

## (12) Patente de Estados Unidos

Rota y col.  
US007220852B1

US 7.220.852 B1

22 de mayo de 2007

(10) Patente No .:

(45) Fecha de patente:

(54) CORONAVIRUS AISLADO DE HUMANOS

(75) Inventores: Paul A. Rota, Decatur, GA (EE. UU.); Larry J. Anderson, Atlanta, GA (EE. UU.); William J. Bellini, Lilburn, GA (EE. UU.); Cara Carthel Burns, Avondale Estates, GA (EE. UU.); Raymond Campagnoli, Decatur, GA (EE. UU.); Qi Chen, Marietta, GA (EE. UU.); James A. Comer, Decatur, GA (EE. UU.); Shannon L. Emery, Lusaka (ZM); Decano D. Erdman, Decatur, GA (NOSOTROS); Cynthia S. Goldsmith, Lilburn, GA (EE. UU.); Charles D. Humphrey, Lilburn, GA (EE. UU.); Joseph P. Icenogle, Atlanta, GA (EE. UU.); Thomas G. Ksiazek, Lilburn, GA (EE. UU.); Stephan S. Monroe, Decatur, GA (EE. UU.); William Allan Nix, Belén, GA (EE. UU.); M. Steven Oberste, Lilburn, GA (EE. UU.); Teresa C. T. Peret, Atlanta, GA (EE. UU.); Pierre E. Rollin, Lilburn, GA (EE. UU.); Mark A. Pallansch, Lilburn, GA (EE. UU.); Antonio Sánchez, Lilburn, GA (EE. UU.); Suxiang Tong, Alpharetta, GA (EE. UU.); Sherif R. Zaki, Atlanta, GA (EE. UU.)

(73) Cesionario: Estados Unidos de América como representado por el Secretario de la Departamento de Salud y Humanos Servicios, Centros para el Control de Enfermedades y Prevención, Washington, DC (EE. UU.)

(\*) Aviso: sujeto a cualquier descargo de responsabilidad, el plazo de este

la patente se extiende o ajusta por debajo de 35

USC 154 (b) por 0 días.

(21) Appl. Número de artículo 10/822,904

(22) Archivado: 12 de abril de 2004

Datos de aplicación relacionados

(60) Solicitud provisional n. ° 60 / 465.927, presentada el abr.

25 de 2003.

(51) Int. Cl.

CI2N 15/50

(2006.01)

CI2N 7/00

(2006.01)

(52) Cl. .... 536 / 23.72: 435 / 235.1

(58) Búsqueda de campo de clasificación ..... 536 / 23.72:

514/44; 435 / 235,1, 320,1

Consulte el archivo de la aplicación para ver el historial de búsqueda completo.

(56)

Referencias citadas

DOCUMENTOS DE PATENTES DE ESTADOS UNIDOS

2005/0181357 A1 \* 8, 2005 Peiris et al. .... 435.5

DOCUMENTOS DE PATENTES EXTRANJERAS

WO WO 2004 / 085.633

WO WO 2004/092360

\* 10/2004

\* 10/2004

OTRAS PUBLICACIONES

N° de acceso de GenBank AY274119, "SARS Coronavirus Tor2.

genoma completo ", versión AY274119.1, 14 de abril de 2003. \*

Número de acceso de GenBank AY278487. "Coronavirus SARS BJO2,

genoma parcial ", versión AY278487.1, 21 de abril de 2003. \*

Número de acceso de Genbank AY278554, "SARS coronavirus CUHK

W1, genoma completo. "Versión AY278554.1, 18 de abril de 2003. \*

N° de acceso de GenBank AY278491, "SARS Coronavirus HKU

39849, genoma completo ", versión AY278491.1, 18 de abril de 2003. \*

Coronavirus asociado al SARS. Disponibilidad de secuencia genómica.

en línea se retiró el 8 de agosto de 2005). Recuperado de Internet

<URL: <http://www.bcgsc.ca/bioinfo/SARS->>.\*

Número de acceso a GenBank AY274119, 14 de abril de 2003.

Número de acceso a GenBank AY278741, 21 de abril de 2003.

"Actualización: brote de respiración respiratoria aguda grave

Syndrome Worldwide, 2003. "MMWR Weekly 52: 241-248 (2003).

Emery et al., "Cadena de polimerasa de transcripción inversa en tiempo real

Ensayo de reacción para el coronavirus asociado al SARS ". Emerg.

Infectar.

Enfermedades 10: 311-316 (2004).

Goldsmith et al., "Caracterización ultraestructural del SARS

Coronavirus ", Emerg. Infectar. Enfermedades 10: 320-326 (2004).

Ksiazek et al., "Un nuevo coronavirus asociado con agudo severo

Síndrome Respiratorio. "N. Eng. J. Med. 348: 1953-1966 (2003).

Luo y Luo, "Análisis inicial de la secuencia del genoma del

coronavirus del SARS

hermanita Uso de una plataforma de bioinformática.

"Bioinformato de Asia y el Pacífico de 2"

Conferencia ics (APBC2004), Dunedin, Nueva Zelanda (2004).

Marra et al., "La secuencia del genoma de los asociados con el SARS

Coronavirus, Science 300: 1393-1404 (2003).  
Material complementario en línea para Marra et al. << [www.sciencemag.org/cgi/content/full/1085953/DC1cd](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/1085953/DC1cd).  
Rota et al., "Caracterización de un nuevo coronavirus asociado con síndrome respiratorio agudo severo, "Science 300: 1394-1399 (2003)  
Material complementario en línea para Rota et al. << [www.sciencemag.org/cgi/content/full/1085952/DC1cc](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/1085952/DC1cc).  
\* citado por el examinador  
Examinador primario Mary E. Mosher  
(74) Abogado, agente o firma: Klarduist Sparkman LLP  
(57)

RESUMEN

Aquí se divulga un coronavirus humano recientemente aislado (SARS-CoV), el agente causante de la enfermedad respiratoria aguda grave  
síndrome (SARS) También se proporcionan el ácido nucleico secuencia del genoma del SARS-CoV y el aminoácido secuencias de los marcos de lectura abiertos SARS-CoV, así como  
métodos de usar estas moléculas para detectar un SARS-CoV y detectar infecciones con el mismo. Inmunoestimulante com  
También se proporcionan posiciones, junto con los métodos de su uso.  
1 reclamo, 7 hojas de dibujo

---

**Página 2**

Patente de EE. UU.  
22 de mayo de 2007  
Hoja 1 de 7  
US 7.220.852 B1  
HIGO. 1A  
HIGO. 1B

---

**Página 3**

---

**Página 4**

Patente de EE. UU.  
22 de mayo de 2007  
Hoja 3 de 7  
US 7.220.852 B1  
Ratsow

Y. SARs cov

Y-SHcov-ocA3

\ s. BCow

.

Ort

SMS  
sm.

HIGO. 3

---

**Página 5**

Patente de EE. UU.

22 de mayo de 2007

Hoja 4 de 7

US 7.220.852 B1

SARS-CoV

SARS-CoV

HCoV-229E

SARS-CoV

HCOV-229E G

PEOW

SARS-CoV

SARS-CoV

HIGO. 4 4

---

**Página 6**

Patente de EE. UU.

22 de mayo de 2007

Hoja 5 de 7

US 7.220.852 B1

ss

S

.

..

---

**Página 7**

US 7.220.852 B1

Hoja 6 de 7

22 de mayo de 2007

Patente de EE. UU.

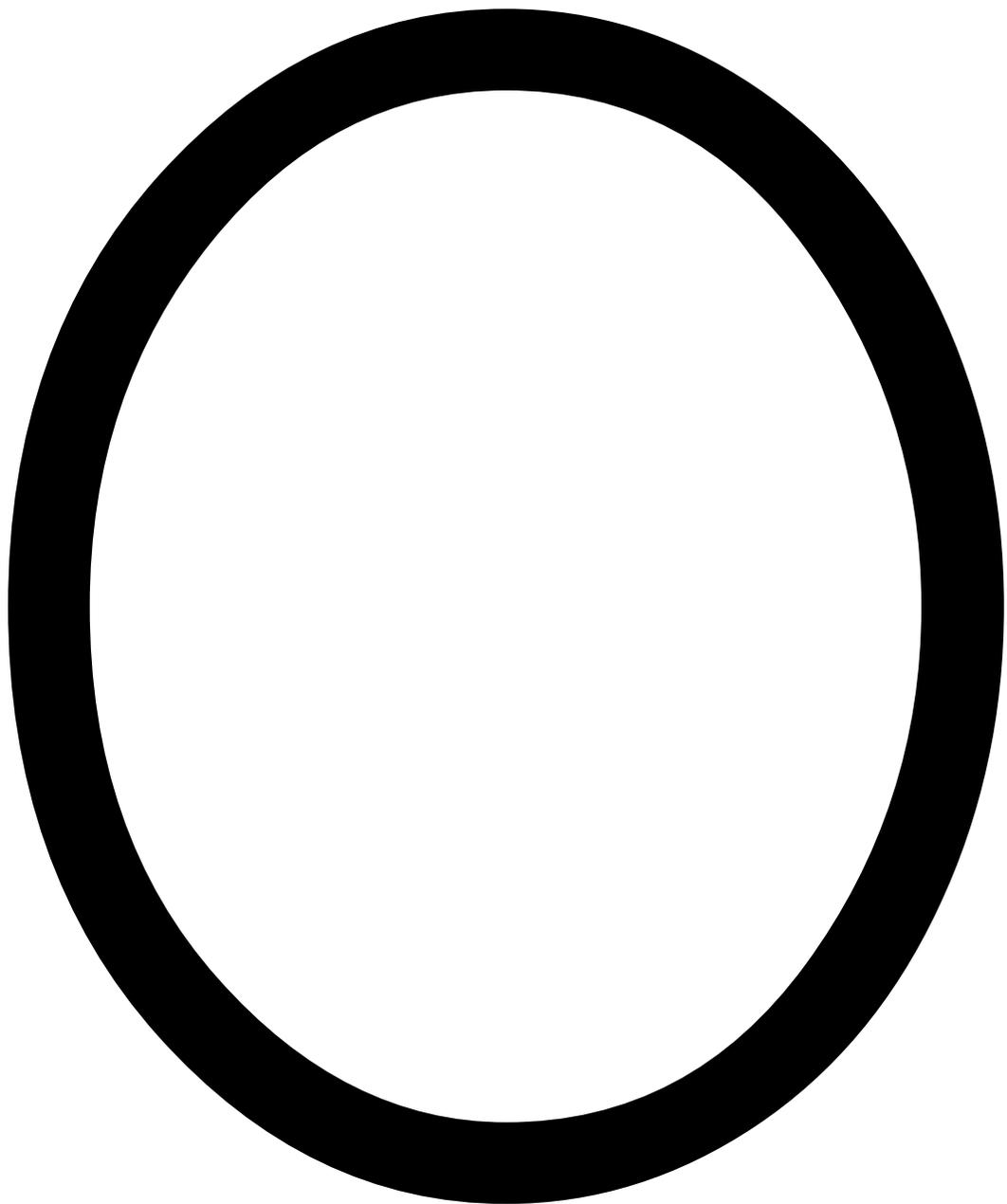
---

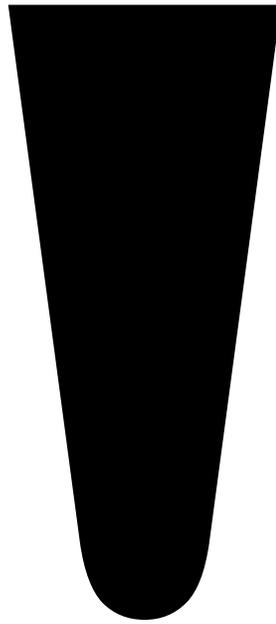
US 7.220.852 B1

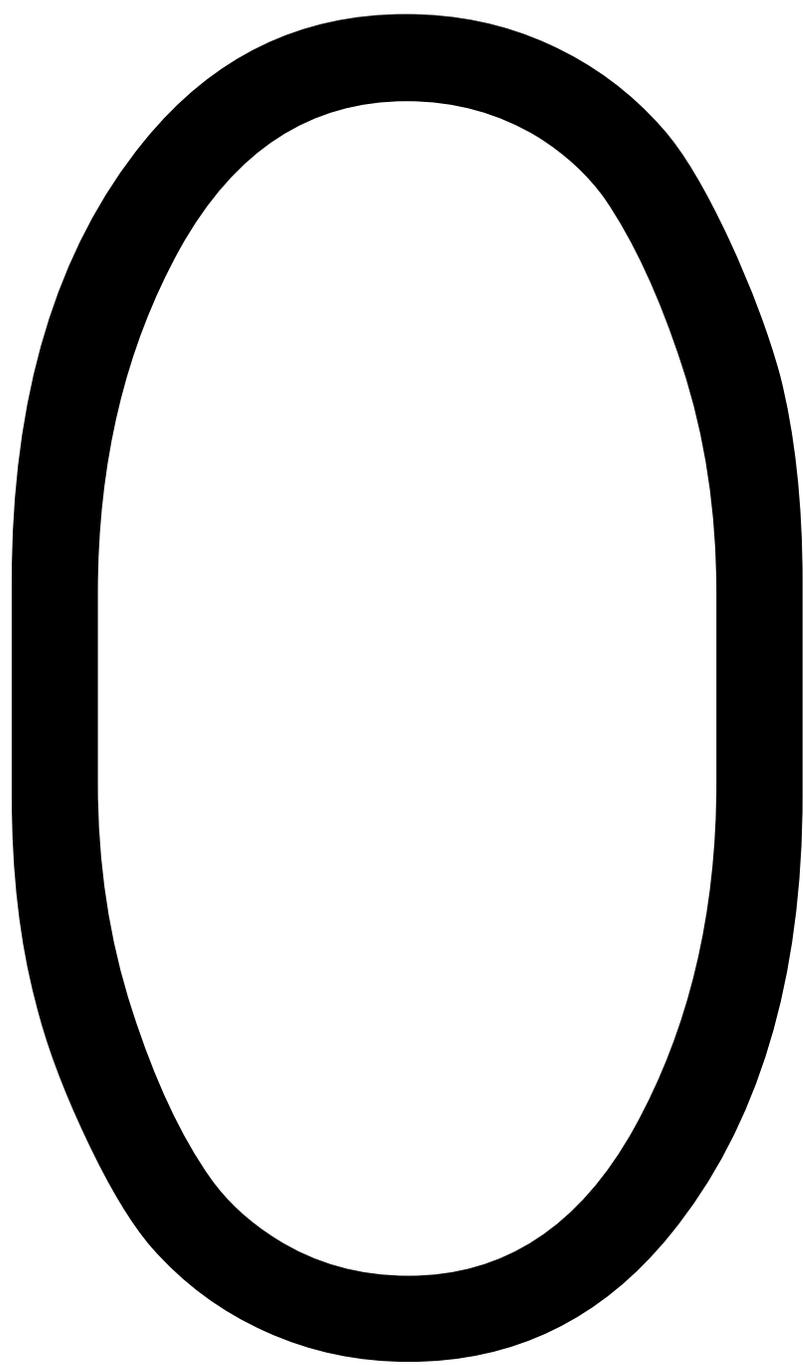
Hoja 7 de 7

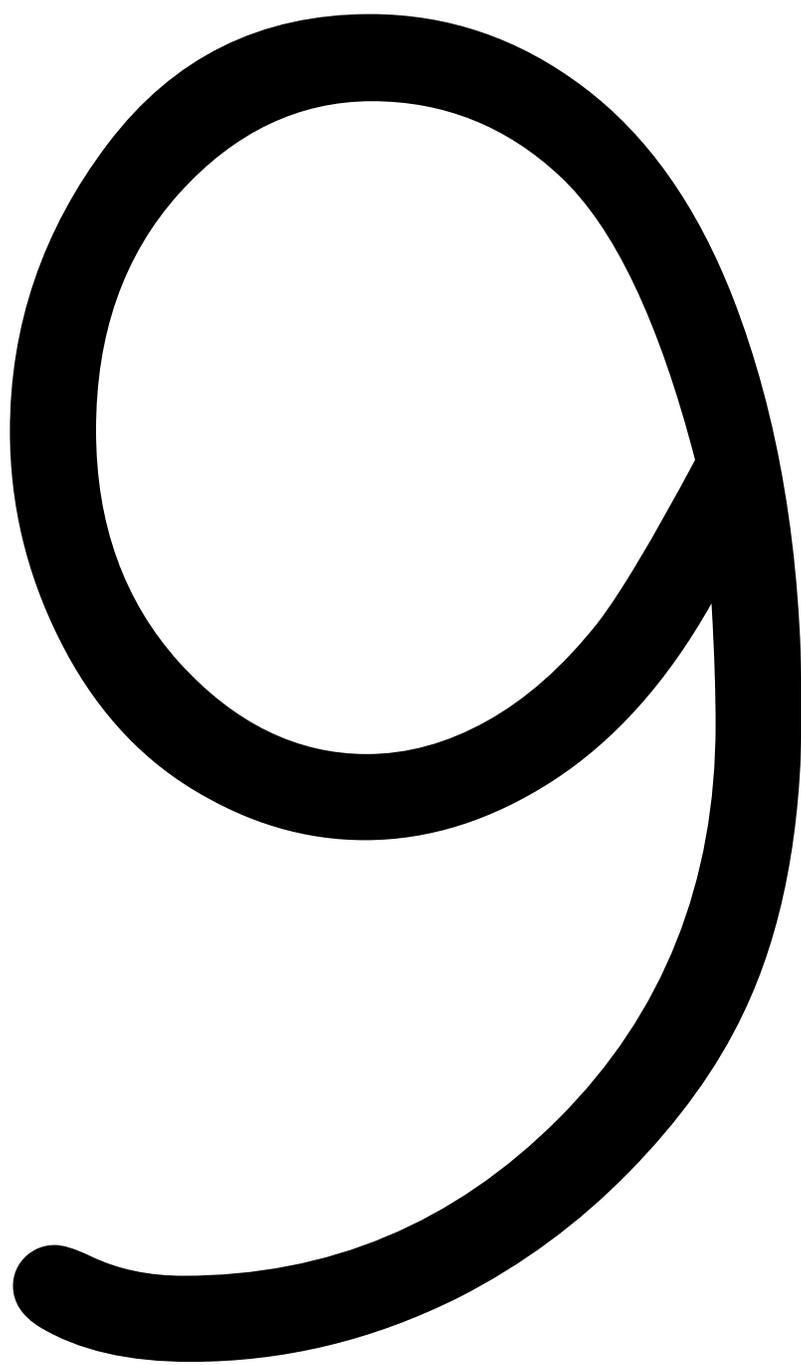
22 de mayo de 2007

Patente de EE. UU.

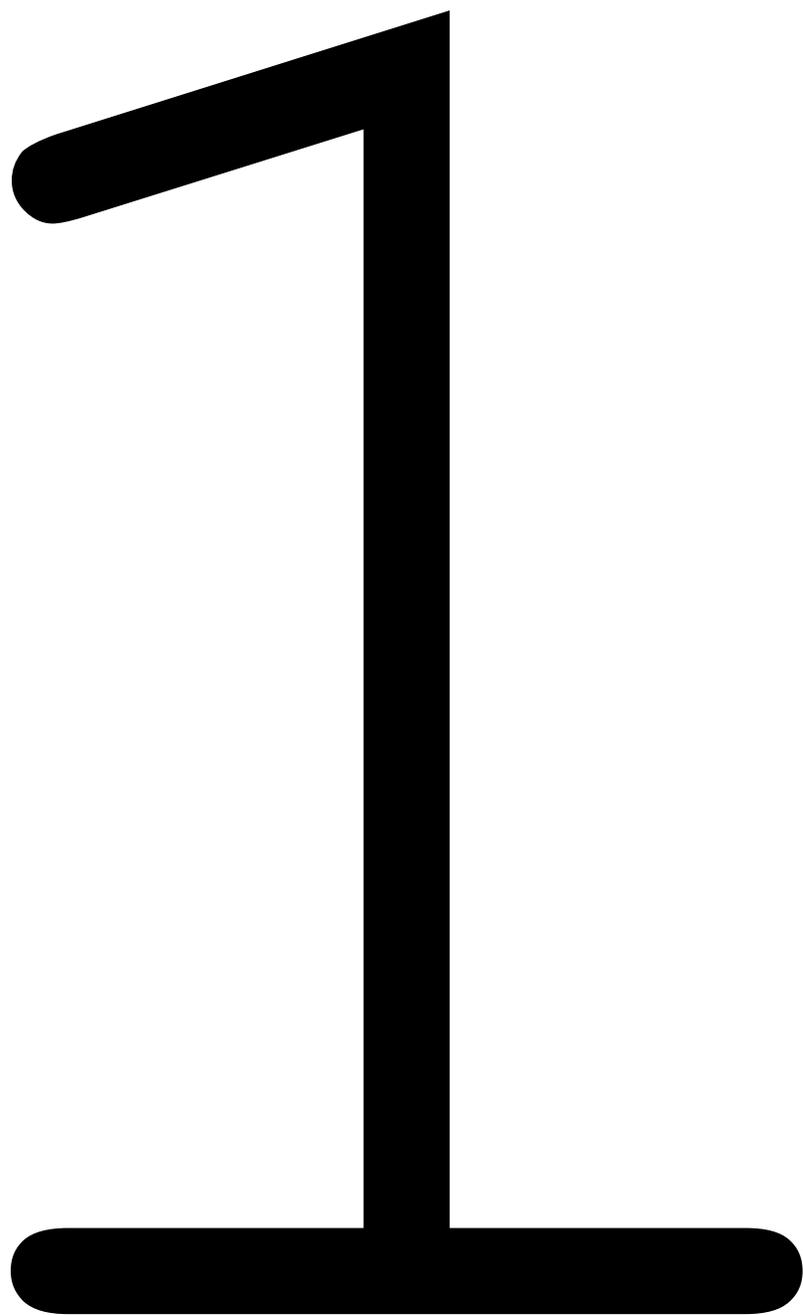


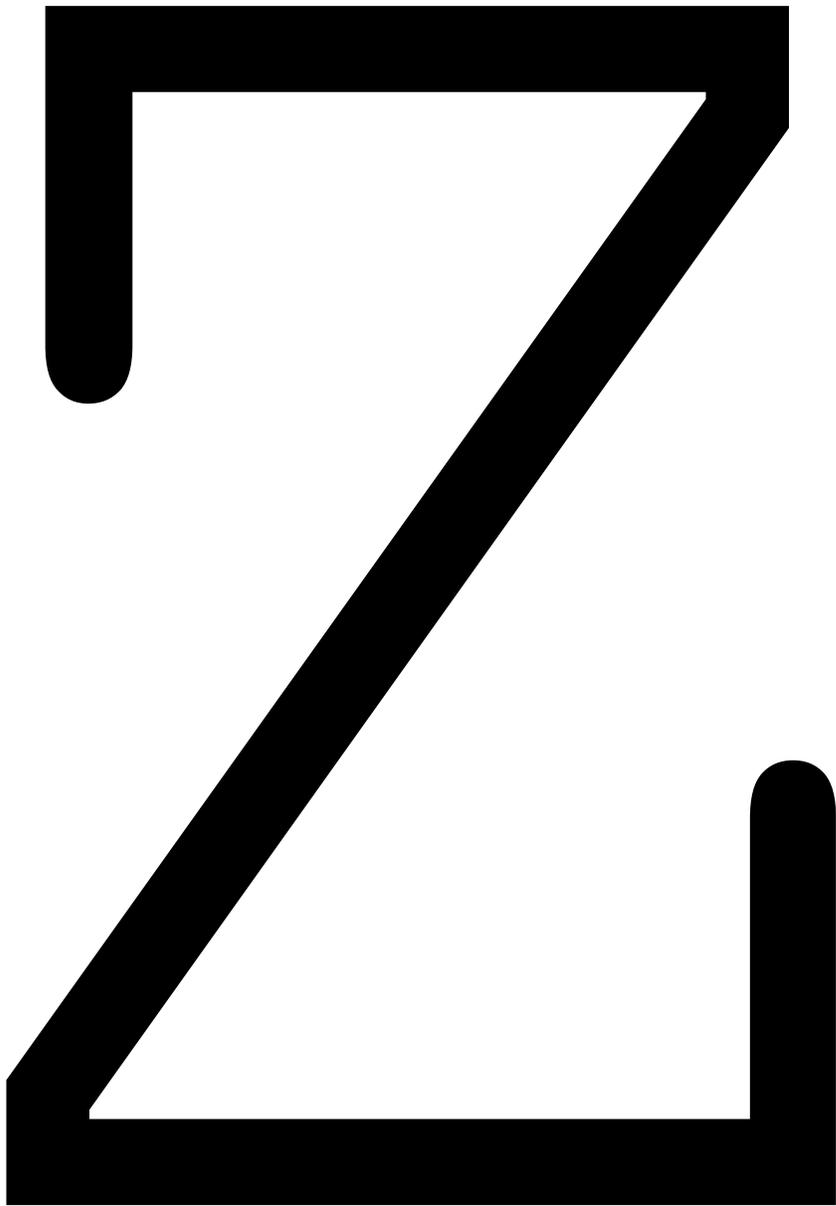






2







US 7.220.852 B1

1)

CORONAVIRUS SOLUCIONADO DE HUMANOS  
RECLAMACIÓN DE PRIORIDAD

Esta solicitud reclama el beneficio de Provisional de EE. UU. Solicitud de Patente No. 60 / 465,927 presentada el 25 de abril de 2003,

que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

DECLARACIÓN DE APOYO GUBERNAMENTAL

Esta invención fue hecha por los Centros para la Enfermedad Control y Prevención, una agencia de los Estados Unidos Gobierno. Por lo tanto, el gobierno de los Estados Unidos tiene ciertas

derechos en esta invención.

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

Esta invención se refiere a un coro humano recién aislado. navirus Más particularmente, se relaciona con un coronavi aislado

genoma rus, proteínas de coronavirus aisladas y aisladas moléculas de ácido nucleico que codifican lo mismo. La revelación

además se relaciona con los métodos para detectar una respiración aguda grave

coronavirus asociado al síndrome de ratory y composiciones que comprende compuestos de coronavirus inmunogénicos.

ANTECEDENTES

Los coronavirus (orden Nidovirales, familia Coronaviridae, género Coronavirus) son un grupo diverso de grandes, envel

virus abiertos de ARN de cadena positiva que causan problemas respiratorios

y enfermedades entéricas en humanos y otros animales. A

aproximadamente 30,000 nucleótidos (nt), su genoma es el más grande encontrado en cualquiera de los virus de ARN. Los coronavirus son

esférico, 100-160 nm de diámetro con complejo de 20-40 nm Proyecciones de superficie en forma de maza que rodean la periferia.

Los coronavirus comparten proteínas estructurales comunes que incluyen un

proteína de pico (S), proteína de membrana (M), proteína de envoltura

(E) y, en un subconjunto de coronavirus, una hemaglutinina proteína esterasa (HE). La proteína S, una glucoproteína que sobresale de la membrana del virus, participa en la célula huésped

receptor de unión y es un objetivo para neutralizar anticuerpos.

Las proteínas E y M están involucradas en la formación de viriones y liberación de la célula huésped. Se encuentran partículas de coronavirus

dentro de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso y en vesículas de células huésped infectadas donde hay viriones

ensamblado El genoma del coronavirus consta de dos marcos de lectura (ORF1a y ORF1b) que producen un ARN polimerasa y un conjunto anidado de mRNAs subgenómico codificado

ing proteínas estructurales y no estructurales, incluida la SE

M y proteínas de la nucleocápside (N). El género coronavirus incluye al menos 13 especies que se han subdividido en al menos tres grupos (grupos I, II y III) sobre la base de propiedades serológicas y genéticas (deVries et al., Sem. Virol.

8: 33-47, 1997: Fields et al. eds. Fields Virology, 3ra edición,

Raven Press, Filadelfia, 1323-1341, 1996; Mahey y Collier eds. Microbiología e infecciones microbianas, volumen 1 Virología, edición de 9 ", Oxford University Press, 463-479, 1998).

Los tres grupos conocidos de coronavirus están asociados con una variedad de enfermedades de humanos y animales domésticos

(por ejemplo, ganado vacuno, cerdos, gatos, perros, roedores y pájaros),

incluyendo gastroenteritis y vías respiratorias superiores e inferiores

enfermedad del tracto. Los coronavirus conocidos incluyen Coro humano navirus 229E (HCoV-229E), coronavirus canino (CCoV),

virus de peritonitis infecciosa felina (FIPV), transmisión porcina

virus de gastroenteritis probable (TGEV), diarrea epidémica porcina

virus rhea (PEDV), coronavirus humano OC43 (HooV

10

15

25

30

35

40

45

50

55

60 60

sesenta y cinco

2

OC43), coronavirus bovino (BCoV), porcino

virus de encefalomiелitis hemaglutinante (HEV), rata Sialo virus de la dacrioadenitis (SDAV), virus de la hepatitis del ratón (MHV), coronavirus de pavo (TCoV) y bronquitis infecciosa aviar virus (IBV-Avian) (Fields et al. eds. Fields Virology, 3rd edición, Raven Press, Filadelfia, 1323-1341, 1996: Mahey y Collier eds. Microbiología e Infecciones Microbianas iones, Volumen 1, Virología, edición de 9 ", Universidad de Oxford Press, 463-479, 1998).

Las infecciones por coronavirus son generalmente específicas del huésped con respecto a la infectividad y síntomas clínicos. Coronavirus exhiben además un marcado tropismo tisular; infección en el incó

La especie de huésped o tipo de tejido recto puede provocar un aborto infección, producción de virus mutantes y virulencia alterada.

Los coronavirus generalmente no crecen bien en cultivo celular,

y los modelos animales para la infección por coronavirus humano son carente. Por lo tanto, se sabe poco sobre ellos (Fields et al.

eds. Fields Virology, 3a edición, Raven Press, Filadelfia, 1323-1341, 1996). Los coronavirus humanos conocidos son notablemente exigente en cultivo celular, prefiriendo líneas celulares seleccionadas, cultivo de órganos, o ratones lactantes para propagación.

Coronavi

Las artimañas cultivadas en cultivo celular exhiben diversos grados de

virulencia y / o efecto citopático (CPE) dependiendo del tipo de célula huésped y condiciones de cultivo. El único humano o

coronavirus animal que se ha demostrado que crece en Vero Las células E6 son PEDV y requieren la adición de tripsina para

medio de cultivo para el crecimiento en células Vero E6.

Además,

El PEDV adaptado al cultivo celular Vero E6 da como resultado un sorprendente

CPE diferente, con vacuolas citoplasmáticas y la formación de sincitios grandes (Hofmann y Wyler, J. Clin. Micro.

26: 2235-39, 1988: Kusanagi et al. J. Vet. Medicina. Sci. 554:

313-18, 1991).

No se sabía que el coronavirus causara previamente enfermedad grave en humanos, pero se han identificado como causa principal de enfermedad del tracto respiratorio superior, incluida la resfriado comun. Las infecciones repetidas en humanos son comunes dentro y a través del serotipo, lo que sugiere que es inmune la respuesta a la infección por coronavirus en humanos es incompleta o de corta duración. La infección por coronavirus en animales puede causar enfermedad entérica o respiratoria grave. La vacunación tiene se ha utilizado con éxito para prevenir y controlar algunos coronavirus en animales. La capacidad de algunos coronavirus para causar una enfermedad grave aumentan la posibilidad que el coronavirus también podría causar una enfermedad más grave en humanos (Fields et al. eds. *Fields Virology*, 3ra edición, Raven Press, Filadelfia, 1323-1341, 1996; Mahey y Collier eds. *Microbiología e infecciones microbianas*, Volumen 1 *Virology*, edición 9<sup>a</sup>, Oxford University Press, 463-479, 1998).

A finales de 2002, casos de enfermedades respiratorias potencialmente mortales sin etiología identificable fueron reportados desde Guangdong Provincia, China, seguido de informes de Vietnam, Canadá, y Hong Kong de enfermedad respiratoria febril severa que se extendió a miembros del hogar y trabajadores de la salud. El síndrome fue designado "Síndrome respiratorio agudo severo" (SARS) en febrero de 2003 por los Centros para la Enfermedad Control y Prevención (MMWR, 52: 241-48, 2003).

Esfuerzos pasados para desarrollar diagnósticos rápidos y vacunas para la infección por coronavirus en humanos se ha visto obstaculizada por una falta de modelos de investigación apropiados y el curso de enfermedad en humanos. Por lo tanto, una necesidad de diagnóstico rápido existen pruebas y vacunas.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

Se ha identificado un coronavirus humano recientemente aislado como agente causal del SARS, y se denomina SARS-CoV.

US 7.220.852 B1

3

La secuencia de ácido nucleico del genoma del SARS-CoV y Las secuencias de aminoácidos de la lectura abierta de SARS-CoV

Los marcos se proporcionan aquí.

Esta divulgación proporciona métodos y composiciones de uso ful en la detección de la presencia de un ácido nucleico de SARS-CoV en

una muestra y / o diagnosticando una infección por SARS-CoV en un

Tema. También se proporcionan métodos y composiciones útiles. en la detección de la presencia de un antígeno SARS-CoV o anti

cuerpo en una muestra y / o diagnosticando una infección por SARS-CoV

en un sujeto.

Lo anterior y otras características y ventajas serán hacerse más evidente a partir de la siguiente descripción detallada

ción de varias realizaciones, que procede con referencia a las figuras acompañantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figs. 1A-B son fotomicrografías que ilustran típicas efectos citopáticos tempranos observados con aislados de coronavirus y

suero de pacientes con SARS. HIGO. 1A es una fotomicrografía de

Células Vero E6 inoculadas con una muestra orofaríngea de un paciente con SARS (x40). HIGO. 1B es una

fotomicrografía

de células Vero E6 infectadas que reaccionan con el suero de un

paciente con SRAS convaleciente en un anti fluorescente indirecto

ensayo de cuerpo (IFA) (x400).

Las figs. 2A-B son electronimicrografías que ilustran ultra características estructurales de los coronavi asociados al SARS

rus (SARS-CoV). HIGO. 2A es un microelectrónico de sección delgada

vista escénica de nucleocápsides virales alineadas a lo largo del

membrana del retículo endoplásmico rugoso (flecha) como partículas brotan en las cisternas. Los viriones envueltos tienen proyecciones de superficie (punta de flecha) y un centro de electrones. Directamente debajo de la envoltura viral se encuentra una característica anillo formado por la nucleocápside helicoidal, a menudo visto en sección transversal. HIGO. 2B es una mancha negativa (metilamina tungstate) electronimicrografía que muestra manchas penetradas partícula de coronavirus con el típico núcleo helicoidal interno estructura tipo cápsida y proyecciones de superficie en forma de palo rodeando la periferia de la partícula. Barras: 100 nm. HIGO. 3 es un árbol de parsimonia máximo estimado ilustrating relaciones filogenéticas putativas entre SARS-CoV y otros coronavirus humanos y animales. Filogenético las relaciones se basan en la alineación de secuencias de 405 nucleótidos del gen de coronavirus polimerasa ORF1b (nucleico ácido 15.173 a 15.578 de la SEC ID N°: 1). Los tres principales grupos antigénicos de coronavirus (I, II y III), representados por HCoV-229E, CCoV, FIPV, TGEV, PEDV, HCoV-OC43, BCoV, HEV, SDAV, MHV, TCoV e IBV-Avian, son se muestra sombreado. Valores de arranque (100 repeticiones) obtenidos de un árbol de consenso de la regla de mayoría del 50% se trazan en el principales ramas internas del filograma. Las longitudes de las ramas son proporcional a las diferencias de nucleótidos. HIGO. 4 es una representación pictórica de la unión vecina árboles que ilustran relaciones filogenéticas putativas entre SARS-CoV y otros coronavi humanos y animales artimañas Secuencias de aminoácidos del SARS-CoV indicado Las proteínas se compararon con las de los virus de referencia. representando cada especie en los tres grupos de coronavi artimañas para las cuales se completa la información de la secuencia genómica estaba disponible el grupo 1: HCoV-229E (AF304460); PEDV (AF353511); TGEV (AJ271965); grupo 2: BCoV

(AF220295); MHV (AF201929); grupo 3: bron infeccioso virus de la quitis (M95169). Secuencias para cepas representativas de otras especies de coronavirus, para las cuales secuencia parcial la información estaba disponible, se incluyeron para algunos de los comparaciones de proteínas estructurales grupo 1: CCoV (D13096); FCoV (AY204704); coronavirus respiratorio porcino (Z24675); grupo 2: HCoV-OC43 (M76373, L14643, M93390); HEV (AY078417); coronavirus de rata (AF207551). Las alineaciones de secuencia y los árboles de unión de vecinos fueron gen

10  
15  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60 60  
sesenta y cinco  
4 4

eliminado usando Clustalx 1.83 con la proteína Gonnet Matriz de comparación. Los árboles resultantes se ajustaron para salida final usando treetool 2.0.1.

Las figs. 5A-C son fotomicrografías que ilustran difusa daño alveolar en un paciente con SARS (FIGS. 5A-B), y tinción inmunohistoquímica de Vero infectado con SARS-CoV Células E6 (figura 5C). HIGO. 5A es una microfotografía de pulmón

tejido de un paciente con SRAS (X50). Daño alveolar difuso, abundantes macrófagos espumosos y sincitial multinucleado las células están presentes; Se utilizó tinción con hematoxilina y eosina. HIGO.

5B es una fotomicrografía de mayor aumento del tejido pulmonar del mismo paciente con SARS (x250). Las células sincitiales no muestran inclusiones virales conspicuas. HIGO. 5C es una fotomicrografía

de infectados por SARS-CoV teñidos inmunohistoquímicamente células (x250). Inmunotinción membranosa y citoplasmática de células individuales y sincitiales Vero E6 se logró utilizando

fluido ascítico felino anti-FIPV-1. Fos inmunoalcalino fatasa con sustrato rojo rápido naftol y hematoxilina se usó la contratinción.

HIGO. 6A-B son electronimicrografías que ilustran ultra

características estructurales de una célula infectada por coronavirus en lavado broncoalveolar (BAL) de un paciente con SARS. HIGO. 6A es una electronimicrografía de una célula infectada con coronavirus.

Numerosas partículas intracelulares y extracelulares son presente; Los viriones están indicados por las puntas de flecha. HIGO. 6B es una electromicrografía de mayor aumento del área vista en la flecha en la FIG. 6A (girado en sentido horario aproximadamente

90 °). Barras: FIG. 6A, 1  $\mu$ m; la FIG. 6B, 100 nm.

