTAAATA 1080

Consulta 251 GTATGGATATATCCAATGAAATTATAATGTGTACTTATGAGCAAAATTAGTAGTGAAAGAC 310
Objeto 1079 ATATGGATATATCCAATGAAATTATAATGTGTACTTATGAGTAGGTTAGTAGTGAAAGAC 1020

Consulta 311 ARTGCCCTAATGAACGCTAGTTACAACCTGGATCTCGTTGAACAGCGTTTAATCTTATTG 370
Objeto 1019 AATGCCCTAATGAACGCTAGTTATAAATCTGGATCTCGTTGAACAGCGTTTAATCTTATTG 960

Consulta 371 GCAATCATCGAAGCAAGAGAATCAGGCAAAGGAATTAATGCAAATGACCCGCTTACGGTT 430
Objeto 959 GCAATCATCGAAGCGAGGGAGTCAGGCAAAGGAATTAACGCCAATGACCCCTCTAACAATC 900

Consulta 431 CATGCAGAGAGTTATATCAATCAATTTGGTGTTTCATCGAGTAAGTCATATCAAGCTCTC 490
Objeto 899 CATGCAGAGAGCTACATCAATCAATTTGGTGTTTCATCGAGTAAGTCATATCAAGCTCTC 840

Consulta 491 AAAGATGCTTGTGATAACTTGTGTTGCACGTCATTCAGCTACCAATCCAAAAGTGAAAAA 550
Objeto 839 AAAGATGCTTGTGATAACCTGTTGTTGCACGTCATTCAGCTATCAGTCCAAAAGTGAAAAA 780

Consulta 551 GGGAACATACAAAATCATCGTTCACGTTGGGTTAGTGAAATTATTTACATTGATACAGAA 610
Objeto 779 GGGAACATACAAAATCATCGTTCACGTTGGGTTAGTGAAATTATTTACATCGACACAGAA 720

Consulta 611 GCAACAGTAAAAATAATATTTGCACCTGCTATTGTCCACTGATTACAAGGCTAGAAGAA 670
Objeto 719 GCAACAGTAAAAATAATCTTTGCACCTGCTATCGTCCACTGATTACAAGATTAGAAGAA 660
```



```

Consulta 671 CAGTTCACCAAGTATGATATTGAGCAAATTAGTGATTATCGAGTGCTTATGCAATTCGC 730
Objeto 659 CAGTTCACCAAGTATGATATTGAGCAAATTAGTGATTATCGAGTGCTTATGCAATTCGC 600

Consulta 731 TTATACGAGTTATTGATTGCTGGCGTAGCACAGGGAAAACACCAATTATTGGGCTAGGC 790
Objeto 599 TTATACGAATTATTGATTGCTGGCGTAGCACAGGGAAAACGCCAATTATTGAATTAGCT 540

Consulta 791 GAATTTAGAAATCGGGTTGGTGTGTTAGATAGTGAATATCATCGAATTGCACACTTGAAA 850
Objeto 539 GAATTTAGGAATCGGGTTGGTGTGTTAGATACTGAATATCATCGAATTGCCACTTGAAA 480

Consulta 851 GAACGAGTTATTGAACATTCAATTAAACAGATTAAACGAGCATACCGACATCACAGCCACC 910
Objeto 479 GAGCGAGTTATTGAACATTCAATTAAACAAATTAACGAACATACCGACATCACAGCCACC 420

Consulta 911 TACGAACAGCAGCAAAAAGGGCGGACAATCACAGGATTTTCATTCAAGTTTAAAGCAGAAG 970
Objeto 419 TACGAACAGCAGCAAAAAGGGCGGAGTGATTACAGGGTTCTCATTCAAATTTAAAGCAGAAG 360

Consulta 971 AAGCCCAAAACAGCCGAAATTTGCTACAGAAACGCCAAAACAGCCACGAATGACCCAGAC 1030
Objeto 359 AAGCCCAAAACAGCCGAGATTGCCACAGAAACGCCAAAACAGCCACGAATGACCTAGAT 300

Consulta 1031 ACGACAAAACCCCTTACAGAGCCTCAGATCGCAAAATACAGCATGATTCTGTGCAAACTA 1090
Objeto 299 ACGATAAAACCCCTTACAGAGCCACAGATCGCAAAATACAGCATGATTCTGTGCAAACTA 240

Consulta 1091 GGCAGTATTTAGACTTGAGTAACCTCCAGACTATCCAGCTTTTGCAAATTTGGATTGGG 1150
Objeto 239 GGCAGTATTTAGACTTGAGTAACCTCCAGACTATCCAGCTTTTGCAAATTTGGATTGGG 180

Consulta 1151 AACATTTTGAAGAACCTGAAAAAGCAGATGAACAAATAGCAAAACGGATTTTCACAGCA 1210
Objeto 179 AACATTTTGAAGAACCTGAAAAAGCAGATGAACAAATAGCAAAACGGATTTTCACAGCA 120

Consulta 1211 TTGAAAACAGAAACCGACTACAGCAAGAAAACTAATTTTGTAGTTGTGATGGGTTTCCC 1270
Objeto 119 TTGAAAACAGAAACCGACTACAGCAAGAAAACTAATTTTGTAGTTGTGATGGGTTTCCC 60

Consulta 1271 GAAATAACATGAAGGGCGCACTTA 1294
Objeto 59 GAAATAACATGAAGGGCGCACTTA 36

Puntuación= 134 bits (148), Expectativa = 3e-27
Identidades = 108/127 (85%), Huecos = 4/127 (3%)
Hebra=Más/Menos

Consulta 1641 CCTAACAGTCCTCGAATATCAAAATGTGGCTACATTTTGTATATACGGGTAGGCTTGCT 1700
Objeto 1455 CCTAACAGTCCCCGAATATCAAAATGTGGCTACATTTTGTATATACGGGTAGGCTTGCT 1396

Consulta 1701 TATTTGAttttttttC-TTCTAAACCTTT-GACTTCTCCCCATTGTTTGACAGAAATGCC 1758
Objeto 1395 TATTGAATCTAATTCCTTTTAAACCTTTTCGACT--TTCCCTATCCTTTGCATAAATTCG 1338

Consulta 1759 CCCCAGAC 1765
Objeto 1337 CCCTGAC 1331

>>>>nrnuc:GI_347602255 Gi|347602255|gb|JN541288.1| Clon plasmídico de bacterias sin cultivar
S6GIO-17 Secuencia genómica. 0/0
Longitud=1215
Puntuación = 1449 bits (1606), Expectativa = 0,0
Identidades = 858/893 (96%) Huecos = 11/893 (1%)
Hebra=Más/Más

Consulta 881 ATTAACGAGCATACCGACATCACAGCCACCTACGAACAGCACAAAAAGGGCGGACAATC 940
Objeto 1 ATCAACGAGCACACCGACATCACAGCCACCTACGAACAGCACAAAAAGGGCGGACAATC 60

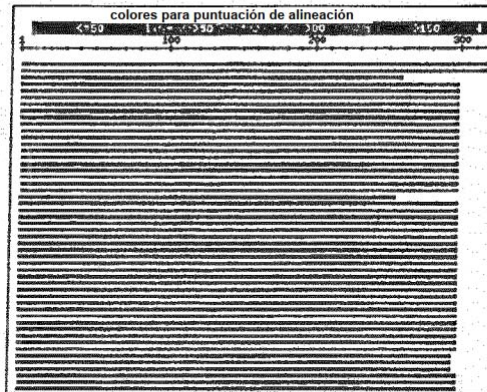
Consulta 941 ACAGGATTTTCATTCAAGTTTAAAGCAGAAGAAGCCCAACAAAGCCGAAATTGCTACAGAA 1000
Objeto 61 ACAGGATTTTCATTCAAGTTTAAAGCAGAAGAAGCCCAACAAAGCCGAAATTGCTACAGAA 120

