

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 833**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06762595 .4**

96 Fecha de presentación: **14.07.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1904626**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

54 Título: **PARTÍCULAS QUIMÉRICAS VACÍAS SIMILARES A VIRUS DERIVADAS DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE LA BURSTITIS INFECCIOSA (IBDV), PROCESO PARA SU PRODUCCIÓN Y APLICACIONES.**

30 Prioridad:
15.07.2005 ES 200501733

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.01.2012

73 Titular/es:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
SERRANO, 117
28006 MADRID, ES y
BIONOSTRA S.L.**

72 Inventor/es:
**RODRÍGUEZ AGUIRRE, José FranciscoCtro. Nacional Biotech.;
RUIZ CASTÓN, JoséCtro. Nacional Biotech.;
SAUGAR GÓMEZ, IreneCtro. Nacional Biotech.;
OÑA BLANCO, Ana MariaCtro. Nacional Biotech.
y
RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ-ALBA, Juan Ramon**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

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).

ES 2 371 833 T3

DESCRIPCIÓN

Partículas quiméricas vacías similares a virus derivadas del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), proceso para su producción y aplicaciones

Campo de la invención

- 5 La invención se relaciona con la producción de partículas quiméricas similares a virus derivadas del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) y sus aplicaciones.

Antecedentes de la invención

- 10 Las partículas similares a virus son estructuras especializadas en el empaque y transporte de ácidos nucleicos y proteínas. Una característica general de las partículas similares a virus es su excelente capacidad para estimular la respuesta inmune del huésped. Estas propiedades hacen de las partículas similares a virus, agentes extremadamente interesantes para el desarrollo de sistemas de entrega intracelulares y para la generación de vacunas de subunidades. El uso de diferentes sistemas de expresión del gen ha ayudado en la producción de cápsides virales vacías o partículas similares a virus (VLPs) de varios virus, por ejemplo rotavirus (US 2003/0175301), retrovirus (US 6.602.705), parvovirus (US 6.458.362), etc. La manipulación genética de estos sistemas de expresión, a su vez permite la producción de VLPs que contienen secuencias de aminoácidos heterólogos a partir de proteínas diferentes de aquellas que forman la cápside viral nativa. Estas VLPs genéricamente se llaman VLPs heterotípicas, recombinantes o quiméricas (CVLPs), y han sido utilizadas principalmente para dos propósitos: (i) generación de vacunas multivalentes por medio de péptidos heterólogos inmunogenéticamente relevantes, y (ii) modificación del tropismo, por medio de la inserción de secuencias de aminoácidos involucradas en las interacciones ligando-receptor.

El virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), que pertenece a la familia *Birnaviridae*, infecta varias especies de aves y es directamente responsable de la bursitis infecciosa, una severa enfermedad inmunosupresora que causa considerables pérdidas económicas en la industria avícola en todo el mundo.

- 25 Las partículas del IBDV son icosaédricas con simetría T=13, carecen de envoltura y están formadas por una única capa proteica. Hasta ahora, los enfoques dirigidos a la obtención de un modelo atómico para las partículas del IBDV han fracasado. Por esta razón, la información disponible en su estructura se basa en modelos tri-dimensionales generados de las imágenes obtenidas por criomicroscopía electrónica del virus purificado y VLPs. Con base en estos estudios, se ha observado que la superficie externa de la partícula se forma por un entramado continuo de 260 trímeros de proteína VP2 (37 kDa) dispuestos en cinco diferentes conformaciones. El lado interno de las partículas contiene 200 trímeros de la proteína VP3 (29 kDa), estos últimos, independientemente uno del otro, se unen al área basal de los trímeros de VP2. Se ha sugerido que un tercer polipéptido, VP4 (28 kDa), también podría ser parte de las partículas, el cual se encuentra localizado en la base de los pentámeros que forman los ángulos de la estructura icosaédrica.

- 35 Los polipéptidos VP2, VP3 y VP4 se producen a partir del procesamiento proteolítico de un polipéptido precursor con un tamaño de 109 kDa. Este precursor se procesa auto-catalíticamente, liberando los polipéptidos pVP2 (48 kDa), VP3 y VP4. El dominio de VP4, que se localiza en la región central de la poliproteína, pertenece a la familia de las lon proteasas y es responsable del corte proteolítico. Los polipéptidos pVP2 y VP3 son directamente responsables del montaje de las cápsides. El producto de 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 forma encontrada en las partículas purificadas. Este procedimiento de pVP2 es necesario para la correcta formación de las cápsides y requiere la presencia de VP3, aunque la proteasa responsable aún no ha sido identificada.

- 45 La morfogénesis es un proceso vital del ciclo vírico que requiere de etapas sucesivas asociadas con las modificaciones en los polipéptidos precursores. Como resultado, los virus han desarrollado estrategias que permiten la secuencial y correcta interacción entre cada uno de sus componentes. Una de estas estrategias, frecuentemente utilizadas por los virus icosaédricos, consiste en el uso de polipéptidos de una poliproteína única como la base de sus componentes estructurales. En estos casos, el correcto procesamiento proteolítico de dicha poliproteína juega un papel crucial en el proceso de montaje.

- 50 Este principio de ensamblaje de la cápside del IBDV, se ha demostrado en trabajos recientes (Fernández-Arias A et al. 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 eucariotas del gen codificante de la poliproteína del IBDV da lugar a la formación de VLPs que son completamente indistinguibles, tanto morfológica como bioquímicamente, de los viriones de IBDV. También se ha observado que el ensamblaje de la cápside requiere solo la síntesis y el procedimiento correcto de la poliproteína viral y es independiente de la presencia del genoma viral o de otras proteínas codificadas por el genoma viral, tales como proteínas VP5 y VP1.

Hasta ahora, los resultados obtenidos de la expresión de genes de IBDV en diferentes sistemas recombinantes, han permitido concluir que: i) el proceso de ensamblaje es independiente de la presencia de material genético del virus, ii) sólo aquellos polipéptidos codificados por el gen de la poliproteína son necesarios para el ensamblaje, y iii) el ensamblaje requiere una interacción coordinada entre los polipéptidos de VP2 y VP3.

- 5 Sin embargo, se desconoce si la interacción pVP2/VP3 se establece entre los dominios VP2 y VP3 de la poliproteína precursora incluso cuando no se ha modificado, o sí, por el contrario, esta interacción ocurre después de procesar el precursor. Además, la información actual no excluye la posibilidad de que VP4 pudiera jugar un papel relevante en la morfogénesis de la cápside. De hecho, han sido reveladas las VLPs del IBDV formadas por el ensamblaje de las proteínas VP2, VP3 y VP4 del IBDV (US 6,528,063; US 5,788,970 y JP 5194597).
- 10 El trabajo desarrollado por los inventores de este trabajo, ha permitido establecer los sistemas para obtener las VLPs de IBDV mediante el uso de diferentes vectores de expresión eucarióticos. Estos vectores han sido utilizados para expresar la poliproteína del IBDV en la ausencia o presencia de ARN de polimerasa viral VP1. La caracterización bioquímica de VLPs purificadas muestra que contienen proteínas pVP2, VP2 y VP3 cuando sólo la poliproteína viral se expresa, y las proteínas pVP2, VP2, VP3 y VP1 cuando la poliproteína y el ARN de la polimerasa viral se expresan simultáneamente (Fernández-Arias A et al. 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 JL et al. 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. 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; Lombardo E et al. 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).

- 25 De hecho, el documento de patente WO 02/088339 revela las partículas del IBDV similares a virus formadas por el ensamblaje de proteínas quiméricas que comprenden la poliproteína del IBDV unida a un polipéptido en su extremo C-terminalarboxilo.

Las CVLPs basadas solamente en la proteína pVP2 del IBDV, o en los fragmentos de ésta, fusionada a un polipéptido de interés, o su potencial uso como vacunas o como portadores de los productos de interés, no han sido descritas antes.

Resumen de la invención

- 30 La invención se enfrenta con el problema de proporcionar nuevas herramientas para vectorizar o incorporar en los portadores, productos de interés tales como moléculas con actividad biológica, por ejemplo fármacos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.

- La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han observado que es posible obtener partículas quiméricas vacías similares a virus derivadas del IBDV, como resultado de la expresión de la proteína pVP2 del IBDV, o un fragmento de dicha proteína que es capaz de ensamblarse por sí mismo y forma dichas partículas similares a virus, las cuales son genéticamente modificadas para incluir una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido heterólogo que comprende un polipéptido de interés, llamado genéricamente IBDV CVLP-pVP2s* en esta descripción. De hecho, los inventores han observado que la proteína de cuerpo completo pVP2 del IBDV, o un fragmento de dicha proteína de hasta 501, por lo general 441-466, residuos de aminoácidos contiguos que se inician después del aminoácido 1 de la proteína pVP2 del IBDV, se puede fusionar con un polipéptido heterólogo y las proteínas de fusión (quiméricas) así obtenidas se pueden ensamblar juntas y formar las CVLPs, específicamente las citadas CVLP-pVP2s*, que tienen propiedades similares a las de las cápsides virales nativas en términos de especificidad e interacciones con células, y que además pueden ser manipuladas para ser dirigidas hacia otras células diana.

- 45 Los citados IBDV CVLP-pVP2s* se forman por el ensamblaje de proteínas de fusión que consisten en una región A, que consiste en una proteína pVP2 del IBDV o un fragmento de dicha proteína pVP2 del IBDV que consiste en al menos una secuencia homóloga a la secuencia del 1 al n fragmentos de la proteína pVP2 del IBDV, en donde "n" es un número entero entre 441 y 501, y una o más regiones B que consisten en polipéptidos heterólogos, en donde dicha región B se une al extremo amino terminal - o carboxilo terminal de dicha proteína pVP2 del IBDV*. Los citados polipéptidos heterólogos contienen un polipéptido de interés, tales como un polipéptido para utilizar en vacunación (inmunización), terapia, diagnóstico, etc. Por lo tanto, dichas CVLP-pVP2s* se pueden utilizar para fines sanitarios, por ejemplo fines terapéuticos, profilácticos o preventivos, o de diagnóstico, etc., por ejemplo en la preparación de vacunas, vectores de terapia génica, etc.

- 55 Los estudios realizados por los inventores han mostrado sorprendentemente que es posible obtener CVLPs formadas por el ensamblaje de la proteína de fusión que se compone de (i) fragmentos de la proteína pVP2 del IBDV

(por ejemplo, fragmentos de pVP2 con 441 a 501, preferiblemente de 441 a 466, residuos de aminoácidos contiguos que se inician después del aminoácido 1 de la proteína pVP2 del IBDV), y (ii) una secuencia de aminoácidos heterólogos, y que dichas secuencias de aminoácidos heterólogos no son un obstáculo para formar dichas CVLPs. Los inventores también han observado que dichas CVLPs se pueden utilizar para inmunizar efectivamente las aves contra la infección inducida por IBDV o para proteger efectivamente los animales de la infección inducida por otros agentes causales (dependiendo de la secuencia de aminoácidos heterólogos presentes en dichas CVLPs y en el antígeno/inmunógeno contenido en dicha secuencia).

En una modalidad particular, los inventores han obtenido las CVLPs formadas por ensamblaje de la proteína de fusión que se compone de fragmentos de la proteína pVP2 del IBDV (por ejemplo, fragmentos de pVP2 con 441 a 466 residuos de aminoácidos contiguos que inician se después del aminoácido 1 de la proteína pVP2 del IBDV) y una secuencia de aminoácidos heterólogos, tales como una histidina-tag (Ejemplo 1). En otra modalidad particular, los inventores también han observado la formación de CVLP por medio de la expresión de fragmentos de la proteína pVP2 del IBDV, particularmente el fragmento identificado en esta descripción como proteína pVP2-456, fusionada al péptido quimérico del virus de la enfermedad de la fiebre aftosa (FMDV) llamado BT, que comprende FMDV B y epítopes de la célula T (Ejemplo 3) (Zhang, Q. et al., 2002, Acta Virologica 46(1): 1-9).

La producción de CVLPs basadas en una única proteína (pVP2*) tiene muchas ventajas, tanto en el nivel de manipulación de los vectores de expresión utilizados y en el nivel de rendimiento de la producción, en comparación con la producción de otras CVLPs formadas por el ensamblaje de dos proteínas (por ejemplo, la proteína pVP2 del IBDV y una proteína de fusión basada en la proteína VP3 del IBDV).

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se relaciona con una proteína de fusión que comprende una región A que se compone de una proteína pVP2 del IBDV o un fragmento de dicha proteína pVP2 del IBDV que se compone de al menos una secuencia homóloga a la del fragmento 1 a n de la proteína pVP2 del IBDV, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501, y una o dos regiones B que se componen de un polipéptido heterólogo. Dichos polipéptidos heterólogos son los polipéptidos de interés. El proceso para obtener dicha proteína de fusión constituye un aspecto adicional de esta invención.

La presente invención se relaciona con una partícula quimérica vacía similar al virus, llamada genéricamente IBDV CVLP-pVP2* (singular) o CVLP-pVP2s* (plural) en esta descripción, caracterizada porque se forma por el ensamblaje de dicha proteína de fusión definida anteriormente.

Un aspecto adicional de esta invención se relaciona con un proceso para la producción del IBDV CVLP-pVP2s* proporcionado por esta invención, con base en la expresión del gen de dicha proteína de fusión definida anteriormente.

La presente invención también se relaciona con los ácidos nucleicos, casetes de expresión, vectores recombinantes y células huésped, desarrollados para llevar a cabo dicho proceso para la producción de las citadas proteínas de fusión o dichas IBDV CVLP-pVP2s*, así como su uso para la producción de las citadas proteínas de fusión IBDV CVLP-pVP2s*.

Dichas IBDV CVLP-pVP2s* tienen la capacidad de vectorizar o incorporar en los portadores, productos de interés tales como moléculas con actividad biológica, por ejemplo fármacos, polipéptidos, proteínas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.

Por lo tanto, en otro aspecto adicional la presente invención se relaciona con composiciones farmacéuticas que comprenden dichas IBDV CVLP-pVP2s* tales como vacunas, vectores de terapia génica y sistemas de administración de la sustancia activa. Dichas vacunas, vectores de terapia génica y sistemas de administración de la sustancia activa constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 muestra la expresión de mutantes de eliminación del extremo C-terminal de pVP2 con y sin un His-tag en el extremo N-terminal. La recolección de mutantes de expresión de pVP2/VP2 sin (Figura 1A) y con (Figura 1B, 9C) His-tag fue analizada por SDS-PAGE y el Western-blot por medio del uso de un anticuerpo policlonal anti-VP2 (Figura 1A, 1B) y anti- His (Figura 1C). El mismo volumen del extracto celular fue cargado para cada mutante con el fin de comparar de esta manera los niveles relativos de expresión de los mutantes de pVP2/VP2. Las cápsides del IBDV fueron utilizadas como un control positivo, y se indican las posiciones correspondientes a pVP2 y VP2. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda en kDa. En aras de la simplificación, los mutantes pVP2/VP2 se denominan de acuerdo con la posición de los últimos aminoácidos. Con el fin de asegurar que la proteína VP3 no está presente y para descartar de esta manera las posibles contaminaciones, el Western blot fue controlado utilizando anticuerpos anti-VP3 (no se muestran).

Figura 2 muestra un análisis de la α -hélice del extremo C-terminal de pVP2. La Figura 2A muestra el espectro de dicroísmo circular (CD) del péptido, en código de una letra, FGFKDIIIRAIRRI (SEQ ID NO: 1) en solución reguladora PES, en la ausencia (línea discontinua) o en la presencia de 30% de trifluoroetanol (TFE) (línea continua). En la figura se pueden observar la forma elíptica mínima a 208 y 220 nm y la incrementada a 195 nm. En la Figura 2B, se muestra la estructura secundaria de los residuos 241-250 de *LmTIM*. Véase la naturaleza anfipática de la hélice alfa.

Figura 3 muestra un análisis de proteínas pVP2 y del mutante HT-pVP2 en geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. La Figura 3A muestra un diagrama de la región C-C-terminal de pVP2, y se indican las posiciones y las secuencias que han sido seleccionadas para las eliminaciones en los mutantes. También se generaron las versiones mutantes His-tag. Tanto los mutantes con tag (Figura 3C) como sin tag (Figura 3B) se expresaron a niveles altos y se centrifugaron en dos etapas; se tomaron 12 fracciones y se concentraron 20 veces, luego se cargaron 1-10 ml de cada fracción (0.1 ml por mutante HT-pVP2). Se analizaron por SDS-PAGE y desarrollaron por tinción de Coomassie. El asterisco indica que el gel fue analizado por Western blot utilizando un anticuerpo anti-VP2 (VP2-512). Los mutantes VP2-487 y VP2-494 no forman estructuras suficientemente estables para resistir las condiciones de purificación, dado que no dan un precipitado a partir del primer gradiente de pureza (el resultado no se muestra). En la Figura 3D, se muestra el perfil típico de proteínas de células IBDV infectadas con IBDV. La dirección de sedimentación fue de derecha a izquierda, y la fracción 12 representa la parte superior de cada gradiente.