Las figs. 7A-C ilustran la organización del SARS-CoV genoma HIGO. 7A es un diagrama de la organización general de el ARN genómico de SARS-CoV de 29,727 nt. El líder de 72 nt

la secuencia se representa como un pequeño rectángulo en el extremo izquierdo

final. ORFs 1a y 1b, que codifican el polipropileno no estructural

teins, y esos ORF que codifican el S, E, M, y N estructural proteínas, están indicadas. Posición vertical de las cajas indi

determina la fase del marco de lectura (fase 1 para proteínas arriba de la línea, fase dos para proteínas en la línea y fase

tres para proteínas debajo de la línea). HIGO. 7B es un expandido

Vista de la región de codificación de proteínas estructurales y predicha

transcripciones de ARNm. Codificación de proteínas estructurales conocidas

regiones (cuadros grises oscuros) y regiones y marcos de lectura

para productos potenciales X1-X5 (cajas de color gris claro) son indi

atendidos Longitudes y ubicaciones del mapa del terminal 3'-coterminales

Los ARNm expresados por el SARS-CoV se indican, como predicho por la identificación del régimen transcripcional conservado

secuencias de latencia. HIGO. 7C es una imagen digitalizada de un nylon.

membrana que muestra análisis de transferencia Northern de SARS-CoV

ARNm. Poly (A) + RNA de células infectadas Vero E6 fue separado en un gel de formaldehído-agarosa, transferido a un membrana de nylon e hibridada con un marcado con digoxigenina

riboprobe superpuesto a la región 3 'no traducida. Señales fueron visualizados por quimioluminiscencia. Tamaños del SARS Los ARNm de CoV se calcularon por extrapolación de un registro

ajuste lineal del marcador de masa molecular. Carril 1, SARS-CoV ARNm: carril 2, célula Vero E6 ARNm: carril 3, masa molecular marcador, tamaños en kB.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

Las secuencias nucleicas y de aminoácidos enumeradas en el el listado de secuencias que lo acompaña se muestra usando el estándar

abreviaturas de letras para bases de nucleótidos, y tres letras código para aminoácidos, como se define en 37 CFR 1.822.

Solamente

se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero el

Strand complementario se entiende como incluido por cualquier referencia a la cadena mostrada. En el acompañante listado de secuencias:

US 7.220.852 B1

5 5

La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de ácido nucleico del Genoma del SARS-CoV.

La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos del Poliproteína 1a de SARS-CoV (codificada por el ácido nucleico 265 a

ácido nucleico 13.398 de SEC ID N°: 1).

5 5

SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la Poliproteína 1b de SARS-CoV (codificada por el ácido nucleico 13,398

a 21.482 de SEQ ID NO: 1).

SEQ ID NO. 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la Proteína SARS-CoV S (codificada por el ácido nucleico 21,492

a

25.256 de la SEC ID N°: 1).

SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la Proteína SARS-CoV X1 (codificada por el ácido nucleico 25,268

a

26.089 de SEQID NO: 1).

La SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de aminoácidos del Proteína SARS-CoV X2 (codificada por el ácido nucleico 25,689 a 15

26,150 de SEQID NO: 1).

26,150 de SEQID NO: 1).

SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la

Proteína E del SARS-CoV (codificada por el ácido nucleico 26,117 a 26.344 de SEQID NO: 1).  
SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de aminoácidos de los 20  
Proteína M del SARS-CoV (codificada por el ácido nucleico 26,398 a 27.060 de SEQID NO: 1).  
La SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de aminoácidos del  
Proteína SARS-CoV X3 (codificada por el ácido nucleico 27,074 a 27,262 de SEQID NO: 1).  
25  
La SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de aminoácidos del  
Proteína SARS-CoV X4 (codificada por el ácido nucleico 27.273 a 27,638 de SEQID NO: 1).  
La SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia de aminoácidos del  
Proteína SARS-CoV X5 (codificada por el ácido nucleico 27.864 a 28,115 de SEQ ID NO: 1).  
SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de aminoácidos del  
Proteína N del SARS-CoV (codificada por el ácido nucleico 28,120 a 29.385 de SEQ ID NO: 1).  
SEC ID N°: 13-15 muestran la secuencia de ácido nucleico de varios cebadores de oligonucleótidos específicos de SARS-CoV.  
SEC ID N°: 16-33 muestran la secuencia de ácido nucleico de varios cebadores / sondas de oligonucleótidos utilizados en tiempo real  
reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR)  
Ensayos de SARS-CoV.  
SEC ID N°: 34-35 muestran la secuencia de ácido nucleico de 40  
dos cebadores degenerados diseñados para reconocer sitios que codifican  
motivos conservados de aminoácidos del coronavirus.  
SEC ID N°: 36-38 muestran la secuencia de ácido nucleico de varios cebadores oligonucleotídicos / sonda utilizados como controles en  
10  
30  
35  
Ensayos de RT-PCR en tiempo real.  
45  
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE VARIOS  
Realizaciones  
I. Abreviaturas  
50  
METRO:  
proteína de membrana de coronavirus  
NORTE:

coronavirus nucleoprotein

55

ORF:

marco de lectura abierto

PCR

reacción en cadena de la polimerasa

CARRERA:

Amplificación rápida de 5 'de extremos de ADNc

RT-PCR:

reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa

S:

proteína de pico de coronavirus

SARS:

Síndrome respiratorio agudo severo

SARS-CoV: coronavirus agudo severo asociado al síndrome respiratorio 60

TRS:

secuencia reguladora transcripcional

II Condiciones

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se utilizan de acuerdo con 65

ing para el uso convencional. Definiciones de términos comunes en

La biología molecular se puede encontrar en Benjamin Lewin, Genes

6 6

VII, publicado por Oxford University Press, 2000 (ISBN

019879276X); Kendrew y col. (eds.), La Enciclopedia de

Molecular Biology, publicado por Blackwell Publishers,

1994 (ISBN 0632021829); y Robert A. Meyers (ed.),

Biología Molecular y Biotecnología: una Integral

Desk Reference, publicado por Wiley, John & Sons, Inc.,

1995 (ISBN 0471186341); y otras referencias similares.

Como se usa en este documento, los términos singulares "a",

"an" y "el

incluir referentes plurales a menos que el contexto indique claramente

de otra manera. Del mismo modo, la palabra 'o' pretende

incluir

"Y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

También como

usado aquí, el término "comprende" significa "incluye". Por lo tanto

"Que comprende A o B 'significa que incluye A, B o A y B.

debe entenderse además que todos los tamaños de nucleótidos o amino

tamaños de ácido y todo peso molecular o masa molecular

los valores dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son

aproximados

compañero, y se proporcionan para la descripción. Aunque los

métodos

y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí

puede usarse en la práctica o prueba de la presente

invención,

Los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Todos

publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias

Las entidades mencionadas en este documento se incorporan por referencia en

en su totalidad. En caso de conflicto, la presente especificación,

incluyendo explicaciones de términos, controlará. Además, el materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y No pretende ser limitante.

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de esta divulgación, las siguientes explicaciones de términos específicos

están provistos:

**Adyuvante:** una sustancia que no específicamente mejora la respuesta inmune a un antígeno. Desarrollo de vacuna los adyuvantes para uso en humanos se revisan en Singh et al. (Nat.

Biotecnología 17: 1075-1081, 1999), que revela que, en el momento de su publicación, sales de aluminio y el MF59 microemulsión son los únicos adyuvantes de vacuna aprobados para

uso humano

**Amplificación:** amplificación de una molécula de ácido nucleico

(por ejemplo, una molécula de ADN o ARN) se refiere al uso de un laboratorio

técnica que aumenta el número de copias de un nucleico molécula de ácido en una muestra. Un ejemplo de amplificación es

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual una muestra es

en contacto con un par de cebadores oligonucleotídicos bajo condiciones que permiten la hibridación de los cebadores para una plantilla de ácido nucleico en la muestra. Los cebadores son

extendido bajo condiciones adecuadas, disociado del plantilla, recocido, extendido y disociado para amplificar

El número de copias del ácido nucleico. El producto de la amplificación puede caracterizarse por técnicas tales como electroforesis, patrones de escisión de endonucleasa de restricción,

hibridación o ligadura de oligonucleótidos, y / o ácido nucleico

secuenciación

Otros ejemplos de métodos de amplificación incluyen hebra amplificación de desplazamiento, como se describe en la patente de EE.UU. No.

5,744.311; amplificación isotérmica libre de transcripción, como divulgado en la patente de EE.UU. N° 6.033.881; reparar la reacción en cadena amplificación, como se describe en el documento WO 90/01069; cadena de ligasa amplificación de reacción, como se describe en el documento EP-A-320.308; brecha llenado de la amplificación de la reacción en cadena de la ligasa, como se describe en Pat. N° 5.427.930; y transcripción de ARN NASBATM amplificación libre, como se describe en la patente de EE.UU. No. 6.025.134.

Se puede modificar un método de amplificación, incluso para ejemplo por pasos adicionales o acoplando la amplificación con otro protocolo

Animal: organismos vertebrados multicelulares vivos, un categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves.

El término mamífero incluye tanto humanos como no humanos

mamíferos. Del mismo modo, el término "sujeto" incluye tanto sujetos humanos y veterinarios, por ejemplo, humanos, no primates humanos, perros, gatos, caballos y vacas.

US 7.220.852 B1

7 7

Anticuerpo: una proteína (o complejo de proteínas) que incluye

uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina.

Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen el kappa, constante lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu genes de la región, así como la miríada de inmunoglobulina vari

genes de la región capaz. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa

o lambda Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa,

delta o épsilon, que a su vez define la inmunoglobulina clases, IgG, IgM, IgA, Ig D e IgE, respectivamente.

La unidad estructural básica de inmunoglobulina (anticuerpo) es

generalmente un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos

pares idénticos de cadenas de polipéptidos, cada par tiene uno

"Ligero" (aproximadamente 25 kDa) y uno "pesado" (aproximadamente 50-70 kDa) cadena. El término N de cada cadena define una variable región de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento de antígeno. Los términos "variable cadena ligera "(V) y" cadena pesada variable "(V) se refieren, respectivamente, a estas cadenas ligeras y pesadas. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos" incluye intacto inmunoglobulinas, así como una serie de bien caracterizadas fragmentos Por ejemplo, Fabs, FV y Fvs de cadena sencilla (SCFV) que se unen a la proteína objetivo (o epítipo dentro de un proteína o proteína de fusión) también sería una unión específica agentes para esa proteína (o epítipo). Estos anticuerpos frag Los elementos se definen de la siguiente manera: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de un anti molécula corporal producida por la digestión de anticuerpos completos con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab ', el fragmento de un molécula de anticuerpo obtenida tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguida de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; dos fragmentos Fab 'son obtenido por molécula de anticuerpo; (3) (Fab '), el fragmento de el anticuerpo obtenido tratando el anticuerpo completo con el enzima pepsina sin reducción posterior; (4) F (ab '), a dímero de dos fragmentos Fab 'unidos por dos disulfuros cautiverio; (5) Fv, un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas; y (6) soltero anticuerpo de cadena, una molécula genéticamente modificada contiene ing la región variable de la cadena ligera, la región variable

de la cadena pesada, unida por un conector de polipéptido adecuado como  
Una molécula de cadena única genéticamente fusionada. Métodos de mak

Estos fragmentos son rutinarios (ver, por ejemplo, Harlow y Lane Usando anticuerpos. Un manual de laboratorio. CSHL Nueva York, 1999).

Anticuerpos para usar en los métodos y dispositivos de este

La divulgación puede ser monoclonal o policlonal. Solo por cierto

por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar a partir de

hibridomas murinos según el método clásico de

Kohler y Milstein (Nature 256: 495-97, 1975) o derivada cinco métodos de los mismos. Procedimientos detallados para monoclonal

la producción de anticuerpos se describe en Harlow y Lane, Uso de anticuerpos: un manual de laboratorio. CSHL, Nueva York,

1999

Antígeno: un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en

un animal, incluidas las composiciones que se inyectan o absorbido en un animal. Un antígeno reacciona con los productos.

de inmunidad humoral o celular específica, incluidas las inducido por inmunógenos heterólogos. En una realización, un antígeno es un antígeno de coronavirus.

Unión o unión estable: un oligonucleótido se une o se une de forma estable a un ácido nucleico diana si una cantidad suficiente de el oligonucleótido forma pares de bases o se hibrida a su ácido nucleico diana, para permitir la detección de esa unión.

El enlace puede ser detectado por físico o funcional propiedades de la diana: complejo oligonucleotídico. Unión entre un objetivo y un oligonucleótido puede ser detectado por

10

15

25

30

35

40

45

50

55

60 60

sesenta y cinco

8

cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica, que incluye

ensayos de unión funcional o física. La unión puede ser detectado funcionalmente determinando si la unión tiene un efecto observable sobre un proceso biosintético como expresión de un gen, replicación de ADN, transcripción, transcripción, y similares.

Métodos físicos para detectar la unión del complemento.

Las cadenas tary de ADN o ARN son bien conocidas en la técnica, y

incluir métodos tales como DNasa I o huella química, cambio de gel y ensayos de escisión por afinidad, transferencia Northern,

Southern blotting, dot blotting y detección de absorción de luz

procedimientos de Por ejemplo, un método que es ampliamente usado, porque es tan simple y confiable, implica observar Un cambio en la absorción de luz de una solución que contiene un

oligonucleótido (o un análogo) y un ácido nucleico diana en 220 a 300 nm a medida que la temperatura aumenta lentamente.

Si el

oligonucleótido o análogo se ha unido a su objetivo, hay un Aumento repentino de la absorción a una temperatura característica.

como el oligonucleótido (o análogo) y el objetivo se disocian o

fundir.

La unión entre un oligómero y su nucleico objetivo

el ácido se caracteriza frecuentemente por la temperatura (T) a

cuyo 50% del oligómero se funde de su objetivo. UN

T más alto, significa un pariente complejo más fuerte o más estable

a un complejo con una T. inferior

ADNc (ADN complementario): un fragmento de ADN que carece de segmentos internos, no codificantes (intrones) y reguladores secuencias que determinan la transcripción. El ADNc se sintetiza

en el laboratorio por transcripción inversa desde messenger ARN extraído de las células.

Electroforesis: Electroforesis se refiere a la migración de solutos cargados o partículas en un medio líquido debajo del influencia de un campo eléctrico. Las separaciones electroforéticas son

ampliamente utilizado para el análisis de macromoléculas. De particular

importancia es la identificación de proteínas y ácido nucleico

secuencias Dichas separaciones pueden basarse en diferencias en tamaño y / o carga. Las secuencias de nucleótidos tienen un tamaño uniforme y por lo tanto se separan en función de las diferencias en tamaño. La electroforesis se puede realizar de forma no compatible en medio líquido (por ejemplo, electroforesis capilar), pero más comúnmente el medio líquido viaja a través de un sólido Medio de soporte. Los medios de apoyo más utilizados son geles, por ejemplo, geles de poliacrilamida y agarosa. Los geles de tamizado (por ejemplo, agarosa) impiden el flujo de moléculas. El tamaño de poro del gel determina el tamaño de un molécula que puede fluir libremente a través del gel. La cantidad de tiempo para viajar a través del gel aumenta a medida que el tamaño de la molécula aumenta. Como resultado, las moléculas pequeñas viajan a través del gel más rápido que las moléculas grandes y por lo tanto progresar más lejos del área de aplicación de muestra que más grandes moléculas, en un período de tiempo dado. Tales geles se usan para separaciones basadas en el tamaño de secuencias de nucleótidos. Fragmentos de ADN lineal migran a través de geles de agarosa con una movilidad inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular Mediante el uso de geles con diferentes concentraciones de agarosa, diferentes tamaños de fragmentos de ADN pueden ser resueltos. Mayores concentraciones de agarosa facilitan la separación de DNAs pequeños, mientras que bajas concentraciones de agarosa permiten la resolución de ADN más grandes. Hibridación: los oligonucleótidos y sus análogos híbridos se unen por enlaces de hidrógeno, que incluye Watson-Crick, Hoogsteen o enlace de hidrógeno Hoogsteen invertido, entre bases complementarias. Generalmente, el ácido nucleico consiste de bases nitrogenadas que son pirimidinas (citosina (C), uracilo (U) y timina (T)) o purinas (adenina (A) y guanina (G)). Estas bases nitrogenadas forman hidro

enlaces gen entre una pirimidina y una purina, y el la unión de la pirimidina a la purina se conoce como "Emparejamiento de bases". Más específicamente, A unirá hidrógeno a Tor U y G se unirán a C. "Complementario" se refiere al

US 7.220.852 B1

9 9

emparejamiento de bases que ocurre entre un ácido nucleico distinto

secuencias o dos regiones distintas del mismo ácido nucleico  
Secuencia.

"Específicamente hibridables" y "específicamente complementary son términos que indican un grado suficiente de complementariedad Tal que se produzca una unión estable y específica entre el oligonucleótido (o su análogo) y el ADN o ARN objetivo. El oligonucleótido o análogo de oligonucleótido no necesita ser 100% complementario a su secuencia objetivo para

ser específicamente hibridable. Un oligonucleótido o análogo es

específicamente hibridable cuando se une el oligonucleótido o análogo a la molécula de ADN o ARN objetivo entre otras

se relaciona con la función normal del ADN o ARN objetivo, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar unión no específica del oligonucleótido o análogo a secuencias no objetivo en condiciones donde la unión específica

Se desea ing, por ejemplo en condiciones fisiológicas en El caso de ensayos o sistemas in vivo. Dicha unión es referido como hibridación específica.

Condiciones de hibridación que resultan en grados particulares de

la rigurosidad variará dependiendo de la naturaleza del método de hibridación de elección y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico hibridante. En general,

la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na "y / o Mg") del el tampón de hibridación determinará la rigurosidad del híbrido

ización, aunque los tiempos de lavado también influyen en la severidad. California

formulaciones sobre condiciones de hibridación requeridas

el logro de grados particulares de rigurosidad es discutido por

Sambrook y col. (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>a</sup> ed., Vol. 1-3, Laboratorio Cold Spring Harbor

Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, capítulos 9 y 11;

y Ausubel et al. *Protocolos cortos en biología molecular*, 4<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999.

A los fines de la presente divulgación, "condiciones estrictas

las condiciones abarcan las condiciones bajo las cuales la hibridación

solo se produce si hay menos del 25% de falta de coincidencia entre

molécula de hibridación y la secuencia objetivo. "Riguroso condiciones 'pueden desglosarse en niveles particulares de rigurosidad para una definición más precisa. Por lo tanto, como se usa en este documento,

Las condiciones de "rigurosidad moderada" son aquellas bajo las cuales

las moléculas con más del 25% de desajuste de secuencia no hibridizar; las condiciones de "rigurosidad media" son aquellas

bajo el cual las moléculas con más del 15% de desajuste

no hibridarse, y las condiciones de "alta rigurosidad son aquellas

bajo qué secuencias con más del 10% de desajuste

No hibridizar. Las condiciones de "muy alta rigurosidad" son aquellos bajo los cuales las secuencias con más del 6% de desajuste

No se hibridará.

Composición inmunoestimulante: un término utilizado aquí para significa una composición útil para estimular o provocar una respuesta inmune específica (o respuesta inmunogénica) en un vertebrado. En algunas realizaciones, el inmunógeno la respuesta es protectora o proporciona inmunidad protectora, en

que permite al animal vertebrado resistir mejor la infección

con o progresión de la enfermedad del organismo contra el cual

La vacuna es dirigida.

Sin desear estar sujeto a una teoría específica, es

cree que una respuesta inmunogénica puede surgir de la

generación de un anticuerpo específico para uno o más de los epítomos proporcionados en la composición inmunoestimuladora.

Alternativamente, la respuesta puede comprender un T-helper o respuesta basada en células citotóxicas a uno o más de los epítomos proporcionado en la composición inmunoestimuladora. Los tres de estas respuestas pueden originarse de ingenuidad o memoria células. Un ejemplo específico de un tipo de inmunoestimulante

La composición es una vacuna.

En algunas realizaciones, una "cantidad efectiva" o "Cantidad inmunoestimulante de un inmunoestimulador composición es una cantidad que, cuando se administra a un

10  
15  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60 60  
sesenta y cinco

10

Sujeto, es suficiente para engendrar un sistema inmune detectable

respuesta. Tal respuesta puede comprender, por ejemplo, generación de un anticuerpo específico para uno o más de los epítomos proporcionados en la composición inmunoestimuladora. Alternativamente, la respuesta puede comprender un T-helper o Respuesta basada en CTL a uno o más de los epítomos proporcionados

en la composición inmunoestimuladora. Los tres de estos Las respuestas pueden originarse de células ingenuas o de memoria. En

otras realizaciones, una "cantidad efectiva protectora de un composición inmunoestimuladora es una cantidad que, cuando administrado a un sujeto, es suficiente para conferir protección

inmunidad sobre el sujeto.

Inhibición o tratamiento de una enfermedad: inhibición del desarrollo completo

Opción de una enfermedad o afección, por ejemplo, en un sujeto

quién está en riesgo de contraer una enfermedad como el SARS. "Tratamiento" se refiere

a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o condición patológica después de que tiene

comenzó a desarrollarse. Como se usa en el presente documento, el término "mejorar".

con referencia a una enfermedad, condición patológica o síntoma

tom, se refiere a cualquier efecto beneficioso observable del tratamiento. El efecto beneficioso puede evidenciarse, por ejemplo, por un inicio tardío de los síntomas clínicos de la enfermedad en un Sujeto susceptible, una reducción en la severidad de algunos o todos síntomas clínicos de la enfermedad, una progresión más lenta de la enfermedad, una reducción en el número de recaídas de la enfermedad, una mejora en la salud general o el bienestar de sujeto, o por otros parámetros bien conocidos en la técnica que son específico a la enfermedad particular.

Aislado: un "microorganismo aislado (como un virus, bacteria, hongo o protozoo) ha sido sustancialmente separado o purificado de microorganismos de diferentes tipos, cepas o especies. Los microorganismos pueden aislarse mediante una variedad de técnicas, que incluyen dilución en serie y cultivo

En g.

Un "componente biológico aislado (como un nucleico molécula de ácido, proteína u orgánulo) ha sido sustancialmente separado o purificado de otros compuestos biológicos en la célula del organismo en el que el componente ocurre naturalmente, como otro cromosómico y extra ADN y ARN cromosómico, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y las proteínas que se han "aislado" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificadas por purificación estándar métodos. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas.

preparado por expresión recombinante en una célula huésped, así como ácidos nucleicos o proteínas sintetizados químicamente, o fragmentos de los mismos.

Etiqueta: Un compuesto o composición detectable que es conjugado directa o indirectamente a otra molécula para facilitar la detección de esa molécula. Específico, no limitativo ejemplos de etiquetas incluyen etiquetas fluorescentes, enlace enzimático

e isótopos radiactivos.

Molécula de ácido nucleico: una forma polimérica de nucleótidos, que puede incluir hebras de sentido y antisentido de ARN, ADNc, ADN genómico y formas sintéticas y polímeros mixtos de los anteriores. Un nucleótido se refiere a un ribonucleótido, desoxinucleótido o una forma modificada de tipo de nucleótido. Una "molécula de ácido nucleico" como se usa en el presente documento es sinónimo de "ácido nucleico y" polinucleótido. Una molécula de ácido nucleico suele tener al menos 10 bases de longitud, a menos que se especifique lo contrario. El término incluye single- y formas bicatenarias de ADN. Un polinucleótido puede incluir uno o ambos de origen natural y modificado nucleótidos unidos entre sí de forma natural y / o enlaces de nucleótidos no naturales.

Oligonucleótido: una molécula de ácido nucleico generalmente con valorando una longitud de 300 bases o menos. El término a menudo se refiere a desoxirribonucleótidos monocatenarios, pero puede referirse como bien a ribonucleótidos monocatenarios o bicatenarios, ARN: Híbridos de ADN y ADN de doble cadena, entre otros. El término "oligonucleótido" también incluye oligonucleótidos

US 7.220.852 B1

11

(es decir, un oligonucleótido menos el fosfato) y cualquier otro polímero base orgánico. En algunos ejemplos, oligonucleótidos las otidas tienen aproximadamente 10 a aproximadamente 90 bases de longitud, por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 bases de longitud. Otros oligonucleótidos son aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60 bases, aproximadamente 65 bases, aproximadamente 70 bases, aproximadamente 75 bases o aproximadamente 80 bases de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios, por ejemplo, para

utilizar como sondas o cebadores, o puede ser de doble cadena, para ejemplo, para usar en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos pueden ser oligo sentido o antisentido nucleótidos. Un oligonucleótido puede modificarse como dismaldecido anteriormente en referencia a las moléculas de ácido nucleico. Oligo los nucleótidos se pueden obtener del ácido nucleico existente Fuentes (por ejemplo, genómico o ADNc), pero también pueden ser sintético (por ejemplo, producido por laboratorio o in vitro síntesis de oligonucleótidos).

Marco de lectura abierto (ORF): una serie de nucleótidos triplete (codones) que codifican aminoácidos sin ningún tipo interno codones de terminación. Estas secuencias son generalmente traducidas capaz en un péptido / polipéptido? proteína / poliproteína. Vinculado operativamente: una primera secuencia de ácido nucleico es operablemente vinculado con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está operativamente vinculado a una secuencia de codificación es el promotor afecta la transcripción o expresión del bacalao secuencia de ing. Generalmente, secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, donde es necesario unir dos proteínas regiones de codificación, en el mismo marco de lectura. Si los intrones son presente, las secuencias de ADN unidas operativamente pueden no ser contiguo.

Portadores farmacéuticamente aceptables: el pharmaceuti Los portadores aceptables útiles en esta descripción son con ventional Remington's Pharmaceutical Sciences, por EW Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 15a Edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para suministro farmacéutico de uno o más con terapéuticos libras o moléculas, como uno o más SARS-CoV moléculas de ácido nucleico, proteínas o anticuerpos que se unen a estos proteínas y agentes farmacéuticos adicionales.

En general, la naturaleza del transportista dependerá de modo particular de administración empleado. por ejemplo, las formulaciones parenterales usualmente comprenden inyectar

fluidos capaces que incluyen productos farmacéuticos y fisiológicos

fluidos aceptables como agua, solución salina fisiológica, Soluciones salinas balanceadas, dextrosa acuosa, glicerol o el

como un vehículo Para composiciones sólidas (por ejemplo, polvo, píldora, tableta o cápsula), convencional no los portadores sólidos tóxicos pueden incluir, por ejemplo, productos farmacéuticos grados de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los portadores biológicamente neutros, farmacéuticos

Las composiciones a administrar pueden contener cantidades menores

de sustancias auxiliares no tóxicas, como humectantes o emul Agentes de clasificación, conservantes y agentes tamponadores de pH y

similares, por ejemplo acetato de sodio o sorbitán monolau Velocidad.

Polipéptido: un polímero en el que los monómeros son amino residuos ácidos que se unen mediante amida cautiverio. Cuando los aminoácidos son alfa-aminoácidos, ya sea

se puede usar el isómero óptico L o el isómero óptico D, el Se prefieren los isómeros L. Los términos "polipéptido" o "pro

tein 'como se usa en el presente documento pretende abarcar cualquier amino

secuencia ácida e incluye secuencias modificadas tales como glicoproteínas El término "polipéptido" es específicamente destinado a cubrir proteínas naturales, así como los que se producen de forma recombinante o sintética.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son aquellas sustituciones funciones que, cuando se hacen, interfieren menos con las propiedades de

la proteína original, es decir, la estructura y especialmente la

10

15

25

30

35

40

45

50

55

60 60

sesenta y cinco

12

la función de la proteína se conserva y no significativamente cambiado por tales sustituciones. Ejemplos de conservadores

Las sustituciones se muestran a continuación.

Residuo original

Sustituciones conservadoras

Ala

Ser

Arg

Lys

ASn

Gln, His

Áspid

Glu

Cys

Ser

Gln

ASn

Glu

Áspid

Su

ASn; Gln

Ile

Leu, Val

Leu

Ile: Val

Lys

Arg: Gln; Glu

Reunió

Leu: Ile

Phe

Reunió; Leu: Tyr

Ser

Thr

Thr

Ser

Trp

Tyr

Tyr

Trp; Phe

pared

Ile: Leu

Las sustituciones conservadoras generalmente mantienen (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la Sustitución, por ejemplo, como una hoja o conformación helicoidal,

(b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el objetivo sitio, o (c) la mayor parte de la cadena lateral.

Las sustituciones que en general se espera que produce los mayores cambios en las propiedades de las proteínas serán

no conservador, por ejemplo, cambios en los que (a) un hidroxil el residuo filico, por ejemplo, serilo o treonilo, esta sustituido

para (o por) un residuo hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucil fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o la prolina se sustituye por (o por) cualquier otro residuo;

(c) a residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo,

lisilo, arginilo o histadilo, se sustituye por (o por) un residuo electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo:

o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo,

fenilalanina, se sustituye por (o por) uno que no tiene un cadena lateral, por ejemplo, glicina.

Sondas y cebadores: una sonda comprende un aislado ácido nucleico unido a una etiqueta detectable u otro reportero

molécula. Las etiquetas típicas incluyen isótopos radiactivos,

Sustratos enzimáticos, cofactores, ligandos, quimioluminiscentes o

agentes fluorescentes, haptenos y enzimas. Métodos para etiquetado y orientación en la elección de etiquetas apropiadas para

Se discuten varios propósitos, por ejemplo, en Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> ed.,

vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 y Ausubel et al. Protocolos cortos en Molecular Biology, 4<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999.

Los cebadores son moléculas cortas de ácido nucleico, por ejemplo

Oligonucleótidos de ADN de 10 nucleótidos o más de longitud, para

ejemplo que hibrida a núcleo complementario contiguo

otides o una secuencia a amplificar. Oligo ADN más largo

los nucleótidos pueden tener aproximadamente 15, 20, 25, 30 o 50 nucleótidos o

más de largo Los cebadores pueden ser recocidos a un complemento

cadena de ADN objetivo por hibridación de ácido nucleico para formar un

híbrido entre el cebador y la cadena de ADN objetivo, y

entonces el cebador se extendió a lo largo de la cadena de ADN objetivo por un

ADN polimerasa enzima. Los pares de cebadores se pueden usar para

amplificación de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, por

PCR u otros métodos de amplificación de ácido nucleico conocidos en

el arte, como se describió anteriormente.

Métodos para preparar y usar sondas de ácido nucleico y

los cebadores se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. (ed.),

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 "ed.,  
Vol. 1-3,  
Cold Spring Harbor Laboratorio de prensa, Cold Spring Harbor,

US 7.220.852 B1

13

NY, 1989; Ausubel y col. Protocolos cortos en molecular  
Biology, 4 "ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999; y  
Innis et

Alabama. Protocolos de PCR, una guía de métodos y  
aplicaciones,

Academic Press, Inc., San Diego, California, 1990. Amplifica

Los pares de cebadores se pueden derivar de una secuencia  
conocida, para

ejemplo, mediante el uso de programas informáticos destinados  
a ese

propósito como Primer (Versión 0.5. (C) 1991, Whitehead  
Instituto de Investigación Biomédica, Cambridge, Mass.). Uno  
de habilidad ordinaria en el arte apreciará que la  
especificidad

de una sonda o cebador particular aumenta con su longitud.

Por lo tanto, para obtener una mayor especificidad, sondas y  
pueden seleccionarse cebadores que comprenden al menos 20,  
25, 30, 35,

40, 45, 50 o más nucleótidos consecutivos de un objetivo  
secuencias de nucleótidos.

Proteína: molécula abiológica, particularmente un  
polipéptido,

expresado por un gen y compuesto de aminoácidos. UN

"poliproteína" es una proteína que, después de la síntesis,  
se escinde para

producen varios polipéptidos funcionalmente distintos.

Purificado: El término "purificado" no requiere absoluto  
pureza; más bien, se pretende como un término relativo. Por  
lo tanto, para

ejemplo, una preparación de proteína purificada es aquella en  
la que

La proteína del sujeto es más pura que en su entorno natural.  
dentro de una celda. Generalmente, una preparación de  
proteínas se purifica

tal que la proteína represente al menos el 50% del total  
contenido proteico de la preparación.

Ácido nucleico recombinante: una secuencia que no es natu  
Rally ocurre o tiene una secuencia hecha por un artificial  
combinación de dos segmentos separados de otra manera

secuencia. Esta combinación artificial a menudo se logra por síntesis química o, más comúnmente, por la artificial manipulación de segmentos aislados de ácidos nucleicos, para ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética como las descrito en Sambrook et al. (ed.), Molecular Cloning. UN Manual de laboratorio, 2 "ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor

Laboratorio de prensa, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989.

El término

recombinante incluye ácidos nucleicos que han sido alterados únicamente mediante la adición, sustitución o eliminación de una parte de

El ácido nucleico.

Muestra: una porción, pieza o segmento que es representativo de un todo. Este término abarca cualquier material, incluyendo

por ejemplo, muestras obtenidas de un animal, una planta o el ambiente.

Una "muestra ambiental" incluye una muestra obtenida de objetos inanimados o depósitos dentro de un interior o ambiente al aire libre Las muestras ambientales incluyen, pero

no se limitan a: muestras de suelo, agua, polvo y aire; abultar

muestras, incluidos materiales de construcción, muebles y vertederos

contenido; y otras muestras de reservorios, como desechos de animales,

granos cosechados y alimentos.

Una "muestra biológica" es una muestra obtenida de una planta o sujeto animal. Como se usa en este documento, muestras biológicas

incluir todas las muestras útiles para la detección de infección viral en

Sujetos, que incluyen, entre otros: células, tejidos y fluidos corporales, como sangre; derivados y fracciones de sangre (como suero); agallas extraídas; biopsia o quirúrgicamente

tejido eliminado, incluidos los tejidos que son, por ejemplo, sin fijar, congelado, fijo en formalina y / o incrustado en par

affin, lágrimas; Leche; raspones en la piel; Lavados de superficie; orina;

esputo; fluido cerebroespinal; líquido prostático pus; hueso mar

aspirados de fila; BAL: saliva; hisopos cervicales, hisopos vaginales;

y lavado orofaríngeo.

Identidad de secuencia: la similitud entre dos nucleicos secuencias de ácido, o dos secuencias de aminoácidos, se expresa en términos de similitud entre las secuencias, de lo contrario referido como identidad de secuencia. La identidad de secuencia es libre medido de forma cuantitativa en términos de porcentaje de identidad (o similitud u homología); cuanto mayor es el porcentaje, más similares son las dos secuencias. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocido en el arte. Varios programas y alineaciones

10  
15  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60 60  
sesenta y cinco

14

los algoritmos se describen en: Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 2: 482, 1981); Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol., 48: 443, 1970); Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 2444, 1988); Higgins y Sharp (Gene, 73: 237-44, 1988); Higgins y Sharp (CABIOS, 5: 151-53, 1989); Corpet y col. (Nuc. Acids Res., 16: 10881-90, 1988); Huang y col.

(Comp. Appls Biosci., 8: 155-65, 1992); y Pearson et al. (Meth. Mol. Biol., 24: 307-31, 1994). Altschuler et al. (Naturaleza Genet., 6: 119-29, 1994) presenta una consideración detallada de

Métodos de alineación de secuencias y cálculos de homología. Las herramientas de alineación ALIGN (Myers y Miller, CABIOS 4: 11-17, 1989) o LFASTA (Pearson y Lipman, 1988)

puede usarse para realizar comparaciones de secuencia (Internet

ProgramC) 1996, WR Pearson y la Universidad de Virginia, "fasta20u63 versión 2.0u63, fecha de lanzamiento Diciembre

de 1996). ALIGN compara secuencias enteras contra una otra, mientras que LFASTA compara regiones de similitud local.

Estas herramientas de alineación y sus respectivos tutoriales son

disponible en Internet en el sitio web de NCSA.

Alternativamente,

para comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de

cerca de 30 aminoácidos, la función "secuencias de Blast 2" puede ser empleado usando la matriz BLOSUM62 predeterminada establecida en parámetros predeterminados, (costo de existencia de brecha de 11, y un por costo de brecha de residuos de 1). Al alinear péptidos cortos (menos que alrededor de 30 aminoácidos), la alineación debe ser realizado utilizando la función "Blast 2 secuencias", emplear La matriz PAM30 se ajusta a los parámetros predeterminados (espacio abierto 9. brecha de extensión 1 penalizaciones). La secuencia BLAST compari El sistema hijo está disponible, por ejemplo, en la web de NCBI sitio; ver también Altschulet al., J. Mol. Biol., 215: 403-10, 1990; Gish y States, Nature Genet., 3: 266-72, 1993; Madden et al., Meth. Enzymol., 266: 131-41, 1996; Altschul y col. Nucleic Acids Res., 25: 3389-402, 1997; y Zhang y Madden, Genome Res., 7: 649-56, 1997. Ortólogos (equivalentes a proteínas de otras especies) de las proteínas se caracterizan en algunos casos por posesión de más del 75% de identidad de secuencia contada sobre el alineación de longitud completa con la secuencia de aminoácidos de proteína específica usando ALIGN configurado a los parámetros predeterminados. Proteínas con mayor similitud con una secuencia de referencia. mostrará identidades de porcentaje crecientes cuando sea evaluado por este método, como al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95% o al menos 98% de identidad de secuencia. Además, la identidad de la secuencia se puede comparar sobre el total longitud de uno o ambos dominios de unión de los descritos proteínas de fusión Cuando es significativamente menor que la secuencia completa en comparación con la identidad de secuencia, las secuencias homólogas serán normalmente posee al menos 80% de identidad de secuencia en corto ventanas de 10-20, y pueden poseer identidades de secuencia de al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99%

dependiendo de su similitud con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia sobre ventanas tan cortas puede disuadir extraído con LFASTA; los métodos se describen en la NCSA sitio web. Un experto en la materia apreciará que estos los intervalos de identidad de secuencia se proporcionan solo como guía; eso es completamente posible que los homólogos fuertemente significativos puedan obtenerse fuera de los rangos provistos. Similar los conceptos de homología se aplican a los ácidos nucleicos como se describen para proteínas

Una indicación alternativa de que dos moléculas de ácido nucleico están estrechamente relacionados es que las dos moléculas se hibridan a entre sí en condiciones estrictas. Representante las condiciones de hibridación se analizan anteriormente. Secuencias de ácido nucleico que no muestran un alto grado de Sin embargo, la identidad puede codificar aminoácidos similares secuencias, debido a la degeneración del código genético. Es entendió que los cambios en la secuencia de ácido nucleico pueden ser hecho usando esta degeneración para producir ácido nucleico múltiple secuencias que codifican cada una sustancialmente la misma proteína.

US 7.220.852 B1

15

Agente de enlace específico: un agente que se une sustancialmente solo a un objetivo definido. Por lo tanto, una unión específica de proteínas el agente se une sustancialmente solo a la proteína definida, o a un región específica dentro de la proteína. Como se usa en el presente documento, una proteína el agente de unión específico incluye anticuerpos y otros agentes que se unen sustancialmente a un polipéptido especificado. El anti los cuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales que son específico para el polipéptido, así como inmunológicamente

porciones efectivas ("fragmentos") de los mismos.  
La determinación de que un agente particular se une a Substan solo puede hacerse fácilmente con un polipéptido específico mediante utilizando o adaptando procedimientos de rutina. Uno adecuado in vitro El ensayo utiliza el procedimiento de transferencia Western (de escrito en muchos textos estándar, incluidos Harlow y Lane, Uso de anticuerpos: un manual de laboratorio. CSHL, Nueva York, 1999).