Consulta 1001 ACGCCAAAACAGCCACGAATGACCCAGACACGACAAAACCCCTTACGAGCCTCAGATC 1060

```

Objeto 121	 ACGCCAAAAACAGCCACGAATGACCCAGACACGACAAAACCCCTTACAGAGCCTCAGATC	180
Consulta 1061	GCAAAATACAGCATGATTCTGTGCAAACTAGGCAGTATTTAGACTTGAGTAACCTCCCA	1120
Objeto 181	 GCAAAATACAGCATGATTCTGTGCAAACTAGGCAGTATTTAGACTTGAGTAACCTCCCA	240
Consulta 1121	GACTATCCAGCTTTTGCAAATTGGATTGGGAACATTTTGAGGAACCCCTGAAAAAGCAGAT	1180
Objeto 241	 GACTATCCAGCTTTTGCAAATTGGATTGGGAACATTTTGAGGAACCCCTGAAAAAGCAGAT	300
Consulta 1181	GAACAAATAGCAAAACGGATTTTCACAGCATTGAAAACAGAAACCGACTACAGCAAGAAA	1240
Objeto 301	 GAACAAATAGCAAAACGGATTTTCACAGCATTGAAAACAGAAACCGACTACAGCAAGAAA	360
Consulta 1241	AACTAATTTTGTGTTGTGATGGGTTTCCCGAAATAACATGAAGGGCGCACTTACGCA--	1298
Objeto 361	 AACTAATTTTGTGTTGTGATGGGTTTCCCGAAATAACATGAAGGGCGCACTTACGCACT	420
Consulta 1299	-----AAATTTTGTCTACGCCAAATTTTGCAAGTACGGTCAGGGAACCCCGACACCCCA	1353
Objeto 421	 GAGAAAAATCTTCGATTTTTCAT---GGAGTCCGTGGGGTAACCCCTCAACCCCA	477
Consulta 1354	AAAGCAAAACACTGTAATCAGGGAAAAACATTTTGTATTTGATCCTTGTGTTGCTACT	1413
Objeto 478	 AAAGCAAAACACTGTAATCAGGGAAAAACATTTTGTATTTGATCCTTGTGTTGCTACT	537
Consulta 1414	CGTAGACACTCGTTTGTGTTGCTCTTCTAGAATTACAAAAAGATATTAGCGAGTGT	1473
Objeto 538	 CGTAGACACTCGTTTGTGTTGCTCTTCTAGAATTACAAAAAGATATTAGCGAGTGT	597
Consulta 1474	CTACGAGCGACTCAATGAAAGTTCGATTATTCCTCTGGAACCCGCTTTTAAAAATA	1533
Objeto 598	 CTACGAGCGACTCAATGAAAGTTCGATTATTCCTCTGGAACCCGCTTTTAAAAATA	657
Consulta 1534	TTGGCTGCTAGATGGTTTTTACTATAGTGAGGTTTGTCTTTTAAAAAACACGAGCAAG	1593
Objeto 658	 TTGGCTGCTAGATGGTTTTTACTATAGTGAGGTTTGTCTTTTAAAAAACACGAGCAAG	717
Consulta 1594	CGAGTTCATAGTTGCTTTTGTGTTTTCGGGCTTAGGGGAAATCCCTAACAGTCCT	1653
Objeto 718	 CGAGTTCATAGTTGCTTTTGTGTTTTCGGGCTTAGGGGAAATCCCTAACAGTCCT	777
Consulta 1654	CGAATATCAAAATGTGGCTACATTTGTATATACGGGTAGGCTTGCTTATTGATTTTT	1713
Objeto 778	 CGAATATCAAAATGTGGCTACATTTGTATATACGGGTAGGCTTGCTTATTGATTTTT	837
Consulta 1714	ttCTTCTAAACCTTTGACTTCTTCCCATTTGTTGCAGAAA-TGCCCCCGAC	1765
Objeto 838	 TCTTCTAAACCTTTGACTTCTTCCCATTTGTTGCAGAAATGCCCTCGAC	890
Puntuación= 576 bits (638), Expectativa = 3e-160		
Identidades = 322/324 (99%), Huecos = 0/324 (0%)		
Hebra=Más/Más		
Consulta 1	AAGCTTGCTTAGTCAAAAAAGTTTGAGCAAGCGAAAACATAGGGCAATTTTCGTGATGA	60
Objeto 892	 AAGCTTGCTTAGTCAAAAAAGTTTGAGCAAGCGAAAACATAGGGCAATTTTCGTGATGA	951
Consulta 61	AAATGGGCTTTAATGTTTTTAAATGCTTTTAAATGCTTTTAGACATGCTGAAACGCPTA	120
Objeto 952	 AAATGGGCTTTAATGTTTTTAAATGCTTTTAAATGCTTTTAGACATGCTGAAACGCPTA	1011
Consulta 121	TATAGCAATGCATACAGAGGACATATGTCCACGTTTACCTATCAATATGTCCACGTTTAC	180
Objeto 1012	 TATAGCAATGCATACAGAGGACATATGTCCACGTTTACCTATCAATATGTCCACGTTTAC	1071
Consulta 181	CTATCAATATGTCCACGTTTACCTATCAATATGTCCACGTTTACCTTGCGTATTTACACA	240
Objeto 1072	 CTATCAATATGTCCACGTTTACCTATCAATATGTCCACGTTTACCTTGCGTATTTACACA	1131
Consulta 241	CATTAAATAGTATGGATATATCCAATGAAATTATAATGTGTACTTATGAGCAAATTAGT	300
Objeto 1132	 CATTAAATAGTATGGATATATCCAATGAGATTATAATGTGTACTTATGAGCAAATTAGT	1191
Consulta 301	AGTGAAAGACAATGCCCTAATGAA	324
Objeto 1192	 AGTGAAAGACAATGCCCTAATCAA	1215

BlastP – Uniprot:
ORF 319aa:



>>>sptrembl:D0T8X0_ACIRA D0t8x0 Subnombre: Completo=Iniciador RepB... 435 1e-119
 >>>sptrembl:C6RK77_ACIRA C6rk77 Subnombre: Completo=Iniciador RepB... 435 1e-119

>>>>sptrembl:D0T8X0_ACIRA D0t8x0 Subnombre: Completo=Proteína iniciadora RepB;. 9/2013
 Longitud=313
 Puntuación= 435 bits (1118), Expectativa = 1e-119, Método:Ajuste de matriz composicional
 Identidades = 208/319 (65%), Positivos = 252/319 (78%), Huecos = 7/319 (2%)

Consulta 1	MSKLVVKDNALMNASYNLDLVEQRLILLAIIEARESCKGINANDPLTVHAESYINQFGVH	60
Objeto 1	M +LVVKDNAL+NASYNLDLVEQRLILLAI+EARESCKGINANDPL VHAESYINQF VH	60
Consulta 61	RVTAYQALKDACDNLFAQFSYQSKSEKGNIQNHRSRWVSEIIYIDTEATVKIIFAPAIV	120
Objeto 61	R TAYQALKDAC +LF RQFSYQ +++GN++++RSRWVSEI Y+D EA VK+IFAPAIV	120
Consulta 121	PLITRLEEQFTKYDIEQISDLSSAYAIRLYELLICWRSTGKTPPIIGLGEFRNRVGVLDSE	180
Objeto 121	PLITRLEEQFTKY+++Q+S L+SAYA+RLYELLI WRSTGKTP+I L +FR R+G+L++E	180
