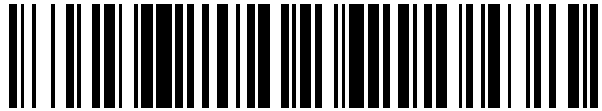


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 586**

51 Int. Cl.:

C07K 14/08 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2008 PCT/EP2008/003778**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2009 WO09135518**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2008 E 08749431 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2288618**

54 Título: **Proteínas de fusión quiméricas y partículas similares a virus de VP2 de Birnavirus**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2018

73 Titular/es:
**CHIMERA PHARMA S.L.U. (100.0%)
Ronda de Poniente 3 2° C-D
28760 Tres Cantos, Madrid, ES**

72 Inventor/es:
**ZÜRCHER, THOMAS;
BERNAL, JUAN JOSÉ;
VON KOBBE, CAYETANO;
JIMÉNEZ TORRES, IGNACIO;
DÍAZ BLÁZQUEZ, ANA;
MARTÍN LORENZO, DIANA;
CALDERITA LUCAS, GLORIA y
GARCÍA DE CASTRO, ARCADIO**

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 659 586 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión quiméricas y partículas similares a virus de VP2 de Birnavirus

5 **Campo técnico**

El campo de la invención se refiere a partículas similares a virus (VLP) quiméricas derivadas de la proteína VP2 quimérica de birnavirus. En particular, la presente divulgación se refiere a proteínas de fusión VP2 quiméricas que incorporan inserciones y/o sustituciones con uno o más péptidos particulares de interés mientras que mantienen la capacidad de ensamblarse en forma de VLP. La invención identifica sitios de inserción y/o sustitución particulares dentro de regiones de bucle P de VP2 y fuera de dichas regiones de bucle P. La invención también incorpora métodos para la identificación de sitios de inserción y sustitución preferidos dentro de VP2 para la incorporación de péptidos particulares de interés. Las VLP quiméricas resultantes son de interés en el diseño de vacunas terapéuticas y profilácticas, además de en el diseño de sistemas de administración de fármacos, vehículos para ADN y ARN en terapia génica, como agentes dirigidos, en el desarrollo de antitoxinas y como reactivos de diagnóstico.

Antecedentes de la invención

Las partículas similares a virus (VLP) son estructuras nanométricas resultantes del ensamblaje de proteínas virales estructurales. Estas partículas se parecen al virus del que derivaron, pero carecen de ácido nucleico viral y son, por tanto, no infecciosas. Las partículas similares a virus (VLP) son formas preferidas en el diseño de vacunas y en otras aplicaciones en salud humana y diagnósticos.

Las vacunas casi siempre incorporan VLP que derivan de los agentes causantes de la enfermedad como se ejemplifica por VLP de la hepatitis B útil en la vacunación contra la hepatitis. Sin embargo, las VLP pueden prepararse para incorporar péptidos no relacionados/heterólogos relevantes para la enfermedad. Estas VLP quiméricas ayudan en la presentación de antígeno y en promover una respuesta inmunitaria en el sujeto receptor. Siendo un ejemplo VLP formadas por el antígeno de núcleo y de superficie de la hepatitis B fusionado con el epítipo de la malaria o VHC, respectivamente [Grgacic E. et al. (2006) *Methods* 40(1):60-65]. El mantenimiento de la estructura de VLP es una característica esencial en el diseño de estos agentes.

Las estructuras nanométricas tridimensionales de VLP no solo proporcionan los medios para incorporar antígenos para su mejorada presentación al sistema inmunitario, sino que también son útiles en el diseño de sistemas de administración de fármacos [Georgens C. et al. (2005) *Current Pharmaceutical Biotech.* 6(1):49-55], como vehículos para ADN en terapia génica [Ou WC. et al. (2001) *J. Med. Virol.*, 64(3):366-373; y Krauzewicz N. et al (2000) *Gene Therapy* 7(13):1094-1102], como agentes dirigidos [Gleiter S. y Lilie H. (2001) *Protein Science* 10(2):434-444], en el desarrollo de antitoxinas [Manayani DJ. et al. (2007) *PLoS Pathogens* 3(10):1422-1431] y como reactivos de diagnóstico [Martinez-Torrecuadrada JL. et al. (2000) *Clinical Diagnostic Lab. Immunol.* 7(4):645-651]. Nuevamente, el mantenimiento de la estructura de VLP es una característica común y esencial en el diseño de estos agentes.

Las VLP comúnmente descritas incluyen aquellas derivadas de hepatitis B, papiloma, polioma y otros virus. Otras VLP descritas incluyen aquellas derivadas del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV).

El IBDV pertenece a la familia *Birnaviridae* y es el agente causante de la enfermedad de Gomaboro en aves de corral. Las partículas de IBDV no mutados son icosaédricas, con simetría T=13 y una única envuelta de proteína formada por 260 trímeros en la proteína VP2 (37 kDa). El lado interno de la envuelta de VP2 parece estar soportado por un armazón formado por 200 trímeros de la proteína VP3 (29 kDa). Se ha sugerido que una tercera proteína, VP4 (28 kDa), también puede desempeñar una función de armazón. En el ensamblaje de virus normal, los componentes de proteína resultan del procesamiento proteolítico de un precursor pVP2-VP4-VP3 de polipéptido más grande (109 kDa). Este precursor experimenta auto-catálisis para liberar un precursor de VP2 de 512 aminoácidos (pVP2), los polipéptidos VP4 y VP3. VP4 pertenece a la familia de proteasas *Lon* y es responsable de la escisión proteolítica, mientras que los polipéptidos pVP2 y VP3 son directamente responsables del ensamblaje de la cápside. Una escisión final de pVP2 en su extremo C terminal da lugar a la forma de 441 aminoácidos madura de VP2 encontrada en el virión [Da Costa B. et al. (2002) *J. Virology* 76(5):2393-2402]. Se ha informado que las proteínas VP2 encontradas en diferentes cepas de IBDV presentan una homología de secuencias de proteína de más del 80%. Las proteínas VP2 de otros *Birnaviridae* comparten homologías con IBDV del 40% para el Birnavirus acuático y del 30% para el Birnavirus de *Drosophila* [Coulibaly F. et al. (2005) *Cell* 25,120(6):761-772].

Se ha encontrado que la expresión en células eucariotas de la poliproteína pVP2-VP4-VP3 de IBDV da lugar a la formación de VLP icosaédricas T=13 que parecen morfológicamente y bioquímicamente indistinguibles de las cápsides de IBDV y que este proceso no requiere la presencia del genoma viral u otras proteínas codificadas por el genoma viral, tales como VP5 y VP1 [Martinez-Torrecuadrada JL. et al. (2001) *J. Virology* 75(22):10815-10828].

La capacidad de proteínas IBDV para generar T=13 proporciona un sistema versátil para la incorporación de péptidos extraños de interés relevantes para la enfermedad humana en forma de una vacuna. Esto se ejemplifica por Delmas B. et al. en el documento WO02088339, en el que proteína verde fluorescente (GFP) se manipula como

una fusión del extremo C terminal a la poliproteína de precursor pVP2-VP4-VP3-GFP para producir VLP T=13 en la que GFP está fusionada a VP3 y supuestamente localizada en las VLP. Similarmente, Rodríguez Aguirre JF. et al. en el documento WO2005071069 describen proteínas de fusión pVP2-VP3-X donde un péptido de interés en la vacunación (X) está fusionado con el extremo C terminal de VP3. Lo más probablemente, las construcciones que incorporan un péptido de interés fusionado con VP3 producen VLP icosaédricas donde el péptido de interés es secuestrado dentro de la partícula T=13.

Aún más, se ha encontrado que la expresión de VP2 en células de insecto, en ausencia de otras proteínas de IBDV, produce la formación de VLP T=1 icosaédricas de tamaño más pequeño [Martínez-Torrecedrera JL. et al. (2003) *Vaccine* 21(17-18):1952-1960]. Se ha informado que la expresión de fragmentos de VP2 de entre 441 y 466 aminoácidos conduce a la formación de VLP icosaédricas, mientras que fragmentos de VP2 más grandes de entre 466 y 501 aminoácidos tienden a formar partículas tubulares [Ruiz Caston J. et al. WO2005105834; y Saugar I. et al. (2005) *Structure* 13(7):1007-1117]. Esto ha sido explotado por Rodríguez Aguirre JF. et al. en el documento WO2007009673, que describe la incorporación de péptidos de interés (X) en VLP T=1 producidas como proteínas de fusión terminales VP2-X. Informes recientes, sin embargo, sugieren que los péptidos fusionados en el extremo C terminal no están expuestos sobre la superficie de VLP [Coulibaly F. et al. (2005) *Cell* 120(6):761-772; Lee CC. et al. 2006 *J. Struct Biol.* 155(1):74-86; y Garriga D. et al. (2006) *J. Virol.* 80(14):6895-6905] y que procedimientos de purificación llevados a cabo en las fusiones del extremo C terminal de VP2 con restos de histidina con una columna de afinidad por ión metálico están lo más probablemente mediados por restos de histidina que existen de forma natural dentro de VP2 [Doong et al., (2007) *Anal. Chem.* 79(20):7654-7656]. Por tanto, fusiones terminales de VP2 producen lo más probablemente la incorporación de péptidos de interés en una forma secuestrada dentro de VLP T=1. Además, se encuentra alta variabilidad de secuencia en los bucles de los dominios P llamados BC (AA 219-224), DE (AA 249-254), FG (AA 283-287) y HI (AA 315-324) que también parecen ser las dianas de los anticuerpos neutralizantes y alojan mutaciones en mutantes de escape que indican que estas regiones son inmunogénicas [Lee CC. et al. (2006) *J. Struct Biology* 155(1):74-86].

Por tanto, hasta la fecha, la incorporación de péptidos de interés en VLP derivadas de IBDV, T=1 y T=13, se ha centrado en fusiones terminales de VP2 y VP3 que lo más probablemente producen el secuestro del péptido de interés dentro de las VLP, como se refiere en Rodríguez-Aguirre JF. et al., documento WO2005071069, y presentación inferior a la óptima a células, receptores de la superficie celular, factores solubles o reactivos de diagnóstico.

La incorporación por medio de inserción o sustitución del péptido de interés dentro de VP2 representa alternativas mejoradas a las fusiones terminales. En particular, pueden resultar mejoras de la exposición superficial de las secuencias insertadas o el secuestro total o parcial dentro de la estructura de VLP de los péptidos insertados. Se reconoce que aunque la exposición superficial puede ser necesaria para direccionar contra otras entidades biológicas tales como receptores de la superficie celular o factores solubles, el secuestro total o parcial puede ser deseable para evitar la degradación o proteólisis biológica o para provocar una respuesta inmunitaria celular. Por tanto, las VLP quiméricas en las que se incorporan péptidos de interés según su actividad biológica prevista podrían representar candidatos a vacuna mejorados, vehículos de ADN o ARN, agentes dirigidos, diagnóstico, obtención de imágenes, o reactivos terapéuticos. Sin embargo, el diseño de VLP basado en inserciones o sustituciones de VP2 de IBDV está restringido por el hecho de que VP2 es una proteína estructural importante de la cápside viral de IBDV, e inserciones o sustituciones con secuencias de péptidos extrañas pueden producir la incapacidad de la proteína quimérica resultante VP2 para auto-ensamblarse en forma de VLP. En realidad, esto se ejemplifica claramente por estudios llevados a cabo en VLP de poliovirus alternativas [Shin YC. y Folk WR. (2003) *J. of Virology* 77(21):11491-11498] donde la inserción de péptidos frecuentemente produce la rotura de VLP.

