



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 294 679**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/08 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05706999 .9**

86 Fecha de presentación : **21.01.2005**

87 Número de publicación de la solicitud: **1706485**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2006**

54 Título: **Cápsidas vacías (VLPs(-VP4)) del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), su procedimiento de obtención y aplicaciones.**

30 Prioridad: **21.01.2004 ES 200400121**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

73 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Bionostra S.L.**

72 Inventor/es: **Rodríguez Aguirre, José Francisco;
Ruiz Castón, José;
González de Llano, María Dolores;
Oña Blanco, Ana María;
Abaitua Elustondo, Fernando;
Luque Buzo, Daniel y
Rodríguez Fernández-Alba, Juan Ramón**

74 Agente: **Arizti Acha, Mónica**

ES 2 294 679 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cápsidas vacías (VLPs(-VP4)) del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), su procedimiento de obtención y aplicaciones.

5

Campo de la invención

La invención se refiere a cápsidas virales vacías del virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV), con actividad inmunogénica frente a IBDV, constituidas por las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, a su producción mediante ingeniería genética y a sus aplicaciones, en particular, en la elaboración de vacunas frente a la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa causada por IBDV y en la elaboración de vectores para terapia génica.

10

Antecedentes de la invención

El virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), también conocida como enfermedad de Gumboro, pertenece a la familia *Birnaviridae*, infecta distintas especies aviares y es el responsable directo de una grave enfermedad inmunosupresora causante de importantes pérdidas económicas en la industria avícola mundial.

15

Las partículas de IBDV son icosaédricas, con una simetría T=13, carecen de envuelta y están formadas por una única capa proteica. Hasta el momento, las aproximaciones encaminadas a la obtención un modelo atómico para las partículas de IBDV han fracasado. Por ello, la información estructural disponible está basada en modelos tridimensionales generados a partir de imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica del virus purificado y de VLPs. En base a esos estudios, se ha comprobado que la superficie externa de la partícula está formada por un entramado continuo de 260 trímeros de la proteína VP2 (37 kDa) ordenados en cinco conformaciones diferentes. La cara interna de las partículas contiene 200 trímeros de la proteína VP3 (29 kDa), estos últimos, independientes entre sí, se encuentran unidos a la zona basal de los trímeros de VP2. Se ha sugerido que un tercer polipéptido, VP4 (28 kDa), también podría formar parte de las partículas, estando situado en la base de los pentámeros que forman los vértices de la estructura icosaédrica.

20

25

Los polipéptidos VP2, VP3 y VP4 se producen a partir del procesamiento proteolítico de un polipéptido precursor de un tamaño de 109 kDa. Este precursor se procesa auto-catalíticamente liberando los polipéptidos pVP2 (48 kDa), VP3 y VP4. El dominio VP4, que se localiza en la región central de la poliproteína, pertenece a la familia de las proteasas Lon y es el responsable del corte proteolítico. Los polipéptidos pVP2 y VP3 son los responsables directos del ensamblaje de las cápsidas. El producto pVP2 sufre un último corte en su extremo C-terminal antes de dar lugar a la forma madura de la proteína, VP2, que es la que se encuentra en las partículas purificadas (Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J. C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H. & Delmas, B. (2002). The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *Journal of Virology* 76:2393-2402). Este procesamiento de pVP2 es necesario para la correcta formación de las cápsidas y requiere de la presencia de VP3, aunque la proteasa responsable aún no ha sido identificada (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49).

30

35

40

Las vacunas convencionales empleadas para el control de la bursitis infecciosa se basan en el empleo de cepas, con diferentes grados de virulencia, del propio IBDV crecidas en cultivo celular o en huevos embrionados. Los extractos que contienen el material infeccioso son sometidos a procesos de inactivación química para producir vacunas inactivadas o bien son empleados de forma directa para producir vacunas vivas atenuadas (Sharma, J. M., Kim, I. J., Rautenschlein, S. & Yeh, H. Y. (2000). Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental and Comparative Immunology* 24:223-235; van den Berg TP, Etteradossi N, Toquin D, Meulemans G. 2000. *Rev Sci Tech* 2000, 19:509-543). Este último tipo de vacunas presenta los inconvenientes clásicos asociados con el empleo de vacunas vivas atenuadas, concretamente, el riesgo de mutaciones que reviertan la virulencia del virus o le hagan perder su inmunogenicidad.

45

50

Se han descrito vacunas sub-unidad recombinantes que contienen la proteína VP2 de IBDV expresada en diversos sistemas de expresión, por ejemplo, bacterias, levaduras o baculovirus, normalmente en forma de proteína de fusión. Los resultados obtenidos en ensayos de inmunización de pollos con dichas vacunas no han sido completamente satisfactorios.

55

Las cápsidas virales vacías o partículas pseudovirales (VLPs, del inglés "virus-like particles"), constituyen una alternativa al empleo de vacunas vivas atenuadas y de vacunas sub-unidad recombinantes. Las VLPs se obtienen por autoensamblaje de las sub-unidades constituyentes de la cápsida viral y mimetizan la estructura y propiedades antigénicas del virión nativo aunque carecen de material genético por lo que son incapaces de replicarse. Además de su aplicación con fines vacunales las VLPs pueden ser utilizadas como vectores de moléculas de interés biológico, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos o proteínas. A modo ilustrativo pueden citarse VLPs de parvovirus (US 6.458.362) o del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (US 6.602.705).

60

65

La morfogénesis es un proceso vital para el ciclo vírico que requiere de pasos sucesivos asociados a modificaciones en los polipéptidos precursores. Por ello, los virus han desarrollado estrategias que permiten la secuencial y

correcta interacción entre cada uno de sus componentes. Una de estas estrategias, utilizada con frecuencia por virus icosaédricos, es la utilización de polipéptidos provenientes de una única poliproteína como base de sus componentes estructurales. En estos casos, el adecuado procesamiento proteolítico de dicha poliproteína juega un papel crucial en el proceso de ensamblaje.

5

En trabajos previos se ha demostrado este principio para el ensamblaje de las cápsidas de IBDV (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). La expresión en células eucarióticas del gen codificador para la poliproteína de IBDV da lugar a la formación de VLPs totalmente indistinguibles morfológica y bioquímicamente de los viriones de IBDV. Asimismo, se ha comprobado que el ensamblaje de las cápsidas necesita únicamente de la síntesis y del correcto procesamiento de la poliproteína viral y es independiente de la presencia del genoma vírico o de otras proteínas codificadas por el genoma viral tales como VP5 y VP1.

10

Paralelamente a la formación de cápsidas, el producto VP4 de IBDV es capaz de autoensamblarse en estructuras tubulares de 20 nm de diámetro. Estos túbulos, conocidos como túbulos de tipo II, se co-purifican parcialmente con las partículas virales. Otros experimentos han demostrado que la obtención de VLPs de IBDV, utilizando para la expresión de la poliproteína baculovirus recombinantes (rBVs), es extremadamente ineficiente obteniéndose como resultado la acumulación de grandes cantidades de túbulos de tipo I en el citosol de las células infectadas (Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278:322-331; Chevalier, C., Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B. & Delmas, B. (2002). The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *Journal of Virology* 76:2384-2392). Recientemente se ha demostrado que esto es debido al corte proteolítico a que es sometida la proteína VP3 cuando es sintetizada en células de insecto. Dicha proteólisis se previene casi totalmente por la formación de complejos VP3/VP1 (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-6449).

15

20

25

Por tanto, los resultados obtenidos hasta la fecha a partir de la expresión de los genes de IBDV en distintos sistemas recombinantes ha permitido concluir que: (i) el proceso de ensamblaje es independiente de la presencia del material genético del virus, (ii) para el ensamblaje sólo son necesarios los polipéptidos codificados por el gen de la poliproteína, y (iii) el ensamblaje requiere de una interacción coordinada entre los péptidos pVP2 y VP3.

30

Sin embargo, no se conoce si la interacción pVP2/VP3 se establece entre dominios de VP2 y VP3 de la poliproteína precursora cuando aún no ha sufrido modificaciones, o si por el contrario, esta interacción ocurre tras el procesamiento del precursor. Además, la información actual no excluye la posibilidad de que VP4 pudiera jugar un papel relevante en la morfogénesis de la cápsida viral. De hecho, se han descrito VLPs de IBDV formadas por ensamblaje de las proteínas VP2, VP3 y VP4 de IBDV (US 6.528.063, US 5.788.970 y JP 5194597).

35

40

Por otro lado, la información acerca de la expresión de proteínas de IBDV mediante ingeniería genética en distintos modelos celulares es escasa. Se ha descrito la expresión de proteínas de IBDV en células de insecto, bacterias y levaduras. Jagadish *et al.* (Jagadish MN, Vaughan PR, Irving RA, Azad AA, Macreadie IG. (1990). Expression and characterization of infectious bursal disease virus polyprotein in yeast. *Gene* 9:179-186; Macreadie IG, Vaughan PR, Chapman AJ, McKern NM, Jagadish MN, Heine HG, Ward CW, Fahey KJ, Azad AA. (1990). Passive protection against infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast. *Vaccine* 8:549-552) describen la expresión de VP2 de IBDV en levaduras. Los resultados descritos indican que la expresión de la poliproteína viral en 2 especies de levadura, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pombe*, es muy ineficiente, acumulándose una gran variedad de productos proteicos de diferente masa molecular. El fracaso en la obtención de productos proteicos del tamaño esperado y la imposibilidad de detectar estructuras producidas por el ensamblaje de éstas fue atribuido a dos posibles causas: (i) una posible toxicidad de la proteasa de IBDV (VP4) en este sistema; y/o (ii) la ineficiencia del sistema de expresión para llevar a cabo una transcripción y/o traducción correcta de la poliproteína de IBDV. Recientemente, Pitcovski *et al.* (Pitcovski J., Gutter B, Gallili G, Goldway M, Perelman B, Gross G, Krispel S, Barbakov M, Michael A. (2003). *Vaccine* 21:4736-4743) han descrito la expresión de VP2 de IBDV en *Pichia pastoris* y la inmunización de pollos con un material que comprende la proteína recombinante (rVP2) en forma parcialmente purificada. En ningún caso se ha descrito la obtención en levaduras de VLPs de IBDV.

45

50

55

Un trabajo previo desarrollado por los inventores ha permitido establecer sistemas para la obtención de VLPs de IBDV empleando diferentes vectores de expresión eucariótica. Estos vectores han sido utilizados para la expresión de la poliproteína de IBDV en ausencia o presencia de la RNA polimerasa viral VP1. La caracterización bioquímica de las VLPs purificadas demuestra que contienen las proteínas pVP2, VP2 y VP3, cuando se expresa únicamente la poliproteína viral y las proteínas pVP2, VP2, VP3 y VP1 cuando se realiza la expresión simultánea de la poliproteína y la RNA polimerasa viral (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79: 1047-1054; Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278: 322-331; Maraver, A., *et al.*, (2003) citado *supra*; Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. &

60

65

Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73: 6973-6983). Sin embargo, no se han descrito previamente VLPs basadas únicamente en pVP2 y VP3 de IBDV, ni su potencial uso con fines vacunales o como vehiculizadoras de productos biológicos de interés.

