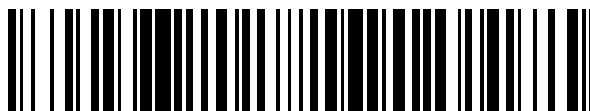


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 511 141**

51 Int. Cl.:

A61K 39/15 (2006.01)

C07K 14/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2011** **E 11716647 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014** **EP 2542259**

54 Título: **Rotavirus aviar de grupo D**

30 Prioridad:

04.03.2010 GB 201003630

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

22.10.2014

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

ROTH, BERNHARD

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 511 141 T3

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

ROTAVIRUS AVIAR DE GRUPO D

Descripción

5 **Campo técnico**

Técnica anterior

10 Los rotavirus pertenecen a la familia de virus *Reoviridae*, y pueden afectar al sistema gastrointestinal y al tracto respiratorio de pájaros, entre otros organismos. La familia de *Reoviridae* consiste en diferentes géneros que incluyen *orthoreovirus* (reovirus de aves y mamíferos), *orbivirus* (virus de lengua azul) y *rotavirus* (grupos A a G).

15 Los rotavirus son virus de ARN no envuelto y con doble armazón. El genoma está compuesto por 11 segmentos de ARN de doble hélice, que codifica seis proteínas estructurales y seis proteínas no estructurales. Hay seis proteínas virales (VPs) que forma el cápside de proteína icosaédrico de tres capas del virión. Estas proteínas estructurales se llaman VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7 [1]. VP6 forma la mayor parte de la cápside. Es muy antigénica y puede usarse para identificar especies de rotavirus [2]. Además de las VPs, hay seis proteínas no estructurales (NSPs) que solamente se producen en células infectadas por rotavirus. Se llaman NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6 [1].

20 Los rotavirus aviarios (RVAs) son bien conocidos [3, 4 y 5] y con frecuencia afectan a las bandadas de aves, y en particular bandadas de pollos, en todo el mundo. Los síntomas en los pollos infectados son diarrea con posterior aumento lento de peso, un síndrome que se conoce como síndrome de malabsorción (SMA) o síndrome de restricción del crecimiento (SRC).

25 En un estudio de campo, se examinaron pollos para consumo de entre 6 y 8 semanas de edad de 8 bandadas con SRC para determinar qué RVAs era los mayores contribuyentes a la patogénesis de SRC [6]. En este estudio, se detectaron RVAs en 32 de 34 pollos de las bandadas con SRC. Se identificaron cuatro grupos de RVAs en bandadas con SRC: RVA A, D, F y G. Los resultados de este estudio mostraron que el grupo de RVA D juega un papel principal en la patogénesis de SRC.

30 El impacto económico de SRC en los criaderos de pollos es severo. Todos los pollos infectados se perderán. Por lo tanto, la detección temprana y prevención de la infección por RVA es muy deseable.

35 En la actualidad, RVAs normalmente se detectan e identifican en base a la migración de los 11 fragmentos genómicos de ARN usando ARN-PAGE. La característica del patrón ARN-PAGE de un RVA grupo D es 5:2:2:2 [7]. Este patrón característico de migración de ARN puede usarse para identificar RVAs grupo D.

40 RVAs también pueden detectarse usando ELISA [8], microscopio electrónico de transmisión y reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) [6]. Solamente PAGE permite la discriminación de diferentes grupos de RVA, pero tiene solamente un grado bajo de sensibilidad. En el presente, los métodos PCR están solamente disponibles para la detección de rotavirus grupo A. En la fecha de prioridad no existían datos de secuencia de nucleótidos para RVAs de grupo D. Por lo tanto, hay una necesidad apremiante de desarrollar métodos alternativos para la detección de otros rotavirus, y en particular rotavirus grupo D. En particular, hay una necesidad apremiante de desarrollar un método de detección rápido y sensible para RVA grupo D.

Divulgación de la invención

50 La presente invención se refiere a la identificación de un nuevo rotavirus aviar grupo D (RVAD) [9] y ofrece varias oportunidades en los campos de veterinaria y farmacia. La invención proporciona:

- La secuencia del ácido nucleico que codifica el polipéptido VP6, y fragmentos y variantes del mismo, y ácidos nucleicos complementarios con el ácido nucleico que codifica el polipéptido VP6.
- La secuencia de polipéptido VP6 codificado por los ácidos nucleicos mencionados anteriormente, y fragmentos, variantes y fragmentos antigénicos de los mismos.
- Las moléculas de ácido nucleico que se hibridizan bajo rigurosidad alta con el ácido nucleico que codifica el polipéptido VP6, incluyendo cebadores y sondas.
- Anticuerpos que se unen con el polipéptido VP6, fragmentos, variantes y/o determinantes antigénicos del mismo.
- Reactivos diagnósticos y kits que comprenden reactivos para identificar la presencia o ausencia de un RVAD en una muestra biológica y métodos que pueden usarse para diagnosticar infección de RVAD o identificar la presencia o ausencia de un virus RVAD en una muestra biológica.
- Vacunas para el tratamiento de o protección de infección de RVAD.
- Métodos para identificar que los huevos, en particular huevos con embrión para la producción de vacuna, están libres de RVAD.

65 **Ácido nucleico**

La invención proporciona ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. La invención también proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido que tiene al menos $i\%$ identidad con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. El valor de i puede seleccionarse de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%. La identidad secuencial debería calcularse junto con la longitud completa de la secuencia de nucleótido.

SEQ ID NO: 2 proporciona la secuencia codificadora RVAD VP6 completa. SEQ ID NO: 1 proporciona un ácido nucleico que comprende un fragmento de la secuencia codificadora VP6 como la enumerada en la SEQ ID NO: 2, y además comprende una secuencia no trasladada 3'.

Preferentemente, el ácido nucleico codifica un polipéptido RVAD VP6. Los ácidos nucleicos de la invención pueden codificar un polipéptido RVAD VP6 como el enumerado en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

La invención también abarca fragmentos de las secuencias de ácido nucleico como las enumeradas en SEQ ID NO: 1 y/o 2. De este modo la invención proporciona un ácido nucleico que comprende un fragmento de al menos n nucleótidos consecutivos de SEQ ID NOs: 1 y/o 2 donde n es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50 o más. El ácido nucleico puede tener una longitud total de $n+x$ nucleótidos, donde $x=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50$ o más. En una realización, el valor de n es 24.

En una realización adicional, la invención proporciona un ácido nucleico que comprende el complemento inverso de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. La invención también proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% idéntica o mayor con el complemento inverso de la secuencia de ácido nucleico como la enumerada en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. La invención también proporciona un ácido nucleico que comprende un fragmento que consiste en al menos n nucleótidos consecutivos de SEQ ID NOs: 1 y/o 2 donde n es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50 o más. El ácido nucleico puede tener una longitud total de $n+x$ nucleótidos, donde $x=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50$ o más. En una realización, el valor de n es 10.

En una realización adicional, la invención proporciona un ácido nucleico que se hibridiza bajo condiciones rigurosas con un ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2. Condiciones rigurosas ejemplares para hibridación son 0,1xSSC, 0,1% SDS a 65 °C durante 10 minutos, y lavar con 2xSSC, 0,1% SDS durante 10 minutos seguido de 0,1xSSC, 0,1% SDS durante 10 minutos más.

La invención proporciona ácido nucleico de la fórmula 5'-X-Y-Z-3', donde: -X- es una secuencia de nucleótido consistente en x nucleótidos; -Z- es una secuencia de nucleótido consistente en z nucleótidos; -Y- es una secuencia de nucleótido consistente en (a) un fragmento de SEQ ID NO: 1 o 2 o (b) el complemento de (a); y dicho ácido nucleico 5'-X-Y-Z-3' no es (i) un fragmento de SEQ ID NO: 1 o 2 Ni (ii) el complemento de (i). Las fracciones -X- y/o -Z- pueden comprender, por ejemplo, una secuencia promotora (o su complemento).

La invención también proporciona ácidos nucleicos que comprenden los ácidos nucleicos y fragmentos de la invención y que pueden comprender más nucleótidos, nucleótidos modificados o una o más etiquetas detectables. Tales ácidos nucleicos pueden ser útiles como cebadores y/o sondas en métodos que incluyen LCR, PCR, RT-PCR, PCR en tiempo real, RT-PCR en tiempo real, pPCR, pRT-PCR, transferencia Northern y transferencia Southern.

Etiquetas ejemplares incluyen radioisótopos, moléculas fluorescentes, biotina, emparejamientos con pares bases, estructuras horquilla y similares. Muchos fluoróforos adecuados son conocidos y pueden usarse, incluidos aunque sin limitar a fluoresceína, en particular 5-FAM (también llamada 5-carboxifluoresceína; también llamada Spiro(isobenzofuran-1(3H), ácido 9'-(9H)xanteno-5-carboxílico, 6'-dihidroxi-3-oxo-6-carboxifluoresceína); lisamina, ficoeritrina; rodamina (Perkin Elmer Cetus); Cy2, Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy5,5 y Cy7; Flúor X (Amersham) y más etiquetas como las descritas en la referencia [10]. Está dentro de la técnica de un experto en la técnica de biología molecular incorporar tales etiquetas en moléculas de ácido nucleico. En una realización específica, el ácido nucleico comprende una etiqueta fluorescente y una molécula inhibidora de fluorescencia. Tales moléculas inhibidoras de fluorescencia son aunque no se limitan a 6-TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina; Xantilio, 9-(2,5-dicarboxifenil)-3,6-bis(dimetilamino); y DABCYL (4-((4-(dimetilamino)fenil)azo)ácido benzoico). El etiquetado de ácido nucleicos con FAM (por ejemplo, en 5') y DABCYL (por ejemplo, en 3') es preferente.

En una realización adicional, la invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico de la invención. Por ejemplo, la invención incluye vectores de clonación o expresión que comprenden un ácido nucleico de la invención. La invención también proporciona los ácidos nucleicos de la invención y además comprende ácidos nucleicos adicionales, por ejemplo ácido nucleico que codifica más polipéptidos, que comprende secuencias promotoras y finalizadoras, que comprende sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción, etc.