Por tanto, la presente divulgación se refiere a proteínas de fusión quiméricas de VP2 de Birnavirus, o fragmentos de las mismas, que incorporan una o más inserciones, o sustituciones parciales, con péptidos particulares de interés, y que son capaces de ensamblarse en estructuras de VLP. Aún más, la presente divulgación se refiere a métodos de identificación y selección de sitios de inserción preferidos dentro de VP2 para la incorporación de péptidos de interés sin pérdida de estructura de VLP y con eficiente formación de VLP.

Descripción detallada de la invención

Las partículas similares a virus (VLP) son de interés en el diseño de medicinas, vacunas terapéuticas y profilácticas, además de en el diseño de sistemas de administración de fármacos, vehículos para ácidos nucleicos en terapia génica, como agentes elegidos como diana, agentes de obtención de imágenes, en el desarrollo de antitoxinas y como reactivos de diagnóstico aplicables a la salud humana y veterinaria. La presente divulgación se refiere a VLP quiméricas de proteínas de fusión VP2 quiméricas, que incorporan inserciones y/o sustituciones con uno o más péptidos de interés y métodos para la identificación y selección de dichas VLP quiméricas.

"Péptidos de interés" se define por este documento como secuencias de aminoácidos distintas de las secuencias de IBDV, que incluyen componentes de vacuna, antígenos y epítomos, secuencias de direccionamiento, secuencias de unión, dominios catalíticos, moduladores de farmacología, inmunoestimuladores, toxinas y antitoxinas que son relevantes para la salud humana o veterinaria.

"ADN de interés" se refiere a secuencias de ADN que codifican péptidos de interés.

"VP2" se refiere a secuencias de VP2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) y proteínas, que incluye la proteína precursora VP2 de 512 aminoácidos (pVP2), la proteína VP2 de 441 madura, o un fragmento de al menos 400 aminoácidos de la misma, capaz de formar VLP. VP2 incluye cualquier proteína VP2 encontrada en las diferentes cepas de IBDV, con especial referencia aquellas con una homología de secuencias de proteínas de al menos el 80% entre ellas. Proteína VP2 también se refiere a otras proteínas VP2 de *Birnaviridae* con homologías de secuencia de proteínas superiores al 30%, preferiblemente superiores al 40%, y más preferiblemente superiores al 60% con aquellas de IBDV.

"Regiones de bucle P" se refieren a los cuatro bucles del dominio P de VP2 de IBDV llamados BC (Q₂₁₉-G₂₂₄), DE (R₂₄₉-G₂₅₄), FG (T₂₈₃-D₂₈₇) y HI (S₃₁₅-Q₃₂₄). Entre paréntesis el primer y último aminoácidos y la posición correspondiente dentro de la secuencia de VP2. Todas las otras localizaciones dentro de VP2 excluyendo el aminoácido del extremo C y N terminal se denominan "fuera de las regiones de bucle P".

"Proteínas de fusión VP2 quiméricas" se refiere a proteínas VP2 quiméricas que incorporan una o más inserciones y/o sustituciones, en localizaciones distintas del extremo C y N terminal, con uno o más péptidos de interés distintos de secuencias de IBDV.

"Vectores de ADN" se refiere a secuencias de ADN que facilitan la clonación y expresión de VP2 que incorporan ADN de interés en los sitios de inserción o sustitución deseados. Las construcciones de ADN también incorporan "vectores de expresión de ADN" que cuando se expresan en un hospedador apropiado tal como bacterias, levadura, células de insecto, plantas, o células de mamífero, producen VP2, proteínas de fusión VP2 que incorporan péptidos de interés, y otras proteínas de IBDV. En la descripción de dichos vectores de ADN, la inserción o sustitución se define entre paréntesis () con flechas ↑ que representan el punto de incorporación del péptido particular de interés X y posiciones flanqueantes de aminoácidos dentro de la secuencia de VP2 [por ejemplo: pESC-URANP2(Q₂₁₉ ↑X↑Y₂₂₀)]. Las deleciones se representan con un triángulo, seguido de elementos flanqueantes de la secuencia de péptidos de VP2 delecionada [por ejemplo: pESC-URA/VP2/Δ Y₂₂₀ - G₂₂₃]. En la definición de múltiples sustituciones de lisina (K), cada una de las posiciones de aminoácidos sustituidas va seguida de una K y separada por un guión - [por ejemplo: pESC-URA/VP2(Q₂₂₁K - H₂₅₃K-G₂₈₅K)].

"VLP de VP2 quimérica" se refieren a VLP T=1 y T=13 y otras nanoestructuras resultantes del ensamblaje de proteínas de fusión VP2 quiméricas y que opcionalmente incorporan proteínas VP3 de IBDV o proteínas de fusión de las mismas.

"Anticuerpos VP2-VLP" se refiere a anticuerpos anti-VP2 que son específicos para VP2 y proteínas de fusión VP2 ensambladas como VLP.

La "formación de VLP" se determina con la expresión de construcciones de ADN que codifican proteínas de fusión VP2 en el sistema de expresión apropiado y cuantificación por medio de un inmunoensayo asociado a enzima de VP2-VLP "ELISA de VLP" que hace uso de anticuerpos anti-VP2 capaces de reconocer VP2 solo cuando se ensamblan como VLP. La "eficiencia de formación de VLP" se calcula como un porcentaje de formación de VLP en comparación con la de VP2 nativa de 452 aminoácidos. Generalmente, valores de ELISA de VLP inferiores al 20% se consideran ruido de fondo (BG), y se considera que proteínas de fusión VP2 quiméricas asociadas no están produciendo formación de VLP eficiente. Aunque se considera que valores de eficiencia de la formación de VLP del 20% o superiores son compatibles con la formación de VLP, que es suficiente para la eficiente formación de VLP, y sitios de inserción de proteínas de fusión VP2 quiméricas asociadas pueden considerarse como sitios de inserción preferidos, las eficiencias de formación de VLP por encima del 50% y preferiblemente por encima del 70% son reconocidas como una característica deseable.

"Sitios de inserción y/o sustitución preferidos" se refiere a localizaciones dentro de VP2 en las que la incorporación de péptidos de interés produce eficiencias de formación de VLP más altas.

La proteína VP2 de IBDV está plegada naturalmente en un dominio de base (B) helicoidal, un dominio de envuelta (S) y un dominio de proyección (P) y puede prepararse para ensamblarse espontáneamente en subunidades de trímero para formar VLP icosaédricas T=1, o T=13 en presencia de VP3. En la presente invención se ha observado que la inserción de un péptido de interés dentro de VP2 de IBDV frecuentemente produce la desestabilización de la estructura de VLP. Además, se ha observado que para muchos posibles sitios de inserción o de sustitución, la eficiencia de formación de VLP de las proteínas de fusión VP2 quiméricas resultantes depende de la secuencia del péptido particular de interés insertada. La presente divulgación se refiere a la identificación de sitios preferidos dentro de VP2 que son apropiados para la inserción o sustitución con péptidos de interés, mientras que mantienen la estructura de VLP, métodos para la identificación de dichos sitios de inserción o sustitución preferidos, y las VLP de VP2 quiméricas resultantes.

Además, la presente divulgación se refiere a VLP de VP2 quiméricas que incorporan una o más inserciones o sustituciones con péptidos de interés dentro de los cuatro bucles P de VP2, BC, DE, FG y HI, y/o localizaciones

fuera de dichos bucles P.

La mayoría de las realizaciones particulares de la presente invención han sido ejemplificadas (Ejemplos 1 a 15) con cinco péptidos de ejemplo diferentes seleccionados con el fin de la presente invención, concretamente TS (SEQ. ID. NO: 1), Flag (SEQ ID NO 2), cMyc (SEQ SEQ ID NO 3), V5 (SEQ ID NO 4) y VSV-G (SEQ ID NO 5).

Proteínas de fusión VP2 quiméricas que incorporan inserciones y/o sustituciones dentro de regiones de bucle P.

10 Los bucles BC, DE, FG y HI del dominio P de VP2 de IBDV representan posibles sitios de inserción para proteínas de fusión que incorporan péptidos de interés. Esto es explotado en la presente invención mediante la incorporación de cinco péptidos de interés de ejemplo diferentes, concretamente TS (SEQ. ID. NO: 1), Flag (SEQ. ID. NO: 2), cMyc (SEQ. ID. NO: 3), V5 (SEQ. ID. NO: 4) y VSV-G (SEQ. ID. NO: 5), en todos los posibles puntos de inserción dentro de los bucles P de VP2 como se muestra en el Ejemplo 1.

15 La incorporación de la secuencia de treonina-serina (SEQ. ID. NO: 1) que codifica un sitio de restricción *Spel* en todos los posibles sitios de inserción dentro de las regiones de bucle P de BC, DE, FG y HI, y posiciones estrechamente adyacentes, produjeron la identificación de puntos de inserción preferidos. Muchos puntos de inserción dentro de las regiones de bucle P parecieron ser compatibles con la formación de VLP. Como se
20 representa en la Figura 2, la incorporación del sitio de restricción *Spel* dentro de la secuencia de TS facilita la posterior incorporación de secuencias de ADN que codifican los otros péptidos de interés de ejemplo, concretamente Flag (SEQ. ID. NO: 2), cMyc (SEQ. ID. NO: 3), V5 (SEQ. ID. NO: 4) y VSV-G (SEQ. ID. NO: 5). La inserción de estos diferentes péptidos de interés modelo, en cada una de las posibles posiciones de región de bucle P de VP2, identificó sitios de inserción adecuados y demostró que sitios preferidos dentro de los bucles P de BC, DE, FG y HI
25 variaron según el ADN de interés insertado. Generalmente, la incorporación de péptidos de interés en regiones de VP2 adyacentes a los bucles P de BC, DE, FG y HI no produce la significativa eficiencia de formación de VLP y así no parece que sea compatible con la formación de VLP.

30 Además, como se demuestra en el Ejemplo 2, VP2 de diferentes longitudes, ejemplificada por VP2 de IBDV de diferentes longitudes en su extremo C terminal, concretamente VP2 con 452, 441 y 456 aminoácidos (VP2 452, VP2 441 y VP2 456), también permite la inserción de péptidos de interés de ejemplo, concretamente Flag (SEQ. ID. NO: 2) y cMyc (SEQ. ID. NO: 3), en regiones de bucle P con poca variación de la eficiencia de formación de VLP. Generalmente, la inserción en VP2 456 produjo una reducción de la eficiencia de formación de VLP en comparación con VP2 452 o VP2 441 con la misma inserción. VP2 452 y VP2 441 representan ambas longitudes preferidas para
35 la formación de VLP que incorporan péptidos de interés. Se prevé que las proteínas VP2 de al menos 400 aminoácidos, distintos de 452, 441 y 456, también puedan ser capaces de formar eficazmente VLP y VLP de VP2 quiméricas.