5

Compendio de la invención

La invención se enfrenta con el problema de proporcionar nuevas vacunas eficaces y seguras frente al virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV).

10

La solución proporcionada por esta invención se basa en que es posible obtener VLPs de IBDV correctamente ensambladas mediante la expresión simultánea de los polipéptidos pVP2 y VP3 de IBDV como genes independientes y como única representación de las proteínas de IBDV en un sistema de expresión génica. Dichas VLPs están formadas por autoensamblaje de, únicamente, pVP2 y VP3 de IBDV, por lo que carecen de VP4 de IBDV, y, por ese motivo, se denominan VLP(-VP4) (singular) o VLPs(-VP4) (plural) en esta descripción. Dichas VLPs(-VP4) pueden ser utilizadas, por ejemplo, con fines terapéuticos o de diagnóstico, por ejemplo, en la elaboración de vacunas para proteger aves de la infección causada por IBDV o en la elaboración de vectores para terapia génica.

15

Los resultados obtenidos permiten concebir dos nuevas conclusiones al entendimiento del patrón de ensamblaje del IBDV: (i) las interacciones entre los polipéptidos pVP2/VP3 dan como resultado un ensamblaje eficiente de las partículas de IBDV sin necesidad de la expresión de la poliproteína completa, y (ii) el polipéptido VP4 no es necesario para la formación de la cápsida.

20

Estos resultados han permitido diseñar una nueva estrategia o procedimiento para la producción eficiente de VLPs de IBDV que contienen los elementos proteicos antigénicamente relevantes para inducir una respuesta inmune. Esta estrategia se basa en la utilización de un sistema o vector de expresión génica que permite la coexpresión de los polipéptidos pVP2 y VP3 como genes independientes y que evita la síntesis de la poliproteína precursora de dichos polipéptidos así como la presencia del polipéptido VP4 durante el proceso de ensamblaje de las cápsidas virales vacías.

25

En una realización particular, se describe la expresión y obtención de VLPs de IBDV, en particular, VLPs(-VP4), en células de insecto mientras que en otra realización particular dichas VLPs(-VP4) se obtienen en levaduras, con un rendimiento muy elevado y con un coste económico muy bajo.

30

Las vacunas obtenidas utilizando dichas VLPs(-VP4) presentan numerosas ventajas ya que, por una parte, se evita la manipulación de material altamente infeccioso, se previene el riesgo potencial de aparición de nuevos mutantes de IBDV y se elimina el uso de virus vivo en las explotaciones avícolas, previniéndose de este modo el riesgo de diseminación de cepas vacunales de IBDV al Medio Ambiente, y, por otra parte, permite el desarrollo de sistemas de diagnóstico diferencial para discriminar entre animales vacunados e infectados. Estos sistemas de diagnóstico se basan en la detección de anticuerpos frente a las proteínas VP2 y VP4. Los animales con IBDV desarrollan una fuerte respuesta humoral frente a ambas proteínas. Mientras que los animales inmunizados con VLPs(-VP4) solo presentan anticuerpos frente a la proteína VP2.

35

Por consiguiente, un objeto de la presente invención lo constituye una cápsida viral vacía de IBDV, VLP(-VP4), con actividad inmunogénica frente a la infección en IBDV, caracterizada porque está constituida por autoensamblaje de, únicamente, las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV.

45

Un aspecto adicional de esta invención se relaciona con un procedimiento para la producción de dichas VLPs (-VP4) de IBDV proporcionadas por esta invención, basado en la co-expresión génica de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV como dos genes independientes.

50

Los ácidos nucleicos, construcciones génicas, sistemas de expresión y células huésped desarrollados para la puesta en práctica de dicho procedimiento de producción de dichas VLPs(-VP4) de IBDV, así como su empleo para la producción de dichas VLPs(-VP4) de IBDV, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

55

Dichas VLPs(-VP4) de IBDV tienen la capacidad de inmunizar animales, en particular, aves, frente a la enfermedad aviar causada por el IBDV así como la capacidad de vectorizar o vehiculizar moléculas de interés biológico, por ejemplo, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. En una realización particular, dichas VLPs(-VP4) de IBDV pueden ser utilizadas en la elaboración de una vacuna para proteger aves frente al virus causante de la enfermedad aviar conocida como bursitis infecciosa (IBDV). Prácticamente cualquier ave, preferentemente aquellas especies aviares de interés económico, por ejemplo, pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices, avestruces, etc., pueden ser inmunizadas frente a la infección causada por IBDV con las vacunas proporcionadas por esta invención. En otra realización particular, dichas VLPs(-VP4) de IBDV pueden vehiculizar, en su interior, productos con actividad biológica, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, fármacos, etc., por lo que pueden ser utilizadas en la elaboración de vectores para terapia génica.

65

Por tanto, en otro aspecto adicional, la presente invención se relaciona con el empleo de dichas VLPs(-VP4) de IBDV, en la elaboración de medicamentos, tales como vacunas y vectores para terapia génica. Dichas vacunas y vectores constituyen aspectos adicionales de la presente invención. En una realización particular, dicha vacuna es una

vacuna útil para proteger aves de la infección causada por IBDV. En una realización concreta, dichas aves seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces, preferentemente, pollos.

Breve descripción de las figuras

5

Figura 1. (a) El diagrama esquematiza los pasos de procesamiento proteolítico necesarios para la formación de las proteínas maduras de la cápsida VP2 y VP3 a partir de la poliproteína precursora. (b) El diagrama refleja las diferentes construcciones genéticas derivadas de la poliproteína de IBDV descritas hasta el momento, así como las estructuras producidas mediante su expresión en diferentes sistemas heterólogos. Los números indican la posición correspondiente al primer y último residuo aminoacídico de la poliproteína presente en cada una de las construcciones. La parte inferior de la figura muestra imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de las estructuras obtenidas mediante expresión de las diferentes construcciones. La barra corresponde a 50 nm. Los datos han sido tomados de las siguientes referencias: Fernández-Arias *et al.*, (1998), citado *supra*; Maraver *et al.*, (2003), citado *supra*; Martínez-Torrecuadrada *et al.*, (2000), citado *supra*; Castón *et al.*, 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the t number for capsid assembly. *Journal of Virology* 75, 10815-10828.

15

Figura 2. *Análisis microscópico de células de insecto H5 que coexpresan pVP2 y VP3.* La distribución subcelular de las proteínas pVP2 y VP3 fue analizada mediante inmunomicroscopía confocal. Células infectadas con los rBVs FB/pVP2 (a), FB/VP3 (b), o FBD/pVP2-VP3 (c-e) fueron incubadas con suero de conejo anti-pVP2 y suero de rata anti-VP3. A continuación, las células fueron incubadas con suero de conejo anti-Ig de conejo acoplada a Alexa 488 (rojo) y con suero de cabra anti-Ig de rata acoplada a Alexa 594 (verde). Los núcleos se tiñeron con To-Pro 3 (azul). (e) Superposición de las imágenes mostradas en los paneles (c) y (d). Imágenes de microscopía electrónica correspondientes a secciones de células H5 infectadas con diferentes construcciones genéticas derivadas de la poliproteína de IBDV. (f) Imagen a baja magnificación de una célula H5 infectada con virus FB parental. El inserto corresponde a un detalle ampliado del área indicada por el recuadro. (g) Imagen a baja magnificación de una célula H5 infectada con el virus FBD/pVP2-VP3. El inserto corresponde a un detalle ampliado del área indicada por el recuadro. (h) Imagen de alta magnificación de una célula H5 infectada con el virus FBD/pVP2-VP3 que muestra en detalle la formación de estructuras de IBDV. (i) Imagen de alta magnificación de una célula BSC1 infectada con el virus vacunal recombinante VTLacOI/POLY mostrando estructuras similares a las detectadas en el panel (h). Las barras indican 600 nm (paneles f y g) y 200 nm (paneles h e i).

30

Figura 3. *Caracterización estructural y bioquímica de las estructuras derivadas de IBDV producidas en células de insecto co-infectadas con los baculovirus recombinantes (rBV) FB/pVP2 + FB/his-VP3.* Células co-infectadas con los rBV FB/pVP2 y FB/his-VP3, o infectadas con el virus FBD/Poly-VP1 o FB/pVP2 fueron empleadas para purificar estructuras derivadas de IBDV mediante centrifugación en gradientes de sacarosa. Los paneles (a), (b), y (c) muestran imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a la fracción 4 de los gradientes obtenidos a partir de las infecciones con FBD/Poly-VP1, FB/pVP2+FB/his-VP3, y FB/pVP2, respectivamente. El panel (d) muestra los resultados de un análisis mediante Western blot de los gradientes de sacarosa correspondientes a cultivos infectados con FBD/Poly-VP1 y FB/pVP2+FB/his-VP3, respectivamente. Los extractos totales (input) y las diferentes fracciones de los gradientes de sacarosa (la fracción F1 corresponde al fondo del gradiente) fueron analizadas mediante Western blot empleando sueros específicos frente a las proteínas VP1, pVP2, VP3, y VP4 de IBDV, respectivamente. Se indica la masa molecular en kDa de los polipéptidos inmunoreactivos.

40

Figura 4. *Caracterización bioquímica y estructural de VLPs de IBDV producidas en *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP.* Un cultivo de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP fue crecido a 30°C en medio suplementado con el inductor galactosa. A las 18 h el cultivo fue recogido y centrifugado. El sedimento resultante fue procesado mediante fraccionamiento en un gradiente lineal 25-50% de sacarosa. A) Análisis bioquímico de muestras correspondientes al sedimento antes de fraccionar (T) así como de las diferentes fracciones del gradiente de sacarosa. Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE y western blot empleando anticuerpos específicos frente a las proteínas VP3 (anti-VP3) y pVP2 (anti-pVP2). Las flechas indican las posiciones de las bandas inmunoreactivas correspondientes a las proteínas VP3-GFP (61 kDa) y pVP2 (48 kDa), respectivamente. B) El análisis estructural de las muestras obtenidas fue realizado mediante TEM. La imagen corresponde a una micrografía obtenida a partir de una alícuota correspondiente a la mezcla de las fracciones 7, 8 y 9 del gradiente de sacarosa. La muestra fue teñida con acetato de uranio y observada mediante TEM. La barra corresponde a 65 nm. C) Muestra de VLPs obtenidas mediante la expresión de la poliproteína de IBDV en células de mamífero mediante infección con el virus vacunal recombinante VT7/Poly (Fernández-Arias *et al.*, (1998), citado *supra*). La barra corresponde a 65 nm.

55

Descripción detallada de la invención

60

En un primer aspecto, la invención proporciona una *cápsida vacía del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV)*, en adelante VLP(-VP4) de la invención, caracterizada porque está constituida por ensamblaje de, únicamente, proteínas pVP2 de IBDV y proteínas VP3 de IBDV.