El ácido nucleico de acuerdo con la invención puede tomar varias formas (por ejemplo, de única hélice, de doble hélice, vectores, cebadores, sondas, etiquetado, etc.). En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, los ácidos nucleicos y polinucleótidos pueden ser ADN, ARN, moléculas de ADN/ARN híbridas y/o ADN, ARN o PNA (ácido nucleico peptídico) modificado. Los ácidos nucleicos y polinucleótidos pueden también comprender al menos un azúcar modificado y/o porción base, o pueden comprender una estructura central modificada o unión inter-nucleósidos no natural.

Donde un ácido nucleico es ADN, se apreciará que "U" en una secuencia de ARN se sustituirá por "T" en el ADN. Similarmente, donde un ácido nucleico es ARN, por ejemplo como en el genoma de un RVA, se apreciará que "T" en una secuencia de ADN (tal como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2) se sustituirá por "U" en el ARN.

Los ácidos nucleicos y polinucleótidos de la invención también pueden modificarse uniendo químicamente los oligonucleótidos con una o más porciones o conjugados para mejorar la actividad, estabilidad o detección de los oligonucleótidos. Tales porciones o conjugados incluyen cromóforos o fluoróforos como se ha descrito anteriormente, y además incluyen lípidos tales como colesterol, ácido cólico, tioéter, cadenas alifáticas, fosfolípidos, poliaminas, glicol de polietileno (PEG), porciones de palmitoil y otros como se desvela, por ejemplo, en las referencias 11 a 18.

Los ácidos nucleicos de la invención se proporcionan preferentemente en forma purificada o sustancialmente purificada, esto es, sustancialmente libres de otros ácidos nucleicos (por ejemplo, ácidos nucleicos que ocurren de manera natural), particularmente de otros RVAD o ácidos nucleicos de célula huésped, siendo generalmente al menos aproximadamente 50% puros (por peso), y normalmente al menos aproximadamente 90% puros. Los ácidos nucleicos de la invención son preferentemente ácidos nucleicos de RVAD.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden prepararse de muchas maneras, por ejemplo, mediante síntesis química (por ejemplo, síntesis fosforamídita de ADN) por completo o en parte, digiriendo ácidos nucleicos más largos usando nucleasas (por ejemplo, enzimas de restricción), uniendo ácidos nucleicos más cortos o nucleótidos (por ejemplo, usando ligasas o polimerasas), de bibliotecas genómicas o de cADN, etc.

El ácido nucleico de la invención puede unirse a un soporte sólido (por ejemplo, una gota, placa, filtro, película, portaobjetos, soportes micromatriz, resina, etc.). El ácido nucleico de la invención puede etiquetarse, por ejemplo, con una etiqueta radioactiva o fluorescente o una etiqueta de biotina. Ésta es particularmente útil cuando el ácido nucleico se va a usar en técnicas de detección, por ejemplo, donde el ácido nucleico es un cebador o como una sonda.

El término "ácido nucleico" incluye en general una forma polimérica de nucleótido de cualquier longitud, que contiene deoxiribonucleótidos, ribonucleótidos y/o sus análogos. Incluye ADN, ARN, híbridos ARN/ARN. También incluye análogos de ADN o ARN, tales como aquellos que contienen estructuras centrales modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos de péptidos (PNAs) o fosfortioatos) o bases modificadas. De este modo, la invención incluye mARN, tARN, rARN, ribozimas, ADN, cADN, ácidos nucleicos recombinantes, ácidos nucleicos ramificados, plásmidos, vectores, sondas, cebadores, etc. Donde el ácido nucleico de la invención toma la forma de ARN, puede tener o no una tapa 5'.

Polipéptidos

La invención proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. La invención también proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de nucleótido que es al menos *j*% idéntica con la secuencia de polipéptido como la enumerada en SEQ ID NOs: 13 y/o 4. El valor de *j* puede seleccionarse de 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%. La identidad secuencial debería calcularse junto con la longitud completa de la secuencia de aminoácido.

Preferentemente, el polipéptido es un polipéptido RVAD VP6. SEQ ID NO: 3 corresponde al polipéptido codificado por SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 4. Corresponde al polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 2. Las SEQ ID Nos: 3 y 4 están alineadas en la Figura 3.

La invención también proporciona un polipéptido que comprende al menos un fragmento de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, donde el fragmento consiste al menos en *w* aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO: 4, donde *w* es 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50 o más. El polipéptido puede tener una longitud total de *w+x* aminoácidos, donde *x*= 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50 o más.

La invención también proporciona variantes de los polipéptidos y fragmentos de la invención que comprenden una o más sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácido. Por ejemplo, SEQ ID NO: 3 es una variante del fragmento de terminal C de SEQ ID NO: 4, que contiene 1 sustitución de aminoácido (Fig. 3).

Un polipéptido de la invención, comparado con SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, puede incluir una o más (por

ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) sustituciones conservativas de aminoácido, esto es, sustituciones de un aminoácido por otro que tiene una cadena lateral relacional. Los aminoácidos genéticamente codificados están generalmente divididos en cuatro familias: (1) ácidos, esto es, aspartato, glutamato; (2) básicos, esto es, lisina, arginina, histidina; (3) no-polares, esto es, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados, esto es, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serian, treonina, tirosina. Fenilalanina, triptófano y tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En general, la sustitución de aminoácidos sencillos en estas familias no tiene un mayor efecto en la actividad biológica. Además, los polipéptidos pueden tener una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) eliminaciones de aminoácido sencillo en relación con SEQ ID NO: 3 o 4. Además, los polipéptidos pueden incluir una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) inserciones (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos) en relación con SEQ ID NO: 3 o 4.

En una realización particular, el fragmento es capaz de inducir una respuesta inmune en un sujeto. El sujeto puede ser un ave o un mamífero. En una realización particular, el sujeto es un pájaro ave, por ejemplo, un pollo o un pavo.

Los fragmentos pueden comprender al menos un epítope de célula T, o preferentemente de célula B. Los epítopes de célula T y B pueden identificarse empíricamente (por ejemplo, usando PEPSCAN [19, 20] o métodos similares), o pueden predecirse (por ejemplo, usando el índice antigénico Jameson-Wolf [21], técnicas con base de matriz [22], TEPITOPE [232], redes neurales [24], OptiMer y EpiMer [25, 26], ADEPT [27], Tsites [28], hidrofiliidad [29], índice antigénico [30] o los métodos desvelados en la referencia 31 y 32, etc.). En la tabla 1 se dan epítopes ejemplares encontrados en SEQ ID NO: 4 e identificados por el método descrito en la referencia 32.

Quando el polipéptido es capaz de unirse específicamente con un anticuerpo anti-RVAD VP6 como aquí se describe, el polipéptido también puede referirse como un antígeno. La invención incluye polipéptidos que son antígenos virales RVAD, y polinucleótidos que codifican estos antígenos virales RVAD.

Los polipéptidos de la invención pueden prepararse de muchas maneras, por ejemplo, mediante síntesis química (por completo o en parte), digiriendo polipéptidos más largos usando proteasas, mediante traslación de ARN, mediante purificación de cultivo celular (por ejemplo, de expresión recombinante), del propio organismo (por ejemplo, después de cultivo bacteriano, o directo de pacientes), etc. Un método preferente para la producción de péptidos < 40 aminoácidos incluye síntesis química in vitro [33, 34]. La síntesis de péptido en fase sólida es particularmente preferente, tales como los métodos basados en química tBoc o Fmoc [35]. La síntesis enzimática [36] puede también usarse en parte o por completo. Como una alternativa a síntesis química, puede usarse síntesis biológica, por ejemplo, pueden producirse polipéptidos mediante traslación. Esto puede realizarse in vitro o in vivo. Los métodos biológicos, en general, se limitan a la producción de polipéptidos basados en aminoácidos L, pero la manipulación de la maquinaria de traslación (por ejemplo, moléculas aminoacil ARN) pueden usarse para permitir la introducción de aminoácidos D (o de otros aminoácidos no naturales, tales como yodotirosina o metilfenilalanina, azidohomoalanina, etc.) [37]. Sin embargo, donde se incluyen aminoácidos D, es preferente usar síntesis química. Los polipéptidos de la invención pueden tener modificaciones covalentes en la terminal C y/o terminal N.

Los polipéptidos de la invención se proporcionan preferentemente en forma purificada o sustancialmente purificada, esto es, sustancialmente libres de otros polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos que ocurren de manera natural), particularmente de otro RVAD o polipéptidos de célula huésped, siendo generalmente al menos aproximadamente 50% puros (por peso), y normalmente al menos aproximadamente 90% puros, esto es, menos de aproximadamente 50% y más preferentemente menos de aproximadamente 10% (por ejemplo, 5% o menos) de una composición hecha de otros polipéptidos expresados. Los polipéptidos de la invención son preferentemente polipéptidos de RVAD.

Los polipéptidos de la invención pueden unirse a un soporte sólido. Los polipéptidos de la invención pueden comprender una etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta fluorescente, o una etiqueta de biotina).

El término "polipéptido" se refiere a polímeros de aminoácido de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que se ha modificado de manera natural o mediante intervención; por ejemplo, la formación de enlace de disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de etiquetado. También se incluyen en la definición, por ejemplo, polipéptido que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.) así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden ocurrir como cadenas única o cadenas asociadas, los polipéptidos de la invención pueden glicosilarse de manera natural o no natural (esto es, el polipéptido tiene un patrón de glicosilación que difiere del patrón de glicosilación encontrado en el correspondiente polipéptido que ocurre de manera natural). Los polipéptidos de la invención pueden estar aislados o purificados.

La invención proporciona polipéptidos que comprenden una secuencia -X-Y- o -Y-X-, donde; -X- es una secuencia de aminoácido como la definida anteriormente e -Y- no es una secuencia como la definida anteriormente, esto es, la invención proporciona proteínas de fusión.

La invención proporciona un proceso para producir polipéptidos de la invención, que comprende la etapa de cultivar una célula huésped de la invención bajo condiciones que inducen la expresión de polipéptido.

5 La invención proporciona un proceso para producir un polipéptido de la invención, donde el polipéptido se sintetizar en parte o por completo usando medios químicos.

Métodos y kits para la detección de ácidos nucleicos de RVAD

10 La invención también proporciona kits y métodos para detectar la presencia o ausencia de RVAD en muestras biológicas. En particular, la invención proporciona kits y métodos para la detección de los ácidos nucleicos de la invención.