40 Por tanto, la presente divulgación incorpora proteínas de fusión VP2 quiméricas y VLP de VP2 quiméricas resultantes donde los péptidos de interés se insertan en las regiones de bucle P de BC (Q₂₁₉-G₂₂₄), DE (R₂₄₉-G₂₅₄), FG (T₂₈₃-D₂₈₇) y HI (S₃₁₅-Q₃₂₄) de la proteína VP2 y fragmentos de la misma. La presente divulgación también incorpora vectores de ADN y construcciones que permiten clonar ADN de interés en cada uno de los sitios disponibles dentro de las regiones de bucle P de VP2 y vectores de expresión de ADN para la expresión de las proteínas de fusión de la región de bucle P VP2 quiméricas resultantes.

45 Las regiones de bucle P de VP2 de IBDV no solo representan posibles sitios de inserción para péptidos de interés, sino que también representan posibles sitios para la sustitución de aminoácidos de VP2 por péptidos de interés. Localizaciones y/o elementos estructurales de VP2 que se ha mostrado que son compatibles con una inserción también pueden considerarse como posibles sitios para sustituciones con péptidos de interés. La sustitución de uno o más restos de aminoácidos adyacentes, o próximos, al sitio de inserción puede ser explorada o alternativamente
50 elementos estructurales completos, tales como un bucle de conexión, o partes de él, pueden estar sustituidos. Sustituciones de regiones de bucle P de VP2 se ejemplifican en el Ejemplo 3, donde aminoácidos dentro de las regiones de bucle P de VP2 de BC, DE, FG y HI están sustituidos por péptidos de interés de ejemplo, concretamente Flag (SEQ. ID. NO: 2) y cMyc (SEQ. ID. NO: 3), y construcciones resultantes evaluadas para su capacidad para formar VLP de VP2. Pareció que la eliminación de las regiones de bucle P, mientras que se mantiene el primer y último resto de las regiones de bucle P, era compatible con la formación de VLP. Además, aunque con una menor eficiencia, pero todavía igual o superior al 20%, para dos de los vectores de expresión y ADN de interés insertado, la sustitución de una región de bucle P completa también produjo la formación de VLP dependiendo del sitio de sustitución. Por tanto, la incorporación de péptidos de interés dentro de VP2 puede referirse a la sustitución de las
55 regiones de bucle P completas, o preferiblemente solo partes de ellas. Además, los péptidos de interés introducidos como sustituciones en las regiones de bucle P de VP2 de BC, DE, FG y HI pueden ser de la misma longitud o diferente que las regiones de bucle P por las que han sido sustituidas.

60 La presente divulgación, por tanto, incorpora proteínas de fusión VP2 quiméricas y VLP de VP2 quiméricas resultantes de la sustitución de regiones de bucle P de VP2, o fragmentos de las mismas, por péptidos particulares de interés en una o más localizaciones dentro de las regiones de bucle P. La presente divulgación también incorpora

los vectores de ADN y construcciones que permiten clonar ADN de interés en cada una de las posiciones de sustitución disponibles dentro de las regiones de bucle P de VP2, y vectores de expresión de ADN para la expresión de las proteínas de fusión de bucle P VP2 quiméricas resultantes.

- 5 Un ejemplo de referencia de VLP resultante de proteínas de fusión VP2 es el Ejemplo 4 que describe la sustitución con restos de lisina (K) en diferentes puntos dentro de regiones de bucle P de VP2 de BC, DE, FG y HI y la conjugación química del péptido de ejemplo cMyc (SEQ. ID. NO: 3). La incorporación de restos K en regiones de bucle P de VP2 permite la conjugación química de las VLP resultantes con múltiples copias de entidades biológicas y químicas que contienen, o preparadas para contener, restos de cisteína en los puntos de conjugación deseados.
- 10 La incorporación de restos K puede implicar la inserción o sustitución de restos de aminoácidos de VP2 por K, poli K, o péptidos ricos en K, en las regiones de bucle P de VP2 o fuera de dichos bucles P. Además, los puntos de conjugación deseados dentro de VP2 pueden estar sustituidos, o preparados para contener, secuencias de aminoácidos, distintos de restos K, que facilitan la conjugación química con entidades biológicas y químicas por otros medios de conjugación o acoplamiento tales como, pero no se limitan a, cisteínas, tirosina, histidina, ácido glutámico o ácido aspártico. Sitios de sustitución y/o de inserción preferidos para restos K u otros restos que permiten la conjugación incluyen aquellos que se encuentra que favorecen la mayor eficiencia de formación de VLP.

- La presente divulgación, por tanto, incorpora VLP de VP2 quiméricas resultantes de la inserción o sustitución de restos de aminoácidos de VP2 por restos que facilitan la conjugación química de entidades biológicas y químicas que pueden contribuir a las propiedades biológicas o farmacológicas deseadas de las VLP quiméricas. La presente divulgación también incorpora vectores de ADN y vectores de expresión de ADN para la expresión de VLP de VP2 quiméricas que incorporan restos de aminoácidos que facilitan la conjugación química.
- 20

Proteínas de fusión VP2 quiméricas que incorporan inserciones y/o sustituciones de regiones de bucle P exteriores.

25

- La posible inserción de péptidos extraños en los dominios de VP2 B, S o P fuera de las regiones de bucle P de BC (AA 219-224), DE (AA 249-254), FG (AA 283-287) y HI (AA 315-324), lo más probablemente produce la rotura de la estructura de VLP, pero puede también representar un medio para modular la exposición superficial de los péptidos insertados de interés o su actividad biológica. En la presente divulgación, regiones fuera de las regiones de bucle P de VP2 que permiten la incorporación de péptidos particulares de interés por inserción o sustitución sin pérdida de la estructura de VLP se identifican por medio de mutagénesis por inserción de transposón usando transposones Tn5 y Mu.
- 30

- Como se muestra en el Ejemplo 5, un cribado al azar con Tn5 generó una biblioteca de clones de ADN con inserciones de Tn5 junto con la secuencia de aminoácidos de VP2 452 completa. La evaluación de la capacidad de estas construcciones para producir VLP produjo la identificación de varios sitios de inserción que producen proteínas de fusión de inserción VP2 que retienen la estructura de VLP. Similarmente, como se muestra en el Ejemplo 6, un cribado al azar con transposón Mu generó una biblioteca de clones de ADN con inserciones junto con la secuencia de aminoácidos de VP2 452 completa. La evaluación de la capacidad de estas construcciones para producir VLP viables conduce a la identificación de varios posibles sitios de inserción que producen proteínas de fusión de inserción VP2 que retienen la estructura de VLP.
- 35
- 40

- Como se ejemplifica en los Ejemplos 5 y 6, las localizaciones de inserción identificadas con mutagénesis por transposones Tn5 y Mu varían dependiendo de las secuencias de transposón usadas. También pueden usarse otros transposones o medios para mutagénesis por inserción al azar para la identificación de sitios adicionales dentro de VP2 con posibilidades de inserción y/o sustitución con péptidos de interés. La mutagénesis por inserción de transposón permite la identificación de localizaciones dentro de las VP2, o proteínas de fusión VP2 quiméricas, que pueden acomodar inserciones y o sustituciones mientras que mantienen la capacidad de formación de VLP. Se prevé que por la exhaustiva evaluación de bibliotecas de inserción al azar, y por medio de uso de diferentes transposones, puedan identificarse todos los posibles sitios de inserción de VP2 compatibles con la formación de VLP. Como se describe previamente, aquellos sitios de inserción de VP2 identificados también pueden ser considerados como posibles sitios para sustituciones con péptidos de interés. Los sitios de inserción de transposones identificados representan posibles sitios de inserción para ADN de interés. Como se muestra en el Ejemplo 7, la inserción de dicho ADN de interés puede llevarse a cabo en las secuencias de transposón insertadas, o mediante la sustitución de las secuencias de transposón insertadas. En dicho Ejemplo 7, la presencia de un sitio de enzima de restricción tal como *NotI* dentro de los transposones Tn5 y Mu insertados facilita la inserción del ADN de interés de ejemplo, concretamente Flag (SEQ. ID. NO: 2) y cMyc (SEQ. ID. NO: 3), en las secuencias de transposón insertadas. Sin embargo, esto produce inserciones que pueden contener secuencias no deseables derivadas del transposón originalmente insertado. Alternativamente, la identificación del sitio de inserción de transposón permite la introducción de un sitio de clonación único, tal como *SpeI*, en la localización identificada en VP2. Como se muestra en el Ejemplo 7, el sitio de clonación único permite la inserción de ADN de interés y generalmente produce elevadas eficiencias de formación de VLP en comparación con proteínas de fusión VP2 quiméricas que conservan las secuencias derivadas de transposón. Por tanto, en una realización preferida de la presente divulgación, un sitio de clonación único se manipula en las localizaciones dentro de VP2, o proteínas de fusión VP2 quiméricas, originalmente identificadas por mutagénesis por transposón u otros medios de inserción de
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ADN de interés al azar. Los vectores de inserción de VP2 resultantes pueden entonces usarse para la incorporación de ADN de interés en el punto de inserción deseado para su expresión en sistemas de expresión apropiados y evaluación de la capacidad de formación de VLP. Si se desea, proteínas de fusión VP2 quiméricas que muestran las mejores eficiencias de formación o propiedades deseadas pueden ser adicionalmente optimizadas mediante la

5 eliminación de las secuencias de TS resultantes del sitio de clonación único manipulado por técnicas de ingeniería genética estándar. Se sabe que la incorporación del ADN de interés también puede producir la sustitución total o parcial de aminoácidos de VP2 estrechamente adyacentes al sitio de localización identificado.

10 Por tanto, la presente divulgación incorpora VLP de VP2 quiméricas resultantes del ensamblaje de proteínas de fusión VP2 quiméricas que incorporan inserciones y/o sustituciones con péptidos de interés en localizaciones fuera de las regiones de bucle P de VP2. Además, la presente divulgación también incorpora vectores de ADN de VP2 y vectores de expresión de ADN que incorporan una o más inserciones y/o sustituciones con ADN de interés en localizaciones fuera de las regiones de bucle P.

15 **Proteínas de fusión VP2 quiméricas que incorporan múltiples inserciones y/o sustituciones.**

La identificación de sitios de inserción y/o sustitución preferidos proporciona los medios para la inserción o sustitución con péptidos de interés en más de un sitio dentro de VP2. Esto se ejemplifica en el Ejemplo 4, donde restos de lisina (K) han sido insertados en 1, 2, 3 o 4 localizaciones simultáneamente mientras que se mantiene la

20 estructura de VLP global. La sustitución con múltiples restos de lisina facilita la conjugación con múltiples copias de una entidad biológica o química, tal como ácidos nucleicos, péptidos, hidratos de carbono y moléculas pequeñas, que pueden ser una característica deseable para la purificación, direccionamiento, carga de fármaco o en alterar la química de superficie de VLP para farmacología mejorada. Otro ejemplo de VLP de VP2 quiméricas resultante de la incorporación de péptidos de interés en más de un punto dentro de VP2 se proporciona por el Ejemplo 8, en el que péptidos de interés de ejemplo, cMyc (SEQ. ID. NO: 3) y Flag (SEQ. ID. NO: 2), se insertan en y/o sustituyen más de

25 una localización dentro de VP2. La introducción de péptidos de interés puede llevarse a cabo por la introducción de sitios de clonación en los puntos de inserción y/o sustitución deseados, clonando los fragmentos que contienen la inserción, o siguiendo otros procedimientos de biología molecular estándar. Por tanto, la presente divulgación incorpora proteínas de fusión VP2 quiméricas, y VLP de VP2 quiméricas resultantes, que incorporan más de una

30 inserción y/o sustitución y vectores de expresión de ADN para la expresión de dichas proteínas de fusión VP2 quiméricas.