Consulta 181	YHRIANLKERVIEHSIKQINEHTDITATYEQHKKGRITITGFSFKFKQKPKQAEIATETP	240
Objeto 181	Y R+ K V+E +I QINEHTDI YEQHKKGR+I GFSF F QK+ K+ E	237
Consulta 241	KTATNDPDTTKPLTEPQIAKYSMLCKLGSISDLNFPDYPAFANWIGNILRNPEKADEQ	300
Objeto 238	+ + + K LTE QI KYS +L KL +SDLS F DY +F+ WIGNILR PE +	293
Consulta 301	IAKRIFTALKTETDYSKKN	319
Objeto 294	A+RIF++L TD++ N	312

>>>>sptrembl:C6RK77_ACIRA C6rk77 Subnombre: Completo=Proteína iniciadora RepB;. 9/2013
 Longitud=313
 Puntuación= 435 bits (1118), Expectativa = 1e-119, Método:Ajuste de matriz composicional.
 Identidades= 208/319 (65%), Positivos = 252/319 (78%), Huecos = 7/319 (2%)

Consulta 1	MSKLVVKDNALMNASYNLDLVEQRLILLAIIEARESCKGINANDPLTVHAESYINQFGVH	60
Objeto 1	M +LVVKDNAL+NASYNLDLVEQRLILLAI+EARESCKGINANDPL VHAESYINQF VH	60
Consulta 61	RVTAYQALKDACDNLFAQFSYQSKSEKGNIQNHRSRWVSEIIYIDTEATVKIIFAPAIV	120
Objeto 61	R TAYQALKDAC +LF RQFSYQ +++GN++++RSRWVSEI Y+D EA VK+IFAPAIV	120
Consulta 121	PLITRLEEQFTKYDIEQISDLSSAYAIRLYELLICWRSTGKTPPIIGLGEFRNRVGVLDSE	180
Objeto 121	PLITRLEEQFTKY+++Q+S L+SAYA+RLYELLI WRSTGKTP+I L +FR R+G+L++E	180
Consulta 181	YHRIANLKERVIEHSIKQINEHTDITATYEQHKKGRITITGFSFKFKQKPKQAEIATETP	240

Objeto 181 Y R+ K V+E +I QINEHTDI YEQHKGR+I GFSF F QK+ K+ E
YKRMERFKTSVLELAINQINEHTDINVAIEQHKGRSIVGFSFNFSQKEKKK---ILEKA 237

Consulta 241 KATNDPDTTKPLTEPQIAKYSMILCKLGSISDLSNFPDYPAFANWIGNILRNPEKADEQ 300
+ + + K LTE QI KYS +L KL +SDLS F DY +F+ WIGNILR PE +

Objeto 238 QVS---EGFKKLTEAQITKYSTVLKSLHELSDLSTFQDYQSFSIWIGNILREPESVRFE 293

Consulta 301 IAKRIFTALKTETDYSSKN 319
A+RIF++L TD++ N

Objeto 294 TAERIFSSLFKRTDFASPN 312

ProtSweep

Una herramienta de identificación de proteínas

Resultados para /home/vir088/rindneu/tsekomp1/MSBI2.176.319.pep

Número de residuos: 319	Peso molecular: 36,37 kD.
Carga: 4	Punto isoelectrico: 9,07

más ...

Predicción de ubicación de la proteína:

Citop.	18
Extr.	5
nucl.	5

Proteína y transcrito identificado

Proteína:

Id: sptrembl:C6RK77 ACIRA

Valoración: similar

Organismo científico: Acinetobacter radioresistens

Resumen: C6rk77 Subnombre: Completo=Proteína iniciadora RepB; 9/2013Longitud=313

Isoforma:

Información GO:

Acceso	Grupo	Nombre	Evidencia
GO:0005727	Componente celular	ADN circular extracromosómico	IEA:InterPro
GO:0003887	Función molecular	Actividad de ADN polimerasa dirigida por ADN	IEA:InterPro
GO:0006270	Proceso biológico	Iniciación de replicación de ADN	IEA:InterPro

Información interpro:

Id	Nombre corto
IPR000525	Initiator_Rep_prot
IPR011991	WHTH_DNA-bd_dom

CM11.252 (2523 pb)

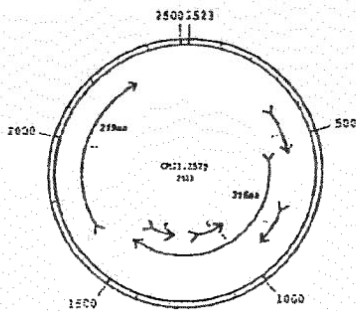
(CMI = aislado de leche de vaca)

(mi1.NoXo.2500.7)

IDÉNTICO A HCBI6.252

TTAAAAATATTGGTTGCTAGATGGTTTAACTATCGTGGAGCTTTTGCTTTTAAAAATACACGAAGCAAAGCGAGTTCATAGT
CGCTTTTGATCTGCTCTTACTAACAGCTCATTTTAAATGGGCGCTTAGTAAGAGATGCTTTTGGGGTTTCGGGGCTTGCCCTG
AACAAAGGTCACAAAGTGGGAATTTATCACGGTAGTGAAAAAGTACCCTTTGTGTATCCTTGCTTTATGCTTTTAAACCTTTG
GACTTTTCCCTTAATTTGCAGAAATFGCCCTCGACTAAGCAAGCTTAGTCAAAAAAGTTTGAGCAAAGCGAAAAACATAGGGC
AATTTTCATGATGAAATGGGCTTTTAAAGTTTAAATGCTTTTAAATGCTTTAGACATGTTGAAATGCAAGCCTAGCAAG
GCATACAGAGGACATACCCCTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTACCGATCAATAG
CCCTACGTTTACGTTTGCATATCACTACAAACAATATTAATGTAGTAATAACTTCAAAATAATAAATGTAGGTTATGAGCGATT
TAATAGTAAAGGATAACGCCCTAATGAACGCTAGTTACAACCTTAGCTTTGGTTGAACAGCGTTTAAATCCTTTTAGCTATATTG
GAAGCGAGAGAAACAGGAAAAGGGATTAATGCCAATGACCCCTTAACAGTTCATGCAAGTAGCTATATCAATCAATTTAACG
GGAAAGACATACGGCATATCAAGCATTAAGATGCTTGCAAGACTTGTGTCACGTCATTTAGTTACCAAGAAAAGCGAG
AACGAGGACGAATTAATATTAAGTCGATGGGTTTCAAAATTTGGTTATATGGACGATACAGCAACCGTTGAAATATTTTT
GCCCCTGCGGTTGTTTCTTTGATTACACGTTTAGAGGAACAATCACTCAATACGATATTGAACAAATTAGCGAGTTATCGAG
TGCTTATGCTGTCCGCTATATGAGTTACTAATTTGTTGGCGTAGCACAGGAAAAACCCCAATTATTGATCTAACAGAGTTTA
GAAAGCGCTAGGCGTTTGTAGATACCGAATACACTAGGACAGATACTTGAAGATGCGAGTGATTGAGCTAGGACTTAAACAA
ATCAACGAGCATACGGACATTACAGCAAGCTACGAACAGCACAAAAAGGGCGGACAATCACAGGATTCTCATTCAGTTTAA