Transformado: una celda "transformada" es una celda en la que Se ha introducido una molécula de ácido nucleico por molecular Técnicas de biología. El término abarca todas las técnicas por que una molécula de ácido nucleico podría introducirse en tales una célula, incluida la transfección con vectores virales, transforma ción con vectores plasmídicos e introducción de ADN desnudo por electroporación, lipofección y acelerador de pistola de partículas

ción  
Vector: una molécula de ácido nucleico como se introduce en un huésped célula, produciendo así una célula huésped transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permitan replicarse En una célula huésped. Tal como un origen de replicación. Un vector puede también incluye uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica.

Virus: organismo infeccioso microscópico que se reproduce dentro de las células vivas. Un virus generalmente consiste esencialmente en un núcleo de un solo ácido nucleico rodeado por una capa proteica, y tiene la capacidad de replicarse solo dentro de una célula viva.

"La replicación viral" es la producción de virus adicionales por

La aparición de al menos un ciclo de vida viral. Un virus puede

Subvierte las funciones normales de las células huésped, haciendo que la célula

comportarse de una manera determinada por el virus. Por ejemplo, una infección viral puede provocar que una célula produzca una citocina, o respondiendo a una citocina, cuando la célula no infectada normalmente lo hago.

"Los coronavirus son virus de ARN grandes y envueltos que causar enfermedades respiratorias y entéricas en humanos y otros animales Los genomas de coronavirus son no segmentados, únicos ARN trenzado de sentido positivo, aproximadamente 27-31 kb en longitud. Los genomas tienen una tapa metilada de 5 'y una cola de poli-A de 3', y funcionan directamente como ARNm. La entrada de la célula huésped se produce a través endocitosis y fusión de membranas, y la replicación ocurre en El citoplasma. Inicialmente, los 5 '20 kb del sentido positivo El genoma se traduce para producir una polimerasa viral, que luego produce una cadena de sentido negativo de longitud completa utilizada como plantilla para producir ARNm subgenómico como un "conjunto anidado de transcripciones El ensamblaje ocurre brotando en el golgi aparato, y las partículas son transportadas a la superficie del celular y liberado.

### III. Resumen de varias realizaciones

Un coronavirus humano recientemente aislado (SARS-CoV) es divulgado aquí. La secuencia completa de ácido nucleico genómico

de este virus también se proporciona aquí. También se divulgan los

secuencias de ácido nucleico de los ORF de SARS-CoV, y el secuencias de polipéptidos codificadas por estos ORF.

Pharmaceu

composiciones estimulantes ticas e inmunes tambien son dis cerrado que incluye uno o más SARS-CoV viral nucleico

ácidos, polipéptidos codificados por estos ácidos nucleicos virales y

anticuerpos que se unen a un polipéptido SARS-CoV o SARS Fragmento de polipéptido CoV.

En una realización, se proporciona un método para detectar La presencia de SARS-CoV en una muestra. Este método incluye poner en contacto la muestra con un par de ácido nucleico

25  
30  
35  
40  
45  
50  
55

60 60  
sesenta y cinco

dieciséis

cebadores que se hibridan con un ácido nucleico de SARS-CoV, en donde

al menos un cebador tiene el extremo 5' etiquetado con un colorante reportero,

amplificación del ácido nucleico del SARS-CoV o un fragmento del mismo de la muestra utilizando el par de ácido nucleico imprimaciones, electroforesis de los productos amplificados, y

detectar el colorante reportero etiquetado en el extremo 5', detectando así

un SARS-CoV. En un ejemplo específico, no limitativo, el ampli

ficación utiliza RT-PCR. En otro ejemplo específico de la método proporcionado, al menos uno de los cebadores de ácido nucleico que

hibridarse con un ácido nucleico de SARS-CoV incluye una secuencia

como se establece en cualquiera de las SEC ID NO: 13-15.

En otro ejemplo del método proporcionado, detectar el la presencia de SARS-CoV en una muestra incluye contactar al muestra con un par de cebadores de ácido nucleico que se hibridan a

un ácido nucleico de SARS-CoV, amplificando el SARS-CoV ácido nucleico o un fragmento del mismo de la muestra utilizando

el par de cebadores de ácido nucleico, que se suman al amplificado

Ácido nucleico de SARS-CoV o su fragmento, un TaqMan Sonda SARS-CoV que se hibrida con el nucleico SARS-CoV ácido, en el que la sonda TaqMan SARS-CoV está marcada con un tinte 5'-reportero y un tinte 3'-quencher, realizando uno o

más rondas adicionales de amplificación y detección de fluo Resistencia del colorante 5'-reportero, detectando así un SARS

CoV. En un ejemplo específico, no limitativo, la amplificación

utiliza RT-PCR. En otro ejemplo específico del pro método visualizado, al menos uno de los cebadores de ácido nucleico que

hibridarse con un ácido nucleico de SARS-CoV y / o el TaqMan Sonda SARS-CoV que se hibrida con el nucleico SARS-CoV

el ácido incluye una secuencia como se establece en cualquiera de las SEC ID

NOS: 16. 33.

En otra realización, se proporciona un método para detectar un SARS-CoV en una muestra biológica que contiene anticuerpos Este método incluye ponerse en contacto con el biológico

muestra con un antígeno específico de SARS-CoV, en donde el el antígeno incluye un organismo SARS-CoV y determinante si se produce una reacción de unión entre el SARS-CoV antígeno específico y un anticuerpo en la muestra biológica si

tal está presente, detectando así el SARS-CoV.

En una realización adicional, se proporciona un método para detectar

un SARS-CoV en una muestra biológica que contiene polipéptidos y / o fragmentos de los mismos. Este método incluye el contacto de la muestra biológica con un SARS Anticuerpo específico de CoV y determinar si una unión la reacción ocurre entre el anticuerpo específico contra el SARS-CoV

y un polipéptido SARS-CoV o fragmento del mismo en el muestra biológica si Tal está presente, detectando así SARS-CoV. En un ejemplo específico, no limitativo, determine Si se produce una reacción vinculante entre el SARS Anticuerpo específico de CoV y un polipéptido SARS-CoV o su fragmento se lleva a cabo in situ o en una muestra de tejido.

En otro ejemplo específico, determinar si un enlace la reacción ocurre entre el anticuerpo específico contra el SARS-CoV

y un polipéptido SARS-CoV o fragmento del mismo incluye Un ensayo inmunohistoquímico.

Una realización adicional incluye un kit para detectar un SARS-CoV en una muestra, que incluye un par de ácido nucleico cebadores que se hibridan en condiciones estrictas con un SARS

Ácido nucleico CoV, en el que un cebador está marcado en el extremo 5 'con

un tinte reportero. En un ejemplo específico, no limitativo, al menos

uno de los cebadores de ácido nucleico que se hibridan con un SARS

El ácido nucleico de CoV incluye una secuencia como se establece en cualquiera de SEQ ID NOS: 13-15.

Otro ejemplo del kit provisto incluye un par de

cebadores de ácido nucleico que hibridan bajo alta restricción condiciones para un ácido nucleico de SARS-CoV y un TaqMan Sonda SARS-CoV que se hibrida con el nucleico SARS-CoV ácido, en el que la sonda TaqMan SARS-CoV está marcada con un tinte 5'-reportero y un tinte 3'-quencher. En un específico, ejemplo no limitativo, al menos uno de los ácidos nucleicos cebadores que se hibridan con un ácido nucleico de SARS-CoV y / o

US 7.220.852 B1

17

la sonda TaqMan SARS-CoV que se hibrida con el SARS El ácido nucleico de CoV incluye una secuencia como se establece en cualquiera de SEQ ID NOs: 16-33.

También se describe en el presente documento una composición que incluye un

organismo aislado del SARS-CoV. En una realización, el El SARS-CoV aislado es un SARS aislado inactivo CoV organismo. En otra realización, la composición incluye al menos un componente seleccionado del grupo compuesto por portadores farmacéuticamente aceptables, adjuvantes y combinaciones de dos o más de los mismos. En todavía En otra realización, la composición se introduce en un Sujeto, provocando así una respuesta inmune contra un Epítipo antigénico de SARS-CoV en un sujeto.

IV. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos del SARS-CoV

La divulgación actual proporciona un SARS-CoV aislado genoma, polipéptidos de SARS-CoV aislados y aislados moléculas de ácido nucleico que codifican lo mismo. En una forma

ment, el genoma aislado de SARS-CoV tiene una secuencia como mostrado en SEQ ID NO: 1 o un equivalente del mismo. escuela politécnica

nucleótidos que codifican un polipéptido SARS-CoV (codificado por

también se proporciona un ORF dentro del genoma), y son denominadas moléculas de ácido nucleico del SARS-CoV. Estos nucleicos las moléculas de ácido incluyen secuencias de ADN, ADNc y ARN que codifican un polipéptido SARS-CoV. Específico, no ejemplos limitantes de una molécula de ácido nucleico de SARS-CoV

que codifican un ORF son ácido nucleico 265 a ácido nucleico 13.398

de SEQID NO: 1 (codificación SARS-CoV 1a, SEQID NO: 2), ácido nucleico 13,398 a 21,482 de SEQ ID NO: 1 (que codifica SARS-CoV 1b, SEC ID N.º: 3), ácido nucleico 21,492 a 25,256 de SEQID NO: 1 (codificación SARS-CoV S, SEQ ID NO: 4), ácido nucleico 25,268 a 26,089 de SEQ ID NO: 1 (que codifica SARS-CoV X1, SEQ ID NO. 5), ácido nucleico 25,689 a 26,150 de SEQ ID NO: 1 (codificación SARS-CoV X2, SEC ID N.º: 6), ácido nucleico 26,117 a 26,344 de SEC ID NO: 1 (codificación SARS-CoVE, SEQID NO: 7), nucleico ácido 26.398 a 27.060 de SEQ ID NO: 1 (que codifica SARS CoV M, SEC ID N.º: 8), ácido nucleico 27,074 a 27,262 de SEQID NO: 1 (codificación SARS-CoV X3, SEQID NO: 9), ácido nucleico 27.273 a 27.638 de SEQ ID NO: 1 (codificación SARS-CoV X4, SEC ID N.º: 10), ácido nucleico 27,864 a 28,115 de SEQID NO: 1 (codificación SARS-CoV X5, SEQID NO: 11), y ácido nucleico 28,120 a 29,385 de SEQID NO: 1 (codificación SARS-CoV N, SEQ ID NO: 12).

Cebadores y sondas de oligonucleótidos derivados de la El genoma del SARS-CoV (SEQID NO: 1) también está incluido dentro del alcance de la presente divulgación. Tal oligonucle los cebadores y sondas de otida pueden comprender una secuencia de

menos unos 15 nucleótidos consecutivos del SARS-CoV

secuencia de ácido nucleico, tal como al menos aproximadamente 20, 25, 30, 35,

40, 45 o 50 o más nucleótidos consecutivos. Estos cebadores y las sondas se pueden obtener de cualquier región de la descrita

Genoma del SARS-CoV (SEQID NO: 1), que incluye particularmente

de cualquiera de los ORF descritos aquí. Específico, no ejemplos limitantes de cebadores oligonucleotídicos derivados de

El genoma del SARS-CoV (SEQID NO: 1) incluye: Cor-p-F2

(SEQ ID NO: 13), Cor-p-F3 (SEQ ID NO: 14), Cor-p-R1

(SEQ ID NO: 15), SARS1-F (SEQ ID NO: 16), SARS1-R

(SEQ ID NO: 17), SARS2-F (SEQ ID NO: 19), SARS2-R

(SEQ ID NO: 20), SARS3-F (SEQ ID NO: 22), SARS3-R

(SEQ ID NO. 23), N3-F (SEQ ID NO: 25), N3-R (SEQ ID

NO: 26), 3'NTR-F (SEQ ID NO: 28), 3'NTR-R (SEQ ID

NO: 29), MF (SEQID NO: 31) y MR (SEQID NO: 32).

Ejemplos específicos no limitantes de sondas de oligonucleótidos

derivado del genoma SARS-CoV (SEQ ID NO: 1)

incluyen: SARS1-P (SEQ ID NO: 18), SARS2-P (SEQ ID

NO: 21), SARS3-P (SEQ ID NO: 24), N3-P (SEQ ID NO:

27), 3'NTR-P (SEQ ID NO: 30) y MP (SEQ ID NO: 33).

Moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido SARS-CoV

la marea puede estar operativamente vinculada a secuencias reguladoras o

5 5  
10  
15  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60 60

sesenta y cinco

18 años

elementos. Las secuencias o elementos reguladores incluyen, pero son

no limitado a promotores, potenciadores, terminación de transcripción

tors, un codón de inicio (por ejemplo, ATG), codones de parada y el

me gusta.

Además, las moléculas de ácido nucleico que codifican un SARS El polipéptido CoV se puede insertar en un vector de expresión.

Los ejemplos específicos y no limitantes de vectores incluyen plas

medios, bacteriófagos, cósmidos, virus animales y levaduras cromosomas artificiales (YAC) (Burke et al., Science 236: 806-12, 1987). Dichos vectores pueden entonces introducirse en un

variedad de huéspedes, incluidas las células somáticas, y simples o

organismos complejos, como bacterias, hongos (Timberlake y Marshall, Science 244: 1313-17, 1989), invertebrados, plantas (Gasser et al., Plant Cell 1: 15-24, 1989) y animales (Pursel et al., Science 244: 1281-88, 1989).

Transformación de una célula huésped con un vector de expresión.

portando una molécula de ácido nucleico que codifica un SARS-CoV

el polipéptido puede llevarse a cabo mediante técnicas convencionales,

como son bien conocidos por los expertos en la materia. Por medio de

ejemplo, donde el huésped es procariota, como E. coli, las células competentes que son capaces de captar ADN pueden ser

preparado a partir de células cosechadas después de un crecimiento exponencial

fase y posteriormente tratada por el método CaCl<sub>2</sub> utilizando

procedimientos bien conocidos en la técnica.  
Alternativamente, MgCl<sub>2</sub>, o  
Se puede usar RbCl. La transformación también se puede  
realizar  
después de formar un protoplasto de la célula huésped si lo  
desea, o por  
electroporación  
Cuando el huésped es un eucariota, los métodos de  
transfección de  
ADN, como los coprecipitados de fosfato de calcio, conven  
Procedimientos mecánicos nacionales tales como  
microinyección, elec.  
troporación, inserción de un plásmido encerrado en liposomas,  
o  
se pueden usar vectores de virus. Las células eucariotas  
también pueden ser  
cotransformado con moléculas de ácido nucleico de SARS-CoV, y  
una segunda molécula de ADN extraña que codifica un  
seleccionable  
fenotipo, como la herpes simple timidina quinasa  
gene. Otro método es usar un vector viral eucariota,  
Como el virus simio 40 o el virus del papiloma bovino, para  
infecta o transforma transitoriamente células eucariotas y  
expresa  
la proteína (ver, por ejemplo, vectores virales eucariotas,  
frío  
Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982).  
Los polipéptidos SARS-CoV de esta divulgación incluyen  
proteínas codificadas por cualquiera de los ORF descritos  
aquí, y  
equivalentes de los mismos. Ejemplos específicos no  
limitativos de  
Las proteínas SARS-CoV se proporcionan en SEQ ID NOS: 2-12.  
También se contemplan proteínas de fusión que incluyen un  
heter  
secuencia de aminoácidos óloga químicamente vinculada a un  
SARS  
Polipéptido CoV. Secuencias heterólogas ejemplares  
incluye etiquetas cortas de secuencia de aminoácidos (como  
seis histidina  
residuos), así como una fusión de otras proteínas (como c-myc  
o fusiones de proteínas fluorescentes verdes). Epítopos del  
SARS  
Proteínas CoV, que son reconocidas por un anticuerpo o que se  
unen  
el principal complejo de histocompatibilidad, y puede usarse  
para

inducir una respuesta inmune específica de SARS-CoV, también abarcado por esta divulgación.

Métodos para expresar grandes cantidades de proteína de un El gen clonado introducido en E. coli puede utilizarse para purificación y análisis funcional de proteínas. por ejemplo, proteínas de fusión que consisten en pep amino terminal

mareas codificadas por una porción del gen E. coli lacZ o trpE

unidos a proteínas del SARS-CoV pueden usarse para preparar anticuerpos policlonales y monoclonales contra estos pro Teins.

La proteína nativa intacta también se puede producir en E. coli en

grandes cantidades para estudios funcionales. Métodos y plásmidos

vectores para producir proteínas de fusión y nativas intactas

Las proteínas en bacterias están descritas por Sambrook et al. (ed.),

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 "ed., Vol. 1-3,

Cold Spring Harbor Laboratorio de prensa, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Dichas proteínas de fusión pueden fabricarse en grandes cantidades.

cantidades, son fáciles de purificar y pueden utilizarse para provocar

US 7.220.852 B1

19

respuesta de anticuerpos Las proteínas nativas se pueden producir en

bacterias colocando un promotor fuerte y regulado y un sitio eficiente de unión a ribosomas aguas arriba del gen clonado.

Si se producen niveles bajos de proteína, se pueden tomar medidas adicionales.

ser tomado para aumentar la producción de proteínas; si altos niveles de

Se producen proteínas, la purificación es relativamente fácil. Adecuado

Los métodos son presentados por Sambrook et al. (ed.), Molecular

Clonación: un manual de laboratorio. 2 "ed., Vol. 1-3, frío

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York,

1989, y son bien conocidos en el arte. A menudo, las proteínas

expresados en niveles altos se encuentran en inclusión insoluble

cuerpos. Métodos para extraer proteínas de estos agregados las puertas están descritas por Sambrook et al. (ed.),

Molecular

Clonación: Manual de laboratorio, 2ª ed., Vol. 1-3, frío

Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York,

1989.

Aislamiento y purificación de expresión recombinante

Las proteínas pueden llevarse a cabo por medios convencionales, incluyendo

ing cromatografía preparativa y separación inmunológica

raciones Además, las proteínas pueden ser químicamente sintéticas.

dimensionado por cualquiera de varios métodos manuales o automatizados

de síntesis conocida en la técnica.

V. Agentes de unión específicos

La divulgación proporciona agentes de unión específicos que se unen

a los polipéptidos SARS-CoV descritos aquí. La Unión

agente puede ser útil para purificar y detectar el polipéptido

mareas, así como para la detección y diagnóstico de SARS-CoV.

Ejemplos de los agentes aglutinantes son policlonales o mono.

anticuerpo clonal, y fragmentos del mismo, que se unen a cualquiera de

los polipéptidos SARS-CoV descritos aquí.

Los anticuerpos monoclonales o policlonales pueden elevarse a

reconocer un polipéptido SARS-CoV descrito en este documento, o un

fragmento o variante del mismo. Óptimamente, los anticuerpos aumentaron

contra estos polipéptidos detectaría específicamente la

polipéptido con el que se generan los anticuerpos. Es decir,

anticuerpos generados contra un polipéptido específico de SARS-CoV

reconocerá y se unirá a ese polipéptido, y no lo hará

Reconocer sustancialmente o unirse a otros polipéptidos o

antígenos La determinación de que un anticuerpo

específicamente

se une a un polipéptido objetivo hecho por cualquiera de un número de métodos estándar de inmunoensayo; por ejemplo, el occidental técnica de transferencia (Sambrook et al. (ed.), Molecular Cloning: Manual de laboratorio, 2<sup>a</sup> ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

Polipéptido recombinante de SARS-CoV sustancialmente puro se pueden aislar antígenos adecuados para su uso como inmunógeno de las células transformadas descritas anteriormente, usando métodos bien conocido en el arte. Anticuerpos monoclonales o policlonales. a los antígenos pueden entonces ser preparados. Los anticuerpos monoclonales contra los polipéptidos pueden ser preparados en comparación con hibridomas murinos según el clásico método de Kohler y Milstein (Nature 256: 495-97, 1975), o un método derivado del mismo. Brevemente, un mouse es repetidamente inoculado con unos microgramos de la proteína seleccionada inmunógeno (por ejemplo, un polipéptido que comprende al menos un epítipo específico de SARS-CoV, una porción de un polipéptido que comprende al menos un epítipo específico de SARS-CoV, o un péptido sintético que comprende al menos un SARS-CoV-spe epítipo específico) durante un período de unas pocas semanas. El mouse es luego sacrificado, y las células productoras de anticuerpos de la bazo aislado Las células del bazo se fusionan por medio de polietilenglicol con células de mieloma de ratón y el exceso de células no fusionadas destruidas por el crecimiento del sistema en medios selectivos que comprenden aminopterina (medios HAT). los las células fusionadas con éxito se diluyen y alícuotas de dilución colocada en pozos de una placa de microtitulación donde el crecimiento de la cultura se continúa. Los clones productores de anticuerpos son

identificado por la detección de anticuerpos en el líquido sobrenadante de los pozos mediante procedimientos de inmunoensayo, como ELISA, como

5 5  
10  
15  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60 60  
sesenta y cinco

20

originalmente descrito por Engvall (Meth. Enzymol., 70: 419-39, 1980), o un método derivado del mismo.

Seleccionado

los clones positivos pueden expandirse y su monoclonal producto de anticuerpo cosechado para su uso. Procedimientos detallados para

la producción de anticuerpos monoclonales se describe en Harlow

y Lane Uso de anticuerpos: un manual de laboratorio, CSHL, Nueva York, 1999.

Los anticuerpos que contienen antisuero policlonal pueden ser pre

cortado inmunizando animales adecuados con un polipéptido que comprende al menos un epítipo específico de SARS-CoV, un por

ción de un polipéptido que comprende al menos un SARS-CoV epítipo específico, o un péptido sintético que comprende al menos

un epítipo específico de SARS-CoV, que puede no modificarse o modificado, para mejorar la inmunogenicidad.

Producción efectiva de anticuerpos (ya sea monoclonal o policlonal) se ve afectada por muchos factores relacionados tanto con el

antígeno y la especie huésped. Por ejemplo, moléculas pequeñas

tienden a ser menos inmunogénicos que otros y pueden requerir uso de portadores y adyuvantes. Además, los animales huéspedes varían en

respuesta al sitio de inoculaciones y dosis, ya sea con inad dosis equivalentes o excesivas de antígeno que dan como resultado un título bajo

antisueros Pequeñas dosis (nivel de ng) de antígeno administrado a

múltiples sitios intradérmicos parecen ser los más confiables. Un

Se puede encontrar un protocolo de inmunización eficaz para conejos en Vaitukaitis y col. (J. Clin. Endocrinol. Metab., 33: 988-91, 1971).

Se pueden administrar inyecciones de refuerzo a intervalos regulares, y antisuero cosechado cuando el título de anticuerpos del mismo, como determinado semicuantitativamente, por ejemplo, por doble inmunodifusión en agar contra concentraciones conocidas de El antígeno, comienza a caer. Ver, por ejemplo, Ouchterlony et al., Handbook of Experimental Immunology, Wier, D. (ed.), Capítulo 19, Blackwell, 1973. Una concentración meseta de el anticuerpo generalmente está en el rango de 0.1 a 0.2 mg / ml de suero (aproximadamente 12 uM). La afinidad de los antisueros por el antígeno es determinado mediante la preparación de curvas de unión competitivas, como descrito, por ejemplo, por Fisher (Manual of Clinical Inmunología, cap. 42, 1980).

Los fragmentos de anticuerpos pueden usarse en lugar de todo anticuerpos y pueden expresarse fácilmente en el huésped procariota células. Métodos de fabricación y uso inmunológico. 5 porciones de anticuerpos monoclonales, también conocidos como "Fragmentos de anticuerpos, son bien conocidos e incluyen aquellos descrito en Better & Horowitz, Methods Enzymol. 178: 476-96, 1989; Glockshuber et al., Bioquímica 29: 1362-67, 1990; y la patente de EE.UU. No. 5.648.237 (Expresión de fragmentos de anticuerpos funcionales); Pat. 4.946.778 (Moléculas de unión a cadena de polipéptido único); y nosotros Palmadita. N° 5,455,030 (inmunoterapia con cadena simple Moléculas de unión a polipéptidos) y referencias citadas en esto. Condiciones por las cuales un polipéptido / agente de unión complejo puede formar, así como ensayos para la detección de la formación de un complejo polipéptido / agente de unión y cuantificación de afinidades de unión del agente de unión y

polipéptido, son estándar en la técnica. Dichos ensayos pueden incluir, pero no se limitan a, transferencia Western, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), hibridación fluorescente in situ (FISH), inmunomagnética ensayos, ELISA, ELISPOT (Coligan et al., Current Protocols in Immunology, Wiley, NY, 1995), ensayos de aglutinación, ensayos de floculación, barrido celular y similares, como también están

conocido por un experto en la materia.

Los agentes aglutinantes de esta divulgación pueden estar vinculados a un

Sustrato (por ejemplo, cuentas, tubos, portaobjetos, placas, nitrocel

hojas de lulosa, y similares) o conjugado con un detectable resto, o ambos unidos y conjugados. La moi detectable

Los casos contemplados para la presente divulgación pueden incluir,

pero no se limitan a, un resto inmunofluorescente (para ejemplo, fluoresceína, rodamina), un resto radiactivo (para

US 7.220.852 B1

21

ejemplo, P. "I, S), un resto enzimático (por ejemplo,

peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina), un coloidal

resto de oro y un resto de biotina. Tal tecnología de conjugación

las niqes son estándar en la técnica (por ejemplo, ver Harlow y

Carril. Uso de anticuerpos: un manual de laboratorio. CSHL, nuevo

York, 1999: Yang et al., Nature, 382: 319-24, 1996).

VI. Detección y diagnóstico de SARS-CoV

A. Métodos de detección y diagnóstico basados en ácido nucleico

Una aplicación importante de la secuencia de información SARS-CoV

La relación presentada aquí está en el área de detección y pruebas de diagnóstico para la infección por SARS-CoV.

Métodos para

Selección de un sujeto para determinar si el sujeto ha sido o es

actualmente infectados con SARS-CoV se describen en este documento.

Uno de estos métodos incluye proporcionar una muestra, que la muestra incluye un ácido nucleico como ADN o ARN, y proporcionando un ensayo para detectar en la muestra la presencia

de una molécula de ácido nucleico del SARS-CoV. Muestras adecuadas

incluir todas las muestras biológicas útiles para la detección de virus

infección en sujetos, incluidas, entre otras, células, tejidos (por ejemplo, pulmón y riñón), fluidos corporales (para

ejemplo, sangre, suero, orina, saliva, esputo y cere líquido cefalorraquídeo), aspirados de médula ósea, BAL y orofa

lavado ryngéal Las muestras adecuadas adicionales incluyen todo el entorno

Muestras fundamentales útiles para la detección de presencia viral en

el medio ambiente, que incluye, entre otros, una muestra obtenido de objetos inanimados o depósitos dentro de un Ambiente interior o exterior. La detección en la muestra. de una molécula de ácido nucleico del SARS-CoV puede ser realizada por

una serie de metodologías, ejemplos no limitativos de los cuales

se detallan a continuación.

En una realización, detectar en la muestra la presencia de una molécula de ácido nucleico de SARS-CoV incluye el ampli

ficación de una secuencia de ácido nucleico de SARS-CoV (o un fragmento

ment de los mismos). Cualquier método de amplificación de ácido nucleico puede ser

usado. En un ejemplo específico, no limitante, la PCR se usa para

amplificar la secuencia (s) de ácido nucleico de SARS-CoV. En otro

ejemplo no limitativo, RT-PCR se puede utilizar para amplificar el

Secuencias de ácido nucleico de SARS-CoV. En un no adicional ejemplo limitante, la amplificación mediada por transcripción puede

ser usado para amplificar las secuencias de ácido nucleico del SARS-CoV.

En algunas realizaciones, un par de SARS-CoV específico

los cebadores se utilizan en la reacción de amplificación. Uno o ambos cebadores pueden tener una etiqueta final (por ejemplo, radio marcado, fluoresceinado o biotinilado). En uno específico, ejemplo no limitativo, al menos uno de los cebadores tiene un extremo 5' marcado con el colorante reportero 6-carboxifluoresceína (6-FAM).

El par de cebadores incluye un cebador aguas arriba (que se une 5' al cebador aguas abajo) y un cebador aguas abajo (que une 3' al cebador aguas arriba). En una realización, ya sea el cebador aguas arriba o el cebador aguas abajo es etiquetado. Ejemplos específicos no limitantes de SARS-CoV los cebadores específicos incluyen, entre otros: Cor-p-F2 (SEQ ID NO: 13), Cor-p-F3 (SEQ ID NO: 14), Cor-p-R1 (SEQ ID NO: 15), SARS1-F (SEQ ID NO: 16), SARS1-R (SEQ ID NO: 17), SARS2-F (SEQ ID NO: 19), SARS2-R (SEQ ID NO: 20), SARS3-F (SEQ ID NO: 22), SARS3-R (SEQ ID NO. 23), N3-F (SEQ ID NO: 25), N3-R (SEQ ID NO: 26), 3'NTR-F (SEQ ID NO: 28), 3'NTR-R (SEQ ID NO: 29), MF (SEQ ID NO: 31) y MR (SEQ ID NO: 32).

Se pueden generar pares de cebadores adicionales, por ejemplo, para amplificar cualquiera de los ORF específicos descritos en este documento, utilizando principios y métodos de diseño de imprimación bien conocidos. En un ejemplo específico, no limitativo, la electroforesis es usado para detectar secuencias específicas de SARS-CoV amplificadas.

La electroforesis se puede automatizar utilizando muchos métodos bien saber en el art. En una realización, un analizador genético es utilizado, como un analizador genético de prisma ABI 3100 (PE

5 5  
10  
15  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60 60  
sesenta y cinco

22

Applied Biosystems, Foster City, California), en donde las bandas se analizan utilizando el software GeneScan (PE Applied Biosys Teme, Foster City, California).

En otro ejemplo específico, no limitativo, la hibridación de los ensayos se utilizan para detectar SARS-CoV específico amplificado usando sondas oligonucleotídicas distintivas. Tales sondas incluyen sondas "TaqMan". Sondas TaqMan consiste en un oligonucleótido con un reportero en el extremo 5' y un apagador en el extremo 3'. En uno específico, no limitativo ejemplo, el reportero es 6-FAM y el apagador es negro Hole Quencher (Biosearch Tech., Inc., Novato, California). Cuando la sonda está intacta, la proximidad del reportero a los resultados de apagado en la supresión de la fluorescencia del reportero, principalmente por transferencia de energía de resonancia fluorescente. Si el objetivo de interés está presente, la sonda TaqMan específicamente hibrida entre los sitios de cebador directo e inverso durante el paso de recocido de PCR. En el proceso de PCR alargamiento, la actividad nucleolítica 5'-3' del ADN Taq la polimerasa escinde la sonda hibridada entre reportero y el apagador. Los fragmentos de la sonda son entonces desplazado del objetivo, y polimerización de la cadena continúa. La ADN polimerasa Taq no escinde no hay sonda hibridada, y corta la sonda hibridada solo durante polimerización. El extremo 3' de la sonda está bloqueado para evitar la extensión de la sonda durante la PCR. Los 5'-3' La escisión de la nucleasa de la sonda hibridada ocurre en cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial del producto de PCR. La acumulación de productos de PCR es detectado directamente al monitorear el aumento de fluorescencia del reportero liberado. El aumento de la señal de fluorescencia se detecta solo si la secuencia objetivo es complementaria a la sonda y se amplifica durante la PCR. Por lo tanto, no se detecta amplificación específica. SARS-CoV específico Las sondas TaqMan de la presente divulgación incluyen, pero no son limitado a: SARS1-P (SEQ ID NO: 18), SARS2-P (SEQ ID NO: 21), SARS3-P (SEQ ID NO: 24), N3-P (SEQ ID NO: 27), 3'NTR-P (SEQ ID NO: 30) y MP (SEQ ID NO: 33),

y los ensayos de hibridación incluyen, pero no se limitan a, un

Ensayo de RT-PCR en tiempo real.

B. Métodos de detección y diagnóstico basados en proteínas.

La presente divulgación proporciona además métodos de detección

ing. un antígeno SARS-CoV en una muestra, y / o diagnosticando

Infección por SARS-CoV en un sujeto mediante la detección de un SARS-CoV

antígeno. Ejemplos de tales métodos comprenden poner en contacto el

muestra con un agente de unión específico de SARS-CoV bajo condiciones por las cuales un complejo antígeno / agente de unión puede

formar; y detectar la formación del complejo, por lo tanto detectar el antígeno SARS-CoV en una muestra y / o diagnosticar

Infección por SARS-CoV en un sujeto. Se contempla que en menos ciertos antígenos estarán en un virión de SARS-CoV intacto,

será una proteína codificada por el SARS-CoV que se muestra en el

superficie de una célula infectada con SARS-CoV que expresa el antígeno,

o será un fragmento del antígeno. Muestras Contempladas

Sujeto a análisis por estos métodos puede comprender cualquier

muestra, como una muestra clínica, útil para la detección de infección viral en un sujeto.

Se discuten los métodos para detectar antígenos en una muestra.

por ejemplo, en Ausubel et al. Protocolos cortos en molecular Biology, 4 "ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999.

Enzima

inmunoensayos como IFA, ELISA e inmunotransferencia pueden adaptarse fácilmente para lograr la detección de SARS Antígenos de CoV de acuerdo con los métodos de esta divulgación.

Un método ELISA eficaz para la detección de solubles.

Los antígenos SARS-CoV son el ELISA competitivo directo. Esta El método es más útil cuando un anticuerpo específico contra el SARS-CoV

y antígeno SARS-CoV purificado están disponibles. Brevemente:

1)

recubrir un sustrato (por ejemplo, una placa de microtitulación) con un

muestra Se sospecha que contiene un antígeno SARS-CoV; 2) contacte el antígeno del SARS-CoV unido con un SARS-CoV anticuerpo específico unido a un resto detectable (por ejemplo,

US 7.220.852 B1

23

enzima peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina enzima); 3) agregar el inhibidor purificado antígeno SARS-CoV; 4)

contactar lo anterior con el sustrato para la enzima; y 5) observar / medir la inhibición del cambio de color o fluorescencia

y cuantificar la concentración de antígeno (por ejemplo, usando un

lector de placas de microtitulación).

Un método ELISA adicional efectivo para la detección de

los antígenos solubles de SARS-CoV son el sándwich de anticuerpos

ELISA Este método es frecuentemente más sensible para detectar

ing antígeno que el método ELISA competitivo directo.

Brevemente: 1) cubra un sustrato (por ejemplo, una placa de microtitulación)

con un anticuerpo específico contra SARS-CoV; 2) contactar al límite

Anticuerpo SARS-CoV con una muestra sospechosa de contener un antígeno SARS-CoV; 3) contacta lo anterior con SARS

Anticuerpo específico de CoV unido a un resto detectable (para

ejemplo, enzima peroxidasa de rábano picante o fos alcalino enzima fatasa); 4) contacte lo anterior con el sustrato para la enzima y 5) observar / medir el cambio de color o fluorescencia y cuantificar la concentración de antígeno (por ejemplo,

usando un lector de placa de microtitulación).

Un método ELISA eficaz para la detección de células.

Los antígenos de SARS-CoV de superficie son el ELISA celular directo.

Brevemente, las células sospechosas de exhibir un SARS en la superficie celular

Los antígenos de CoV son fijos (por ejemplo, usando glutaraldehído)

e incubado con un anticuerpo específico contra el SARS-CoV unido a

un resto detectable (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante enzima o enzima fosfatasa alcalina). Después de un lavado para eliminar el anticuerpo no unido, el sustrato para la enzima es agregado y se observa cambio de color o fluorescencia / measured

La presente divulgación proporciona además métodos de detección

ing un anticuerpo reactivo contra el SARS-CoV en una muestra, y / o diagnosticar la infección por SARS-CoV en un sujeto mediante la detección de un SARS-CoV-reactivo de anticuerpos. Ejemplos de tales métodos. comprende poner en contacto la muestra con un polipéptido SARS-CoV

marea de esta divulgación bajo condiciones por las cuales un pólipo ¿marea? se puede formar un complejo de anticuerpos; y detectar la formación de el complejo, detectando así el anticuerpo SARS-CoV en un muestra y / o diagnóstico de infección por SARS-CoV en un sujeto.

Muestras contempladas Sujeto a análisis por estos métodos puede comprender cualquier muestra, como una muestra clínica, como descrito aquí como útil para la detección de virus infección en un sujeto.

Los métodos para detectar anticuerpos en una muestra son dis maldecido, por ejemplo, en Ausubel et al. Protocolos cortos en

Molecular Biology, 4 "ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999.

Inmunoensayos enzimáticos como IFA, ELISA e inmuno la transferencia se puede adaptar fácilmente para lograr la detección de anticuerpos contra el SARS-CoV de acuerdo con los métodos de este divulgar. Un método ELISA efectivo para la detección de anticuerpos específicos de SARS-CoV es el ELISA indirecto método. Brevemente: 1) unir un polipéptido SARS-CoV a un El sustrato (por ejemplo, una placa de microtitulación; 2) contacta el polipéptido unido con una muestra Se sospecha que contiene Anticuerpo SARS-CoV; 3) contacta lo anterior con un secundario anticuerpo unido a un resto detectable que es reactivo con

el anticuerpo unido (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante)

enzima o enzima fosfatasa alcalina); 4) contacta al arriba con el sustrato para la enzima; y 5) observar / medir cambio de color o fluorescencia.

Otra técnica inmunológica que puede ser útil en el la detección de anticuerpos contra el SARS-CoV utiliza anti monoclonal cuerpos para la detección de anticuerpos específicamente reactivos con

Polipéptidos SARS-CoV en un ensayo de inhibición competitiva. Brevemente, una muestra sospechosa de contener SARS-CoV anti los cuerpos se ponen en contacto con un polipéptido SARS-CoV de este

divulgación que está vinculada a un sustrato (por ejemplo, un placa de microtitulación). El exceso de muestra se lava a fondo.

Un radio marcado (por ejemplo, ligado a enzimas, fluorescente, radio

activo, y similares) anticuerpo monoclonal específico para el

5 5

10

15

25

30

35

40

45

50

55

60 60

sesenta y cinco

24

El polipéptido SARS-CoV se pone en contacto con cualquier previ

complejos de polipéptido-anticuerpo formados de manera abundante y la

Se mide la cantidad de unión de anticuerpo monoclonal. los

La cantidad de inhibición de la unión del anticuerpo monoclonal es

medido en relación con un control (sin anticuerpo monoclonal),

permitiendo la detección y medición de anticuerpos en el muestra. El grado de inhibición de anticuerpos monoclonales puede

ser un ensayo muy específico para detectar SARS-CoV. Mono los anticuerpos clonales también se pueden usar para la detección directa de SARS-CoV en células o muestras de tejido por, por ejemplo, IFA

análisis de acuerdo con métodos estándar.

Como otro ejemplo, una prueba de microaglutinación puede ser utilizado para detectar la presencia de anticuerpos contra el SARS-CoV en un

muestra. En pocas palabras, perlas de látex, glóbulos rojos u otro agglu

las partículas que se pueden recubrir están recubiertas con un polipéptido SARS-CoV de esta divulgación y mezclado con una muestra, de modo que anticuerpos en la muestra que son específicamente reactivos con

El antígeno se reticula con el antígeno, causando aglutinación.