Proteínas de fusión VP2 quiméricas que incorporan inserciones y/o sustituciones y fusiones terminales.

35 Además, otro objeto de la presente divulgación incorpora VLP en las que las proteínas de fusión de inserción o sustitución VP2 quiméricas están además también fusionadas, en cualquiera de sus extremos carboxi (C) o amino (N) terminal, con un péptido de interés que puede ser igual o diferente a los péptidos insertados de interés. Proteínas de fusión de inserción o sustitución VP2 quiméricas con fusiones terminales adicionales se ejemplifican en el

40 Ejemplo 9, donde péptidos de interés de ejemplo, Flag (SEQ. ID. NO: 2) y cMyc (SEQ. ID. NO: 3), se insertan en diversos puntos dentro de regiones de bucle P de VP2 y además también se fusionan en el extremo C o N terminal de VP2. Se encontró que la eficiencia de formación de VLP dependía de tanto la localización de la inserción primaria como del péptido insertado. Además, la incorporación de la fusión terminal adicional generalmente produce eficiencias de formación de VLP reducidas, pero todavía iguales o superiores al 20%, en comparación con proteínas de fusión VP2 quiméricas de una única inserción. Como se muestra en el Ejemplo 9, para los péptidos de interés

45 particulares evaluados, algunas construcciones que incorporan tanto la inserción como la fusión terminal, parecieron ser compatibles con la formación de VLP.

La presente divulgación, por tanto, incorpora VLP de VP2 quiméricas resultantes de fusiones de inserción o sustitución de VP2 con péptidos de interés y adicionalmente la fusión terminal de la inserción o sustitución resultante

50 con los mismos péptidos de interés o diferentes. La identificación de las construcciones de ADN preferidas que incorporan inserciones y fusiones terminales puede llevarse a cabo siguiendo la identificación inicial de los puntos de inserción preferidos, seguido de una fusión del extremo C o N terminal, o alternativamente la proteína VP2 quimérica terminalmente fusionada puede cribarse o evaluarse para puntos de inserción o sustitución preferidos. Este cribado puede llevarse a cabo contra sitios preseleccionados dentro de VP2, o al azar tras la mutagénesis por transposón u

55 otros enfoques de clonación al azar.

La presente divulgación también incorpora los vectores y construcciones de ADN que permiten clonar ADN de interés en cada una de las posiciones de inserción o sustitución disponibles dentro de una proteína VP2 que también

60 está terminalmente fusionada, en cualquiera de sus extremos carboxi (C) o amino (N) terminal, con un péptido de interés que puede ser el mismo, o diferente, a los péptidos de interés insertados o fusionados.

VLP quiméricas que contiene proteínas de fusión VP2 quiméricas y otras proteínas derivadas de Birnavirus.

Además, como se ejemplifica en los Ejemplos 10 a 12, la proteína VP2 de fusión que incorpora la inserción o

65 sustitución de uno o más péptidos particulares de interés también puede expresarse simultáneamente con otros IBDV o proteínas de Birnaviridae para favorecer la formación de VLP T=13. La formación de VLP T=13, en

comparación con VLP T=1, aumenta el número de copias de proteínas VP2 por VLP y puede producir estabilidad de VLP mejorada y/o puede ser una forma preferida para presentación o incorporación de péptidos de interés. Pueden generarse VLP T=13 recombinantes ya sea por la expresión de las poliproteínas pVP2-VP4-VP3, o por la co-expresión del gen de pVP2 y VP3.

5 La expresión de la poliproteína pVP2-VP4-VP3 produce la generación de las proteínas individuales pVP2, VP4 y VP3 mediante la actividad proteolítica de VP4. La expresión de IBDV no mutado o poliproteínas de *Birnaviridae* normalmente da lugar a estructuras tubulares que contienen pVP2. Sin embargo, la fusión de una secuencia exógena en el extremo C terminal de VP3, tal como GFP, o la delección de restos de VP3 del extremo C terminal promueve fuertemente el procesamiento de pVP2 y el auto-ensamblaje de VLP T=13. Como se ejemplifica en el Ejemplo 10, VLP T=13 que incorporan una proteína de fusión de inserción de VP2 quiméricas pVP2(X)-VP4-VP3-Y que contiene el péptido de interés de ejemplo (X o Y), cMyc (SEQ. ID. NO: 3) o Flag (SEQ. ID. NO: 2), y también VP3-Flag o VP3-cMyc, puede ser eficientemente formadas por la expresión en sistemas de expresión de baculovirus. Además, el componente de VP3 de la poliproteína también puede prepararse para contener péptidos de interés como se ejemplifica por la fusión terminal de los péptidos de interés de ejemplo, cMyc (SEQ. ID. NO: 3) y Flag (SEQ. ID. NO: 2).

Alternativamente, la co-expresión de pVP2 y VP3 de construcciones de genes independientes también proporciona los medios para la formación de VLP T=13. Además, las expresiones de pVP2 y VP3 fusionadas en su extremo N terminal a varios restos de histidina producen VLP T=13 que, a diferencia de los sistemas de expresión de poliproteína, pueden prepararse para contener pVP2 no procesada. Como se muestra en el Ejemplo 11, la co-expresión en levadura de proteínas de fusión VP2 quiméricas que incorporan Flag (SEQ. ID. NO: 2) y cMyc (SEQ. ID. NO: 3) como inserciones de ejemplo en regiones de bucle P, y His-VP3 que incorporan Flag y cMyc como una fusión terminal de ejemplo, produce la eficiente formación de VLP T=13. Además, la incorporación de múltiples restos de lisina (K) dentro de las regiones de bucle P de VP2 también produce la aceptable formación de VLP T=13. La incorporación de dichos restos K pretende la conjugación química con VLP T=13 de múltiples copias de entidades biológicas y químicas de un modo similar al descrito en el presente documento para VLP T=1. Similarmente, como se muestra en el Ejemplo 12, VLP T=13 que incorporan una proteína de fusión VP2 quimérica que contiene como inserción un péptido de interés de ejemplo cMyc (SEQ. ID. NO: 3) o Flag (SEQ. ID. NO: 2), y His-VP3 que está fusionada en el extremo C terminal con el mismo péptido de interés o diferente, también pueden ser eficientemente formadas por la expresión en sistemas de expresión de baculovirus.

Por tanto, otro objeto de la presente divulgación se refiere a VLP T=13 que resultan del ensamblaje de proteínas de fusión VP2 quiméricas, resultantes de la inserción o sustitución con uno o más péptidos de interés particulares dentro de VP2, y proteínas VP3 que pueden, o no pueden, incorporar los mismos péptidos de interés u otros. La presente invención también incorpora vectores de expresión y construcciones de ADN que incorporan poliproteína pVP2(X)-VP4-VP3-Y, donde X e Y representan un ADN de interés particular, o alternativamente vectores de expresión de ADN que permiten la expresión simultánea de proteínas de fusión VP2 quiméricas que incorporan péptidos de interés y proteínas VP3 o proteínas de fusión de las mismas.

40 **Cribado de vectores de ADN de VP2 preseleccionados para sitios de inserción y/o sustitución preferidos para péptidos de interés particulares.**

45 Sitios de inserción o sustitución preferidos dentro de VP2, juzgados por la capacidad para formar VLP eficientemente, pueden variar para diferentes péptidos de interés. Por tanto, otro objeto de la presente divulgación demostrado en los Ejemplos 13 y 14 incorpora métodos de cribado para identificar sitios de inserción preferidos para péptidos de interés dados usando un panel preseleccionado de vectores de ADN de inserción y/o sustitución de VP2. Los métodos de cribado pueden ser generalmente realizados del siguiente modo:

50 1. Selección de vectores de VP2: Por la cual se prepara un panel de selección de vectores de inserción y/o sustitución de ADN de VP2 para incorporar en un sitio de clonación, preferiblemente un sitio de clonación múltiple, que favorece la clonación direccional del ADN de interés.

55 2. Clonación de ADN de interés: Por la cual el ADN de interés se clona siguiendo procedimientos de biología molecular estándar en el panel previamente seleccionado de vectores de inserción y/o sustitución de VP2. Pueden disponerse vectores de ADN como un array de vectores preseleccionados, un vector por pocillo como se muestra en el Ejemplo 13, o en un formato de grupo, que contiene más de un vector preseleccionado por reacción de clonación como se muestra en el Ejemplo 14. El último produciendo bibliotecas de inserción y/o sustitución de VP2.

60 3. Transformación y expresión: Las ligaciones resultantes o bibliotecas de inserción y/o sustitución de VP2 obtenidas en la etapa previa se transforman en sistemas de expresión adecuados, bacterianos, de levadura, u otros adecuados, para la evaluación de la eficiencia de formación de VLP de los clones individuales. Esto puede llevarse a cabo en pocillos individuales para formatos de array, o puede llevarse a cabo como un grupo, seguido de siembra y selección de colonias.

4. Evaluación de la capacidad de formación de VLP: Para clones individuales resultantes del cribado en array, se lisan y analizan células hospedadoras para la expresión de VLP en cada uno de los pocillos individuales o aplicaciones por medio de un ELISA de VLP. Para transformaciones reunidas, las colonias sembradas resultantes pueden evaluarse para la eficiencia de producción de VLP por medio de un ensayo de inmunotransferencia de colonias usando anticuerpos específicos para VLP de VP2 contra filtros réplica hechos para contener muestras para cada una de las colonias. Las proteínas de fusión VP2 quiméricas con las eficiencias de formación de VLP más altas están seleccionadas para la confirmación e identificación del sitio de inserción preferido. Mientras que las eficiencias de formación de VLP por encima del 20% son reconocidas como compatibles con la formación de VLP, la eficiencia de formación de VLP por encima del 50%, y más preferiblemente por encima del 70%, son reconocidas como una característica deseable para proteínas de fusión VP2 quiméricas resultantes.

5. Confirmación o identificación del sitio de inserción: Las técnicas de secuenciación de ADN proporcionan los medios para la confirmación o, para transformaciones reunidas, la identificación del sitio de inserción del ADN de interés. Además, la formación de VLP puede confirmarse por microscopía electrónica (ME).

Estos métodos de cribado contra vectores de ADN de VP2 preseleccionados permiten la rápida selección de los mejores sitios preseleccionados dentro de VP2 para la incorporación, ya sea como inserciones o sustituciones, de un péptido de interés particular que produce la producción de VLP. Estos métodos de cribado pueden llevarse a cabo ya sea en un formato de array o en un formato de grupo para generar bibliotecas que pueden entonces cribarse para colonias que están expresando proteínas de fusión VP2 quiméricas que producen la eficiente formación de VLP.