GCAGAAGAAGAAAAAGGGGCGGAAATGCCAAAAATAGCGATTCTAGCCACATATCGAAAAACCTAGTCAATCCCTGCCA
ACATCGCAAAACAGCCTGAAATGCCAAAAAGATGATTTAGGGCACAGAGCAAGCAAGATTACAGGGTTAATTTATGTCGAAT
GGTTTAGCAGATCGGTTTAAACGTTGGTGATGAGTCAGTAATAGACATGATGAAACGCATCNGAGGAAATTACAACCTGATACA
ACAGCAGACCAATGGGAAAAACAAGCTAGAAGATTTGGCGTGATTTTTCAGTCATGATCAATTTCCCGAAGGACATATAAAAA
ATAATGTAGTTAAATATAGTAGTTATAATATTGACTACAATATTTAACTACTATATTGTAGTCTTAAATCAACTTACATAGAA
TTTAAATATGTCTCTTCGCCAATTTTAGAACAACTCTCTCTTTGATCAAACTGATGAAAGCTCTACTGTGCCACTATCAATT
AGACTTCCAACAACCTGAATAATGAGCTTGAAGAACTGACTATAACACTAGATAAATCCAAGAGTTTCTACTCCTAGAGTT
CATTAGGCTGGAATTAGTGAGACTAGCAATATGTTAGAAGCAAGCGAAGAACCTTACTTGAAAGTCCAAGAGATTCTA
GTGACTTTACAACCTATAAGAAGTTTATGTTGAACACTAATTTCAATAACAATAAAGCATCACACATGACTATGTTGGAGAAT
CAAGAAGCTGCTGCTTTCGTAAGGTTTGGAAAGAATATATCTGTAATTTAGAAGAAGGCGATAAGGTTTACCTTTTATCAAAG
TGCGCTTGGTTTGTAGCATCTGGTATTGTCACGTTGACTTAATCAAAGTGAGTATCGTGGACAACCAGAAAGAAAAATATT
CTAAAAAATTAAGGATTTTAAATAGGATTTAAAGCAATTTCTGCAAAAGAGTTTAAAGACCTTAACTGGCGGTGGTGCTAGC
TTTCGTACAACAATGAGCGAGCTAAAGCCTGAACAATGTAGAAAATTAGATATGGAAATAGAAAAACGGATCAAGTCAGTAAG
TTAAAAATATGAGTTGTTGTTTGTAGTGTCACGTAGCAATCACTTAGAAGTTCCCTTTGTATTACTTGTCTAGCAATGGTTT
TAAAAAGCGTCACTACTGATAGTGACGCTTTTTTTGTTTTTCAAAGGAAGTAATTAGCGAGTGTCTACGAGCGACACAATGAA
AGTTCGATTATTCCTCCTCTAAAAAACCGCTT

Repetición - 3x22nt + 17nt



Similitud de nucleótidos de un 85-90 % con el aislado de ADN circular asociado a TSE Sphinx 1.76

ORF: 316aa - proteína de replicación con un 85 % de similitud con Sphinx1.76

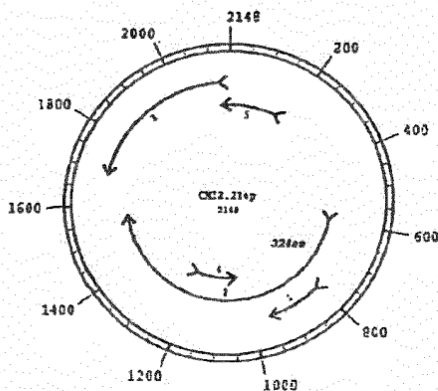
Figura 1(e)

CM12.214 (2148 pb)

(mi2.NuXn.2000.8)

TTGTAAGTAATTAATGAACGAGTGTCTACGAGTGGCATAAAGAAAGTTCGCTTATTGCCCCCTCTGAAAAACCGCTTTTCTAT
ATCTAATTTTCATGAAAATTTTAACTACTGTGAGCTTTTGCTTTTGAAAAGACACGAGCGAAGCGAGTGCCATTTTGTCTT
GCTTTTGGGGTTTGGGGCTTGCCCCAACAGGGCACAGAGTAGGAATTTTACACGGTAGTGAAAAAGTCCCCTCTGTGTCTCT
TGCCCTATGCTTTTAAACCTTTGAATTTTCCCTGTAATTTGAAGAAATTGCCCTCGACTAAGCTTGTCTAGTCAAAAAAG
TTTGAGCAAAGCGAAAACATAGGGCAATTTTCAATAAAAAATGGGCTTTTAAAGTTTTTAAATGCTTTTAAATGCTTTTAGA
CATGCTGAAATGCCTACACAGCAAGGCATACAGAGGACATACCTCTAGGTTTACCCACCAATACTECTAGGTTTACCTACCA
TACTCCTAGGTT TACCTACCAATACTCCTAGGTTTACCTTCGGTAATCCTAAAAGATATAATACAAAGGAACACTACTAGGTTT
AATATTAATAAGTAAATGAGCGATTTAATAGTAAAAGATAATGCCTTAATGAACGCTAGTTATAACCTAGACTTAGTTGAGC
AGCGTTTAATCTCTTGCGTATCCTTGAGGCGAGAGAAACAGGCAAGGGATTAAATGCCAATGATCCTCTAACCGTTTCATGCT
GAAAGCTATATCAATCAATTTGGTGTAGCTAGACAGACTGCATATCAAGCATTAAAAGATGCTTGTAAGGACTTATTTGCACG
CCAATTTAGTTACCAAGAAAAACGTGAGCGTGGGCGAGCTAATATTACAAGTCGTTGGGTATCGCAAATTGCTTACATTGATG
AAACGGCAACAGTAAAGTTATTTTGCCCTGCCGTTGTTCCACTGATTACACGATTAGAGGAACAATTACCCCAATACGAT
ATTGAACAAATTAGCGGTTTATCGAGTGCCCTATGCCGTCCTATATGAATTATTGATTGTTTGGCGTAGTACAGGGAAAAC
ACCTGTTATTGAACTAGCAGAGTTTGAAGAGCGTTTAGGTTGTTTAAATGATGAATATACTAGATCGGATAATTTCAAAAAAT
GGATTATTGAAACCCCTATTAAACAAATAAACGAGCATACCGACATCACAGCAAGCTACGAACAGCACAAAAAGGGCGGACA
ATCACAGGGTTTTTCATTCAAGTTTAAAGCAGAAGAAAAAACAGAACCTGAACGCCAAAAAACAGCGATTCTAGCCAACGTAT
CGAAAAGCCTAGTCAAATCCCTGCCAACATCGTAAACAACCTGAAAACGCAAATTTGAGCGATTACAGCATCGAGCAAGCA
AGATTACAGGGTTAATCATGTCTAACCGCTATCAGATCGGTTTAAACAAGGTGATGAATCAATCATGCAGATGATGGCAGCT
ATTCAAAGTGAGATTACAACCGATTCAATAGCCGACCAATGGCAATCAAAATTAGAAGAATTTGGCGTAGTTTTTAGTCTGT
CACGTAGCAATCAGTAGAAAAATTATGCTTGAAAGGCTTGCTGTTATTACATTTCAAAAAGCGTCACTACTGATAGTGACGCT
TTTCTTAGTTTGCTGTTGAATTAAACAGTGAGTGATAGACCTCTTTGGTTAGGACTTCATTAACTTTTCATGCCATTCTT
TAATTATTTTTGTCGTTTCTGCATTTTCACTAGAACAAATAACTAATGTTTTTCTTGCTGAGGTAGTTTTTCCCCAAATG
TCCCAATCCAATACGAATAGGGCGTCTGAAAACAATCCAATCGGTTTCACTTTTCATCACCATTGACTTCATAAGCTCCACC
AATTACCTGAACATAATGCAATTAATTTGCCACCATTTTTTAATAGCAACAATATCATTCACTTTCACTTCTGTTAAAAAAGTCCT
CTTTTTCAACCTGTCCTCCAGCCCATTTTCTTAAACCTATAATTTTTTGTCTCTAAAATTGAATGTAACCTTCCGAAAAG
CTTTGATCATCAGGGTGCATCTGCATATGCCAATATTGAGTCATGTTTTTTTCCATAGGTAATTATGTTTGT

Repetición — $3 \times 22\text{nt} + 17\text{nt}$



Similitud de nucleótidos de un 79 % con el aislado de ADN circular asociado a TSE Sphinx 1.76