Los complejos de polipéptido-anticuerpo aglutinado forman un precipitado, visible a simple vista o medible por espectrofotómetro En una modificación de la prueba anterior, Los anticuerpos específicos de SARS-CoV de esta divulgación pueden ser

unido a las partículas aglutinables y al antígeno SARS-CoV en la muestra así detectada.

#### VII. Composiciones Estimuladoras Farmacéuticas e Inmunes y sus usos

Composiciones farmacéuticas que incluyen SARS-CoV secuencias de ácido nucleico, polipéptidos SARS-CoV o anti los cuerpos que se unen a estos polipéptidos también están incluidos

por la presente divulgación. Estas composiciones farmacéuticas

las opciones incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o

más polipéptidos de SARS-CoV, uno o más ácidos nucleicos moléculas que codifican un polipéptido SARS-CoV, o un anti cuerpo que se une a un polipéptido SARS-CoV, en conjunto con un portador farmacéuticamente aceptable.

Aquí se describen sustancias adecuadas para su uso como composiciones inmunoestimulantes para la inhibición o tratamiento

ment de SARS. Composiciones inmunoestimulantes particulares están dirigidos contra el SARS-CoV e incluyen antígenos obtenido de SARS-CoV. En una realización, un sistema inmune composición estimuladora contiene SARS-CoV atenuado.

Los métodos de atenuación viral son bien conocidos en la técnica, y

incluye, pero no se limita a, pasaje serial alto (para ejemplo, en células huésped susceptibles en un entorno específico

condiciones mentales para seleccionar viriones atenuados), exposición

a un agente mutagénico (por ejemplo, un mutágeno químico o radiación), ingeniería genética utilizando ADN recombinante tecnología (por ejemplo, usando reemplazo de genes o gen noqueado para deshabilitar uno o más genes virales), o algunos

combinación de los mismos.

En otra realización, el componente inmunoestimulador la posición contiene SARS-CoV inactivado. Métodos de viral la inactivación es bien conocida en la técnica e incluye, pero son sin limitarse a calor y productos químicos (por ejemplo, formalina, B-propiolactona y etiléniminas).

En otra realización más, el sistema inmunoestimulador la posición contiene un vector de ácido nucleico que incluye SARS Moléculas de ácido nucleico CoV descritas aquí, o que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunógeno polipéptido o fragmento de polipéptido de SARS-CoV o derivado del SARS-CoV, como un polipéptido que codifica una proteína de superficie de SARS-CoV.

En una realización adicional, el sistema inmunoestimulador la posición contiene una subunidad SARS-CoV, como glycoproteína, proteína principal de la cápside u otros productos genéticos encontrados provocar respuestas inmunes humorales y / o mediadas por células.

El polipéptido SARS-CoV inmunoestimulante proporcionado mareas, construcciones o vectores que codifican Tales polipéptidos, son combinado con un portador farmacéuticamente aceptable o

US 7.220.852 B1

25

vehículo para la administración como un sistema inmunoestimulador posición para sujetos humanos o animales. En algunas realizaciones, más de un polipéptido SARS-CoV inmunoestimulante se puede combinar para formar una sola preparación. Las formulaciones inmunogénicas pueden ser convenientemente pre sembrado en forma de dosificación unitaria y preparado usando convencional técnicas farmacéuticas Dichas técnicas incluyen el paso de asociar el ingrediente activo y el portador (es) farmacéutico (s) o excipiente (s). En general, el las formulaciones se preparan de manera uniforme e íntima asociando el ingrediente activo con el líquido

transportistas Formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que puede contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del destinatario previsto; y acuosa y no acuosa Suspensiones estériles que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en envases de dosis unitarias o multidosis, por ejemplo, sellados ampollas y viales, y se pueden almacenar en un liofilizado condición (liofilizada) que requiere solo la adición de un vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para preparaciones inyectables, inmediatamente antes de su uso. Solucion de inyeccion extemporánea

Las preparaciones y suspensiones pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y tabletas comúnmente utilizados por alguien de habilidad ordinaria en el art.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de dosis unitarias son aquellos que contienen una dosis o unidad, o una fracción apropiada del mismo, del ingrediente administrado. Debe estar debajo se puso de pie que, además de los ingredientes en particular los hombres mencionado anteriormente, las formulaciones incluidas en este documento pueden incluir otros agentes comúnmente utilizados por alguien de habilidad ordinaria en el Arte.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento, incluidas las para uso como composiciones inmunoestimulantes, se pueden administrar a través de diferentes rutas, como la oral, incluyendo la bucal y Sublingual, rectal, parenteral, aerosol, nasal, intramuscular, Subcutáneo, intradérmico y tópico. Pueden ser admin istered en diferentes formas, incluyendo pero no limitado a Soluciones, emulsiones y suspensiones, microesferas, par ticles, micropartículas, nanopartículas y liposomas. El volumen de administración variará dependiendo de

ruta de administración. A modo de ejemplo, intramuscular  
Las inyecciones pueden variar de aproximadamente 0,1 ml a  
aproximadamente 1,0 ml.

Los expertos en la materia sabrán lo apropiado  
volúmenes para diferentes vías de administración.

Un desarrollo relativamente reciente en el campo de la  
inmunidad.

compuestos estimulantes (por ejemplo, vacunas) es el directo  
inyección de moléculas de ácido nucleico que codifican  
péptido anti

gens (ampliamente descrito en Janeway & Travers, Immunobiología El sistema inmune en salud y enfermedad, página 13.25, Garland Publishing, Inc., Nueva York, 1997; y McDonnell y Askari, N. Engl. J. Med. 334: 42-45, 1996).

Vectores que incluyen moléculas de ácido nucleico descritas

aquí, o que incluyen una secuencia de ácido nucleico que  
codifica un

el polipéptido SARS-CoV inmunogénico se puede utilizar en  
tales métodos de vacunación de ADN.

Por lo tanto, el término "composición inmunoestimulante" como  
usado aquí también incluye vacunas de ácido nucleico en las que un  
molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido SARS-  
CoV es

administrado a un sujeto en una composición farmacéutica.

Para la inmunización genética, se conocen métodos de  
administración adecuados.

para los expertos en la materia se incluye la inyección  
directa de plásmido

ADN en los músculos (Wolff et al., Hum. Mol. Genet. 1: 363,

1992), entrega de ADN complejado con proteína específica

vehículos (Wu et al., J. Biol. Chem. 264: 16985, 1989), co

precipitación de ADN con fosfato de calcio (Benvenisty

y Reshef, Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 9551, 1986), encaps

ulación de ADN en liposomas (Kaneda et al., Science

243: 375, 1989), bombardeo de partículas (Tang et al., Nature

10

15

25

30

35

40

45

50

55

60 60

sesenta y cinco

26

356: 152, 1992: Eisenbraun y col., DNA Cell Biol. 12: 791

1993) e infección in vivo usando vectores retrovirales

clonados

(Seeger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 5849, 1984). Simi

En general, las preparaciones de vacunas de ácido nucleico

pueden administrarse

a través de portador viral.

La cantidad de compuesto inmunoestimulador en cada la dosis de una composición inmunoestimuladora se selecciona como cantidad que induce un inmunoestimulador o inmunopro Respuesta tectiva sin efectos secundarios adversos significativos. Tal cantidad variará dependiendo de qué específico Se emplea inmunógeno y cómo se presenta. Inicial las inyecciones pueden variar de aproximadamente 1 ug a aproximadamente 1 mg, con Algunas realizaciones que tienen un intervalo de aproximadamente 10 ug a aproximadamente 800 ug, y aún otras realizaciones, un rango de aproximadamente 25ug a aproximadamente 500 ug. Después de una administración inicial de la composición inmunoestimuladora, los sujetos pueden recibir una o varias administraciones de refuerzo, adecuadamente espaciadas. Las administraciones de refuerzo pueden variar de aproximadamente 1 lug a aproximadamente 1 mg, con otras realizaciones que tienen un intervalo de aproximadamente 10 ug a aproximadamente 750 ug, y aún otros un rango de aproximadamente 50 ug a unos 500 lug. Impulsores periódicos a intervalos de 1 a 5 años, por ejemplo, tres años, puede ser deseable mantener el niveles deseados de inmunidad protectora. También se contempla que la inmunoestimulación proporcionada las moléculas y composiciones de latoria pueden administrarse a un sujeto indirectamente, estimulando primero una célula in vitro, que la célula estimulada se administra posteriormente al sujeto a provocar una respuesta inmune. Además, el farmacéutico o composiciones inmunoestimulantes o métodos de tratamiento El tratamiento puede administrarse en combinación con otros tratamientos peuticos.

#### VIII Kits

También se proporcionan aquí kits útiles en la detección. y / o diagnóstico de SARS-CoV. Esto incluye kits para usar con métodos de detección de ácidos nucleicos y proteínas, como

los divulgados en este documento.

Los cebadores oligonucleotídicos específicos de SARS-CoV y

las sondas descritas en este documento pueden suministrarse en forma de kit para uso en la detección de SARS-CoV. En tal kit, una apropiada cantidad de uno o más de los oligonucleótidos es proporcionado en uno o más contenedores, o retenido en un sustrato.

Se puede proporcionar un cebador o sonda de oligonucleótidos en un solución acuosa o como polvo liofilizado o liofilizado, por ejemplo. Los contenedores en los que los oligonucleótidos que se suministran pueden ser cualquier convencional contenedor que puede contener el formulario suministrado, para ejemplo, tubos de microcentrífuga, ampollas o botellas. En algunas aplicaciones, se proporcionan pares de cebadores en cantidades de un solo uso en tubos individuales (generalmente desechables) o contenedores equivalentes. Con tal arreglo, el muestra a analizar para detectar la presencia de un núcleo de SARS-CoV se puede agregar ácido a los tubos individuales y amplificación llevado a cabo directamente.

La cantidad de cada oligonucleótido suministrado en el kit puede ser cualquier cantidad apropiada y puede depender del mercado al que se dirige el producto. Por ejemplo, si el kit está adaptado para investigación o uso clínico, la cantidad de cada cebador oligonucleotídico proporcionado probablemente sería una cantidad suficiente para cebar varias reacciones de amplificación por PCR.

Las pautas generales para determinar las cantidades apropiadas pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: un manual de laboratorio*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001; Ausubel et al. (eds.), *Protocolos breves en biología molecular*, John Wiley e hijos, Nueva York, NY, 1999; e Innis et al., *PCR Aplicaciones, Protocolos para Genómica Funcional*, Académica Press, Inc., San Diego, California, 1999. Un kit puede incluir más de dos cebadores, para facilitar la amplificación de

un mayor número de secuencias de nucleótidos SARS-CoV.

US 7.220.852 B1

27

En algunas realizaciones, los kits también incluyen uno o más reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación in vitro

iones, incluidos los reactivos de preparación de muestras de ADN, apro

tampones priados (por ejemplo, tampón de polimerasa), sales (para

ejemplo, cloruro de magnesio) y desoxirribonucleótidos (dNTP).

Los kits pueden incluir oligonucleótidos marcados o no otide primers y / o sondas para usar en la detección de SARS Secuencias de nucleótidos de CoV. Las secuencias apropiadas para

dicha sonda será cualquier secuencia que se encuentre entre sitios de recocido de los dos cebadores oligonucleotídicos proporcionados,

Tal que la secuencia a la que la sonda es complementaria es amplificado durante la reacción de amplificación.

Una o más secuencias de control para usar en el amplificador Las reacciones de reacción también se pueden suministrar en el kit. En otra

realizaciones particulares, el kit incluye equipo, reactivos e instrucciones para extraer y / o purificar nucleótidos de una muestra.

Los kits para la detección del antígeno SARS-CoV incluyen para

instancia al menos una unión específica de antígeno SARS-CoV agente (por ejemplo, un anticuerpo policlonal o monoclonal o fragmento de anticuerpo). Los kits también pueden incluir medios para

detección de antígeno: complejos de agentes de unión específicos, para

ejemplo, el agente de unión específico puede ser detectable etiquetado. Si el agente de unión específico no está etiquetado, puede ser

detectado por segundos anticuerpos o proteína A, por ejemplo, que también se puede proporcionar en algunos kits en uno o más

contenedores separados. Dichas técnicas son bien conocidas.

Otro ejemplo de un kit de ensayo proporcionado aquí es un polipéptido recombinante específico de SARS-CoV (o fragmento del mismo) como un antígeno y un anti conjugado con enzimas

anticuerpo humano como segundo anticuerpo. Ejemplos de tales kits

También puede incluir uno o más sustratos enzimáticos. Tales kits

se puede usar para probar si una muestra de un sujeto contiene

anticuerpos contra una proteína específica de SARS-CoV.

El tema de la presente divulgación es adicional

ilustrado por los siguientes ejemplos no limitantes.

5 5

10

15

25

30

28

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Aislamiento y caracterización de SARS-CoV

Aislamiento de virus y caracterización ultraestructural

Este ejemplo describe el aislamiento y las características originales.

terización de un nuevo coronavirus humano de pacientes con SARS

Una variedad de muestras clínicas (sangre, suero, material de hisopos o lavados orofaríngeos, material de

Hisopos nasofaríngeos y tejidos de órganos principales recolectados

en la autopsia) de pacientes que cumplen con la definición de caso de

El SARS fue enviado a los Centros para el Control de Enfermedades y Prevención (CDC) como parte de la investigación etiológica de SARS Estas muestras se inocularon en una serie de

líneas celulares continuas, incluidas Vero E6, NCI-H292, MDCK, LLC-MK2 y células B95-8, y en ICR de lactancia

ratones por vía intracraneal e intraperitoneal. Todos Se observaron cultivos diariamente para CPE. Medio de

mantenimiento

se reabasteció el día siete y se terminaron los cultivos catorce días después de la inoculación. Cualquier cultura que

exhiba

CPE identificable fueron sometidos a varios procedimientos para

Identificar la causa del efecto. Se observaron ratones lactantes

diariamente durante catorce días, y cualquier ratón enfermo o muerto estaba

más probado mediante la preparación de una suspensión cerebral que fue

filtrada y subcultivada. Ratones que se quedaron bien después

catorce días fueron asesinados, y los resultados de sus pruebas fueron

registrado como negativo.

Dos líneas celulares, células Vero E6 y células NCI-H292, inocu con muestras orofaríngeas del paciente 16 (un 46 médico varón de un año con un vínculo epidemiológico a un hospital con múltiples pacientes con SARS) inicialmente mostró CPE

(Tabla 1)

TABLA 1.

Muestras de pacientes con SARS que fueron positivas para SARS-CoV por uno o más métodos '.

Exposición  
Recomendaciones  
Paciente

y  
en el cofre  
No.

Ajuste  
Edad / sexo  
Radiografía

1  
Singapur,  
53 años F  
Neumonía  
hospital

2t  
Hong  
36 años? F  
Neumonía

Kong  
hotel  
3  
Hong  
22 años METRO  
Neumonía

Kong  
hotel  
4t  
Hong  
39 años? METRO  
Neumonía

Kong  
hotel  
5 5  
Hong  
49 años M  
Neumonía

Kong  
hotel  
6i  
Hong  
46 años? METRO  
Neumonía

Kong  
hotel  
7 7  
Vietnam,  
Adulto  
Neumonía  
hospital  
desconocido

8  
Vietnam,  
Adulto  
Neumonía  
hospital  
desconocido  
9 9  
Vietnam,

Adulto  
Neumonía  
hospital  
desconocido  
10  
Vietnam,  
Adulto  
Neumonía  
hospital  
desconocido  
11  
Vietnam,  
Adulto  
Neumonía  
hospital  
desconocido  
Hospital Serológico  
ización  
Resultados  
Muestra  
Aislamiento  
RT-PCR  
si  
-  
Nasal,  
No hecho  
orofaríngeo  
hisopos  
si  
-  
Nasal, hisopo  
No hecho  
si  
-  
Torunda  
si  
-  
Nasal,  
fáringeo  
Torunda  
si  
No hecho  
Espujo  
-  
-  
si  
-  
Riñón, pulmón  
+ S  
-  
broncoalveolar  
lavado  
si  
Orofaringeo  
-  
-  
lavar  
si  
Orofaringeo  
-  
lavar

## TABLA 1-continuación

Muestras de pacientes con SARS que fueron positivas para SARS-CoV por uno o más métodos '.

Exposición  
Recomendaciones

Paciente  
Y  
en el cofre  
Hospital  
No.  
Ajuste  
Edad / sexo  
Radiografía  
ización  
2  
Vietnam,  
Adulto  
Neumonía  
si  
hospital  
desconocido  
3  
Vietnam,  
Adulto  
Neumonía  
si  
hospital  
desconocido  
4 4  
Vietnam,  
Adulto  
Neumonía  
si  
hospital  
desconocido  
5 5  
Vietnam,  
Adulto  
Neumonía  
si  
hospital  
desconocido  
6 6  
Vietnam,  
46 años? METRO  
Neumonía  
si  
hospital  
7 7  
Canadá,  
43 años? METRO  
Neumonía  
si  
familia  
8  
Taiwán  
51 años / F  
Neumonía  
si  
familia  
9 9  
Hong  
AdultoF  
Neumonía  
si  
Kong  
hotel  
Serológico  
Resultados  
Muestra  
Aislamiento  
RT-PCR  
laríngeo  
lavar

laríngeo  
lavar  
laríngeo  
lavar  
laríngeo  
lavar  
Nasal,  
orofaríngeo  
hisopos  
Pulmón, hueso  
<sup>son</sup>  
Esp<sup>u</sup>to  
Orofaringeo  
lavar

\* Los signos más denotan resultados positivos, y los signos menos denotan resultados negativos. Los ensayos serológicos y RT-PCR no se realizaron necesariamente en muestras obtenidas al mismo tiempo.

Este fue un espécimen tardío, anticuerpo positivo en la primera muestra. Los viajes incluyeron China, Hong Kong (hotel) y Hanoi (el paciente era el paciente índice en el Hospital Francés).

La aislamiento fue solo del riñón.

El aislamiento fue solo de la orofaringe.

El CPE en las células Vero E6 se observó por primera vez en el quinto día post-inoculación; fue focal, con redondeo celular y un Apariencia refractiva en las células afectadas que pronto fue

seguido de desprendimiento de células (figura 1A). El CPE se extendió

involucrar rápidamente a toda la monocapa celular dentro de 24 a 48

horas Subcultura de material después de la preparación de un maestro.

El stock de semillas (utilizado para la posterior producción de antígeno) resultó

en la rápida aparición de CPE, como se señaló anteriormente, y en

destrucción completa de la monocapa en el inoculado

matraces dentro de las 48 horas. CPE similar también se observó en cuatro

Cultivos adicionales: tres cultivos de muestras respiratorias

(dos lavados orofaríngeos y una muestra de esputo) y

un cultivo de una suspensión de tejido renal obtenido en

autopsia. En estas muestras, se observó el CPE inicial

entre el día dos y el día cuatro y, como se señaló

anteriormente, el CPE

progresó rápidamente para involucrar a toda la monocapa celular.

Se prepararon muestras de cultivo de tejidos que muestran CPE para

examen microscópico de electrones. Tinción negativa elec

Las muestras tron-microscópicas se prepararon secando cul

sobrenadante puro, mezclado 1: 1 con paraformaldehído al

2.5%,

sobre rejillas con recubrimiento de Formvarcarbon y tinción

con 2%

tungstato de metilamina. Microscopía electrónica de sección delgada las muestras se prepararon fijando un sedimento celular lavado con 2.5% de glutaraldehído e incrustando el sedimento celular en epoxi resina. Además, se preparó un stock maestro de semillas a partir de cultivo restante Sobrenadante y células por congelación-descongelación el matraz de cultivo, aclarando los contenidos descongelados por centrifugación a 1000xg, y dispensar el sobrenadante en alícuotas almacenadas en fase gaseosa sobre nitrógeno líquido. El maestro el stock de semillas se subcultivó en botellas de rodillos de 850 cm de Células Vero E6 para la preparación de positivo fijado en formalina células de control para análisis inmunohistoquímico, mezcladas con células Vero E6 normales, e irradiadas con rayos gamma para preparación de portaobjetos para pruebas IFA o extraídos con detergente y irradiado con rayos gamma para su uso como antígeno ELISA para anticuerpos pruebas.

Examen de células Vero E6 CPE-positivas por delgado microscopía electrónica de sección reveló coro característico partículas de navirus dentro de las cisternas de los endoplasmas rugosos retículo mic y en vesículas (Figura 2A) (Becker et al., J.

30

35

40

45

50

55

60 60

sesenta y cinco

Virol 1: 1019-27, 1967; Oshiro et al. J. Gen. Virol.

12: 161-8, 1971). Se encontraron partículas extracelulares en grandes grupos y adheridos a la superficie de la membrana de plasma

brana Tinción negativa microscopía electrónica identificada coro

Partículas de Navirus, 80 a 140 nm de diámetro, con 20 a 30 proyecciones de superficie complejas de 40 nm que rodean la periferia

ery (figura 2B). Hemaglutinina glicoproteína de tipo esterasa No se vieron proyecciones.

El aislamiento y el crecimiento de un coronavirus derivado del ser humano. en Vero E6 las células fueron inesperadas. Lo previamente conocido los coronavirus humanos son notablemente fastidiosos, prefiriendo seleccione líneas celulares, cultivo de órganos o ratones lactantes para propa gation El único coronavirus humano o animal que tiene Se ha demostrado que el crecimiento en las células Vero E6 es PEDV, y requiere la adición de tripsina al medio de cultivo para el crecimiento en el células. Además, PEDV se adaptó al crecimiento en células Vero E6 resulta en un CPE sorprendentemente diferente, con vacío citoplasmático oles y la formación de grandes sincitios. Las células sincitiales fueron solo se observa ocasionalmente en monocapas de células Vero E6 infectado con el SARS-CoV; claramente no representan El CPE dominante. Transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa y Secuencia Para los ensayos de RT-PCR, se colocaron sobrenadantes de cultivo celular en tampón de lisis. Se prepararon extractos de ARN a partir de 100 ul de cada muestra (o sobrenadante de cultivo) con el automatizado Sistema de extracción NucliSens (bioMérieux, Durham, NC). Inicialmente, degenerar, cebadores que contienen inosina IN-2 (+) 5'GGGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA3 '(SEQ ID NO: 34) e IN-4 (-) 5'TAACACACAACICCATCA TCA3 '(SEQ ID NO: 35) fueron diseñados para reconocer sitios que codifican motivos de aminoácidos conservados que se identificaron en el base de alineamientos de coronavirus ORF1a disponibles, ORF1b, S, HE, M y N secuencias de genes. Adicional, Específico del SARS, cebadores Cor-p-F2 (+) 5'CTAACATGCT TAGGATAATGG3 '(SEQ ID NO: 13), Cor-p-F3 (+) 5'GCCTCTCTTGTCTTGCTCGC3 '(SEQ ID NO: 14), y Cor-p-R1 (-) 5'CAGGTAAGCGTAAACTCATC3 (SEQ ID NO: 15) se diseñaron como secuencias genéricas

---

US 7.220.852 B1

31

de productos de RT-PCR amplificados con el degenerado  
imprimaciones Estos cebadores específicos de SARS se usaron  
para probar

muestras de pacientes para SARS (ver más abajo).

Imprimaciones utilizadas para

amplificación específica de metapneumovirus humano tiene  
sido descrito por Falsey et al. (J. Infect. Dis. 87: 785-90,  
2003).

Para productos de RT-PCR de menos de 3 kb, el ADNc fue  
sintetizado en una mezcla de reacción del 20 de julio que  
contiene 500 ng de

ARN, 200 U de transcriptasa inversa Superscript™ II (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California), 40 U de RNasin

(Promega Corp., Madison, Wisconsin), 100 mM cada dNTP

(Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, Ind.), 4 ul de

5x buffer de reacción (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad,

Calif.) Y 200 pmoles del cebador inverso. La reacción

La mezcla, a excepción de la transcriptasa inversa, se calentó a

70 ° C durante 2 minutos, enfriado a 4 ° C. por 5 minutos y luego

calentado a 42 ° C. en un termociclador La mezcla se mantuvo a

42 ° C. durante 4 minutos, y luego la transcriptasa inversa fue

añadido, y las reacciones fueron incubadas a 42 ° C durante 45 minutos. Se usaron dos microlitros de la reacción de ADNc en

una reacción de PCR de 50 ul que contiene Tris-HCl 67 mM (pH 8.8),

1 mM cada cebador, sulfato de amonio 17 mM, 6 mM

EDTA, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 200 mM cada dNTP y 2.5 U de Taq

ADN polimerasa (Roche Molecular Biochemicals, India

Napolis, Ind.). El programa termociclador para la PCR con

con 40 ciclos de desnaturalización a 95 ° C. por 30 segundos

recocido a 42 ° C. durante 30 segundos, y extensión a 65 ° C.

por 30 segundos Para cebadores específicos de SARS-CoV, el recocido

La temperatura de ing aumentó a 55°C.

Para la amplificación de fragmentos de más de 3 kb, regiones del genoma entre secciones de secuencia conocida fueron

amplificado por medio de un protocolo RT-PCR largo y SARS

Cebadores específicos de CoV. La síntesis de ADNc de primera cadena fue por formado a 42 ° C. o 50 ° C utilizando Superscript™ II RNase H

transcriptasa inversa (Invitrogen Life Technologies, Carls malo, California) según las instrucciones del fabricante con modificaciones menores Cebadores específicos de coronavirus

(500 ng) y SARS-CoV RNA (350 ng) se combinaron con la mezcla de nucleótidos de PCR (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, Ind.), Se calentó durante 1 minuto a 94 ° C y se enfrió

a 4°C en un termociclador. El 5x buffer de primera cadena, ditiotreititol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif.) Y el inhibidor de la proteasa RNasa (Roche Molecular Se agregaron bioquímicos, Indianápolis, Ind.), Y el Las muestras se incubaron a 42 ° C o 50 ° C durante 2 minutos.

Después de agregar transcriptasa inversa (200 U), las muestras

se incubaron a 42 ° C o 50 ° C durante 1,5 a 2 horas.

Las muestras se inactivaron a 70°C durante 15 minutos y posteriormente tratado con 2U de RNase H (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Ind.) A 37 ° C durante 30 minutos.

La amplificación por RT-PCR larga de fragmentos de 5 a 8 kb fue

realizado utilizando Taq Plus Precision (Stratagene, La Jolla,

Calif.) Y AmpliWax PCR Gem 100 cuentas (Bio aplicado sistemas; Foster City, California) para PCR de "arranque en caliente" con el

siguientes parámetros de termociclado: desnaturalización a 94 ° C.

durante 1 minuto seguido de 35 ciclos de 94 ° C durante 30 segundos,

55 ° C durante 30 segundos, un aumento de 0.4 grados por segundo

hasta 72 ° C y 72 ° C durante 7 a 10 minutos, con un final extensión a 72°C durante 10 minutos. Los productos de RT-PCR fueron

separados por electroforesis en geles de agarosa TAE al 0,9% y

purificado mediante el uso de un kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen,

Inc., Santa Clarita, California).

En todos los casos, los productos de RT-PCR se aislaron en gel y purificado para secuenciación mediante un QIAquick Gel Extract kit de iones (Qiagen, Inc., Santa Clarita, California). Ambos hilos fueron secuenciados por métodos automatizados, utilizando fluorescentes terminadores de cadena didesoxi (Applied Biosystems; Foster Ciudad, California). La secuencia del líder se obtuvo del sub ARNm genómico que codifica el gen N y del 5 'de

5 5  
15  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60 60  
sesenta y cinco

32

terminal del ARN genómico. La amplificación rápida de 5 'de Técnica de ADNc termina (RACE) (Harcourt et al., Virology 271: 334-49, 2000) se utilizó con cebadores inversos específicos para el gen N o para la región 5 'no traducida. CARRERA los productos se secuenciaron directamente o se clonaron en un vector plasmídico antes de la secuenciación. Una cartilla que fue específico para el líder de SARS-CoV se utilizó para amplificar el región entre el extremo 5 'del genoma y conocida secuencias en el gen rep. El término 3 'del genoma se amplificó para la secuenciación mediante el uso de un cebador oligo- (dT) y cebadores específicos para el gen N. Una vez que la secuencia genómica completa del SARS-CoV tenía determinado, se confirmó secuenciando una serie de productos de RT-PCR amplificados independientemente que abarcan todo el genoma Secuenciación de sentido positivo y negativo cebadores, a intervalos de aproximadamente 300 nt, se utilizaron para generar una secuencia confirmatoria con un promedio de redundancia de 9.1. La secuencia confirmatoria fue idéntica a la secuencia original La secuencia genómica (SEQ ID NO: 1) fue publicado en la base de datos de secuencia GenBank (Accession No. AY278741) el 21 de abril de 2003. Análisis de secuencia Las secuencias de aminoácidos predichas se compararon con los de virus de referencia que representan cada especie para

qué información de secuencia genómica completa estaba disponible

capaz: los representantes del grupo 1 incluyeron coronavirus humano 229E (número de acceso de GenBank AF304460), epi porcina virus de diarrea demica (N° de acceso a GenBank AF353511), y el virus de la gastroenteritis transmisible (Adhesión GenBank No. AF27 1965); representantes del grupo 2 incluyeron bovinos coronavirus (número de acceso de GenBank AF220295) y virus de hepatitis de ratón (N° de acceso de GenBank AF201929); el grupo 3 estuvo representado por el virus de la bronquitis infecciosa (Número de acceso de GenBank M95169). Secuencias para representar cepas representativas de otras especies de coronavirus para las cuales se incluyó información de secuencia parcial.

Para algunas de las comparaciones de proteínas estructurales:

grupo 1

cepas representativas incluyeron coronavirus canino (Gen Bank Access No. D13096), coronavirus felino (GenBank N° de acceso AY204704) y coronavirus respiratorio porcino (número de acceso de GenBank Z24675); y grupo 2 representantes incluyeron tres cepas de coronavirus humano OC43 (N° de acceso de GenBank M76373, L14643 y M93390), encefalomiелitis hemaglutinante porcina virus (GenBank Accession No. AY078417) y coronavirus de ratas (número de acceso de GenBank AF207551). Secuencias parciales de nucleótidos del gen de la polimerasa fueron alineado con secuencias de coronavirus publicadas, utilizando CLUSTAL W para Unix (versión 1.7: Thompson et al., *Acidos Nucleicos Res.* 22: 4673-80, 1994). Árboles filogenéticos fueron calculados por parsimonia máxima, distancia y análisis de criterios basados en la máxima probabilidad con PAUP (versión 4.0.d10; Swofford ed., *Phylogenetic Analysis usando Parsimonia y otros métodos*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts). Cuando se compara con otros humanos y animales coronavirus, el nucleótido y el aminoácido deducido de esta región tuvo puntuaciones de similitud que van desde 0.56 a 0.63 y de 0.57 a 0.74, respectivamente. El más alto nivel de similitud se obtuvo con el grupo II coronavirus

artimañas El árbol de parsimonia máxima obtenido de la alineación de la secuencia de nucleótidos se muestra en la FIG. 3. Arranque análisis de correas de los nodos internos en las ramas internas del árbol proporcionó pruebas contundentes de que el SARS-CoV es genéticamente distinto de otros coronavirus conocidos. Análisis de microarrays (usando un ADN oligonucleotídico largo microarrays con elementos de matriz derivados de altamente con regiones servidas dentro de familias virales) de muestras de cultivos celulares infectados y no infectados dieron una señal positiva para un grupo de ocho oligonucleótidos derivados de dos virus

US 7.220.852 B1

33

familias: Coronaviridae y Astroviridae (Wang et al., PNAS 99: 15687-92, 2002). Todos los astrovirus y dos de los los oligonucleótidos de coronavirus comparten una secuencia de consenso motivo que se asigna al extremo 3 'de los astrovirus y dos miembros de la familia del coronavirus: bron infeccioso aviar quitis y coronavirus de pavo (Jonassen et al., J. Gen. Virol. 79: 715-8, 1998). Los resultados fueron consistentes con la identidad de el aislado como un coronavirus. Alineamientos de secuencia adicionales y unión de vecinos los árboles se generaron usando ClustalX (Thompson et al., Acidos Nucleicos Res. 25: 4876-82, 1997), versión 1.83, con la matriz de comparación de proteínas Gonnet. Los árboles resultantes se ajustaron para el resultado final utilizando treetool versión 2.0.1. Las distancias por pares no corregidas se calcularon a partir de secuencias alineadas utilizando el programa Distancias del Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 10.2 (Accel Rys, Burlington, Massachusetts). Las distancias se convirtieron a porcentaje identidad restando de 100. Las secuencias de aminoácidos para tres proteínas enzimáticas bien definidas codificadas por el representante

gen y las cuatro proteínas estructurales principales del SARS-CoV se compararon con los de virus representativos para cada una de las especies de coronavirus para las cuales completa la información de la secuencia genómica estaba disponible (figura 4, tabla 2) Las topologías de los filogramas resultantes son notablemente similares (figura 4). Para cada proteína analizada, la especie formaron grupos monofiléticos consistentes con el establecimiento de grupos taxonómicos lisados. En todos los casos, secuencias de SARS-CoV segregado en una cuarta rama bien resuelta. Estos clus Los valores se basaron en valores de arranque superiores al 90% (1000 réplicas). De acuerdo con las comparaciones por pares entre las especies de coronavirus previamente caracterizadas (Tabla 2), hubo una mayor conservación de la secuencia en el enzímico proteínas (3CLA', polimerasa (POL) y helicasa (HEL)) que entre las proteínas estructurales (SEM y N). Estos resultados indican que el SARS-CoV no está estrechamente relacionado con ningún de los coronavirus previamente caracterizados y forma un grupo distinto dentro del género Coronavirus.

TABLA 2

5 5  
10  
15  
25  
30

34

87: 785-90, 2003. Controles positivos y negativos de RT-PCR, que contiene extractos de ARN virales estandarizados y nucleasa

Se incluyó agua libre en cada corrida. Amplificado 6-FAM los productos etiquetados fueron analizados por electroforesis capilar en un analizador genético de prisma ABI 3100 con GeneScan software (versión 3.1.2: Applied Biosystems; Foster City, California) Las muestras se consideraron positivas para SARS-CoV

si los productos de amplificación estuvieran dentro de un nucleótido de el tamaño esperado del producto (368 nucleótidos para Cor-p-F2 o Cor-p-R1 y 348 nucleótidos para Cor-p-F3 o Cor-p-R1) para ambos conjuntos de cebadores específicos, según lo confirmado por una segunda PCR

reacción de otra parte alícuota de extracto de ARN en un separado laboratorio. Donde el rendimiento de ADN era suficiente, el amplificado

Los productos también fueron secuenciados. Además, como se describe

arriba, detección basada en microarrays de SARS-CoV en paciente

se realizaron muestras (Wang et al., PNAS 99: 15687-92, 2002 y Bohlander et al., Genomics 13: 1322-24, 1992).

Ejemplo 3

Inmunohistoquímico e histopatológico

Análisis y Análisis Electrón-Microscópico de

Fluido de lavado broncoalveolar

Este ejemplo ilustra inmunohistoquímico, histo

Análisis patológico y microscópico electrónico de Vero E6

células infectadas con el SARS-CoV y muestras de tejido de

Pacientes con SARS.

Células Vero E6 fijadas con formalina e incluidas en parafina infectadas

con el SARS-CoV y tejidos obtenidos de pacientes con

El SARS se tiñó con hematoxilina y eosina y varios

tinciones inmunohistoquímicas. Ensayos inmunohistoquímicos

se basaron en un método descrito anteriormente para el

hantavirus

(Zaki et al., Amer: J. Pathol. 146: 552-79, 1995).

Brevemente,

Secciones de 4 um se desparafinaron, rehidrataron y

digirieron.

en proteínasa K durante 15 minutos. Los portaobjetos fueron incubados

durante 60 minutos a temperatura ambiente con anti monoclonal

Identidades de aminoácidos por pares de proteínas de coronavirus.

Grupo

Virus

3CLPRO

POL

HEL

S

mi

METRO

norte

Identidad de aminoácidos por pares (porcentaje)

G1

HCoV-229E

40,1

58,8

59,7

23,9

22,7

28,8

23,0

PEDV

44,4

59,5

61,7

21,7

17,6

31,8

22,6

TGEV

44,0

59,4

61,2  
20,6  
22,4  
30,0  
25,6  
G2  
BCCV  
48,8  
66,3  
68,3  
27,1  
20,0  
39,7  
31,9  
MHV  
49,2  
66,5  
67,3  
26,5  
21,1  
39,0  
33,0  
G3  
IEV  
41,3  
62,5  
58,6  
21,8  
18,4  
27,2  
24,0

Longitud de proteína prevista (aa)

SARS-CoV

306  
932  
601  
1255  
76  
221  
422

Rango CoV

302-307  
923-940  
S06-600  
1173-1452  
76-108  
225-262  
377 454

## Ejemplo 2

cuerpos, antisuero policlonal o fluidos ascíticos derivados de

Detección de SARS-CoV en un sujeto

Este ejemplo demuestra la detección de SARS-CoV en muestras de pacientes que usan cebadores específicos de SARS-CoV.

Los cebadores específicos del SARS Cor-p-F2 (SEQ ID NO: 13), Cor-p-F3 (SEQ ID NO: 14) y Cor-p-R1 (SEQ ID NO: 15) se utilizaron para analizar muestras de pacientes con SRAS.

Una cartilla

para cada conjunto se etiquetó en el extremo 5 'con 6-FAM para facilitar Análisis GeneScan. Las reacciones de amplificación en un solo paso fueron

realizado con el sistema Access RT-PCR (Promega, Madison, Wisconsin) según lo descrito por Falsey et al., J. Infect. Dis.

55

60 60

sesenta y cinco

especies animales con reactividades a varios coronavi conocidos

artimañas, y con una muestra de suero de fase convaleciente de

Un paciente con SARS.  
Las diluciones óptimas de los anticuerpos primarios fueron desalentadoras  
minado por experimentos de titulación con coronavirus infectado  
células de pacientes con SARS y con células no infectadas o, cuando esté disponible, con concentraciones recomendadas por el  
fabricantes. Después de la aplicación secuencial del  
apropiado  
comió anticuerpo de enlace biotinilado, avidina-fosfatasa alcalina  
complejo, y sustrato rojo naftol-rápido, las secciones fueron  
contratintado en hematoxilina de Mayer y montado con  
medio de montaje acuoso. El siguiente anticuerpo y  
Se utilizaron controles de tejido: muestras de suero de nonin

US 7.220.852 B1

35

animales infectados, diversos cultivos celulares infectados con coronavirus

y tejidos animales, cultivos celulares no infectados y normales tejidos humanos y animales. Los tejidos de los pacientes también fueron

probado por ensayos inmunohistoquímicos para varios otros patógenos pulmonares virales y bacterianos. Además, un BAL 5

la muestra estaba disponible de un paciente para sección delgada

evaluación microscópica electrónica.