Figura 4 representa fotografías de microscopía electrónica del ensamblaje de pVP2 de los mutantes de eliminación de la región C-terminal. Las Figuras 4A y 4B muestran que los mutantes VP2-441 y VP2-456 forman partículas con cápsides con simetría T=1, a pesar del hecho de algún residuo asociado en estructuras más grandes inestables formadas por 12 partículas dodecaédricas (flechas en la Figura 4A). Las Figuras 4C, 4D y 4E muestran fotografías de diferentes ensamblajes de VP2-466: se muestran en la Figura 4C estructuras tubulares con un arreglo hexagonal deducido a partir de sus transformadas de Fourier (inserto) en las fracciones inferiores, la Figura 4D muestra partículas con cápsides T=1, tubos delgados rotos y material disociado como estructuras predominantes, y también se obtuvieron partículas con cápsides T=13 en las fracciones del medio, y la Figura 4E muestra las partículas con T=1 en las fracciones de la parte superior.

Figura 5 consiste de las fotografías obtenidas por microscopía electrónica de los ensamblajes correspondientes a las proteínas His-pVP2 mutantes con eliminaciones en la región C-terminal. Las fracciones de concentración fueron diluidas (1/50) para la observación óptima de los ensamblajes obtenidos. Figura 5A muestra los ensamblajes HT-VP2-441: estructuras de cápside con T=1 y ensamblajes dodecaédricos más grandes (indicados con flechas). La Figura 5B muestra ensamblajes HT-VP2-466: partículas con cápsides con T=13 y T=7 en las fracciones intermedias. La Figura 5C muestra los ensamblajes de HT-VP2-466 partículas con cápsides T=13 y T=7 en las fracciones intermedias. Las Figuras 5D, 5E y 5F muestran ensamblajes de HT-VP2-476: estructuras tubulares del tipo I en las fracciones inferiores (Figura 5D), partículas con cápsides T=13 y T=7 y piezas con ensamblaje tubular en las fracciones intermedias (Figura 5E), y ensamblajes irregulares en las fracciones de la parte superior (Figura 5F). La barra corresponde a una longitud de 100 nm.

Figura 6 muestra la estructura tri-dimensional de la cápside del IBDV. La Figura 6A muestra una micrografía crioelectrónica de las cápsides del IBDV. La longitud de la barra es 50 nm. La Figura 6B muestra una representación de la superficie exterior (izquierda) e interior (derecha) de la cápside del IBDV vista a lo largo de un eje de dos dimensiones de simetría icosaédrica. El mapa de superficie ha sido representado asumiendo la presencia de 780 moléculas de VP2-441 y un valor de $0.73 \text{ cm}^3/\text{g}$ como un volumen de proteína específica parcial. Con el fin de ver con claridad los poros envueltos, sólo se muestra el hemisferio frontal del mapa. Los cinco tipos de capsómeros triméricos se indican con letras "a" a "e". La longitud de la barra es 200 \AA .

Figura 7 muestra la estructura tri-dimensional de las cápsides HT-VP2-466. La Figura 7A muestra una fotografía de criomicroscopía electrónica de los ensamblajes HT-VP2-466 (fracción 7). La longitud de la barra es 50 nm. Los círculos encierran tres ensamblajes icosaédricos distinguibles claramente con una simetría T=13, T=7 y probablemente T=1. La longitud de la barra es 50 nm. La Figura 7B muestra la estructura tri-dimensional de HT-VP2-466 cápsides con T=13 (izquierda y centro) y T=7 (derecha). Estos mapas de densidad fueron perfilados con el fin de abarcar un volumen de 780 (T=13) o 420 (T=7) HT-VP2-466 moléculas. Se indican los tipos de trímeros de HT-VP2-466. La longitud de la barra es 200 \AA .

Figura 8 muestra una comparación estructural de las cápsides del IBDV y HT-VP2-466. La Figura 8A muestra los perfiles de densidad del IBDV (línea continua) y cápsides HT-VP2-466 (línea punteada) 3DR, ambas analizadas a una resolución de 15 \AA . Las envolturas de la proteína ($r = 253\text{-}350 \text{ \AA}$) virtualmente se solapan excepto para las diferencias pequeñas (flechas). La Figura 8B muestra una fotografía del gel SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie de las proteínas de las cápsides IBDV y HT-VP2-466 utilizadas para la criomicroscopía electrónica. pVP2/VP2 y VP3 fueron cuantificadas a partir de geles iguales. Las Figuras 8C y 8D muestran las secciones cruzadas de las cápsides tomadas del IBDV y HT-VP2-466 3DR, respectivamente. La proteína y el ARN son oscuros. La Figura 8E representa un mapa, calculando la diferencia entre HT-VP2-466 y la cápside del IBDV. El mapa resultante se representa en la superficie externa de la cápside del IBDV vista a lo largo de un eje icosaédrico de dos dimensiones. La Figura 8F representa un mapa de diferencia calculado a partir de la diferencia del IBDV en

relación con la cápside HT-VP2-466. Al restar estas diferencias, el mapa resultante, que se muestra como 132 lóbulos principales, se muestra en la superficie interior de la cápside HT-VP2-466 vista a lo largo de un eje icosaédrico de dos dimensiones. Cada una de estas islas de densidad, utilizando $0.73 \text{ cm}^3/\text{g}$ como un volumen de proteína parcial, corresponde a aproximadamente 26 kDa. Por otra parte, la masa de 5-6 copias de los segmentos de 442-466 (2.6 kDa) y His-Tag (3.4 kDa) oscilan de 31 a 37 kDa cada una. La longitud de la barra es 200Å.

Figura 9 muestra la organización estructural de las cápsides del IBDV y HT-VP2-466. Las secciones icosaédricas de las cápsides IBDV (mitad izquierda) y de HT-VP2.466 (mitad derecha) 3DR se muestran a una resolución de 15Å, y se ven dentro de un eje de dos dimensiones. Las distancias perpendiculares de las secciones icosaédricas que se muestran a partir del centro de cápsides con T=13 son 328 Å (A), 319 Å (B), 311 Å (C), 302 Å (D), 294 Å (E), 286 Å (F), 277 Å (G) y 269 Å (H). Las facetas han sido generadas a partir del programa Facets (proporcionada por R.A. Crowther, MRC, Cambridge). La longitud de la barra es 200Å.

Figura 10 muestra los ensamblajes de proteínas mutantes pVP2 y HT-pVP2. La Figura 10A muestra un diagrama que ilustra los ensamblajes adoptados por VP2 con diferentes extensiones del extremo C-terminal, dependiendo de la extensión C-terminal de la secuencia, sola (VP2) o con His-tag (HT-VP2). Se muestra la α -hélice del péptido, en un código de letra, 443-GFKDIIRAIR-453 (SEQ ID NO: 2). Cabe señalar que a medida que la longitud del C-terminal de la secuencia unida a VP2 (o su versión His-tag) aumenta, existe un balance en el desplazamiento entre las estructuras con las cápsides con T=1 y tubos, que favorece la formación de estructuras tubulares hexagonales. También se muestra la secuencia completa de la región C-terminal de pVP2 y de los sitios utilizados en esta invención. La Figura 10B muestra una representación de la α -hélice mencionada anteriormente para el péptido de SEQ ID NO: 2 en la izquierda. La carga complementaria propuesta entre la α -hélice anfipática y los últimos cinco aminoácidos de la región C-terminal de VP3 (o la alineación de la región His-Tag (Htag) de VP3 similar) utilizados en la presente invención se muestran en el lado derecho de la figura. Las secuencias de VP3 y H-tag se muestran en direcciones opuestas, a partir de la región C-terminal a la N-terminal.

Figura 11 muestra el resultado de un análisis Western blot de diferentes fracciones (F6-F11) que contienen cápsides quiméricas del IBDV formadas por el ensamblaje de la proteína de pVP2 del IBDV-456 y el péptido BT quimérico que contiene el Virus de la Fiebre Aftosa, o FMDV, epítopos Banda T expresados en levaduras. La mancha superior muestra los resultados obtenidos utilizando un anticuerpo anti-VP2 del IBDV específico, mientras que la mancha inferior muestra los resultados obtenidos utilizando un anticuerpo anti-FMDV específico. Se pueden observar en la mancha superior diferentes bandas inmunorreactivas (polipéptidos) debido a la existencia de los agregados de la producción de las proteínas cuando las cápsides se forman; los mismos polipéptidos se reconocen por los anticuerpos anti-FMDV específicos (panel inferior). El control (pESCURA/pVP2) muestra una banda inmunorreactiva contra anticuerpos anti-VP2 específicos con un peso molecular más pequeño que no se reconoce por los anticuerpos anti-FMDV específicos.

Figura 12 muestra los resultados de un ensayo de ELISA utilizando anticuerpos contra virus de la fiebre aftosa (FMDV) tres semanas después de la vacunación de ratones con CVLPs.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión, de ahora en adelante proteína de fusión de la invención, que se compone de una región A que se compone de la proteína pVP2 del fragmento de proteína IBDV de residuos de aminoácidos 1 a n, en donde "n" es un número entero entre 441 y 501, y una o dos regiones B que se componen de polipéptidos heterólogos. Dichos polipéptidos heterólogos contienen uno o más polipéptidos de interés. La región B puede ser localizada en la posición terminal amino (N-) o carboxilo (C-), en relación con el fragmento de la proteína de la región A.

Como se utiliza en la presente invención, el término "IBDV" se refiere al virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa e incluye diferentes cepas del IBDV que pertenecen a cualquiera de los serotipos conocidos (1 o 2) [a modo de ilustración, véase la revisión de van den Berg TP et al. 2000. Rev Sci Tech. 19:509-43].

El término "proteína pVP2 del IBDV" generalmente se refiere a una proteína de la secuencia de aminoácidos la cual comprende, o consiste de, la secuencia de aminoácidos de la proteína pVP2 del IBDV e incluye cualquiera de las diferentes proteínas pVP2 representativas de cualquiera de las cepas mencionadas del IBDV [base de datos de NCBI proteína], de acuerdo con la definición dada 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 con las proteínas sustancialmente homólogas a dichas proteínas pVP2 del IBDV, i.e. proteínas que presentan buena alineación con la secuencia de una cierta proteína pVP2 del IBDV, por ejemplo proteínas de las secuencias de aminoácidos de las que tienen un grado de identidad en relación con dichas proteínas pVP2 del IBDV de al menos 60%, preferiblemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos 90% y, aún más preferiblemente de al menos 95%. Las secuencias homólogas a una secuencia de la proteína pVP2 del IBDV pueden ser identificadas fácilmente por una persona de habilidad en el arte con la ayuda de un programa de ordenador apropiado para comparar secuencias, por ejemplo el

programa BLAST (Altschul et al. 1997. Nucleic Acids Res. 25:3389). En una modalidad particular la proteína pVP2 del IBDV es la cepa Soroa de la proteína pVP2 del IBDV, cuya la secuencia de aminoácidos de longitud completa se deposita en el NCBI con número de acceso AAD30136 (SEQ ID NO: 16).

El término "fragmento 1 a n de la citada proteína pVP2 del IBDV, en donde "n" es un número entero entre 441 y 501", generalmente se refiere a un péptido o proteína de la secuencia de aminoácidos de la cual consiste de la secuencia de aminoácidos contiguos comprendida entre el residuo 1 y el residuo "n" de la proteína pVP2 del IBDV, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501. Por lo tanto, dicho fragmento 1 a n de la proteína pVP2 del IBDV presente, en su caso puede estar, en las CVLPpVP2s* proporcionadas por esta invención, tiene una secuencia de aminoácidos que se compone de, o esencialmente que se compone de, entre 441 y 501 residuos de aminoácidos contiguos, que inician a partir del residuo de aminoácidos número 1, de cualquier proteína pVP2 representativa de cualquier cepa del IBDV, por ejemplo de la proteína de cepa Soroa de pVP2 del IBDV [NCBI, número de acceso AAD30136] (SEQ ID NO:16).

Los fragmentos particulares 1 a n de la proteína pVP2 del IBDV se indican para el siguiente formato "pVP2-n", en donde "n" es como se define previamente. En una modalidad particular, dicho fragmento 1 a n de la proteína pVP2 del IBDV es una proteína seleccionada del grupo que se compone de:

(i) la proteína pVP2-441, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 al residuo 441 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ. ID. NO.16;

(ii) la proteína pVP2-452, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 al residuo 452 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ ID NO: 16;

(iii) la proteína pVP2-456, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 al residuo 456 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ ID NO: 16;

(iv) la proteína pVP2-466, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 al residuo 466 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ ID NO: 16;

(v) la proteína pVP2-476, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 al residuo 476 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ ID NO: 16;

(vi) la proteína pVP2-487, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 al residuo 487 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ ID NO: 16;

(vii) la proteína pVP2-494, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 al residuo 494 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ ID NO: 16; y

(viii) la proteína pVP2-501, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 al residuo 501 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ ID NO: 16.

La proteína de fusión de la invención comprende una región A que consiste en el fragmento de proteína pVP2 del IBDV que consiste en los residuos de aminoácidos 1 a n, en donde "n" es un número entero entre 441 y 501, y una o dos regiones B que consiste en polipéptidos heterólogos.

La proteína de fusión de la invención consiste de una región A, que consiste en el fragmento de la proteína pVP2 del IBDV que consiste en los residuos de aminoácidos 1 a n, en donde "n" es un número entero entre 441 y 501, unido a una o dos regiones B que consisten en un polipéptido heterólogo, en donde dichos polipéptidos heterólogos no son polipéptidos IBDV nativos y dichos polipéptidos heterólogos contienen uno o más polipéptidos de interés útiles en vacunación, terapia y/o diagnóstico, y en donde dichas regiones B se unen a una región terminal de dicha región A. En una modalidad particular, dichas regiones B se unen al amino terminal del fragmento de proteína de la región A de dicha proteína pVP2 del IBDV, mientras que en otra modalidad particular, dicha región B se une al carboxilo terminal del fragmento de proteína de la región A de dicha proteína pVP2 del IBDV.

El fragmento de la proteína pVP2 del IBDV que forma la región A de la proteína de fusión de la invención puede ser cualquier fragmento de proteína pVP2 representativo de cualquier cepa del IBDV, por ejemplo la cepa Soroa pVP2 del IBDV de longitud completa [NCBI, número de acceso AAD30136] (SEQ ID NO: 16).

La región A consiste de un fragmento 1 a n de dicha proteína pVP2 del IBDV. Dicho fragmento 1 a n de la proteína pVP2 del IBDV que forma la región A de la proteína de fusión de la invención puede ser cualquier fragmento 1 a n de una proteína pVP2 representativa de cualquier cepa del IBDV, por ejemplo, de la cepa Soroa. En una modalidad particular, dicho fragmento 1 a n de la proteína pVP2 del IBDV que forma dicha región A es una proteína seleccionada del grupo que se compone de la proteína pVP2-441, la proteína pVP2-452, la proteína pVP2-456, la

proteína pVP2-466, la proteína pVP2-476, la proteína pVP2-487, la proteína pVP2-494, y la proteína pVP2-501, preferiblemente seleccionado de la proteína pVP2-441, la proteína pVP2-452, la proteína pVP2-456 y la proteína pVP2-466.

- 5 La región B presente en la proteína de fusión de la invención consiste de polipéptidos heterólogos. Como se utiliza en la presente invención, el término "polipéptidos heterólogos" se refiere a los polipéptidos que no pertenecen a la cápside del IBDV nativa.

En una modalidad, dichos polipéptidos heterólogos contienen uno o más polipéptidos de interés. El tamaño de los polipéptidos de interés puede variar dentro de un amplio rango, de unos pocos aminoácidos hasta cientos de aminoácidos. Dicho polipéptido de interés puede ser virtualmente cualquier polipéptido, independientemente de su origen (eucariota, procariota, viral, etc.), susceptible de ser expresado recombinantemente, por ejemplo un antígeno, tal como un antígeno viral, bacteriano, o microbiano, etc., contra el cual es deseable inducir una respuesta inmune en un animal (incluyendo a los seres humanos); una enzima, tal como una enzima destinada a complementar una función en la cual un organismo es deficiente; o un polipéptido que comprende un dominio peptídico unido al ácido nucleico capaz de reconocer específicamente una secuencia de ADN o ARN diana que permite el enlace de la proteína de fusión de la invención con una secuencia del ácido nucleico que comprende dicha secuencia diana, y su encapsidación en una partícula vacía similar al virus que se compone de dicha proteína de fusión de la invención (IBDV CVLP-pVP2s*). Dichos polipéptidos de interés son polipéptidos útiles en la vacunación, terapia o diagnóstico, tales como un epítipo o determinante antigénico capaz de inducir una respuesta inmune en animales y humanos contra enfermedades causadas por los virus, bacterias, parásitos o cualquier otro tipo de microorganismos, o contra enfermedades tumorales. En una modalidad específica, dicho polipéptido de interés es el péptido quimérico del virus de la enfermedad de la fiebre aftosa (FMDV) llamado BT, que comprende epítopes de la célula B (epítipo B) FMDV y epítopes de la célula T (epítipo T) (Zhang, Q. et al., 2002, Acta Virologica 46(1):1-9). En una modalidad particular, el epítipo B se localiza en la proteína FMDV VP1, por ejemplo entre las posiciones 133-159 de dicha proteína VP1 del serotipo C aislado Español, o en posiciones equivalentes de otros aislados, mientras que el epítipo T se localiza en la proteína FMDV VP4, por ejemplo entre las posiciones 20-34 de dicha proteína VP4 del serotipo Asia FMDV.