La presente divulgación, por tanto, incorpora métodos de cribado que implican disposiciones de array de vectores de ADN de VP2 para la inserción en puntos preseleccionados de un ADN de interés particular, y las proteínas de fusión VP2 resultantes de la expresión de los vectores de expresión de ADN de fusión de VP2 quiméricas resultantes. Además, la presente divulgación también incorpora métodos de cribado que implican el uso de grupos de vectores de ADN de VP2 para la inserción de ADN de interés en puntos preseleccionados, y la posterior selección de vectores de expresión de proteína de fusión VP2 quimérica que producen la eficiente formación de VLP. Dichos métodos de cribado, ya sea en un formato de array o en un formato de grupo, pueden llevarse a cabo no solo contra VP2 452, sino también contra VP2 de diferentes longitudes o previamente preparada para contener inserciones o sustituciones con los mismos péptidos de interés o diferentes.

Cribado al azar para sitios de inserción y/o sustitución preferidos para péptidos particulares de interés.

Sitios de inserción o sustitución preferidos dentro de VP2, evaluados por la capacidad para formar VLP eficientemente, pueden variar para diferentes péptidos de interés. Por tanto, otro objeto de la presente divulgación demostrado en el Ejemplo 15 incorpora métodos de cribado al azar para identificar sitios de inserción preferidos para un péptido de interés dado usando una biblioteca de inserción y/o sustitución de VP2 al azar para la incorporación de péptidos de interés. Los métodos de cribado al azar pueden ser generalmente realizados del siguiente modo:

1. Generación de inserciones al azar: Por la que se prepara cualquier sitio de clonación apropiado que contenga transposón para insertarse al azar a través del gen de VP2 completo para producir una biblioteca de inserción de transposones. La incorporación de uno, o preferiblemente dos, sitios únicos de enzimas de restricción dentro de las secuencias derivadas de transposón insertadas al azar facilita la clonación direccional del ADN de interés deseado.

2. Clonación de ADN de interés: Por la cual el ADN de interés se clona en la biblioteca de inserción de transposón previamente generada siguiendo procedimientos de biología molecular estándar.

3. Transformación y expresión: La biblioteca de ligación resultante se transforma entonces en sistemas de expresión adecuados, bacterianos, de levadura, u otros adecuados, para la evaluación de la eficiencia de formación de VLP de las colonias individuales.

4. Evaluación de la capacidad de formación de VLP: Pueden evaluarse colonias para la eficiencia de producción de VLP por medio de un ensayo de inmunotransferencia de colonias usando anticuerpos específicos para VLP de VP2 contra filtros réplica hechos para contener muestras para cada una de las colonias. Se seleccionan las proteínas de fusión VP2 quiméricas con las eficiencias de formación de VLP más altas para la confirmación e identificación del sitio de inserción preferido. Aunque las eficiencias de formación de VLP por encima del 20% son reconocidas como compatibles con la formación de VLP, las eficiencias de formación de VLP por encima del 50%, y más preferiblemente por encima del 70%, son reconocidas como una característica deseable para proteínas de fusión VP2 quiméricas resultantes.

5. Confirmación o identificación del sitio de inserción: Técnicas de secuenciación de ADN proporcionan los medios para la identificación del sitio de inserción del ADN de interés. Además, la formación de VLP puede confirmarse por microscopía electrónica (ME).

Estos métodos de cribado al azar permiten la rápida selección de los mejores sitios preseleccionados dentro de VP2 para la incorporación de un péptido particular de interés que produce la producción de VLP. La presente divulgación, por tanto, incorpora métodos de cribado al azar para la identificación de sitios de inserción de VP2 preferidos para un ADN de interés particular, y las proteínas de fusión VP2 quiméricas, y VLP de VP2 quiméricas, resultantes de la expresión de los resultante vectores de expresión de ADN de proteína fusión de VP2 quimérica. Además, dichos métodos de cribado pueden llevarse a cabo no solo contra VP2 452, sino también contra VP2 de diferentes longitudes o ya preparada para contener inserciones o sustituciones con péptidos de interés.

Por tanto, en vista de lo anterior, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una proteína de fusión, capaz de formar una partícula similar a virus, que consiste en la incorporación en localizaciones distintas del extremo N o C terminal de una o más secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria, distintas de una secuencia del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa, dentro de una proteína VP2 de virus *Birnaviridae*, en la que preferiblemente la proteína VP2 es la proteína VP2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa o una VP2 que comparte al menos el 30% homología de secuencias de aminoácidos con la proteína VP2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa, y en la que las secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria están seleccionadas de la lista que consiste en: componentes de vacuna, antígenos y epítomos, secuencias de direccionamiento, secuencias de unión, dominios catalíticos, moduladores de farmacología, inmunoestimuladores, toxinas y antitoxinas.

En una realización preferida, la proteína VP2 es una pVP2 de 512 aminoácidos de longitud completa, o fragmento de 456, o 452 o 441 aminoácidos de la misma, o comprende al menos 400 aminoácidos de VP2.

En otra realización preferida, las secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria se incorporan en uno o más sitios dentro de la proteína VP2 dentro de las regiones de bucle P de VP2 BC (Q219-G224), DE (R249-G254), FG (T283-D287) y HI (S315-Q324), y/o fuera de dichas regiones de bucle P de VP2, en la que las secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria son iguales o diferentes para cada incorporación.

En otra realización preferida, la incorporación de secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria consiste en inserciones.

En otra realización preferida, la proteína de fusión está terminalmente fusionada ya sea en su región del extremo carboxi (C) o amino (N) terminal, con una segunda secuencia de aminoácidos relevante para la salud humana o veterinaria que puede ser igual o diferente a las secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria insertadas en la región de bucle P o fuera de dichas regiones de bucle P, en la que las secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria están seleccionadas de la lista que consiste en: componentes de vacuna, antígenos y epítomos, secuencias de direccionamiento, secuencias de unión, dominios catalíticos, moduladores de farmacología, inmunoestimuladores, toxinas y antitoxinas.

Otro aspecto de la invención se refiere a una partícula similar a virus constituida por el ensamblaje de la proteína de fusión como se ha definido anteriormente. En una realización preferida de este aspecto de la invención, esta partícula similar a virus está constituida por el ensamblaje de la proteína de fusión como se ha definido anteriormente y la proteína VP3, en la que la proteína VP3 está terminalmente fusionada, ya sea en el extremo N o C terminal, con una secuencia de aminoácidos relevante para la salud humana o veterinaria que puede ser igual o diferente a aquella incorporada en VP2, en la que las secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria están seleccionadas de la lista que consiste en: componentes de vacuna, antígenos y epítomos, secuencias de direccionamiento, secuencias de unión, dominios catalíticos, moduladores de farmacología, inmunoestimuladores, toxinas y antitoxinas. En otra realización preferida, esta partícula similar a virus se obtiene por la co-expresión de pVP2 y VP3 de construcciones génicas independientes o por la expresión de construcciones que comprenden la poliproteína pVP2-VP4-VP3.

Otro aspecto de la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica las proteínas de fusión definidas anteriormente. Otro aspecto de la invención se refiere a una construcción génica que comprende este ácido nucleico. Otro aspecto de la invención se refiere a un sistema de expresión que comprende esta construcción génica operativamente unida a elementos de control de la transcripción, y opcionalmente de la traducción. Otro aspecto de la invención se refiere a una célula hospedadora que contiene este ácido nucleico o esta construcción génica o este sistema de expresión.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* de este sistema de expresión génica para producir partículas similares a virus.

Otro aspecto de la invención se refiere a las partículas similares a virus quiméricas definidas anteriormente para su uso en medicina, administración de fármacos, terapia génica, como agentes elegidos como diana, agentes de obtención de imágenes, en vacunación, como antitoxinas, en diagnóstico, o en técnicas de obtención de imágenes aplicables a salud humana o veterinaria.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de cribado para la localización de los sitios de inserción preferidos dentro de proteínas VP2, o proteínas de fusión de las mismas, que se ensamblan eficientemente en partículas similares a virus, que comprende:

- 5 a. Disponer, tanto individualmente como en conjuntos, un conjunto de cualquier combinación de vectores de biblioteca de ADN para la proteína VP2 de *Birnaviridae*, o proteínas de fusión de la misma, incorporar uno o más vectores con sitios de clonación preseleccionados o vectores con sitios de inserción al azar para la incorporación de ADN de interés que conduce a cualquiera de las proteínas de fusión VP2 definidas anteriormente;
- 10 b. Poner en contacto el conjunto de vectores de ADN de a) con un ADN de interés que codifica una secuencia de aminoácidos relevante para la salud humana o veterinaria, para la incorporación de dicho ADN de interés, en el que la secuencia de aminoácidos relevante para la salud humana o veterinaria está seleccionada de la lista que consiste en: componentes de vacuna, antígenos y epítopos, secuencias de direccionamiento, secuencias de unión, dominios catalíticos, moduladores de farmacología, inmunoestimuladores, toxinas y antitoxinas;
- 15 c. Transfectar, transformar o infectar células hospedadoras con los vectores de expresión de ADN resultantes de b) para la expresión de proteínas de fusión VP2 quiméricas;
- d. Evaluar la eficiencia de formación de VLP de células hospedadoras de c) y seleccionar clones que expresan partículas similares a virus quiméricas con eficiencias más altas;
- e. Determinar o confirmar la localización de inserción preferida del ADN de interés.

20 Aunque la anterior invención se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para los fines de claridad de entendimiento, será rápidamente evidente para aquellos expertos habituales en la materia en vista de las enseñanzas de la presente invención que pueden hacerse ciertos cambios y modificaciones a la misma dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

25 Descripción de las figuras

Figura 1: Oligonucleótidos usados para construcciones de plásmido.

30 La Figura 1 describe las secuencias de nucleótidos usadas como cebadores para reacciones de PCR en la construcción de vectores de ADN y vectores de expresión de ADN.

Figura 2: Construcción de vectores de inserción de bucle Spel-VP2.

35 La Figura 2 representa la inserción de sitios de restricción *SpeI* por mutagénesis dirigida al sitio que generan inserciones de serina-treonina (TS) en cada una de las posibles posiciones dentro de la región DE de bucle P de VP2. La clonación del ADN de interés en los sitios *SpeI* condujo a la inserción de péptidos de interés flanqueados por dipéptidos TS en ambos extremos.

Figura 3: Análisis de microscopía electrónica de VLP de VP2 quiméricas purificadas.

40 La Figura 3 representa micrografías electrónicas (ME) de VLP quiméricas obtenidas tras la expresión del vector de expresión de ADN en *S. cerevisiae* cepa 499, lisis y fraccionamiento de extractos solubles en gradientes de sacarosa. Los paneles a-i muestran imágenes de microscopía electrónica (ME) de VLP de VP2 quiméricas purificadas teñidas con acetato de uranilo: (a) VP2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₅₄), (b) VP2(H₂₅₃↑cMyc↑G₂₅₄), (c) VP2(A₃₂₁↑Flag↑G₃₂₂), (d) VP2(A₃₂₁↑cMyc↑G₃₂₂), (e) VP2(V₂₅₂↑Flag↑H₂₅₃), (f) VP2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₅₄)-Flag, (g) VP2(H₂₅₃↑cMyc↑G₂₅₄)-cMyc, (h) VP2(A₃₂₁↑Flag↑G₃₂₂)-Flag y (i) VP2(Q₂₂₁↑K↑-H₂₅₃↑K↑-G₂₈₅↑K↑H₃₂₀↑K↑). La barra mostrada en las imágenes de ME se corresponde con 200 nm.

Figura 4: Construcción de plásmidos de expresión de VP2 con múltiples inserciones.