15 En una realización particular, la invención proporciona un kit que comprende cebadores para amplificar una secuencia plantilla contenida en un ácido nucleico de la invención, el kit comprende un primer cebador y un segundo cebador, donde el primer cebador comprende una secuencia sustancialmente complementaria a una parte de dicha secuencia plantilla y el segundo cebador comprende una secuencia sustancialmente complementaria a una parte del complemento de dicha secuencia plantilla, donde las secuencias en dichos cebadores definen las terminales de la secuencia plantilla que se amplificará.

20 Por "sustancialmente complementaria" en referencia a una secuencia cebadora se entiende que los cebadores tienen suficiente complementariedad con la secuencia plantilla, o complemento de la misma, para emparejarse con la secuencia plantilla, o complemento de la misma, a una temperatura de 45 a 65 °C, por ejemplo, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 o 65 °C, en una concentración de sal de 50mM cationes monovalentes.

25 La secuencia plantilla (incluyendo las partes complementarias con los cebadores) puede tener de 50 nucleótidos a 1500 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la secuencia plantilla puede tener 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1250 o 1500 nucleótidos de longitud. En una realización, el ácido nucleico plantilla está contenido en la secuencia de ácido nucleico como la enumerada en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En una realización, el ácido nucleico plantilla es la secuencia de ácido nucleico como la enumerada en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Los cebadores de la invención también son adecuados para su uso en la detección de secuencias plantilla que difieren de SEQ ID: 1 o SEQ ID NO: 2.

30 La invención también proporciona kits que además comprenden una secuencia sonda sustancialmente complementaria con una parte de dicha secuencia plantilla o sustancialmente complementaria a una parte del complemento inverso de dicha secuencia plantilla. La secuencia sonda puede también comprender un etiqueta detectable. Por "sustancialmente complementaria" en referencia a una secuencia sonda se entiende que las sondas tienen suficiente complementariedad con la secuencia plantilla, o complemento de la misma, para emparejarse con la secuencia plantilla, o complemento de la misma, a una temperatura de 45 a 65 °C, por ejemplo, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 o 65 °C, en una concentración de sal de 50mM cationes monovalentes.

35 Los cebadores o sondas pueden tener 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50 o más nucleótidos de longitud. Las sondas o cebadores pueden comprender más nucleótidos u otras modificaciones en el extremo 5' o 3' o en ambos. Los nucleótidos adicionales pueden comprender secuencias promotoras, sitios de reconocimiento de endonucleasas u otras secuencias de ácido nucleico. En general, las sondas y cebadores no tienen más de 100 nucleótidos de longitud, por ejemplo, ≤ 75 nucleótidos.

40 Una pareja cebadora particular que puede usarse en los kits y métodos de la invención comprende la secuencia de RVAD delantero (GCRACAAGTGARACAAWG – SEQ ID NO: 24) y RVAD inverso (GGAAGCAGTTGTCATCAA – SEQ ID NO: 25). Esta pareja cebadora puede usarse con cualquier secuencia sonda, pero en particular con una secuencia sonda que comprende 6FAM-TTGCATATTAGATTGTCTCGTGGTGTATA-Dabcyl (SEQ ID NO: 26) en qRT-PCR.

45 Se dan más secuencias cebadoras en la tabla 2 más abajo. En una realización, los cebadores se usan en las siguientes parejas. SEQ ID NOs: 27 y 28; SEQ ID NOs: 29 y 30; SEQ ID NOs: 31 Y 32; SEQ ID NOs: 33 y 34; SEQ ID NOs: 35 y 36.

50 La invención también comprende un método para diagnosticar infección de RVAD o para identificar la presencia o ausencia de un virus RVAD en una muestra biológica que comprende la etapa de detectar la presencia o ausencia de una molécula de ácido nucleico de la invención. En una realización particular, los métodos incluyen la detección de la presencia o ausencia de un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico como la enumerada en SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2.

55 La etapa de detección puede estar precedida por una etapa de amplificación, por ejemplo usando cualquier

técnica de amplificación de ácido nucleico conocida en la técnica, y en particular LCR, PCR, RT-PCR, PCR en tiempo real, RT-PCR en tiempo real, qPCR y qRT-PCR. Puede usarse cualquier método adecuado para detectar la presencia o ausencia del ácido nucleico de la invención, incluyendo aunque sin limitar transferencia Southern, transferencia Northern y electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida seguido de visualización de ácidos nucleicos usando bromuro de etidio. El ácido nucleico de la invención puede también detectarse usando un ensayo en tiempo real (por ejemplo, “qPCR”; Taqman™, Lightcycler™; Scorpion™, etc.).

Debido a que RVAD tiene un genoma ARN, en una realización particular de la invención se usa RT-PCR para la etapa de amplificación. Sin embargo, los métodos equivalentes de amplificación de ARN también son aplicables, como los conocidos por un experto en la técnica (NASBA™; 3SR™; TMA™, etc.). En una realización particular, se aplica un ensayo de una etapa RT-PCR en tiempo real (“RT-qPCR en tiempo real”). Pueden usarse kits RT-PCR disponibles en el mercado, por ejemplo, kit Virus Qiagen QuantiTect™ o kit Super Script™ II Platinum™. Las señales de fluorescencia generadas pueden analizarse usando el software ciclador respectivo en tiempo real, como es conocido en la técnica. Los kits de la invención pueden por lo tanto incluir transcriptasa inversa.

Los cebadores y sondas como los descritos anteriormente pueden usarse en cualquiera de los métodos de la invención.

Los métodos de la invención descritos anteriormente para la detección de la presencia o ausencia de VRAD en una muestra biológica son particularmente útiles para revisar bandadas de aves, y en particular bandadas de pollos, para infección de RVAD. La revisión de aves para la presencia o ausencia de RVAD puede usarse en métodos para controlar o prevenir brotes de SRC o SMA.

Los métodos de la invención descritos anteriormente son útiles para revisar huevos de aves para la presencia o ausencia de RVAD. La revisión de huevos para la presencia o ausencia de RVAD puede usarse para asegurarse que los huevos usados en la producción de vacunas estén libres de RVAD.

La invención también proporciona un método para verificar que un huevo está libre de RVAD que comprende la detección de la presencia o ausencia de RVAD en un huevo. Puede usarse cualquiera de los métodos descritos anteriormente para detectar la presencia o ausencia de un ácido nucleico de la invención para verificar que un huevo está libre de RVAD.

En los métodos descritos anteriormente, el huevo puede ser un huevo de pollo. En una realización adicional, le huevo es un huevo de pollo con embrión y en particular un huevo de pollo con embrión para su uso en la producción de vacunas. La vacuna que se está produciendo puede ser una vacuna para gripe.

Anticuerpos e inmunoensayos

En una realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente con los polipéptidos de la invención. En particular, un anticuerpo de la invención se une específicamente con un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO: 4. Por “se une específicamente” se entiende que los anticuerpos se unen a un polipéptido de la invención con una afinidad sustancialmente superior a BSA. Preferentemente, la afinidad es al menos 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces, 10^6 veces, etc. mayor para los polipéptidos de la invención que para BSA.

En una realización, los anticuerpos se unen con los polipéptidos de la invención con al menos una afinidad 10 veces, 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces, 10^6 veces mayor que su afinidad de enlace con un polipéptido VP6 derivado de cualquier otro Reovirus. En otra realización, el anticuerpo se une con un polipéptido de la invención con al menos una afinidad 10 veces, 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces, 10^6 veces mayor que su afinidad de unión con un polipéptido VP6 de otro rotavirus.

Los polipéptidos de la invención que se unen específicamente con los anticuerpos de la invención son referidos como antígenos.

“Anticuerpo” como se conoce en la técnica incluye una o más porciones biológicas que, a través de medios químicos o físicos, pueden unirse a un epítipo de un polipéptido de interés. Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos que se unen específicamente con un antígeno viral RVAD de los polipéptidos VP6 de la invención. El término “anticuerpo” incluye anticuerpos obtenidos de preparaciones policlonales y monoclonales, así como los siguientes: moléculas de anticuerpo híbrido (quimérico) [38 y 39]; fragmentos F(ab')₂ y F(ab); moléculas Fv [40 y 41]; moléculas Fv de cadena sencilla (sFv) [42]; constructos de fragmento de anticuerpo dimerico y trimérico; y, cualquier fragmento funcional obtenido de tales moléculas, donde tales fragmentos mantienen propiedades inmunológicas de enlace de la molécula de anticuerpo original. El término “anticuerpo” incluye además anticuerpos obtenidos por medio de procesos no convencionales, tales como expresión en fagos.

Como aquí se usa, la expresión “anticuerpo monoclonal” se refiere a una composición de anticuerpo que tiene una población homogénea de anticuerpos. La expresión no se limita en lo relativo a la especie o fuente del

anticuerpo, ni pretende estar limitada por la manera en la que se hace.

5 Los anticuerpos se producen usando técnicas bien conocidas para aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, en los ejemplos referenciales 43 y 44. Por ejemplo, se generan anticuerpos policlonales inmunizando un animal adecuado, tal como un ratón, rata, conejo, oveja, pollo o cabra, con un antígeno de interés. Con el fin de mejorar la inmunogenicidad, el antígeno puede estar unido a un transportador antes de la inmunización. Tales transportadores son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. La inmunización generalmente se realiza mezclando o emulsionando el antígeno en solución salina, preferentemente en un adyuvante como adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión parenteralmente (generalmente subcutáneamente o intramuscularmente). Al animal generalmente se le estimula 2-6 semanas más tarde con una o más inyecciones del antígeno en solución salina, preferentemente usando adyuvante incompleto de Freund. Los anticuerpos también pueden generarse mediante inmunización in vitro, usando métodos conocidos en la técnica. Después se obtiene antisuero policlonal del animal inmunizado.