65

El término "IBDV", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a las diferentes cepas de IBDV pertenecientes a cualquiera de los serotipos (1 ó 2) conocidos [a título ilustrativo véase la revisión realizada por van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin D, Meulemans G., en *Rev Sci Tech* 2000 19: 509-43] y los términos "proteína pVP2 de IBDV" y "proteína VP3 de IBDV" se refieren a las diferentes formas de las proteínas pVP2 y VP3 representativas

ES 2 294 679 T3

de cualquiera de las mencionadas cepas de IBDV [NCBI protein databank], de acuerdo con la definición realizada por Sánchez y Rodríguez (1999) (Sánchez AB, Rodríguez JF. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. Virology. 1999 Sep 15; 262(1):190-199) así como proteínas sustancialmente homólogas a dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, es decir, proteínas cuyas secuencias de aminoácidos tienen un grado de identidad, respecto a dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

La proteína pVP2 de IBDV presente en la VLP(-VP4) de la invención puede ser cualquier proteína pVP2 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo, la proteína pVP2, longitud completa, de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136]

La proteína de VP3 de IBDV presente en la VLP(-VP4) de la invención puede ser cualquier proteína VP3 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo, la proteína VP3, longitud completa, de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136].

En una realización particular, las VLPs(-VP4) de la invención presentan un diámetro de 65-70 nm y un contorno poligonal indistinguible de las VLPs de IBDV obtenidas en otros sistemas de expresión (Figura 4C).

Las VLPs(-VP4) de la invención pueden obtenerse mediante la expresión simultánea de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, en células huésped apropiadas. Dichas células huésped apropiadas son células que contienen la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP3 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas. En una realización particular, dichas células huésped apropiadas son células transformadas, transfectadas o infectadas con un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de expresión que comprende una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP3 de IBDV, o bien, alternativamente, con un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína pVP2 de IBDV, y una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, en forma de 2 genes independientes. De forma más concreta, el ácido nucleico proporcionado por esta invención se caracteriza porque su secuencia de nucleótidos está constituida por (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV. Una característica del ácido nucleico proporcionado por esta invención es que carece de la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP4 de IBDV. Tal como se utiliza en esta descripción, el término “fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2” o “fase de lectura abierta correspondiente a la proteínas VP3 de IBDV” incluye, además de las secuencias de nucleótidos de dichas fases de lectura abierta, otras fases de lectura abiertas análogas a las mismas codificantes de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV. El término “análogo/a”, tal como aquí se utiliza, pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que puede ser aislada o construida sobre la base de la secuencia de nucleótidos codificantes de pVP2 y VP3 de IBDV, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. En general, una secuencia de nucleótidos análoga a otra secuencia de nucleótidos es sustancialmente homóloga a dicha secuencia de nucleótidos. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos, un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

En otro aspecto, la invención proporciona una *construcción génica* que comprende un ácido nucleico proporcionado por esta invención, es decir, un ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos está constituida por (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV. Dicha construcción génica carece de la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP4 de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona un *sistema o vector de expresión* seleccionado entre:

- a) un sistema de expresión que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV; y

- b) un sistema de expresión que comprende dos construcciones génicas, una primera construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y una segunda construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En una realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, en donde dicha construcción génica está operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En otra realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende (i) una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha primera construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, y (ii) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.

Los elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, presentes en el sistema de expresión proporcionado por esta invención incluyen promotores, que dirigen la transcripción de las secuencias de nucleótidos de interés a las que están operativamente enlazados, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc.

Prácticamente cualquier sistema o vector de expresión apropiado puede ser utilizado en la generación del sistema de expresión proporcionado por esta invención. A modo ilustrativo, dichos sistemas o vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos, o virus, que pueden contener, además, un origen de replicación heterólogo, por ejemplo, bacteriano o de levadura para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Estos sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de la presente invención. En una realización particular, dicho sistema o vector de expresión es un plásmido, tal como un plásmido adecuado para transformar levaduras, por ejemplo, el plásmido denominado pESCURA/pVP2-VP3-GFP (Ejemplo 2), o un virus, tal como un baculovirus recombinante (rBV), por ejemplo, el rBV denominado FBD/pVP2-his-VP3 (Ejemplo 1.2), que expresa durante su ciclo de replicación ambas proteínas (pVP2 de IBDV e his-VP3) simultáneamente en células de insecto, o los rBVs denominados FB/pVP2 y FB/his-VP3 (Ejemplo 1.1) que expresan las proteínas pVP2 de IBDV e his-VP3, respectivamente, cuando co-infectan células de insecto, obteniéndose VLPs(-VP4) de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona una *célula huésped* que contiene la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP3 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas diferentes. En una realización particular, dicha célula huésped es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con (i) un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende bien una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, o bien, alternativamente, con (ii) un sistema de expresión que comprende una construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y otra construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV.

En una realización particular, la célula huésped proporcionada por esta invención es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión que comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, en donde dicha construcción génica está operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.

En otra realización particular, la célula huésped proporcionada por esta invención es una célula huésped transformada, transfectada o infectada con una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha primera construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, y con una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta o región codificante correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.

ES 2 294 679 T3

Prácticamente cualquier célula huésped susceptible de ser transformada, transfectada o infectada por un sistema de expresión proporcionado por esta invención puede ser utilizada, por ejemplo, células de mamífero, células aviares, células de insecto, levaduras, etc.; no obstante, en una realización particular, dicha célula huésped se selecciona entre levaduras y células de insecto. Las levaduras son adecuadas por razones de simplicidad y coste de producción. Las células de insecto son adecuadas cuando el sistema de expresión comprende uno o dos baculovirus recombinantes (rBV). El empleo de rBV es ventajoso por cuestiones de bioseguridad relacionadas con el rango de huésped de los baculovirus, incapaces de replicar en otros tipos celulares que no sean de insecto.

En una realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, etc., transformada con un sistema de expresión, tal como un plásmido o un vector de expresión, que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

En otra realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una célula de insecto, infectada con un sistema de expresión, tal como un baculovirus recombinante, que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

En otra realización particular, la invención proporciona una célula huésped, tal como una célula de insecto, co-infectada con un sistema de expresión que comprende un primer baculovirus recombinante que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y con un segundo baculovirus recombinante que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP3 de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona un *procedimiento para la producción de VLPs(-VP4) de la invención* que comprende cultivar una célula huésped proporcionada por esta invención que contiene la secuencia de nucleótidos codificantes de dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de dicha proteína VP3 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas diferentes, y que expresa simultáneamente dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, y, si se desea, recuperar dichas VLPs(-VP4) de la invención. En una realización particular, dicha célula huésped proporcionada por esta invención es una célula transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión adecuado, tal como un sistema de expresión que comprende una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, o bien, alternativamente, con un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína pVP2 de IBDV y una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV.

Dicho procedimiento comprende, por tanto, la co-expresión génica de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV como dos genes independientes. Tras la expresión simultánea de dichas proteínas (pVP2 y VP3 de IBDV) en dichas células, las proteínas expresadas se ensamblan y forman las VLPs(-VP4) de la invención, las cuales pueden ser aisladas o retiradas del medio, y, si se desea, purificadas. El aislamiento y purificación de dichas VLPs(-VP4) de la invención puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante fraccionamiento en gradientes de sacarosa.

En una realización particular, la co-expresión génica de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV se realiza mediante el empleo de un rBV que permite la expresión simultánea de dichas proteínas a partir de dos genes quiméricos independientes en células de insecto. En este caso, la producción de VLPs(-VP4) de la invención puede realizarse mediante un procedimiento que comprende, en primer lugar, la obtención de un sistema de expresión génica constituido por un rBV que contiene una construcción génica que codifica simultáneamente para dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, tal como el rBV denominado FBD/pVP2-his-VP3 (Ejemplo 1.2) o bien, alternativamente, la obtención de un rBV que contiene una construcción génica que codifica para la proteína pVP2 de IBDV y la obtención de otro rBV que contiene una construcción génica que codifica para dicha proteína VP3 de IBDV, tales como los rBVs denominados FB/pVP2 y FB/his-VP3 (Ejemplo 1.1), seguido de la infección de células de insecto con dicho sistema de expresión basado en dicho(s) baculovirus recombinante(s), expresión de las proteínas recombinantes y, si se desea, aislamiento de las VLPs(-VP4) de la invención formadas por ensamblaje de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, y, opcionalmente, purificación posterior de dichas VLPs(-VP4) de la invención.

La construcción de un baculovirus recombinante que permite la expresión de forma independiente de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV se puede realizar por cualquier experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (Cold Spring Harbor, N.Y.; Leusch MS, Lee SC, Olins PO. 1995. A novel host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. *Gene* 160: 191-4; Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol* 67: 4566-79).

En otra realización particular, la co-expresión génica de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV se realiza mediante el empleo de un vector que permite la expresión de dichas proteínas en células de levadura. En este caso, la producción de VLPs(-VP4) de la invención puede llevarse a cabo mediante un procedimiento que comprende, en primer lugar, la

obtención de un sistema de expresión génica constituido por un plásmido que contiene una construcción génica que codifica simultáneamente para las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, seguido de la transformación de levaduras con dicho sistema de expresión, expresión de las proteínas recombinantes y, si se desea, aislamiento de las VLPs(-VP4) de la invención formadas por ensamblaje de dichas proteínas pVP2 y VP3 de IBDV, y, opcionalmente, purificación posterior de dichas VLPs(-VP4) de la invención. En una realización concreta, el sistema de expresión adecuado para transformar levaduras está basado en un sistema de expresión pESC Yeast (Stratagene) tal como, por ejemplo, el plásmido pESCURA/pVP2/VP3-GFP (Ejemplo 2) que contiene una construcción génica que codifica para las proteínas pVP2 de IBDV y VP3-GFP.

La obtención de levaduras transformadas con una construcción génica o con un sistema o vector de expresión apropiado que permite la expresión simultánea de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV se puede realizar por cualquier experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (pESC epitope tagging vectors Instructions manual. Stratagene www.stratagene.com; Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory).

En otro aspecto, la invención se relaciona con el *empleo del sistema de expresión génica* proporcionado por esta invención para la producción y obtención de VLPs(-VP4) de la invención.

Las VLPs(-VP4) de la invención pueden ser utilizadas para inmunizar animales, en particular, aves, *per se* o como vectores o vehiculizadores de moléculas con actividad biológica, por ejemplo, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, fármacos, etc., por lo que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o de diagnóstico. En una realización particular, dichas moléculas con actividad biológica incluyen antígenos o inductores de respuestas inmune en animales o humanos a los que se suministre, o bien fármacos que se liberan en su sitio de acción específico, o bien secuencias de ácido nucleico, todas ellas útiles en terapia génica y destinadas a ser introducidas en el interior de las células apropiadas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el *empleo de las VLPs(-VP4) de la invención en la elaboración de medicamentos* tales como, vacunas, vectores para terapia génica (delivery systems), etc. En una realización particular, dicho medicamento es una vacuna destinada a conferir protección a animales, en particular, aves, frente al virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV). En otra realización particular, dicho medicamento es un vector para terapia génica.