50 La Figura 4 representa construcciones de expresión de VP2 con dos inserciones Flag o cMyc en las regiones DE y HI del bucle P de pESC-URA/VP2(X-X). Dobles inserciones resultan de la clonación de fragmentos *RsrII* y *NarI* de pESC-URANP2(H₂₅₃↑cMyc↑G₂₅₄) y pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₅₄) en pESC-URANP2(A₃₂₁↑cMyc↑G₃₂₂) y pESC-URA/VP2(A₂₅₃↑Flag↑G₃₂₂).

Figura 5: Construcción de construcciones de inserción y sustitución de VP2 con fusión del extremo N o C terminal.

60 La Figura 5 representa la fusión del extremo C y extremo N terminal de péptidos de interés de ejemplo cMyc y Flag con proteínas de fusión VP2 quiméricas previamente preparadas para contener cMyc, Flag o múltiples sustituciones de lisina. Se generaron construcciones del extremo C terminal pESC-URA/VP2(X)-X por inserción de adaptadores de ADN que codifican péptidos Flag y cMyc en la dirección 3' de los genes de VP2 usando sitios de restricción *NotI* y *HindIII*. Se generaron construcciones del extremo N terminal pESC-URA/X-VP2(X) por inserción en un sitio *EcoRI* localizado en la dirección 5' del codón de iniciación de VP2.

65

Figura 6: Secuencia del gen pVP2 sintético.

La Figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos del gen pVP2 sintéticamente producido de la cepa Soroa de IBDV (NCIB N.º AAD30136) y la proteína correspondiente. Los sitios de restricción de ADN usados para clonar están subrayados y nombrados. Los restos de aminoácidos de regiones de bucle P BC, DE, FG y HI se muestran subrayados.

Figura 7: Secuencia del gen VP4 sintético.

La Figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento sintéticamente producido del segmento A de la cepa Soroa de IBDV (NCIB N.º AAD30136), que contiene el extremo 3' del gen de pVP2, el gen de VP4 y el extremo 5' del gen VP3. La secuencia de aminoácidos de VP4 está numerada y subrayada y los sitios de restricción de ADN usados en la clonación están subrayados y nombrados.

Figura 8: Secuencia del gen VP3 sintético.

La Figura 8 muestra la secuencia de nucleótidos del gen de VP3 sintéticamente producido de la cepa Soroa de IBDV (NCIB N.º AAD30136) y la proteína correspondiente. Las mutaciones silenciosas han sido introducidas en las posiciones 147 (A a T), 333 (C a T), 561 (T a C) y 600 (T a C) para mutar sitios de enzimas de restricción *MscI*, *NcoI*, *HindIII* y *NcoI*, respectivamente.

Figura 9: Construcción de vectores de expresión pVP2-VP4-VP3-pp pFastBacDual.

La Figura 9 muestra las etapas para la construcción de vectores de expresión pVP2-VP4-VP3-pp pFastBacDual. Etapa 1: Clonación del gen pVP2 en pFastBacDual™ (pFBD) en la dirección 3' del promotor PH; Etapa 2: Inserción de genes de VP3-X, Flag y cMyc, en el sitio de restricción *HindIII* en la dirección 3' del gen pVP2; Etapa 3: Sustitución del fragmento pVP2 *RsrII-NcoI* para generar las construcciones de inserción o sustitución de pVP2 pFBD/pVP2(X)-VP3-X-pp que contienen Flag, cMyc o múltiples lisinas; Etapa 4: Inserción del gen de VP4 en sitios de restricción *PvuII* y *BsgI* localizados en el extremo 3' y 5' del gen de pVP2 y VP3, respectivamente, para generar pFBD/pVP2(X)-VP4-VP3-X-pp.

Figura 10: Construcción de vectores de expresión pESC-URA pVP2, VP3 dobles:

La Figura 10 muestra las etapas para la construcción de vectores de expresión pESC-URA pVP2, VP3 dobles. Etapa 1: Clonación de His-VP3-X en pESC-URA™ en la dirección 3' del promotor G10 para generar pESC-URA/His-VP3-X; Etapa 2: Inserción de genes de pVP2 en la dirección 3' del promotor G1 en un sitio *BamHI-HindIII*, generando vectores de expresión pVP2-VP3 dobles pESC-URA/pVP2-His-VP3-X; Etapa 3: Sustitución del fragmento *RsrII-MscI* de pVP2 para generar las construcciones de inserción o sustitución de pVP2-VP3 pESC-URA/pVP2(X)-His-VP3-X.

Figura 11: Construcción de vectores de expresión pVP2, VP3 de FastBacDual.

La Figura 11 muestra las etapas para la construcción de vectores de expresión pVP2, VP3 FastBacDual. Etapa 1: Clonación de genes de His-VP3-X en pFastBacDual™ (pFBD) en la dirección 3' del promotor P10 para generar pFBD/His-VP3-X, Etapa 2: Inserción de genes de pVP2 en la dirección 3' del promotor PH en el sitio *BamHI-HindIII*, generando vectores de expresión de pVP2-VP3 dobles pFBD/pVP2-His-VP3-X; Etapa 3: Sustitución del fragmento *RsrII-NcoI* de pVP2 para generar construcciones de inserción o sustitución de pVP2-VP3 pFBD/pVP2(X)-His-VP3-X.

Figura 12: Análisis de microscopía electrónica (ME) de VLP T=13 quiméricas purificadas.

La Figura 12 muestra imágenes de microscopía electrónica (ME) de muestras de VLP T=13 purificadas teñidas con acetato de uranilo tras la purificación en gradiente de sacarosa. (1) pVP2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₅₄)-His-VP3-Flag y (2) pVP2-His-VP3-Flag. La barra mostrada en las imágenes de ME se corresponde con 200 nm.

Figura 13: Generación de un sitio de clonación múltiple en posiciones de inserción de VP2.

La Figura 13 representa la inserción de un sitio de clonación múltiple (MCS) en un sitio *SpeI* produciendo un sitio de clonación *NotI/SpeI* que contiene varios codones de terminación en marco. Los péptidos de interés se introducen como inserciones *NotI/SpeI*. Los codones de terminación garantizan que la religación de vectores vacíos durante la generación de las bibliotecas de inserción genera versiones delecionadas de la proteína VP2 que son incapaces de formar VLP.

Ejemplos

Ejemplo 1. Inserción de péptidos de interés en regiones de bucle P de VP2 de IBDV.

5 Se generó una colección de plásmidos que incorporan un sitio *SpeI* en cada una de las posibles posiciones dentro de los bucles P de VP2, y posiciones inmediatamente adyacentes, por mutagénesis dirigida al sitio usando el plásmido de expresión en levadura pESC-URA-VP2 452 (pESC-URA/VP2). Para la construcción de pESC-URA/VP2, se amplificó el ADNc de VP2 usando los oligonucleótidos VP2-452*EcoRI*-fw (SEQ. ID. NO: 6) y VP2-452*NotI*-rev (SEQ. ID. NO: 7) (Figura 1) y los moldes pESC-URA/pVP2-512 que contienen la inserción de VP2 512 de IBDV de longitud completa (cepa Soroa de IBDV, NCIB N.º AAD30136). La inserción VP2 452 se clonó en pESC-URA digerido con *EcoRI* y *NotI* (Stratagene™) en el que se delecionó previamente el sitio *SpeI*. La inserción del sitio de restricción *SpeI* generó una inserción de serina-treonina (TS) en cada una de las posibles posiciones dentro de las regiones de bucle P de VP2 como se muestra en la Tabla 1 y se ejemplifica para la región de bucle P de DE en la Figura 2. Se linealizaron por separado vectores de inserción de bucle *SpeI*-VP2 purificados (vectores de inserción de bucle VP2-TS o pESC-URA/VP2/*SpeI*) por digestión con *SpeI* y se ligaron a moléculas adaptadoras de ADN que codifican una única copia del péptido de interés. Se usaron los plásmidos religados para transformar *E. coli*, y se identificaron clones de inserción por análisis de restricción y secuenciación. Esto se llevó a cabo para cada uno de los 4 péptidos de interés de ejemplo, concretamente Flag (SEQ. ID. NO: 2), cMyc (SEQ. ID. NO: 3), V5 (SEQ. ID. NO: 4) y VSV G (SEQ. ID. NO: 5) generando un panel de construcciones de inserción de péptidos de VP2 con secuencias de TS flanqueantes derivadas del sitio *SpeI* manipulado. Se usaron vectores de inserción de bucle VP2-TS purificados y construcciones de inserción de péptidos de VP2 para transformar la cepa Y449 de *S. cerevisiae*. Se determinó cuantitativamente la capacidad para formar VLP para cada uno de los vectores de inserción de bucle de VP2-TS [por ejemplo: pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑TS↑G₂₅₄)] y construcciones de inserción de bucle de VP2-péptido [por ejemplo: pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₅₄)] por ELISA de VLP usando extractos de células de levadura totales (véase la Tabla 1). El ensayo de ELISA de VLP hizo uso de un anticuerpo capaz de reconocer VP2 solo cuando se ensambla en forma de una VLP. Brevemente, se recubrieron previamente placas de ELISA con anti-VP2 de conejo y se añadieron diluciones de muestras en serie y se incubaron durante 1 hora a TA. Después de lavar, la placa se incubó con anti-VP2 de ratón durante 1 hora a TA, seguido de desarrollo del ensayo de peroxidasa según el procedimiento convencional. La CE₅₀ para una muestra dada se determina como la dilución de muestra a la que el ELISA de VLP da el 50% de la máxima señal obtenida para esa muestra. La eficiencia de formación de VLP se expresa en todos los casos como el porcentaje del valor de CE₅₀ obtenido para una muestra dada en comparación con el control de VP2 452 nativo.

35 Con el fin de confirmar la formación de VLP de VP2 quiméricas, se prepararon cultivos de levadura a gran escala, se purificaron VLP por medio de centrifugación en gradiente de sacarosa, y se verificó la presencia de VLP por microscopía electrónica (ME) como se muestra en la Figura 3. Las eficiencias de formación de VLP inferiores al 20% de las de la VP2 452 nativa se consideraron ruido de fondo (BG) y se tomaron como una indicación de que la localización de la inserción no era compatible con la formación de VLP para los péptidos probados. Los resultados obtenidos sirvieron para identificar sitios de inserción específicamente favorecidos por los diferentes péptidos de interés probados.

45 Como se demuestra en la Tabla 1, la eficiencia de formación de VLP de insertos en los bucles BC, DE, FG y HI del dominio P de VP2 depende de la secuencia del ADN de interés insertado y la localización de la inserción. Como un ejemplo, localizaciones de inserciones, indicadas por una flecha, que produjeron alta eficiencia de formación de VLP para el dipéptido TS incluyeron las posiciones G₂₅₄↑L₂₅₅, D₂₈₇↑N₂₈₈, S₃₁₅↑K₃₁₆, K₃₁₆↑S₃₁₇, G₃₂₂↑D₃₂₃ y D₃₂₃↑Q₃₂₄, mientras que los sitios preferidos para la inserción de Flag fueron H₂₅₃↑G₂₅₄, S₃₁₅↑K₃₁₆ y G₃₁₈↑G₃₁₉, para la inserción de cMyc D₃₂₃↑Q₃₂₄, para la inserción de V5 G₃₁₈↑G₃₁₉ y Q₃₂₄↑M₃₂₅, y para la inserción de VSV-G la posición G₃₁₈↑G₃₁₉.