15 Los anticuerpos monoclonales generalmente se preparan usando el método de Kohler & Milstein [45] o una modificación del mismo. Típicamente, se inmuniza un ratón o rata como se ha descrito anteriormente. También pueden usarse conejos. Sin embargo, en lugar de hacer sangrar al animal para extraer suero, se extrae el bazo (y opcionalmente varios nodos linfáticos grandes) y se desasocia en células sencillas. Si se desea, las células del bazo pueden analizarse (después de la extracción de células específicamente adherentes) aplicando una suspensión celular a una placa cubrirse bien con el antígeno. Las células B, que expresan inmunoglobulina unida a la membrana específica para el antígeno, se unirán a la placa, y no se aclarará con el resto de la suspensión. Las células B resultantes, o todas las células de bazo desasociadas, se inducen después para fusionarse con células de mieloma para formar hibridomas, y después se cultivan en un medio selectivo (por ejemplo, medio de hipoxantina, aminopterina, timidina, "HAT"). Los hibridomas resultantes se colocan en placas mediante dilución limitativa, y se someten a ensayo para la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno inmunizador (y que no se unen a antígenos no relacionados). Los hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales seleccionados se cultivan después in vitro (por ejemplo, en botellas de cultivo de tejido o reactores de fibra hueca), o in vivo (por ejemplo, como ascitis en ratones).

30 La invención también proporciona kits y métodos para la detección de los polipéptidos de la invención. Puede usarse cualquier método conocido para detectar polipéptidos. Tales métodos incluyen, aunque no se limitan a, espectrometría de masas, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, métodos inmunoquímicos, ensayos de aglutinante-ligando, técnicas de inmunohistoquímica, aglutinación y ensayos complementarios [46].

35 La invención también proporciona métodos para determinar la presencia o ausencia de RVAD en una muestra biológica detectando la presencia o ausencia de antígenos VP6 RVAD o anticuerpos VP6 anti-RVAD en una muestra biológica que comprende la detección de la interacción de un anticuerpo VP6 anti-RVAD, ya sea un anticuerpo nativo o un anticuerpo de la invención, con un anticuerpo VP6 RVAD.

40 Un "anticuerpo nativo" es un anticuerpo presente en una muestra biológica obtenida de un sujeto, donde el sujeto se ha expuesto y preparado para una respuesta inmune a VP6 RVAD, dando como resultado la producción de anticuerpos VP6 anti-RVAD. El sujeto puede ser un mamífero o un ave. En una realización el sujeto es un pollo. En otra realización, es sujeto es un huevo con embrión.

45 El diseño del inmunoensayo está sujeto a una gran cantidad de variaciones y en la técnica se conocen muchos formatos. Los protocolos pueden ser, por ejemplo, usar soportes sólidos o inmunoprecipitación. La mayoría de los ensayos incluyen el uso de anticuerpo o polipéptido etiquetado; las etiquetas pueden ser, por ejemplo, moléculas enzimáticas, fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas o con tinte. Los ensayos que amplifican las señales del complejo inmune son también conocidos; cuyos ejemplos son ensayos que utilizan biotina y avidina, e inmunoensayos mediados con etiquetas de enzimas, tales como ensayo ELISA.

50 El inmunoensayo puede estar, sin limitación, en un formato heterogéneo u homogéneo, y ser de un tipo estándar o competitivo. En un formato heterogéneo, el polipéptido está típicamente unido a una matriz sólida o soporte para facilitar la separación de la muestra del polipéptido después de la incubación. Ejemplos de soportes sólidos que pueden usarse son nitrocelulosas (por ejemplo, en forma de membrana o pozo microtítulo), cloruro de polivinilo (por ejemplo, en láminas o pozos microtítulo), látex de poliestireno (en gotas o placas microtítulo, fluoruro de polivinilideno, papel diazotizado, membranas de nailon, microchips, biochips de alta o baja densidad, inmunoensayos recombinantes (RIBA), dispositivos de microfluidez, gotas micromagnéticas, gotas activadas y gotas de proteína A. Por ejemplo, pueden usarse placas microtítulos Dynatech Immunlon o Immunlon 2 o gotas de poliestireno de 0,25 pulgadas (Bola de Plástico de Precisión) en el formato heterogéneo. El soporte sólido que contiene los polipéptidos antigénicos típicamente se lava después de separarlo de la muestra del test, y antes de la detección de anticuerpos unidos. Tanto los formatos estándares como los competitivos se conocen en la técnica.

65 En un formato heterogéneo, la muestra del test se incuba con la combinación de antígenos en solución. Por ejemplo, puede estar bajo condiciones que precipiten cualquier complejo antígeno-anticuerpo que se forme. Tanto los formatos estándares como los competitivos para estos ensayos se conocen en la técnica.

- 5 En un formato estándar, se detecta la cantidad de anticuerpos VP6 anti-RVAD en los complejos anticuerpo-antígeno. Esto puede llevarse a cabo determinando si los anticuerpos etiquetados anti-xenogénicos (por ejemplo, anti-pollo) que reconocen un epítotope en anticuerpo VP6 anti-RVAD se unirán debido a la formación del complejo. En un formato competitivo, la cantidad de anticuerpos VP6 anti-RVAD en la muestra se deduce controlando el efecto competitivo en la unión de una cantidad conocida de anticuerpos etiquetados (u otro ligando competitivo) en el complejo.
- 10 Los complejos formados que comprenden anticuerpo VP6 anti-RVAD (o en el caso de ensayos competitivos, la cantidad de anticuerpo competente) se detectan mediante cualquiera de un número de técnicas conocidas, dependiendo del formato. Por ejemplo, los anticuerpos VP6 anti-RVAD no etiquetados en el complejo pueden detectarse usando un conjugado de Ig anti-xenogénico que forma complejo con una etiqueta (por ejemplo, una etiqueta enzima).
- 15 En un formato de ensayo de inmunoprecipitación o aglutinación la reacción entre los antígenos RVAD y el anticuerpo forma una red que precipita de la solución o suspensión y forma una capa o película visible de precipitado. Si no está presente ningún anticuerpo VP6 anti-RVAD en el espécimen del test, no se forma un precipitado visible.
- 20 Hay al menos tres tipos específicos de ensayo de aglutinación de partícula (AP). Estos ensayos se usan para la detección de anticuerpos para varios antígenos cuando se cubren en un soporte. Un tipo de estos ensayos es el ensayo de hemaglutinación usando glóbulos rojos (GRs) que se sensibilizan al adsorben pasivamente el antígeno (o anticuerpo) al GR. La adición de anticuerpos de antígeno específicos presentes en el componente del cuerpo, si hay alguno, provoca que los GRs cubiertos con el antígeno purificado se aglutinen.
- 25 Para eliminar las potenciales reacciones no específicas en el ensayo de hemaglutinación, pueden usarse dos transportadores artificiales en lugar de GR en el AP. Los más comunes de estos son las partículas de látex. Sin embargo, también pueden usarse partículas de gelatina. Los ensayos que utilizan cualquier de estos transportadores se basan en la aglutinación pasiva de las partículas cubiertas con antígenos purificados.
- 30 Los antígenos VP6 anti-RVAD típicamente se empaquetarán en forma de un kit para su uso en estos inmunoensayos. El kit normalmente contendrá en recipientes separados el antígeno VP6 RVAD, las formulaciones de anticuerpo control (positivo y/o negativo), anticuerpo etiquetado cuando el formato del ensayo requiera el mismo y reactivos que generan señales (por ejemplo, sustrato de enzima) si la etiqueta no genera una señal directamente. El antígeno VP6 RVAD puede estar ya unido a una matriz sólida o estar separado con reactivos para unirse a la matriz. Las instrucciones (por ejemplo escritas, CD-ROM, etc.) para realizar el ensayo normalmente estarán incluidas en el kit.
- 35 En una realización alternativa de la invención la presencia o ausencia de RVAD en una muestra biológica puede determinarse por medio de inmunohistoquímica (el uso de anticuerpos para sondar antígenos específicos en una muestra). Dicho análisis es estándar en la técnica, donde la detección de antígenos en tejidos es conocida como inmunohistoquímica, mientras la detección en células cultivadas normalmente se denomina inmunocitoquímica. En resumen, el anticuerpo primario se detectará uniéndolo con su antígeno específico. El complejo anticuerpo-antígeno se unirá después por un anticuerpo conjugado de enzima secundaria. En presencia del sustrato necesario y el cromógeno la enzima unida se detecta de acuerdo con los depósitos coloreados en los sitios de enlace anticuerpo-antígeno. Hay una amplia variedad de tipos de muestras adecuadas, afinidad antígeno-anticuerpo, tipos de anticuerpo y métodos de mejora de detección. De este modo, el experto en la técnica debe determinar las condiciones óptimas para la detección inmunohistoquímica o inmunocitoquímica para cada caso individual.
- 40 Los métodos de inmunoensayos, de detección inmunohistoquímica e inmunocitoquímica de la invención para la presencia o ausencia de RVAD en una muestra biológica son particularmente útiles en la revisión de bandadas de aves, y en particular en bandadas de pollos, para infección de RVAD. La revisión de aves para la presencia de RVAD puede usarse en métodos para controlar o prevenir brotes de SRC y SMA.
- 45 Los métodos de inmunoensayos, de detección inmunohistoquímica e inmunocitoquímica de la invención son también útiles para la revisión de huevos de aves para la presencia o ausencia de RVAD. La revisión de huevos para la presencia o ausencia de RVAD puede usarse para asegurar que los huevos usados en la producción de vacunas estén libres de RVAD.
- 50 La invención también proporciona un método para verificar que un huevo está libre de RVAD que comprende la detección de la presencia o ausencia de RVAD en un huevo. Puede usarse cualquiera de los métodos descritos anteriormente para detectar la presencia o ausencia de un polipéptido de la invención o un anticuerpo anti-RVAD para verificar que un huevo está libre de RVAD.
- 55 En los métodos descritos anteriormente, el huevo puede ser un huevo de pollo. En una realización adicional, el huevo es un huevo de pollo con embrión y en particular un huevo de pollo con embrión para su uso en

la producción de vacunas. La vacuna que se está produciendo puede ser una vacuna para gripe.

5 Los anticuerpos de la invención se proporcionan preferentemente en forma purificada o sustancialmente purificada. Típicamente, el anticuerpo estará presente en una composición que está sustancialmente libre de otros polipéptidos, por ejemplo, donde menos del 90% (por peso), normalmente menos del 60% y más normalmente menos del 50% de la composición está hecha de otros polipéptidos.