En una modalidad particular, dicha región B consiste de un polipéptido único de interés. Sin embargo, en otra modalidad particular, dicha región B consiste de dos o más polipéptidos idénticos o diferentes de interés que pueden formar tandemes.

- 30 En una modalidad particular, la proteína de fusión de la invención consiste de una región A unida a una única región B. En este caso, dicha región B puede estar unida al terminal amino de dicha región A; o alternativamente, dicha región B puede estar unida al carboxilo terminal de dicha región A.

Como se discute previamente, la región B puede contener uno o más polipéptidos de interés. En una modalidad particular, dicha región B contiene un polipéptido único de interés, mientras que en otra modalidad particular, dicha región B comprende dos o más diferentes polipéptidos de interés.

- 35 En otra modalidad particular, la proteína de fusión de la invención consiste de una región A unida a dos regiones B, una de ellas unida al terminal amino de dicha región A y la otra al terminal carboxilo de dicha región A. Dichas regiones B pueden ser idénticas o diferentes y cada una de ellas puede contener uno o más polipéptidos de interés, que pueden ser idénticos o diferentes uno de otro.

- 40 De esta manera, en una modalidad, la proteína de fusión de la invención consiste de una región A unida a una primera y una segunda región B, la primera región B que está unida al terminal amino de la región A y la segunda región B que está unida a la región carboxilo terminal de la región A. Como se ha mencionado anteriormente, las citadas primera y segunda regiones B, comprenden polipéptidos heterólogos que son idénticos o diferentes.

- 45 En una modalidad específica, la proteína de fusión de la invención consiste de una región A unida a una primera región B, que contiene un primer polipéptido de interés (PI1) y una segunda región B que contiene un segundo polipéptido de interés (PI2). Dichos polipéptidos de interés (PI1) y (PI2) pueden ser idénticos o diferentes. En una modalidad específica, dichos polipéptidos de interés (PI1) y (PI2) son diferentes el uno del otro.

- 50 En otra modalidad particular, la proteína de fusión de la invención consiste de una región A unida a dos regiones B, una de ellas unida al terminal amino de la región A y la otra al terminal carboxilo de la región A. Dichas regiones B pueden ser idénticas o diferentes y cada una de ellas puede contener uno o más polipéptidos de interés, que pueden ser idénticos o diferentes el uno del otro. En una modalidad específica, la proteína de fusión de la invención consiste de una región A unida a una primera región B que contiene un primer polipéptido de interés (PI1) y una segunda región B que contiene un segundo polipéptido de interés (PI2). Dichos polipéptidos de interés (PI1) y (PI2) pueden ser idénticos o diferentes. En una modalidad específica, dichos polipéptidos de interés (PI1) y (PI2) son diferentes.

La región A de la proteína de fusión de la invención se puede unir directamente a dicha región B. Por otra parte, dicha región A no se une directamente a dicha región B, si no que se une a través de un polipéptido espaciador entre dichas regiones A y B. Por lo tanto, si se desea, la proteína de fusión de la invención además puede contener un polipéptido espaciador localizado entre dichas regiones A y B. Ventajosamente, dicho polipéptido espaciador es un péptido con flexibilidad estructural, preferiblemente un polipéptido que da lugar a un dominio no-estructurado capaz de inducir una respuesta inmune o no. A modo de ejemplo, dicho péptido flexible puede contener repeticiones de residuos de aminoácidos, particularmente de los residuos Gly y Ser, o cualquier otra repetición apropiada de residuos de aminoácidos.

La proteína de fusión de la invención puede ser obtenida por medio de la expresión del gen de la secuencia del ácido nucleico que codifica para dicha proteína de fusión en células huésped apropiadas. Dichas células huésped apropiadas son células que contienen la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de fusión de la invención, por ejemplo células que contienen una secuencia del ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de fusión de la invención o que han sido transformadas por dicho ácido nucleico, o células transformadas, transfectadas o infectadas con un vector recombinante que comprende una secuencia del ácido nucleico que codifica para la proteína de fusión de la invención. Las secuencias del ácido nucleico, casetes de expresión, vectores recombinantes y células huésped que son apropiadas para obtener la proteína de fusión de la invención serán descritas a continuación con detalle en combinación con el proceso para la producción del IBDV CVLP-pVP2s*.

La proteína de fusión de la invención expresada en una célula huésped apropiada se puede auto ensamblar y forma partículas químicas similares a virus derivadas del IBDV llamado genéricamente IBDV CVLP-pVP2* (singular) o IBDV CVLP-pVP2s* (plural) en esta descripción.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con dichas IBDV CVLP-pVP2s*, i.e., una partícula química vacía similar al virus que comprende al menos una proteína de fusión de la invención. Dichas IBDV CVLP-pVP2s* se forman por ensamblaje de la proteína de fusión de la invención, tienen simetría T=1 y se caracterizan porque consisten sólo del ensamblaje de las proteínas de fusión de la invención que se componen de una región A, que se compone del fragmento de proteína pVP2 del IBDV que se compone de residuos de aminoácidos 1 a n, en donde "n" es un número entero entre 441 y 501, y una región B que se compone de polipéptidos heterólogos.

Las IBDV CVLP-pVP2s* de la invención pueden ser obtenidas por medio de la expresión de la proteína de fusión de la invención en células huésped apropiadas bajo condiciones que permiten la formación de dichas partículas similares a virus del IBDV.

Por lo tanto, la invención se relaciona con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de la invención.

La secuencia del ácido nucleico de la invención comprende (i) una secuencia de nucleótidos que se compone del marco de lectura abierto o que codifica las regiones correspondientes al fragmento de proteína pVP2 del IBDV que se compone de residuos de aminoácidos 1 a n, en donde "n" es un número entero entre 441 y 501, y (ii) una secuencia de nucleótidos que se compone del marco de lectura abierto o que codifica la región de uno o más polipéptidos heterólogos que comprenden uno o más polipéptidos de interés.

La secuencia del ácido nucleico proporcionada por esta invención comprende (i) una secuencia de nucleótidos que se compone del marco de lectura abierto o que codifica las región correspondiente al fragmento de proteína pVP2 del IBDV que se compone de los residuos de aminoácidos 1 a n, en donde "n" es un número entero entre 441 y 501, (ii) una primera secuencia de nucleótidos que se compone del marco de lectura abierto o que codifica la región de uno o más polipéptidos heterólogos que contienen uno o más polipéptidos de interés, y (ii') una segunda secuencia de nucleótidos que se compone del marco de lectura abierto o que codifica la región de uno o más polipéptidos heterólogos que contienen uno o más polipéptidos de interés, en donde dicha segunda secuencia de nucleótidos puede ser idéntica o diferente de dicha primera secuencia de nucleótidos. En este caso, una de dicha primera o segunda secuencias de nucleótidos se liga operativamente en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que se compone del marco de lectura abierto o que codifica la región correspondiente a dicho fragmento de proteína pVP2 del IBDV que se compone de los residuos de aminoácidos 1 a n, y la otra se liga operativamente al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que se compone del marco de lectura abierto o que codifica la región correspondiente a dicho fragmento de proteína pVP2 del IBDV que se compone de los residuos de aminoácidos 1 a n.

Como se utiliza en esta descripción, el término "marco de lectura abierto correspondiente al fragmento de proteína pVP2 del IBDV de residuos de aminoácidos 1 a n" incluye, además de la secuencias de nucleótidos de dichos marcos de lectura abiertos, otros marcos de lectura abiertos similares a los mismos que codifican los fragmentos de proteína pVP2, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501, de dicha proteína pVP2 del IBDV.

- Del mismo modo, el término "marco de lectura abierto de uno o más polipéptidos heterólogos que contiene uno o más polipéptidos de interés", incluye cualquier secuencia de nucleótidos codificante de dichos polipéptido(s) heterólogo(s) que contienen uno o más polipéptidos de interés. El término "análogo" como se utiliza en este documento pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que puede ser aislada o construida sobre la base de la secuencia de nucleótidos codificante del fragmento de proteína pVP2 del IBDV, por ejemplo por medio de la introducción de sustituciones de nucleótidos conservadoras o no-conservadoras, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquier extremo de la molécula o la eliminación de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o dentro de la secuencia. Generalmente, una secuencia de nucleótidos similar a otra secuencia de nucleótidos es sustancialmente homóloga a dicha secuencia de nucleótidos.
- En el sentido que se utiliza en esta descripción, la expresión "sustancialmente homóloga" significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, en el nivel de nucleótido, de al menos 60%, preferiblemente de al menos 80%, más preferiblemente de al menos 90% y aún más preferiblemente de al menos 95%.
- La invención proporciona un casete de expresión que comprende una secuencia del ácido nucleico proporcionada por esta invención, i.e. un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de la invención ligada operativamente a elementos de transcripción y, opcionalmente de traducción y control.
- El casete de expresión proporcionado por esta invención comprende, ligado operativamente a elementos de transcripción y, opcionalmente de traducción y control, una secuencia de nucleótidos que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que se compone del marco de lectura abierto o que codifica la región correspondiente al fragmento de la proteína pVP2 del IBDV que se compone de residuos de aminoácidos 1 a n, en donde "n" es un número entero entre 441 y 501, y (ii) una secuencia de nucleótidos que se compone del marco de lectura abierto o que codifica la región de uno o más polipéptidos heterólogos que contienen uno o más polipéptidos de interés.
- Por lo tanto, el casete de expresión proporcionado por esta invención comprende, ligados operativamente a elementos de transcripción y, opcionalmente de traducción y control, una secuencia de nucleótidos que se compone de una secuencia de nucleótidos que se compone del marco de lectura abierto o que codifica la región correspondiente al fragmento de proteína pVP2 del IBDV que se compone de residuos de aminoácidos 1 a n, en donde "n" es un número entero comprendido entre 441 y 501, (ii) una primera secuencia de nucleótidos que se compone del marco de lectura abierto o que codifica la región de uno o más polipéptidos heterólogos que contienen uno o más polipéptidos de interés, y (iii) una segunda secuencia de nucleótidos que se compone del marco de lectura abierto o que codifica la región de uno o más polipéptidos heterólogos que contienen uno o más polipéptidos de interés, en donde dicha segunda secuencia de nucleótidos puede ser idéntica o diferente de dicha primera secuencia de nucleótidos. En este caso, una de dicha primera o segunda secuencias de nucleótidos se liga operativamente en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que se compone del marco de lectura abierto o que codifica la región correspondiente a dicho fragmento de proteína pVP2 del IBDV que se compone de residuos de aminoácidos 1 a n, y la otra se liga operativamente al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que comprende el marco de lectura abierto o que codifica la región correspondiente a dicho fragmento de proteína pVP2 del IBDV que se compone de los residuos de aminoácidos 1 a n.
- Los elementos de transcripción, y opcionalmente de traducción y control presentes en el casete de expresión proporcionados por esta invención incluyen promotores que dirigen la transcripción de las secuencias de nucleótidos (pVP2 del IBDV o fragmento de este y polipéptido heterólogo) al cual se liga operativamente, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su apropiada regulación en tiempo y lugar, por ejemplo señales de inicio y terminación, sitios de división, señales de poliadenilación, origen de replicación, potenciadores transcripcionales, silenciadores transcripcionales, etc. Generalmente, dichos elementos, así como los vectores utilizados para construir los casetes de expresión y los vectores recombinantes de acuerdo con la invención, se eligen en función de las células huésped destinadas a ser utilizadas.
- La invención proporciona un vector recombinante que comprende una secuencia del ácido nucleico proporcionada por esta invención o un casete de expresión proporcionado por esta invención. Virtualmente cualquier vector se puede utilizar en la generación del vector recombinante proporcionado por esta invención. A modo de ejemplo, dichos sistemas de expresión o vectores apropiados puede ser escogidos de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso específico, a partir de dichos plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levaduras (YACs), cromosomas artificiales de bacterias (BACs), cromosomas artificiales basados en bacteriófago PI (PACs), cósmidos, o virus, que además pueden tener un origen de replicación heterólogo, por ejemplo un origen bacteriano o de levadura, por lo que puede ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador que se puede utilizar para seleccionar las células transfectadas que son diferentes del gen o genes de interés. Estos vectores recombinantes pueden ser obtenidos por los expertos en el arte por medio del uso de técnicas de ingeniería genética convencional (Sambrook et al. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), y son parte de la presente invención.

Dicho vector recombinante es un plásmido, tal como un plásmido apropiado para transformar las levaduras, o un virus, tal como baculovirus recombinantes (rBV) que expresan la proteína de fusión de la invención durante su ciclo de replicación y los cuales, después de su ensamblaje, forman las IBDV CVLP-pVP2s*. En una modalidad particular las CVLPs, específicamente IBDV CVLP-pVP2s* que contiene el péptido BT quimérico de FMDV en la posición del C-terminal en relación con la proteína pVP2-456, han sido obtenidos en levaduras. El plásmido de expresión pESCURA/pVP2-456-BT, que fue utilizado para transformar los cultivos *Saccharomyces cerevisiae* (Ejemplo 3), fue generado para este propósito. En otra modalidad particular las CVLPs han sido obtenidas mediante el uso de un sistema de expresión basado en rBV (Ejemplo 1).

La invención proporciona una célula huésped que contiene una secuencia del ácido nucleico proporcionada por esta invención, i.e. un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de la invención. En una modalidad particular, dicha célula huésped es una célula transformada por una secuencia del ácido nucleico proporcionada por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de la invención. En otra modalidad particular, dicha célula huésped es una célula que se transforma, transfecta o infecta con un vector recombinante proporcionada por esta invención que comprende una secuencia del ácido nucleico de la invención que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de la invención.

Virtualmente se puede utilizar cualquier célula huésped susceptible de ser transformada por una secuencia del ácido nucleico proporcionada por esta invención, o cualquier célula huésped susceptible de ser transformada, transfectada o infectada por un vector recombinante proporcionado por esta invención, por ejemplo células de mamífero, células de ave, células de insecto, células de levadura, etc.; sin embargo, en una modalidad particular, dicha célula huésped se selecciona de células de levadura y de insecto. Las levaduras son apropiadas debido a la simplicidad y los costos de producción. Las células de insecto son apropiadas cuando el sistema de expresión comprende un rBV. El uso de rBV es ventajoso para ensayos de bioseguridad en relación con el rango de huésped de baculovirus de los baculovirus, que son incapaces de replicarse en tipos de célula que no sean células de insecto.

La invención proporciona una célula huésped, tal como una levadura, por ejemplo una levadura del género *Saccharomyces*, tal como *S. cerevisiae*, *S. pombe*, etc., o del género *Pichia*, tal como *P. pastoris*, etc., transformada con un vector recombinante proporcionado por esta invención, tal como un plásmido que comprende una secuencia del ácido nucleico de la invención o un casete de expresión proporcionado por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de fusión de la invención.

Preferiblemente, la invención proporciona una célula huésped, tal como una célula de insecto, infectada con un vector recombinante proporcionado por esta invención, tal como un rBV que comprende una secuencia del ácido nucleico de la invención o un casete de expresión proporcionado por esta invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de fusión de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un proceso para la producción de IBDV CVLP-pVP2s* que comprende el cultivo de una célula huésped proporcionada por esta invención que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención bajo condiciones que permiten expresar dicha proteína de fusión, y, si se desea, la recuperación de dichas IBDV CVLP-pVP2s*. En una modalidad particular, dicho proceso se lleva a cabo mediante el uso de una célula huésped proporcionada por esta invención que se compone de una célula transformada por una secuencia del ácido nucleico de la invención que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención. En otra modalidad particular, dicho proceso se lleva a cabo mediante el uso de una célula huésped proporcionada por esta invención que se compone de una célula que se transforma, transfecta o infecta con un vector recombinante proporcionado por esta invención que comprende una secuencia del ácido nucleico de la invención que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de la invención.

Después de expresar las proteínas de fusión de la invención en dichas células, las proteínas expresadas se ensamblan y forman las IBDV CVLP-pVP2s*, que pueden ser aisladas o retiradas del medio y purificadas si así se desea. El aislamiento y purificación de dichas IBDV CVLP-pVP2s* se puede hacer mediante métodos convencionales, por ejemplo por medio de fraccionamiento de gradientes de sacarosa.