50 **Tabla 1: Posiciones de inserciones en regiones de bucle P BC, DE, FG y HI.**

(% de VLP: eficiencia de formación de VLP; BG: expresión del ruido de fondo; NT: no probado).						
REGIÓN DE BUCLE P	POSICIÓN DE INSERCIÓN (secuencias de la región de bucle P subrayadas)	% de VLP				
		TS	Flag	cMyc	V5	VSV-G
B-C	↑S ₂₁₈ <u>Q₂₁₉Y₂₂₀Q₂₂₁P₂₂₂G₂₂₃G₂₂₄</u> V ₂₂₅	22	BG	BG	BG	BG
	S ₂₁₈ ↑ <u>Q₂₁₉Y₂₂₀Q₂₂₁P₂₂₂G₂₂₃G₂₂₄</u> V ₂₂₅	48	35	BG	25	BG
	S ₂₁₈ <u>Q₂₁₉Y₂₂₀↑Y₂₂₀Q₂₂₁P₂₂₂G₂₂₃G₂₂₄</u> V ₂₂₅	23	BG	36	80	84
	S ₂₁₈ <u>Q₂₁₉Y₂₂₀↑Q₂₂₁P₂₂₂G₂₂₃G₂₂₄</u> V ₂₂₅	47	34	61	33	82
	S ₂₁₈ <u>Q₂₁₉Y₂₂₀Q₂₂₁↑P₂₂₂G₂₂₃G₂₂₄</u> V ₂₂₅	37	31	BG	BG	20
	S ₂₁₈ <u>Q₂₁₉Y₂₂₀Q₂₂₁P₂₂₂↑G₂₂₃G₂₂₄</u> V ₂₂₅	65	46	34	71	75
	S ₂₁₈ <u>Q₂₁₉Y₂₂₀Q₂₂₁P₂₂₂G₂₂₃↑G₂₂₄</u> V ₂₂₅	BG	BG	30	BG	BG
	S ₂₁₈ <u>Q₂₁₉Y₂₂₀Q₂₂₁P₂₂₂G₂₂₃G₂₂₄↑</u> V ₂₂₅	34	23	BG	BG	25
S ₂₁₈ <u>Q₂₁₉Y₂₂₀Q₂₂₁P₂₂₂G₂₂₃G₂₂₄</u> V ₂₂₅ ↑	BG	BG	BG	BG	BG	
D-E	↑F ₂₄₈ <u>R₂₄₉T₂₅₀S₂₅₁V₂₅₂H₂₅₃G₂₅₄</u> L ₂₅₅	BG	NT	NT	NT	NT
	F ₂₄₈ ↑ <u>R₂₄₉T₂₅₀S₂₅₁V₂₅₂H₂₅₃G₂₅₄</u> L ₂₅₅	BG	NT	NT	NT	NT
	F ₂₄₈ <u>R₂₄₉↑T₂₅₀S₂₅₁V₂₅₂H₂₅₃G₂₅₄</u> L ₂₅₅	BG	BG	BG	BG	BG

(% de VLP: eficiencia de formación de VLP; BG: expresión del ruido de fondo; NT: no probado).

REGIÓN DE	POSICIÓN DE INSERCIÓN (secuencias de la región de)	% de VLP				
	F ₂₄₈ <u>R₂₄₉T₂₅₀↑S₂₅₁V₂₅₂H₂₅₃G₂₅₄L₂₅₅</u>	43	37	BG	BG	23
	F ₂₄₈ <u>R₂₄₉T₂₅₀S₂₅₁↑V₂₅₂H₂₅₃G₂₅₄L₂₅₅</u>	38	BG	BG	BG	BG
	F ₂₄₈ <u>R₂₄₉T₂₅₀S₂₅₁V₂₅₂↑H₂₅₃G₂₅₄L₂₅₅</u>	26	66	BG	25	24
	F ₂₄₈ <u>R₂₄₉T₂₅₀S₂₅₁V₂₅₂H₂₅₃↑G₂₅₄L₂₅₅</u>	69	100	84	NT	49
	F ₂₄₈ <u>R₂₄₉T₂₅₀S₂₅₁V₂₅₂H₂₅₃G₂₅₄↑L₂₅₅</u>	100	28	BG	BG	BG
	F ₂₄₈ <u>R₂₄₉T₂₅₀S₂₅₁V₂₅₂H₂₅₃G₂₅₄L₂₅₅↑</u>	35	25	22	BG	NT
F-G	↑L ₂₈₄ <u>T₂₈₃T₂₈₄G₂₈₅T₂₈₆D₂₈₇N₂₈₈</u>	25	BG	NT	NT	NT
	L ₂₈₄ ↑ <u>T₂₈₃T₂₈₄G₂₈₅T₂₈₆D₂₈₇N₂₈₈</u>	62	45	34	23	BG
	L ₂₈₄ <u>T₂₈₃↑T₂₈₄G₂₈₅T₂₈₆D₂₈₇N₂₈₈</u>	79	45	23	95	80
	L ₂₈₄ <u>T₂₈₃T₂₈₄↑G₂₈₅T₂₈₆D₂₈₇N₂₈₈</u>	81	56	45	68	70
	L ₂₈₄ <u>T₂₈₃T₂₈₄G₂₈₅↑T₂₈₆D₂₈₇N₂₈₈</u>	85	75	NT	NT	NT
	L ₂₈₄ <u>T₂₈₃T₂₈₄G₂₈₅T₂₈₆↑D₂₈₇N₂₈₈</u>	90	66	32	NT	57
	L ₂₈₄ <u>T₂₈₃T₂₈₄G₂₈₅T₂₈₆D₂₈₇↑N₂₈₈</u>	97	62	NT	NT	NT
	L ₂₈₄ <u>T₂₈₃T₂₈₄G₂₈₅T₂₈₆D₂₈₇N₂₈₈↑</u>	44	NT	NT	NT	NT
H-I	↑T ₃₁₄ <u>S₃₁₅K₃₁₆S₃₁₇G₃₁₈G₃₁₉Q₃₂₀A₃₂₁G₃₂₂D₃₂₃Q₃₂₄M₃₂₅</u>	34	NT	NT	NT	NT
	T ₃₁₄ ↑ <u>S₃₁₅K₃₁₆S₃₁₇G₃₁₈G₃₁₉Q₃₂₀A₃₂₁G₃₂₂D₃₂₃Q₃₂₄M₃₂₅</u>	71	58	65	NT	83
	T ₃₁₄ <u>S₃₁₅↑K₃₁₆S₃₁₇G₃₁₈G₃₁₉Q₃₂₀A₃₂₁G₃₂₂D₃₂₃Q₃₂₄M₃₂₅</u>	100	100	NT	38	36
	T ₃₁₄ <u>S₃₁₅K₃₁₆↑S₃₁₇G₃₁₈G₃₁₉Q₃₂₀A₃₂₁G₃₂₂D₃₂₃Q₃₂₄M₃₂₅</u>	100	NT	NT	NT	NT
	T ₃₁₄ <u>S₃₁₅K₃₁₆S₃₁₇↑G₃₁₈G₃₁₉Q₃₂₀A₃₂₁G₃₂₂D₃₂₃Q₃₂₄M₃₂₅</u>	59	85	NT	NT	NT
	T ₃₁₄ <u>S₃₁₅K₃₁₆S₃₁₇G₃₁₈↑G₃₁₉Q₃₂₀A₃₂₁G₃₂₂D₃₂₃Q₃₂₄M₃₂₅</u>	56	100	36	97	100
	T ₃₁₄ <u>S₃₁₅K₃₁₆S₃₁₇G₃₁₈G₃₁₉↑Q₃₂₀A₃₂₁G₃₂₂D₃₂₃Q₃₂₄M₃₂₅</u>	83	NT	NT	77	79
	T ₃₁₄ <u>S₃₁₅K₃₁₆S₃₁₇G₃₁₈G₃₁₉Q₃₂₀↑A₃₂₁G₃₂₂D₃₂₃Q₃₂₄M₃₂₅</u>	91	66	81	NT	NT
	T ₃₁₄ <u>S₃₁₅K₃₁₆S₃₁₇G₃₁₈G₃₁₉Q₃₂₀A₃₂₁↑G₃₂₂D₃₂₃Q₃₂₄M₃₂₅</u>	73	62	67	34	33
	T ₃₁₄ <u>S₃₁₅K₃₁₆S₃₁₇G₃₁₈G₃₁₉Q₃₂₀A₃₂₁G₃₂₂↑D₃₂₃Q₃₂₄M₃₂₅</u>	100	60	NT	72	58
	T ₃₁₄ <u>S₃₁₅K₃₁₆S₃₁₇G₃₁₈G₃₁₉Q₃₂₀A₃₂₁G₃₂₂D₃₂₃↑Q₃₂₄M₃₂₅</u>	100	86	99	64	NT
	T ₃₁₄ <u>S₃₁₅K₃₁₆S₃₁₇G₃₁₈G₃₁₉Q₃₂₀A₃₂₁G₃₂₂D₃₂₃Q₃₂₄↑M₃₂₅</u>	75	70	NT	95	NT
T ₃₁₄ <u>S₃₁₅K₃₁₆S₃₁₇G₃₁₈G₃₁₉Q₃₂₀A₃₂₁G₃₂₂D₃₂₃Q₃₂₄M₃₂₅↑</u>	BG	BG	NT	NT	NT	

Ejemplo 2. Inserción de péptidos de interés en regiones de bucle P de VP2 de diferentes longitudes.

Para probar si la longitud de las proteínas VP2 podría afectar la eficiencia de formación de VLP, se compararon VP2 de IBDV de diferentes longitudes en su extremo C terminal, concretamente VP2 con 452, 441 y 456 aminoácidos (VP2 452, VP2 441 y VP2 456), para su capacidad para incorporar inserciones de péptidos de interés, concretamente cMyc (SEQ. ID. NO: 3) y Flag (SEQ. ID. NO: 2), en localizaciones dentro de las regiones de bucle P DE y HI. Para la construcción de pESC-URA/VP2 456 y pESC-URA/VP2 441, se amplificó el ADNc de VP2 usando oligonucleótidos VP2 452EcoRI-fw (SEQ. ID. NO: 6) y VP2 456-rev (SEQ. ID. NO: 8) o VP2 441-rev (SEQ. ID. NO: 9) y el molde pESC-URA/pVP2 512 que contiene la inserción VP2 512 de longitud completa. Se clonaron fragmentos de genes de VP2 456 y VP2 441 purificados en plásmidos pESC-URA/VP2 digeridos con 452EcoRI y NotI. Para este fin, se digirieron plásmidos de inserción de bucle de VP2 [por ejemplo: pESC-URA/VP2 (H₂₅₃↑Flag↑G₂₅₄), con enzimas de restricción RsrII y MscI, que se cortaron dentro del gen VP2 en la posición de aminoácido G₂₄-W₄₁₄, y los fragmentos de genes de VP2 purificados se clonaron en plásmidos pESC-URA/VP2 441 y pESC-URA/VP2 456 digeridos con RsrII y MscI. Se identificaron clones correctos por análisis de restricción y secuenciación y se transformaron en la cepa Y449 de *S. cerevisiae* para evaluar la expresión de VP2 y la eficiencia de formación de VLP por ELISA de VLP cuantitativa usando extractos de células de levadura totales.