Los tejidos pulmonares se obtuvieron de la autopsia de tres pacientes y mediante biopsia pulmonar abierta de un paciente, 14-19 días

después de la aparición de los síntomas del SARS. Laboratorio confirmatorio

La evidencia tory de infección con coronavirus estaba disponible para

dos pacientes (pacientes 6 y 17) e incluyeron PCR amplificación de ácidos nucleicos de coronavirus de tejidos, virales aislamiento del fluido BAL o detección de anticuerpos séricos

reactivo con coronavirus (Tabla 1). Para dos pacientes, no las muestras estaban disponibles para molecular, cultivo celular o sero

análisis lógico sin embargo, ambos pacientes cumplieron con los CDC defi

nitio para casos probables de SARS y tuvo una fuerte epidemia  
enlaces lógicos con casos de SARS confirmados por laboratorio.  
Evaluación histopatológica de los tejidos pulmonares de los cuatro.  
los pacientes mostraron daño alveolar difuso en varios niveles de  
progresión y severidad. Los cambios incluyeron membrana hialina  
formación de brana, inflamatoria mononuclear intersticial  
infiltrados y descamación de neumocitos en alveolar espacios (figura 5A). Otros hallazgos identificados en algunos pacientes  
incluida hemorragia intraalveolar focal, inflamación necrótica  
Escombros tory en pequeñas vías respiratorias y neumonía organizada.  
Se identificaron células sincitiales multinucleadas en el interior  
Veo espacios de dos pacientes que fallecieron 14 y 17 días,  
respectivamente, después del inicio de la enfermedad. Estas celdas contenían  
abundante citoplasma vacuolado con hendido y cono núcleos laminados. No obvio intranuclear o intracitoplasmático  
se identificaron inclusiones virales (figura 5B) y electrón  
examen microscópico de un número limitado de estas células sincitiales no revelaron partículas de coronavirus. No defini  
Se identificó inmunotinción tiva en tejidos de SARS pacientes con el uso de una batería de inmunohistoquímicos tinciones reactivas con coronavirus de los grupos antigénicos I,  
II y III. Además, no se tiñó el tejido del paciente identificado con el uso de manchas inmunohistoquímicas para virus de influenza A y B, adenovirus, Hendra y Nipah virus, metapneumovirus humano, sincitial respiratorio virus, virus del sarampión, Mycoplasma pneumoniae y Chlamydia pneumoniae.  
Evaluación de células Vero E6 infectadas con coronavirus aislado de un paciente con SARS reveló CPE viral que incluidas células sincitiales multinucleadas ocasionales pero no  
inclusiones virales obvias (figura 5C). Inmunohistoquímico ensayos con varios anticuerpos reactivos con coronavirus del grupo antigénico I, incluidos HCoV-229E, FIPV y TGEV, y con una muestra de suero inmune de un paciente

con SARS, demostró fuerte citoplasma y membrana tinción nous de células infectadas (figura 5C y tabla 3): Sin embargo, la reactividad cruzada con el mismo humano inmune No se observó muestra de suero y antígeno FIPV. No la tinción se identificó con cualquiera de varios monoclonales o anticuerpos policlonales reactivos con coronavirus en anti grupo genico II (HCoV-OC43, BCoV y MHV) o grupo III (TCoV y IBV-Avian). Examen microscópico electrónico La porción de un fluido BAL de un paciente reveló muchos coro células infectadas con navirus (Figuras 6A-B).

10  
15  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60 60  
sesenta y cinco

### 36

TABLA 3

Reactividades inmunohistoquímicas de varios grupos policlonales I anti muestras de antisuero de referencia de coronavirus con un coronavirus aislado de un paciente con SARS y con coronavirus antigénicos seleccionados del grupo I. Reactividad inmunohistoquímica de antisuero con células de cultivo infectadas con coronavirus

HCoV-229E  
SARS-CoV (ratón 3T3-  
FIPV-1  
Antisuero  
(Vero E6)  
HAPN)  
(BHK-fAPN)  
Convaleciente-  
-  
-  
fase SARS  
(paciente 3)  
Conejillo de indias anti  
-  
-  
HCoV-229E  
Conejo anti  
-  
-  
-  
HCoV-229E  
Anti felino  
-  
-  
-  
FIPV-1  
Anti porcino  
-  
-  
TGEV

### Ejemplo 4

Análisis serológico de SARS-CoV

Este ejemplo ilustra métodos representativos de per formando análisis serológicos de SARS-CoV.

Se prepararon los portaobjetos aplicando 15 ul del Suspensión de gamma-irradiado mixto infectado y no en células infectadas en portaobjetos recubiertos de teflón de 12 pocillos. Las diapositivas fueron

dejar secar al aire antes de fijarlo en acetona. Las diapositivas fueron luego se almacena a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta que se usa para las pruebas de IFA (Wulff y Lange, Bull. OMS 52: 429-36, 1975). Un antígeno ELISA se preparó mediante extracción con detergente y posterior gamma irradiación de células Vero E6 infectadas (Ksiazek et al., J. Infect. Dis. 179 (supl. 1): S191-8, 1999). La dilución óptima (1: 1000) para el uso de este antígeno fue determinado por titulación de tablero de ajedrez contra suero de paciente con SARS del fase convaleciente; un antígeno de control, preparado de manera similar de células Vero E6 no infectadas, se usó para controlar reactividad específica de sueros probados. Los conjugados utilizados fueron IgG, IgA e IgM antihumanas de cabra conjugadas con fluoresceína isotiocianato y peroxidasa de rábano picante (Kirkegaard y Perry, Gaithersburg, Maryland), para el examen IFA y ELISA, respectivamente. Especificidad y reactividad cruzada de una variedad de Se evaluaron muestras de suero del virus recientemente identificado mediante el uso de las pruebas descritas en este documento. Para esta evaluación, suero de pacientes con SARS en Singapur, Bangkok y Hong Kong, junto con suero de donantes de sangre sanos. del banco de suero CDC y de personas infectadas con coronavirus humano conocido (coronavirus humano OC43 y 229E) (muestras proporcionadas por E. Walsh y A. Falsey, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, Nueva York). Manche los portaobjetos con células infectadas que reaccionaron con suero de pacientes con SARS probable en la fase de convalecencia (Figura 1B). Detección de un panel de suero de pacientes con Sospecha de SARS de Hong Kong, Bangkok, Singapur como así como los Estados Unidos mostraron un alto nivel de especificidad reacción con células infectadas y conversión de negativo a la reactividad positiva o el diagnóstico aumentan en la prueba IFA por un factor de cuatro. Del mismo modo, las pruebas de estas mismas muestras de suero

con el antígeno ELISA mostró alta señal específica en el muestras de fase convaleciente y conversión de negativo a reactividad positiva de anticuerpos o incrementos diagnósticos en el título (Tabla 4).

US 7.220.852 B1

37

CUADRO 4

Resultados de las pruebas serológicas con ensayo IFA y ELISA en SARS  
pacientes probados contra el coronavirus humano recientemente aislado.

Fuente

Suero No. Días después del inicio Título ELISA \* Título IFA \*

Hong Kong

1)

4 4

Y 1 00

Y 25

Hong Kong

1,2

3

26400

1600

Hong Kong

2)

1

400

100

Hong Kong

2.2 2.2

6 6

1600

200

Hong Kong

3)

7 7

Y 1 00

Y 25

Hong Kong

3.2

7 7

26400

800

Hong Kong

4)

8

Y 1 00

Y 25

Hong Kong

4.2 4.2

3

1600

50

Hong Kong

5)

0

100

Y 25

Hong Kong

5.2

7 7

26400

1600

Hong Kong

6)

2

1600

200

Hong Kong

6.2

20

26400

6400  
Hong Kong  
7)  
7 7  
400  
50  
Hong Kong  
7.2  
24  
26400  
3200  
Hong Kong  
8)  
3  
Y 1 00  
Y 25  
Hong Kong  
8.2  
5 5  
26400  
200  
Hong Kong  
9)  
5 5  
Y 1 00  
Y 25  
(Hanoi)  
Hong Kong  
9.2  
1  
26400  
1600  
Bangkok  
1)  
2  
Y 1 00  
Y 25  
Bangkok  
1,2  
4 4  
Y 1 00  
Y 25  
Bangkok  
1.3  
7 7  
Y 1 00  
Y 25  
Bangkok  
1.4  
5 5  
1600  
200  
Estados Unidos  
1)  
2  
Y 1 00  
Y 25  
Estados Unidos  
1,2  
6 6  
400  
50  
Estados Unidos  
1.3  
3  
26400  
800  
Singapur  
1)  
2  
00  
Y 25  
Singapur  
1,2  
1  
26400  
800  
Singapur  
2)  
6 6  
00  
Y 25  
Singapur

2.2 2.2  
25  
26400  
400  
Singapur  
3)  
6 6  
00  
Y 25  
Singapur  
3.2  
4 4  
26400  
400  
Singapur  
4)  
5 5  
00  
Y 25  
Singapur  
4.2 4.2  
6 6  
1600  
400

\* Recíproco de dilución

Información del número limitado de muestras analizadas.  
Sugiere que el anticuerpo es primero detectable por el ensayo IFA y

ELISA entre una y dos semanas después del inicio de síntomas en el paciente. Pruebas IFA y ELISA de un panel de 384 muestras de suero seleccionadas al azar (de sangre de EE. UU.

donantes) fueron negativos para anticuerpos contra el nuevo coronavirus,

con la excepción de un espécimen que tenía un mínimo reactividad en ELISA. Un panel de suero humano emparejado muestras con incrementos diagnósticos (por un factor de cuatro o

más) en anticuerpos (con títulos muy altos para los homólogos antígeno viral en el suero de fase convaleciente) a los dos coronavirus humanos conocidos, OC43 (13 pares) y 229E (14 pares), no mostraron reactividad en agudos o convalecientes fase de suero con el coronavirus recién aislado por cualquiera

la prueba IFA o el ELISA.

Ejemplo 5

Poli (A) "ARN. Aislamiento y Northern Hibridación

Este ejemplo ilustra un método representativo de Northern hibridación para detectar mensajes SARS-CoV en Vero Células E6.

El ARN total de las células Vero E6 infectadas o no infectadas fue aislado con reactivo Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California) según los fabricantes recomendaciones. Se aisló poli (A) ARN del ARN total mediante el uso del kit Oligotex Direct mRNA (Qiagen, Inc., Santa

Clarita, California), siguiendo las instrucciones para el lote

protocolo, seguido de precipitación con etanol. ARN aislado de 1 cm de células se separó por electroforesis en un

5 5  
10  
15  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60 60  
sesenta y cinco

38

0,9% en gel de agarosa que contiene 3,7% de formaldehído, seguido por hidrólisis alcalina parcial (Ausubel et al. eds. Current Protocolos en biología molecular, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY, cap. 4.9, 1996). ARN fue transferido a un membrana de nylon (Roche Molecular Biochemicals, India Napolis, Ind.) por transferencia de vacío (Bio-Rad, Hercules, Calif.) Y fijado por reticulación UV. La plantilla de ADN para la síntesis de la sonda se generó por amplificación por RT-PCR de SARS-CoV nt 29.083 a 29.608 (SEQ ID NO: 1), utilizando un cebador inverso que contiene un promotor de ARN polimerasa T7 para facilitar la generación de una ribosonda de sentido negativo. En transcripción in vitro de la ribosonda marcada con digoxigenina, hibridación y detección de las bandas se llevaron a cabo con el sistema digoxigenina mediante el uso de rec del fabricante procedimientos recomendados (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, Ind.). Las señales fueron visualizadas por chemiluminescencia y detectado con película de rayos X.

Ejemplo 6

Organización del genoma del SARS-CoV

Este ejemplo ilustra la organización genómica de la Genoma del SARS-CoV, incluida la ubicación del SARS-CoV

ORFS

El genoma del SARS-CoV es un polietileno de 29.727 nucleótidos.

ARN adenilado, y el 41% de los residuos son G o C (rango para secuencias de genoma completo de coronavirus publicadas, 37%

al 42%). La organización genómica es típica de coronavi. trucos, que tienen el gen característico orden 5'-replicasa

(rep), espiga (S), envoltura (E), membrana (M),  
nucleocápside

(N) -3 "y regiones cortas no traducidas en ambos extremos  
(FIG.

7A, Tabla 5). El gen rep SARS-CoV, que comprende  
aproximadamente dos tercios del genoma, codifica dos  
poliproteínas (codificadas por ORF1a y ORF1b) que sufren  
procesamiento proteolítico co-traducciona. Hay cuatro ORF  
aguas abajo de rep que codifican las proteínas estructurales,  
S, E,

M y N, que son comunes a todos los coronavirus conocidos.

El gen hemaglutinina-esterasa, que está presente entre  
ORF1b y S en el grupo 2 y algunos coronavirus del grupo 3  
(Lai y Holmes, en Fields Virology, eds. Knipe and How  
ley, Lippincott Williams and Wilkins, Nueva York,  
4 "edición,

2001, cap. 35), no se encontró en SARS-CoV.

Los coronavirus también codifican una serie de no estructurales  
proteínas que se encuentran entre S y E, entre M y  
N, o aguas abajo de N. Estas proteínas no estructurales, que  
varían ampliamente entre las diferentes especies de  
coronavirus, son de

función desconocida y son prescindibles para la replicación  
de virus

(Lai y Holmes, en Fields Virology, eds. Knipe and How  
ley, Lippincott Williams and Wilkins, Nueva York,  
4 "edición,

2001, cap. 35) El genoma del SARS-CoV contiene ORF  
para cinco proteínas no estructurales de más de 50 amino  
ácidos (figura 7B, tabla 5). Dos codificaciones ORF  
superpuestas

proteínas de 274 y 154 aminoácidos (denominados X1 (SEQ ID  
NO: 5) y X2 (SEQ ID NO: 6), respectivamente) se encuentran  
entre S (SEQ ID NO: 4) y E (SEQ ID NO: 7). Tres  
genes no estructurales adicionales, X3 (SEQ ID NO: 9), X4  
(SEQ ID NO: 10) y X5 (SEQ ID NO: 11) (codificación  
proteínas de 63, 122 y 84 aminoácidos, respectivamente), son  
ubicado entre M (SEQ ID NO: 8) y N (SEQ ID NO:

12) Además de los cinco ORF que codifican el no estructural  
proteínas descritas anteriormente, también hay dos ORF más  
pequeños

entre M y N, que codifican proteínas de menos de 50 amino  
ácidos Búsquedas en la base de datos GenBank (BLAST y  
FastA) indicó que no hay una secuencia significativa simi  
laridad entre estas proteínas no estructurales de SARS-CoV  
y cualquier otra proteína.

---

US 7.220.852 B1

39

Los productos del gen rep del coronavirus se traducen de ARN genómico, pero las proteínas virales restantes son trans procedente de ARNm subgenómicos que forman un 3'-coterminar conjunto anidado, cada uno con un extremo 5' derivado del genómico

Secuencia 5'-líder. Los ARNm subgenómicos de coronavirus se sintetizan a través de una transcripción discontinua process, cuyo mecanismo no ha sido inequívocamente establecido (Lai y Holmes, en Fields Virology, eds. Knipe y Howley, Lippincott Williams y Wilkins, Nueva York, 4a edición, 2001, cap. 35; Sawicki y Sawicki, Adv. Exp. Medicina. Biol. 440: 215-19, 1998). El líder del SARS-CoV la secuencia se mapeó comparando la secuencia de Productos 5'-RACE sintetizados a partir del ARNm del gen N con

los sintetizados a partir de ARN genómico. Una secuencia, AAAC

GAAC (nucleótidos 65-72 de SEQID NO: 1), se identificó inmediatamente aguas arriba del sitio donde está el ARNm del gen N

y las secuencias genómicas divergieron. Esta secuencia también fue

presente aguas arriba de ORF1a e inmediatamente aguas arriba de

otros cinco ORF (Tabla 5), lo que sugiere que funciona como el

núcleo conservado de la secuencia reguladora transcripcional (TRS)

Además del sitio en el extremo 5' del genoma, el

La secuencia central conservada de TRS aparece seis veces en el

resto del genoma. Las posiciones del TRS en el

genoma de SARS-CoV predicen que los ARNm subgenómicos de 8.3, 4.5, 3.4, 2.5, 2.0 y 1.7 kb, sin incluir el poli (A)

se debe producir cola (Figuras 7A-B, Tabla 5). Al menos cinco

Los ARNm subgenómicos fueron detectados por la hibridación del norte

ción de ARN de células infectadas con SARS-CoV, utilizando una sonda

derivado de la región 3' no traducida (figura 7C). los

los tamaños calculados de las cinco bandas predominantes corresponden a

los tamaños de cinco de los ARNm subgenómicos predichos de

SARS-CoV; la posibilidad de que otros, de baja abundancia Los ARNm presentes no pueden excluirse. Por analogía con otros coronavirus (Lai y Holmes, en Fields Virology, eds. Knipe y Howley, Lippincott Williams y Wilkins, Nueva York, edición de 4 ", 2001, Capítulo 35), los 8.3-kb y 1.7-kb

Los mRNAs subgenómicos son monocistrónicos, dirigiendo transla ción de S y N, respectivamente, mientras que múltiples proteínas son traducido de 4.5 kb (X1, X2 y E), 3.4 kb (M y X3) y ARNm de 2,5 kb (X4 y X5). Un consenso TRS es no encontrado directamente aguas arriba del ORF que codifica el

proteína E predicha, y un ARNm monocistrónico que predecirse que codifique para E no podría identificarse claramente por

Análisis de transferencia de Northern. Es posible que la banda de 3.6 kb

contiene más de una especie de ARNm o que el monocis El ARNm tronic para E es un mensaje de baja abundancia.

#### CUADRO 5

Ubicaciones de los ORF del SARS-CoV y tamaños de proteínas y ARNm

Ubicación del genoma

Tamaño predicho

ORF

TRS a ORF ARN de inicio Proteína final (aa) ARNm (nt)

1a.

72

26S

13,398

4,378 29,727

1b

13,398

21,482

2,695

S

21,491

21492

25,256

1,255

8,308 °

X1

25,265

25,268

26,089

274

4,534

X2

25,689

26,150

154

mi

26,117

26,344

76

METRO

26,353

26,398

27,060

221

3,446

X3  
27,074  
27,262  
63  
X4  
27,272  
27,273  
27,638  
122  
2,527e  
10  
15  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60 60  
sesenta y cinco

## 40

### TABLA 5-continuación

Ubicaciones de los ORF del SARS-CoV y tamaños de proteínas y ARNm

Ubicación del genoma

Tamaño predicho

ORF

TRS a ORF ARN de inicio Proteína final (aa) ARNm (nt)

X5

27,778

27,864

28,115

84

2,021d

norte

28,111

28,120

29,385

422

1,688

La ubicación es el nucleótido más 3 'en el consenso TRS, AAAC

GAAC.

No incluye poli (A). El tamaño predicho se basa en la posición de la estafa

Servido TRS.

ARNm correspondiente detectado por análisis de transferencia Northern (Figura 7C)

Ningún ARNm correspondiente a la utilización de este consenso TRS fue detectado por análisis de transferencia Northern (FIG. 7C)

### Ejemplo 7

Ensayo de RT-PCR en tiempo real para SARS-CoV

Detección

Este ejemplo demuestra el uso de SARS-CoV-spe

cebadores y sondas específicos en un ensayo de RT-PCR en tiempo real para

detectar SARS-CoV en muestras de pacientes.

Una variante del formato en tiempo real, basada en la sonda TaqMan

tecnología de hidrólisis (Applied Biosystems, Foster City, California), se utilizó para analizar un total de 340 muestras clínicas

recogido de 246 personas con confirmado o sospechoso

Infección por SARS-CoV. Las muestras incluyeron oro y

Hisopos nasofaríngeos (secos y en medios de transporte viral),

Sputa, aspirados y lavados nasales, BAL y tejido pulmonar

especímenes recogidos en la autopsia.

Extracción de ácido nucleico

Los ácidos nucleicos del SARS-CoV se recuperaron de la clínica muestras que utilizan el sistema de extracción automatizado NucliSens

(bioMérieux, Durham, Carolina del Norte). Siguiendo fabricantes

instrucciones, muestras recibidas en el tampón de lisis NucliSens

fueron incubadas a 37 ° C durante 30 min con intermitente

mezcla y 50 µl de suspensión de sílice, proporcionada en el kit de extracción, se agregó y se mezcló. Los contenidos de la el tubo se transfirió luego a una extracción de ácido nucleico cartucho y procesado en una estación de trabajo extractora. Aproximadamente 40-50 uL de eluato de ácido nucleico total fue

recuperado en viales libres de nucleasas y probado en el momento diario o almacenado a -70 ° C.

Primers y sondas

Se diseñaron múltiples conjuntos de cebadores y sondas a partir de

SARS-CoV polimerasa 1b (ácido nucleico 13,398 a 21,482 de SEQID NO: 1) y el gen de la nucleocápside (ácido nucleico 28,120

a 29,385 de SEQ ID NO: 1) secuencias usando Primer

Versión de software Express 1.5 o 2.0.0 (Applied Biosystems, Foster City, California) con la siguiente configuración predeterminada:

temperatura de fusión del cebador (T) establecida a 60 ° C; sonda T. Set

a 10 ° C mayor que los cebadores a aproximadamente 70 ° C;

y no se permiten residuos de guanidina en los extremos de la sonda 5 '.

Todos los cebadores y sondas fueron sintetizados por fos estándar

técnicas de química de phoramidita. Las sondas TaqMan fueron etiquetado en el extremo 5 'con el reportero 6-FAM y en el 3'-final con el quencher Blackhole Quencher 1 (Biosearch Technologies, Inc., Novato, California). Imprimación óptima y las concentraciones de la sonda se determinaron mediante titulación cruzada de

diluciones dobles en serie de cada cebador contra una constante

cantidad de ARN de SARS-CoV purificado. Primer y sonda concentraciones que dieron la mayor eficiencia de amplificación

Se seleccionaron las muestras para su posterior estudio (Tabla 6).

US 7.220.852 B1

41

CUADRO 6

42

Cebadores y sondas utilizados para ensayos de RT-PCR en tiempo real "

Genómica

ID del ensayo Primer / secuencia de sonda

Región

Ensayo de diagnóstico primario

SARS1

CATGTGTGGCGGCTCACTATAT (SEQ ID NO: 16)

ARN POI

R

GACACTATTAGCATAAGCAGTTGTAGCA (SEQ ID NO: 17)

C

TTAAACCAGGTGGAACATCATCCGGTG (SEQ ID NO: 18)

SARS2

GGAGCCTTGAATACACCCAAAG (SEQ ID NO: 19)

Nucleocapsida

R

GCACGGTGGCAGCATTG (SEQ ID NO: 20)

C

CCACATTGGCACCCGCAATCC (SEQ ID NO: 21)

SARS3

CAAACATTGGCCGCAAATT (SEQ ID NO: 22)

Nucleocapsida

R

CAATGCGTGACATTCCAAAGA (SEQ ID NO. 23)

Para confirmar resultados positivos

N3

CCGAAGAGCTACCCGACG (SEQ ID NO: 26)

GAAGTACCATCTGGGGCTGAG (SEQ ID NO: 25)

CACAATTTGCTCCAAGTGCCTCTGCA (SEQ ID NO: 24)

Nucleocapsida

CTCTTTCATTTTGCCGTCACCACCAC (SEQ ID NO: 27)

AGCTCTCCCTAGCATTATTCCTG (SEQ ID NO: 28)

CACCACATTTTCATCGAGGC (SEQ ID NO: 29)

TACCCTCGATCGTACTCCGCGT (SEQ ID NO: 30)

TGTAGGCACTGATTTCAGGTTTTG (SEQ ID NO: 31)

CGGCGTGGTCTGTATTTAATTTA (SEQ ID NO: 32)

CTGCATACAACCGCTACCGTATTGGAA (SEQ ID NO: 33)

Proteína M

RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa: F, cebador directo; R, cebador inverso: sonda P. NTR región no traducida.

Ensayo de RT-PCR en tiempo real

El ensayo de RT-PCR en tiempo real se realizó utilizando el Mezcla maestra RT-PCR de un paso en tiempo real (Biosys aplicada

Tems, Foster City, California). Cada mezcla de reacción de 25 uL

contenía 12.5 LL de 2x Master Mix, 0.625 uL de 40x

Mezcla de inhibidores MultiScribe y RNase, 0.25 uL de 10 uM

sonda, 0.25 uL cada uno de 50 uM cebadores directo e inverso,

6.125 uL de agua libre de nucleasas y 5 uL de ácido nucleico extraer. La amplificación se realizó en placas de 96 pocillos en un Sistema de detección en tiempo real iCycler i0 (Bio-Rad, Hercules, California) Las condiciones de termociclado consistieron en 30 minutos a 48 ° C para transcripción inversa, 10 minutos a 95 ° C para activación de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold, y 45 ciclos de 15 segundos a 95 ° C y 1 minuto a 60 ° C. Cada uno ejecutar incluido un control de plantilla genómica SARS-CoV y al menos dos controles sin plantilla para la extracción (para verificar para contaminación durante el procesamiento de la muestra) y uno no control de plantilla para el paso de amplificación por PCR. Como un control para inhibidores de PCR y para controlar la extracción de ácido nucleico eficiencia, cada muestra fue probada por RT-PCR en tiempo real para

La presencia del gen P de la ribonucleasa humana (RNasa) (N° de acceso de GenBank NM 006413) utilizando el siguiente

```
LISTADO DE SECUENCIAS
<160> NÚMERO DE SEQ ID NOS: 38
<210> SEQ ID NO 1
& 2 11s LONGITUD 29 727
& 212> TIPO DE ADN
<213> ORGANISMO: Coronavirus
& 220> CARACTERÍSTICA
<221> NOMBRE / CLAVE: característica variada
<222> UBICACIÓN: (265). . (13398)
& 223> OTRA INFORMACIÓN ORF 1a
& 220> CARACTERÍSTICA
<221> NOMBRE / CLAVE: característica variada
<222> UBICACIÓN: (13398) ... (21482)
30
35
40
45
```

cebadores y sonda de bajada: cebador directo 5'-AGATTTG GACCTGCGAGCG-3 '(SEQ ID NO: 36): cebador inverso 5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3 '(SEQ ID NO: 37): sonda 5'-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-3 (SEQID NO: 38). La reacción de ensayo se realizó idénticamente a lo descrito anteriormente, excepto que las concentraciones de cebador utilizadas

fueron 30 uM cada uno. Se tomaron mediciones de fluorescencia.

y el valor del ciclo umbral (C) para cada muestra fue calculado determinando el punto en el que la fluorescencia excedió un límite establecido en la media más 10 estándar desviaciones por encima de la línea de base. Se consideró un resultado de prueba positivo si dos o más de los objetivos genómicos del SARS mostraron

resultados positivos (ciclos CS45) y todos positivos y negativos  
Las reacciones de control dieron los valores esperados.  
Si bien esta divulgación se ha descrito con énfasis sobre las realizaciones preferidas, será obvio para aquellos de habilidad ordinaria en el arte que variaciones y equivalentes de se pueden usar las realizaciones preferidas y se pretende que la divulgación se puede practicar de otra manera que no sea específicamente descrito aquí. En consecuencia, esta divulgación incluye todas las modificaciones incluidas en el espíritu y alcance de la divulgación tal como se define en las reivindicaciones a continuación.

---

**Página 30**

---

**Page 31**

---

**Página 32**

citgcatgttg  
tatgaaaatt  
ggtgctaaac  
attgcagtica  
aa.gc.ctagag  
gaggagaat  
gatgaggitta  
gctgat atca  
totttccttg  
acttggtgttg  
ttgaagaaag  
tatacacttg  
ccttcagaag  
gaaatgcttg  
gccataatgg  
gacitat ggtg  
aagctgaact  
tittaatcttg  
gtatcatcac  
totgaggagc  
a aggacago  
cacactctgg  
cittaaag agtc  
alacactaatc.  
ccaa.catact  
aag actittct  
catacticttg  
tggaaattitc  
ttgtctagtg  
caag aggott  
gottacagta  
citacagoatg  
gg a agaaaa  
tatgataatc  
tatctagtac  
ttacagdaag  
tacact cata  
atgtcagagt  
accatcaa.gc  
ttggatgggt

ttggacctaa  
tdaatticaca  
cactitcagtc  
atgacaaaag.c  
tggaag cacc  
citgtcgtaca  
ccacaiacact  
atggtaagct  
agalaggatgc  
taatacccttc  
tgc.cagttga  
aggaagctaa  
cacctaagtc  
citcatgctga  
calaccatc.ca  
tdcgtattott  
citctaaatga  
alagaggctgc  
cagatgctgt  
actittgtaga  
gtacagagtt  
agagcc.ccg.  
tattatcc ct  
a cacacaca  
tggatgggtc  
ttgtactacc  
atgagagttt  
citcaagttgg  
ttittattago  
attatagagc  
ataaaactgt  
citaatttga  
citactacctt  
ttalagacagg  
aacaag agtc  
gtacattctt  
taactogctaa  
acaaag gacc  
citgtgtcgtga  
Attataaaaa.

47

cctaaatgca  
gga catctta  
ttacaagtg  
totttatgag  
taaacaagag  
gaa.gc.ctgtc  
ggaagaaact  
ttaccatgat  
accittacatg  
caaaaaggct  
tgagtatata  
Gactgctott  
taaggaagag  
agaga Caaga  
acgtaagtat  
cittittatact  
gcc.gcttgtc  
gc gct gtatg  
tactacatat  
aac agitttct  
agtggttgaa  
cgagtttcat  
gCgggaggitt  
gcttgtggat  
tgatgttaca  
tagtgatgac  
tottggtagg  
tggitttaact  
actitcaiacag  
cc.gtgtggit  
tgg.cgagctt  
atctgcaaag  
aacgggtgta  
tgtttccatt  
ttcttttgtt  
atgtgcgaat  
ggaga.cccitc

agtgactgat  
taaactcgat  
ggataatgct  
ggtgaggaca  
cittgcaccat  
tgcgtgcaga  
caggttgctca  
mordaza coaccala  
gatgtgaagc  
aagtttctta  
totcagaa.ca  
gtaggtgatg  
ggtgg cacta  
accacgtacc  
aagaaatgca  
attctaggaa  
aaattaatgc  
aaaggaatta  
agtaaagagc  
acaatgccala  
cgttctotta  
aatggatacc  
ttggctggct  
tittcttaa.gc  
cittgacggtg  
aagacitataa  
atgtctatoga  
aaaattaaac  
acactacgta  
tacatgtctg  
tdaattalaat  
cittgaagttca  
gatgctgcta  
ggtgatgtca  
cgagttctta  
gaagctgtga  
ccatgtgttgt  
atgatgtctg  
gagtacactg  
tattcg tattg  
gttittctaca  
ggagttacitt  
tactatacag

US 7.220.852 B1

-continuado  
cagottct talagg cago a  
tgttgtcago agg catattt  
cggttcgtac acaggttitat  
tggattatct tata acctg  
acacagaaga titccaaaact  
caaaaattaa gqctgcatt  
ccaataagtt acticttgttt  
tgcttagagg toaagatag  
ttatcactag togtgat atc  
citgagatgct citcaagagct  
citggacaagg atgtgctggit  
aatctgcatt titatgtacta  
citgitatcct g gaatttgaga  
citatatgcat ggatgtaga  
aaattcaaga ggg catcgtt  
citgtagctitc tattattacg  
ttggittatgt gacacatggit  
aagcticcitgc cqtagtgtca  
toactitcgtc atcaaa aca  
cittacagaga ttggtctat  
gtggtgacaa aattggtgtac  
aggttctitt.c acttgacaaa  
aagtgttcac aactgtggac  
catatggaca gcagtttggit  
citcatgtaa toatgagggit  
gtgaagctitt cqagtactac  
citttaalacca cacaaagaaa  
gggctgataa caattgttat  
aattcaatgc accago actt  
actittgttgc acticatactic  
gagaalactat gacccatctt

atgtggtg tg taalacattgt  
tgtatatggg tactictatot  
gtggtoztoga tigctacacala  
caccaccitgc tigagtataaa  
gtaactato a gtgtggtoat  
acggagcto a ccttacaag  
aggaalacatc ttacactaca  
acacagagat tdalacaaaa  
agcagocctat agaccittgta  
3600  
3660  
372 o  
378 o.  
384 o  
39 00  
396 o  
4020  
408 o  
414 o  
4200  
4260  
4320  
4.380  
4 440  
4500  
45 60  
4680  
474. o  
4800  
4860  
4920  
4.980  
5040  
5 160  
5220  
528 o  
5340  
5 400  
546 o  
5520  
558 o  
5640  
5700  
576 o.  
5820  
588 o  
594 o

48

---

**Page 33**

---

**34**

---

**Página 35**

---

**Page 36**

---

**Page 37**

---

**38**

---

**Página 39**

agcc.ca.gatc  
gatataagct  
aacttggcgg  
aatttagagga  
aaac aggttc  
agataataaa  
atgctgaat  
aactacaa.gc

aaagaatgct  
aaggaataat  
citttagctgt  
ttgcaccagg  
cagatcttaa  
tacatacggc  
atgtgacaaa  
agcaaaaact  
citg acctitta  
atgcatcatc  
aaattgatgg  
agttgttctitc  
citgitaatgtc  
gtaggctitat  
actaaacgaa  
accggtgcac  
tgaggggggt  
atattttct  
gcaa.ccct gt  
ttgtc.cgtgg  
ttaacaattic  
totttgctgt  
ttaattgcac  
gtaattittaa  
ataagggcta  
alaccitattitt  
cottiacc  
taaag.ccaac  
attggtctda  
aaggaattta  
citaatattac  
acaatggaa  
c gagggctat  
Tottcattta  
titttatcc ct  
atcaaaatgt  
gtoacaagat  
ttcattcatg  
aagtcaag.cg  
Tottgaaaag  
gatgaatgtc  
accostacaac  
tacagotgtg  
tgactitcgto  
taataaatgg  
agagaatgac  
agcc.ctgggit  
caagct tatg  
atcggag Ca  
citataccatg  
citatactico  
tottaaggag  
cattagagaa  
catggttatt  
cacttittgat  
CT TATACitatic  
catttitat  
cataccttitt  
ttgggttitt  
tactaatggt  
ttctaaa.ccc.  
tittcgagtac  
acacttacga  
toalaccitata  
taagttgcct  
tgctdaagac  
tacatttatg  
aaatccactt  
ccagacctct  
aaacttgtgt

61

actgactittc  
gcc titcgaac  
atgataggct  
atggacagoa  
gtgtgttctg  
ttgtcagtga  
citttgggtga  
tggaaccag

tgttgacctitc  
gcaaagtata  
atgagagitta  
citcagacaat  
a C gacgcag  
gaccttatta  
totaaagaag  
ggttctatag  
ggccatttct  
tttittaattg  
catgtaact  
tittgacatga  
aatcaaatca  
aacaacagag  
titotitatitat  
gatggtcaag  
gatgaaattit  
totaatgtta  
aaggatggta  
ggttctacca  
ggtatacgag  
atgggtacac  
atatotgatg  
gagtttggtg  
gatgtagttc  
cittgg tatta  
attggggca  
citcaagtatg  
gctgaactica  
aattitcaggg  
ccttittggag  
mordaza citcgc  
acatcgttta  
tagccaag.cg  
cagtgaaaaa  
tgattgatct  
tittcaaaagt  
aggatggaca  
gtggtgc gat  
aga attatogg  
citcaactgtg  
ttcactittgg  
ggttgccaac  
Attctactitt  
ttagogatat  
ggtttittcac  
citgtaaagat  
catggtggac  
gggctaacta  
acatthttctg  
gcaaattitcc  
atgatatgat  
ttggtggitttc  
titotitactict  
citcc taatta  
ttagatcaga  
cagggitttca  
tittattittgc  
tgaacaacaa  
catgtaactt  
agacacatac  
cctttitc.gct  
ttaaaaaataa.  
gtgatctacc  
acattacaaa.  
cgtcagotgc  
atgaaaatgg  
aatgctotgt  
ttgttcc citc  
aggtttittaa

US 7.220.852 B1

-continuado  
tatggatgaa  
tggagatttic  
citcacaagat  
titactitcaita  
tttacttgat

ggtoaaggitt  
tgttgaalacc  
gcc taacttg  
tgaaaatgct  
tdaatacitta  
tgctggctot  
tgg cacacta  
aattggagac  
gtatgaccot  
ttatctgttgt  
gato aacagag  
agcttttggt  
tottggcaag  
gaggalacaca  
tottaatta  
titattotott  
aagtgatatt  
cactagtggit  
cacticaa.cat  
cactictitit  
tactattaat  
tgccacagag  
gtoac agtcg  
tgaattggtgt  
tatgatatto  
tgatgttca  
agatgggttt  
ttctggittitt  
ttittagagcc  
agcctattitt  
tacaatcaca  
taagagctitt  
aggagatggt  
tgctactaaa  
ttcatacago  
agt catggac  
toaccactita  
acagatgccc  
gacitttgtc.g  
acaattgact  
ttctacceala  
tacaagatgc  
gttataccala  
aatacactita  
gatalaaggag  
cittgtc.gatt  
tgtgca.ca.g  
aggaccaaac  
ggatttataa  
tottggaatg  
acaaatgtaa  
cc.gaaggaac  
aatccitaticc  
agaggaactg  
cittgaaaaag  
cittgtaaca  
agtgaccittg  
actitcatcta  
tta acto agg  
catacgtttg  
aaatcaaatg  
gtgattatta  
gacaaccott  
gataatgcat  
gaaaagttcag  
cittctatotitt  
aac actittga  
attcttacag  
gttggctatt  
gatgctgttg  
gagattgaca  
gtgagattoc  
titcccttctg  
20220  
20280  
20340  
204 00  
20460  
20520  
20640  
20 940

21 000  
21 060  
21120  
21180  
2124 0  
21300  
21360  
21420  
21480  
21540  
21600  
21660  
21720  
21780  
21840  
21900  
21960  
22 020  
22080  
221 4 0  
22200  
22260  
22320  
22,380  
224 40  
225 00

62

totatgcatg  
acticaa.catt  
tittgcttcto  
tagcgcCagg  
tgggttgtgt  
attataaata  
atgttgccctitt  
cattaaatga  
tagtacttitc  
citg accittat  
tgtaacticc  
atttactga  
cittittggggg  
tatato aaga  
cagottgg.cg  
taggagctga  
gtgctagtta  
atactatgtc  
citactalactit  
cc.gtag attg  
etiqueta aatatgg  
atc.gcaa.cac  
aatattittgg  
ggtotttitat  
agcaatatgg  
totaatggact  
citgctotagt  
aaataactitt  
ttctotatga  
cacto aagaat  
atgctoa.gc  
gtgtgctaaa  
ggittaattac  
citgctgaaat  
gacaatcaaa  
cagoccc.gca  
a accacago  
ttgttgtttaa  
ttactacaga  
acacagtta  
ggagagaaaa  
tittittcaacc  
caatgtctat  
acaaactggit  
cittgcttgg  
taggitatctt  
citcccctgat  
titatggittitt  
ttittgaactt  
taagaaccag  
ttcttcaaag

titcc.gttctga  
tgtaagtgta  
tgtaactg.c  
catatattoct  
gcatgctcgac  
ccatacagtt  
tittaggtgct  
ttcaattago  
taatatgtac  
cittittgcaca  
acgtgaagtg  
tggittittaat  
tgaggacittg  
c gaatgccita  
tacagtgttg  
tagtgg tact  
tgctatocaa  
galaccaaaaa  
tacaacaa.ca  
Attaalacaca  
tgatatocctit  
agg cagacitt  
cagggcttct  
aag agttgac  
tgggtgtgct  
gcc agcaatt  
tgg cacttct  
caatacattt  
tgatccitctg