En una modalidad particular, la célula huésped es una célula de insecto y la expresión del gen de la proteína de fusión de la invención se hace mediante el uso de un rBV, que permite la expresión de la proteína de fusión de la invención del ácido nucleico proporcionado por esta invención, en células de insecto. Por lo tanto, en una modalidad particular, la invención proporciona un proceso para la producción IBDV CVLP-pVP2s* que comprende (i) el cultivo de células de insecto infectadas con un rBV que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención, bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar las IBDV CVLP-pVP2s*, y (ii) si se desea, el aislamiento, y opcionalmente la purificación de dichas IBDV CVLP-pVP2s*. Dicho proceso por lo tanto comprende primero la obtención de un vector recombinante que se compone de un rBV que comprende un ácido nucleico de la invención o un casete de expresión proporcionado por esta invención que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención, seguido por la infección de las células de insecto con dicho rBV, que expresan las proteínas recombinantes, y si se desea, el

aislamiento de las IBDV CVLP-pVP2s* formadas por el ensamblaje de la proteína de fusión de la invención, y opcionalmente la posterior purificación de dichas IBDV CVLP-pVP2s*.

La construcción de un baculovirus recombinante que permite la expresión de la proteína de fusión de la invención se puede llevar a cabo por una persona versada en la técnica basándose en la descrita en este documento y en el estado del arte respecto a esta tecnología (Sambrook et al. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Leusch MS et al. 1995. A novel host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. Gene 160:91-4; Luckow VA et al. 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 modalidad particular, la célula huésped es una célula de levadura y la expresión del gen de las proteínas de fusión de la invención se puede hacer mediante el uso de un vector recombinante que permite la expresión de la proteína de fusión de la invención en células de levadura. Por lo tanto, en una modalidad particular, la invención proporciona un proceso para la producción del IBDV CVLP-pVP2s* que comprende (i) el cultivo de levaduras transformadas con un vector recombinante que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención, bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes de fusión y su ensamblaje para formar las IBDV CVLP-pVP2s*, y (ii) si se desea, el aislamiento y opcionalmente la purificación de dichas IBDV CVLP-pVP2s*. Dicho proceso por lo tanto comprende primero la obtención de un vector recombinante que se compone de un plásmido que comprende un ácido nucleico de la invención o un casete de expresión proporcionado por esta invención que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención, seguido por la transformación de las células de levaduras con dicho vector recombinante, que expresa las proteínas recombinantes, y si se desea el aislamiento de las IBDV CVLP-pVP2s* formadas por el ensamblaje de la proteína de fusión de la invención, y opcionalmente la posterior purificación de dichas IBDV CVLP-pVP2s*. En una modalidad específica, el sistema de expresión apropiado para transformar las levaduras se basa en un sistema de expresión de levadura pESC (Stratagene). La obtención de levaduras transformadas con un vector recombinante apropiado que permita la expresión de la proteína de fusión de la invención, se puede hacer por una persona versada en la técnica basándose en la descrita en este documento y en el estado del arte respecto a esta tecnología (pESC epitope tagging vectors Instructions manual. Stratagene www.stratagene.com; Sambrook et al. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Generalmente, las IBDV CVLP-pVP2s* obtenidas en células de levaduras son cápsides T=1; a modo de ilustración, cuando IBDV CVLP-pVP2s*, en cual región A consiste de la proteína pVP2-441, la proteína pVP2-456 o la proteína pVP2-466, fueron producidas en células de levaduras, las IBDV CVLP-pVP2s* así obtenidas fueron solo cápsides T=1.

La invención se relaciona con el uso del vector recombinante proporcionado por esta invención para la producción y la obtención de la proteína de fusión de la invención y/o las IBDV CVLP-pVP2s* de la invención.

Las IBDV CVLP-pVP2s* se pueden utilizar como vectores o como portadores para productos de interés, tales como moléculas con actividad biológica, por ejemplo fármacos, polipéptidos, proteínas, anticuerpos, hormonas, enzimas con terapéuticos potenciales para tratar enfermedades, ácidos nucleicos, etc., para que puedan ser utilizadas con fines terapéuticos, de diagnóstico o de investigación. Preferiblemente, dichas moléculas de interés biológico incluyen polipéptidos de interés, tales como antígenos o inductores de respuesta inmune en animales o humanos en a quienes se administra, para que puedan ser utilizadas en la preparación de vacunas contra enfermedades en humanos y animales causadas por los virus, bacterias, parásitos o cualquier otro tipo de microorganismos, o contra enfermedades tumorales, o incluyen secuencias del ácido nucleicos útiles en terapia génica, destinadas a ser introducidas dentro de apropiadas células, para que puedan ser utilizadas en la preparación de vectores de terapia génica, o incluyen compuestos de interés sanitario (anticuerpos, hormonas, enzimas con potencial terapéutico para tratar enfermedades, etc.) para su administración en un cuerpo humano o animal, para que puedan ser utilizadas como sistemas de administración de la sustancia activa.

Por lo tanto, la invención se relaciona con el uso del IBDV CVLP-pVP2s* en la preparación de una composición farmacéutica, por ejemplo vacunas, vectores de terapia génica, sistemas de administración de la sustancia activa, etc. En una modalidad particular, dicha composición farmacéutica es una vacuna destinada a conferir la protección contra enfermedades humanas o animales causadas por los virus, bacterias, parásitos o cualquier otro tipo de microorganismos, o contra enfermedades tumorales. Preferiblemente, dicha composición farmacéutica es un vector de terapia génica o un sistema de administración de la sustancia activa; ejemplos ilustrativos y no-limitantes de dichas sustancias activas incluyen fármacos, anticuerpos, hormonas, enzimas potencialmente involucradas en el tratamiento de enfermedades, etc.

Además, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del IBDV CVLP-pVP2s* y un adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una modalidad particular, dicha composición farmacéutica es una vacuna, una terapia génica o un sistema de administración de la sustancia activa.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de IBDV CVLP-pVP2s*, opcionalmente con uno o más adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Dicha vacuna es útil en la protección (i.e., protege) de los animales y humanos contra enfermedades causadas por microorganismos (virus, bacterias, parásitos, etc.), o contra enfermedades tumorales. En una modalidad particular, dicha vacuna es particularmente útil en la protección de animales y humanos simultáneamente contra la infección causada por dos o más agentes infecciosos que inducen la enfermedad. A modo de ejemplo, la vacuna proporcionada por esta invención se puede utilizar para proteger las aves, por ejemplo, pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces, etc., contra IBDV y contra uno o más agentes infecciosos responsables para enfermedades aviares (patógenos de aves).

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad calculada del IBDV CVLP-pVP2s* para la producción del efecto deseado, y generalmente será determinado, entre otras causas, por las características típicas de las IBDV CVLP-pVP2s* y el efecto de inmunización que se obtiene.

Los adyuvantes y portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en dichas vacunas son adyuvantes y portadores conocidos por aquellos de habilidad en el oficio y convencionalmente utilizados en la preparación de las vacunas.

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

La vacuna proporcionada por esta invención se puede administrar por cualquier método de administración apropiado dando lugar a una respuesta inmune que protege contra la secuencia heteróloga o epítipo utilizado, razón por la cual dicha vacuna será formulada en la forma farmacéutica que es apropiada para el método de administración elegido. En una modalidad particular, la administración de la vacuna proporcionada por esta invención se lleva a cabo vía parenteral, por ejemplo vía intraperitoneal, subcutánea, etc.

Por lo tanto, la invención se relaciona con un vector de terapia génica que comprende una IBDV CVLP-pVP2*.

Además, la invención se relaciona con un sistema de administración de la sustancia activa que comprende al menos una IBDV CVLP-pVP2* y una sustancia activa. Ejemplos ilustrativos, no limitantes de sustancias activas incluyen fármacos, anticuerpos, hormonas, enzimas con potencial terapéutico para tratar enfermedades, etc.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no se deben considerar en ningún sentido como limitantes de dicha invención.

EJEMPLO 1

Obtención del IBDV CVLP-pVP2s* en Células de Insecto y Análisis de Polimorfismo Estructural

I. MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del virus

La cepa Soroa del IBDV, una cepa del IBDV de serotipo I, fue purificada por un protocolo estándar a partir de células QM7 de músculo de codorniz (Lombardo et al. 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. J Virol 73, 6973-6983) y fue almacenada en solución reguladora PES 25 mM (piperazina-N-N'-bis (ácido 2-etanosulfónico) [PIPES] pH=6.2, NaCl 150 mM y CaCl₂ 20 mM).

Construcción de los Baculovirus Recombinantes

Los baculovirus recombinantes (rBV) FB/VP2-456, han sido descritos previamente ((Castón et al., 2001. Cterminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. J Virol 75, 10815-10828).

El plásmido pVOTE.2/POLY (Oña et al., 2004. The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. Virology 322, 135-142). ha sido utilizado como molde de ADN para la síntesis por PCR de fragmentos de ADN de aquellos derivados de pVP2 para generar los rBVs identificados como FB/VP2-441, FB/VP2-466, FB/VP2-476, FB/VP2-487, FB/VP2-494, FB/VP2-501 y FB/VP2-512. El PCR se llevó a cabo con polimerasa de ADN Vent (Biolabs) utilizando el mismo cebador para el extremo 5' (5'-pVP2) y un cebador específico para el extremo 3' de cada mutante (Tabla 1).

Tabla 1

Secuencias del Cebador oligonucleótido Utilizadas para Generar Eliminaciones del Mutante del Extremo del C-terminal		
Cebador	Secuencia (5' -> 3')	SEQ ID NO
5'-VP2	GCGCAGATCTATGACAAACCTGTCAGATCAAACCC	3
NotI-441	GCGCGCGGCCGCTTATGCTCCTGCAATCTTCAGG	4
HindIII-456	GCGCAAGCTTACACAGCTATCCTCCTTATGGC	5
HindIII-466	GCGCAAGCTTAGGCAGGTGGGAACAATGTGG	6
HindIII-476	GCGCAAGCTTAACCTTCCCCAATTGCATGGGGC	7
HindIII-487	GCGCAAGCTTAGGCCTGGGCCTCATCGCCCAGC	8
HindIII-494	GCGCAAGCTTAGGCTCGAGCAGTTCCTGAAGC	9
HindIII-501	GCGCAAGCTTAAGCTCTTGCTTTTCCTGACGC	10
HindIII-512	GCGCAAGCTTAGGCGAGAGTCAGCTGCCTTATGC	11

Los fragmentos de la digestión de PCR con BgIII-HindIII fueron clonados en los múltiples sitios de clonación (polienlazante) BamHI-HindIII de los plásmidos de la expresión de la proteína FastBac y pHisFastBac-C (Invitrogen). El plásmido pHisFastBac-C fue utilizado para expresar las variantes His-pVP2. La secuencia extra *tag* que fue utilizada, en códigos de una letra, fue MSYYHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMGS (SEQ ID NO: 12). Las secuencias del plásmido resultantes fueron verificadas por medio del método de secuenciación Sanger (Sanger et al., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74, 5463-5467).

La selección de los bácmidos derivados de la cepa *E. coli*/DH10Bac y la preparación de ésta para su transfección con lipofectamina se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos de los fabricantes (Invitrogen).

Las construcciones se expresaron en células de insecto H5 (Maraver et al., 2003. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. J Virol 77, 2459-2468) (Figura 1).

Caracterización y Purificación de las Estructuras Mutantes de Eliminación pVP2

Las células H5 (2.5×10^8 células) fueron infectadas con el rBV apropiado a una multiplicidad de infecciones (m.o.i.) de 1-5 unidades formadoras de placas (PFU)/célula. Las células fueron recolectadas a 48 horas pos-infección (h.p.i.) y fueron lisadas en solución reguladora de lisis PES que contiene 1% de IGEPAL CA-630 (Sigma) en hielo. El material en partículas fue purificado a través de un cojín de sacarosa al 20% y un gradiente de sacarosa lineal al 25-50%. El material en partículas que contenía la proteína mutada de eliminación pVP2 se concentró 20 veces por ultracentrifugación y fue identificado por medio de SDS-PAGE y Western blotting. Las fracciones ricas en VP2 fueron seleccionadas para estudios estructurales y fueron utilizados dentro de los primeros 1-2 días después de la purificación.

SDS-PAGE y Western Blotting

Los extractos celulares de las células infectadas (10-15 ml) o las fracciones del gradiente de concentración de sacarosa (2-5 ml) se adicionaron a la solución reguladora de Laemmli hasta alcanzar una concentración final de 1x, se calentó (100 °C, 2 minutos). La electroforesis se llevó a cabo en geles al 11% de poli(acrilamida) (38.96% (peso/v) de acrilamida y 1.04 (peso/v) de bis-acrilamida metileno). El Western blotting se llevó a cabo con un suero anti-VP2 (Lombardo et al., 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. J Virol 73, 6973-6983). Se utilizó suero anti-VP3 de conejo como control negativo. El anticuerpo anti-His tag fue obtenido de Sigma.

Microscopía electrónica Convencional

Se dispusieron muestras de 2-5 ml de cada fracción del gradiente de sacarosa y se tiñeron negativamente con de acetato de uranilo acuoso al 2% (peso/v). Las micrografías se registraron con un microscopio electrónico JEOL 1200 EXII que opera a 100 kV con un aumento nominal de x40,000.

5 Microscopía electrónica

Las muestras (gotas de 5 ml), o fracciones que contienen los viriones o cápsides HT-VP2-466, fueron dispuestas sobre una malla cubierta con carbón, se lavaron dos veces con gotas de agua, se secaron por transferencia, y fueron sumergidas en un baño de etano líquido después de los procesos establecidos, esencialmente como lo divulga Castón *et al.* (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. J Virol 75, 10815-10828). Las micrografías se registraron bajo condiciones de exposición mínima de tal manera que las muestras capturadas recibieron exposiciones de 6-10 e-/nm², con aumentos nominales de x 50,000 en un microscopio electrónico Tecnai G2 que opera a 200 kV y está equipado con un dispositivo de campo. El bacteriófago T4 fue vitrificado y el espacio axial de 40.5Å de su eje de cola fue utilizado como estándar de ampliación interna.

15 Microscopía de Dicroísmo Circular (CD)

El péptido de SEQ ID NO: 1 se sintetizó químicamente y su espectro lejano UV CD fue almacenado en un dicrógrafo Jasco utilizando células con un tamaño de 0.1 a 1 mm a 25°C. Cada espectro es la acumulación de 3 escáneres. Las concentraciones del péptido utilizado oscilan de 10 a 200 mM. El espectro CD fue analizado como se describe previamente por Jiménez, 1999 (Jiménez *et al.*, 1999. Helicity of alpha (404-451) and beta (394-445) tubulin C-terminal recombinant peptides. Proteína Sci 8, 788-799) (Figura 4A).

Análisis de Imágenes

Las operaciones generales de procesamiento de imágenes fueron realizadas utilizando un sistema de software PIC (Trus *et al.* 1996. Digital image processing of electron micrographs: the PIC system-III. J Struct Biol 116, 61-67). Las micrografías fueron evaluadas en términos de su resolución y astigmatismo por análisis de Fourier. El valor sub-focal de las micrografías electrónicas seleccionadas permitió la reconstrucción de las estructuras de una resolución dentro del primer cero de la función de transferencia de contraste del microscopio electrónico (CTF). Los valores sub-focales para las micrografías seleccionadas analizadas (81 para IBDV, 82 para las cápsides HT-VP2-466), medidas con el paquete Bsoft (Heymann, 2001), oscilaron de 0.6 a 3.7 mM(CTF en los espacios de 12-30Å', respectivamente). Las micrografías fueron adquiridas con un escáner Zeiss PhotoScan TD a 7 mm/pixel y se combinaron para producir 21 mm pixeles (4.2Å en la muestra). La partículas de proteínas fueron extraídas y pre-procesadas utilizando el proceso automatizado de Conway *et al.* (Conway *et al.*, 1993. The effects of radiation damage on the structure of frozen hydrated capsids HSV-1. J Struct Biol 111, 222-233). Las primeras estimaciones de las orientaciones angulares de las partículas se midieron por procesos de "línea común" en Transformadas de Fourier (PFT) (Baker and Cheng, 1996. A model-based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryoelectron microscopy. J Struct Biol 116, 120-130), utilizando el IBDV 3DR como un modelo inicial, a una escala aproximada, a una resolución de 28 Å'. Se calculó un nuevo mapa de densidad y se utilizó para todos los refinamientos de la fase de orientación posterior y origen, utilizando una versión modificada del algoritmo PFT de modo que se pueden utilizar tanto la amplitud como la información de fase.