En otro aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de VLPs(-VP4) de la invención, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dicha vacuna es útil para proteger animales, en particular, aves, frente al virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV). En una realización particular, dichas aves se seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces. En una realización preferida, la vacuna proporcionada por esta invención es una vacuna útil para proteger pollos de la infección causada por IBDV.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de VLPs(-VP4) de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de las VLPs(-VP4) y el efecto de inmunización a conseguir.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas vacunas son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de vacunas.

En una realización particular, dicha vacuna se prepara en forma de una solución o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro diluyente farmacéuticamente aceptable.

La vacuna proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada que dé como resultado una respuesta inmune protectora frente a la secuencia heteróloga o epítipo utilizado, para lo cual dicha vacuna se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la vacuna proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

Ejemplo 1

Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 (pVPX) y VP3 en células de insecto

1.1 *Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 (pVPX) y VP3 con dos rBVs independientes en células de insecto*

En este ejemplo se describen los resultados de una serie de experimentos diseñados para analizar la posibilidad de obtener VLPs de IBDV a partir de una estrategia que evita la síntesis de la poliproteína de IBDV y, por tanto, la

presencia de la proteasa VP4 durante el proceso de ensamblaje. El diseño experimental se basa en la coexpresión de las proteínas pVP2 y VP3 de IBDV a partir de dos genes quiméricos independientes. Para ello, se han utilizado dos baculovirus recombinantes (rBVs) descritos previamente, FB/his-VP3 (Kochan, G., González, D. & Rodríguez, J. F. (2003). Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. *Archives of Virology* 148, 723-744) y FB/VPX [también identificado como FB/pVP2 en esta descripción] (Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. & Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278, 322-331). Estos rBVs fueron generados mediante el clonaje en vectores apropiados de los DNA complementarios (cDNAs) codificadores de las proteínas pVP2 y pVP3 de IBDV. Dichos cDNAs fueron obtenidos por RT-PCR a partir del segmento A del genoma de IBDV serotipo I cepa Soroa (número de acceso al NCBI, AAD30136). El rBV FB/his-VP3 expresa una proteína VP3 quimérica que en su extremo N-terminal contiene un tandem de 6 histidinas fusionadas a la secuencia de VP3 (Met754-Glu1012 de la poliproteína) denominada his-VP3. El rBV FB/pVP2 expresa la región codificadora de la proteína pVP2 (Met1-Ala512).

El análisis de la expresión de estas proteínas pVP2 y his-pVP3, bien de forma independiente o conjunta, se realizó en cultivos celulares. Para la realización de estos experimentos, se utilizaron cultivos en monocapa de células procedentes del insecto *Trichoplusia ni* (H5, Invitrogen) que fueron crecidos sobre cubreobjetos de cristal. Dichos cultivos fueron infectados independientemente con FB/pVP2, FB/his-VP3, o co-infectados con ambos rBVs. La multiplicidad de infección fue de 5 unidades formadoras de placa (ufp)/célula. A las 48 horas después de la infección (hpi) las células fueron fijadas, e incubadas con sueros policlonales de conejo anti-VP2 y con sueros policlonales de rata anti-VP3 (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). Después de sucesivos lavados, los cubreobjetos fueron incubados con sueros de cabra anti-rata conjugado con Alexa 594 y con sueros de cabra anti-conejo conjugado a Alexa 488 (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.). Los núcleos celulares fueron teñidos con el marcador específico To-Pro-3 (Molecular Probes, Inc.). Finalmente, las muestras se visualizaron por epifluorescencia con un microscopio Zeiss Axiovert 200 equipado con el sistema confocal Bio Rad Radiance 2100. Las imágenes obtenidas se almacenaron utilizando el equipo de software Laser Sharp Package (Bio Rad). Como se muestra en la Figura 2a, en los cultivos infectados con FB/pVP2 el suero anti-VP2 mostró una señal granular fina mezclada con estructuras tubulares ambas distribuidas en todo el citoplasma. La señal anti-VP3, detectada en las células infectadas con el rBV FB/his-VP3, se caracterizó por la presencia de acumulaciones de forma esférica alrededor del núcleo y, aparentemente, huecas. En los cultivos coinfectados con ambos rBV se detectó una notable modificación en el patrón de distribución de ambas proteínas. En estas células, las señales específicas de pVP2 y VP3 se colocalizaron en acumulaciones esféricas y densas, sugiriendo que su coexpresión permitía la formación de complejos pVP2/his-VP3 (Figura 2c a la 2e).

Con la intención de caracterizar estas estructuras en mayor detalle, extractos similares, correspondientes a células infectadas con FB/pVP2+FB/hisVP3 fueron analizados por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Como control, y en paralelo, se analizaron por la misma técnica cultivos de células H5 infectadas con la cepa silvestre del virus FBD (FastBacDual, Invitrogen). Después de la infección, las células fueron recogidas a las 48 h, y procesadas como se ha descrito previamente (Fernández-Arias A, Risco C, Martínez S, Albar JP & Rodríguez JF. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79:1047-1054) para su análisis en cortes ultrafinos por TEM. Como se muestra en la Figura 2, el citoplasma de las células coinfectadas contiene agregados formados por una mezcla de túbulos y estructuras similares a cápsidas (Figura 2g, 2h y 2i). Estos agregados no fueron observados en ningún caso en las muestras correspondientes a células infectadas con el virus silvestre FBD (Figura 2f). El aspecto y el tamaño de los túbulos, así como de las estructuras similares a cápsidas fue semejante a los descritos previamente en cultivos celulares infectados con VT7/Poly, un recombinante del virus vaccinia que expresa el gen de la poliproteína de IBDV (Fernández-Arias A, Risco C, Martínez S, Albar JP & Rodríguez JF. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79:1047-1054).

Para establecer de forma inequívoca que la coexpresión de pVP2 e his-VP3 permitía el ensamblaje y, por tanto, la obtención de VLPs-(VP4), se decidió purificar las partículas formadas. Para ello, se infectaron con FB/pVP2+FB/his-VP3 cultivos de células H5. 60 hpi, las células se homogeneizaron y los extractos se separaron en gradientes de sacarosa tal y como se ha descrito previamente (Lombardo E, Maraver A, Castón JR, Rivera J, Fernández-Arias A, Serrano A, Carrascosa JL & Rodríguez JF. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73:6973-6983). Después de su centrifugación, los gradientes fueron fraccionados, y las distintas fracciones fueron analizadas por TEM tal como se ha descrito previamente (Lombardo E *et al.*, citado *supra*). Como control, y sujetos al mismo procedimiento, se fraccionaron gradientes correspondientes a extractos de células infectadas con el rBV FB/VPX o con el rBV FBD/Poly-VP1. El virus recombinante FBD/Poly-VP1 expresa simultáneamente la poliproteína y el polipéptido VP1. Como era predecible, la infección con FBD/Poly-VP1 tenía como resultado una eficiente producción de VLPs (Maraver A, Oña A, Abaitua F, González D, Clemente R, Diaz-Ruiz A, Castón JR, Pazos F & Rodríguez JF. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49). Por otra parte, las fracciones correspondientes a las células infectadas con FB/VPX solamente contenían túbulos de aspecto retorcido. Los gradientes correspondientes a células coinfectadas con los rBVs FB/pVP2+FB/his-VP3 contenían túbulos rígidos de tipo I en las fracciones cercanas al fondo del gradiente, y VLPs-(VP4) en las centrales y en las fracciones superiores

(Figura 3b). Las VLPs-(VP4) aisladas de las células co-infectadas con rBV FB/pVP2+FB/his-VP3 tenían un diámetro de 65-70 nm, así como un contorno poligonal característico, absolutamente indistinguible de las VLPs purificadas de cultivos infectados con FBD/Poly-VP1 (Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Diaz-Ruiz, A., Caston, J. R., Pazos, F. & Rodríguez, J. F. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology* 77:6438-49) o de los cultivos infectados con VT7/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054).

Con la intención de conseguir una caracterización bioquímica del material obtenido, se realizaron experimentos de western-blot en los que las distintas fracciones se enfrentaron a sueros específicos contra las proteínas VP1, pVP2, VP3 y VP4 (Fernández-Arias *et al.* 1998, Lombardo *et al.*, 2000). Como control se utilizaron extractos de células infectadas con IBDV. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3d. Como se esperaba, las bandas correspondientes a los polipéptidos VP1 y VP4 sólo fueron detectadas en muestras correspondientes a células infectadas con FBD/Poly-VP1. Los patrones correspondientes a pVP2/VP3 en muestras correspondientes a células infectadas con FBD/Poly-VP1 o coinfectadas con FB/VPX+ FB/his-VP3 fueron similares, detectándose dos bandas correspondientes a pVP2 y VP3, respectivamente.

1.2 Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 (pVPX) y VP3 con un rBV en células de insecto

Además, se procedió a la construcción del plásmido pFBD/pVP2-his-VP3. El primer paso de la construcción se realizó mediante el clonaje de la región codificante de la proteína pVP2 en el vector pFBDual (Invitrogen). El fragmento de DNA correspondiente a pVP2 se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos identificados como Oligo I (SEQ ID NO: 1) y Oligo II (SEQ ID NO: 2) empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). El fragmento fue purificado, sometido a digestión con los enzimas BglII y HindIII y clonado en el vector pFBDual (Invitrogen) previamente digerido con los enzimas BamHI y HindIII. El plásmido resultante se denominó pFBD/pVP2. A continuación, se obtuvo un fragmento de DNA conteniendo la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 mediante digestión del plásmido pFB/his-VP3 (Kochan *et al.*, 2003, citado *supra*) con el enzima RsrII, tratamiento con Klenow, y posterior restricción con KpnI. Este fragmento de DNA fue purificado y clonado en el plásmido pFBD/pVP2 previamente digerido con los enzimas SmaI y KpnI. El plásmido resultante se denominó pFBD/pVP2-his-VP3 (SEQ ID NO: 3) y contiene la secuencia de nucleótidos codificante de las proteínas pVP2 e his-pVP3 (esta última está codificada por la cadena complementaria a los nucleótidos 6734-7585 de la SEQ ID NO: 3). La secuencia de aminoácidos de la proteína pVP2 y de la proteína de fusión his-VP3 (pVP2-his-VP3) codificada por la secuencia de nucleótidos contenida en dicho plásmido pFBD/pVP2-his-VP3 se muestra en la SEQ ID NO: 4.

El plásmido pFBD/pVP2-his-VP3 permite la obtención de un rBV, denominado FBD/pVP2-his-VP3, que expresa durante su ciclo de replicación ambas proteínas simultáneamente [<http://invitrogen.com/content/sfs/manuals/bevtest.pdf>].

Los resultados obtenidos con FBD/pVP2-his-VP3 son idénticos a los obtenidos mediante la coinfección con los rBVs FB/pVP2 y FD/his-VP3, obteniéndose VLPs(-VP4) de IBDV.