63

aaaattitcta  
tittaagtgct  
gcagattott  
ggtattgctg  
aatag tagga  
aga catggca  
ggcaaacctt  
tacaccaacta  
ttaaatgcac  
tgtgttcaatt  
agatttcaac  
gatcc taaaa  
Attacaccitg  
actgatgttt  
actggaaa.ca  
acttctitatg  
tottt attac  
gatagttcaa  
Attactacag  
atctg.cggag  
calactaaatc.  
titcgctdaag  
tittitcaciaa.  
cicttittaata  
ggtgatatta  
ccaccitctg.c  
gcc actogctg  
atggcatata  
caaatc.gc.ca  
tdaactgcat  
cittgttaaac  
togcg acttg  
caaag.cctitc  
gctaactctg  
tttggttgaa  
titcctacatg  
tgtcatgaag  
tggitttatta  
gtotcaggaa  
caacctgagc  
attggtgttgc  
atggc gtttc  
ttgtagt caa  
Attataatta  
acattgatgc  
agcttaggcc  
gcaccccaacc  
citggcattgg  
Cggcc acggit

ttaattittaa.  
catttcaa.ca  
catctgaaat  
gaacaaatgc  
citacagdaat  
atgitattoca  
agtgc gacat  
gtag tactag  
ttgcttactic  
aagtaatgcc  
attctactga  
gtgcacticto  
toaaacaaat  
tattacctga  
aggtgacact  
atgctagaga  
para actuar gatga  
gatggacatt  
ggttcaatgg  
accalatttala  
tgggcaa.gct  
aacttagcto  
ataaagttcga  
aaacctatot  
citgctactaa  
agggtacca  
toacg tatgt  
gcaaag cata  
Cacagaggaa  
attgttgatgt  
togacticatt

US 7.220.852 B1

-continuado

tgattacitct  
tgccactaag  
gggagatgat  
taaattgc.ca  
tactitcaact  
citttgagaga  
tgctcittaat  
citaccalacct  
ttggttgacca  
tgg acto act  
atttgcc.gt  
Attach Acatt  
ttcatctgaa  
atgcagat  
gacitcaa.gca  
toctattgga  
ccaaaaatct  
taataa.cacc  
tgtttctato  
atgtgctaatt  
agg tatgct  
gtacaaaacc  
cccitctaaag  
cgctgatgct  
totcatttgt  
tatgattgct  
tgggtctggC  
cattggagtt  
caaggcgatt  
gcaagacggt  
taattittggit  
ggcggaggt  
un CaCaAAA.  
aatgtctgag  
ccittatgtcc  
gcc atcc cag  
cittcc citcgt  
cittctittitct  
cgittattggc  
Caaagaagag  
gtgctictaca  
ttgaatgatc  
gtaagacaaa  
gatgattitca  
ggtaattata

Gacatat cita  
tgttattggc  
tacagagttg  
aaattatcca  
ggtagtggtg  
gatggttctg  
tdaccittgct  
gtagtggttc  
caacticacac  
ggctgct.tta  
gctgg cattt  
attggtggctt  
attgctatac  
gctaaaacct  
ttgcttctoc  
gctgaac agg  
ccaactittga  
ccaactalaga  
ggctt catga  
gCg Cagaagt  
gcc tacactg  
gctgctottc  
accoaaaatg  
agtcaatético  
gttalaccaga  
gcaatttcaa  
caaattgaca  
citaatcaggg  
tgtagttcttg  
titccacaag  
gagaggaact  
galaggtgttt  
coacaataaa.  
atcattaa.ca  
citggacaagt  
22560  
22 620  
22680  
2240  
22800  
22,860  
22920  
22,980  
23040  
23100  
2316 0  
23220  
23280  
2334 0  
234 00  
23460  
23520  
23580  
2364 0  
237 00  
23760  
23820  
23880  
2394 0  
24 000  
24060  
24 120  
24, 180  
2424 0  
24.300  
24360  
24 420  
24 480  
24.54. 0  
24 600  
24 660  
24,720  
24780  
24840  
249 00

64

US 7.220.852 B1

69

-continuado

citgcctatat ggaagag.ccc taatgtgita aattaattitt agtag tacta toccoatgttg 297.00

attittaatag cittcttagga gaatgac

29727

&lt;210&gt; SEQ ID NO 2

&amp; 2 11s LONGITUD 4.382

&amp; 212&gt; TIPO PRT

&lt;213&gt; ORGANISMO: Coronavirus

&lt;400 SECUENCIA: 2

Met Glu Ser Leu Val Leu Gly Val Asn Glu Lys Thr His Val Gln Leu

1

5 5

10

15

Ser Lieu Pro Wall Leu Gln Val Arg Asp Wall Leu Val Arg Gly Phe Gly

20

25

30

Asp Ser Val Glu Glu Ala Leu Ser Glu Ala Arg Glu His Lieu Lys Asn

35

40

45

Gly Thr Cys Gly Lieu Val Glu Lieu Glu Lys Gly Val Lieu Pro Gln Lieu

50

55

60 60

Glu Gln Pro Tyr Val Phe Ile Lys Arg Ser Asp Ala Lieu Ser Thr Asn

sesenta y cinco

70

75

80

Su Gly His Lys Val Val Glu Lieu Val Ala Glu Met Asp Gly Ile Gln

85

90

95

Tyr Gly Arg Ser Gly Ile Thr Leu Gly Val Leu Val Pro Su Val Gly

100

105

110

Glu Thr Pro Ile Ala Tyr Arg Asn. Muro Leu Lieu Arg Lys Asn Gly Asn

115

120

125

Lys Gly Ala Gly Gly Su Ser Tyr Gly Ile Asp Leu Lys Ser Tyr Asp

130

135

1 4 0

Leu Gly Asp Glu Lieu Gly. Thir Asp Pro Ile Glu Asp Tyr Glu Gln Asn

145

15 0

155

160

Trp Asn. Thir Lys Su Gly Ser Gly Ala Lieu Arg Glu Lieu. Thir Arg Glu

1,65

170

175

Lugar. Asn Gly Gly Ala Val Thr Arg Tyr Val Asp Asn. Asn. Phe Cys Gly

180

185

19 0

Pro Asp Gly Tyr Pro Leu Asp Cys Ile Lys Asp Phe Lieu Ala Arg Ala

195

200

205

Gly Lys Ser Met Cys Thr Lieu Ser Glu Gln Leu Asp Tyr Ile Glu Ser

210

215

220

Lys Arg Gly Val Tyr Cys Cys Arg Asp His Glu His Glu Ile Ala Trp

225

230

235

240

Phe Thr Glu Arg Ser Asp Lys Ser Tyr Glu His Gln Thr Pro Phe Glu

245

250

255  
Ile Lys Ser Ala Lys Lys Phe Asp Thr Phe Lys Gly Glu Cys Pro Lys  
260  
265  
27 0  
Phe Val Phe Pro Leu Asn Ser Lys Val Lys Val Ile Gln Pro Arg Val  
275  
280  
285  
Glu Lys Lys Lys Thr Glu Gly Phe Met Gly Arg Ile Arg Ser Val Tyr  
29 0  
295  
300  
Pro Val Ala Ser Pro Gln Glu Cys Asn Asn Met His Leu Ser Thr Leu  
305  
310  
315  
320  
Met Lys Cys Asn His Cys Asp Glu Val Ser Trp Gln Thr Cys Asp Phe  
325  
330  
335  
Leu Lys Ala Thr Cys Glu His Cys Gly Thr Glu Asn Lieu Val Ile Glu  
340  
345  
35 0

US 7.220.852 B1

71

-continuado

Gly Pro Thr Thr Cys Gly Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Val Val Lys Met  
355  
360  
365  
Pro Cys Pro Ala Cys Gln Asp Pro Glu Ile Gly Pro Glu His Ser Val  
370  
375  
380  
Ala Asp Tyr Su Asn Su Ser Asn. Ile Glu Thr Arg Lieu Arg Lys Gly  
385  
390  
395  
400  
Gly Arg Thr Arg Cys Phe Gly Gly Cys Val Phe Ala Tyr Val Gly Cys  
405  
410  
415  
Tyr Asn Lys Arg Ala Tyr Trp Val Pro Arg Ala Ser Ala Asp Ile Gly  
420  
425  
43 0  
Ser Gly His Thr Gly Ile Thr Gly Asp Asin Val Glu Thir Leu Asin Glu  
435  
4 40  
4 45  
Asp Leu Lieu Glu Ile Leu Ser Arg Glu Arg Val Asn. Ile Asn. Ile Val  
450  
455  
460  
Gly Asp Phe His Lieu. Asn. Glu Glu Val Ala Ile Ile Lieu Ala Ser Phe  
465  
470  
475  
480  
Ser Ala Ser Thr Ser Ala Phe Ile Asp Thr Ile Lys Ser Leu Asp Tyr  
485  
490  
495  
Lys Ser Phe Lys Thr Ile Val Glu Ser Cys Gly Asn Tyr Lys Val Thr  
5 00  
505  
510.  
Lys Gly Lys Pro Wall Lys Gly Ala Trp Asn. Ile Gly Gln Gln Arg Ser  
515  
520  
525  
Val Leu Thr Pro Leu Cys Gly Phe Pro Ser Gln Ala Ala Gly Val Ile  
530  
535  
540

Arg Ser Ile Phe Ala Arg Thr Lieu. Asp Ala Ala Asn His Ser Ile Pro  
545  
550  
555  
560  
Asp Leu Gln Arg Ala Ala Val Thir Ile Leu Asp Gly Ile Ser Glu Gln  
565  
570  
575  
Ser Lieu Arg Lieu Val Asp Ala Met Val Tyr Thr Ser Asp Leu Lieu. Thr  
580  
585  
59 0  
Asn Ser Val Ile Ile Met Ala Tyr Val Thr Gly Gly Leu Val Gln Gln  
595  
600  
605  
Thr Ser Gln Trp Leu Ser Asn Leu Leu Gly. Thir Thr Val Glu Lys Leu  
610  
615  
620  
Arg Pro Ile Phe Glu Trp Ile Glu Ala Lys Lieu Ser Ala Gly Val Glu  
625  
630  
635  
640  
Phe Lieu Lys Asp Ala Trp Glu Ile Leu Lys Phe Lieu. Ile Thr Gly Val  
645  
650  
655  
Phe Asp Ile Val Lys Gly Gln Ile Gln Val Ala Ser Asp Asn. Ile Lys  
660  
665  
67 0  
Asp Cys Wall Lys Cys Phe Ile Asp Val Val Asn Lys Ala Leu Glu Met  
675  
680  
685  
Cys Ile Asp Gln Val Thr Ile Ala Gly Ala Lys Lieu Arg Ser Lieu. Asn  
69 0.  
695  
7 00  
Leu Gly Glu Val Phe Ile Ala Gln Ser Lys Gly Lieu. Tyr Arg Gln Cys  
705  
710  
715  
720  
Ile Arg Gly Lys Glu Gln Leu Gln Leu Llleu Met Pro Leu Lys Ala Pro  
725  
730  
735  
Lys Glu Val Thr Phe Leu Glu Gly Asp Ser Su Asp Thr Val Leu Thr  
740  
745  
750  
Ser Glu Glu Val Val Lieu Lys Asn Gly Glu Lieu Glu Ala Leu Glu Thr  
755  
760  
765  
Pro Val Asp Ser Phe Thr Asn Gly Ala Ile Val Gly Thr Pro Val Cys

US 7.220.852 B1

73

-continuado

770  
775  
780  
Val Asn Gly Lieu Met Lieu Llleu Glu Ile Lys Asp Lys Glu Gln Tyr Cys  
785  
790  
795  
800  
Ala Leu Ser Pro Gly Lieu Llleu Ala Thr Asn. Asn Val Phe Arg Lieu Lys  
805  
810  
815  
Gly Gly Ala Pro Ile Lys Gly Val Thr Phe Gly Glu Asp Thr Val Trp  
820  
825  
830

Glu Val Glin Gly Tyr Lys Asn Val Arg Ile Thr Phe Glu Lieu. Asp Glu  
 835  
 840  
 845  
 Arg Val Asp Llys Val Lieu. Asn. Glu Lys Cys Ser Val Tyr Thr Val Glu  
 85 0  
 855  
 860  
 Ser Gly Thr Glu Val Thr Glu Phe Ala Cys Val Val Ala Glu Ala Val  
 865  
 870  
 875  
 880  
 Val Lys Thr Leu Gln Pro Val Ser Asp Leu Leu Thr Asn Met Gly Ile  
 885  
 890  
 895  
 Asp Lieu. Asp Glu Trp Ser Val Ala Thr Phe Tyr Lieu Phe Asp Asp Ala  
 9 00  
 905  
 910  
 Gly Glu Glu Asin Phe Ser Ser Arg Met Tyr Cys Ser Phe Tyr Pro Pro  
 915  
 920  
 925  
 Asp Glu Glu Glu Glu Asp Asp Ala Glu Cys Glu Glu Glu Glu Ile Asp  
 930  
 935  
 940  
 Glu Thir Cys Glu His Glu Tyr Gly Thr Glu Asp Asp Tyr Glin Gly Lieu  
 945  
 950  
 955  
 96.0  
 Pro Leu Glu Phe Gly Ala Ser Ala Glu Thr Val Arg Val Glu Glu Glu Glu  
 965  
 970  
 975  
 Glu Glu Glu Asp Trp Lieu. Asp Asp Thir Thr Glu Glin Ser Glu Ile Glu  
 980  
 985  
 99 0  
 Pro Glu Pro Glu Pro Thr Pro Glu Glu Pro Val Asin Glin Phe Thr Gly  
 995  
 10 00  
 1005  
 Tyr Lieu Lys Lieu. Thir Asp Asn. Muro Ala Ile Lys Cys Muro Asp Ile  
 0 10  
 015  
 020  
 Val Lys Glu Ala Glin Ser Ala Asn Pro Met Val Ile Val Asn Ala  
 Ala Asn. Ile His Lieu Lys His Gly Gly Gly Val Ala Gly Ala Lieu  
 Asn Lys Ala Thr Asn Gly Ala Met Gln Lys Glu Ser Asp Asp Tyr  
 Ile Lys Lieu. Asn Gly Pro Leu Thr Val Gly Gly Ser Cys Lieu Lieu  
 Ser Gly Su Asn Lieu Ala Lys Lys Cys Lieu. Su Val Val Gly Pro  
 Asn Lieu. Asn Ala Gly Glu Asp Ile Glin Lieu Llleu Lys Ala Ala Tyr  
 Glu Asn. Phe Asn. Ser Glin Asp Ile Leu Lieu Ala Pro Leu Llleu Ser  
 Ala Gly Ile Phe Gly Ala Lys Pro Leu Glin Ser Leu Glin Val Cys  
 Val Glin Thr Val Arg Thr Glin Val Tyr Ile Ala Val Asn Asp Lys  
 Ala Leu Tyr Glu Glin Val Val Met Asp Tyr Lieu. Asp Asn Lieu Lys  
 Pro Arg Val Glu Ala Pro Lys Glin Glu Glu Pro Pro Asn Thr Glu

Áspid  
 pared  
 Teu  
 Áspid  
 Gly  
 Gly  
 Ser  
 Ala  
 Reunió  
 Reunió  
 Gly  
 Phe  
 Teu  
 pared  
 Ser  
 pared  
 Glu  
 Áspid

Teu  
pared  
Thr  
Ser  
Ser  
190  
Reunió  
565  
Lys  
Pro  
Glu  
Asn  
Áspid  
pared  
pared  
Ala  
Glu  
Ala  
pared  
Ser  
Su  
Thr  
Su  
Ser  
Arg  
Phe  
Teu  
pared  
Thr  
Thr  
Thr  
Gly  
Reunió  
Ile  
Ala  
Pro  
Gly  
Ser  
Glu  
Su  
Arg  
Ile  
Thr  
Teu  
Gly  
Ala  
Gly  
Su  
Teu  
Áspid  
Glu  
Ile  
Ser  
Thr  
Gly  
pared  
Ala  
Ile  
Ala  
Ala  
Glin  
Ser  
Asn  
Phe  
Pro  
Asn  
pared  
Ser  
Áspid  
Telu  
Ser  
Asn  
Gly  
Glu  
Phe  
Telu  
Phe  
Ser  
Gly  
Áspid  
Thr  
Phe  
Telu  
Glu  
Ile  
Glu  
Glu  
Asn  
Ala  
Gly  
Glu

Gly  
Áspid  
Telu  
Thr  
Glin  
75

Lys  
195  
210  
Telu  
225  
Ser  
Thr  
Su  
Glu

Áspid  
Thr  
Glu  
pared  
Thr  
Thr  
Ala  
Ile  
Pro  
Telu  
Glu  
pared  
Telu  
pared  
Arg  
pared  
Glu  
Glu  
Telu  
Phe  
pared  
Ile  
Asn

Áspid  
Ile  
Glu  
Ile  
Glu  
Telu  
pared  
Arg  
Thr  
pared  
pared  
pared  
Glu  
Ser  
Thr  
Ser  
Thr  
pared  
pared  
Su

Gly  
pared  
Áspid  
Ser  
Áspid  
Thr  
Reunió  
Thr  
Ala  
Pro  
Ser  
Ile  
Áspid  
Ala  
Thr  
Ala  
pared  
Ser  
Teu  
Glu  
Su  
Teu  
Thr  
Pro

US 7.220.852 B1

Glin  
Glu  
Teu  
Glin  
Ala  
Teu  
Thr  
Ser

Trp  
Teu  
Glin  
Ser  
Reunió  
Ala  
Ser  
Ser  
Ala  
Teu  
Thr  
Ser  
Thr  
Glin  
Thr

-continuado

Lys  
200  
Asn  
350  
Reunió  
365  
Pro  
Thr  
Teu  
Reunió  
pared  
Arg  
Pro  
Ala  
Ala  
Teu  
Pro  
pared  
Ile  
Ile  
Pro  
Ser  
pared  
Glu  
Áspid  
pared  
Teu  
pared  
Thr  
Phe  
Teu  
Reunió  
Ile  
Ala  
Gly  
Teu  
Pro  
Arg  
Ile  
Arg  
Thr  
Gly  
Reunió  
Áspid  
Thr  
Glu  
Ser  
pared  
Áspid  
Áspid  
Áspid  
Thr  
Ala  
Arg  
pared  
Pro  
Teu  
Glin  
Asn  
Glu  
Arg  
Ala  
Ser  
Arg  
Phe  
Pro  
Teu  
Phe  
Reunió  
Gly  
76

Ala  
Thr  
Phe  
Reunió  
Gly  
Ser  
Ala  
Ala  
pared  
Glin  
Ala  
Gly  
Teu  
Ala  
Ser  
Ser  
pared  
Phe  
Áspid  
Ala  
Trp  
Áspid  
580  
Telu  
940  
Ser  
955  
Su  
pared  
Phe  
Ala  
Teu  
pared  
Ala  
Asn  
Glu  
Ala  
Su  
Reunió  
Ser  
Glin  
Gly  
Thr  
Asn  
Pro  
Asn  
Asn  
Phe  
Ile  
Thr  
pared  
Teu  
Thr  
Teu  
Teu  
Phe  
Teu  
Asn  
Ile  
Glin  
Asn  
Teu  
Thr  
Thr  
Ala  
Teu  
Thr  
Pro  
Gly  
Asn  
Telu  
Su  
Asn  
Ser  
Telu  
Glin  
Gly  
Teu  
Gly  
Reunió  
Pro  
Glu  
Telu  
Gly  
Thr  
Glu  
Pro  
Ala  
Áspid  
Glin  
Ile  
Pro  
Thr  
Su

Ile  
Ala  
Glu  
Ala  
Áspid  
Glu  
Glin  
Gly  
Ser  
Glin  
Glin  
Arg  
Pro  
Ile  
Ile  
Asn  
Phe  
Ser  
pared  
Gly  
Ala

77

Lys  
585  
Pro  
Áspid  
Áspid  
Trp  
Glin  
Ile  
Arg  
Ala  
Thr  
Telu  
Phe  
Gly  
Gly  
Áspid  
Thr  
Pro  
Pro  
Glu  
Ser  
Áspid  
Glu  
Ala  
Thr  
Su  
Áspid  
Glu  
Ala  
Glin  
Telu  
Glu  
Thr  
Ser  
Gly  
pared  
Thr  
Su  
Gly  
Áspid  
pared  
Glin  
Phe  
Áspid  
Telu  
Ile  
Telu  
pared  
Thr  
Ser  
Trp  
Áspid  
Teu  
Arg  
Ala  
Thr  
Arg  
Thr  
Arg  
Reunió  
Phe  
Ala  
pared  
Ser  
Teu  
Pro

Áspid  
Teu  
Ser  
Áspid  
Teu  
Thr

US 7.220.852 B1

Asn  
Teu  
Phe  
Asn  
Glu  
Ala  
Reunió  
pared  
Teu

Áspid  
Áspid  
Reunió  
Teu  
Thr

Su  
Phe  
Áspid  
Ile  
Asn  
Asn  
pared  
Su  
Thr

-continuado

Su  
590

Arg

605  
Teu  
620  
Phe  
635  
Asn  
650  
Thr  
740

Asn  
755  
Glu  
Ser

Gly

Pro  
Ala  
Asn  
Su  
Asn

Gly

Teu  
Thr  
Ala  
Ala  
Ile  
Thr  
Teu  
Teu

Reunió  
Phe  
Su  
Pro

Gly

Glu  
Arg  
Glin  
Phe

Gly

Teu  
pared  
pared  
Glin  
Pro  
Asn  
Thr  
Glu

Áspid  
pared

Teu  
Thr  
Phe  
Ile  
Pro

Lys

pared  
Teu  
Asn

Áspid  
Thr  
Teu  
pared  
Glu  
Thr  
Pro  
Glu  
Ala  
Reunió  
Thr  
Gly  
Pro  
Thr  
Gly  
Pro  
Ser  
pared  
Asn  
78

Thr  
Ser  
Áspid  
pared  
Glu  
Ala  
Glu  
Ile  
pared  
Ala  
pared  
Asn  
Ser  
Trp  
Thr  
Thr  
Teu  
Ile  
Gly  
Phe  
Gly  
Phe  
Arg  
1970  
Trp  
1985  
Asn  
2000  
Asn  
2015  
Glu  
2030  
Thr  
2045  
Gly  
2060  
Ala  
2075  
Telu  
20 90  
a.  
Telu  
2210  
Ala  
2225  
Cys  
2240  
Thr  
2255  
Ser  
2270  
Glin  
2285  
Telu  
2300  
Phe  
2315  
Tyr  
2330  
Ile  
2345  
Reunió  
2360  
Ser  
Teu  
Asn  
Thr  
pared

Ser  
Ala  
Pro  
Arg  
Thr  
Arg  
Teu  
Ala  
Asn  
Reunió

Gly  
pared  
Ala  
Phe  
Ile  
Teu  
Phe  
Ala  
Pro  
Glu  
pared  
Teu  
Ile  
Phe  
Teu  
Teu  
Ile  
Ser  
Ser  
Teu  
Phe

Gly  
Áspid  
Teu  
Thr  
Ala  
Teu  
Ala  
Ser  
Ile

Arg  
Glu  
Thr  
pared  
pared  
Glu  
Ala  
Asn  
Telu  
Ala  
Telu

Arg  
pared  
Pro  
Telu

Gly  
pared  
Phe

Áspid  
Ile  
Glu  
Telu  
Ser  
Ile  
Phe

pared  
Glu  
Ile  
pared

Thr  
Asn  
Telu  
Ser

Gly  
Glin  
Phe  
Ala  
Ala  
Ser  
pared

Arg  
Ser  
Ser

Trp  
Gly  
Su  
pared  
Phe

79

1975  
Telu  
1990

Telu  
2005  
Ser  
2020  
Glin  
2035  
Gly  
205 0  
Glin  
2065  
Thr  
2080  
Phe  
2200  
Ile  
2215  
Telu  
22,30  
Glu  
22 45  
Glu  
2260  
Telu  
2275  
Ser  
229 0  
pared  
2305  
Telu  
2320  
Phe  
2335  
Glin  
235 0  
Ala  
2365  
Trp  
Ala  
Glin  
Asn  
Glu  
Ser  
Telu  
Pro  
Ala  
pared  
Telu  
Telu  
Telu  
Ser  
Telu  
Telu  
Gly  
Áspid  
Telu  
Ser  
Ile  
Reunió  
Ser  
Ser  
pared  
Glin  
Glu  
pared  
Telu  
Ile  
Trp  
Ala  
Phe  
Pro  
Telu  
Ser  
Ser  
Ser  
Ala  
Ala  
Ser  
Ala  
Phe  
Thr  
Glu  
Pro  
pared  
Ile  
Gly  
Thr  
Thr  
Ser  
Ile  
Asn  
Thr  
Thr  
Teu  
Teu  
Gly  
Asn

Teu  
Phe  
Teu  
Ile  
Asn  
Pro

US 7.220.852 B1

Áspid

Thr  
Ile  
Teu  
Su  
Ile  
Ile  
Thr  
Asn  
Phe  
Thr

Áspid

Phe  
Ser  
Phe  
Asn  
Pro  
Pro

Áspid

Reunió  
Reunió  
Ser  
pared

-continuado

1980  
Pro  
1995  
Thr  
2010  
Ser  
2025  
Glu  
20 40

Lys  
2055  
Glu  
2070

a.  
Yo e  
a.  
Thr  
2205  
Teu  
2220

Gly  
2235  
Ser  
225 0

Cys  
2265  
Ala  
2280

Teu  
2295  
Teu  
2310  
Glin  
2325

Trp  
234. 0  
Ser  
2355

Ile  
2370  
pared  
Glin

Glu  
Pro  
Áspid

Thr  
Teu  
Ser  
Reunió  
Ala

Gly  
Ile  
Ile  
Ala  
Ser  
Ser

Teu  
Thr  
Phe  
pared  
Teu  
Ala

Trp  
Áspid  
Gly  
Glu  
Áspid  
Ser  
Teu  
Pro  
Su  
Ala  
Asn  
Pro  
Ser  
Ile  
Ala  
Pro  
Asn  
Ile  
Glu  
Ile  
Thr  
Phe  
Reunió  
Reunió  
Thr  
Reunió  
pared  
pared  
Áspid  
Reunió  
Asn  
Gly  
Thr  
Asn  
Asn  
Reunió  
pared  
Ser  
pared  
Thr  
Teu  
Phe  
Trp  
pared  
Ser

80

pared  
Arg  
Thr  
Áspid  
Ser  
Su  
Pro  
Thr  
Ser  
Ser  
pared  
Áspid  
Glu  
Ala  
Ile  
Gly  
Asn  
Arg  
Ile  
Teu  
Teu  
pared  
2375  
Tyr  
2390  
Asn  
2405  
Gly  
2420  
Phe  
2435  
Telu  
2450  
Ser  
2465  
Telu  
24.80  
Telu  
2495  
Lys  
2510

Lys  
2525  
Glin  
2540  
Ser  
2555  
Ala  
2570  
Lys  
2585  
Gly  
26 00  
Arg  
2615  
Glu  
2630  
Áspid  
2645  
Reunió  
2660  
Su  
2675  
Trp  
2690  
Glin  
27 05  
Thr  
2720  
Ile  
2735  
Reunió  
2750  
Su  
Gly  
Phe  
Ser  
Ser  
Gly  
Teu  
Áspid  
Teu  
pared  
Glin  
Ser  
Thr  
Ile  
Asn  
Ile  
Ser  
Teu  
Ile  
Arg  
Reunió  
Thr  
Teu  
Ile  
Phe  
Su  
Ser  
Áspid  
Reunió  
pared  
pared  
Ala  
Gly  
Teu  
Pro  
Asn  
pared  
Arg  
Ala  
Teu  
Reunió  
Asn  
Gly  
Glin  
pared  
Áspid  
Phe  
Telu  
Glu  
Gly  
Áspid  
Ala  
Telu  
pared  
Asn  
Arg  
Ala  
Ser  
Thr

Ala  
Áspid  
Arg  
Arg  
Thr  
Ser  
Phe  
Áspid  
pared  
Pro  
Ser  
Glin  
Áspid  
Thr  
Telu  
Áspid  
pared  
Telu  
Asn  
Áspid  
Glin  
Áspid  
Ala  
Thr  
Gly  
Thr  
81  
Gly  
2380  
Ala  
2395  
Ser  
2410  
Su  
24.25  
Thr  
24 40  
Lys  
2455  
Ser  
2470  
Ala  
2485  
Asn  
25 00  
Ile  
2515  
Ala  
25.30  
Pro  
25,45  
Ser  
2560  
Phe  
2575  
pared  
2590  
Gly  
2605  
Áspid  
2620  
Ser  
2635  
Phe  
26,50  
Telu  
2665  
pared  
2680  
Tyr  
2695  
Ala  
210  
Arg  
2725  
Gly  
2740  
Telu  
2755  
Cys  
Thr  
Phe  
Asn  
Phe  
Arg  
pared  
Gly  
Telu  
Asn  
Ser

Ile  
Thr  
Ser  
Ala  
pared  
Thr  
Su  
Reunió  
Gly  
Ala  
Reunió  
Telu  
Thr  
Arg  
Trp  
Ile  
Pro  
Ala  
Glin  
Áspid  
pared  
Telu  
Glu  
Ala  
Thr  
Telu  
Áspid  
Su  
Telu  
Ala  
Ser  
pared  
Ile  
Ser  
pared  
pared  
Asn  
Ser  
Ile  
pared  
Asn  
Ile  
Ser  
Teu  
pared  
Thr  
Ala  
Ser  
pared  
Ser  
Thr  
Ser  
Teu  
Asn  
pared  
pared  
pared

US 7.220.852 B1

Ser  
Glu  
Áspid  
Asn  
Thr  
Teu  
pared  
Ala  
Teu  
Ser  
Phe  
Su  
Thr  
Áspid  
Áspid  
Ile  
Su  
Ser  
Asn  
Asn  
Ser  
Teu

-continuado

Thr  
2385  
Cys  
24 00  
Ala  
24.15  
Teu  
24.30  
Glu  
2445  
Pro  
2460

Asn  
24,75  
Tyr  
24,90  
Arg  
25 05  
Phe  
2520  
Ser  
2535  
Áspid  
255 0  
pared  
2565  
Ser  
2580  
Ser  
2595  
Phe  
26,10  
Thr  
2625  
Teu  
264 0  
Asn  
2655  
Áspid  
2670  
Asn  
2685  
Glu  
27 00  
Ile  
2715  
pared  
273 0  
Thr  
2745  
Ala  
276 0.  
Cys  
Thr  
Asn  
Asn  
pared  
Thr  
Gly  
Glu  
Ala  
Áspid  
pared  
Glin  
pared  
Glu  
pared  
pared  
pared  
Glin  
Pro  
Ile  
Ala  
Reunió  
Thr  
Gly  
Ala  
Áspid  
Ala  
Arg  
Asn  
Gly  
pared  
Reunió  
Pro  
Teu  
Ser  
Áspid  
pared  
pared  
Asn  
Ser  
Teu  
Phe  
Thr  
Phe  
Teu  
Reunió  
Ile  
Gly  
Áspid  
Arg  
Glin  
Teu  
Su  
Asn

Teu  
Phe  
Reunió  
Ala  
Ala  
pared  
Thr  
Glu  
Ala  
Teu  
Arg  
Arg  
Thr  
pared  
82

Thr  
Ala  
Asn  
Ile  
Ile  
pared  
Áspid  
Phe  
Asn  
Thr  
Thr  
Glu  
Arg  
Ile  
Áspid  
pared  
Gly  
Reunió  
Pro  
Thr  
Phe  
Arg  
Glu  
Tyr  
2765  
Thr  
2780  
Arg  
2795  
Gly  
2810  
Áspid  
2825  
Gly  
284 0  
Asn  
2855  
Gly  
2870  
Phe  
2.885  
Lys  
29 00  
Telu  
2915  
Arg  
29,30  
Tyr  
2.945  
Tyr  
2960  
Telu  
2975  
Ala  
2990  
Ala  
30 05  
pared  
3020  
Thr  
3035  
Glu  
305 0  
Ser  
30 65  
Asn  
3095  
Ser  
31,10  
Ile

31.25  
Lys  
31 40  
Ala  
Ile  
Asn  
Áspid  
Phe  
Phe  
Gly  
Asn  
Ala  
Áspid  
Teu  
Teu  
Ser  
Teu  
Asn  
Ser  
Phe  
pared  
Áspid  
Pro  
Ser  
Arg  
Ala  
pared  
Glu  
Ile  
Áspid  
Ser  
Ile  
Áspid  
Ile  
Thr  
Ala  
Glu  
pared  
Glu  
Arg  
Thr  
Ser  
Ile  
Ala  
Ala  
Asn  
Thr  
pared  
Ile  
Teu  
pared  
Teu  
Reunió  
Ile  
Ile  
Ala  
pared  
Phe  
Ser  
Reunió  
Gly  
Telu  
Gly  
Su  
Ser  
Gly  
Phe  
Ser  
Ala  
Su  
Ile  
Ser  
Ser  
pared  
Reunió  
Pro  
Ile  
Ser  
Trp  
Pro  
Pro  
Telu  
Ala  
Gly  
Ser  
Reunió  
Ser  
Gly  
Gly  
pared  
Thr  
pared

pared  
Telu  
pared  
Phe  
Pro  
Su  
Phe  
Thr

83

pared  
2770  
Gly  
2785  
Thr  
2800  
Phe  
2815  
pared  
2830

Gly  
284,5  
Su  
2.860  
Thr  
2875  
Cys  
2890

Lys  
2905  
Ile  
2920

Áspid

2935  
pared  
295 0  
Thr  
2965

Arg  
2.980

Phe  
2995  
Pro  
3010

pared  
3025

Tyr  
3040

pared  
3055

Cys  
3070

Phe  
3085

Telu  
31 00

Phe  
31.15

Cys  
3130

Asn  
31,45

Phe  
Su

Tyr  
Áspid

Ser  
pared

Telu  
Phe

Pro  
pared

Pro  
Ser

Gly  
Arg

Telu  
Ala

Phe  
Ala

Telu  
Ala

Trp  
Su

Gly  
Telu

Thr  
Áspid

Glin  
Ala

Pro

Telu  
Ser  
Telu  
pared  
Ser  
pared  
Glu  
pared  
Gly  
pared  
Gly  
Reunió  
Ala  
pared  
Telu  
Su  
Ile  
Trp  
pared  
Telu  
Teu  
Ala  
Arg  
Ala  
Gly  
Pro  
Ala  
Pro  
Ser  
Ile  
pared  
Arg  
Teu  
pared  
Glin  
Gly  
Asn  
Pro  
Teu  
Thr  
Phe  
Thr  
Asn

US 7.220.852 B1

Ser  
Ile  
Phe  
Gly  
Ile  
Thr  
Arg  
Teu  
Ala  
Glu  
Ile  
Thr  
Ser  
Asn  
Áspid  
Pro  
Ile  
Phe  
Ala  
Ala  
Teu  
Glin  
Ala  
Phe  
Phe

-continuado

Ile  
2775  
Glin  
279 0  
Ala  
2805  
Gly  
2820  
Ile  
2835  
pared  
285 0  
pared  
2865  
Ile  
2880  
Glu  
2.895  
Cys  
2.910  
Teu

2925  
Glin  
2.940  
Thr  
2955  
Glu  
297 0  
Asn  
2985  
Ala  
3000  
pared  
3 015  
Arg  
3045  
Teu  
3060  
Tyr  
3 0F5  
Thr  
3 0 9 0  
Trp  
3105  
Ile  
312 0  
Asn  
3135  
Ser  
315 0  
Glu  
Su  
Áspid  
Asn  
Ser  
Thr  
Teu  
Phe  
Glu  
Arg  
Phe  
Phe  
pared  
Glu  
Reunió  
Gly  
Ala  
Arg  
Teu  
Ser  
Phe  
Phe  
Asn  
Thr  
Reunió  
Áspid  
Gly  
Arg  
Arg  
Ser  
Thr  
Áspid  
Pro  
Pro  
Áspid  
Gly  
Su  
Asn  
Ala  
Ile  
pared  
Phe  
Phe  
Ala  
pared  
Gly  
pared  
Su  
Glu  
Ala  
Ala  
Ser  
Ile  
Thr  
Áspid  
Asn  
Ala  
Ile  
Le1  
Le1  
Le1  
Phe  
Le1  
Le1