Sólo los procesos basados en el modelo fueron utilizados para reconstruir la cápside de VP2 pequeña, y la otra cápside de VP2 pequeña extraída de la cápside de VP2 grande fue utilizada como un modelo inicial. Su estructura tri-dimensional fue calculada como un control interno sin imponer la simetría icosaédrica utilizando un método de retroproyección ponderado y distribuyendo las orientaciones a lo largo del todo el espacio de orientación por vistas equivalentes de selección aleatoria que se relacionaron con los originales por simetría. El mapa de densidad resultante fue similar al obtenido con el método basado en la simetría icosaédrica pero a una resolución inferior (los datos no se muestran). Las fases fueron corregidas para la función de transferencia de contraste (CTF) por medio de transposición simple de las fases del lóbulo de CTF necesarias. Las reconstrucciones fueron calculadas utilizando las técnicas de Fourier-Bessel (Crowther, 1971. Procedures for three-dimensional reconstruction of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs. Phil Trans R Soc Ser B 261, 221-230). Las reconstrucciones finales combinaron las imágenes 10,849 y 1,557 para las cápsides del IBDV y HT-VP2-466, y las resoluciones obtenidas por medio del criterio de correlación de Fourier envolvente (umbral 0.5) de 12 y 15 Å', respectivamente. Otra reconstrucción para las cápsides de HT-VP2-466 más pequeñas fue calculada a partir del mismo conjunto de micrografías. La resolución de la reconstrucción final, que contenía 108 partículas, fue estimada a aproximadamente 23 Å' de acuerdo con el estimado obtenido por el análisis de FSC (Conway *et al.*, 1993. The effects of radiation damage on the structure of frozen hydrated HSV-1 capsids. J Struct Biol 111, 222-233).

Los perfiles de densidad radial cuantificados esféricamente fueron calculados para ambos mapas de T=13 y fueron normalizados y se tomaron a escala para solapar ambos perfiles. Los mapas fueron obtenidos luego por la diferencia de ambos y cambiando el orden de los dos mapas. Las islas de densidad pequeña fueron filtradas para traducir los resultados de ambos mapas (ver Figuras 8E y 8F), considerando sólo las mayores diferencias en los radios correspondientes a la envoltura de la proteína.

II. RESULTADOS

Mutantes de Eliminación Extremo del C-terminal de la Proteína pVP2 que tienen un His-tag en su extremo N-terminal

Dado que el procesamiento del extremo C-terminal de la proteína pVP2 (512 aminoácidos) que da lugar a la proteína VP2 (441 aminoácidos) no ocurre cuando se expresa en baculovirus recombinantes, diferentes construcciones de pVP2 que varían en la longitud del extremo C-terminal han sido expresadas en dicho sistema. Las posiciones 456, 466, 476, 487, 494 y 501 (Figura 3A) han sido seleccionadas con el fin de cubrir uniformemente dicha región. El análisis Western blot de estas variantes de pVP2/VP2 muestra que todos los mutantes de pVP2 con eliminaciones del C-terminal se expresan correctamente, dando lugar a una banda principal (Figura 1). También se ha generado la misma serie de los mutantes de pVP2/VP2, fusionada en su extremo N-terminal con un His-tag (HT-VP2). Los pesos moleculares de dichas variantes de pVP2/VP2 se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Peso Molecular (kDa) de las Variantes pVP2/VP2		
Mutantes-(últimos residuo)	-6x Histidinas	+ 6x Histidinas
VP2-441	47.1	50.5
VP2-456	48.9	52.2
VP2-466	49.9	53.3
VP2-476	50.8	54.2
VP2-487	52.0	55.3
VP2-494	52.6	56.0
VP2-501	53.2	56.6
VP2-512	54.4	57.8

Las variantes de pVP2/VP2 se expresaron a niveles altos y se purificaron por medio de un cojín de sacarosa seguido por un gradiente de sacarosa. Las fracciones obtenidas del gradiente fueron caracterizadas por electroforesis SDS-PAGE. Los geles teñidos con azul de Coomassie mostraron que las fracciones que contienen las variantes de pVP2 tuvieron un muy amplio rango de bandas (Figuras 3B, 3C). La proteínas de fusión obtenidas de las células infectadas con IBDV siguiendo la estrategia descrita anteriormente se purificaron con el propósito de comparar dichos resultados (Figura 3D). Mientras que los mutantes de pVP2 que no contienen His-tag mostraron una organización heterogénea (Figura 3B), las proteínas de fusión pVP2/VP2 que contienen His-tag se organizan de tal manera que su tamaño aumenta a medida que aumenta la longitud del dominio C-terminal (Figura 3C).

Análisis por Microscopía electrónica de Ensamblajes de pVP2/VP2

Los análisis de las diferentes fracciones de proteína obtenidas a partir del gradiente de sacarosa, que fueron teñidas negativamente mediante microscopía electrónica, mostraron una morfología diferente dependiendo de la longitud del extremo C-terminal de pVP2 y en la presencia o ausencia de His-tag.

VP2-441 (Figura 4A) y VP2-456 (Figura 4B) dieron lugar a estructuras de ensamblaje en forma de rosquilla de aproximadamente 23 nm de diámetro que corresponde al de las cápsides dodecaédricas con simetría T=1. Dependiendo del tipo de ensamblaje de VP2-466 que se forme, la variante se sitúa así a través del gradiente de sacarosa. Las fracciones inferiores contenían tubos delgados con un diámetro de aproximadamente 25 nm (Figura

4C), dispuestos regularmente con una morfología helicoidal (Figura 4C, caja). Las fracciones del medio mostraron tubos delgados más cortos con cápsides de simetría similar a T=1 rodeados por material que los interrumpe, indicando que esta simetría es probablemente muy inestable (Figura 4D). También se observaron ocasionalmente las simetrías similares a T=13 también pequeñas (Figura 4E). VP2-476 se comporta de manera similar a VP2-466. La mayoría de las VP2-501s migraron a fracciones en la mitad inferior del gradiente y se ensamblaron en tubos dispuestos parcialmente de aproximadamente 35 nm de diámetro (Figura 4F). En la parte de la mitad superior del gradiente, VP2-501 se ensambla en una estructura tubular trenzada isométrica con un tamaño irregular. VP2-512 finalmente se observó como túbulos cortos curvados y como partículas irregulares.

En las células infectadas por IBDV, la mayoría de las estructuras purificadas fueron localizadas en la mitad del gradiente y corresponden con una partícula icosaédrica de diámetro 65-70 nm (Figura 4H). Sin embargo, las estructuras de forma tubular con organización hexagonal llamada tubos del tipo I, fueron observadas cerca de la parte inferior del gradiente (Figura 4G).

Todos estos resultados juntos muestran que VP2-466 contiene información suficiente para formar cápsides del tipo hexámeros (tubo delgado) y pentámero (cápside T=1), y se observaron esporádicamente cápsides con ensamblaje T=13.

Análisis por microscopía electrónica de ensamblajes (His-) pVP2/VP2

Los ensamblajes de las proteínas de fusión HT-pVP2/VP2 fueron analizados de manera similar. Se observó la presencia de partículas de 23 nm de diámetro en las fracciones enriquecidas de HT-VP2-441 (Figura 5A). El mutante HT-VP2-456 produjo ensamblaje de las estructuras con una morfología similar a cápsides infecciosas reales T=13 (comparar las Figuras 5B y 4H), que migran a la mitad del gradiente. La mayoría de las HT-VP2-456s, cápsides T=1, fueron localizadas en la parte superior del gradiente. La tendencia para formar cápsides correctas fue mejorada con la proteína HT-VP2-466 (Figura 5C). Las partículas con cápsides similares a T=13 se mostraron con una abundancia mayor, y mientras estaban siendo obtenidas con una alta eficiencia, fueron seleccionadas para estudios estructurales de resolución alta. Las cápsides con un tamaño medio de aproximadamente 53 nm se podrían distinguir fácilmente de las cápsides T=13 (flechas, Figura 5C).

Las proteínas de fusión HT-VP2-476 (Figuras 5D-F) y HT-VP2-487 mantuvieron la capacidad de ser ensambladas como cápsides con una estructura similar a los virus, aunque con una eficiencia inferior. Las estructuras predominantes fueron tubos hexagonales de longitudes variables (Figura 5D). Por último, las proteínas HT-VP2-494, HT-VP2-501 y HT-VP2-512 formaron sólo estructuras tubulares con una disposición aparentemente hexagonal.

El extremo N-terminal His-tag de las diferentes proteínas pVP2/VP2 no afectó el ensamblaje de las subunidades en partículas regulares. En la ausencia de la proteína VP3, el otro principal componente de las cápsides, HT-VP2-456, permite el correcto ensamblaje de las estructuras con simetría similar a las cápsides T=13.

Análisis de Dicroísmo Circular de Amino Ácidos 443-452 del Dominio C-terminal de pVP2

La estructura secundaria del péptido de SEQ ID NO: 2, que corresponde a los aminoácidos 443-452 del extremo C-terminal de la proteína pVP2, fue predicha por medio del programa de ordenador Agadir (Muñoz and Serrano, 1994. Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. *Nat Struct Biol* 1, 399-409). Dicho programa detectó una pronunciada tendencia helicoidal en el péptido, que da lugar a una α -hélice anfipática (Figura 10B, izquierda). Con el fin de contrastar esta predicción, se sintetizó un péptido sintético, aminoácidos 442-454, y la media de la estructura secundaria fue analizada por dicroísmo circular. En una solución reguladora acuosa, el péptido mostró insignificante estructura helicoidal, de tal manera que adopta una formación enrollada al azar. Cuando se adiciona trifluoroetanol (TFE), que es un solvente que induce la hélice, da lugar a la formación de un componente claramente helicoidal (Figura 2). Se realizó una búsqueda en la PDB (*Protein Data Base*) con WHATIF (<http://www.cmbi.kun.nl/gv/whatif>) para ver si se podrían encontrar péptidos con similares estructuras conocidas, y dicho péptido fue encontrado en los aminoácidos 241-250 de la triosafosfato isomerasa de *Leishmania mexicana* (*Lm TIM*) (Williams et al., 1999. Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng* 12, 243-250). Cuando dicha secuencia de péptido, en código de una letra, EFRDIIDATR (SEQ ID NO: 13), se compara con los diez aminoácidos de pVP2, se observa que la naturaleza anfipática es casi idéntica: existe un cambio conservador (R para K), una sustitución de D con R, que cambia la polaridad manteniendo un lado de la cadena cargada, y un cambio de T por I.

Estructura de la Cápside del IBDV

Una criomicrografía de las partículas IBDV muestra claramente las áreas periféricas deseadas (Figura 6A). El mapa de densidad final de la cápside T=13 fue calculado con una resolución de 12Å³. La arquitectura molecular de la cápside es esencialmente similar a aquella revelada por Böttcher *et al.* (Böttcher et al., 1997. Three-dimensional

structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. J Virol 71, 325-330) en la cual la principal característica es la presencia de 260 trímeros de VP2 proyectados desde una envoltura continua y dispuestos en cinco tipos de formaciones diferentes (Figura 6B a-e). En el lado interno existen 200 proyecciones triméricas de forma de Y, interior. La mejora en la resolución permitió la identificación de un número de detalles estructurales de una manera más precisa y aguda, particularmente en los cinco ejes de la cápside interior. De esta manera los 60 trímeros interiores ausentes, cinco por pentámero, se reemplazan por dos bordes anulares. Mientras que el borde más exterior se forma por diez densidades globulares estrechamente conectadas, el borde interior se forma por cinco glóbulos, como se ha pronosticado (Figura 9). Otro aspecto relevante se relaciona con la apariencia porosa de la envoltura capsular. Estos poros (616 en total) tienen un diámetro de aproximadamente 15Å', y se localizan exactamente bajo conexiones de densidad, llamados brazos conectores, entre trímeros adyacentes en el lado exterior.

Estructura de la Cápside His-VP2-466

El análisis por microscopía electrónica de las fracciones ricas en partículas similares a virus, muestra que las cápsides VP2-466 se forman por un mezcla compleja de diferentes cápsides pero que tienen un ensamblaje similar (Figura 7A). Estas cápsides tienen un tamaño aproximado que oscila de 65 nm (similar a las cápsides del IBDV T=13) a 53 nm, también con una variación de ensamblajes isométricos más pequeños. Todas estas estructuras mostraron las mismas áreas periféricas deseadas. La cápside de HT-VP2-466 3DR fue determinada con una resolución de 15Å' (Figura 7B, izquierda y centro). Los lados exteriores de las cápsides del IBDV y HT-VP2-466 están casi superpuestos, mientras que los lados internos muestran diferencias aparentes. La diferencia estructural más grande se relaciona con los ejes de simetría de cinco y seis veces, donde se observa que una densidad extra conecta la estructura del trímero de forma Y en la cápside de HT-VP2-466, y no en la cápside del IBDV.

El mapa de densidad de cápsides de HT-VP2-466 de tamaño intermedio, mostró simetría T=7 (Figura 7B, derecha), la cual se basó en la equivalencia con los capsómeros triméricos similares a aquellos de T=13, excepto para el requerimiento de solo tres diferentes tipos de capsómeros triangulares (llamados a', b' y c'). Las cápsides T=13 y T=7 comparten el mismo bloque trimérico esencial de HT-VP2-466 en la red icosaédrica.

Comparación Estructural y Bioquímica de Las cápsides IBDV y HT-VP2-466

Se encontraron similitudes estructurales tanto en los perfiles de densidad radiales (Figura 8A) y en las secciones cruzadas centrales (Figuras 8C y 8D) de las cápsides del IBDV y HT-VP2-466, que virtualmente se solapan. Se encontraron dos diferencias menores en la cubierta de la proteína (radios aproximados 253Å - 350Å) (Figura 8A, flechas). Un pico extra de densidad fue observado en el lado interno de la cápside del IBDV, principalmente localizado en un radio de 325Å - 345Å, y otro en la cápside de HT-VP2-466 en su lado interno (en un radio de 268Å - 285 Å). Los mapas de diferencias fueron calculados por medio de sustracción aritmética de los valores de densidad de la capa de proteína en ambas estructuras con el fin de localizar más precisamente dichas diferencias. Alternando el orden de sustracción en los dos mapas, los mapas resultantes mostraron sólo aquellas diferencias estructurales que podrían ser atribuidas a cada estructura (Figuras 8E y 8F). La ubicación de las diferencias estructurales en el lado exterior de la cápside del IBDV muestra que las regiones con mayores diferencias están en los brazos conectores entre trímeros adyacentes de VP2. Las diferencias estructurales en el lado interno están principalmente en los ejes de simetría de cinco y seis veces, precisamente donde se localizan las densidades interiores de la cápside de HT-VP2-466.

Los geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie mostraron que las fracciones enriquecidas en partículas virales contienen pVP2/VP2 y VP3 como los componentes principales (Figura 8B), que comprenden casi el 90% de la proteína total. Un análisis equivalente de las fracciones utilizadas para obtener los datos del criomicroscopio de electrones para las cápsides de HT-VP2-466 mostraron que dichas cápsides consisten de un único polipéptido de aproximadamente 54 kDa. Dado que las diferencias mínimas en el nivel de la capa de proteína no pueden ser tenidas en cuenta para verificar la diferencias con VP3, los resultados obtenidos significan que ambas cápsides se construyen a partir de una única proteína, VP2, o su variante His-tag, para las cápsides del IBDV y HT-VP2-466, respectivamente, y que VP3 no se incorpora como un componente integral de la cápside del IBDV.

Análisis de cuasi-equivalencia en una Cápside T=13

Debe considerarse un nuevo escenario para la cápside del IBDV, ya que esta cápside debe ser considerada una cápside cuasi-equivalente. Con el fin de confirmar esta hipótesis y valorar apropiadamente las características equivalentes de las cápsides del IBDV y HT-VP2-466, se compararon mapas de alineación de secciones icosaédricas de dichas cápsides (Figura 9). Las secciones más externas (de 328 a 311 Å) mostraron que las unidades triméricas fueron básicamente idénticas (Figuras 9A, 9B y 9C). Además, la cápside continua es evidente a (302 a 294Å), y se observan diferencias mínimas (Figuras 9D y 9E). En un radio de 286Å, las secciones correspondientes al inicio de la capa interior de ambas cápsides T=13 mostraron que las 260 unidades triméricas interiores mostraron una clara continuidad con otras 260 unidades triméricas interiores, incluyendo aquellas alrededor de eje de cinco veces de simetría (Figura 9F). Los trímeros pentaméricos se ensamblan más cerca que los

trímeros hexaméricos y aparecen fusionados en un radio de 277Å, donde existen densidades extra visibles en ejes de seis veces de simetría de la cápside de HT-VP2-466 (Figura 9G). Las densidades extra en los ejes de simetría de orden 6 (Figura 9H) son evidentes en un radio de 269Å.