ORF: 324aa - proteína de replicación con un 86 % de similitud con Sphinx1.76

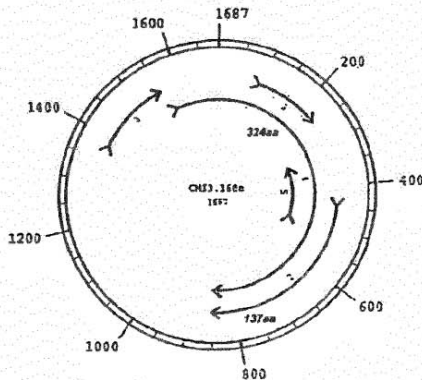
Figura 1(f)

CMI3.168 (1687 pb)

(mi3.NnXn.1600.5)

GGATTAATGCCAATGATCCCTTAACAGTTCATGCAAGTAGCTATATCAATCAATTTAACGTTGAAAGACATACGGCATATCAA
GCATTAAAGATGCTTGTAAAGACTTATTTGCACGCCAATTTAGTTACCAAGAAAAACGTGAGCGTGGGCGAGCTAATATTAC
AAGTCGTTGGGTATCGCAAATGCTTACATTGATGAAACGGCAACAGTTGAGGTTATTTTGGCCCTGCCGTTGTCCACTGA
TTACACGATTAGAGGAACAATTCACCAATACGATATTGAACAAATTAGCGGTTTATCGAGTGCCTATGCAGTTTCGCTTATAT
GAGTTATTGATCTGCTGGAGAACACAGGAAAGACACCAAGTTCTTGACTTAACAGAGTTTAGAAAGCGTCTAGGTGTTTTAGA
TACCGAATACACTAGAACAGATAACTTGAAGATGCGAGTGATTGAGCAGTCACTCAAGCAAATAAACAAGCATACCGACATCA
CAGCGAGCTACGAACAGCACAAAAAGGGCGGACAAATCACAGGATTCTCATTCAAGTTTAAGCAGAAGAAGAAAAACAGAGCCA
GAAACGCCAAAAACAACGATTCTGGCGTTTCTAAGCCGAAAAACAGTAGAAATCCCTGCCGAAGTCGTAAAAACAGCCTAAAAA
CACCAATTTGAGCGATTAGAGAAACGAGTAAGGATGATCACAGGGGCAATTGCTAAAAATAACCTGGCAAGTCGTTTCAAC
ATGGGAATGAATCACCACTGGATATGATGAAACGTATTCAAAGTGAAATCACATCAGACGAACTGCCGATCTATGGCAAAAC
AACTTGATCAATGGGTGTGGTTTTTTAGTCATGACGAATTTCCCGAAGGGCGCACTTTCCCAAACTATCGTTTGAGTGCGT
TTTTCTATCGAAAAAGTAAAAAGACAAAGAAAAATTTCTTTGTCTTTTTTCTGTTTTTCAAAAAAGGGATTAGCGAGTGTC
TACGAGCGACACAAATGAAGTTTCGATTATTTCCCTCTGAAAAACCGCTTTTTGTATCTGATTTCAAGAAAAATTTAACTA
TCGTGCGCTTTTGCCTTTGAGAAGACACGAGCGAAGCGAGTGCCATTTTGCCTTTGCTTTTGGGGTTTGGGGCTT
GCCCAACAAGGCACAGAGTAGGAATTTTACACGGTAGTGGAAAAAGTCCCTCTGTGTGCTTGTCTAATCTTTTAAAC
CTTTGATCTTTCACCGTAATTTGCTAAAAATTTGCCCGACTGAGTGAAGCGAAGTCAAAAAAGTTTGAGCAAAAGCGAAACAT
AGGGCAATTTTCGTGATGAAATGGGCTTTTAAAGTTTAAATGCTTTTAAATGCTTTTAGACACGCTGAAACGCAAGCCTA
GCAAGGTATACAGAGGGCATTACCTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTACCGATC
AATACCCCTACGTTTACGTTTGCATATACTACAAAAATATAATAATGTAGTAATACTTCAAAATAATAAACGTAGGTTATGAG
CGATTTAATAGTAAAGATAACGCCCTAATGAACGCTAGTTACAACCTAGCTTTGGTTGAACAGCGTTTAATTCTATTGGCTA
TCCTAGAGCGGAGAGAAACAGGCAAG

Repetición - ATACCCCTACGTTTACCGATCA - 3x22nt + 12nt



Similitud de nucleótidos de un 79 % con el aislado de ADN circular asociado a TSE Sphinx 1.76

ORF: 324aa - proteína de replicación con un 80 % de similitud con Sphinx1.76

137aa - proteína de replicación con un 59 % de similitud con Sphinx1.76

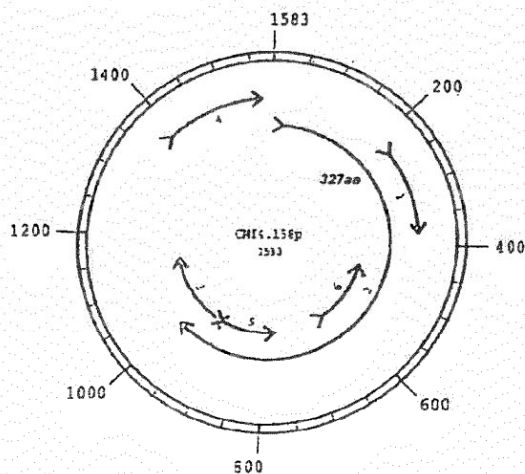
Figura 1(g)

CM14.158 (1583 pb)

(mil.NoXo.1500.5)

GAGGACGAATTAATATTACAAGTCGTTGGGTTTACAAATTGGTTATATGGACGATACAGCAACCGTTGAGGTTATTTTGGC
CCTGCGGTTGTTCCATTGATTACAAGACTGGAGGAACAATTACCCAGTACGATATTGAGCAAATTAGCGGTTTATCTAGTGC
TTATGCCGTCCTGTATGAATTATTGATCTGTTGGCGTAGCACAGGAAAAACGCCCGTCATAGAACTAGCAGAGTTTAGAA
AACGAATAGGTGTTTAGATACTGAATACAGGAGAACAGATAACTTAAAGATGCGAGTTATTGAGCTAGCACTCAAGCAGATC
AACGAACATACAGACATCACAGCAAGCTATGAACAGCACAAAAAGGGCGGACAATCACTGGGTTCTCATTCAAGTTTAAGCA
GAAGAAGAAAACAGAGCTAGAAAACGCCAAAAACAGCGATTCTAGCCACATATCGAAAAACCTAGTCAAATCCCTACCAACA
TCGTAACACAGCCTGAAAACGCCAAAAAGACGATTTAGGGCATAGAGCAAGTAAGATTACAGGTTTAATCATGTCCAATGGT
TTAGCAGATCGGTTTAAACGTGGTGATGAGTCCGTCTGAAATATGATGAAACGCATCAAAGAAGAAATTACAACCGATGCAAC
AGCCGATCTATGGCAAAACAACTGAATCAATGGTGTGGTTTTTAGTCATGACTAAATTGGCTATGCAATGTCTCCGCTCT
TTTTCTAAGAACCGTTTTTGGCTTTTCAAAATCGCGGCTCGCGGGTGCTTTACTGGTATATGCGCTTTTTCGTGCTGCTTT
CAAAAAATGTGGCGATAGCCAACATTCTCGATTTTGATCTTGATTTTGGGGTTTTAGGGTCTCCCTAACAGACATAGAGACA
CAACTCGCTAGAGGGGTCTCTATGTGTCTTGGCCCTTAATTAATAAACTAAATAAATTTTACCCTGTTTTGCTTTAAAAAG
GCAGGTTTTCTTTGTCCTTACTTTTGACTTTGATTTTCTCTGTTTTTTGAGTTACCCACAAGAATTTTCATGTGGTTTTG
GGCTTTTAAGGTTTTTAATGCTTTTAAATGCTTTTAAACATGCTGAAACGTAAGCATAGCAAGGTATACAGAGTTTATTCTC
CTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTACCGATCAATACCCCTACGTTTACCCCTAC
TACCCCTACGTTTACGTTGTCATATACTACAAAAACAATAATGTAGTAATAACTTCAAAATAAAGAGTAGGTTATGAGCG
ATTTAATAGTAAAGATAACGCCCTAATGAACGCTAGTTACAACCTAGCTTTGGTTGAACAGCGTTTAATCTTTTAGCTATA
TTGGAAGCGAGAGAACAGGAAAGGGATTAATGCCAATGATCCCTAACAGTTTCATGCAAATAGCTATATCAATCAATTTAA
CGTGGAAAGACATACGGCATATCAAGCATTAAAGATGCCTGCAAAGACTTGTTTGACGTCATTCAGTTACCAAGAAAAGC
GAGAAC

Repetición - 3x22nt + 17nt