Phe  
Reunió  
Phe  
Teu  
Glu  
Teu

84

51

US 7.220.852 B1

85

-continuado

3155  
316 0  
31,65

Lys Lieu Arg Ser Glu Thir Lieu Lleu Pro Leu Thr Glin Tyr Asn Arg

317 0  
31,75  
3180

Tyr Lieu Ala Leu Tyr Asn Lys Tyr Lys Tyr Phe Ser Gly Ala Lieu

31,85  
319 0  
31,95

Asp Thir Thr Ser Tyr Arg Glu Ala Ala Cys Cys Su Leu Ala Lys

3200  
3205  
3210

Ala Lieu. Asn Asp Phe Ser Asn. Ser Gly Ala Asp Wall Leu Tyr Glin

3215  
3220  
3225

Pro Pro Gln Thr Ser Ile Thr Ser Ala Val Leu Gln Ser Gly Phe

3230  
3235  
324 0

Arg Lys Met Ala Phe Pro Ser Gly Lys Val Glu Gly Cys Met Val

3245  
325 0  
3255

Glin Val Thr Cys Gly Thr Thr Thr Leu Asn Gly Leu Trp Leu Asp

3260  
3265  
3270

Asp Thr Val Tyr Cys Pro Arg His Val Ile Cys Thr Ala Glu Asp

3275  
328 0  
3285

Met Lieu. Asn Pro Asn Tyr Glu Asp Leu Lieu. Ile Arg Lys Ser Asn

3290  
3295  
3300

Su Ser Phe Leu Val Glin Ala Gly Asn Val Glin Leu Arg Val Ile

3305  
3310  
3315

Gly His Ser conoció a Glin Asn. Cys Lieu Lieu Arg Lieu Lys Wall Asp Thr

3320  
3325  
333 0

Ser Asn Pro Lys Thr Pro Lys Tyr Lys Phe Val Arg Ile Gln Pro

3335  
3340  
3345

Gly Glin Thr Phe Ser Val Leu Ala Cys Tyr Asn Gly Ser Pro Ser

3350  
3355  
3360

Gly Val Tyr Gln Cys Ala Met Arg Pro Asn His Thr Ile Lys Gly

3365  
3370  
3375

Ser Phe Lieu. Asn Gly Ser Cys Gly Ser Val Gly Phe Asn. Ile Asp

3380  
3385  
3390

Tyr Asp Cys Val Ser Phe Cys Tyr Met His His Met Glu Leu Pro

3395  
3400  
3405

Thr Gly Val His Ala Gly. Thr Asp Leu Glu Gly Lys Phe Tyr Gly

3410

34,15  
3420  
Pro Phe Val Asp Arg Glin Thr Ala Glin Ala Ala Gly Thr Asp Thr  
3.425  
34,30  
3435  
Thir Ile Thr Leu Asn Val Leu Ala Trp Leu Tyr Ala Ala Val Ile  
34 40  
3445  
3450  
Asn Gly Asp Arg Trp Phe Lieu. Asn Arg Phe Thir Thr Thr Lieu. Asn  
3455  
3460  
3465  
Asp Phe Asn Leu Val Ala Met Lys Tyr Asn Tyr Glu Pro Leu Thr  
347 0  
34,75  
3480  
Glin Asp His Val Asp Ile Leu Gly Pro Leu Ser Ala Glin Thr Gly  
34,85  
3490  
3495  
Ile Ala Val Lieu. Asp Met Cys Ala Ala Lieu Lys Glu Lieu Llieu Glin  
35 00  
3505  
3510  
Asn Gly Met Asn Gly Arg Thr Ile Leu Gly Ser Thr Ile Leu Glu  
3515  
3520  
3525  
Asp Glu Phe Thr Pro Phe Asp Val Val Arg Gln Cys Ser Gly Val  
3530  
3535  
354. 0  
Thr Phe Glin Gly Lys Phe Lys Lys Ile Val Lys Gly Thr His His  
35,45  
355 0  
3555

US 7.220.852 B1

87

-continuado

Trp Met Leu Leu Thr Phe Leu Thir Ser Leu Leu Ile Leu Val Glin  
35 6.0  
3565  
357 0  
Ser Thr Gln Trp Ser Leu Phe Phe Phe Val Tyr Glu Asn Ala Phe  
3575  
358 0  
3585  
Leu Pro Phe Thr Leu Gly Ile Met Ala Ile Ala Ala Cys Ala Met  
3590  
3595  
3600  
Leu Lieu Val Lys Su Lys Su Ala Phe Lieu. Cys Lieu Phe Leu Lieu  
3605  
3610  
3615  
Pro Ser Leu Ala Thr Val Ala Tyr Phe Asn Met Val Tyr Met Pro  
3620  
3625  
36,30  
Ala Ser Trp Val Met Arg Ile Met Thr Trp Leu Glu Leu Ala Asp  
3635  
3640  
3645  
Thir Ser Leu Ser Gly Tyr Arg Lieu Lys Asp Cys Wal Met Tyr Ala  
3650  
3655  
3660  
Ser Ala Leu Val Leu Leu Ile Leu Met Thr Ala Arg Thr Val Tyr  
3665  
36 70  
3675  
Asp Asp Ala Ala Arg Arg Val Trp Thr Lieu Met Asn Val Ile Thr  
3680  
3685  
369 0  
Leu Val Tyr Lys Val Tyr Tyr Gly Asn Ala Lieu. Asp Glin Ala Ile  
3695

3700  
 3705  
 Ser Met Trp Ala Leu Val Ile Ser Val Thir Ser Asn Tyr Ser Gly  
 3710  
 3715  
 372 0  
 Val Val Thir Thr Ile Met Phe Leu Ala Arg Ala Ile Val Phe Val  
 3725  
 373 0  
 3735  
 Cys Val Glu Tyr Tyr Pro Leu Leu Phe Ile Thr Gly Asn Thr Leu  
 3740  
 3745  
 375 0  
 Gln Cys Ile Met Leu Val Tyr Cys Phe Leu Gly Tyr Cys Cys Cys  
 3755  
 376 0  
 3765  
 Cys Tyr Phe Gly Lieu Phe Cys Lieu Lieu. Asn Arg Tyr Phe Arg Lieu  
 3770  
 3775  
 378 0.  
 Thr Leu Gly Val Tyr Asp Tyr Leu Val Ser Thr Glin Glu Phe Arg  
 3785  
 3790  
 3795  
 Tyr Met Asn. Ser Glin Gly Lieu Lleu Pro Pro Lys Ser Ser Ile Asp  
 38 00  
 3805  
 3810  
 Ala Phe Lys Lieu. Asn. Ile Lys Lieu Lieu Gly Ile Gly Gly Lys Pro  
 3815  
 3820  
 3825  
 Cys Ile Lys Val Ala Thr Val Glin Ser Lys Met Ser Asp Wall Lys  
 3830  
 3835  
 384 0  
 Cys Thr Ser Val Val Leu Leu Ser Val Leu Gln Gln Leu Arg Val  
 384,5  
 3850  
 3855  
 Glu Ser Ser Ser Lys Lieu Trp Ala Glin Cys Val Glin Lieu. Su asn  
 3860  
 3865  
 387 0  
 Asp Ile Leu Lieu Ala Lys Asp Thir Thr Glu Ala Phe Glu Lys Met  
 3875  
 3880  
 3885  
 Val Ser Lieu Lleu Ser Val Lieu Lleu Ser Met Glin Gly Ala Val Asp  
 3890  
 3.895  
 39 00  
 Ile Asin Arg Lieu. Cys Glu Glu Met Lieu. Asp Asn Arg Ala Thr Lieu  
 39 05  
 3910  
 391,5  
 Glin Ala Ile Ala Ser Glu Phe Ser Ser Leu Pro Ser Tyr Ala Ala  
 392,0  
 3925  
 393 0  
 Tyr Ala Thr Ala Glin Glu Ala Tyr Glu Glin Ala Val Ala Asn Gly  
 3935  
 394 0  
 39,45

Áspid  
 Ala  
 Glu  
 Arg  
 Reunió  
 Asn  
 Ile  
 Teu  
 pared  
 Reunió  
 Asn  
 Teu  
 Pro  
 Pro  
 pared  
 Ala  
 Phe

Gly  
Thr  
Áspid  
Gly  
Gly  
Ser  
395 0  
Lys  
39 65  
Lys  
3980  
Ser  
3995  
Telu  
4010  
Ile  
4025  
Pro  
40 40  
Gly  
4055  
Ser  
400  
Telu  
4205  
Telu  
4220  
Thr  
4235  
Ala  
4250  
Gly  
4265  
Gly  
4280  
Glin  
4295  
Su  
4310  
Lys  
4.325  
Phe  
Glu  
Ser  
Reunió  
Glu  
Phe  
Ile  
Teu  
Thr  
Ala  
pared  
Trp  
Teu  
Teu  
Teu  
Ser  
Arg  
Gly  
Glu  
pared  
Glin  
Thr  
Glu  
Ile  
Thr  
pared  
Glu  
Ala  
Áspid  
Thr  
Asn  
Thr  
Teu  
Glin  
Pro  
Glin  
Ala  
Ala  
Teu  
Áspid  
Phe  
Phe  
Ser  
pared  
Áspid  
Pro  
Gly  
Ser  
Áspid  
pared

Teu  
pared  
Phe  
Áspid  
Reunió  
Asn  
Thr  
Trp  
Telu  
Telu  
Asn  
Ala  
Ser  
Gly  
pared  
Ile  
Telu  
Pro  
Pro  
Ile  
Glin  
Phe  
Su  
Glin  
Arg  
Telu  
Áspid  
Glin  
Arg  
Telu  
Ala  
Ala  
Asn  
Glu  
Ser  
Ile  
Asn  
Gly  
Áspid  
Thr  
Thr  
Ala  
Ala  
Ala  
Thr  
Ala  
Gly  
Pro  
Ile  
Asn

89

Lys  
3955  
Arg  
3970  
Ala  
3985  
Ala  
4 000  
Arg  
40 15  
Arg  
4030  
Ala  
4045  
Thr  
4060  
Asn  
424 0  
Lys  
4255  
Asn  
427 0  
Ile  
4285  
Gly  
430 0  
Asn  
4315  
Pro  
4330  
Thr  
Lys  
Áspid  
Reunió  
Glin  
Ile  
Thr  
Telu  
Thr  
Asn

Glin  
Thr  
Thr  
Telu  
Thr  
Ser  
Ala  
Thr  
Ala  
Pro  
Thr  
pared  
Telu  
Ala  
Thr  
pared  
Telu  
Gly  
Telu  
Áspid  
Glin  
Asn  
Ala  
Ser  
Glin  
Ser  
Áspid  
Ile  
Pro  
Asn  
pared  
Thr  
Tyr  
pared  
pared  
Ser  
Lys  
Thr  
Ala  
Glin  
Thr  
Áspid  
Cys  
Reunió  
Gly  
pared  
Reunió  
Teu  
Pro  
Thr  
Teu  
Asn  
Arg  
pared  
Thr

US 7.220.852 B1

Reunió  
Reunió  
Ser  
Asn  
pared  
pared  
Asn  
pared  
Áspid  
Arg  
pared  
Ala  
Gly  
Thr  
Gly  
Teu  
Teu  
Teu  
Áspid  
Reunió  
Pro  
Phe  
Ala  
pared

-continuado

Ser  
396 0  
Glin  
3975  
Tyr  
399 0  
Ala  
4005  
Áspid  
4020

Pro  
4035  
pared  
4.050  
Áspid  
408 o  
Asn  
4095  
Pro  
4200  
Asn  
4215  
Glin  
4230  
Ser  
4245  
Tyr  
4260  
Teu  
4275  
Glu  
429 o  
Teu  
4305  
Cys  
4320  
Asn  
4.335  
Teu  
Arg  
Reunió  
Ala  
Teu  
pared  
Phe  
Ala  
Ser  
Asn  
Teu  
Thr  
Arg  
Ala  
Teu  
Arg  
Ala  
Phe  
Teu  
Áspid  
Áspid  
Gly  
Asn  
Lys  
Glin  
Glin  
Teu  
Asn  
Pro  
Thr  
Áspid  
Pro  
Ser  
Arg  
Áspid  
Phe  
Arg  
Glu  
pared  
Gly  
Gly  
Ala  
Thr  
Asn  
Teu  
Pro  
Reunió  
pared  
Teu  
Ala  
Thr  
Asn  
Ile  
Áspid  
Ser  
Asn  
Ala  
Glin  
Áspid  
pared  
Phe  
Pro  
Reunió  
Asn  
Ala

Ser  
Su  
Reunió  
Arg  
pared  
Trp  
90

US 7.220.852 B1

91 91

-continuado

434 0  
4.345  
4350

Lys Gly Tyr Gly Cys Ser Cys Asp Gln Leu Arg Glu Pro Leu Met

4355  
4360  
4365

Gln Ser Ala Asp Ala Ser Thr Phe Leu Asn Gly Phe Ala Val

4370  
4375  
4.380

<210> SEQ ID NO 3

& 2 11s LONGITUD 2.695

& 212> TIPO PRT

<213> ORGANISMO: Coronavirus

<400 SECUENCIA: 3

Arg Val Cys Gly Val Ser Ala Ala Arg Leu Thr Pro Cys Gly Thr Gly

1  
5 5

10  
15

Thr Ser Thr Asp Val Val Tyr Arg Ala Phe Asp Ile Tyr Asn Glu Lys

20  
25  
30

Val Ala Gly Phe Ala Lys Phe Lieu Lys Thr Asn. Cys Cys Arg Phe Gln

35  
40  
45

Glu Lys Asp Glu Glu Gly Asn Lieu Lieu. Asp Ser Tyr Phe Val Val Lys

50  
55  
60 60

Arg His Thr Met Ser Asn Tyr Gln His Glu Glu Thir Ile Tyr Asn Leu

sesenta y cinco

70  
75  
80

Wall Lys Asp Cys Pro Ala Val Ala Wal Su Asp Phe Phe Lys Phe Arg

85  
90  
95

Val Asp Gly Asp Met Val Pro Su Ile Ser Arg Gln Arg Lieu. Thir Lys

100  
105  
110

Tyr Thr Met Ala Asp Lieu Val Tyr Ala Lieu Arg His Phe Asp Glu Gly

115  
120  
125

Asn. Cys Asp Thr Lieu Lys Glu Ile Leu Val Thr Tyr Asn. Cys Cys Asp

130  
135  
1 4 0

Asp Asp Tyr Phe Asn Lys Lys Asp Trp Tyr Asp Phe Val Glu Asn Pro

145  
15 0  
155  
160

Asp Ile Leu Arg Val Tyr Ala Asn Lieu Gly Glu Arg Val Arg Gln Ser

1,65  
170  
175

Leu Llys Lys Thr Val Gln Phe Cys Asp Ala Met Arg Asp Ala Gly Ile

180  
185  
19 0

Val Gly Val Lieu. Thir Lieu. Asp Asn Gln Asp Lieu. Asn Gly Asn Trp Tyr

195  
 200  
 205  
 Asp Phe Gly Asp Phe Val Glin Val Ala Pro Gly Cys Gly Val Pro Ile  
 210  
 215  
 220  
 Val Asp Ser Tyr Tyr Ser Leu Leu Met Pro Ile Leu Thir Leu Thr Arg  
 225  
 230  
 235  
 240  
 Ala Lieu Ala Ala Glu Ser His Met Asp Ala Asp Leu Ala Lys Pro Leu  
 245  
 250  
 255  
 Ile Lys Trp Asp Leu Lleu Lys Tyr Asp Phe Thr Glu Glu Arg Lieu. Cys  
 260  
 265  
 27 0  
 Leu Phe Asp Arg Tyr Phe Lys Tyr Trp Asp Gln Thr Tyr Su Pro Asn  
 275  
 280  
 285  
 Cys Ile Asn. Cys Lieu. Asp Asp Arg Cys Ile Lieu. Su Cys Ala Asn. Phe  
 29 0  
 295  
 300  
 Asn Val Leu Phe Ser Thr Val Phe Pro Pro Thr Ser Phe Gly Pro Leu  
 305  
 310  
 315  
 320  
 Val Arg Lys Ile Phe Val Asp Gly Val Pro Phe Val Val Ser Thr Gly  
 325  
 330  
 335

Su  
 Pro  
 Thr  
 385  
 pared  
 Glu  
 465  
 Ala  
 Phe  
 Glu  
 Thr  
 Ala  
 545  
 Glin  
 Thr  
 Teu  
 Áspid  
 Ala  
 625  
 Su  
 Reunió  
 Ser  
 Glin  
 Lys  
 705  
 Ala  
 Su  
 Ser  
 Ala  
 370  
 Gly  
 Ala  
 Asn  
 450  
 pared  
 Asn  
 Asn  
 Áspid  
 Ile  
 530  
 Arg  
 Phe  
 pared  
 Tyr  
 610  
 Ser  
 Arg  
 pared

Gly  
Ala  
69 O.  
Ile  
Telu  
Ala  
pared  
Phe  
Ser  
355  
Reunió  
Phe  
Pro  
Phe  
Glin  
435  
Telu  
pared  
Glin  
Glin  
515  
Thr  
Thr  
Su  
pared  
Thr  
595  
Pro  
Telu  
Phe  
Reunió  
Áspid  
675  
pared  
Ala  
Tyr  
pared  
Arg  
340  
Arg  
Su  
Ser  
Gly  
Phe  
420  
Áspid  
Pro  
Áspid  
pared  
Trp  
5 00  
Áspid  
Glin  
pared  
Glin  
Ile  
pared  
Lys  
pared  
Tyr  
Cys  
660  
Ala  
Thr  
Áspid  
Telu  
740  
Cys  
Glu  
Teu  
Ala  
pared  
Asn  
405  
Lys  
Gly  
Thr  
Lys  
Ile  
485  
Gly  
Ala  
Reunió  
Ala  
Lys  
565  
Gly  
Tyr  
Cys  
Teu

Arg  
645  
Gly  
Thr  
Ala  
Lys  
Asn  
725  
Tyr  
Teu  
Ser  
Ala  
Ala  
390  
Phe  
Glu  
Asn  
Reunió  
Tyr  
470  
pared  
Lys  
Teu  
Asn  
Gly  
550  
Teu  
Thr  
Ser  
Ala  
630  
Teu  
Gly  
Thr  
Asn  
Tyr  
710  
Lys  
Asn

93

Gly  
Phe  
Ser  
375  
Ala  
Asn  
Gly  
Ala  
Cys  
455  
Phe  
Asn  
Ala  
Phe  
Teu  
535  
pared  
Teu  
Ser  
Áspid  
Arg  
615  
Arg  
Ala  
Ser  
Ala  
pared  
695  
pared  
Áspid  
Su  
Ser  
pared  
Lys  
360  
Gly  
Telu  
Lys  
Ser  
Ala  
4 40  
Áspid  
Asn  
Ala  
Lys  
Ser  
Lys  
Lys  
pared

600  
Ala  
Lys  
Asn  
Telu  
Tyr  
680  
Asn  
Arg  
pared  
Phe  
Asn  
pared  
345  
Glu  
Asn  
Thr  
Ser  
425  
Ile  
Ile  
Telu  
Telu  
505  
Ile  
Ser  
Phe  
585  
Glu  
Reunió  
Su  
Glu  
Tyr  
665  
Ala  
Ala  
Asn  
Áspid  
Ser  
745  
Su  
Telu  
Telu  
Asn  
Phe  
410  
pared  
Ser  
Arg  
Áspid  
490  
Thr  
Ala  
Ile  
570  
Thr  
Pro  
Asn  
Cys  
650  
pared  
Asn  
Telu  
Telu  
Su  
730  
Reunió  
Ala  
Asn  
Teu  
Teu  
Asn  
395  
Glu  
Áspid  
Glin  
Áspid  
475  
Ile  
Ser  
555  
Ala  
Gly  
Pro  
Asn  
Thr  
635  
Ala  
Ser  
Teu  
Glin  
715  
Glu  
Reunió

Ala

US 7.220.852 B1

-continuado

Glin  
pared  
Teu  
pared  
Áspid

Teu  
Teu  
460

Gly  
Ser  
Áspid

Arg  
Ser  
540  
Thr  
Ala

Gly  
Su  
Reunió  
Glin

Pro  
pared  
Ser  
7 00

Su  
Phe  
Ile  
Glin  
Áspid

Tyr  
365  
Áspid

Ala  
Phe  
Áspid

4 45  
Teu  
Gly

Ala  
Ser  
Asn  
525  
Ala

Reunió  
Thr  
Trp

Teu  
605  
Teu  
pared

Gly  
Phe  
685  
Thr

Arg  
pared  
Teu

Gly  
pared  
35 0  
Ala

Lys  
Phe  
Ala  
Su

43 0  
Gly  
Reunió  
510.

pared  
Thr  
Arg  
Su

59 0  
Reunió  
Arg  
Asn

Telu  
Gly  
67 0  
Asn

Áspid  
Telu  
Áspid  
Ser

750  
Telu  
Asn  
Ala  
Arg  
Glin  
pared  
415  
Phe  
pared  
Ile  
Phe  
495  
Ser  
Ile  
Asn  
Asn  
Gly  
575  
Asn  
Gly  
Ile  
Telu  
Ser  
655  
Thr  
Ile  
Gly  
Glu  
735  
Áspid  
pared  
Telu  
Áspid  
Thr  
Thr  
400  
Ser  
Phe  
Arg  
pared  
Asn  
480  
Pro  
Pro  
Arg  
Arg  
560  
Ala  
Reunió  
Trp  
Reunió  
Ser  
640  
Glu  
Ser  
Asn  
Glu  
720  
Phe  
Áspid  
Ala  
94

US 7.220.852 B1

95

-continuado

755  
760  
765  
Ser Ile Lys Asn. Phe Lys Ala Val Lieu. Tyr Tyr Glin Asn. Asn Val Phe  
770  
775  
780  
Met Ser Glu Ala Lys Cys Trp Thr Glu Thr Asp Leu Thir Lys Gly Pro  
785  
790  
795  
800  
Su Glu Phe Cys Ser Gln Su Thr Met Leu Val Lys Glin Gly Asp Asp  
805  
810  
815  
Tyr Val Tyr Leu Pro Tyr Pro Asp Pro Ser Arg Ile Leu Gly Ala Gly

820  
 825  
 830  
 Cys Phe Val Asp Asp Ile Wall Lys Thr Asp Gly Thr Lieu Met Ile Glu  
 835  
 840  
 845  
 Arg Phe Val Ser Leu Ala Ile Asp Ala Tyr Pro Leu Thir Lys His Pro  
 85 0  
 855  
 860  
 Asn Glin Glu Tyr Ala Asp Val Phe His Leu Tyr Lieu Glin Tyr Ile Arg  
 865  
 870  
 875  
 880  
 Lys Lieu. Su Asp Glu Lieu. Thr Gly His Met Lieu. Asp Met Tyr Ser Val  
 885  
 890  
 895  
 Conoci a Leu Thr Asn Asp Asn. Thir Ser Arg Tyr Trp Glu Pro Glu Phe Tyr  
 9 00  
 905  
 910  
 Glu Ala Met Tyr Thr Pro His Thr Val Leu Glin Ala Val Gly Ala Cys  
 915  
 920  
 925  
 Val Lieu. Cys Asn. Ser Glin Thr Ser Lieu Arg Cys Gly Ala Cys Ile Arg  
 930  
 935  
 940  
 Arg Pro Phe Leu. Cys Cys Lys Cys Cys Tyr Asp Su Val Ile Ser Thr  
 945  
 950  
 955  
 96.0  
 Ser His Lys Leu Val Leu Ser Val Asn Pro Tyr Val Cys Asn Ala Pro  
 965  
 970  
 975  
 Gly Cys Asp Val Thr Asp Val Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Gly Met Ser  
 980  
 985  
 99 0  
 Tyr Tyr Cys Lys Ser His Lys Pro Pro Ile Ser Phe Pro Leu Cys Ala  
 995  
 10 00  
 1005  
 Asn Gly Glin Val Phe Gly Leu Tyr Lys Asn Thr Cys Val Gly Ser  
 0 10  
 015  
 020  
 Asp Asn Val Thr Asp Phe Asn Ala Ile Ala Thr Cys Asp Trp Thr  
 025  
 030  
 035  
 Asn Ala Gly Asp Tyr Ile Leu Ala Asn Thr Cys Thr Glu Arg Lieu  
 040  
 045  
 05 0  
 Lys Leu Phe Ala Ala Glu Thir Leu Lys Ala Thr Glu Glu Thr Phe  
 055  
 060  
 065  
 Lys Lieu Ser Tyr Gly Ile Ala Thr Val Arg Glu Val Lieu Ser Asp  
 070  
 075  
 080  
 Arg Glu Lieu. Su Leu Ser Trp Glu Val Gly Lys Pro Arg Pro Pro  
 Leu Asn Arg Asn Tyr Val Phe Thr Gly Tyr Arg Val Thr Lys Asn  
 Ser Lys Val Glin Ile Gly Glu Tyr Thr Phe Glu Lys Gly Asp Tyr  
 Gly Asp Ala Val Val Tyr Arg Gly Thr Thr Thr Tyr Lys Leu Asn  
 Val Gly Asp Tyr Phe Val Leu Thir Ser Su Thr Val Met Pro Leu  
 Ser Ala Pro Thr Leu Val Pro Glin Glu His Tyr Val Arg Ile Thr

Gly  
 pared  
 Glin  
 Ala  
 Su

Pro  
Glu  
pared  
pared  
pared  
Áspid  
Thr  
Thr  
Ala  
Teu  
Pro  
Trp  
pared  
Ser  
Glu  
Thr  
Teu  
Asn  
Áspid  
Thr  
Asn  
Pro  
Ala  
Áspid  
Phe  
Phe  
Asn  
Ser  
Gly  
Ala  
Ala  
Áspid  
Ala  
Ser  
Teu  
Pro  
Pro  
Áspid  
Thr  
Áspid  
Ala  
Glin  
Pro  
Pro  
pared  
Su  
pared  
Gly  
Ala  
Ser  
Su  
Ser  
Thr  
Glin  
Gly  
Pro  
Áspid  
pared  
pared  
Glu  
Arg  
Telu  
Glu  
Áspid  
Áspid  
Ile  
pared  
pared  
Ile  
Glu  
Ser  
Ile  
Telu  
Telu  
Ile  
pared  
Telu  
Thr  
Ser  
Ala  
Ser  
Phe  
Asn  
Ile  
Telu  
Pro  
Reunió  
Thr  
Áspid  
Thr  
pared  
Phe  
Telu  
Gly

Glin  
Glin  
Ile  
Áspid

97

Asn  
180  
Ile  
Gly  
Ile  
pared  
Telu  
Reunió  
Ala  
Pro  
Asn  
Telu  
Ser  
Ser

Áspid  
Glu  
Ser  
Telu  
pared  
Telu  
Thr  
Glu

Gly  
Ser  
Reunió  
Ser  
Ile  
Glu  
Ile  
Asn  
Pro  
Ala  
Arg  
Ser

Gly  
Ala  
Ala  
pared  
Phe  
Pro  
Pro  
pared  
Asn  
Ser  
Asn  
Telu  
Phe

Áspid  
Glin  
Su  
pared  
Pro  
Ser  
Glu  
Thr  
Su  
Thr  
pared  
Thr  
Teu  
Glin  
Ser  
Teu  
Thr  
Ile  
Arg  
Ile  
Teu  
pared  
Su

US 7.220.852 B1

Glu  
Ala  
Ala  
Thr  
Thr  
Asn  
Teu  
Ser  
Thr  
Asn  
Glin  
Phe  
Phe  
Reunió  
Glu  
Thr

Pro  
Thr  
-continuado  
Thr  
455  
Thr  
470  
Asn  
485  
5 00  
le  
515  
530  
Thr  
545  
560  
Ser  
Ser  
Ile  
Ala  
Ala  
Glu  
Ala  
Áspid  
Thr  
Teu  
Arg  
Áspid  
Ile  
Asn  
Glin  
pared  
Glin  
pared  
Áspid  
Pro  
Teu  
Glin  
Gly  
Ser  
Thr  
Gly  
Arg  
Glin  
Áspid  
Teu  
Ile  
Reunió  
Asn  
Reunió  
Asn  
Pro  
Asn  
Áspid  
Thr  
Ala  
Arg  
Arg  
Phe  
Ala  
Teu  
Asn  
Teu  
Teu  
Ser  
Teu  
pared  
Ile  
Ser  
Gly  
Gly  
Pro  
Phe  
Arg  
Ala  
Ala  
Ser  
Thr  
Ile  
Áspid  
Arg  
Pro  
98

pared  
Ile  
Pro

Ala  
Ala  
pared  
Asn  
Glin  
Asn  
Phe  
Arg  
Ser  
Thr  
Gly  
Teu  
Glu  
Arg  
Pro  
Trp  
Arg  
Áspid  
Ala  
Áspid  
565  
Ile  
Reunió  
Reunió  
Ile  
Gly  
Teu  
Glu  
pared  
Teu  
Teu  
Asn  
Ala  
pared  
Pro  
pared  
Pro  
Pro  
Ser  
Thr  
Áspid  
Gly  
Áspid  
Pro  
Reunió  
Phe  
Gly  
Thr  
pared  
Phe  
Su  
Arg  
Ser  
Thr  
Thr  
Asn  
Teu  
Su  
Su  
Ile  
Glin  
pared  
Glin  
Áspid  
Su  
Asn  
Thr  
Ser  
Gly  
Gly  
Ile  
Phe  
Asn  
Ala  
Thr  
Telu  
Ile  
Áspid  
Ser  
Telu  
Pro  
Glin  
pared  
Glu  
Ile  
Su  
Telu  
Ala  
Su  
pared  
Arg

Telu  
Ser  
Ile  
Phe  
Thr  
Áspid  
Telu  
pared  
Arg  
Ile  
Arg  
Reunió  
Ala  
Phe  
Ser  
Ala  
Gly  
Reunió  
Su  
Glu  
Ala  
Áspid  
Áspid  
pared  
Ala

99

Pro  
570  
Lys  
Reunió  
Glu  
Glu  
Telu  
Thr  
Asn  
Telu  
pared  
pared  
Trp  
Ile  
Su  
pared  
Glu  
pared  
Ile  
Glu  
Ser  
Asn  
Thr  
Áspid  
Asn  
Glu  
Gly  
Glin  
Gly  
Ala  
Reunió  
Glin  
Phe  
Phe  
Arg  
Asn  
Áspid  
Áspid  
Áspid  
Telu  
Gly  
Trp  
Ile  
Thr  
Pro  
Asn  
Asn  
Reunió  
Teu  
Reunió  
pared  
pared  
Ala  
Su  
pared  
Glin  
Ala  
Arg  
Arg  
Ser  
Asn  
Glu  
Áspid  
Ala

Teu  
Su  
Teu

US 7.220.852 B1

Thr  
Glin  
Ile  
Su

Gly  
pared

Pro  
Teu  
Teu  
Thr  
Ser

Glin  
Su  
Ile  
pared

pared  
Ala  
Pro  
Phe

Glu  
Gly

Asn  
Asn  
Ala

-continuado

Tyr

575

Phe

95 O

Glin

Arg

Asn

Su

Thr

Ser

Thr

Pro

Teu

Áspid

Ala

Gly

Phe

Gly

Trp

Glin

Thr

Trp

Ser

Teu

Ala

Áspid

Phe

Ile

Pro

Su

Teu

Arg

Gly

pared

Arg

Thr

Glu

Gly

Pro

Thr

Su

Pro

Ser

Phe

Gly

pared

Arg

Ser

Ala

Ala

Ile

Ala

Teu

pared

Gly

Thr

Pro

Teu

Tyr

Arg  
Áspid  
Gly  
Asn  
Áspid  
Trp  
Teu  
Gly  
Glu  
Thr  
Áspid  
Phe  
Su  
Glin  
Ser  
Phe  
Pro  
Phe  
100

Phe  
pared  
Thr  
Glu  
Gly  
Trp  
Asn  
Pro  
Ile  
pared  
Glu  
Thr  
Thr  
Glu  
Glu  
Ile  
Ala  
Glin  
Phe  
Reunió  
Glu  
Teu  
Teu  
Ser  
1955  
Tyr  
1970  
Ser  
1985  
Arg  
2000  
Tyr  
2015  
Phe  
2030  
Asn  
2045  
pared  
2060  
pared  
2075  
Áspid  
20 90  
2210  
Thr  
2225  
Telu  
2240  
Lys  
2255  
Áspid  
2270  
Su  
2285  
Su  
2300  
Lys  
2315  
Phe  
2330  
pared  
2345  
Arg  
Ser  
Thr  
pared

Ser  
pared  
Phe  
Pro  
Pro  
Glu  
Ile  
Teu  
Teu  
Ile  
Ile  
Ser  
Ile  
Asn  
Glin  
Teu  
Phe  
Asn  
Ile  
Glu  
Glu  
Ile  
Trp  
pared  
pared  
Gly  
Ser  
Phe  
Glu  
Arg  
Phe  
pared  
Reunió  
Glu  
Thr  
Áspid  
Áspid  
Áspid  
Telu  
Trp  
Thr  
Ile  
Ile  
Telu  
Telu  
Telu  
Áspid  
Ser  
Áspid  
Ser  
pared  
Asn  
Thr  
Ser  
Ile  
Ile  
Áspid  
Áspid  
Telu  
101  
Ser  
Gly  
Telu  
Ile  
Arg  
Gly  
Asn  
Phe  
Trp  
Asn  
Thr  
Ser  
Telu  
pared  
Asn  
Glin  
Glin  
Gly  
Gly  
Phe  
Ala  
Telu  
1960  
Pro  
1975  
pared  
1990  
Gly  
2005  
Áspid  
2020

Tyr  
2035  
Telu  
205 O  
Su  
2065  
Asn  
2080  
Lys  
2200  
Gly  
2215  
Phe  
22,30  
Phe  
22 45  
Reunió  
2260  
Arg  
2275  
Áspid  
229 O  
Telu  
2305  
Ile  
2320  
Glin  
2335  
Telu  
235 O  
Pro  
Ala  
Ala  
Glin  
Phe  
Ala  
Asn  
Telu  
Arg  
Thr  
Thr  
Arg  
Gly  
pared  
Thr  
Glu  
Phe  
Ala  
Pro  
Thr  
Áspid  
Glu  
Telu  
pared  
Glin  
Ser  
Áspid  
pared  
Arg  
Gly  
Glu  
Áspid  
pared  
Asn  
Telu  
Thr  
Glin  
Thr  
Ser  
Reunió  
Gly  
Áspid  
Ser  
Asn  
Phe  
Teu  
Gly  
Thr  
Asn  
pared  
Ala  
Ile  
Teu  
Ala  
Thr  
Teu  
pared  
Ser  
Áspid  
Teu  
Su

Arg  
Áspid  
Ser  
Phe

US 7.220.852 B1

Su  
Ser  
Arg  
Reunió  
Áspid  
Glu  
Su  
Thr  
Thr  
Ile  
Áspid  
Pro  
Ala  
Phe  
Arg  
Pro  
Ile  
Áspid  
Arg  
Phe  
Glu  
Gly  
Ser  
Ser  
Ser  
pared

-continuado

1965  
Gly  
1980  
Ala  
1995  
Su  
2010  
Reunió  
2025  
Thr  
20 40  
Asn  
2055  
Ala  
2070  
Ser  
2205  
Gly  
2220  
Gly  
2235  
Áspid  
225 0  
Teu  
2265  
Gly  
2280  
Glin  
2295  
Clin  
2310  
Thr  
2325  
Lys  
234. 0  
Glu  
2355  
Lys  
Thr  
Su  
Ile  
pared  
Gly  
pared  
Pro  
Pro  
Ala  
Su  
Gly  
Gly  
Glu  
Ile  
Teu  
Glu  
Teu

Áspid  
pared  
Ile  
Glin  
Ala  
Ser  
Asn  
Ala  
Glu  
Áspid  
pared  
pared  
Ala  
pared  
Pro  
pared  
Gly  
Ser  
Ile  
Glu  
Teu  
Ala  
Gly  
Ser  
pared  
Ile  
pared  
Ile  
Asn  
Ala  
Teu  
Ala  
Gly  
Asn  
Pro  
Asn  
Ser  
Thr  
pared  
Teu  
Pro  
pared  
Glin  
Áspid  
Ala  
Phe  
Gly  
Pro  
Asn

102

---

60

Ser  
Áspid  
pared  
Pro  
Teu  
Pro  
Glin  
pared  
Thr  
Áspid  
Ile  
Ile  
Glu  
Ile  
Thr  
Phe  
Ser  
Glu  
Arg  
Reunió  
Teu  
Ser  
<400  
Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thir Ser Gly Ser Asp Leu  
Glin  
2360  
Tyr  
2375  
Glu  
2390  
Gly  
2405  
Glu  
2420  
Lys  
2435  
Tyr

2450  
Ile  
2465  
Ala  
24.80  
Ser  
2495  
Gly  
2510  
Ile  
2525  
Asn  
2540  
Lys  
2555  
Glu  
2570  
Ser  
2585  
Glu  
26.00  
Glin  
2615  
Asn  
2630  
Ser  
2645  
Lys  
2660  
Gly  
2675  
Áspid  
2690  
TIPO  
ORGANISMO: Coronavirus  
Áspid  
Ala  
Thr  
pared  
Gly  
Teu  
Su  
pared  
Áspid  
Áspid  
Ser  
Áspid  
Glin  
Su  
Trp  
Ala  
Ile  
Thr  
Glu  
Arg  
Ile  
Teu  
Glu  
Phe  
Ala  
Ile  
Asn  
Phe  
Teu  
Teu  
Áspid  
Ser  
Ser  
Trp  
Phe  
Áspid  
Asn  
Phe  
Asn  
Teu  
Teu  
SEC ID N° 4  
LONGITUD  
Ser  
Ile  
Reunió  
Áspid  
Reunió  
Thr  
Gly  
Arg  
Asn  
Ala  
Reunió  
Telu  
Trp

Thr  
Telu  
Gly  
Pro  
Pro  
Glin  
Ile  
pared  
1255  
PRT  
SECUENCIA: 4

103

pared  
Ser  
Pro  
Pro  
Telu  
Reunió  
Telu  
Ala  
Glin  
Áspid  
Thr  
Glu  
Ala  
Asn  
Ala  
Ile  
Ile  
Telu  
Ile  
Ile  
Asn  
Ile  
2365  
Phe  
2380  
Lys  
2395  
Asn  
2410  
Glin  
24.25  
Asn  
24 40  
Thr  
2455  
Gly  
2470  
Trp  
2485  
Phe  
25 00  
pared  
2515  
Áspid  
25.30  
Gly  
25,45  
Telu  
2560  
Ala  
2575  
Phe  
2590  
Gly  
2605  
Thr  
2620  
Glin  
2635  
Lys  
26,50  
Asn  
2665  
Arg  
2680  
Asn  
2695  
Ser  
Reunió  
Telu  
Telu  
Asn  
pared  
Telu  
Ser  
Telu  
pared  
Su  
Pro  
Phe

Gly  
Áspid  
pared  
Ala  
Reunió  
Telu  
Telu  
Áspid  
Glu  
Telu  
Glin  
Ala  
Ala  
Áspid  
Pro  
Ser  
Thr  
Arg  
Phe  
Gly  
Telu  
Thr  
Asn  
Su  
Ser  
Arg  
Reunió  
Asn  
pared  
Trp  
Ala  
Thr  
Áspid  
Ala  
Thr  
Thr  
Ser  
Asn  
Ala  
Ser  
Gly  
Ile  
Asn

US 7.220.852 B1

pared  
Ser  
Reunió  
Glu  
Pro  
Gly  
Gly  
Ala  
Asn  
pared  
Teu  
Asn  
Arg  
-continuado  
Lys  
2370  
Lys  
2385  
Glin  
24 00  
Glin  
24.15  
Asn  
24.30  
Thr  
2445  
Tyr  
2460  
pared  
24,75  
Thr  
24,90  
Áspid  
25 05  
Lys  
2520  
Su  
2535  
Teu  
255 0  
Ala  
2565  
Teu  
2580  
Asn  
2595

Gly  
26,10  
Tyr  
2625  
Ser  
264 0  
Ala  
2655  
Ser  
2670  
pared  
2685  
pared  
Áspid  
Ala  
Arg  
Ala  
Glin  
Asn  
Ala  
Teu  
Ser  
Trp  
pared  
pared  
Reunió  
Ala  
Ile  
Teu  
pared  
Teu  
pared  
Thr  
Gly  
Trp  
Reunió  
pared  
Teu  
Reunió  
Pro  
Teu  
Thr  
Áspid  
Thr  
Gly  
Gly  
Ser  
Pro  
Phe  
Phe  
Reunió  
Teu  
pared  
Ile  
Su  
Glin  
Teu  
Ile  
Arg  
Gly  
pared  
Teu  
Teu  
Phe  
Ile  
Su  
Ser  
Trp  
Áspid  
Ser  
Glu  
Ser