III. DISCUSIÓN

5 En la presente invención se ha analizado el polimorfismo de conformación de la proteína más abundante en IBDV, la proteína VP2. VP2 inicialmente se sintetiza como un precursor de 512 aminoácidos, pVP2, que se procesa varias veces en su extremo C-terminal para dar lugar a la proteína VP2 madura (441 aminoácidos). La mayoría de los mutantes expresados en el sistema de baculovirus desarrollado en esta invención, podría corresponder por lo tanto a los intermedios que se presentan naturalmente durante el proceso de ensamblaje del virus. El mecanismo molecular responsable de controlar los polimorfismos está en una secuencia de 71 aminoácidos temporalmente unida al extremo C-terminal y que se retira cuando su función se ha completado. En la ausencia de VP3, la presencia de un His-tag en el extremo N-terminal de la proteína VP2 se requiere para su correcto ensamblaje, indicando que este His-tag reproduce la función de la proteína VP3 durante el ensamblaje. El control del ensamblaje de la cápside del complejo IBDV T=13 requiere por lo tanto la interacción independiente de dos elementos polipéptidos que pueden ser desconectados en el sistema de la presente invención.

Los resultados de la presente invención indican que el controlador molecular del cambio de la proteína VP2 se localiza en el segmento 443-GFKDIIRAIR-453 (SEQ ID NO: 2), que está dispuesto en forma de α -hélice. El mutante de HT-VP2-456 de la invención representa el borde entre la formación de una conformación única o conformaciones múltiples en VP2. Si las unidades de ensamblaje son más pequeñas, como en el caso de HT-VP2-441, sólo se producen estructuras pentaméricas (cápsides T=1), mientras que si se incluyen los aminoácidos 443-452, se forman ambas cápsides T=13 y cápsides T=1.

EJEMPLO 2

Caracterización de Inmunogenicidad del IBDV CVLP-pVP2s*

Con el fin de evaluar la Inmunogenicidad de las CVLPs-pVP2-456 obtenidas en el Ejemplo 1, se realizó una prueba de inmunización en pollos de 1 día de edad. En resumen, un grupo de animales 7 SPF (específico libre de patógeno) fue inmunizado por vía intramuscular con una dosis única de 200 μ l que contienen 10 μ g de CVLPs-pVP2-456/animal diluidos en PBS. Un grupo similar fue inyectado con PBS. El suero fue extraído semanalmente de cada uno de los animales en ambos grupos. Los sueros de cada grupo y los datos fueron mezclados con el fin de obtener un suero homogéneo (mezcla) representado por volúmenes iguales de cada individuo en el grupo. Los sueros fueron analizados por medio de ELISA. Para tal fin, los pozos fueron recubiertos con 10 ng de CVLPs-pVP2-456. Las pruebas fueron realizadas de acuerdo con un protocolo revelado previamente (Current Protocols in Immunology. Edited by: Bierer, Coligan, Margulies, Shevach, Strober, John Wiley & Sons http://www.interscience.wiley.com/c_p/index.htm). Los resultados obtenidos muestran que una única inmunización en la ausencia de un adyuvante causa una potente respuesta a la proteína pVP2-456. Se obtuvieron resultados similares cuando se probaron otras CVLP-pVP2s* obtenidas en el Ejemplo 1, fueron probados. Resultados similares también cuando se probaron otras VLPs tanto químicas (CVLPs) como no-químicas, que contienen IBDV VP2 reveladas en los solicitudes de patente españolas P200300751, P200400120 y P200400121.

EJEMPLO 3

Obtención de CVLP-pVP2s* (pVP2*-BT) en Levaduras

El plásmido de expresión pESCURA/pVP2-456-BT fue generado con el gen heterólogo que codifica para el péptido químico de FMVD llamado BT (Zhang, Q. et al., 2002, Acta Virologica 46(1): 1-9) unido al extremo N-terminal de pVP2-456 con el propósito de estudiar la posibilidad de la obtención del IBDV CVLP-pVP2s* en cultivos de levadura (*S. cerevisiae*). Dicho péptido químico BT comprende el epítipo de la célula B (localizado entre las posiciones 133-159 de la proteína VP1 del aislado del Serotipo C Español FMDV) y el epítipo de la célula T (localizado entre las posiciones 20-34 de la proteína VP4 del serotipo Asia FMDV). La secuencia de aminoácidos del epítipo de la célula B es, en código de una letra, SIINYYMQQYQNSM (SEQ ID NO: 14), mientras que la secuencia de aminoácidos del epítipo de la célula T es, en código de una letra, MTTTYTASARGDLAHLTTTHARHLP (SEQ ID NO: 15).

La primera etapa en la construcción de plásmidos de expresión se llevó a cabo por medio de la clonación de la región codificante de la proteína pVP2-456 en el vector pESCURAinv. El plásmido pESCURAinv fue generado por medio de la digestión del vector pRS426 (Stratagene) con la enzima PvuII y la religación de la mezcla de digestión. El vector resultante, ESCURAinv, contiene la región de clonación múltiple en una posición invertida en relación con el vector parental pRS426. El fragmento de ADN correspondiente a la proteína pVP2-456 fue obtenido por medio de PCR con los oligonucleótidos correspondientes (Tabla 1) utilizando el plásmido pVOTE.2/Poli como un molde (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 viruslike particles. Journal of General Virology 79, 1047-1054). El fragmento fue purificado, se sometió a digestión con las enzimas BglII y HindIII y se clonó en el vector pESCURA.inv previamente digerido con las enzimas BamHI y HindIII. El plásmido resultante fue denominado pESCURA/pVP2-456.

- 5 Un fragmento de ADN que contiene el marco de lectura abierto correspondiente a dicho péptido quimérico BT de FMDV fue clonado en el plásmido pESCURA/pVP2-456 previamente digerido con las enzimas de restricción apropiadas. El plásmido resultante fue denominado pESCURA/pVP2-456-BT y contiene los ORFs de la proteína de pVP2 del IBDV-456 y del péptido quimérico BT de FMDV.

- 10 Dicho plásmido pESCURA/pVP2-456-BT fue utilizado posteriormente para transformar un cultivo de la cepa haploide 499 de la levadura *S. cerevisiae* de acuerdo con un protocolo previamente revelado (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 por medio del cultivo en placas con medio SC (CSM + YNB, 2% de glucosa y bacto agar) suplementado con los aminoácidos triptófano, leucina e histidina y carente de uracilo (-Ura). Después de 48 horas de incubación a 30°C, se seleccionó una colonia, que se utilizó para realizar el
15 posterior análisis de expresión de la proteína y la formación de CVLPs-pVP2-456-BT.

- El análisis de la expresión de la proteína pVP2-456 y BT y formación de CVLP fue realizado siguiendo un protocolo previamente revelado para la caracterización de VLPs del 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 se cultivó en medio líquido CSM (-Ura) + YNB suplementado con 2% de rafinosa. El cultivo fue incubado a 30°C durante 24 horas. Este cultivo fue utilizado para inocular, a una densidad óptica (OD) de 0.2, un
25 matraz de 200 ml de medio CSM (-Ura) + YNB suplementado con 2% de inductor de galactosa. El cultivo fue mantenido a 30°C durante 18 horas (hasta una OD entre 1.0 y 2.0). Las levaduras se centrifugaron a 3,000 rpm, 5 minutos a 4°C, se lavaron con agua destilada una vez, y el pellet fue resuspendido en solución reguladora de lisis (TEN: Tris 10 mM, pH 8.0; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM) + inhibidores de la proteasa 2X (Compl Roche). Un volumen de perlas de vidrio con un tamaño aproximado de 425-600 micrones (Sigma) fue adicionado para la lisis. Esta
30 mezcla fue sometida a un vórtex vigoroso durante 30 segundos 4 veces, con intervalos de 30 segundos, y todos a 4°C. Luego la fracción soluble se recuperó 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 el protocolo previamente revelado (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 después del fraccionamiento y una muestra del material inicial fueron analizadas por medio de electroforesis en gel de poliácridamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) [Current Protocols in Molecular Biology] e inmunodetección por Western blot utilizando sueros antiVP2-456 y anti-BT [Current Protocols in Molecular Biology]. El Western blot mostró la presencia de bandas, con la masa molecular
40 predicha correspondientes a las proteínas pVP2 (48 kDa) y BT (Figura 11). Estos resultados muestran la correcta expresión de ambos péptidos en el cultivo *S. cerevisiae* transformado con el plásmido pESCURA/pVP2-456-BT. Luego las diferentes fracciones del gradiente fueron analizadas por medio de TEM como se describe 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
45 complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. Journal of Virology 73: 6973-6983). El análisis TEM de las fracciones de gradiente mostró la existencia de CVLPs-VP2-456-BT (no se muestran los datos).

EJEMPLO 4

Capacidad de CVLPs de inducir inmunorrespuestas anti-FMDV

- 50 Con el fin de evaluar la capacidad de CVLPs [es decir CVLPs-pVP2* (pVP2*-BT) (Ejemplo 3)] para inducir inmunorrespuestas anti-FMDV en ratones, 4 grupos de ratones Balbc de 14 días de edad fueron inmunizados por vía intramuscular (10 animales por grupo). Los grupos de tratamiento fueron los siguientes:

- Grupo 1, Placebo (PBS);
- Grupo 2, 50 µg de CVLPs;
- 55 ■ Grupo 3, 100 µg de CVLPs; y

■ Grupo 4, 50 µg de CVLPs más adyuvante.

Se utilizó tocoferol como adyuvante y todas las dosis del inmunógeno (CVLPs) fueron resuspendidas en un volumen final de PBS de 0.2 ml. Tres semanas después de la vacunación, se recolectaron muestras de suero de cada animal y se detectó la presencia de los anticuerpos específicos del virus de la enfermedad de la fiebre aftosa (FMDV) mediante un ELISA de captura contra cepa de FMDV sin purificar de virus C-S8cl virus capturado utilizando un suero de FMDV anti-serotipo C de conejo (anti-C1-Noville) como se describe previamente [E. de Oliveira et al. Vaccine 23 (2005) 2647-2657].

En resumen, las placas de 96 pozos fueron recubiertas con suero anti-C1-Noville en solución reguladora de carbonato, por evaporación durante la noche a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 (0.005%) (solución reguladora de lavado) y el antígeno correspondiente de un sobrenadante de células de riñón de hámster bebé (BHK) infectadas con la cepa de FMDV C-S8cl se adicionó a los pozos. Después de la incubación (1 h a 37°C), los pozos se lavaron tres veces con solución reguladora de lavado y se bloquearon durante 1 h con 0.5% de BSA en PBS (solución reguladora de bloqueo).

Después de bloquear, las placas se incubaron con diluciones de sueros de los cuatro grupos de ratones (i.e., sueros de placebo y ratones inmunizados con CVLPs) en solución reguladora de bloqueo más 0.1% de Tween 20 durante 2 h. Después del lavado (tres veces con solución reguladora de lavado) los pozos se incubaron por 1 h con sueros anti-ratón de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante en solución reguladora de bloqueo más 0.1% de Tween 20 por 2 h. Después del prolongado lavado, el sustrato tetrametilbenzidina (TMB) se adicionó a los pozos, la reacción se dejó desarrollar por 10 minutos y luego se detuvo con H₂SO₄ 2M. La reacción antígeno-anticuerpo se determinó en un espectrofotómetro a 292 nm.

Como se muestra en la Figura 12, algunos animales de los grupos 3 y 4 mostraron títulos de anticuerpos específicos contra FMDV. Estos resultados señalan claramente que la inmunización con CVLPs [CVLPs-pVP2* (pVP2*-BT) (Ejemplo 3)] induce a respuestas inmunes específicas contra FMDV y que esta respuesta inmune se incrementa con la adición de un adyuvante.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BIONOSTRA S.L. y CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

<120> "Partículas quiméricas vacías similares a los virus derivadas del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), proceso para su producción y aplicaciones

<160> 15

<150> P200501733

<151> 2005-07-15

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 1

Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile Arg Ala Ile Arg Arg Ile
5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> péptido

<400> 2

Gly Phe Lys Asp Ile Ile Arg Ala Ile Arg
5 10

<210> 3

<211> 35

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> Cebador oligonucleótido 5'-VP2 utilizado para generar eliminaciones mutantes del extremo C-terminal

<400> 3

15 gcgcagatct atgacaaacc tgtcagatca aaccc 35

<210> 4

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220> ADN sintético

<223> Cebador oligonucleótido NotI-441 utilizado para generar eliminaciones mutantes del extremo C-terminal

<400> 4

gcgcgcggcc gcttatgctc ctgcaatctt cagg 34

<210> 5

25 <211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> Cebador oligonucleótido HindIII-456 utilizado para generar eliminaciones mutantes del extremo C-terminal

30 <400> 5

	gcgcaagctt acacagctat cctccttatg gc	32
	<210> 6	
	<211> 31	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> Cebador oligonucleótido HindIII-466 utilizado para generar eliminaciones mutantes del extremo C-terminal	
	<400> 6	
	gcgcaagctt aggcaggtgg gaacaatgtg g	31
10	<210> 7	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
15	<223> Cebador oligonucleótido HindIII-476 utilizado para generar eliminaciones mutantes del extremo C-terminal	
	<400> 7	
	gcgcaagctt aaccttcccc aattgcatgg ggc	33
	<210> 8	
	<211> 33	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
	<223> Cebador oligonucleótido HindIII-487 utilizado para generar eliminaciones mutantes del extremo C-terminal	
	<400> 8	
25	gcgcaagctt aggcctgggc ctcatcgccc agc	33
	<210> 9	
	<211> 32	
	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
30	<223> Cebador oligonucleótido HindIII-494 utilizado para generar eliminaciones mutantes del extremo C-terminal	
	<400> 9	

ES 2 371 833 T3

gcgcaagctt aggctcgagc agttcctgaa gc 32

<210> 10

<211> 32

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

<223> Cebador oligonucleótido HindIII-501 utilizado para generar eliminaciones mutantes del extremo C-terminal

<400> 10

gcgcaagctt aagctcttgc tttcctgac gc 32

10 <210> 11

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220> ADN sintético

15 <223> Cebador oligonucleótido HindIII-512 utilizado para generar eliminaciones mutantes del extremo C-terminal

<400> 11

gcgcaagctt aggcgagagt cagctgcctt atgc 34

<210> 12

<211> 28

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia extra tag

<400> 12

Met	Ser	Tyr	Tyr	His	His	His	His	His	His	Asp	Tyr	Asp	Ile	Pro	Thr
				5					10					15	
Thr	Glu	Asn	Lys	Tyr	Phe	Gln	Gly	Ala	Met	Gly	Ser				
			20				25								

25

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

ES 2 371 833 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

<400> 13

Glu Phe Arg Asp Ile Ile Asp Ala Thr Arg
5 10

5

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> epítoto de la célula B del péptido BT quimérico

<400> 14

Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln Asn Ser Met
5 10 15

<210> 15

15

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> epítoto de la célula T del péptido BT quimérico

20

<400> 15

Met Thr Thr Thr Tyr Thr Ala Ser Ala Arg Gly Asp Leu Ala His Leu
5 10 15
Thr Thr Thr His Ala Arg His Leu Pro
20 25

<210> 16

<211> 512

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> proteína IBDV pVP2 de la cepa Soroa (NCBI AAD30136)

<400> 1

```

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
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
Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Gly Asn Gly Asn Tyr
65           70           75           80
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
Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr
          115          120          125
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
Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly
          165          170          175
Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys
          180          185          190
Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile
          195          200          205
Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly
          210          215          220
Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu
225          230          235          240

```

Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val	245	250	255
Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile	260	265	270
Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Asn Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn	275	280	285
Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro	290	295	300
Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln	305	310	315
Ala Gly Asp Gln Met Ser Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr	325	330	335
Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val	340	345	350
Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val	355	360	365
Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val	370	375	380
Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu	385	390	395
Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr	405	410	415
Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu	420	425	430
Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile	435	440	445
Arg Ala Ile Arg Arg Ile Ala Val Pro Val Val Ser Thr Leu Phe Pro	450	455	460
Pro Ala Ala Pro Leu Ala His Ala Ile Gly Glu Gly Val Asp Tyr Leu	465	470	475
Leu Gly Asp Glu Ala Gln Ala Ala Ser Gly Thr Ala Arg Ala Ala Ser	485	490	495
Gly Lys Ala Arg Ala Ala Ser Gly Arg Ile Arg Gln Leu Thr Leu Ala	500	505	510

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión capaz de formar una partícula vacía similar a virus y que consiste en una región A que consiste en un fragmento de la proteína pVP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), que consiste en residuos de aminoácidos 1 a n, en donde "n" es un número entero entre 441 y 501, y una o dos regiones B que consisten en polipéptidos heterólogos, en donde dichos polipéptidos heterólogos no son polipéptidos IBDV nativos y dichos polipéptidos heterólogos contienen uno o más polipéptidos de interés útiles en vacunación, terapia y/o diagnóstico, y en donde dichas regiones B se unen a una región terminal de dicha región A.
2. Proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha región A consiste en dicho fragmento de la proteína pVP2 del IBDV seleccionado de:
 - (i) pVP2-441, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 al residuo 441 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ ID No. 16;
 - (ii) pVP2-452, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 al residuo 452 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ ID No. 16;
 - (iii) pVP2-456, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 y al residuo 456 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ ID No. 16;
 - (iv) pVP2-466, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 al residuo 466 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ ID No. 16;
 - (v) pVP2-476, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 al residuo 476 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ ID No. 16;
 - (vi) pVP2-487, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 al residuo 487 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ ID No. 16;
 - (vii) pVP2-494, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 al residuo 494 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ ID No. 16; y
 - (viii) pVP2-501, que consiste en la secuencia de aminoácidos del residuo 1 al residuo 501 de la proteína pVP2 del IBDV de SEQ ID No. 16.
3. Proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde una región B se une a la región terminal amino de dicha región A
4. Proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde una región B se une a la región carboxilo terminal de dicha región A.
5. Proteína de fusión de la reivindicación 1, que comprende una región A y dos regiones B idénticas o diferentes, estando unida una de dichas regiones B al amino terminal de la región A, y estando unida la otra región B al arboxilo terminal de la región A.
6. Proteína de fusión de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha proteína de fusión comprende además un polipéptido espaciador localizado entre dichas regiones A y B.
7. Partícula quimérica vacía similar a virus que comprende al menos una proteína de fusión de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Método para la producción de las partículas quiméricas vacías similares a virus de la reivindicación 7, que comprende el cultivo de una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica dicha proteína de fusión y la recuperación de dichas partículas quiméricas vacías similares a virus.
9. Método de la reivindicación 7 a 8, en donde dicha célula huésped es una célula de insecto.
10. Método de la reivindicación 7 a 8, en donde dicha célula huésped es una célula de levadura.
11. Composición farmacéutica que comprende las partículas quiméricas vacías similares a virus de la reivindicación 6 y un adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. Composición farmacéutica de la reivindicación 11, en donde dicha composición farmacéutica es una vacuna.

13. Vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la partícula quimérica vacía similar al virus de la reivindicación 7.

5

10

15

20

25

30

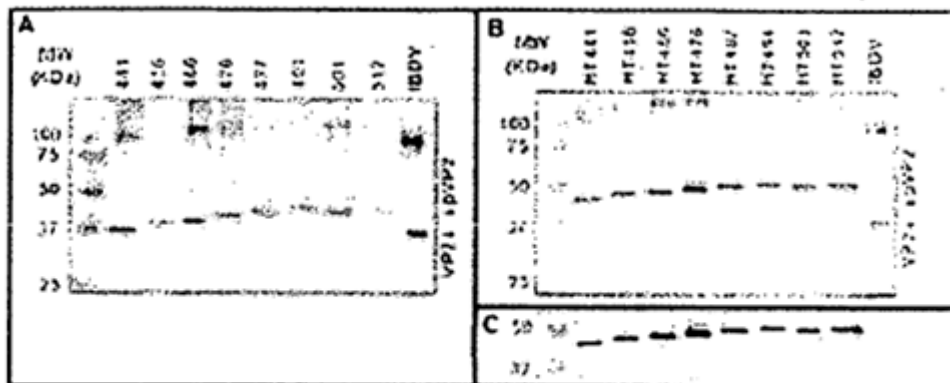


FIGURA 1

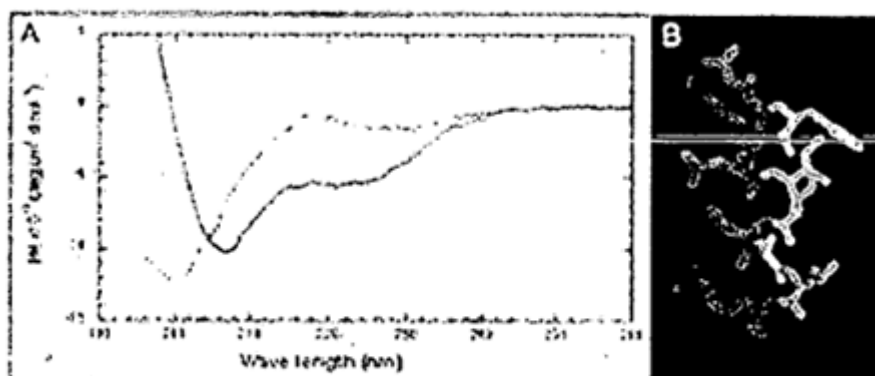
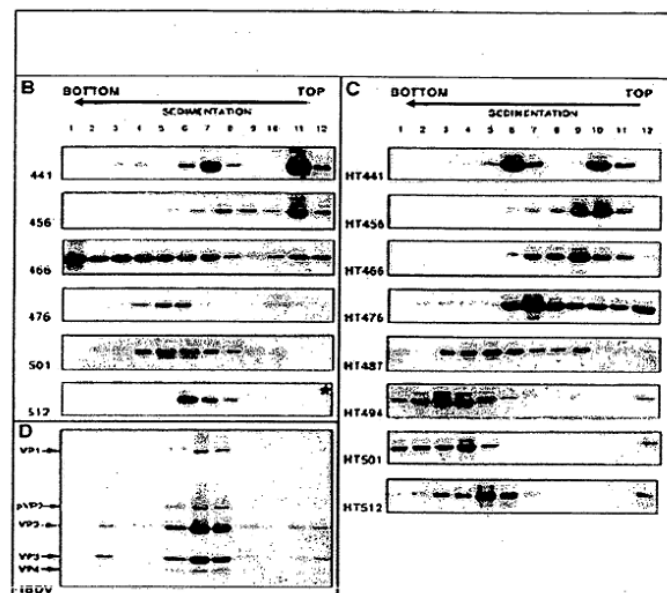
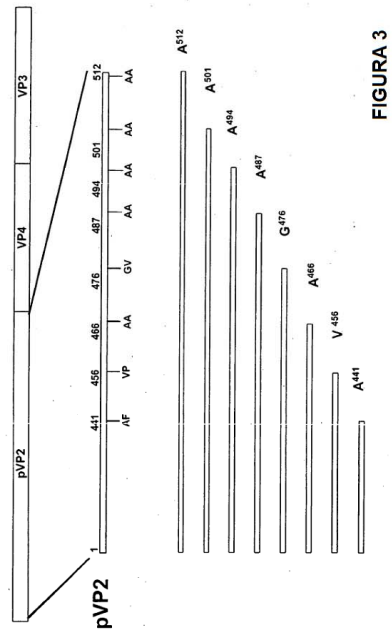