Ejemplo 2

Obtención de VLPs(-VP4) mediante la coexpresión de pVP2 y VP3 como dos genes independientes en levaduras

Con el fin de estudiar la posibilidad de obtener VLPs(-VP4) de IBDV en cultivos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se generó el vector pESCURA/pVP2-VP3-GFP con el gen heterólogo GFP unido al extremo N-terminal de VP3. El primer paso en la construcción del vector se realizó mediante el clonaje de la región codificante de la proteína pVP2 de IBDV en el vector pESCURAinv. El plásmido pESCURAinv se generó mediante digestión del vector pRS426 (Stratagene) con el enzima PvuII y religación de la mezcla de digestión. El vector resultante, pESCURAinv, contiene la región de clonaje múltiple en posición invertida con respecto a la del vector parental pRS426. El fragmento de DNA correspondiente a la proteína pVP2 se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos denominados Oligo III (SEQ ID NO: 5) y Oligo IV (SEQ ID NO: 6) empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). El fragmento fue purificado, sometido a digestión con los enzimas BglII y HindIII y clonado en el vector pESCURAinv previamente digerido con los enzimas BamHI y HindIII. El plásmido resultante se denominó pESCURA/pVP2.

El plásmido pFB/VP3-GFP fue construido en dos etapas. La primera consistió en el clonaje de un fragmento de DNA, generado mediante PCR, que contiene la ORF de la proteína VP3 de IBDV carente del codón de terminación. Esta PCR se realizó utilizando los oligonucleótidos denominados Oligo V (SEQ ID NO: 7) y Oligo VI (SEQ ID NO: 8) y empleando como molde el plásmido pVOTE.2/Poly (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054). El DNA resultante fue digerido con los enzimas

ES 2 294 679 T3

EcoRI y BamHI y clonado en el vector pEGFP-N3 (Clontech) también digerido con los mismos enzimas. El plásmido resultante se denominó pVP3-GFP. A continuación, el plásmido pEGFP-GFP fue digerido con los enzimas EcoRI y NotI y clonado en el vector pFastBac1 (Invitrogen). El plásmido resultante se denominó pFB/VP3-GFP.

5 A continuación, se obtuvo un fragmento de DNA que contenía la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV fusionada a la región codificante de la proteína EGFP mediante digestión del plásmido pFB/VP3-GFP con los enzimas EcoRI y NotI. Este fragmento de DNA fue purificado y clonado en el plásmido pESCURA/pVP2 previamente digerido con los enzimas EcoRI y NotI. El plásmido resultante se denominó pESCURA/pVP2-VP3-GFP (SEQ ID NO: 9) y contiene las ORFs de las proteínas pVP2 y VP3-GFP bajo el control transcripcional de dos promotores independientes, GAL 1 y GAL 10, ambos inducibles por galactosa (la proteína pVP2 está codificada por la cadena de nucleótidos complementaria a los nucleótidos 5862-7343 de la SEQ ID NO: 9). La secuencia de aminoácidos de la proteína pVP2 y de la proteína de fusión VP3-GFP (pVP2-VP3-GFP) codificada por la secuencia de nucleótidos contenida en dicho plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP se muestra en la SEQ ID NO: 10.

15 Posteriormente, pESCURA/pVP2-VP3-GFP se empleó para transformar un cultivo de la levadura *S. cerevisiae* haploide cepa 499 de acuerdo con un protocolo previamente descrito (Gietz, R.D. and R.A. Woods. (2002), Transformation of yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology* 350:87-96). Las levaduras transformadas con el plásmido fueron seleccionadas mediante crecimiento en placas de medio SC (CSM + YNB, glucosa 2% y bacto agar) suplementadas con los aminoácidos triptófano, leucina e histidina y carentes de uracilo (-Ura). Tras una incubación de 48 h a 30°C, se seleccionó una colonia que fue empleada para la realización de los subsiguientes análisis de expresión de proteínas y formación de VLPs-(VP4).

25 El análisis de la expresión de las proteínas pVP2 y VP3 y formación de VLPs-(VP4) se realizó siguiendo un protocolo descrito previamente para la caracterización de VLPs de IBDV en otros sistemas de expresión (Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. & Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 79, 1047-1054; Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). La colonia seleccionada fue cultivada en medio líquido CSM (-Ura) + YNB suplementado con rafinosa al 2%. El cultivo se incubó a 30°C durante 24 h. Este cultivo fue empleado para inocular, a una densidad óptica (D.O.) de 0,2, un matraz de 200 ml de medio CSM (-Ura) + YNB suplementado con el inductor galactosa al 2%. El cultivo fue mantenido a 30°C durante 18 horas (hasta una D.O. entre 1,0 y 2,0). Las levaduras fueron centrifugadas a 3.000 rpm, 5 minutos a 4°C, se lavaron con agua destilada una vez, y el pellet fue resuspendido en tampón de lisis (TEN: Tris 10 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM) + inhibidores de proteasas 2X (Compl Roche). Para la lisis se añadió un volumen de "glass beads" (cuentas o perlas de vidrio) de un tamaño aproximado de 425-600 micrones (Sigma). Esta mezcla fue sometida al vortex vigoroso durante 30 segundos 4 veces, con intervalos de 30 segundos, y todo ello a 4°C. Tras ello se recuperó la fracción soluble por centrifugación de la mezcla de lisis a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Esta muestra fue sometida a fraccionamiento en un gradiente de sacarosa de acuerdo con un protocolo previamente descrito (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). Las muestras obtenidas tras el fraccionamiento así como una muestra del material de partida fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) [Current Protocols in Molecular Biology] e inmunodetección por Western blot (Figura 4A) empleando sueros anti-pVP2 y anti-VP3 [Current Protocols in Molecular Biology]. Como se muestra en la Figura 4A, el Western blot reveló la presencia de bandas, con la masa molecular predicha correspondiente a las proteínas pVP2 (48 kDa) y VP3-GFP (61 kDa), así como otras bandas inmunoreactivas de menor tamaño producidas probablemente por degradación proteolítica tanto en la muestra inicial como en las diferentes fracciones del gradiente. Estos resultados demostraron de forma fehaciente la correcta expresión de ambos polipéptidos en el cultivo de *S. cerevisiae* transformado con el plásmido pESCURA/pVP2-VP3. A continuación, las distintas fracciones del gradiente fueron analizadas mediante TEM tal como se ha descrito previamente (Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. & Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology* 73, 6973-6983). Como se muestra en la Figura 4B, el análisis mediante TEM de las fracciones del gradiente reveló la existencia de VLPs de IBDV en la fracciones superiores del gradiente. Estas VLPs, VLPs-(VP4), presentan un diámetro de 65-70 nm y un contorno poligonal indistinguible de las VLPs de IBDV obtenidas en otros sistemas de expresión (Figura 4C).

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una cápsida vacía del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), VLP(-VP4), **caracterizada** porque está constituida, únicamente, por ensamblaje de proteínas pVP2 de IBDV y proteínas VP3 de IBDV.
2. Un ácido nucleico **caracterizado** porque su secuencia de nucleótidos está constituida por (i) una secuencia de nucleótidos que consiste en la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que consiste en la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV.
3. Una construcción génica que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 2.
4. Un sistema de expresión seleccionado entre:
- a) un sistema de expresión que consiste en (i) una construcción génica que consiste en la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y (ii) una construcción génica que consiste en la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción;
- b) un sistema de expresión que consiste en una construcción génica según la reivindicación 3, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción.
5. Sistema de expresión según la reivindicación 4, **caracterizado** porque se selecciona entre plásmidos, báculos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PAC), cósmidos, y virus, que pueden contener, opcionalmente, un origen de replicación heterólogo.
6. Una célula huésped que contiene un ácido nucleico según la reivindicación 2, o una construcción génica según la reivindicación 3, o un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.
7. Una célula huésped transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.
8. Célula huésped según la reivindicación 6 ó 7, **caracterizada** porque es una célula de insecto o una levadura.
9. Un procedimiento para la producción de cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, que comprende cultivar una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, y, si se desea, recuperar dichas cápsidas vacías de IBDV.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha célula huésped es una célula de insecto, que comprende las etapas de:
- a) preparar un sistema de expresión seleccionado entre:
- un sistema de expresión constituido por un baculovirus recombinante que contiene una construcción génica según la reivindicación 3, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción; y
- un sistema de expresión constituido por (i) un baculovirus recombinante que contiene una construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína pVP2 de IBDV, y (ii) un baculovirus recombinante que contiene una construcción génica que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP3 de IBDV;
- b) infectar células de insecto con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);
- c) cultivar las células de insecto infectadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV; y
- d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV.
11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha célula huésped es una levadura, que comprende las etapas de:
- a) preparar un sistema de expresión constituido por un plásmido que contiene una construcción génica según la reivindicación 3;
- b) transformar células de levadura con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);

ES 2 294 679 T3

c) cultivar las levaduras transformadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV; y

d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, las cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV.

5

12. Empleo de un sistema de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, para la producción y obtención de cápsidas vacías, VLPs(-VP4), de IBDV según la reivindicación 1.

10 13. Empleo de cápsidas vacías del virus causante de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, en la elaboración de un medicamento.

14. Empleo según la reivindicación 13, en el que dicho medicamento es una vacuna frente a la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa.

15 15. Empleo según la reivindicación 13, en el que dicho medicamento es un vector para terapia génica.

16. Una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías de IBDV, VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

20

17. Vacuna según la reivindicación 16, para proteger aves de la infección causada por el virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV).

25 18. Vacuna según la reivindicación 17, en la que dichas aves se seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces.