Similitud de nucleótidos de un 85 % con el aislado de ADN circular asociado a TSE Sphinx 1.76

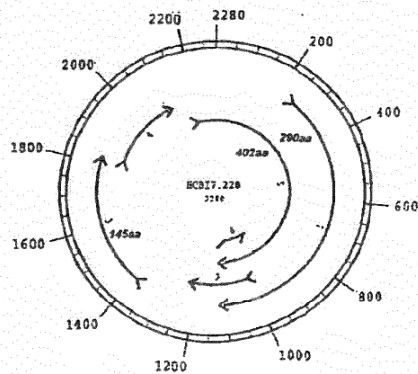
ORF: 327aa - proteína de replicación con un 80 % de similitud con Sphinx1.76

Figura 1(h)

HCBI7.228 (2280 pb)

(ri71.NdXd.2500.4G)

CTAAGGCAGATCAACACAGGGATAGAATAACACGTTTGGGATTTTGAACATAGAGCGAAGCTACAAGAACAATATTTGTGG
ACGCAGGTGATTTCAAATCTGAAGGCGAAGACGATCTATCCAATAAGGCTCTTAAGGCTGCAACAAAAATTAAGGTTGTGG
CCAGTTTCTTATATTAGAAATTAACACTATCGACCAAGTTAAGCTCGAAAAATCCACGTATGTGGACAGCATTGTCTAT
GCCCAATGTGTGACAGGTATTCGCGCTGCTCGCTCAATGAAACGCTATTTAGATCGTATCCATGAATTAATCGCTCAGAATCCG
CGTTTAAAGCCTGTTTGTATCACTTAAACGGTCAAGAACGGGGAAGACTTAGAAGAACGCTATAATCACCTTACAAGCTCATT
TAGAAAGCTTCTATCGCGTTATAGGGATTACAAGAAAAAGGGTTGGGGTTTAAACCAATTCTGTAAATTTGATGGTGCTTCT
ATACCACTGAATACACCTACAACGAAAGACAAAACAATGGCATCCGATATTCATATTTTCGCTTACTCAATGAATGGATA
GACCAGGAAGAAATATCTGAGACCTGGCATGACATTACCCTGGATTCTTATATCATCGATATTCGTAGAGTTAAAAAACCAA
AGAACACGGCTATAGCAAAGCTGTTGCTGAGGTATGTAATACGCTCTTAAGTTTGGCGATCTATCAGTTGAAAAACACTTGGG
ATGCATTTTAAACGCTTAAGGTTAAACGCTCTTACAGGCTCTTTCGGTCTATGCATGGAGTTAAAAATCCAGATAAGGCCACG
GATGATATGCCACTGGAGGAGCTGCCGTACTTAGAAATGTTCTATCGTTTCGTGTTTGAATAAAAAATCTACTACAACCTAGA
AATAACAAAAGACGTAACGCCACAAACGAATCTCGACAGAGTGAGGAGGCGGCACCAACGACCGACACGACTGGAGAGAATG
AGTTGAAGGCGCAGGATGAAGCGAGGACGTTGCCGGTGCGAGGGCACGCACTCACGGAACGACCGCAGCAAGTCCATGAATAT
TTTGACCCATTTGATATTGAGAGAGAAGAATACGACTTCTACCTTAAGGGTTTCGACCCCTTAAACCCCAAGGGCGCACTT
ATGCAAACTTTTCAAGTTTCGCCAGTGCTCCACACAGTAACAGAGGCGCGGAGTGCGCCCGAATGACATCATCTAAATTTCA
AAACCTTCTCTCCCTGATTACAAGCTCCCTTTTGCTTTCTCCGGAAAGTTTATGCCATCCCAACGGGTGGCGACGCTTGA
CAATTATAATTTAATCTGCAATATTCATCGGACATTCATAAATAATCTGATTGGAATATTAATATGCTTTTAAATCTCTAG
CGGTTGCAATCGCTACAAATAATGCTTCTAATCTGACGAAAGACTTGAACCAATTAATCTGTTAGCTGATAGTGAATTT
CAGGCGTATGACACTGTTGCAAAATCAATGGGTCTAATCTCGTCAAGATTTCTATCACAGTTATTGCTTCCAACTTCGACA
GGCTTTAAAGAGTTTGTAGTGGGTATACAAGTTCAAATCCTTCTACACCTTATCTGTTTGTGTTAATTAATACGGACA
ATGACGAAGTTAAGCTCAAACCTTTCCAACTTCTCTCATCTATTTCTCAAGAATTAATGGACGAAGAAGAAAAAGAAATTCAT
GAAGCAATCGAAACCATATGAATACTTCCATGATATGCAACTCGTCCAAAGGCATCTTGTGAGAGGATGATTCAAA
ATGATTAAAGCTGAAGGGATCGTTTAAACGCTATTTACCCAGCAAGGTGGTAAAGATAAAAAACAGGTGATCAATTTGCTGA
CCGTGACAAGTGCAAAATTTAGGTGCTATGGATCTGCCTAACGGTGACGTTAAAAATGAGTTATTACGTTATCTGTAGAAA
ACTATCGGGACTTTAAAGACTTCTTAATCAGAAAAATCTGATTGCTGTGGTGCAATGGCAAGTGGTGCATATGTTATTTT
TACGTTGCTAAAGCGCAAAGCCTGTTTATGACAGAAATGATGTAAACACGAAAAAAACAGTGGGTAGCCTTGGCTTCTCG
CTGTTTTTCTTCTCTTGATACTATTAACATAAGTGGGATGAAATTGACTAAAAAGACAATAAAAAAGCCCATATTTCTG
ACACTTTGGCGGGTGATGAATTACAGGCTTTGCAATCTG



Similitud de nucleótidos de un 78 % con el aislado de ADN circular asociado a TSE Sphinx 1.76

ORF:

402aa - un 81 % en la proteína de replicación 232aa con Sphinx1.76

290aa - un 89 % en la proteína de replicación 168aa con Sphinx1.76

145aa - vaga similitud con proteína de la cápsida del virus del mosaico del narciso (nmv)

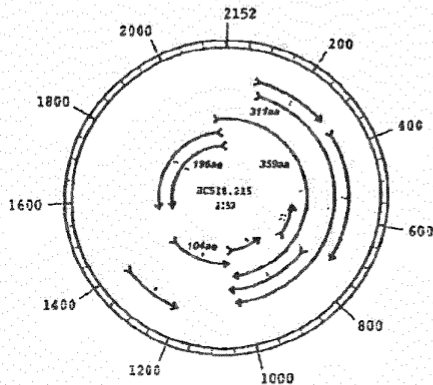
Figura 2

HCBI8.215 (2152 pb)

(HCBI = aislado de sangre de ganado bovino sano)

(ril.10E.1.5)

TAATGTTATCTACCTTTCTGTTGTGTCGGTGTCACTTTACTTGGTATATATAGGCGGTTGTCCCGCGGAGAAATT
TATTTTCGCAAAGAGGGGTATGTTGCATTTACAAAATGGCGTTCCGGAATCGGCGTTTTCAGGCGGGGCGCAGGCG
TCGTTTTACTCCACGGAGGTCCACTTTTCGCCGACGATCTTTCCGCAATGGTTCGGTACGTACGACAAGGCGGTA
TTCACGGCCACGCACGAATGTGCGTCGTGTGCGCAATCTCGCGTCTCGGAAGTGTGCGGACAATATGATTTGTAC
TCCTATTGACGACACGGGTACTCCTCAGACTCCCGGACCCGTATCTATGGATGCATCATCTGTTTACGGGTTTCAT
CTTTTCACCAACTGCACGGACCGCAGGTACTCAACTTGAGAGCGGTGAGCGGGTCAATGCACCTAGCTCGGCCCA
GCGGAGGAAGAGCAAATGTTACGTTTCGGGGTTACGGAGAACTGTGCAAATTCAGACGGATGACGCGTTCGCCATG
GGTATGGCGTCGTATTGTGTTTCAGCACTATTGGCTTGCGCTCTCAGTTTGACCCCGGTCTTTTGTACAACAATGA
CGAAACCCGTGGCTGGGGTTCGAGCCTGTTCAATATCCGGAGTGGTACGCAGCAGGCATCCATTCTTGAGGGCGT
TGTTTTTAGGTACCTATTCAGGGTACCGAGGGTGTGCGATTGGGCCAATGTGATGACTGCTACTACGGCCCCCTCG
GCATGTCAGGGTTTATTCGGATCGGCGCCGTGTTATTCAATCCCCCAACTCGGAGGGGGGTACTATTGACTATC
GAAGCATTACGATGGTATTAATCGGAGCATTATTTACGACGATGTGGAATTTGGAGCGGGAGCGAAGGCTACGAA