FIGURA 2

5

10



5

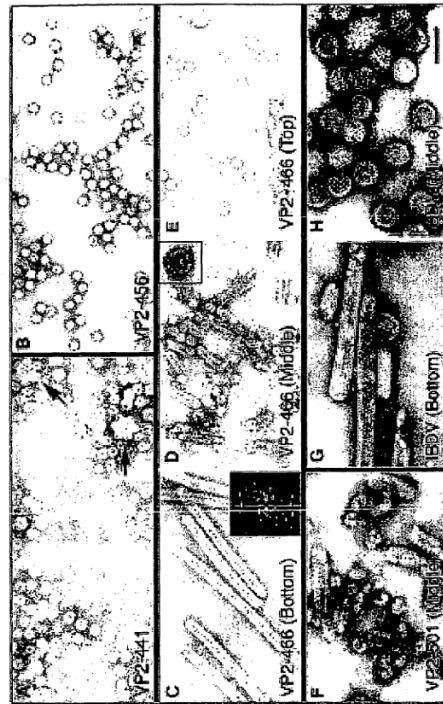


FIGURA 4

10

15

5

10

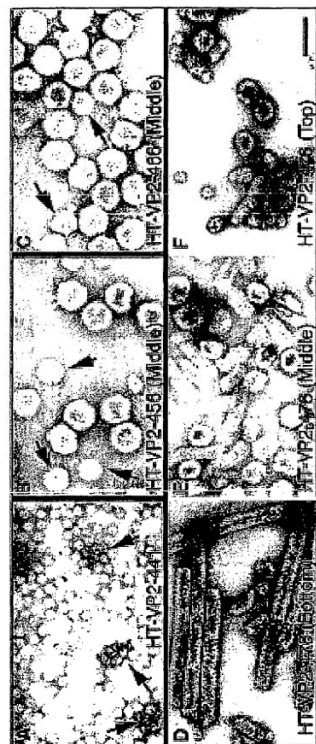


FIGURA 5

15

5

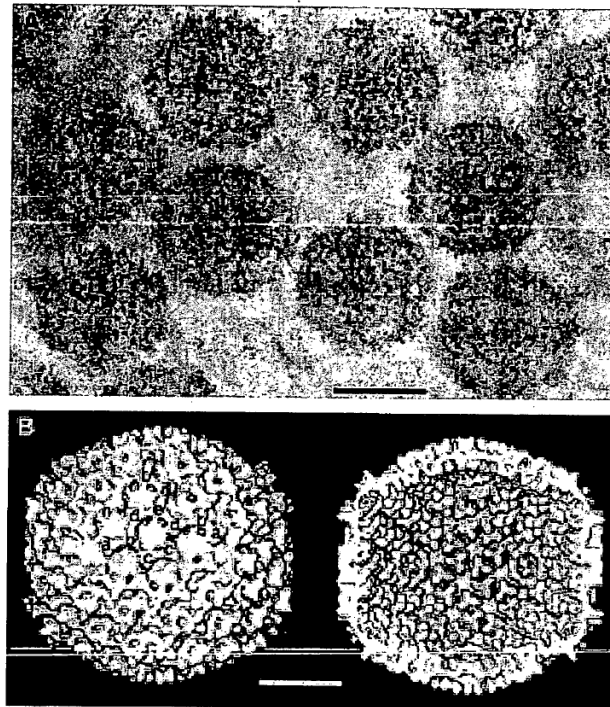


FIGURA 6

10

15

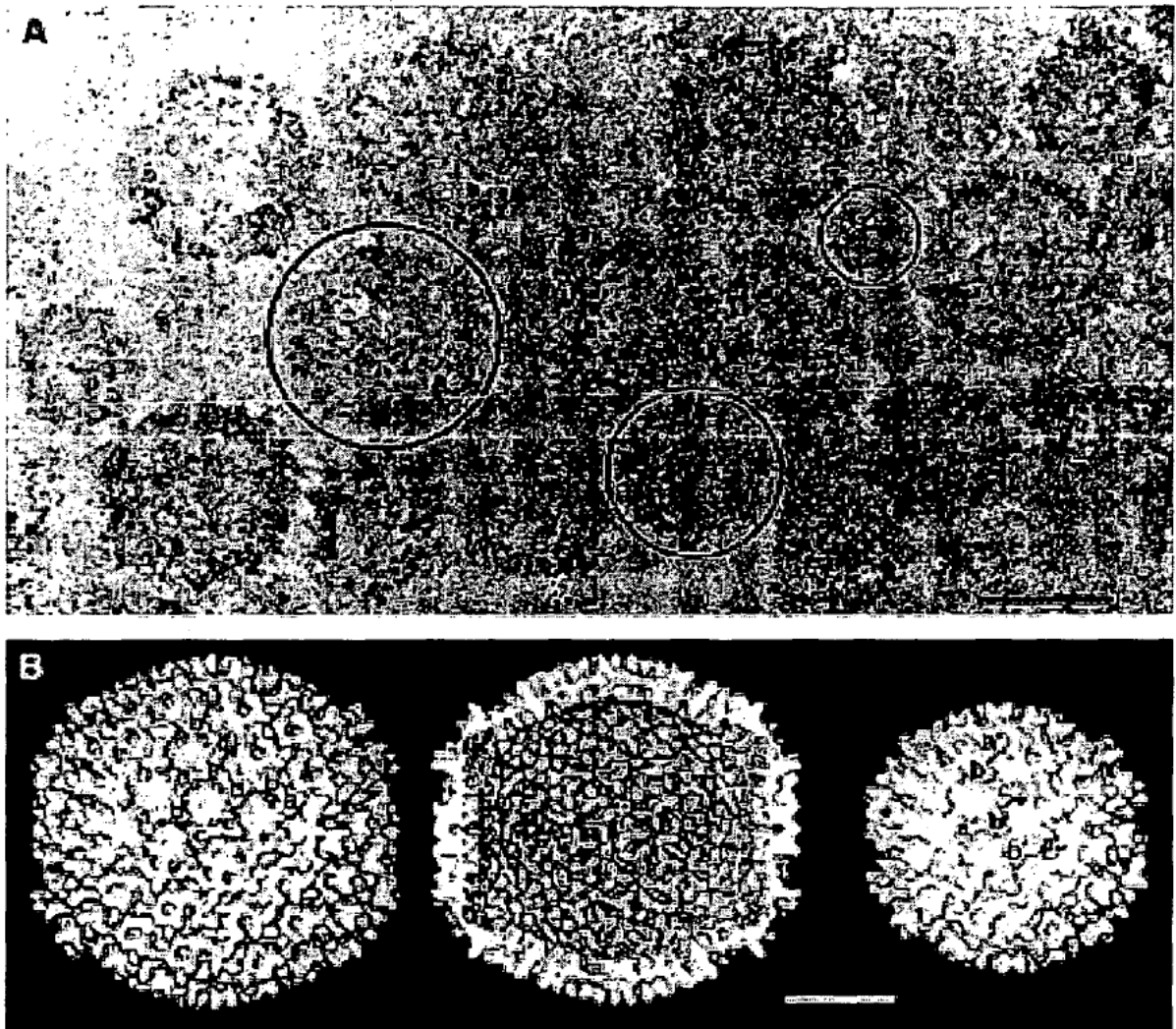


FIGURA 7

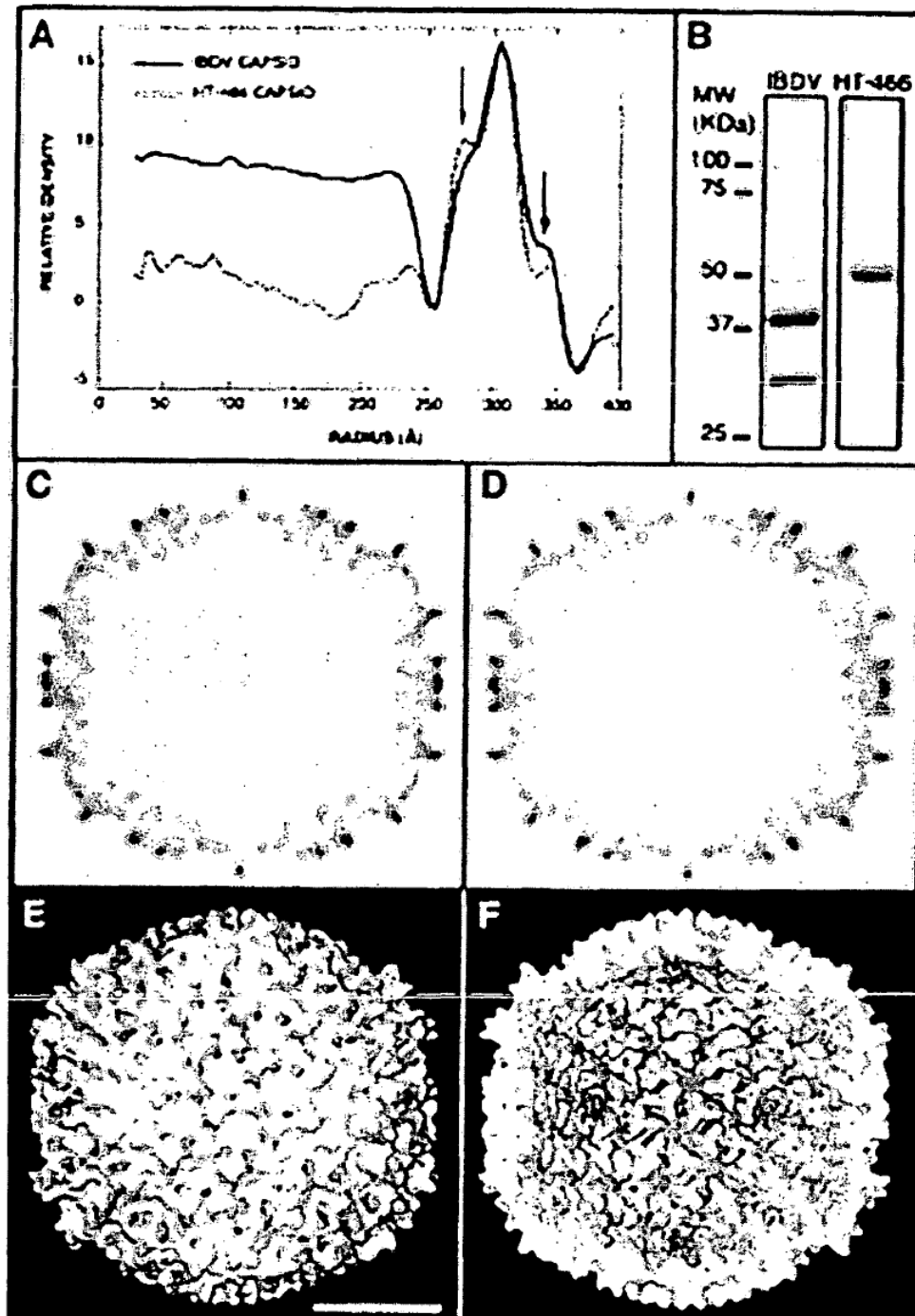


FIGURA 8

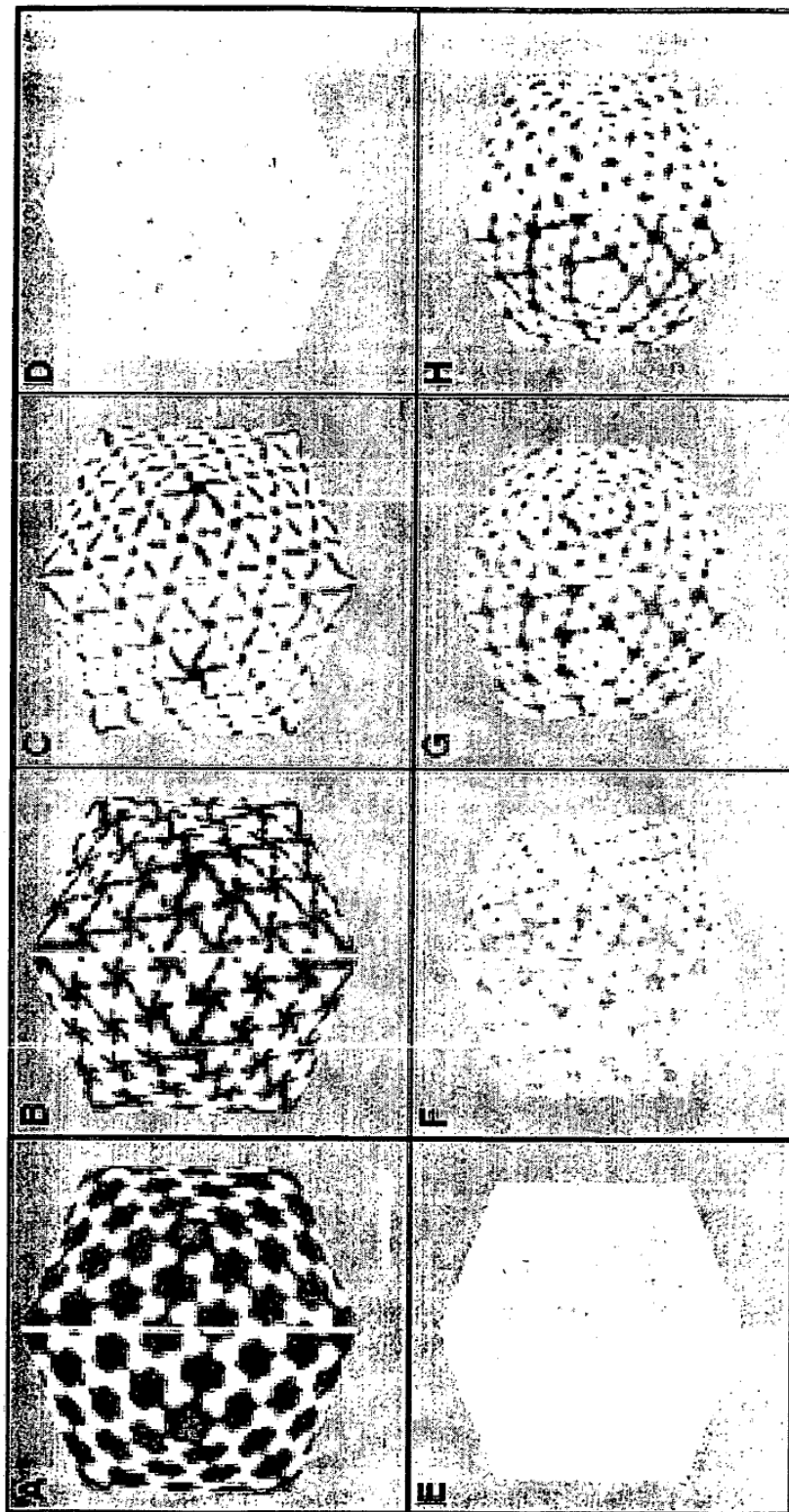
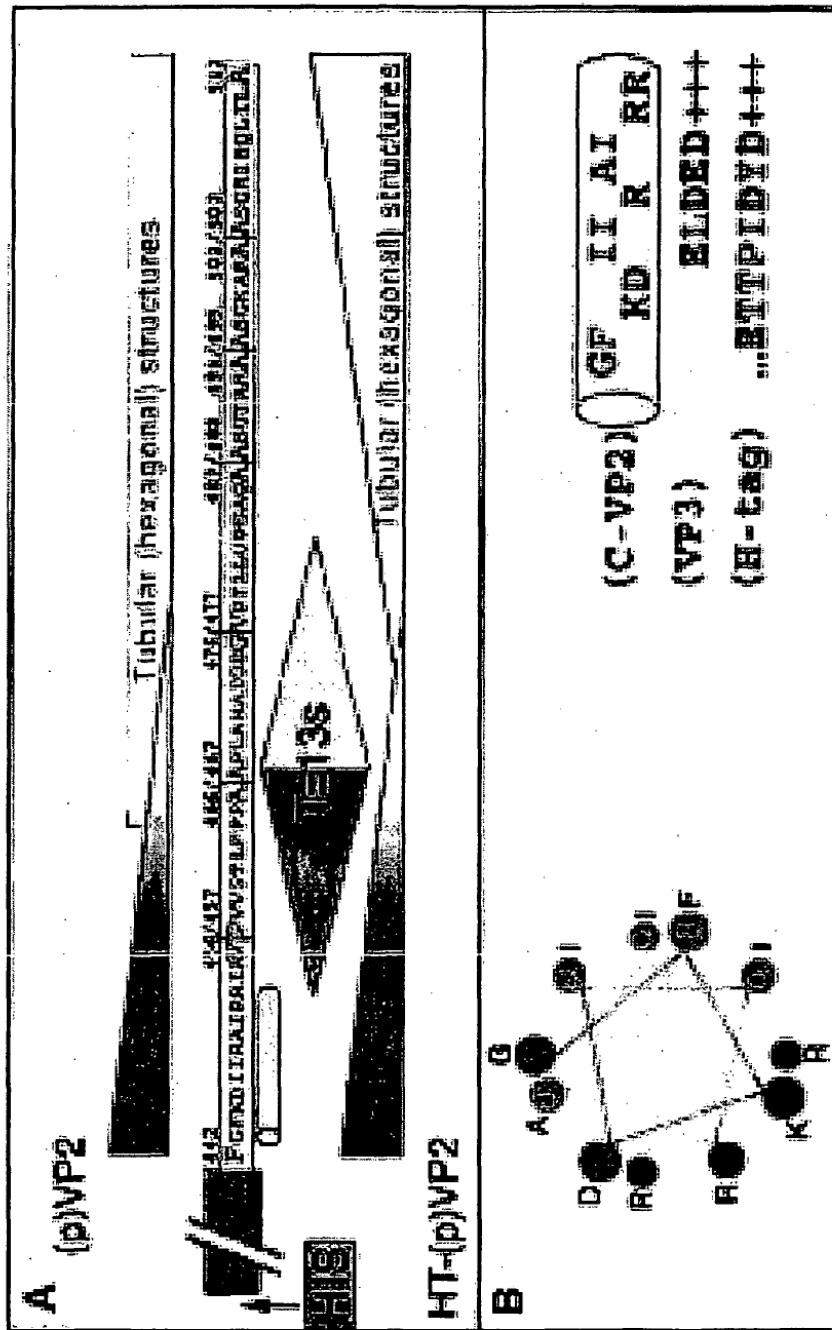
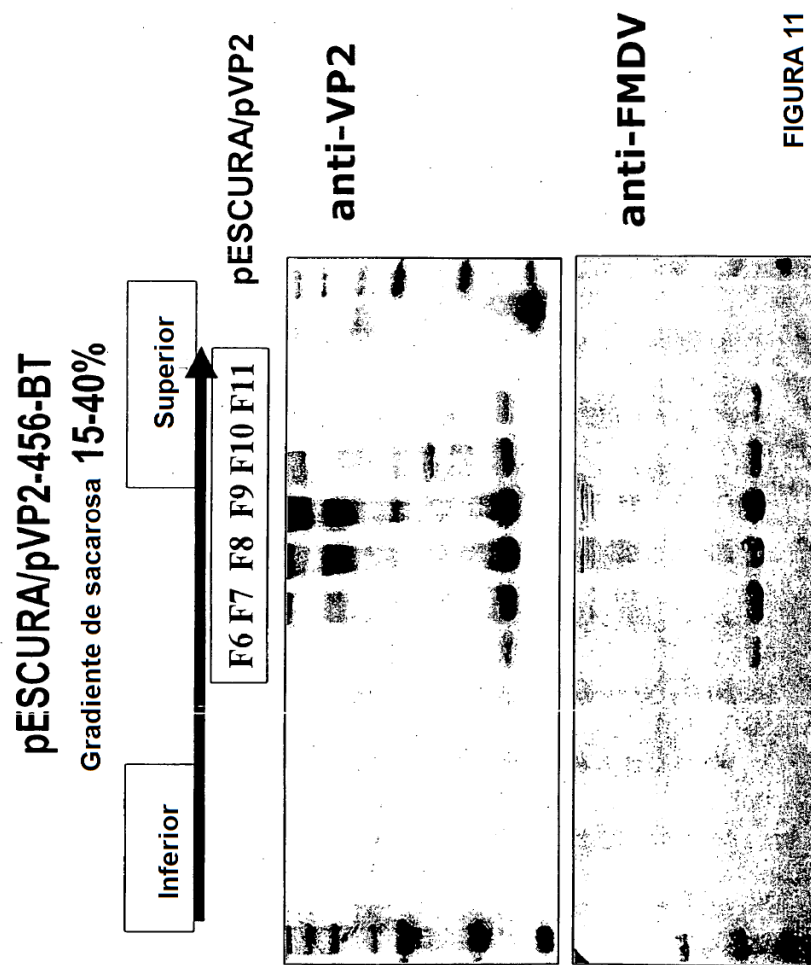
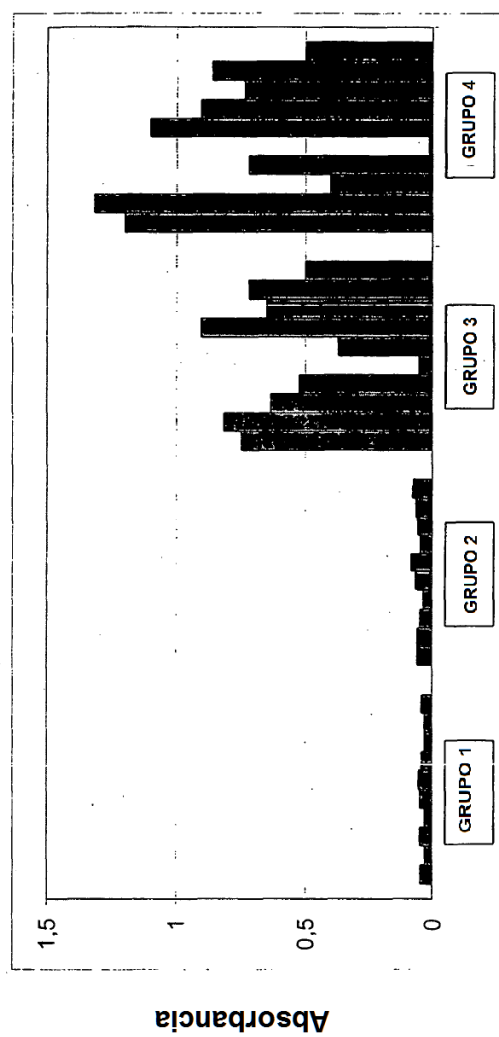


FIGURA 9

**FIGURA 10**



**FIGURA 12**

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION

Esta lista de referencias citada por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.

5 Documentos de patentes citadas en la descripción

- US 20030175301 A [0002]
- US 6602705 B [0002]
- US 6458362 B [0002]
- US 6528063 B [0009]

- 10 • US 5788970 A [0009]
- JP 5194597 B [0009]
- WO 02088339 A [0011]
- ES P200300751 [0114]
- ES P200400120 [0114]
- 15 • ES P200400121 [0114]

Literatura no-patente citada en la descripción

- **Fernández-Arias A et al.** Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology*, 1998, vol. 79, 1047-1054 [0007] [0010]
- **Martínez-Torrecuadrada JL et al.** Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology*, 2000, vol. 278, 322-331 [0010]
- 20 • **Maraver A et al.** The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role for capsid formation. *Journal of Virology*, 2003, vol. 77, 6438-49 [0010]
- **Lombardo E et al.** 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*, 1999, vol. 73, 6973-6983 [0010]
- 25 • **Zhang, Q. et al.** *Acta Virologica*, 2002, vol. 46 (1), 1-9 [0017] [0036] [0115]
- **van den Berg TP et al.** *Rev Sci Tech.*, 2000, vol. 19, 509-43 [0027]
- **SánchezAB ; Rodríguez JF.** Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*, 15 September 1999, vol. 262 (1), 190-199 [0028]
- 30 • **Altschul et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389 [0028]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0059] [0068] [0069]
- **Leusch MS et al.** A novel host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. *Gene*, 1995, vol. 160, 91-4 [0068]
- 35 • **Luckow VA et al.** 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*, 1993, vol. 67, 4566-79 [0068]

- **Lombardo et al.** 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. *J Virol*, 1999, vol. 73, 6973-6983 [0082]
- 5 • **Castón et al.** C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J Virol*, 2001, vol. 75, 10815-10828 [0083] [0091]
- **Oña et al.** The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology*, 2004, vol. 322, 135-142 [0084]
- **Sanger et al.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977, vol. 74, 5463-5467 [0085]
- 10 • **Maraver et al.** Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *J Virol*, 2003, vol. 77, 2459-2468 [0087]
- **Lombardo et al.** 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. *J Virol*, 1999, vol. 73, 6973-6983 [0089]
- 15 • **Jiménez et al.** Helicity of alpha (404-451) and beta (394-445) tubulin C-terminal recombinant peptides. *Protein Sci*, 1999, vol. 8, 788-799 [0092]
- **Trus et al.** Digital image processing of electron micrographs: the PIC system-III. *J Struct Biol*, 1996, vol. 116, 61-67 [0093]
- 20 • **Conway et al.** The effects of radiation damage on the structure of frozen hydrated capsids HSV-1. *J Struct Biol*, 1993, vol. 111, 222-233 [0093]
- **Baker ; Cheng.** A model-based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryoelectron microscopy. *J Struct Biol*, 1996, vol. 116, 120-130 [0093]
- **Crowther.** Procedures for three-dimensional reconstruction of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs. *Phil Trans R Soc Ser B*, 1971, vol. 261, 221-230 [0094]
- 25 • **Convay et al.** The effects of radiation damage on the structure of frozen hydrated HSV-1 capsids. *J Struct Biol*, 1993, vol. 111, 222-233 [0094]
- **Muñoz ; Serrano.** Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. *Nat Struct Biol*, 1994, vol. 1, 399-409 [0105]
- 30 • **Williams et al.** Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng*, 1999, vol. 12, 243-250 [0105]
- **Böttcher et al.** Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol*, 1997, vol. 71, 325-330 [0106]
- **Current Protocols in Immunology.** John Wiley & Sons [0114]
- 35 • **Fernández-Arias, A. ; Risco, C. ; Martínez, S. ; Albar, J. P. ; Rodríguez, J. F.** Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology*, 1998, vol. 79, 1047-1054 [0116]
- **Gietz, R.D. ; R.A. Woods.** Transformation of yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology*, 2002, vol. 350, 87-96 [0118]
- 40 • **Fernández-Arias, A. ; Risco, C. ; Martinez, S. ; Albar, J. P. ; Rodriguez, J. F.** Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology*, 1998, vol. 79, 1047-1054 [0119]
- **Lombardo, E. ; Maraver, A. ; Castón, J. R. ; Rivera, J. ; Fernández-Arias, A. ; Serrano, A. ; Carrascosa,**

J. L. ; Rodriguez, J. F. 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*, 1999, vol. 73, 6973-698 [0119]

• **Lombardo, E. ; Maraver, A. ; Castón, J. R. ; Rivera, J. ; Fernández-Arias, A. ; Serrano, A. ; Carrascosa,**

5 **J. L. ; Rodriguez, J. F.** 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*, 1999, vol. 73, 6973-6983 [0119]

• **E. de Oliveira et al.** *Vaccine*, 2005, vol. 23, 2647-2657 [0121]