19. Una vacuna para proteger pollos de la infección causada por el virus causante de la bursitis infecciosa (IBDV) que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías de IBDV, VLPs(-VP4), según la reivindicación 1, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 294 679 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
5 <110> BIONOSTRA, S.L.
- <120> CÁPSIDAS VACÍAS (VLPs(-VP4)) DEL VIRUS CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSITIS
INFECCIOSA (IBDV), SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y APLICACIONES
- 10 <130> P1392PC
- <150> ES P200400121
15 <151> 2004-01-21 (21 enero, 2004)
- <160> 10
<170> PatentIn version 3.1
- 20 <210> 1
<211> 35
<212> DNA
25 <213> Secuencia artificial
- <220> DNA Sintético
<223> Cebador Oligo I
30 <400> 1
- gcgcagatct atgacaaacc tgtcagatca aacctt 35
- 35 <210> 2
<211> 34
<212> DNA
40 <213> Secuencia artificial
- <220> DNA sintético
<223> Cebador Oligo II
45 <400> 2
- gcgcaagctt aggcgagagt cagctgcctt atgc 34
- 50 <210> 3
<211> 7595
<212> DNA
55 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Plásmido pFBD/pVP2-his-VP3
60 <221> Promotor
<222> (157)..(285)
65 <223> Promotor ppolh
- <221> CDS

ES 2 294 679 T3

<222> (291)..(1289)

<223> pVP2 ORF

5 <221> Promotor

<222> (7443) . . (7503)

<223> Promotor p10

10 <400> 3

```

gggtgatcaa gtcttcgctg agtgattgta aataaaatgt aatttacagt atagtatttt      60
aattaatata caaatgattt gataataatt cttattttaac tataatatat tgtgttgggt      120
15 tgaattaaag gtccgtatac tccggaatat taatagatca tggagataat taaaatgata      180
accatctcgc aaataaataa gtattttact gttttcgtaa cagttttgta ataaaaaac      240
20 ctataaatat tccggattat tcataccgctc ccaccatcgg gcgcggatct atg aca      296
                                     Met Thr
                                     1
25 aac ctg tca gat caa acc cag cag att gtt ccg ttc ata cgg agc ctt      344
   Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg Ser Leu
                                     5                               10                               15
30 ctg atg cca aca acc gga ccg gcg tcc att ccg gac gac acc ctg gag      392
   Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr Leu Glu
                                     20                               25                               30
35 aag cac act ctc agg tca gag acc tcg acc tac aat ttg act gtg ggg      440
   Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr Val Gly
   35                               40                               45                               50
40 gac aca ggg tca ggg cta att gtc ttt ttc cct gga ttc cct ggc tca      488
   Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro Gly Ser
                                     55                               60                               65
45 att gtg ggt gct cac tac aca ctg cag ggc aat ggg aac tac aag ttc      536
   Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr Lys Phe
                                     70                               75                               80
50 gat cag atg ctc ctg act gcc cag aac cta ccg gcc agt tac aac tac      584
   Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr Asn Tyr
                                     85                               90                               95
55 tgc agg cta gtg agt cgg agt ctc aca gtg agg tca agc aca ctt cct      632
   Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr Leu Pro
   100                               105                               110
60 ggt ggc gtt tat gca cta aac ggc acc ata aac gcc gtg acc ttc caa      680
   Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr Phe Gln
   115                               120                               125                               130
65 gga agc ctg agt gaa ctg aca gat gtt agc tac aat ggg ttg atg tct      728
   Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu Met Ser
                                     135                               140                               145
70 gca aca gcc aac atc aac gac aaa att ggg aac gtc cta gta ggg gaa      776
   Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val Gly Glu
                                     150                               155                               160

```


ES 2 294 679 T3

	agctgcctca	ggccgcataa	ggcagctgac	tctcgcctaa	gcttgtcgag	aagtactaga	1849
5	ggatcataat	cagccatacc	acattttag	aggttttact	tgcttttaaaa	aacctcccac	1909
	acctccccct	gaacctgaaa	cataaaatga	atgcaattgt	tgttgttaac	ttgtttattg	1969
	cagcttataa	tggttataaa	taaagcaata	gcatcacaaa	tttcacaaat	aaagcatttt	2029
10	tttcaactgca	ttctagttgt	ggtttgtcca	aactcatcaa	tgtatcttat	catgtctgga	2089
	tctgatcact	gcttgagcct	aggagatccg	aaccagataa	gtgaaatcta	gttccaaact	2149
15	atthttgcat	ttttaatttt	cgtattagct	tacgacgcta	caccagttc	ccatctattt	2209
	tgctactctt	ccctaaataa	tccttaaaaa	ctccatttcc	accctccca	gttcccaact	2269
20	atthttgtccg	cccacagcgg	ggcatttttc	ttcctgttat	gtttttaatc	aaacatcctg	2329
	ccaactccat	gtgacaaacc	gtcatcttcg	gctacttttt	ctctgtcaca	gaatgaaaat	2389
25	ttttctgtca	tctcttcggt	attaatgttt	gtaattgact	gaatatcaac	gcttatttgc	2449
	agcctgaatg	gcgaatggga	cgcgccctgt	agcggcgcac	taagcgcggc	gggtgtgggtg	2509
	gttacgcgca	gcgtgaccgc	tacacttgcc	agcgccttag	cgcccgtcc	tttcgctttc	2569
30	ttcccttccct	ttctcgcacc	gttcgcccggc	tttccccgtc	aagctctaaa	tcgggggctc	2629
	cctttagggt	tccgatttag	tgctttacgg	cacctcgacc	ccaaaaaact	tgattagggt	2689
35	gatggttcac	gtagtgggcc	atcgccctga	tagacggttt	ttcgcccttt	gacgttggag	2749
	tccacgttct	ttaatagtgg	actcttgttc	caaactggaa	caacactcaa	ccctatctcg	2809
40	gtctattctt	ttgatttata	agggattttg	ccgatttcgg	cctattgggt	aaaaaatgag	2869
	ctgatttaac	aaaaatttaa	cgcgaaatth	aacaaaatat	taacgtttac	aatttcaggt	2929
45	ggcacttttc	ggggaaatgt	gcgcggaacc	cctatttggt	tatttttcta	aatacattca	2989
	aatatgtatc	cgctcatgag	acaataacc	tgataaatgc	ttcaataata	ttgaaaagg	3049
50	aagagtatga	gtattcaaca	ttccctgtgc	gcccttattc	ccttttttgc	ggcattttgc	3109
	cttcctgttt	ttgctcacc	agaaacgctg	gtgaaagtaa	aagatgctga	agatcagttg	3169
	gggtgcacgag	tgggttacat	cgaactggat	ctcaacagcg	gtaagatcct	tgagagtttt	3229
55	cgccccgaag	aacgttttcc	aatgatgagc	acttttaaaag	ttctgctatg	tggcgcggta	3289
	ttatcccgta	ttgacgccgg	gcaagagcaa	ctcggtcgcc	gcatacacta	ttctcagaat	3349
60	gacttggttg	agtactcacc	agtcacagaa	aagcatctta	cggatggcat	gacagtaaga	3409
	gaattatgca	gtgctgccat	aaccatgagt	gataacactg	cggccaactt	acttctgaca	3469
	acgatcggag	gaccgaagga	gctaaccgct	tttttgca	acatggggga	tcagtgaact	3529
65	cgcttgatc	gttggaacc	ggagctgaat	gaagccatac	caaacgacga	gcgtgacacc	3589

ES 2 294 679 T3

	acgatgcctg	tagcaatggc	aacaacgttg	cgcaaactat	taactggcga	actacttact	3649
5	ctagcttccc	ggcaacaatt	aatagactgg	atggaggcgg	ataaagttgc	aggaccactt	3709
	ctgcgctcgg	cccttccggc	tggctggttt	attgctgata	aatctggagc	cggtgagcgt	3769
	gggtctcgcg	gtatcattgc	agcactgggg	ccagatggta	agccctcccc	tatcgtagtt	3829
10	atctacacga	cggggagtca	ggcaactatg	gatgaacgaa	atagacagat	cgctgagata	3889
	ggtgcctcac	tgattaagca	ttggtaactg	tcagaccaag	tttactcata	tatactttag	3949
15	attgatttaa	aacttcattt	ttaatttaaa	aggatctagg	tgaagatcct	ttttgataat	4009
	ctcatgacca	aaatccctta	acgtgagttt	tcgttccact	gagcgtcaga	ccccgtagaa	4069
20	aagatcaaag	gatcttcttg	agatcctttt	tttctgcgcg	taatctgctg	cttgcaaaca	4129
	aaaaaaccac	cgctaccagc	ggtggtttgt	ttgccggatc	aagagctacc	aactcttttt	4189
25	ccgaaggtaa	ctggcttcag	cagagcgcag	ataccaaata	ctgtccttct	agtgtagccg	4249
	tagttaggcc	accacttcaa	gaactctgta	gcaccgccta	catacctcgc	tctgctaatc	4309
	ctgttaccag	tggctgctgc	cagtggcgat	aagtcgtgtc	ttaccggggt	ggactcaaga	4369
30	cgatagttac	cggataaggc	gcagcggtcg	ggctgaacgg	ggggttcgtg	cacacagccc	4429
	agcttggagc	gaacgaccta	caccgaactg	agatacctac	agcgtgagca	ttgagaaagc	4489
35	gccacgcttc	ccgaagggag	aaaggcggac	aggatccgg	taagcggcag	ggtcggaaaca	4549
	ggagagcgca	cgaggggagct	tccaggggga	aacgcctggt	atctttatag	tctgtcggg	4609
40	tttcgccacc	tctgacttga	gcgtcgattt	ttgtgatgct	cgtcaggggg	gcggagccta	4669
	tggaaaaacg	ccagcaacgc	ggccttttta	cggttcctgg	ccttttgctg	gccttttgct	4729
45	cacatgttct	ttcctgcggt	atcccctgat	tctgtggata	accgtattac	cgcctttgag	4789
	tgagctgata	ccgctcgccg	cagccgaacg	accgagcgca	gcgagtcagt	gagcgaggaa	4849
	gcggaagagc	gcctgatgcg	gtattttctc	cttacgcatc	tgtgcggtat	ttcacaccgc	4909
50	agaccagccg	cgtaacctgg	caaaatcggt	tacggttgag	taataaatgg	atgccctgcg	4969
	taagcgggtg	tgggcggaca	ataaagtctt	aaactgaaca	aaatagatct	aaactatgac	5029
55	aataaagtct	taaactagac	agaatagttg	taaactgaaa	tcagtccagt	tatgctgtga	5089
	aaaagcatac	tggacttttg	ttatggctaa	agcaaacctc	tcattttctg	aagtgcaaat	5149
60	tgcccgtcgt	attaaagagg	ggcgtggcca	agggcatggt	aaagactata	ttcgcggcgt	5209
	tgtgacaatt	taccgaacaa	ctccgcggcc	gggaagccga	tctcggcctt	aacgaattgt	5269
	taggtggcgg	tacttgggtc	gatatcaaag	tgcatacact	cttcccgtat	gcccactttt	5329
65	gtatagagag	ccactgcggg	atcgtcaccg	taatctgctt	gcacgtagat	cacataagca	5389