Vacunas

10 La invención también proporciona una vacuna para el tratamiento de o protección contra infección de RVAD, y en una realización se usa para el tratamiento o prevención de SRC y/o SMA. Las formulaciones de vacuna de la invención incluyen virus RVAD atenuado que comprende un polipéptido de la invención o una formulación de subunidad recombinante o purificado de uno o más antígenos virales de RVAD que incluyen antígeno VP6 RVAD. Las formulaciones de vacuna pueden además comprender un adyuvante.

15 La invención incluye una composición que comprende un virus RVAD atenuado que tiene una secuencia de polipéptido VP6 como aquí se describe. Esta composición puede usarse como una vacuna de virus RVAD profiláctica o terapéutica. Los métodos para atenuar virus son conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen el paso en serie de los virus RVAD en células cultivadas (por ejemplo, cultivo de célula aviar o mamífera), hasta que el virus RVAD demuestre la función atenuada. La temperatura a la que el virus crece puede ser cualquier temperatura con la que ocurra la atenuación del paso de cultivo de tejido. Un experto en la técnica puede medir la función atenuada del virus RVAD después de uno o más pasos en cultivo celular. Como aquí se usa, la atenuación se refiere a la virulencia reducida del virus RVAD en un sujeto ave, en particular en un pollo. La evidencia de la función atenuada puede estar indicada por los niveles reducidos de réplica viral o por la virulencia reducida en un modelo animal.

20 En una realización específica, el RVAD se atenúa al introducir mutaciones en la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido VP6.

30 Otros métodos para producir un virus RVAD atenuado incluyen el paso del virus en cultivo celular a temperaturas sub-óptimas o "frías" y la introducción de mutaciones atenuantes en el genoma viral de RVAD mediante mutagénesis aleatoria (por ejemplo, mutagénesis química) o mutagénesis dirigida específica de sitio. La preparación y generación de vacunas RSV (cuyos métodos generalmente serán aplicables al virus RVAD) se desvelan, por ejemplo, en las referencias 47 a 50.

35 La invención incluye una composición que comprende un antígeno viral de RVAD aislado o purificado derivado de los polipéptidos de la invención. En particular, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende un polipéptido de la invención o un fragmento antigénico del mismo. La composición puede además comprender uno o más adyuvantes.

40 Los antígenos virales de RVAD usados en la invención pueden producirse en una variedad de diferentes sistemas de expresión que son bien conocidos en la técnica; por ejemplo, aquellos usados en células de mamíferos, baculovirus, bacterias y levadura. Tales sistemas de expresión típicamente usarán polinucleótidos que codifican los antígenos virales de la invención. Tales secuencias pueden obtenerse usando técnicas estándares de biología molecular, incluyendo la traslación de secuencias de aminoácido aquí listadas. Por consiguiente, la invención incluye polinucleótidos que codifican los antígenos virales de la invención. Además, los antígenos virales de la invención pueden producirse (al menos en parte, preferentemente por completo) por medio de métodos de química sintética.

50 Las vacunas de la invención pueden administrarse mediante cualquier ruta conocida en la técnica para la administración de vacunas, incluyendo inyección intramuscular o subcutánea, administración intraocular, administración intranasal o administración oral. En una realización, la vacuna de RVAD de la invención es adecuada para administración oral. En particular, la vacuna puede administrarse a bandadas de aves usando agua potable.

55 General

La expresión "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

60 La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que es "sustancialmente libre" de Y puede no estar completamente libre. Donde sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

65 El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

Las referencias a una identidad secuencial porcentual entre dos secuencias significan que, cuando se alinean, ese porcentaje de monómeros es el mismo al comparar las dos secuencias. Este alineamiento y la homología porcentual o identidad secuencial pueden determinarse usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo aquellos descritos en la sección 7.7.18 de referencia 51. La identidad entre secuencias de aminoácido y nucleótidos se determina preferentemente mediante el algoritmo de búsqueda por homología Smith-Waterman [52], usando una búsqueda de hueco afín con parámetros predeterminados *penalización por hueco abierto*=12 y *penalización por extensión de hueco*=1. Puede usarse la matriz de puntuación BLOSUM62.

Como se ha indicado en el texto anterior, los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención pueden incluir secuencias que:

- (a) son idénticas (esto es, 100% idénticas) a una secuencia de SEQ ID NOS: 1 a 4;
- (b) comparte identidad secuencial con una secuencia de SEQ ID NOS: 1 a 4;
- (c) tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos sencillos o alteraciones de aminoácido (eliminaciones, inserciones, sustituciones), que pueden estar en localizaciones separadas o pueden estar contiguas, como es compara con las secuencias de (a) o (b); y
- (d) cuando se alinean con una secuencia particular de SEQ ID NOS: 1 a 4 usando un algoritmos de alineamiento en parejas, una ventana móvil de x monómeros (aminoácidos o nucleótidos) que se mueve desde el inicio (terminal N o 5') hasta el final (terminal C o 3'), de tal manera que para una alineamiento que se extiende a p monómeros (donde $p > x$), hay $p-x+1$ de tales ventanas, cada ventana tiene al menos $x \cdot y$ monómeros alineados idéntico, donde: x se selecciona de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200; y se selecciona de 0,50, 0,60, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99; y si $x \cdot y$ no es un número entero entonces se redondea al número entero más cercano.

El algoritmo de alineamiento en parejas preferente es el algoritmo de alineamiento global Needleman-Wunsch [53], que usa parámetros predeterminados (por ejemplo, penalización por abertura de hueco = 10,0 y con penalización por extensión de hueco = 0,5, usando la matriz de puntuación EBLOSUM62). Este algoritmo se implementa de manera conveniente en la herramienta "needle" en el paquete EMBOSS [54].

Los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención pueden además tener secuencias adicionales a terminal N/5' y/o terminal C/3' de estas secuencias (a) a (d).

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican con detalle en la bibliografía. Véase, por ejemplo, referencias 55-62.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1: Gráficos de amplificación de una muestra positiva de RVAD en diluciones en serie (2 veces) y control negativo (agua).

Fig. 2: Alineamiento Clustal X de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2

Fig. 3: Alineamiento Clustal X de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4

Modos para realizar la invención

Materiales y Métodos

Muestra con contenido intestinal

Se recogió contenido intestinal de un pollo enano a la edad de 10 días. Se identificaron numerosas partículas de RVAD mediante PAGE en este contenido intestinal del pollo. La preparación de la muestra, el aislamiento de ARN ds viral y el PAGE se describieron en la referencia 6.

Mini kit Qiagen QIAamp viral ARN, extracción de gel de segmento de genoma VP6

Amplificación y clonación de ARN ds viral (método modificado descrito en la referencia 63)

Ligación de oligos: 10 μ l ARNds, 1,5 μ l cebador PC3 100 μ M, 1 μ l Inhibidor ARNasa, 2,5 μ l BSA, 2,5 μ l ATP 10 mM, 4 μ l ARN ligasa, 2,75 μ l tampón y 2,5 μ l PEG 4000 se incubaron durante 24 h a 17 °C. ARNds ligados se diluyeron en tampón PE a 100 μ l y se purificaron sobre columna de extracción de gel Eppendorf como lo describe el fabricante. Para eluir 1 μ l oligoT17, se añadieron 100 μ M y 1,5 μ l DMS y se incubaron a 99 °C en un termociclador durante 2 minutos y se enfriaron en hielo. Inmediatamente después de esta etapa se añadieron los siguientes reactivos: 2 μ l agua, 1 μ l Ribolock, 1,5 μ l TRIS pH 8,3 1M, 6 μ l MgCL2 5 mM, 2,1 μ l KCl 1 M; 6 μ l dNTPs 2,5 mM, 0,35 μ l AMV transcriptasa inversa. La reacción se incubó a 42 °C durante 45 minutos seguido de incubación a 50 °C durante 15 minutos. La reacción se paró para la adición de 1 μ l EDTA 1 M. El ARN residual se extrajo mediante la adición de 3,4 μ l NaOH e incubación a 65 °C durante 30 minutos.

La hibridación del ADN se realizó durante una hora a 65 °C después de añadir 4,3 μ l Tris (pH 7,5, 1M) y 4,3 μ l HCl (1M). 5 μ l de la reacción de cADN se añadió a una reacción 50 μ l PCR que contenía 5 μ l tampón Ex Taq

tampón, 4 µl dNTPs 2,5mM, 1 µl cebador PC2 100 µM, 1 µl Ex Taq. Durante la pre-incubación durante 5 minutos a 72 °C se rellenan los excesos parciales del cADNs. Esto es seguido de una incubación de 2 minutos a 94 °C y 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 67 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 5 minutos. La calidad y cantidad de los amplicones PCR se comprobó mediante electroforesis de gel. Los productos PCR se clonaron mediante clonación T/A y se secuenciaron.

qPT-PCR

A 1-4 µl ARNs (extraído con mini kit QIAGEN QIAamp ARN viral) se añadieron 3 µl de cada cebador 10 µM (RVAD delantero (GCRACAACTGARACAAWG – SEQ ID NO: 24) y RVAD inverso (GGAAGCAGTTGTCATCAA – SEQ ID NO: 25) y se desnaturalizaron a 99 °C durante 10 minutos. Los tubos PCR se enfriaron en hielo y la mezcla maestra (10 µl sonda RT Eppendorf RealMaster 2,5x, sonda 0,5 µl RVAD 10 µM (6FAM-TTGCATATTAGATTGTCTCGTGGTGTATA-Dabcyl (SEQ ID NO: 26)), 0,25 µl Enzima realMaster RT, 0,25 µl solución inhibidora ARNasa) y se añadió agua de grado PCR hasta un total de 25 µl. Se realizó transcripción inversa a 50 °C durante 30 minutos, seguido de una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos y 45 ciclos de dos etapas de 10 segundos, desnaturalización a 95 °C e hibridación/amplificación durante 30 segundos a 60 °C en una máquina PCR Stratagene Mx3000P en tiempo real.

Resultados

Los resultados del qRT-PCR se muestran en la Fig. 1. La secuencia del fragmento amplificado se da en la SEQ ID NO: 1.

La secuencia completa de RVAD VP6 se da en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de polipéptido codificado se da en la SEQ ID NO: 4.