104

Áspid  
Su  
Ser  
Asn  
sesenta y cinco  
Ile  
pared  
Ser  
Asn  
Gly  
145  
Phe  
Gly

Phe  
Teu  
Gly  
225  
Ala  
Teu  
Thr  
Ser  
Phe  
305  
Asn  
pared  
Ser  
pared  
Áspid  
385  
Glin  
Reunió  
Arg  
Thr  
Áspid  
50  
pared  
Pro  
pared  
pared  
Phe  
130  
Thr  
Glu  
Asn  
Telu  
Pro  
210  
Ile  
Glin  
Áspid  
pared  
29 0  
Arg  
Telu  
pared  
Ser  
370  
Ser  
Thr  
Gly  
Cys  
Ser  
35  
Thr  
Thr  
Phe  
Arg  
Ile  
115  
Glu  
Glin  
Phe  
Tyr  
195  
Ser  
Asn  
Áspid  
Pro  
Ala  
275  
Ala  
Telu  
355  
Ala  
Phe  
Gly  
Cys  
Thr  
Ser  
Telu  
Gly  
Lys  
Gly  
100  
Ile  
Telu  
Thr  
Ile  
Lys  
180  
pared  
Gly  
Ile  
Ile

Thr  
260  
pared  
Ser  
pared  
Pro  
Trp  
340  
Tyr  
Thr  
pared  
pared  
pared  
420  
Thr  
Reunió  
Tyr  
Phe  
85  
Trp  
Ile  
Cys  
Su  
Ser  
1,65  
Su  
Tyr  
Phe  
Thr  
Trp  
245  
Thr  
Áspid  
Phe  
Pro  
Phe  
325  
Glu  
Asn  
Lys  
pared  
Ile  
405  
Teu  
Phe  
Arg  
Teu  
Su  
70  
Gly  
pared  
Asn  
Áspid  
Thr  
15 0  
Áspid  
Teu  
Lys  
Asn  
Asn  
230  
Gly  
Phe  
Cys  
Glu  
Ser  
310  
Gly  
Ser  
Teu  
Lys  
390  
Ala  
Ala

105

Gly  
Thr  
55  
Thr  
Ile  
Phe  
Asn  
Asn  
135  
Reunió  
Ala  
Arg  
Gly  
Thr

215  
Phe  
Thr  
Reunió  
Ser  
Ile  
295  
Gly  
Glu  
Lys  
Thr  
Asn  
375  
Gly  
Trp  
Áspid  
pared  
40  
Glin  
Ile  
Gly  
Ser  
120  
Pro  
Ile  
Phe  
Glu  
Tyr  
200  
Telu  
Arg  
Ser  
Telu  
Glin  
280  
Áspid  
Áspid  
pared  
Phe  
360  
Áspid  
Áspid  
Asn  
pared  
25  
Áspid  
Asn  
Phe  
Ser  
105  
Thr  
Phe  
Phe  
Ser  
Phe  
185  
Glin  
Ala  
Ala  
Lys  
265  
Asn  
pared  
Phe  
Ile  
345  
Phe  
Telu  
Áspid  
Asn  
Thr  
425  
10  
Glin  
Tyr  
Telu  
Su  
Ala  
90  
Thr  
Asn  
Phe  
Áspid  
Telu  
170  
pared  
Pro  
Pro  
Ile  
Ala  
250  
Pro

Gly  
pared  
Asn  
330  
Ser  
Ser  
Cys  
pared  
Tyr  
410  
Arg  
Ala  
Pro  
Phe  
Thr  
75  
Ala  
Reunió  
pared  
Ala  
Asn  
155  
Áspid  
Phe  
Ile  
Ile  
Teu  
235  
Ala  
Áspid  
Teu  
Ile  
Arg  
315  
Ala  
Asn  
Thr  
Phe  
Arg  
395  
Asn

US 7.220.852 B1

-continuado

Pro  
Áspid  
Teu  
60 60  
Phe  
Thr  
Asn  
pared  
pared  
1 4 0  
Ala  
pared  
Áspid  
Phe  
220  
Thr  
Glu  
Ala  
Tyr  
Phe  
Thr  
Phe  
Ser  
Glin  
Teu  
Ile  
Asn  
Glu  
45  
Pro  
Gly  
Glu  
Asn  
Ile  
125  
Ser  
Phe  
Ser  
Asn  
pared  
Ala  
Phe  
Asn  
Glu  
285  
Glin  
Pro  
pared

Lys  
365  
Asn  
Ile  
Pro  
Áspid  
Tyr  
30  
Ile  
Phe  
Asn  
Lys  
110  
Arg  
Asn  
Glu  
Lys  
19 O  
pared  
Telu  
Phe  
pared  
Gly  
27 O  
Telu  
Thr  
Asn  
Phe  
Ala  
35 O  
pared  
Ala  
Áspid  
Ala  
43 O  
15  
Thr  
Phe  
Pro  
Ser  
95  
Ser  
Ala  
Pro  
Lys  
175  
Áspid  
Arg  
Pro  
Ser  
Gly  
255  
Thr  
Ser  
Ile  
Pro  
335  
Áspid  
Pro  
Áspid  
415  
Thr  
Glin  
Arg  
Ser  
pared  
Asn  
Glin  
Reunió  
Thr  
160  
Ser  
Gly  
Áspid  
Telu  
Pro  
240  
Tyr  
Ile  
Asn  
Thr  
320  
Ser  
Gly  
Ala  
Gly  
400  
Phe  
Ser

Thr  
Arg  
Lys  
465  
pared  
Pro  
Phe  
Phe  
545  
Ser  
Ser  
Glu  
Ala  
Gly  
625  
Su  
Ser  
Thr  
705  
Asn  
Glin  
Ala  
Glin  
Ser  
785  
Glu  
Gly  
Pro  
450  
Pro  
Gly  
pared  
Asn  
530  
Glin  
pared  
Phe  
pared  
Ile  
610  
Asn  
pared  
Ala  
Ile  
Ser  
69 O.  
Thr  
Reunió  
Ala  
Reunió  
770  
Glin  
Áspid  
Glin  
Ala  
Asn  
435  
Phe  
Phe  
Telu  
Telu  
515  
Gly  
Pro  
Arg  
Gly  
Ala  
595  
Su  
Asn  
Áspid  
Ser  
pared  
675  
Asn  
Glu  
Gly  
Glu  
755  
Ile  
Telu  
Tyr  
Glin  
835  
Tyr  
Glu  
Thr

Tyr  
Ser  
5 00  
Ser  
Telu  
Phe  
Áspid  
Gly  
pared  
Ala  
pared  
Thr  
Tyr  
660  
Ala  
Asn  
pared  
Ile  
Ser  
740  
Glin  
Lys  
Telu  
Telu  
Gly  
820  
Lys  
Asn  
Pro  
Thr  
485  
Phe  
Thr  
Thr  
Glin  
Pro  
565  
pared  
Teu  
Phe  
Ser  
645  
Su  
Tyr  
Thr  
Reunió  
Cys  
725  
Phe  
Thr  
Pro  
Phe  
805  
Glu  
Phe  
Tyr  
Áspid  
Pro  
470  
Thr  
Glu  
Áspid  
Gly  
Glin  
Glin  
550  
Lys  
Ser  
Tyr  
Glin  
Glin  
630  
Tyr  
Thr  
Thr  
Ile  
Pro  
710  
Gly  
Cys  
Pro  
Áspid  
790  
Asn  
Cys  
Asn  
107  
Lys  
Ile  
455  
Ala

Thr  
Teu  
Teu  
Thr  
535  
Phe  
Thr  
pared  
Glin  
Teu  
615  
Thr  
Glu  
pared  
Reunió  
Ala  
695  
pared  
Áspid  
Thr  
Asn  
Thr  
775  
Pro  
Teu  
Gly  
Tyr  
4 40  
Ser  
Telu  
Gly  
Telu  
Ile  
Gly  
Gly  
Ser  
Ile  
Áspid  
600  
Thr  
Glin  
Cys  
Ser  
Ser  
680  
Ile  
Ser  
Ser  
Glin  
Thr  
760  
Telu  
Telu  
pared  
Gly  
Telu  
840  
Arg  
Asn  
Asn  
Ile  
Asn  
505  
Lys  
pared  
Arg  
Glu  
Thr  
585  
pared  
Pro  
Ala  
Telu  
665  
Telu  
Pro  
Reunió  
Thr  
Telu  
745  
Arg  
Lys  
Lys  
Thr  
Áspid  
825  
Thr  
Tyr  
pared  
Gly  
490  
Ala

Asn  
Telu  
Áspid  
Ile  
570  
Pro  
Asn  
Ala  
Gly  
Ile  
650  
Telu  
Gly  
Thr  
Ala  
Glu  
730  
Asn  
Glu  
Pro  
Telu  
810  
Ile  
pared  
Teu  
Pro  
Tyr  
475  
Tyr  
Pro  
Glin  
Thr  
pared  
555  
Teu  
Gly  
Cys  
Trp  
Cys  
635  
Pro  
Arg  
Ala  
Asn  
Lys  
715  
Cys  
Arg  
pared  
Phe  
Thr  
795  
Ala  
Asn  
Teu

US 7.220.852 B1

-continuado

Arg  
Phe  
460  
Trp  
Glin  
Ala  
Pro  
540  
Ser  
Áspid  
Thr  
Thr  
Arg  
Teu  
Ile  
Ser  
Áspid  
Phe  
7 00  
Thr  
Ala  
Ala  
Phe  
Gly  
Áspid  
Ala  
Pro  
Su  
4 45  
Ser  
Pro  
Pro

Thr  
pared  
525  
Ser  
Áspid  
Ile  
Asn  
Áspid  
605  
Ile  
Ile  
Gly  
Thr  
Ser  
685  
Ser  
Ser  
Asn  
Teu  
Ala  
765  
Gly  
Arg  
Ala  
Arg  
Pro  
845  
Gly  
Pro  
Telu  
pared  
510.  
Asn  
Ser  
Phe  
Ser  
Ala  
59 O  
pared  
Gly  
Ala  
Ser  
67 O  
Ser  
Ile  
pared  
Telu  
Ser  
750  
Glin  
Phe  
Ser  
Gly  
Áspid  
Telu  
Lys  
Áspid  
Asn  
Arg  
495  
Thr  
Pro  
575  
Ser  
Ser  
Ser  
Ala  
Gly  
655  
Glin  
Ile  
Ser  
Áspid  
Telu  
735  
Gly  
pared  
Asn  
Phe  
Phe  
815  
Telu  
Telu  
Telu  
Gly  
Áspid  
480  
pared  
Gly  
Asn  
Arg

Áspid  
560  
Ser  
Thr  
Thr  
Glu  
640  
Ile  
Ala  
Ile  
Cys  
720  
Telu  
Ile  
Phe  
Ile  
800  
Reunió  
Ile  
Thr

108

---

Page 63

Áspid  
Thr  
865  
Ala  
pared  
Ile  
pared  
945  
Áspid  
Arg  
Glin  
Thr  
Phe  
Pro  
Glu  
Ala  
Trp  
Thr  
Ile  
Ser  
Pro  
pared  
Asn  
Glu  
Ala  
Reunió  
Ser  
Gly  
Áspid  
85 0  
Ala  
Reunió  
Telu  
Ser  
Telu  
930  
Ile  
Telu  
Telu  
Lys  
0 10  
Reunió  
Gly  
Glin  
Glin  
915  
Glin  
Glin  
Telu  
Ile  
Ile  
995  
Reunió  
Gly  
Gly  
Asn  
Phe  
Ile  
Asn  
Asn  
pared  
Ile  
Asn  
Teu  
Ser

-continuado

Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Leu Val Ser Gly Thr Ala  
855  
860  
Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe  
870  
875  
880  
Conoci a Ala Tyr Arg Phe Asin Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn  
885  
890  
895  
Glu Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn. Gln Phe Asn Lys Ala  
9 00  
905  
910  
Ile Gln Glu Ser Leu Thir Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly  
920  
925  
Asp Val Val Asn. Gln Asn Ala Gln Ala Lieu. Asn. Thir Lieu  
935  
940  
Leu Ser Ser Asn. Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Lieu. Asn  
950  
955  
96.0  
Ser Arg Lieu. Asp Llys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp  
965  
970  
975  
Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln  
980  
985  
99 0  
Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Lieu Ala Ala  
10 00  
1005  
Ser Glu Cys Wall Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp  
015  
020  
Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ala Ala  
030  
035  
Val Val Phe Leu. Su Val Thr Tyr Val Pro Ser Gln  
045  
05 0  
Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His Glu Gly Lys  
060  
065  
Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Phe Asn Gly. Thir Ser  
075  
080  
Thr Gln Arg Asin Phe Phe Ser Pro Gln Ile Ile Thr  
09 0  
095  
Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly  
05  
10  
Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Lieu. Áspid  
20  
25  
Glu Glu Lieu. Asp Llys Tyr Phe Lys Asn Su Thr Ser  
35  
40  
Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val  
5 0  
55  
Gln Lys Glu e Asp Arg Lieu. Asn. Glu Val Ala Lys  
sesenta y cinco  
70  
Glu Ser Lieu e Asp Leu Gln Glu Lieu Gly Lys Tyr  
80  
85  
Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Val Trp Leu Gly Phe Ile  
95  
200  
Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Leu Leu Cys Cys  
210  
215  
Cys Cys Ser Cys Lieu Lys Gly Ala Cys Ser Cys Gly  
225  
230  
Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val Lieu Lys  
240  
245

Leu Su Tyr Thr  
US 7.220.852 B1  
110

<400  
1250  
PRT  
SECUENCIA:  
Met Asp Leu Phe  
1  
Pro  
Ala  
Gly  
Teu  
sesenta y cinco  
Teu  
Tyr  
145  
Asn  
Thr  
Arg  
Glu  
Ile  
225  
Pro  
Pro  
Pro  
<400  
pared  
Thr  
pared  
50  
Asn  
Asn  
Ala  
Phe  
Cys  
130  
Phe  
Ser  
Pro  
Su  
pared  
210  
Glu  
Asn  
Ala  
Telu  
Lys  
Ile  
35  
Ala  
Telu  
Ala  
Telu  
115  
Trp  
pared  
pared  
Ser  
195  
Asn  
pared  
Reunió  
Ile  
Pro  
Phe  
Arg  
Telu  
Gly  
100  
Glin  
Thr  
Telu  
180  
Gly  
Ala  
Glin  
Áspid  
260  
PRT  
SECUENCIA:  
SEC ID N° 5  
LONGITUD  
TIPO  
ORGANISMO: Coronavirus

274  
5 5  
Reunió  
5 5  
Áspid  
Teu  
Teu  
Trp  
Teu  
85  
Reunió  
Cys  
Cys  
Trp  
Áspid  
1,65  
Lys  
pared  
Glin  
Thr  
Ile  
245  
Pro  
SEC ID N° 6  
LONGITUD  
TIPO  
ORGANISMO: Coronavirus  
154  
6 6  
Arg  
Asn  
Glin  
Ala  
Glin  
70  
Teu  
Glu  
Ile  
Lys  
Su  
15 0  
Thr  
Glu  
Lys  
Teu  
Phe  
230  
Su  
Ile  
**111**  
1255  
Phe Phe  
Ala Ser  
Ala Ser  
40  
Wall Phe  
55  
Leu Ala  
Phe Wall  
Ala Glin  
Asn Ala  
120  
Ser Lys  
135  
Thir His  
Ile Wall  
200  
Glu Ser  
215  
Phe Ile  
Thir Ile  
Tyr Asp  
Met Met Pro Thir Thr Leu Phe Ala  
1  
5 5  
Val Tyr His Ile Thr Val Ser Glin  
Thr  
Pro  
25  
Telu  
Glin  
Telu  
Thr  
Phe  
105  
Cys  
Asn  
Asn  
pared  
Glin  
185

pared  
Thr  
Phe  
Áspid  
Glu  
265  
Telu  
10  
Ala  
Pro  
Ser  
Tyr  
Ile  
90  
Telu  
Arg  
Pro  
Tyr  
Thr  
170  
Ile  
pared  
Glin  
Asn  
Gly  
250  
Pro  
Gly  
Ser  
Phe  
Ala  
Lys  
75  
Ile  
Teu  
Áspid  
155  
Glu  
Gly  
pared  
Ile  
Lys  
235  
Ser  
Thr

US 7.220.852 B1

-continuado

Ser  
Thr  
Gly  
Thr  
60 60  
Gly  
Ser  
Teu  
Ile  
Teu  
1 4 0  
Gly  
Gly  
Su  
Thr  
220  
Teu  
Ser  
Thr  
Gly Thr His Ile  
10  
Ile Glin Leu Ser  
25  
Thr Ala Phe Gln Su Glin Asn Ser Lys Lys Thr Thr  
35  
40  
Ile  
pared  
Trp  
45  
Phe  
Su  
Reunió  
125  
Áspid  
Tyr  
Gly  
Thr  
pared  
Gly

Thr  
Thr  
Teu  
Lys  
45  
Thr  
Su  
30  
Telu  
Ile  
Glin  
Telu  
Ala  
110  
Arg  
Áspid  
Ile  
Gly  
Ser  
19 0  
Tyr  
Áspid  
pared  
Thr  
27 0  
Ala  
15  
Ala  
pared  
Ile  
Phe  
Telu  
95  
Telu  
Ala  
Pro  
Ile  
175  
Glu  
Phe  
Thr  
Áspid  
Ala  
255  
Ser  
Glin  
Thr  
Ile  
Ala  
Ile  
Telu  
Ile  
Trp  
Asn  
Tyr  
160  
Ser  
Áspid  
Thr  
Gly  
Pro  
240  
Asn  
pared  
Met Thir Thr  
15  
Lieu Lys Wal  
30  
Leu Wal Wall  
112

Ile  
Ala  
sesenta y cinco  
Glin  
Teu  
Glu  
Teu  
Thr  
145  
<400  
Telu  
50  
Ile  
Thr  
Lys  
Telu  
Telu

130  
Su  
Ser  
Telu  
Thr  
Telu  
115  
Ala  
Ser  
Ile  
Pro  
pared  
Su  
100  
Ile  
Ile  
Cys  
Phe  
PRT  
SECUENCIA:  
Gly  
Lys  
Teu  
85  
Arg  
Glin  
Teu  
SEC ID N° 7  
LONGITUD 76  
TIPO  
ORGANISMO: Coronavirus  
7 7  
Thr  
Phe  
70  
Lys  
Reunió  
Glin  
Cys  
Lys  
15 0  
Met Tyr Ser Phe Val Ser  
1  
pared  
Ile  
pared  
Teu  
sesenta y cinco  
<400  
Telu  
Telu  
Ser  
50  
Asn  
Telu  
Thr  
35  
Telu  
Ser  
Phe  
Ala  
pared  
Ser  
PRT  
SECUENCIA:  
Conocí a Ala Asp Asn  
1  
Glu  
Teu  
pared  
sesenta y cinco  
Ile  
Ala  
Pro  
Thr  
Glin  
Telu  
Telu  
50  
Telu  
Ala  
Ser  
Glu  
Arg  
130  
Trp  
Glin  
35  
pared  
Ala  
Reunió  
Phe  
Thr  
115

Pro  
Asn  
Phe  
Phe  
Ala  
Ala  
Arg  
100  
Asn  
Telu  
5 5  
Teu  
Teu  
Lys  
Glu  
SEC ID N° 8  
LONGITUD 22  
TIPO  
ORGANISMO: Coronavirus

1  
8  
Gly  
5 5  
Teu  
Ala  
Teu  
pared  
Cys  
85  
Teu  
Ile  
Reunió  
Ala  
Arg  
Pro  
Gly  
70  
Thr  
pared  
Tyr  
Trp  
Tyr  
70  
Ile  
Phe  
Teu  
Glu

113

Glin  
55  
Thr  
Reunió  
Cys  
Trp  
Lys  
135  
Lys  
Glu  
Phe  
Teu  
Thr  
55  
pared  
Ile  
Ile  
Ser  
Teu  
55  
Arg  
pared  
Ala  
Teu  
Ser  
135  
pared  
Thr  
Telu  
Lys  
Ile  
120  
Su  
Glin  
Glu  
pared  
Cys  
40  
pared  
Pro  
Thr  
Gly  
Asn

40  
Telu  
Ile  
Gly  
Asn  
120  
Glu  
Telu  
Ser  
Su  
Tyr  
105  
Glin  
Lys  
pared  
Thr  
pared  
25  
Ala  
Tyr  
Áspid  
pared  
Phe  
25  
Arg  
Trp  
Asn  
Telu  
Thr  
105  
pared  
Telu  
Lys  
Telu  
Ser  
90  
Thr  
Phe  
Arg  
Gly  
10  
Phe  
pared  
Telu  
Glu  
10  
Telu  
Asn  
Pro  
Trp  
Reunió  
90  
Pro  
pared  
Thr  
Ser  
75  
Ser  
Glin  
Reunió  
pared  
Thr  
Teu  
Teu  
75  
Glu  
Phe  
Arg  
pared  
pared  
75  
Trp  
Ser  
Teu  
Ile

US 7.220.852 B1

-continuado

Reunió  
60 60  
Teu  
Ser  
Ser  
Reunió  
Ser  
1 4 0  
Teu  
Teu  
Ser  
60 60  
pared  
Teu  
Teu

Phe  
Thr  
60 60  
Thr  
Teu  
Reunió  
Arg  
Gly  
1 4 0  
Ser  
Su  
Teu  
Thr  
Ser  
125  
Thr  
Ile  
pared  
Asn  
45  
Arg  
Ala  
Teu  
45  
Teu  
Gly  
Ser  
Trp  
Gly  
125  
Ala  
Telu  
Thr  
Ala  
110  
Arg  
Asn  
pared  
Thr  
30  
Ile  
pared  
Glin  
Trp  
30  
Ala  
Gly  
Ser  
110  
Thr  
pared  
Tyr  
Telu  
Ser  
95  
Telu  
Arg  
Telu  
Asn  
15  
Telu  
pared  
Telu  
15  
Ile  
Ile  
Ile  
Phe  
95  
Phe  
Ile  
Ile  
Reunió  
Telu  
Telu  
Glin  
Arg  
Ser  
Ala  
Asn  
Asn  
Telu  
Reunió  
Ile  
Phe  
Ala  
pared  
Asn  
pared  
Ile

Arg Gl

145

115

y Su Leu Arg conoció a Ala

15 0

p Leu Pro Lys Glu Ile

1,65

Tyr Tyr Lys Lieu Gly Ala Ser

Ala Al

Su Al

21

&lt;400

180

un Tyr Asn Arg Tyr Arg

195

un Gly Ser Asn Asp Asn

0

215

SEC ID N° 9

LONGITUD 63

TIPO PRT

ORGANISMO: Coronavirus

SECUENCIA: 9

Met Phe His Leu Val Asp Phe

1

Ile Il

5 5

e Met Arg Thr Phe Arg

20

Ile Ser Ser Ile Val Arg Gln

35

Tyr Ser Glu Lieu. Asp Asp Glu

50

&lt;400

55

SEC ID N° 10

LONGITUD 122

TIPO PRT

ORGANISMO: Coronavirus

SECUENCIA: 10

Met Lys Ile Ile Leu Phe Leu

1

5 5

Leu Tyr His Tyr Glin Glu Cys

Glu Pro Cys Pro Ser Gly. Thr

35

Leu Ala Asp Asn Lys Phe Ala

50

55

Phe Ala Cys Ala Asp Gly Thr

sesenta y cinco

70

Ser Val Ser Pro Lys Leu Phe

85

Leu Tyr Ser Pro Leu Phe Leu

100

Lugar. Cys Phe Thir Ile Lys Arg

&lt;400

115

SEC ID N° 11

LARGO 84

TIPO PRT

ORGANISMO: Coronavirus

SECUENCIA: 11

Gly

Thr

Glin

Ile

200

Ile

Glin

Ile

Telu

40

Glu

Thr

pared

Tyr

40

Telu

Arg

Ile  
Ile  
Lys  
120  
Su  
pared  
Arg  
185  
Gly  
Ala  
pared  
Ala  
25  
Phe  
Pro  
Telu  
Arg  
25  
Glu  
Thr  
Su  
Arg  
pared  
105  
Thr  
Pro  
Ala  
170  
pared  
Asn  
Telu  
Thr  
10  
Ile  
Lys  
Reunió  
Ile  
10  
Gly  
Gly  
Cys  
Thr  
Glin  
90  
Ala  
Glu  
Teu  
155  
Thr  
Gly  
Teu  
Ile  
Trp  
Pro  
Glu  
pared  
Thr  
Asn  
Thr  
Tyr  
75  
Glu  
Ala

US 7.220.852 B1

-continuado

Gly Arg Cys Asp Ile

160

Ser Arg Thr Leu Ser

175

Thr Asp Ser Gly Phe

190

Lys Lieu. Asn. Thir Asp

205

Wall Glin

220

Ala Glu Ile Lieu. Ile

15

Asn Lieu. Asp Wal Ile

30

Lugar. Thir Lys Lys Asn

45

Leu Asp Tyr Pro

60 60

Phe Thr Ser Cys Glu

15

Thr Val Lieu Lleu Lys

30

Ser Pro Phe His Pro  
45  
Ser Thr His Phe Ala  
60 60  
Glin Leu Arg Ala Arg  
80  
Glu Wall Glin Glin Glu  
95  
Leu Wall Phe Leu. Ile  
110  
Conoci a Cys Lieu Lys Ile Lieu Val Arg Tyr Asn. Thr Arg Gly Asn. Thir Tyr  
1  
5 5  
10  
15  
116

Ser  
Trp  
Glin  
Glu  
sesenta y cinco  
Lys  
<400  
Thr  
Su  
Áspid  
50  
Gly  
Arg  
Ala  
Thr  
35  
Pro  
Su  
Thr  
Met Ser Asp  
1  
Thr  
Arg  
Asn  
Teu  
sesenta y cinco  
Pro  
Gly  
Glu  
Áspid  
145  
Glin  
Ser  
Gly  
Ala  
Teu  
225  
Glin  
Glin  
Áspid  
Phe  
Asn  
Thr  
50  
Arg  
Áspid  
Gly  
Telu  
Gly  
130  
Su  
Telu  
Arg  
Asn  
Arg  
210  
Áspid  
Glin  
Ala  
Glin  
29 0  
Gly  
Gly  
35  
Ala  
Phe

Áspid

Áspid

Gly

115

Ile

Ile

Pro

Gly

Ser

195

Reunió

Glin

Pro

Phe

275

Áspid

117

Trp Lieu. Cys Ala

Met Wall Glin Thr

Ala Gly Gly Ala

55

Glin Thr Ala Ala

Asn

SEC ID N° 12

LONGITUD 422

TIPO

ORGANISMO: Coronavirus

PRT

SECUENCIA: 12

Asn Gly

5 5

Gly Pro

20

Ala Arg

Ser Trp

Pro Arg

Glin Ile

85

Gly Lys

100

Thr Gly

Val Trp

Gly Thr

Glin Gly

1,65

Gly Ser

180

Arg Asn

Ala Ser

Lugar. Asn

Gly Glin

245

Arg Glin

260

Gly Arg

Lugar. Ile

70

Pro

Thr

Pro

Phe

Gly

70

Gly

Reunió

Pro

pared

Arg

15 0

Thr

Glin

Ser

Gly

Glin

230

Thr

Lys

Arg

Glin

Lys

Thr

55

Glin

Tyr

Lys  
Glu  
Ala  
135  
Asn  
Thr  
Ala  
Thr  
Gly  
215  
Teu  
pared  
Gly  
Glin  
295  
Telu  
Cys  
40  
Telu  
Phe  
Ser  
Ser  
Glin  
40  
Ala  
Gly  
Tyr  
Glu  
Ala  
120  
Thr  
Pro  
Telu  
Ser  
Pro  
200  
Gly  
Glu  
Thr  
Thr  
Pro  
280  
Gly  
Gly  
25  
Thr  
Ile  
Asn  
Thr  
25  
Arg  
Telu  
pared  
Telu  
105  
Ser  
Glu  
Asn  
Pro  
Ser  
185  
Gly  
Glu  
Ser  
Lys  
Ala  
265  
Glu  
Thr  
Lys  
Pro  
Ala  
Áspid  
Glin  
10  
Thr  
Pro  
90  
Ser  
Telu  
Gly  
Asn  
Lys  
170  
Arg  
Ser  
Thr  
Lys  
Lys  
250  
Thr

Glin  
pared  
Asn  
Arg  
pared  
75  
Arg  
Asn  
Pro  
Glin  
Ile  
75  
Ala  
Pro  
Pro  
Ala  
Asn  
155  
Gly  
Ser  
Ser  
Ala  
pared  
235  
Ser

US 7.220.852 B1

-continuado

Teu  
pared  
Cys  
60 60  
Teu  
Ser  
Asn  
Glin  
Su  
60 60  
Asn  
Thr  
Arg  
Teu  
1 4 0  
Ala  
Phe  
Ser  
Arg  
Teu  
220  
Ser  
Ala  
Glin  
Glin  
Lys  
300  
Pro  
Thr  
45  
Trp  
pared  
Ala  
Glin  
Gly  
45  
Gly  
Thr  
Trp  
Gly  
125  
Asn  
Ala  
Tyr  
Ser  
Gly  
Ala  
Gly  
Ala  
Tyr  
Gly  
285  
Su  
Phe  
30  
Ile  
Tyr  
pared  
Pro  
Asn  
30  
Telu

Lys  
Asn  
Arg  
Tyr  
110  
Ala  
Thr  
Thr  
Ala  
Arg  
19 O  
Asn  
Telu  
Lys  
Glu  
Asn  
27 O  
Asn  
Trp  
Su  
Asn  
Telu  
Telu  
Arg  
15  
Gly  
Pro  
Glu  
Ser  
pared  
95  
Phe  
Asn  
Pro  
pared  
Glu  
175  
Ser  
Ser  
Telu  
Gly  
Ala  
255  
pared  
Phe  
Pro  
Arg  
Su  
Ile  
Gly  
Asn  
Glu  
Gly  
Arg  
Telu  
160  
Gly  
Arg  
Pro  
Telu  
Glin  
240  
Ser  
Thr  
Gly  
Glin  
118

Ile  
305  
Ile  
Ala  
Teu  
Pro  
Glin  
385  
Reunió  
Ala

US 7.220.852 B1

119

-continuado

Ala Glin Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser  
310

315  
 Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr  
 325  
 330  
 Ile Lys Lieu. Asp Asp Lys Asp Pro Glin Phe Lys Asp  
 340  
 345  
 Lugar. Asn Lys Su Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro  
 355  
 360  
 365  
 Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Thr Asp Glu Ala Glin  
 370  
 375  
 380  
 Arg Glin Lys Lys Gln Pro Thr Val Thr Leu Leu Pro  
 390  
 395  
 Asp Asp Phe Ser Arg Glin Leu Glin Asn. Ser Met Ser  
 405  
 410  
 Asp Ser Thr Glin Ala  
 420  
 <210> SEQ ID NO 13  
 <211 y LONGITUD 21  
 & 212> TIPO DE ADN  
 <213> ORGANISMO: secuencia artificial  
 Y 220s CARACTERÍSTICA  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
 <400 SECUENCIA: 13  
 citaa catgct taggataatg g  
 <210> SEQ ID NO 14  
 <211 y LONGITUD 21  
 & 212> TIPO DE ADN  
 <213> ORGANISMO: secuencia artificial  
 Y 220s CARACTERÍSTICA  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
 <400 SECUENCIA: 14  
 gcctcitcttg ttcttgctcg c  
 <210> SEQ ID NO 15  
 <211 y LONGITUD 21  
 & 212> TIPO DE ADN  
 <213> ORGANISMO: secuencia artificial  
 Y 220s CARACTERÍSTICA  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
 <400 SECUENCIA: 15  
 caggtaag.cg taaaactcat c  
 <210> SEQ ID NO 16  
 <211 y LONGITUD 22  
 & 212> TIPO DE ADN  
 <213> ORGANISMO: secuencia artificial  
 Y 220s CARACTERÍSTICA  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
 <400 SECUENCIA: 16  
 catgttggtggc ggctoactat en  
 <210> SEQ ID NO 17  
 & 2 11s LONGITUD 2.8  
 & 212> TIPO DE ADN  
 <213> ORGANISMO: secuencia artificial  
 Y 220s CARACTERÍSTICA  
 <223> OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
 Tyr  
 Asn  
 35 O  
 Pro  
 Pro  
 Ala  
 Gly  
 Su  
 335  
 pared  
 Thr  
 Telu  
 Ala  
 Ala  
 415  
 Arg  
 320  
 Gly  
 Ile  
 Glu  
 Pro  
 Áspid

400  
Ser  
21  
21  
21  
22

120

US 7.220.852 B1

121

-continuado  
<400 SECUENCIA: 17  
gacact atta gcataag cag ttgtagca  
<210> SEQ ID NO 18  
& 2 11s LONGITUD 27  
& 212> TIPO DE ADN  
<213> ORGANISMO: secuencia artificial  
Y 220s CARACTERÍSTICA  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
<400 SECUENCIA: 18  
ttaalaccagg toggaac atca toc ggtg  
<210 SEQ ID NO 19  
<211 y LONGITUD 22  
& 212> TIPO DE ADN  
<213> ORGANISMO: secuencia artificial  
Y 220s CARACTERÍSTICA  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
<400 SECUENCIA: 19  
ggagccttga atacacccaa ag  
<210> SEQ ID NO 20  
& 2 11s LONGITUD 17  
& 212> TIPO DE ADN  
<213> ORGANISMO: secuencia artificial  
Y 220s CARACTERÍSTICA  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
<400 SECUENCIA: 20  
gCacggtggC agcattg  
<210> SEQ ID NO 21  
<211 y LONGITUD 21  
& 212> TIPO DE ADN  
<213> ORGANISMO: secuencia artificial  
Y 220s CARACTERÍSTICA  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
<400 SECUENCIA: 21  
ccacattggc accogcaatc c  
<210> SEQ ID NO 22  
& 2 11s LONGITUD 19  
& 212> TIPO DE ADN  
<213> ORGANISMO: secuencia artificial  
Y 220s CARACTERÍSTICA  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
<400 SECUENCIA: 22  
caaacattgg cc.gcaaatt  
<210> SEQ ID NO 23  
<211 y LONGITUD 21  
& 212> TIPO DE ADN  
<213> ORGANISMO: secuencia artificial  
Y 220s CARACTERÍSTICA  
<223> OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
<400 SECUENCIA: 23  
caatgctgga cattccaaag a  
<210> SEQ ID NO 24

28  
27  
22  
17  
21  
19  
21

122

<400  
caca atttgc ticcaagtgcc totgca  
<400  
gaagtacat citggggctga g  
<400  
cc.gaagagct accogacg  
<400  
cittctittcatt ttgcc.gtoac caccac  
<400  
LARGO 26  
TIPO DE ADN  
ORGANISMO: Secuencia Artificial  
CARACTERÍSTICA:

123

US 7.220.852 B1

-continuado

OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.

SECUENCIA:  
SEQ ID NO  
LONGITUD 21  
TIPO DE ADN  
ORGANISMO: Secuencia Artificial  
CARACTERÍSTICA:

24

25

OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.

SECUENCIA:  
SEQ ID NO  
LONGITUD 18  
TIPO DE ADN  
ORGANISMO: Secuencia Artificial  
CARACTERÍSTICA:

25

26

OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.

SECUENCIA:  
SEQ ID NO  
LARGO 26  
TIPO DE ADN  
ORGANISMO: Secuencia Artificial  
CARACTERÍSTICA:

26

27

OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.

SECUENCIA:  
SEQ ID NO  
LONGITUD 24  
TIPO DE ADN  
ORGANISMO: Secuencia Artificial  
CARACTERÍSTICA:

27

28

OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.

SECUENCIA: 28  
agctciticct agcattatto actg

<400

caccacattt a atcgaggc

<400

SEQ ID NO  
LONGITUD 2.0  
TIPO DE ADN  
ORGANISMO: Secuencia Artificial  
CARACTERÍSTICA:

29

30

OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.

SECUENCIA:  
SEQ ID NO  
LONGITUD 22  
TIPO DE ADN  
ORGANISMO: Secuencia Artificial  
CARACTERÍSTICA:

29

30

OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.

SECUENCIA: 30  
26  
21

18 años

26

24

20

124

---

US 7.220.852 B1

125

-continuado  
tacctcg en cqtactcc.gc git  
<400  
SEC ID N° 31  
LONGITUD 23  
TIPO DE ADN  
ORGANISMO: Secuencia Artificial  
CARACTERÍSTICA:  
OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
SECUENCIA: 31  
tgtagg cact gattcaggitt ttg  
<400  
SEC ID N° 32  
LONGITUD 23  
TIPO DE ADN  
ORGANISMO: Secuencia Artificial  
CARACTERÍSTICA:  
OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
SECUENCIA: 32  
cggcgtgg a totattta en tta  
<400  
SEC ID N° 33  
LARGO 27  
TIPO DE ADN  
ORGANISMO: Secuencia Artificial  
CARACTERÍSTICA:  
OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
SECUENCIA: 33  
citgcatacaa cc.gctaccgt attgaa  
<400  
SEC ID N° 34  
LONGITUD 24  
TIPO DE ADN  
ORGANISMO: Secuencia Artificial  
CARACTERÍSTICA:  
OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
SECUENCIA: 34  
gggttgggiac tatcctaagt gtga  
<400  
EQ ID NO 35  
ENGLH 21  
ADN YPE  
ORGANISMO: Secuencia Artificial  
COMIDA  
Información adicional: oligonucleótido sintético.  
COMIDA  
NOMBRE / CLAVE: característica variada  
UBICACIÓN: (12) ... (12)  
OTRA INFORMACIÓN: ' ' n ' ' equivale a inosina.  
SECUENCIA: 35  
talacacaaa cnic catcatc. un  
<400  
SEC ID N° 36  
LONGITUD 19  
TIPO DE ADN  
ORGANISMO: Secuencia Artificial  
CARACTERÍSTICA:  
OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.  
SECUENCIA: 36  
agatttggac citgcgagcg  
22  
23  
23  
27  
24  
21  
19

126

US 7.220.852 B1

127

128

-continuado

<210 SEQ ID NO 37

& 2 11s LONGITUD 2.0

& 212> TIPO DE ADN

<213> ORGANISMO: secuencia artificial

Y 220s CARACTERÍSTICA

<223> OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.

<400 SECUENCIA: 37

gag.cggctgt citccacaagt

20

<210 SEQ ID NO 38

& 2 11s LONGITUD 23

& 212> TIPO DE ADN

<213> ORGANISMO: secuencia artificial

Y 220s CARACTERÍSTICA

<223> OTRA INFORMACIÓN: Oligonucleótido sintético.

<400 SECUENCIA: 38

ttctgacctgaaggctctgc gcg

23

Reclamamos:

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que consiste en secuencia de nucleótidos como se establece en SEQ ID NO: 1.

k. .

25