ES 2 294 679 T3

	ccaagcgcgt	tggcctcatg	cttgaggaga	ttgatgagcg	cggaggcaat	gccctgcctc	5449
5	cggtgctcgc	cggagactgc	gagatcatag	atatagatct	cactacgcgg	ctgctcaaac	5509
	ctgggcagaa	cgtaagccgc	gagagcgcca	acaaccgctt	cttggtcgaa	ggcagcaagc	5569
	gcgatgaatg	tcttactacg	gagcaagttc	ccgaggtaat	cggagtccgg	ctgatgttgg	5629
10	gagtaggtgg	ctacgtctcc	gaactcacga	ccgaaaagat	caagagcagc	ccgcatggat	5689
	ttgacttggg	cagggccgag	cctacatgtg	cgaatgatgc	ccatacttga	gccacctaac	5749
15	tttgttttag	ggcgactgcc	ctgctgcgta	acatcgttgc	tgctgcgtaa	catcgttgct	5809
	gctccataac	atcaaacatc	gaccacggc	gtaacgcgct	tgctgcttgg	atgcccgagg	5869
20	catagactgt	acaaaaaaaaac	agtcataaca	agccatgaaa	accgccactg	cgccgttacc	5929
	accgctgcgt	tcggtcaagg	ttctggacca	gttgcgtgag	cgcatacgct	acttgcatta	5989
25	cagtttacga	accgaacagg	cttatgtcaa	ctgggttcgt	gccttcatcc	gtttccacgg	6049
	tgtgcgtcac	ccggcaacct	tgggcagcag	cgaagtcgag	gcatttctgt	cctggctggc	6109
	gaacgagcgc	aaggtttcgg	tctccacgca	tcgtcaggca	ttggcggcct	tgctgttctt	6169
30	ctacggcaag	gtgctgtgca	cggatctgcc	ctggcttcag	gagatcggtg	gacctcggcc	6229
	gtcgcggcgc	ttgccggtgg	tgctgacccc	ggatgaagtg	gttcgcatcc	tcggttttct	6289
35	ggaaggcgag	catcgtttgt	tcgcccagga	ctctagctat	agttctagtg	gttggcctac	6349
	gtacccgtag	tggctatggc	agggcttgcc	gccccgacgt	tggctgcgag	ccctgggcct	6409
40	tcacccgaac	ttggggggtg	gggtggggaa	aaggaagaaa	cgcgggcgta	ttggtcccaa	6469
	tggggtctcg	gtggggtatc	gacagagtgc	cagccctggg	accgaacccc	gcgtttatga	6529
45	acaaacgacc	caacacccgt	gcgttttatt	ctgtcttttt	attgccgtca	tagcgcgggt	6589
	tccttccggt	attgtctcct	tccgtgtttc	agttagcctc	ccccatctcc	cggtagcgca	6649
	tgctcgcgag	ctgcaggctc	tagattcgaa	agcggccgcg	actagtgagc	tcgtcgacgt	6709
50	aggcctttga	attccggatc	ctcactcaag	gtcctcatca	gagacggtcc	tgatccagcg	6769
	gcccagccga	ccagggggtc	tctgtgttgg	agcattgggt	tttggcttgg	gctttggtag	6829
55	agcccgcctg	ggattgcgat	gcttcatctc	catcgcagtc	aagagcagat	ctttcatctg	6889
	ttcttggttt	gggccacgtc	catggttgat	ttcatagact	ttggcaactt	cgtctatgaa	6949
60	agcttggggg	ggctctgcct	gtcctggagc	cccgtagatc	gacgtagctg	cccttaggat	7009
	ttgttcttct	gatgccaaac	ggctcttctc	tgcatgcacg	tagtctagat	agtctcgtt	7069
65	tgggtccggt	atctctcggt	tgctctgcca	gtactttacc	tggcctgggc	ttggccctcg	7129
	gtgcccattg	agtgtctacc	attctgggtg	tgcaaagtag	atgcccatgg	tctccatctt	7189

ES 2 294 679 T3

```

ctttgagatc cgtgtgtctt tttccctctg tgcttctctt ggtgtggggc cccgagcctc 7249
cactccgtag cctgctgtcc cgtacttggc cctttgagac ttgctgcctg cttgtgggtgc 7309
5  gtttgcaaga aaatttcgca tccgatgggc gttcgggtcg ctgagtgcga agttggccat 7369
gtcagtcaca atcccattct cttccagcca catgaacaca ctgagtgcag attggaatag 7429
10  tgggtccacg ttggctgctg cttccattgc tctgacggca ctctcgagtt cgggggtctc 7489
tttgaactct gatgcagcca tggcgccctg aaaatacagg ttttcgggtcg ttgggatatc 7549
15  gtaatcgtga tgggtgatggg gatggtagta cgacatgggt tcggac 7595

```

<210> 4

<211> 333

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Proteína pVP2-his-VP3

<400> 4

```

30  Met Thr Asn Leu Ser Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
    1          5          10          15
    Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Asp Asp Thr
    20          25          30
35  Leu Glu Lys His Thr Leu Arg Ser Glu Thr Ser Thr Tyr Asn Leu Thr
    35          40          45
    Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro
    50          55          60
40  Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
    65          70          75          80
45  Lys Phe Asp Gln Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr
    85          90          95
    Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr
    100         105         110
50  Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
    115         120         125
55  Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu
    130         135         140
    Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val
    145         150         155         160
60  Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
    165         170         175
65  Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
    180         185         190

```

ES 2 294 679 T3

	Met	Val	Ala	Thr	Cys	Asp	Ser	Ser	Asp	Arg	Pro	Arg	Val	Tyr	Thr	Ile
			195					200					205			
5	Thr	Ala	Ala	Asp	Asp	Tyr	Gln	Phe	Ser	Ser	Gln	Tyr	Gln	Pro	Gly	Gly
		210					215					220				
10	Val	Thr	Ile	Thr	Leu	Phe	Ser	Ala	Asn	Ile	Asp	Ala	Ile	Thr	Ser	Leu
		225				230					235					240
15	Ser	Val	Gly	Gly	Glu	Leu	Val	Phe	Arg	Thr	Ser	Val	His	Gly	Leu	Val
					245					250					255	
20	Leu	Gly	Ala	Thr	Ile	Tyr	Leu	Ile	Gly	Phe	Asp	Gly	Thr	Thr	Val	Ile
				260					265						270	
25	Thr	Arg	Ala	Val	Ala	Ala	Asn	Asn	Gly	Leu	Thr	Thr	Gly	Thr	Asp	Asn
			275						280					285		
30	Leu	Met	Pro	Phe	Asn	Leu	Val	Ile	Pro	Thr	Asn	Glu	Ile	Thr	Gln	Pro
		290						295				300				
35	Ile	Thr	Ser	Ile	Lys	Leu	Glu	Ile	Val	Thr	Ser	Lys	Ser	Gly	Gly	Gln
		305				310					315					320
40	Ala	Gly	Asp	Gln	Met	Ser	Trp	Ser	Ala	Arg	Gly	Ser	Leu			
					325					330						

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

35 <213> Secuencia artificial

<220> DNA sintético

40 <223> Cebador Oligo III

<400> 5

45 ggcgagatct atgacaaacc tgcagatca aacctt

35

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

50 <213> Secuencia artificial

<220> DNA sintético

55 <223> Cebador Oligo IV

<400> 6

60 gcgcaagctt aggcgagagt cagctgcctt atgc

34

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

65 <213> Secuencia artificial

ES 2 294 679 T3

<220> DNA sintético
 <223> Cebador Oligo V

5 <400> 7

gcgcgaattc gatggcatca gaggtaaag aga

33

10 <210> 8
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220> DNA sintético
 <223> Cebador Oligo VI

20 <400> 8

cgcgatccc tcaaggtcct catcagagac gg

32

25 <210> 9
 <211> 9600
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

30 <223> Plásmido pESCURA/pVP2-VP3-GFP
 <221> Promotor
 <222> (5649)-(5859)
 35 <223> Promotor GAL 1 (pVP2)

<221> Promotor
 40 <222> (7402)..(8080)
 <223> Promotor GAL 2 (VP3-GFP)

<221> CDS
 45 <222> (8086)..(9597)
 <223> ORF VP3-GFP

<400> 9

50 ggccgcacta gtatcgatgg attacaagga tgacgacgat aagatctgag ctcttaatta 60

acaattcttc gccagagggtt tggtaagtc tccaatcaag gttgtcggct tgtctacctt 120

55 gccagaaatt tacgaaaaga tggaaaaggg tcaaactcgtt ggtagatcgc ttgttgacac 180

ttctaaataa gcgaatttct tatgatttat gatttttatt attaaataag ttataaaaaa 240

aataagtgta tacaaatddd aaagtgactc ttaggttdta aaacgaaaat tcttattctt 300

60 gagtaactct ttctgttagg tcagggttgc ttctcaggta tagcatgagg tcgctccaat 360

tcagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc 420

65 ttccgcttcc tcgctcactg actcgcctgcg ctccggtcgtt cggctgcggc gagcgggatc 480

ES 2 294 679 T3

	agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa	540
	catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt	600
5	tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg	660
	gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcggtcg	720
10	ctctoctggt cggaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcggggaag	780
	cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcgggtgtagg tcggtcgctc	840
15	caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa	900
	ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg	960
20	taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtgggtggc	1020
	taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac	1080
25	cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg	1140
	tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt	1200
	gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt	1260
30	catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaat gaagttttaa	1320
	atcaatctaa agtatatatg agtaaaactg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga	1380
35	ggcacctatc tcagcgatct gtctatctcg ttcacccata gttgcctgac tccccgctgt	1440
	gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg	1500
40	agaccacgc tcaccggctc cagatctatc agcaataaac cagccagccg gaagggccga	1560
	gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga	1620
45	agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttggtgcca ttgctacagg	1680
	catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc	1740
	aaggcgagtt acatgatccc ccatggtgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggctcctc	1800
50	gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca	1860
	taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg agtactcaac	1920
55	caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg	1980
	ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc	2040
60	ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg	2100
	tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac	2160
	aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggat aagggcgaca cggaaatgtt gaatactcat	2220
65	actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata	2280

ES 2 294 679 T3

	catatltgaa	tgtatltaga	aaaataaaca	aataggggtt	cgcgcacat	ttccccgaaa	2340
5	agtgccacct	gaacgaagca	tctgtgcttc	atltttgtaga	acaaaaatgc	aacgcgagag	2400
	cgctaatltt	tcaaacaaag	aatctgagct	gcattltttac	agaacagaaa	tgcaacgcga	2460
	aagcgctatt	ttaccaacga	agaatctgtg	cttcattltt	gtaaaacaaa	aatgcaacgc	2520
10	gagagcgcta	atltttcaaa	caaagaatct	gagctgcatt	tttacagaac	agaaatgcaa	2580
	cgcgagagcg	ctatltttacc	aacaaagaat	ctatacttct	tttttgttct	acaaaaatgc	2640
15	atcccgagag	cgctatlttt	ctaacaaagc	atcttagatt	actltttttc	tcctttgtgc	2700
	gctctataat	gcagtctctt	gataactltt	tgcaactgtag	gtccgttaag	gttagaagaa	2760
20	ggctactlttg	gtgtctatlt	tctcttccat	aaaaaaagcc	tgactccact	tcocgcgttt	2820
	actgattact	agcgaagctg	cggtgtcatt	ttttcaagat	aaaggcatcc	ccgattatat	2880
	tctataccga	tgtggattgc	gcatactltg	tgaacagaaa	gtgatagcgt	tgatgattct	2940
25	tcattggcca	gaaaattatg	aacggtttct	tctatltttgt	ctctatatac	tacgtatagg	3000
	aaatgtttac	atlttctgat	tgltttcogat	tcactctatg	aatagttctt	actacaatlt	3060
30	ttttgtctaa	agagtaatac	tagagataaa	cataaaaaat	gtagaggctcg	agtttagatg	3120
	caagttcaag	gagcgaaggg	tggtatggta	ggttatatag	ggatatagca	cagagatata	3180
35	tagcaaagag	atactltttga	gcaatgtttg	tggaagcggg	attcgcataa	tttttagtagc	3240
	tcgttacagt	ccggtgcggt	tttggttttt	tgaaagtgcg	tcttcagagc	gcttttggtt	3300
40	ttcaaaagcg	ctctgaagtt	cctatacttt	ctagagaata	ggaacttcgg	aataggaact	3360
	tcaaagcggt	tccgaaaacg	agcgttccg	aaaatgcaac	gcgagctgcg	cacatacagc	3420
45	tcactgttca	cgctgcacct	atatctgcgt	gttgcctgta	tatatatata	catgagaaga	3480
	acggcatagt	gcgtgtttat	gcttaaagtc	gtacttatat	gcgtctatlt	atgtaggatg	3540
	aaaggtagtc	tagtacctcc	tgtgatatta	tcccattcca	tgccgggtat	cgtatgcttc	3600
50	cttcagcact	acccttttagc	tgttctatat	gctgccactc	ctcaattgga	ttagtctcat	3660
	ccttcaatgc	tatcatttcc	tttgatattg	gatcatacta	agaaaccatt	attatcatga	3720
55	cattaaccta	taaaaatagg	cgatcacga	ggccctttcg	tctcgcgcgt	ttcgggtgatg	3780
	acggtgaaaa	cctctgacac	atgcagctcc	cggagacggg	cacagcttgt	ctgtaagcgg	3840
60	atgccgggag	cagacaagcc	cgtcagggcg	cgtcagcggg	tgttggcggg	tgccggggct	3900
	ggcttaacta	tgcggcatca	gagcagattg	tactgagagt	gcaccatacc	acagctlttc	3960
65	aattcaattc	atcattlttt	ttttattctt	ttttttgatt	tcggtttctt	tgaaatlttt	4020
	ttgattcggg	aatctccgaa	cagaaggaag	aacgaaggaa	ggagcacaga	cttagattgg	4080