TABLA 1: EPÍTOPES PRONOSTICADOS

SEQ ID No.	Posición de inicio	Posición de fin	Secuencia de aminoácido	Longitud de péptido
5	4	12	LSSIALTVR	9
6	24	33	YSNVSDVIQQ	10
7	37	43	MVRVLNG	7
8	62	78	DLPQLGTTLLNIDANYU	17
9	88	103	LTEFVIAVCETELLVD	16
10	111	119	PQSEALRLL	9
11	121	128	NNKYVFLN	8
12	137	144	EWHYRLSA	8
13	150	162	SNHVPYIFPYDMA	13
14	164	174	AYDRVTAAYDN	11
15	183	195	LNNAIHF AAFDQD	13
16	207	235	FEYLYNLRTPVSNATIVIHPISILSVPSM	29
17	241	247	ATHYWPY	7
18	260	275	RVEFQLAGQVIYVAAN	16
19	281	290	IPQF DAVNII	10
20	292	306	TMRRLPLLADLQNIF	15
21	314	328	THQAVISTKIEVLNA	15
22	333	347	TVPSIDEHLYALIVG	15
23	355	362	QAGPVFPP	8

TABLA 2: SECUENCIAS CEBADORAS

SEQ ID NO:	Delantera	SEQ ID NO:	Inversa
27	TTAGAAACCAAGCTGCCACA	28	TGCAAATCAGCTAGCAATGG
29	TGCCATTGCTAGCTGATTTG	30	ACGCATACCAGGAGGAAAGA
31	AACCAAGCTGCCACACACTA	32	TGCAAATCAGCTAGCAATGG
33	AAACCAAGCTGCCACACACT	34	AAACCAAGCTGCCACACACT
35	ATTTGAGGACGCCAGTGTCT	36	ATTTGAGGACGCCAGTGTCT

REFERENCIAS

1. Pesavento JB, Crawford SE, Este MK, Prasad BV (2006). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309:189-319.
2. Bishop RF (1996) *Arch. Virol. Suppl.* 12:119-28.
3. Songserm T, Pol JM, van Roozelaar D, Kok GL, Wagenaar F, ter Huume AA. (2000) *Avian Dis.* 44(3):556-67.
4. Page RK, Fletcher OJ, Rowland GN, GAudry D, Villegas P. (1982) *Avian Dis.* 26(3):618-24
5. Bellinzoni R, Mattion N, Vallejos L, La Torre JL, Scodeller EA. (1987) *Res VEt Sci.* 43(1):130-1
6. Otto P, Liebler-Tenorio EM, Elschner M, Reetz J, Löhren U, Diller R. (2006) *Avian Dis.* 50(3):411-8.
7. M. S. McNulty, G. M. Allan, D. Todd, J. B. McFerran y R. M. McCracken (1981) *J Gen Virol.* 55:405-413.
8. Boards, G. M. et al., *Journal of Clinical Microbiology*, 19:248-254 (1984).
9. Trojnar E, Otto P, Roth B, Reetz J y Johne R. (2010) *J. Virol* 84(19):10254-10265.
10. Kricka, Nonisotopic DNA Probe Techniques, 1992, Academic Press San Diego, Calif.
11. Patente de Estados Unidos 5.514.758
12. Patente de Estados Unidos 5.565.553
13. Patente de Estados Unidos 5.567.810
14. Patente de Estados Unidos 5.574.142
15. Patente de Estados Unidos 5.585.481
16. Patente de Estados Unidos 5.587.371
17. Patente de Estados Unidos 5.597.696
18. Patente de Estados Unidos 5.958.773
19. Geysen et al. (1984) *PNAS USA* 81:3998-4002.
20. Carter (1994) *Methods Mol Bil* 36:207-23.
21. Jameson, BA et al. 1998 *CABIOS* 4(1):181-186.
22. Raddizzani & Hammer (2000) *Brief Bioinform* 1(2):179-89.
23. De Lalla et al. (1999) *J. Immunol.* 163:1725-29.
24. Brusic et al. (1998) *Bioinformatics* 14(2):121-30
25. Meister et al. (1995) *Vaccine* 13(6):581-91.
26. Roberts et al. (1996) *AIDS Res Hum Retrovirus* 12(7):593-610.
27. Maksyutov & Zagrebelaya (1993) *Comput Appl Biosci* 9(3):291-7.
28. Feller & de la Cruz (1991) *Nature* 349(6311):720-1.
29. Hopp (1993) *Peptide Research* 6:183-190.
30. Welling et al. (1985) *FEBS Lett.* 188-215-218.
31. Davenport et al. (1995) *Immunogenetics* 42:392-297.
32. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. (1990) *Dec* 10;276(1-2):172-4.
33. Bodanszky (1993) *Principles of Peptide Synthesis* (ISBN: 0387564314).
34. Fields et al. (1997) *Meth Enzymol* 289: Solid-Phase Peptide Synthesis. ISBN: 0121821900.
35. Chan & White (2000) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*. ISBN: 0199637245.
36. Kullmann (1987) *Enzymatic Peptide Synthesis*. ISBN: 0849368413.
37. Ibba (1996) *Biotechnol Genet Eng Rev* 13:197-216.
38. Winter et al. (1991) *Nature* 349: 293-299
39. Patente de Estados Unidos 54.816.567
40. Inbar et al. (1972) *Proc Natl. Acad Sci USA* 69:2659-2662
41. Ehrlich et al. (1980) *Biochem* 19:4091-4096
42. Huston et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci UsA* 85:5897-5883
43. Patente de Estados Unidos 4.011.308
44. Patente de Estados Unidos 4.722.890
45. Kohler & Milstein (1975) *Nature* 256:495-497
46. *Basic and Clinical Immunology, Sites and Terr.* Eds. Appleton & Lange, Norwalk, Conn. Páginas 217-262, 1991.
47. EP 0 640 128
48. Patente de Estados Unidos 6.284.254
49. Patente de Estados Unidos 5.922.326
50. Patente de Estados Unidos 5.882.651
51. *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al., eds., 1987) Suplemento 30

52. Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2:482-489.
 53. Needleman & Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453.
 54. Rice et al. (2000) Trends Genet 16:276-277
 55. Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
 56. Methods In Enzimology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.).
 57. Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).
 58. Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989).
 59. Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K. S., ed., CRC Press, 1997)
 60. Short Protocols in Molecular Biology, 4º ed. (Ausubel et al., eds., 1999, John Willey & Sons)
 61. Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
 62. PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag).
 63. Potgieter AC, Steele AD y van Dijk AA (2002) J Gen. Virol. 83, 2215-2223.

15

LISTADO SECUENCIAL

20

- <110> NOVARTIS AG
 <120> ROTAVIRUS AVIAR
 <130> PO54197WO

25

- <150> GB 1003630.9
 <151> 2010-03-04
 <160> 36

30

- <170> SeqWin99, versión 1.02
 <210> 1
 <211> 363
 <212> ADN

35

- <213> Rotavirus aviar D
 <400> 1

40

```

gcgacaactg agacaactgt gccatctatt aatgaacatt tgtatgcttt aattgtagga 60
actagaggta gatatcagat gcaggctgga ccagtccttc ctccctggtat gcgttgggat 120
gatattctga ataggtatac accagcgaga caatctaata tgcaacgggt gatgacaact 180
gcttcatac ttgatctagt ttccatgtag gcgcggaaga tgccactcga gataacatca 240
aggtaaaat acgtggaact aggctgagta tgtggcacag taatgcggag taatatctgc 300
45 atggaagaaa tctgttatca tacgtcagca gctattatct ttgaccggat cccgggaatt 360
cgg 363
    
```

50

- <210> 2
 <211> 1194
 <212> ADN
 <213> Rotavirus aviar D

55

- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 408
 <223> n es cualquier nucleótido

60

- <220>
 <221> misc_feature
 <222> 690
 <223> n es cualquier nucleótido

65

- <400> 2

ES 2 511 141 T3

```

5      atggaggcgc tgtcttcaat tgcgttgact gtcagagaag cacgagaaaa gatcataaat 60
      ggaacaatat attccaacgt gtcggatgta atacaacaat tcaatcaaat ggttagagta 120
      ttgaatggat caacttttac tactggtgga ttggctacta tgccacttag agaatggact 180
      tttgatctgc cgcaattggg tacaacttta ctaaatatag atgctaatta tgtagaatca 240
      atgacaccaa cacttgatat gttgactgag tttgtgattg ctgtatgtga aactgagttg 300
      ctagttgata acaatagaaa tggcgcatac ccacaatctg aagcattgag attactatct 360
      aacaataaat atgttttcc taaataggat ttaggatcta agtacaatnc agaatggcat 420
      tatagattgt cagctaggga tccaatgttt tcaaatcatg taccatata attcccataat 480
      gatatggcta tagcatatga tagagtaacg gctgcttacg ataatgtgtc aggaacacga 540
10     tttgcatcac taaataatgc tatacatttt gctgcatttg atcaagactt tgttcgtgga 600
      cagccagcta atgctgaggca atttgaatac ctttacaatt tgaggacgcc agtgtctaat 660
      gctactatag tcatacatcc aatatacagan attttgcag taccagatg gattagaaac 720
      caagctgcca cacactattg gccatacaac ccatataata taccgacgtt tagagatgac 780
      attagatttg aattccaact tgaggacaa gtaatatatg tagctgcgaa tctgggaatg 840
      catactattc cgcaatttga tgcagtaaat atcatcttga caatgaggag attgccattg 900
15     ctagctgatt tgcaaaaat attcccagct ggaaatccat cagcaacaca tcaagctgta 960

      ctagctgatt tgcaaaaat attcccagct ggaaatccat cagcaacaca tcaagctgta 960
      atttcaacta aaattgaagt gctgaatgcg acaactgaaa caactgtacc atctattgat 1020
20     gaacatttgc atgctttaat tgtaggaact agaggtagat atcagatgca ggctggacca 1080
      gcttttctc ctggatgctg ttgggatgat attctgaata ggtatacacc agcaagacaa 1140
      tctaataatgc aacggttgat gacaactgct tccatacttg atctagtttc catg 1194

```

```

25     <210> 3
      <211> 69
      <212> PRT
      <213> Rotavirus aviar D