TGCCATTGCGAGTGGAACTCCATATGGGAATATGGGAGATTGTTTGTCTTGTATTCTTTTCGAGTGCATCGGA
TGATGAGACCAGCGGAGCGTCTTTCCAGCCTCATGGGAAGTTTTATTGGCATGAAGGGCAATCTGCTTAGCTATA
GAGGGGAGTCTGACTTCTACAAAATACAATTCTTGCCATCCAGTCTGATCCACCCCTTCTGTGATGGGATA
CTCATTTGATATCCAAATACATGGTTTCCCCCACTTAATTGCCTTCTTCTTGTACTTGTCTGTAGAAATAGAA
GTCTAGCTGGTTTCCAGCATGACTTGACTGTGGGAAGATTGAGTCTCCGCGATGTCATCAAGACGGCATACTTGACATCTCAAGGG
ATTCTCCAGTGAGAAGAGCCGCCAAAATAGGCGTGCTTGCGGAGAGATCTTGCCACATAGTCTTGCCAGTTCTT
GAGGGTCCATAGAGGACAGTACTTTCCCTGCCTAACACATTAGCCGTTAGGGTTAGGGTTACCCTTTAGGGT
TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGT
GTGGTGTGTGTGTAACCCCTTACTGTGGCATCCCATCCAATGTAGTCTCAGCCCACTGATTGAGCTCAGGA
AACTGCGAAGTGTGCAATTCATACTCTGGGTCTGTGCGATATGGGTCTGGATCCACACGATAGTGCCAGTCCGGCA
TATTTCTCGAGTGACGGGAAGCTGGTGAGTAGAAGTCTTGGGTCCAAATCACGGACAGCTTCGAAAACCTCCGCT
CGAGTCGGTGCCAAGACGATTTGATGGTGCTTATTCTCAACTCCAGCGCTTGCTATCTGCTGCTGGTTCGAGT
CCTCCAGCGACAACATCCCATCCTTGATCGCGTAATCATAATGGACTTGAGGGTCCGCGCTTAGTAATTGAGATGT
TAGGGTGGAAACCTCCAACATCAAAGACAGCAGCAGTCTTGATTGAAATCGTCGTCCAAATCCACAAAAGCGT
GCAGATGAGTTCCGCCATCAGAGTGGGCTTCTCTTCCAATGATGCATTCTCCTCCAAGGTCACCAATGTGTGAAA
CAATAGTGAATGGGTGAGGCCGCCGATTGAGCGTAGGTGAGAAGCGCATATCGGGCATAGAAGCGAAATGTGCG
ACATTGAGGGTGACACAGAAAGGTAGGTT



Similitud de nucleótidos de un 70 % con el aislado de gemicircularvirus 3 P24c

ORF: 359aa - proteína de la envuelta de un 32 % de similitud con el virus 1 asociado a libélula

311aa - proteína de la envuelta de un 32 % de similitud con el virus 1 asociado a libélula

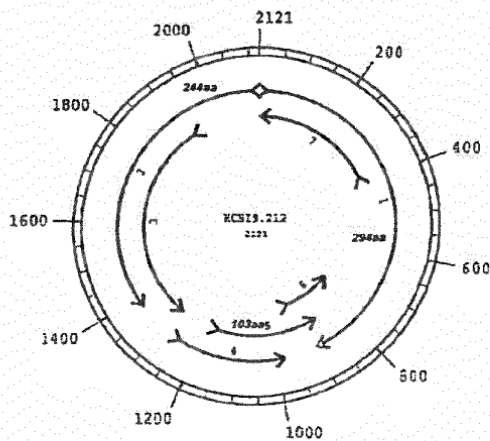
196aa - proteína asociada a replicación con un 54 % de similitud con gemicircularvirus 4

104aa - proteína asociada a replicación con un 63 % de similitud con gemicircularvirus 8

Figura 3 (a)

HCBI9.212 (2121 pb)
(*rkg.S1.8B.1.2*)

ATTTTCGACCAGTAAAAATGGCTTACGGATTCCGCCGCCGCTTTGGTCGCTCCCGTCGCTCGTACCGACGAAG
GCCCCGTTCCGCCGCTATTCCCCGAAGGGGTAGAAGCGGGTATGGTCGTGGCGGTTACAACCGTCGGCGTTATCGTCG
TCGTCGCCGCTCTTGGATTAGTCCTTACAACAAAAAGCATGACGTGATTAAAGGGGGCGCATGATTGGAATGATAA
TTCGTTCCGCCCTATAGGTGCCCCAACACCTTTTTTGGGTTCGCCCAACCTACATGCCAACGCCGTTGCTGG
GGATACTGGTCACAATCCTCAAAAGGTTCCGACCAGTAAGAATGTTGGGTTCACTGGATATCAGGAACGTGTTCA
TATTGCTACGGCTGAATCTTTGATTGCGCTCGCATGGTTATTTGGTCATATAACCGGCTTGAGAATACGGCCGG
TCCGACGAAGACGGATGATCAGGGTACTTCGTACACGACACGTGAGCTTACCCCGCTCCAATTAACGAAGGGGT
CCGTGCGTTTTTGTTCGAGGTACTCAGGGTATCGATTACACTGAGAACACCTTGCATGAGGCTCCGCTGAATTC
CGATCACTTTACCGTTGCGTATGATCGTACACGTGTGTACAGCCTCGTCGTCTTACTGGTGACGAATACGGTCA
TATTTTAAATATGAAGTCTCGGAACCGTGGTGAAGGATTATTTACTCGGATGATGAGGATGGTTTACAGAAGGG
TCCTCTTGTGAACGGATGGTCTTCTCTTGGACGTGTGTCTAAGGGAACATGTATATTTTGTATGCTTTTCTAC
GGGGTATTTCTTGGTAGTAATACTCCTTCTATTGCTAGATTGCTCCGACTGGGACTCGTTACTGGACGGAGGG
TTAGATACAATACAATTTGGATCCACCACATTGATTATGTGACAGTTGTTTATAAGCCAATCGTAGTCCACCCCT
TTAGCGAAGTGTGGGTCCGTTTCATGCACATGATTGAGGGTTTGGCCAGTAGATCGTTTCGCTTCTTTCGGTAC
TTGTCCGTGATGACGAATTGTTTTTGTGCGCCTAGCCACCCCTTGTATGAGTGGAAGTATTCGAATCCTCCTGG
ATGTCGTGCAAGACGGCGTATTGACAATCGTCGGAGAATTCGTCCATGTTGAATTGTAGGTTGAAGTACGCATGG
TGTCCCAACGATCTGGCGTATAGCGTCTTCCGGTCTTGTGTTGGTCCCCATAAAATGAGTGATTAACTCTGCCC
AAGTAAAGATCAGTAATGGGGTTCGGGGCGAAGCCCTGAAGCGGACAAGATTTGATCGTGCGAGGACGCTACGTC
GGCCGACGCGCCAGCAGACTTACCTCTCGGGTCTACAGTCCCAATGGCTGCCTGATTCTCCCACTCGGAGATCT
CAGGATAGCGTTCTCTCTCCACAATGATGGGCGGCGCCTCGTATTCGGTTCCTCGTCGGGGTAATAAAATTTGG
CGTATTCGATGATGCGCTGATTGGTAGCAACCAATCTCTTGGAGCTTGTGACGGACAGCCGACAGAAATGATTCT
TTTAGTGTGCGAGCTGATGATATCAGCCCACTTATTTGAATTATCCCCGTACATGAGCGAGCATCTGCTGGGG
CTCGCCGTGCTCAAGTCGGATGTCTCCATCCTTGGCGACATAATCGAAGACCTTGTGTGGAGTTGACGAATCGA
TTTAATATTGCCGTGAGCTCCAAAGTAGTCGAACGAGTTGCCGAGTTGACAGTGACAATCTTGTGCAAGCCAAG
ATATATGTGGTAATGAATTCCTCCATCCGAATGGCGCTCTCGTCCGAGTCGACAGCATAAAGGATTTCCAAAATT
CGCTGTGACAGTTCAAGGAAAGGAGTTCTGCGTCGAATTCATGTTGGAGGTGTTGGGGACTTGTGGAAACGT
AATGATAAGATTTCTTGTCTGACTTGAATCGTCGAGGCATTTTAAGGAGTCGTTACAGTGACGTGTGCAATA
GAGAGAGACTTGGCTAATATTATCTCTCTATTGTCAGTTGCACATTGCACATGGCTGCCTATAAATACCCCT
CATCCCCCTGCGGTGAGTC