ES 2 294 679 T3

	tatatatacg	catatgtagt	gttgaagaaa	catgaaattg	cccagtattc	ttaacccaac	4140
5	tgcacagaac	aaaaacctgc	aggaaacgaa	gataaatcat	gtcgaagct	acatataagg	4200
	aacgtgctgc	tactcatcct	agtcctggtg	ctgccaagct	atttaatatc	atgcacgaaa	4260
	agcaaacaaa	cttgtgtgct	tcattggatg	ttcgtaccac	caaggaatta	ctggagttag	4320
10	ttgaagcatt	aggteccaaa	atltgtttac	taaaaacaca	tgtggatata	ttgactgatt	4380
	tttccatgga	gggcacagtt	aagccgctaa	aggcattata	cgccaagtac	aatltttttac	4440
15	tcttcgaaga	cagaaaattt	gctgacattg	gtaatacagt	caaattgcag	tactctgcgg	4500
	gtgtatacag	aatagcagaa	tgggcagaca	ttacgaatgc	acacgggtgtg	gtgggcccag	4560
20	gtattgttag	cggtttgaag	caggcggcag	aagaagtaac	aaaggaacct	agaggccttt	4620
	tgatgttagc	agaattgtca	tgcaagggct	ccctatactac	tggagaatat	actaagggta	4680
	ctgttgacat	tgcgaagagc	gacaaagatt	ttgttatcgg	ctttattgct	caaagagaca	4740
25	tgggtggaag	agatgaaggt	tacgattggt	tgattatgac	accgggtgtg	ggtttagatg	4800
	acaagggaga	cgcattgggt	caacagtata	gaaccgtgga	tgatgtggtc	tctacaggat	4860
30	ctgacattat	tattgttggga	agaggactat	ttgcaaaggg	aagggatgct	aaggtagagg	4920
	gtgaacgtta	cagaaaagca	ggctgggaag	catatttgag	aagatgcggc	cagcaaaaact	4980
35	aaaaaactgt	attataagta	aatgcatgta	tactaaactc	acaattaga	gcttcaattt	5040
	aattatatca	gttattacc	tatgcgggtg	gaaataccgc	acagatgcgt	aaggagaaaa	5100
40	taccgcatca	ggaaattgta	aacgttaata	ttttgttaaa	attcgcgtta	aatlttttgtt	5160
	aaatcagctc	atlttttaac	caataggccg	aaatcggcaa	aatcccttat	aaatcaaaaag	5220
	aatagaccga	gataggggtg	agtgttggtc	cagtttgga	caagagtcca	ctattaaaga	5280
45	acgtggactc	caacgtcaaa	gggcgaaaaa	ccgtctatca	gggcgatggc	ccactacgtg	5340
	aaccatcacc	ctaatcaagt	tttttgggggt	cgaggtgccg	taaagcacta	aatcgggaacc	5400
50	ctaaagggag	cccccgattt	agagcttgac	ggggaaagcc	ggcgaacgtg	gcgagaaagg	5460
	aaggaagaa	agcgaagga	gcgggcgcta	gggcgctggc	aagtgtagcg	gtcacgctgc	5520
55	gcgtaaccac	cacaccgccc	gcgcttaatg	cgccgctaca	gggcgctcg	cgccattcgc	5580
	cattcaggct	gcgcaactgt	tgggaagggc	gatcgggtcg	ggcctcttcg	ctattaagcc	5640
	agctggatct	tcgagcgtcc	caaaaccttc	tcaagcaagg	ttttcagtat	aatgtttacat	5700
60	gcgtacacgc	gtctgtacag	aaaaaaaaaga	aaaatttgaa	atataaataa	cgttcttaaat	5760
	actaacataa	ctataaaaaa	ataaataggg	acctagactt	caggttgtct	aactccttcc	5820
65	ttttcggtta	gagcggatct	tagctagccg	cggtaccaag	cttaggcgag	agtcagctgc	5880

ES 2 294 679 T3

	cttatgcggc	ctgaggcagc	tcttgctttt	cctgacgcgg	ctcgagcagt	tcctgaagcg	5940
	gcctgggcct	catcgcccag	caggtagtct	acaccttccc	caattgcatg	ggctagggga	6000
5	gcggcaggtg	ggaacaatgt	ggagaccacc	ggcacagcta	tcctccttat	ggcccggatt	6060
	atgtctttga	agccgaatgc	tcctgcaatc	ttcaggggag	agttgaggtc	ggccacctcc	6120
10	atgaagtatt	cacgaaagtc	agtgtactcc	cttgttggcc	agacggctct	gatgccaaga	6180
	cggtcctct	cactcagtat	caatthttgtg	tagttcatgg	ctcctgggtc	aaatcggccg	6240
15	tattctgtaa	ccaggttctt	tgctagtcca	ggatthtggga	tcagctcgaa	gttgctcacc	6300
	ccagcgaccg	taacgacgga	tcctgttgcc	actctthtctg	aggccactag	cgtgacggga	6360
20	cggagggccc	ctggatagtt	gccaccatgg	atcgtcactg	ctaggctccc	tcttgccgac	6420
	catgacatct	gatccccctgc	ctgaccacca	ctthttggagg	tcactatctc	cagthttgatg	6480
25	gatgtgattg	gctgggttat	ctcgthttgtt	ggaatcacia	gattgaaatg	cataaggttg	6540
	tcggtgccgg	tcgtcagccc	attgthttgcg	gccacagccc	tggtgattac	cgthtgccca	6600
30	tcaaagccta	tgaggtagat	ggtggcgccc	agtacaaggc	cgtggacgct	tgthtcgaaac	6660
	acgagctctc	ccccaacgct	gaggcttggtg	atggcatcaa	tgthtggtga	gaacagtggtg	6720
35	attgthtacc	cacctgggtg	gtactgtgat	gagaatthgt	aatcatcggc	tgcatthtatg	6780
	gtgtagactc	tgggcctgtc	actgctgtca	catgtggcta	ccaththttgg	gtcaagccct	6840
40	attgcgggaa	tggggtcacc	aagcctcaca	tacccaagat	catatgatgt	gggtaagctg	6900
	aggacgggtg	ccccthcccc	tactaggacg	thccccatth	tgthcgthgat	gthggctgth	6960
45	gcagacatca	accatttgta	gctaacatct	gtcagthcac	tcaggctthcc	thggaaggthc	7020
	acggcgthta	tggtgccgth	tagthcataa	acgccaccag	gaagthgtgct	tgacctcact	7080
50	gtgagactcc	gactcactag	cctgcagtag	thgtaactgg	ccggtaggth	ctgggcagthc	7140
	aggagcatct	gatcgaacth	gtagthtccca	thgcccctgca	gtgtgtagthg	agcaccacaa	7200
55	attgagccag	ggaatccagg	gaaaaagaca	atthagccctg	accctgtgtc	ccccacagthc	7260
	aaattgtagg	tcgaggthctc	tgacctgaga	gtgtgctthct	ccagggtgtc	gtccggaatg	7320
60	gacgccggthc	cggtthgttg	catcagaagg	ctccgtatga	acggaacaat	ctgctgggth	7380
	tgatctgaca	ggthttgtcat	agatccgggg	ththththctcc	thgacgtthaa	agthatagagg	7440
65	tatattaaca	atthththgtth	gatactththta	thacaththga	ataagaagth	atacaaacctg	7500
	aaaatgthga	aagthattagth	thaaagthggth	atgthcagththth	thgcatththata	thathctgtthaa	7560
70	tagatcaaaa	atcatcgctth	cgctgaththaa	thacccccaga	aathaaaggth	aaaaactaat	7620
75	cgcatthata	tcctatggth	gththaaatthga	thctgththcath	thgaaggththg	thggggccagg	7680

ES 2 294 679 T3

	Pro	Asp	Pro	Asn	Glu	Asp	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Val	His	Ala	Glu	Lys	Ser	
	145					150					155					160	
5	Arg	Leu	Ala	Ser	Glu	Glu	Gln	Ile	Leu	Arg	Ala	Ala	Thr	Ser	Ile	Tyr	
					165					170					175		
10	Gly	Ala	Pro	Gly	Gln	Ala	Glu	Pro	Pro	Gln	Ala	Phe	Ile	Asp	Glu	Val	
				180					185					190			
15	Ala	Lys	Val	Tyr	Glu	Ile	Asn	His	Gly	Arg	Gly	Pro	Asn	Gln	Glu	Gln	
			195					200					205				
20	Met	Lys	Asp	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Met	Glu	Met	Lys	His	Arg	Asn	Pro	
		210					215					220					
25	Arg	Arg	Ala	Leu	Pro	Lys	Pro	Lys	Pro	Lys	Pro	Asn	Ala	Pro	Thr	Gln	
	225					230					235					240	
30	Arg	Pro	Pro	Gly	Arg	Leu	Gly	Arg	Trp	Ile	Arg	Thr	Val	Ser	Asp	Glu	
				245						250					255		
35	Asp	Leu	Glu	Gly	Ser	Ile	Ala	Thr	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	
				260					265					270			
40	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	
			275					280					285				
45	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	
		290					295					300					
50	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	
	305					310					315					320	
55	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	
				325						330					335		
60	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	
				340					345					350			
65	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	
			355					360					365				
70	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	
		370					375					380					
75	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	
	385					390					395					400	
80	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	
				405						410					415		
85	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	
			420						425					430			
90	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	
			435					440					445				
95	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	
		450					455					460					

ES 2 294 679 T3

465 Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
470 475 480

5 Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
485 490 495

10 Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
500

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65