```

```

30     <400> 3

      Ala Thr Thr Glu Thr Thr Val Pro Ser Ile Asn Glu His Leu Tyr Ala
      1      5      10      15

      Leu Ile Val Gly Thr Arg Gly Arg Tyr Gln Met Gln Ala Gly Pro Val
35     20      25      30

      Phe Pro Pro Gly Met Arg Trp Asp Asp Ile Leu Asn Arg Tyr Thr Pro
      35      40      45

40     Ala Arg Gln Ser Asn Met Gln Arg Leu Met Thr Thr Ala Ser Ile Leu
      50      55      60

      Asp Leu Val Ser Met
45     65

```

```

50     <210> 4
      <211> 398
      <212> PRT
      <213> Rotavirus aviar D

```

```

55     <220>
      <221> SITE
      <222> 136
      <223> Xaa es cualquier aminoácido

```

```

60     <220>
      <221> SITE
      <222> 230
      <223> Xaa es cualquier aminoácido

```

```

65     <400> 4

```

ES 2 511 141 T3

1 Met Glu Ala Leu Ser Ser Ile Ala Leu Thr Val Arg Glu Ala Arg Glu
 5 Lys Ile Ile Asn Gly Thr Ile Tyr Ser Asn Val Ser Asp Val Ile Gln
 10 Gln Phe Asn Gln Met Val Arg Val Leu Asn Gly Ser Thr Phe Thr Thr
 15 Gly Gly Leu Ala Thr Met Pro Leu Arg Glu Trp Thr Phe Asp Leu Pro
 20 Gln Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Ile Asp Ala Asn Tyr Val Glu Ser
 25 Met Thr Pro Thr Leu Asp Met Leu Thr Glu Phe Val Ile Ala Val Cys
 30
 35 Glu Thr Glu Leu Leu Val Asp Asn Asn Arg Asn Gly Ala Tyr Pro Gln
 40 Ser Glu Ala Leu Arg Leu Leu Ser Asn Asn Lys Tyr Val Phe Leu Asn
 45 Met Asp Leu Gly Ser Lys Tyr Xaa Ser Glu Trp His Tyr Arg Leu Ser
 50 Ala Arg Asp Pro Met Phe Ser Asn His Val Pro Tyr Ile Phe Pro Tyr
 55 Asp Met Ala Ile Ala Tyr Asp Arg Val Thr Ala Ala Tyr Asp Asn Val
 60 Ser Gly Thr Arg Phe Ala Ser Leu Asn Asn Ala Ile His Phe Ala Ala
 65 Phe Asp Gln Asp Phe Val Arg Gly Gln Pro Ala Asn Ala Arg Gln Phe
 70 Glu Tyr Leu Tyr Asn Leu Arg Thr Pro Val Ser Asn Ala Thr Ile Val
 75 Ile His Pro Ile Ser Xaa Ile Leu Ser Val Pro Ser Met Ile Arg Asn
 80 Gln Ala Ala Thr His Tyr Trp Pro Tyr Asn Pro Tyr Asn Ile Pro Thr
 85 Phe Arg Asp Asp Ile Arg Val Glu Phe Gln Leu Ala Gly Gln Val Ile
 90 Tyr Val Ala Ala Asn Leu Gly Met His Thr Ile Pro Gln Phe Asp Ala
 95 Val Asn Ile Ile Leu Thr Met Arg Arg Leu Pro Leu Leu Ala Asp Leu
 100 Gln Asn Ile Phe Pro Ala Gly Asn Pro Ser Ala Thr His Gln Ala Val
 105 Ile Ser Thr Lys Ile Glu Val Leu Asn Ala Thr Thr Glu Thr Thr Val
 110 Pro Ser Ile Asp Glu His Leu Tyr Ala Leu Ile Val Gly Thr Arg Gly
 115 Arg Tyr Gln Met Gln Ala Gly Pro Val Phe Pro Pro Gly Met Arg Trp
 120 Asp Asp Ile Leu Asn Arg Tyr Thr Pro Ala Arg Gln Ser Asn Met Gln
 125 Arg Leu Met Thr Thr Ala Ser Ile Leu Asp Leu Val Ser Met
 130

ES 2 511 141 T3

Pro Gln Ser Glu Ala Leu Arg Leu Leu
1 5

5
<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Rotavirus aviar D

10
<400> 11

Asn Asn Lys Tyr Val Phe Leu Asn
1 5

15

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Rotavirus aviar D

20
<400> 12

25

Glu Trp His Tyr Arg Leu Ser Ala
1 5

30

<210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> Rotavirus aviar D

35
<400> 13

40

Ser Asn His Val Pro Tyr Ile Phe Pro Tyr Asp Met Ala
1 5 10

45

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Rotavirus aviar D

50
<400> 14

Ala Tyr Asp Arg Val Thr Ala Ala Tyr Asp Asn
1 5 10

55

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> Rotavirus aviar D

60
<400> 15

Leu Asn Asn Ala Ile His Phe Ala Ala Phe Asp Gln Asp
1 5 10

65

ES 2 511 141 T3

5 <210> 16
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Rotavirus aviar D
 <400> 16

10 Phe Glu Tyr Leu Tyr Asn Leu Arg Thr Pro Val Ser Asn Ala Thr Ile
 1 5 10 15
 Val Ile His Pro Ile Ser Ile Leu Ser Val Pro Ser Met
 20 25

15 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Rotavirus aviar D
 <400> 17

20 Ala Thr His Tyr Trp Pro Tyr
 1 5

25 <210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Rotavirus aviar D
 <400> 18

35 Arg Val Glu Phe Gln Leu Ala Gly Gln Val Ile Tyr Val Ala Ala Asn
 1 5 10 15

40 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Rotavirus aviar D
 <400> 19

45 Ile Pro Gln Phe Asp Ala Val Asn Ile Ile
 1 5 10

50 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Rotavirus aviar D
 <400> 20

55 Thr Met Arg Arg Leu Pro Leu Leu Ala Asp Leu Gln Asn Ile Phe
 1 5 10 15

60 <210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Rotavirus aviar D
 <400> 21

ES 2 511 141 T3

		Thr	His	Gln	Ala	Val	Ile	Ser	Thr	Lys	Ile	Glu	Val	Leu	Asn	Ala
		1				5					10					15

5

<210> 22
<211> 15
<212> PRT

10 <213> Rotavirus aviar D

<400> 22

		Thr	Val	Pro	Ser	Ile	Asp	Glu	His	Leu	Tyr	Ala	Leu	Ile	Val	Gly
		1				5					10					15

15

20 <210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Rotavirus aviar D

25 <400> 23

		Gln	Ala	Gly	Pro	Val	Phe	Pro	Pro
		1				5			

30

35 <210> 24
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

40 <400> 24
gcracaactg aracaacwg

45 <210> 25
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

50 <400> 25
ggaagcagtt gtcacac

55 <210> 26
<211> 30
<212> ADN
<213> sonda

60 <400> 26
ttgcatatta gattgtctcg ctggtgata

65 <210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador
 5 <400> 27
 ttagaaacca agctgccaca
 <210> 28
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 15 <400> 28
 tgcaaatcag ctgcaatgg
 <210> 29
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 29
 tgccattgct agctgattg
 30 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador
 <400> 30
 acgcatacca ggaggaaaga
 40 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> cebador
 45 <400> 31
 aaccaagctg ccacacacta
 <210> 32
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> cebador
 <400> 32
 55 tgcaaatcag ctgcaatgg
 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 65 <400> 33
 aaaccaagct gccacacact

ES 2 511 141 T3

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> cebador
<400> 34
10 aaacaagct gccacacact
<210> 35
<211> 20
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
20 <400> 35
atttgaggac gccagtgtct
<210> 36
<211> 20
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador
30 <400> 36
atttgaggac gccagtgtct
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que comprende:
- 5 (a) una secuencia de ácido nucleico con al menos 90% de identidad con la secuencia de ácido nucleico como la enumerada en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2;
- (b) una secuencia de ácido nucleico con al menos 90% de identidad con el complemento inverso de la secuencia de ácido nucleico como la enumerada en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2;
- 10 (c) un fragmento de la secuencia de ácido nucleico como la enumerada en las SEQ ID NOS: 1 y/o 2 que consiste en al menos 24 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NOS: 1 y/o 2;
- (d) un fragmento del complemento inverso de las secuencias de ácido nucleico como las enumeradas en SEQ ID NOS: 1 y/o 2 que consisten al menos en 16 nucleótidos consecutivos del complemento inverso SEQ ID NOS: 1 y/o 2; o
- 15 (e) una secuencia de ácido nucleico que se hibridiza bajo condiciones de rigurosidad alta con una secuencia de ácido nucleico como la enumerada en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
2. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende una etiqueta detectable.
3. Un kit que comprende cebadores para amplificar una secuencia plantilla contenida en un ácido nucleico de virus RVAD de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el kit un primer cebador y un segundo cebador, donde el primer cebador comprende una secuencia sustancialmente complementaria a una parte de dicha secuencia plantilla y el segundo cebador comprende una secuencia sustancialmente complementaria a una parte del complemento de dicha secuencia plantilla, donde las secuencias en dichos cebadores que tienen sustancial complementariedad definen las terminales de la secuencia plantilla que se amplificará.
- 20 4. Un kit de acuerdo con la reivindicación 3, que además comprende una secuencia sonda sustancialmente complementaria a una parte de dicha secuencia plantilla o sustancialmente complementaria a una parte del complemento inverso de dicha secuencia plantilla.
- 25 5. Un kit de acuerdo con la reivindicación 3 o reivindicación 4, donde la secuencia plantilla está contenida en una secuencia de ácido nucleico como la enumerada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 30 6. Un método para diagnosticar infección de RVAD o para identificar la presencia o ausencia de un virus RVAD en una muestra biológica, que comprende la etapa de detectar la presencia o ausencia de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.
- 35 7. Un polipéptido que comprende:
- (a) una secuencia de aminoácido con al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácido como la enumerada en la SEQ ID NO: 3;
- 40 (b) una secuencia de aminoácido con al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácido como la enumerada en la SEQ ID NO: 4; o
- (c) un fragmento de la secuencia aminoácido como la enumerada en la SEQ ID NO: 3 que consiste en al menos 9 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 3; o
- 45 (d) un fragmento de la secuencia aminoácido como la enumerada en la SEQ ID NO: 4 que consiste en al menos 15 aminoácidos consecutivos derivados de SEQ ID NO: 4.
8. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.
- 50 9. El anticuerpo de la reivindicación 8, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
10. El anticuerpo de la reivindicación 8, donde el anticuerpo es un anticuerpo aviar.
11. Un inmunoensayo para detectar la presencia o ausencia de un antígeno RVAD en una muestra biológica, que comprende la etapa de poner en contacto la muestra con el anticuerpo de una cualquiera de la reivindicaciones 8 a 10.
- 55 12. El método de la reivindicación 6 o el inmunoensayo de la reivindicación 11, donde la muestra biológica es un huevo.
- 60 13. Una vacuna que comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento de una protección contra RVAD.
- 65