Similitud de nucleótidos de un 78 % con virus fecal de Meles meles

ORF: 294aa - proteína de la cápsida de un 26 % de similitud con gemicircularvirus 8

244aa - proteína de replicación de un 34 % de similitud con virus fecal de Meles meles

103aa - proteína asociada a replicación de un 59 % de similitud con virus 1 asociado a libélula

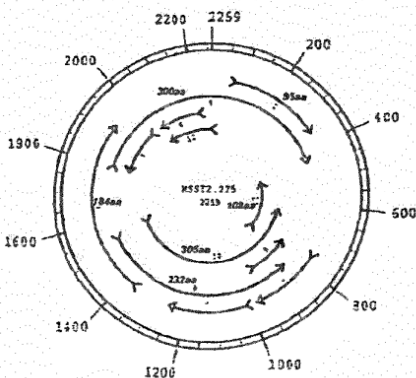
Figura 3 (b)

MSSI2.225 (2259 pb)

(*MSSI = aislado de suero de esclerosis múltiple*)

(*ms24.RCA.1700.3*)

TTCTTAATCAGCTGTTTCGATCAGACCACCGAAGGTGGATGTCGACGCGTCATCGGCCACTTCTCGGGGTCCTA
ATGCCCGAGATGAGCTGCAATCTTACGTCTTCCGGGGTCAGGAAGATTCTGATTGGGCAGATCAGTTTACTGCC
CCCTTGATACTCGTCGATTACGGTTAAGTCCGACAACTCCGCGTCATCCGCCCGGTAATGAAACAGGTGCTT
CGCGCTTGTTTAAAGTTTGGTACCCATTTCGTCTGATACCTCTTACGAAGATGACCTTGAGTCCGACGTTGTCG
GTGATCGGCCCTTTTCTACCGCAGGTTTACGAGGTGTTGGGGATATGTACGTCTGGAATATAATGGGTATTACGA
ATTTGGTGAATGATGCACCTCCAACGTCCTACAGGTTCGGTCTGAGGGCAGCTTTTATTGGCATGAGCGGTAAA
TTAGGAGACTATGGGGCTATCTAGGTACACGAAATCGCAGTTGGCATTAAGCCACTCGGTGTCAACACCAAGCTC
GTCACGTGGGTGCGAGTTAGATAGCCAAATTGAGGGCCGAGCCAGTGTACCACTTTTCCCTTGTACTTATC
CGTGACGTAGAACTGCTTTTGTATGACCTAACCAAGATTGTTAGCTGGGAAGGAATTAATTCTCCGAGTCTGTC
AAAGATGGCGTACTCAACCCCATCAAGGTTTTCGTCCAAGCTAAAGAGGCCTCCGAAGTAAAGCATGGTTTCCAG
GCTTCTAGCCCAAATGGTTTTCCTATTCTGGAAGGCCGTATACCAAGTGATTTTCTTCTGTTCTGATATCG
AAGTCAGATCCAGATTTGTTGATGCGCACTCGAGCGAGGCGCTGCGCGAGGCCCGCCGAGCATGGAGGCGCG
CGTAGCCGCGGACTGACGCGCTGCGACGTGCATGATAACTTACCTCCAGTTTACCTCGTCCAAGATTTTGTG
TACCATTTGATTGAGTTGAGCCACCAAGACGTATCGATGTTAACTCCCTCCGCTGTCTCATACGGGACTCTGAT
TGGTGGGAATTTCCAGGCTGCGTATGCCCTGAGCTGGGTGAAGGAGGTGACCAATGAGCGTGGAGCCAGGCGTT
GCATAGGTCCCAAACTCTTGCTCACTCTCAGCATTGATGATTTTACGCCACACCCCACTAGTTGCATCCACTCT
GCCTGCAACAGGTGCGTCTGAGTCCCGCAGCAACATCTCCATCTTTGATTGCATAATCAAACCCCTCTTCTGG
TGTTCCGCGAGAAGGCGATACATTTGGGTGGCATCCTTCAACATCGAATGCACGCGCTTCCGGTCTTATATTT
GACTCCGAAGTCGACAAAAGCGTGCAGATGAAGACCCCATCTGCGTGATTCTCTCGGCCGATGATGCATTACGC
TCCAAGTCCCGCAAGATGATTGACCACTGCAAAAGGTCGAGGTCTCCACATTGTGGATAGGTGAGCAAGGCGTA
CCGTGCTTGAATCGAAAAGAGGACATAGTTGCTTGTGTCACATTTCTTGGGTCCAAGTCTGGGCAGTTAATG
TTATATGCCAGACGGACCCAGACCCGGGTCTTTCGAATATAAATACCCCTCGCTCGTCCCAACCTCTCTGTT
TTTTTGTATGCGCGATTATCATGTCTGCCCTGATCCACCCCGTTGCCTGCAATCGGACTTGCCAAGACTACGTC
AACCACGCTAGACACGAATGTTGTTTAGTGTGTAACCTCCGCCACCCCTTCATCTCTACTGTGCGACATTGT
TCAGAATGTGCGGTGCGCCGTCGATCTGGTCGAAGAATCGCAAAGCTTTCGCCGCGGTGGTAGAGCTACAAGAT
CTCGTGGCGAAGTACACGCGCTCTTCTAGGCGAAGAGTCAGACGGCGAAGTATGACTACCCGAGCTGTCTCA
ACATAACCACTCGTAAGAAGGTGGATAACATGTTGCCCTGTTGTTGTTGCCGAGGATAACACGACTACTGTGGGC
CTTACACGTCCGTGTACCCCTCTTTCCCTTTTCGTTCCCAATGCCGCGACGACCCGAACCCCTGTTACCAATC
CTGCCGTCCGAATCTCTCGGATATTTTCGGGTGCGGATATAGGGAGCGCGTCCGCATTGATCTTATGGGTGGT
GAACTTTTATGTGGCGCGCATCGTCTTCATGTTGAAGGGATCCGATTTGAGAGTTGCTATGAATCCAGTGATT
CAGGCAACA



Similitud de nucleótidos de un 75 % con el aislado de gemicircularvirus P22.

ORF:

300aa - proteína de la envuelta de un 33-36 % de similitud con gemicircularvirus 8 y el virus fecal de Meles meles

232aa - proteína asociada a replicación de un 61 % de similitud con gemicircularvirus

108aa - proteína asociada a replicación de un 71 % de similitud con gemicircularvirus

Figura 3 (c)

51

Grupo 1:

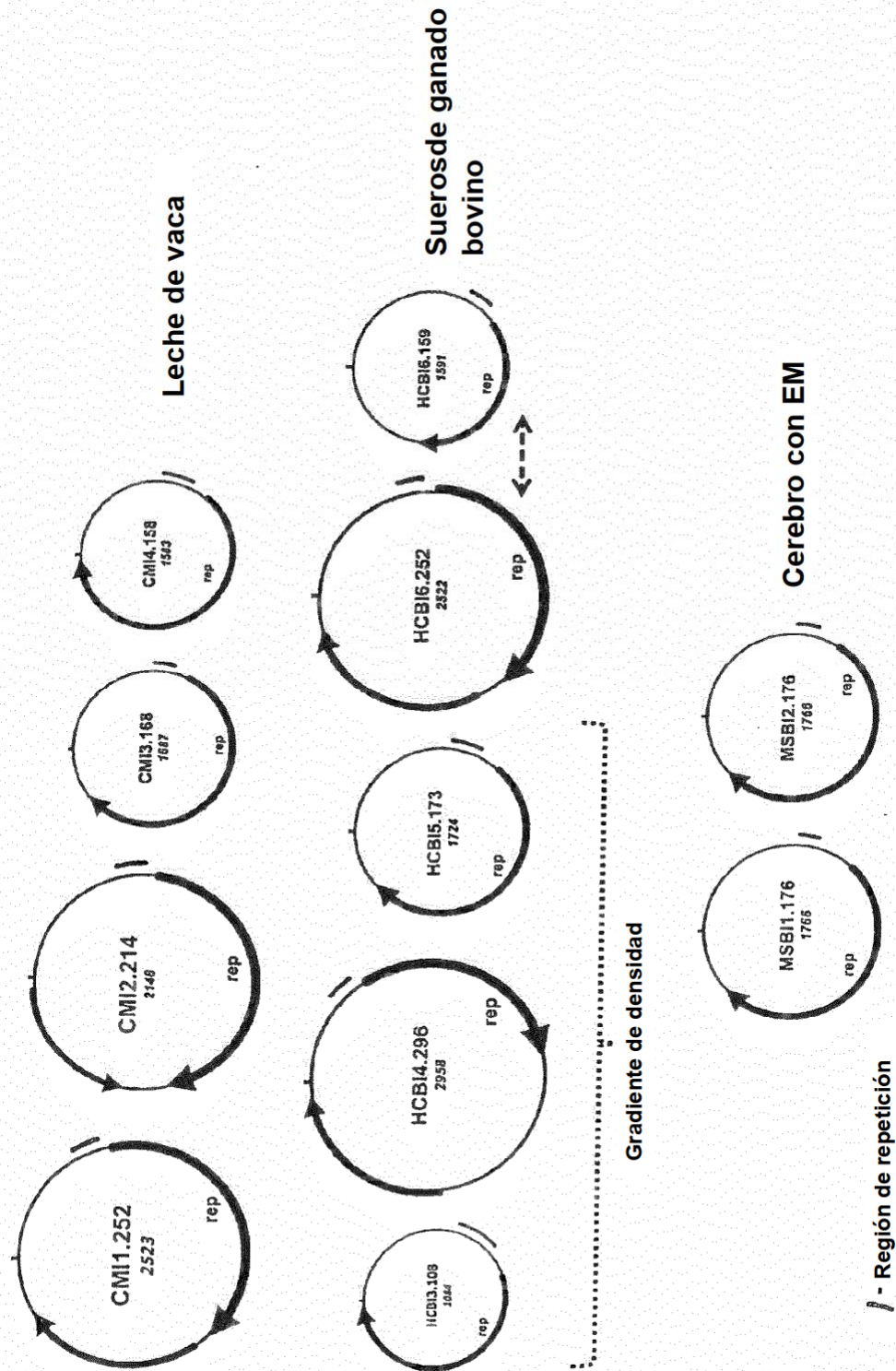
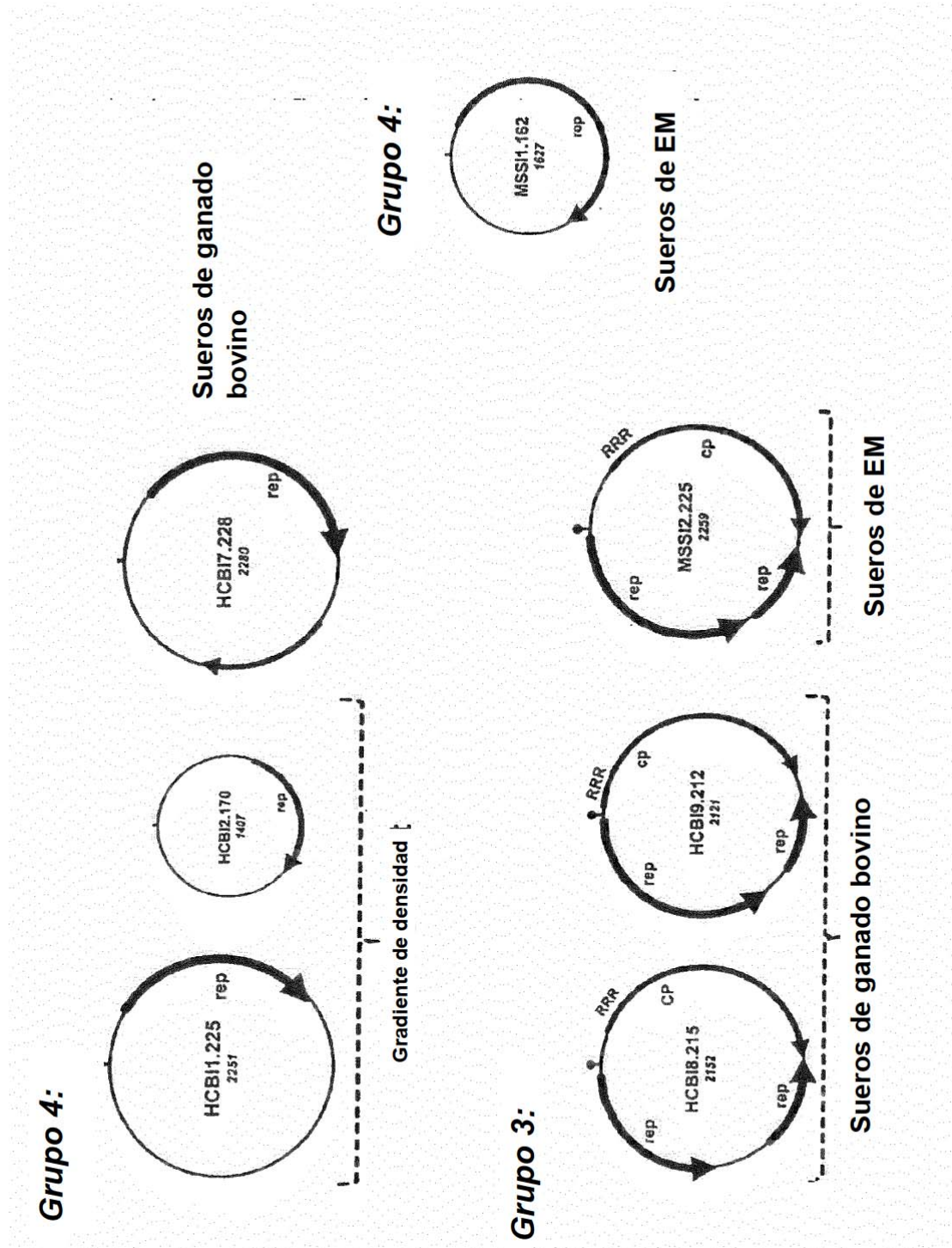


Figura 5



* - Nucleótidos idénticos
0 - Una o más diferencias de nucleótidos

Figura 6

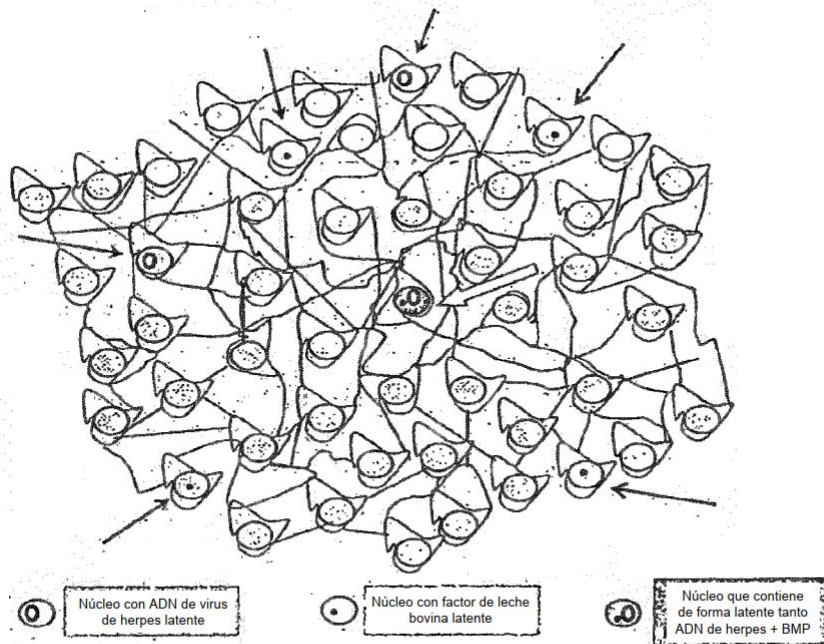


Figura 7

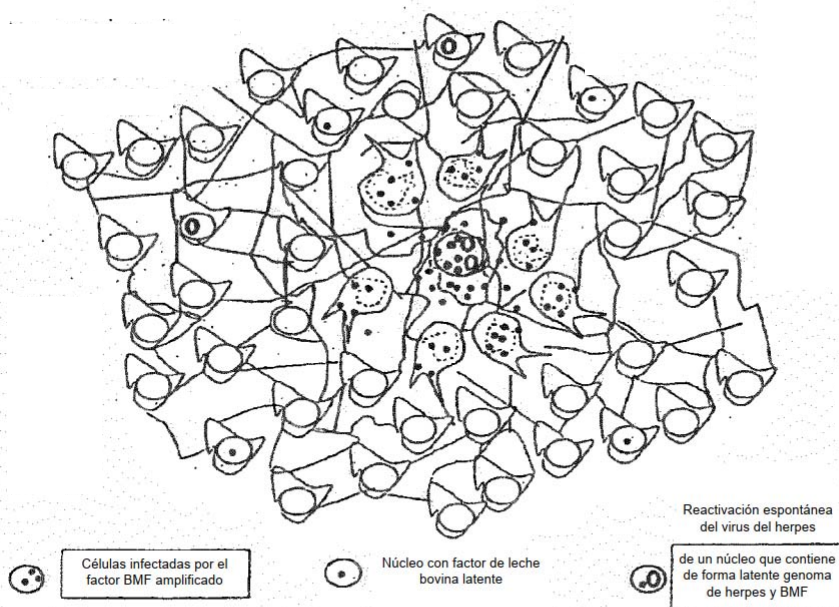


Figura 8

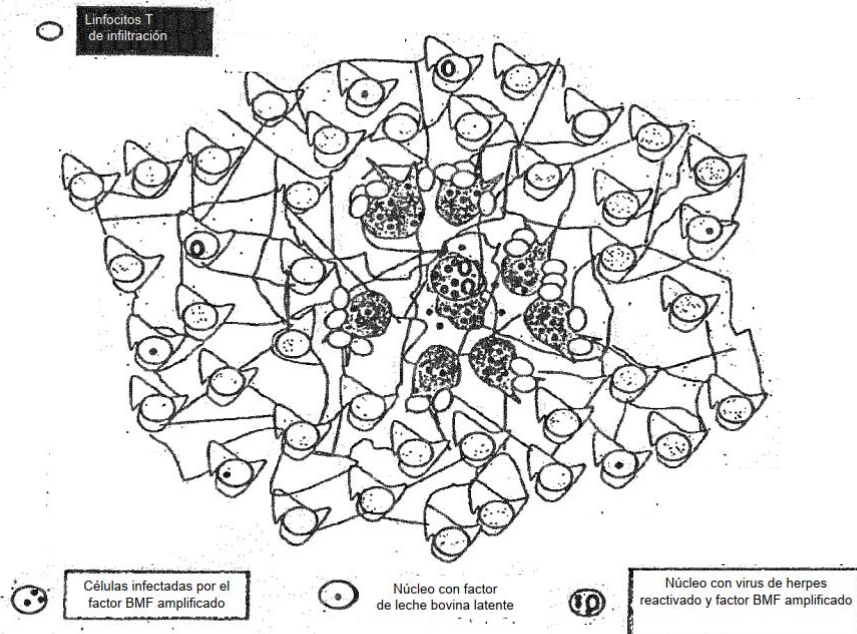


Figura 9

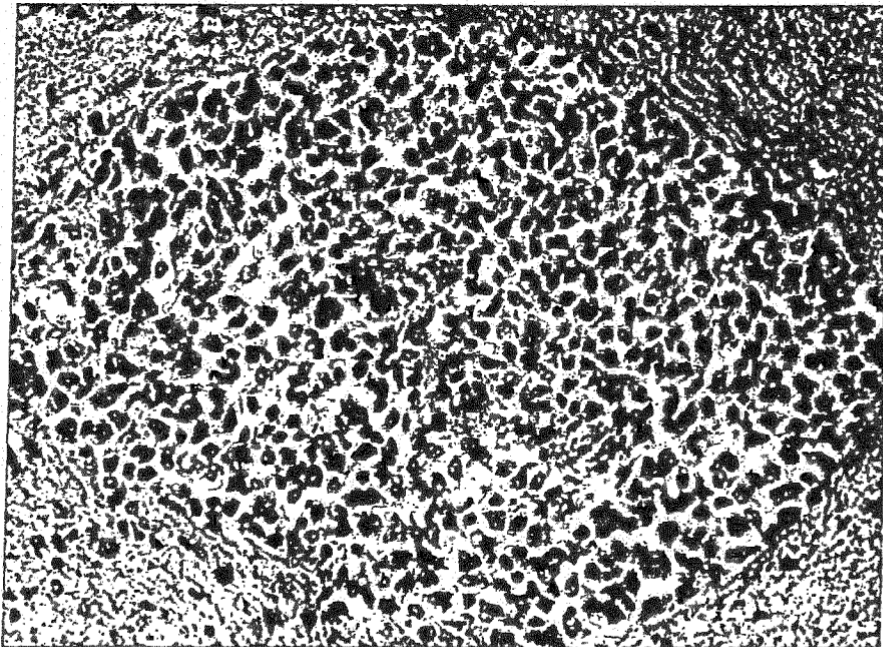


Figura 10

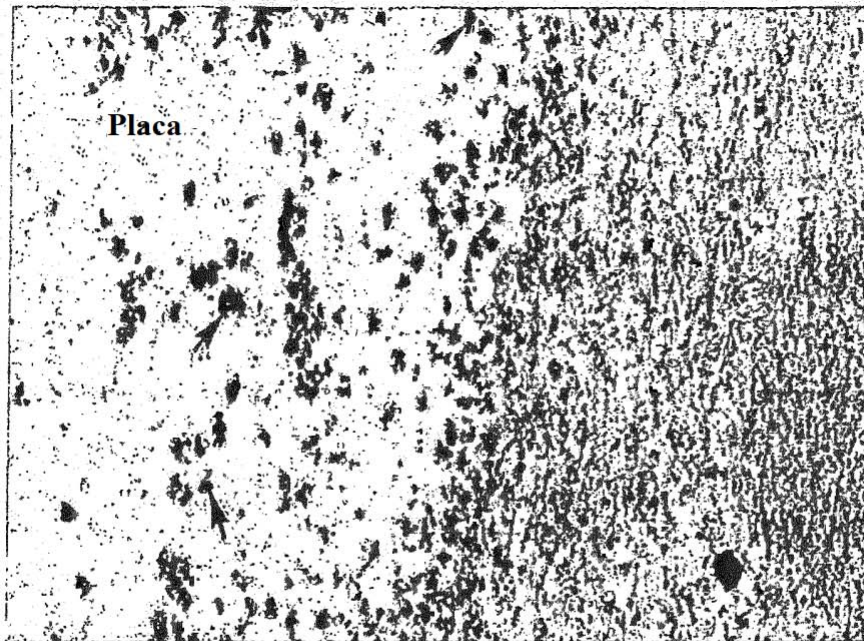
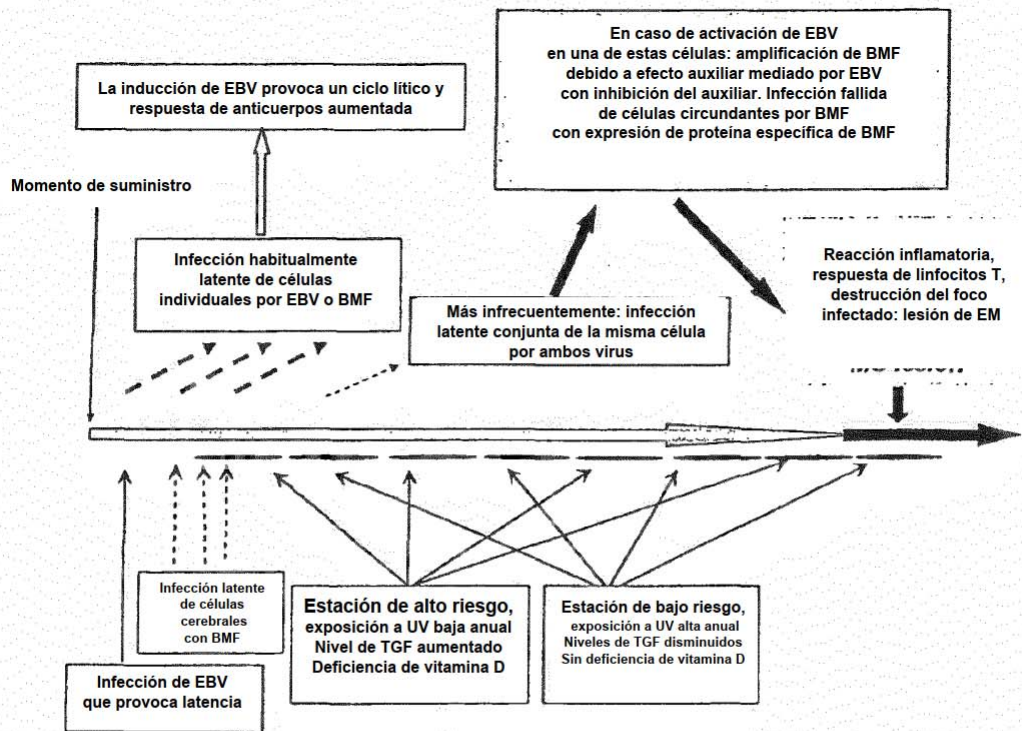


Figura 11



La deficiencia de vitamina D provoca aumento en $TGF\beta$ y mayores tasas de inducción de EBV espontánea, pronunciada de forma estacional a principios de primavera (exposición a UV reducida)

Figura 12

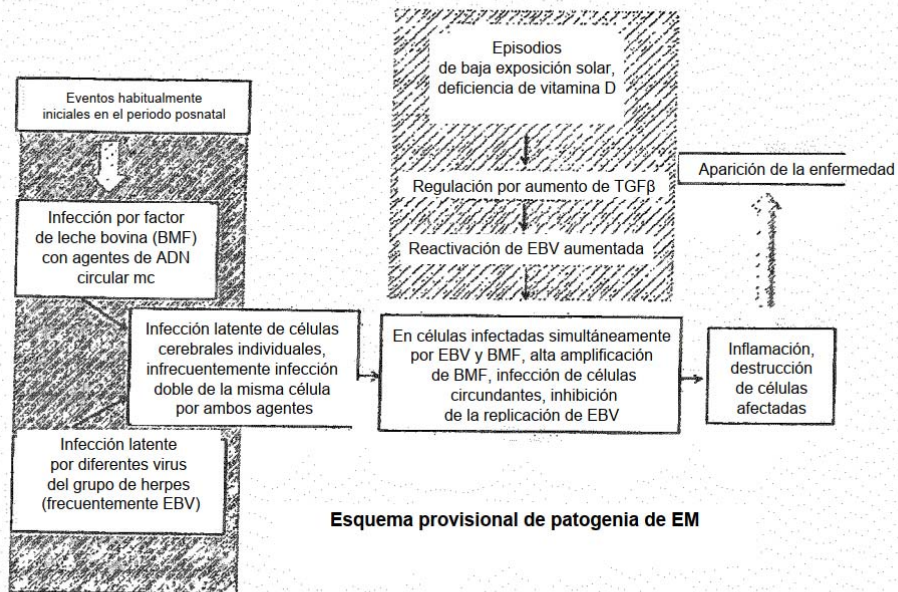


Fig. 13