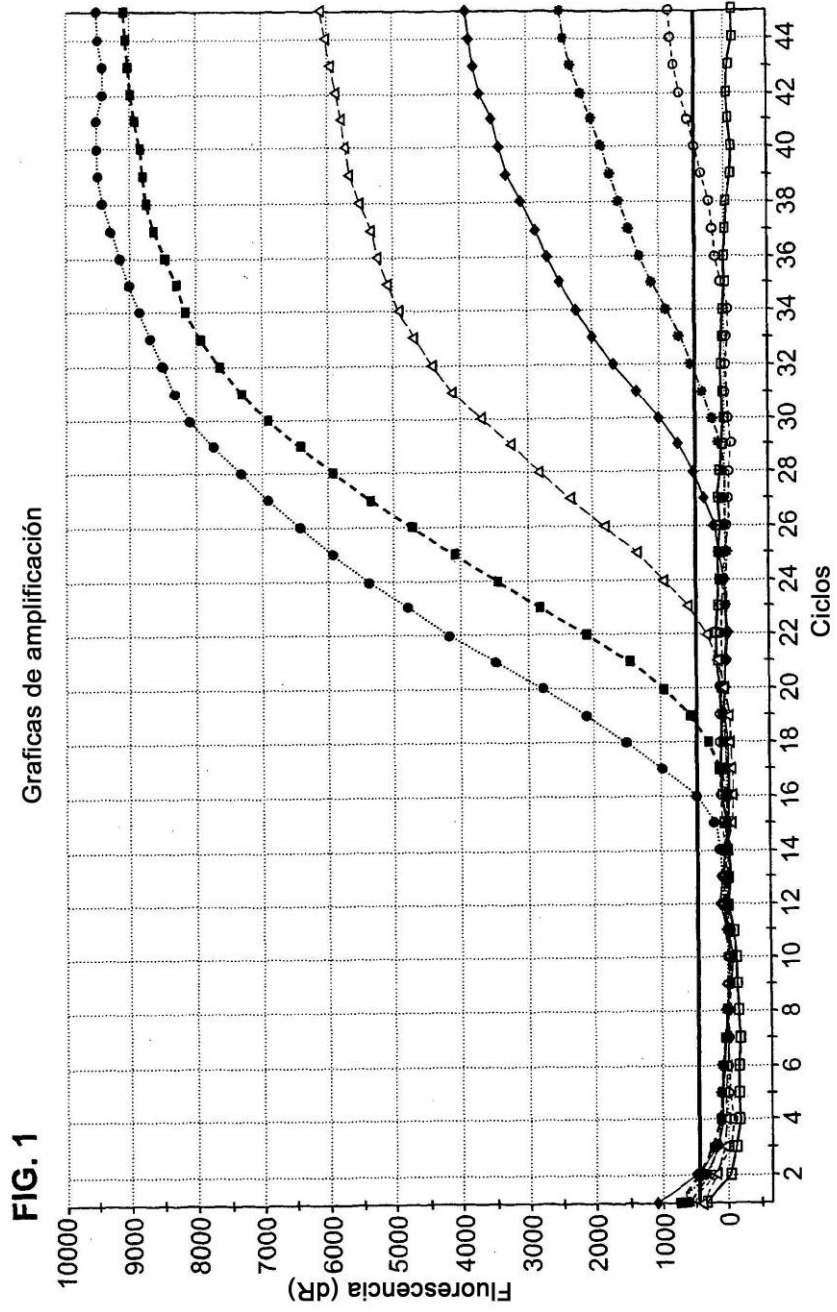


FIG. 2

CLUSTAL 2.0.12 alineación de secuencias multiple

```

seq_id 1 -----
seq_id 2 ATGGAGGCGCTGTCTTCAATTGCGTTGACTGTCAGAGAAGCACGAGAAAAGATCATAAAT 60
seq_id 1 -----
seq_id 2 GGAACAATATATTCCAACGTGTCGGATGTAATACAACAATTCATCAAATGGTTAGAGTA 120
seq_id 1 -----
seq_id 2 TTGAATGGATCAACTTTTACTACTGGTGGATGGCTACTATGCCACTTAGAGAATGGACT 180
seq_id 1 -----
seq_id 2 TTTGATCTGCCCAATTGGGTACAACTTTACTAAATATAGATGCTAATTATGTAGAATCA 240
seq_id 1 -----
seq_id 2 ATGACACCAACACTTGATATGTTGACTGAGTTTGTGATTGCTGTATGTGAAACTGAGTTG 300
seq_id 1 -----
seq_id 2 CTAGTTGATAACAATAGAAATGGTGCATACCCACAATCTGAAGCATGAGATTACTATCT 360
seq_id 1 -----
seq_id 2 AACATAAATATGTTTTCCTTAATATGGATTAGGATCTAAGTACATNTCAGAATGGCAT 420
seq_id 1 -----
seq_id 2 TATAGATGTGCTAGCTAGGGATCCAATGTTTCAAATCATGTACCATATATATCCCATAT 480
seq_id 1 -----
seq_id 2 GATATGGCTATAGCATATGATAGAGTAACGGCTGCTTACGATAATGTGTCAGGAACCGA 540
seq_id 1 -----
seq_id 2 TTTGCATCACTAAATAATGCTATACATTTTGTCTGATTTGATCAAGACTTTGTTCTGTTGA 600
seq_id 1 -----
seq_id 2 CAGCCAGCTAATGCGAGGCAATTTGAATACCTTTACAATTTGAGGACGCCAGTGTCTAAT 660
seq_id 1 -----
seq_id 2 GCTACTATAGTCATACATCCAATATCAGANATTTTGTGCTGCAAGTATGATTAGAAAC 720
seq_id 1 -----
seq_id 2 CAAGCTGCCACACACTATTGGCCATACAACCCATATAATATACCGCGTTTAGAGATGAC 780
seq_id 1 -----
seq_id 2 ATTAGAGTTGAATCCAACCTGCAGGACAAGTAATATATGTAGCTGCGAATCTGGGAATG 840
seq_id 1 -----
seq_id 2 CATACTATTCGCAATTTGATGCAGTAAATATCATCTTGACAATGAGGAGATGCCATFG 900
seq_id 1 -----
seq_id 2 CTAGCTGATTTGCAAAATATATTCAGCTGGAAATCCATCAGCAACACATCAAGCTGTA 960
seq_id 1 -----
seq_id 2 -----GCGACAACCTGAGACAACCTGTGCCATCTATTAAT 33
seq_id 1 ATTTCAACTAAAATGAAAGTGTGAATGCGACAACCTGAAACAACCTGTACCATCTATGAT 1020
seq_id 2 *****
seq_id 1 GAACATTTGTATGCTTTAATTGTAGGAACCTAGAGGTAGATATCAGATGCAGGCTGGACCA 93
seq_id 2 GAACATTTGTATGCTTTAATTGTAGGAACCTAGAGGTAGATATCAGATGCAGGCTGGACCA 1080
seq_id 1 -----
seq_id 2 GTCTTTCCTCCTGGTATGCGTTGGGATGATATCTGAATAGGTATACACCAGCAGACAA 153
seq_id 2 GTCTTTCCTCCTGGTATGCGTTGGGATGATATCTGAATAGGTATACACCAGCAGACAA 1140
seq_id 1 -----
seq_id 2 TCTAATATGCAACGGTTGATGACAACCTGCTTCCATACTTGATCTAGTTTCCATGAGCG 213
seq_id 2 TCTAATATGCAACGGTTGATGACAACCTGCTTCCATACTTGATCTAGTTTCCATG----- 1194
seq_id 1 -----
seq_id 2 CGGAAGATGCCACTCGAGATAACATCAAGGTTAAAATACGTGGAACCTAGGCTGAGTATGT 273
seq_id 1 -----
seq_id 2 GGCACAGTAATGCGGAGTAATATCTGCATGGAAGAAATCTGTTATCATACGTGAGCAGCT 333
seq_id 1 -----
seq_id 2 ATTATCTTTGACCGGATCCCGGAATTCGG 363

```

FIG. 3

CLUSTAL 2.0.12 alineación de secuencias multiples

```

SEQ_ID_3 -----
SEQ_ID_4 MEALSSIALTVREAREKIINGTIYSNVSDVIQQFNQMVRLNGSTFTTGGLATMPLREWT 60

SEQ_ID_3 -----
SEQ_ID_4 FDLPLQLGTTLLNIDANYVESMTPTLDMLTEFVIAVCETELLDNRRNGAYPQSEALRLLS 120

SEQ_ID_3 -----
SEQ_ID_4 NNKYVFLNMDLGSKYXSEWHYRLSARDPMFSNHVPYIFPYDMAIAYDRVTAAYDNVSGTR 180

SEQ_ID_3 -----
SEQ_ID_4 FASLNNAIHFAAFDQDFVRGQPANARQFEYLYNLRTPVSNATIVIHPI SXILSVPSMIRN 240

SEQ_ID_3 -----
SEQ_ID_4 QAATHYWPYNPYNIPTFRDDIRVEFQLAGQVIYVAANLGMHTIPQFDAVNII LTMRRRLPL 300

SEQ_ID_3 -----ATTETTVP SINEHLYALIVGTRGRYMQAGP 31
SEQ_ID_4 LADLQNI FPAGNPSATHQAVISTKIEVLNATTETTVP S IDEHLYALIVGTRGRYMQAGP 360
                *****.*****

SEQ_ID_3 VFPPGMRWDDILNRYTPARQSNMQRLMTTASILDVSM 69
SEQ_ID_4 VFPPGMRWDDILNRYTPARQSNMQRLMTTASILDVSM 398
                *****
    
```