Como se demuestra en la Tabla 2, la eficiencia de producción de VLP varió según el sitio de inserción dentro de VP2, además de con la longitud de VP2. Además, se observó que VP2 más corta en algunos casos produjo eficiencia de formación de VLP mejorada.

Tabla 2: Formación de VLP de construcciones de VP2 con inserción de péptidos de interés en regiones de bucle de VP2 441 y VP2 456.

(Los péptidos de interés aparecen subrayados y flanqueados por secuencias conectoras de TS; BG: expresión del ruido de fondo; % de VLP: eficiencia de formación de VLP).

REGIÓN DE BUCLE P	POSICIÓN DE INSERCIÓN (SECUENCIA DE PÉPTIDOS INSERTADA)	LONGITUD DE PROTEÍNA VP2	% DE VLP
D-E	H ₂₅₃ ↑Flag↑G ₂₅₄ (TS <u>DYKDDDDKGGSSDYKDDDDK</u> TS)	VP2 452	100
		VP2 441	100
		VP2 456	56
H-I	A ₃₂₁ ↑Flag↑G ₃₂₂ (TS <u>DYKDDDDKGGSSDYKDDDDK</u> TS)	VP2 452	62
		VP2 441	67
		VP2 456	56

(Los péptidos de interés aparecen subrayados y flanqueados por secuencias conectoras de TS; BG: expresión del ruido de fondo; % de VLP: eficiencia de formación de VLP).			
REGIÓN DE BUCLE P	POSICIÓN DE INSERCIÓN (SECUENCIA DE PÉPTIDOS INSERTADA)	LONGITUD DE PROTEÍNA VP2	% DE VLP
D-E	S ₂₅₁ ↑Flag↑V ₂₅₂ (TS <u>SDYKDDDDKGGSSDYKDDDDK</u> STS)	VP2 452	BG
		VP2 441	34
		VP2 456	BG
D-E	H ₂₅₃ ↑cMyc↑G ₂₅₄ (T <u>SEQKLISEEDL</u> STS)	VP2 452	84
		VP2 441	83
		VP2 456	54

Ejemplo 3: Sustitución de regiones de bucle P para péptidos de interés.

5 Para facilitar la sustitución de regiones de bucle P por péptidos de interés, se generaron vectores de clonación en los que los codones dentro de las regiones de bucle P se sustituyeron por una secuencia que codifica un conector corto que contiene un sitio *NotI* de enzima de restricción usando un plásmido pESC-URA/VP2 452 con una mutación en el sitio *NotI* en la dirección 3' del gen de VP2 452 (pESC-URA/VP2 452 [Δ *NotI*]). En una serie de mutantes, se deleciónó la región de bucle P completa y en otra serie se deleccionaron todos, excepto del primer y el último codón de cada bucle P, como se muestra en la Tabla 3. Se clonaron péptidos de interés de ejemplo, concretamente Flag (SEQ. ID. NO: 2) y cMyc (SEQ. ID. NO: 3), siguiendo los procedimientos convencionales como fragmentos de ADNbc de *NotI* para el ADN de interés en vectores de clonación linealizados con *NotI* [por ejemplo: pESC-URANP2/ Δ Y₂₂₀-G₂₂₃] generando inserciones en marco. Se usaron construcciones purificadas [por ejemplo: pESC-URAA/P2/ Δ Y₂₂₀-G₂₂₃/Q₂₁₉↑Flag↑G₂₂₄ para transformar Y449 de *S. cerevisiae* y la eficiencia de producción de VLP, mostrada en la Tabla 3, se determinó cuantitativamente por ELISA de VLP en extractos de células de levadura totales. La Tabla 3 muestra la eficiencia de formación de VLP cuando las secuencias de bucle de VP2 están sustituidas con péptidos de interés. Como se demuestra en la Tabla 3, la eficiencia de formación de VLP fue generalmente baja, pero todavía igual o superior al 20%, y varió según el sitio de sustitución dentro de VP2. Además, se observó que la retención del primer y último resto de las regiones de bucle P mejoró la eficiencia de formación de VLP.

Tabla 3: Sustituciones de secuencias de bucle de VP2 con péptido de interés.

(Los péptidos de interés aparecen subrayados y flanqueados por secuencias conectoras de TS; BG: expresión del ruido de fondo; % de VLP: eficiencia de formación de VLP).			
REGIÓN DE BUCLE P	POSICIÓN DE SUSTITUCIÓN	PÉPTIDO INSERTADO (SECUENCIA)	% de VLP
B-C	S ₂₁₈ ↑...↑V ₂₂₅	Flag (GGSGR <u>RDYKDDDDKGGSSDYKDDDDK</u> GGSGR)	BG
		cMyc (GGSGR <u>EQKLISEEDL</u> GGSGR)	BG
	S ₂₁₈ ↑Q ₂₁₉ ↑...↑G ₂₂₄ V ₂₂₅	Flag (GGSGR <u>RDYKDDDDKGGSSDYKDDDDK</u> GGSGR)	24
		cMyc (GGSGR <u>EQKLISEEDL</u> GGSGR)	33
D-E	F ₂₄₈ ↑...↑L ₂₅₅	Flag (GGSGR <u>RDYKDDDDKGGSSDYKDDDDK</u> GGSGR)	25
		cMyc (GGSGR <u>EQKLISEEDL</u> GGSGR)	BG
	F ₂₄₈ R ₂₄₉ ↑...↑G ₂₅₄ L ₂₅₅	Flag (GGSGR <u>RDYKDDDDKGGSSDYKDDDDK</u> GGSGR)	35
		cMyc (GGSGR <u>EQKLISEEDL</u> GGSGR)	27
F-G	L ₂₈₄ ↑...↑N ₂₈₈	Flag (GGSGR <u>RDYKDDDDKGGSSDYKDDDDK</u> GGSGR)	BG
		cMyc (GGSGR <u>EQKLISEEDL</u> GGSGR)	BG
	L ₂₈₄ T ₂₈₃ ↑...↑D ₂₈₇ N ₂₈₈	Flag (GGSGR <u>RDYKDDDDKGGSSDYKDDDDK</u> GGSGR)	22
		cMyc (GGSGR <u>EQKLISEEDL</u> GGSGR)	21
H-I	T ₃₁₄ ↑...↑M ₃₂₅	Flag (GGSGR <u>RDYKDDDDKGGSSDYKDDDDK</u> GGSGR)	BG
		cMyc (GGSGR <u>EQKLISEEDL</u> GGSGR)	25
	T ₃₁₄ S ₃₁₅ ↑...↑Q ₃₂₄ M ₃₂₅	Flag (GGSGR <u>RDYKDDDDKGGSSDYKDDDDK</u> GGSGR)	28
		cMyc (GGSGR <u>EQKLISEEDL</u> GGSGR)	34

Ejemplo de referencia 4: Incorporación de restos de lisina (K) en regiones de bucle y conjugación química de cMyc.

25 Para generar sitios de conjugación adicionales dentro de VP2, se clonaron restos de lisina (K) como sustituciones de restos de la región de bucle P. Brevemente, se generaron diferentes mutantes de lisina por mutagénesis dirigida al sitio del plásmido pESC-URA/VP2 [por ejemplo: pESC-URA/VP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K)]; las mutaciones se expresan como el aminoácido mutado seguido del resto K inducido]. Se transformaron construcciones purificadas en Y449 de *S. cerevisiae* y se determinó la expresión de VP2 y la eficiencia de formación de VLP por ELISA de VLP cuantitativa en extractos de células de levadura totales. La Tabla 4 muestra la eficiencia de producción de VLP de mutantes expresada como el % de eficiencia de producción de VLP en comparación con VP2-VLP nativa.

Como se muestra en la Tabla 4, se expresaron mutantes con 2, 3 y 4 restos de lisina adicionales a altos niveles y la eficiencia de producción de VLP T=1 fue comparable a la de VP2 452 nativa. Solo el mutante VP2(G₂₈₅K-Q₃₂₀K) preparado para contener un resto de lisina en la sustitución G₂₈₅ y otro en la sustitución de Q₃₂₀ no formó VLP. El análisis de ME de las construcciones de sustitución de K confirmó la presencia de VLP T=1. Para la conjugación química, se purificaron VLP por medio de centrifugación en gradiente de sacarosa y se compararon la eficiencia de conjugación de péptidos de VLP mutantes de VP2 452, 3K y 4K. Se prepararon conjugados de VLP-péptido con 0,5-2 mg de muestras de VLP de VP2 purificada. En una primera etapa, se incubaron VLP con éster N-succinimidílico de ácido 3-maleimidobenzoico a una relación de 1:50 durante 30 minutos a 20 °C y posteriormente se dializaron para eliminar MBS. El VLP-MBS resultante y el péptido de interés de ejemplo, concretamente un cMyc modificado (SEQ. ID. NO: 3) preparado para contener un resto de cisteína (C) terminal, se mezclaron 1:50 (VLP-MBS: cMyc) y se incubaron durante la noche a 4 °C, pH 7,0. Se dializó el producto de conjugación final (VLP - cMyc), se liofilizó y la cantidad de péptido conjugado se cuantificó por ELISA usando anticuerpos específicos para cMyc. Los resultados mostraron claramente que la incorporación de restos K adicionales por medio de sustituciones aumentó la eficiencia de conjugación para péptidos de interés.

Tabla 4: VLP de VP2 quiméricas que incorporan sustituciones de lisina en regiones de bucle P.

(% de VLP: eficiencia de formación de VLP; BG: expresión del ruido de fondo; NT: no probado).							
NÚMERO RESTOS INCORPORADOS	DE K	B-C Q ₂₂₁ K	D-E H ₂₅₃ K	F-G G ₂₈₅ K	H-I Q ₃₂₀ K.	% DE VLP	MORFOLOGÍA DE VLP (ME)
0						100	T=1
1					X	NT	NT
1				X		NT	NT
1			X			NT	NT
1		X			X	NT	NT
2				X	X	BG	T=1
2			X		X	66	T=1
3		X	X	X		55	T=1
4		X	X	X	X	45	T=1

Ejemplo 5. Identificación de sitios de inserción de VP2 fuera de regiones de bucle P por mutagénesis por transposón al azar con Tn5.

La inserción del transposón Tn5 produce la inserción de 57 nucleótidos que codifican 19 aminoácidos. La mutagénesis por inserción al azar de VP2 de IBVD con Tn5, usando el plásmido pESC-URA/VP2 452 (Δ SpeI/NotI) y el kit EZ-Tn5 In-Frame Linker Insertion (Epicentre™), generó una biblioteca de clones de ADN con inserciones junto con la secuencia de aminoácidos de VP2 452 completa. Se llevó a cabo la transformación de células competentes usando *Transformax EC100 Electrocompetent cells*, obteniéndose >200.000 clones con resistencia a ampicilina (proporcionada por el plásmido) y kanamicina (proporcionada por el transposón). Se aislaron y purificaron ADN de plásmido de todos los clones para formar una primera biblioteca de Tn5. El ADN de esta primera biblioteca de Tn5 se digirió con *EcoRI* y *BglII* para purificar la banda correspondiente a la secuencia codificante de VP2 con una inserción Ez-Tn5. Esta banda se clonó en el vector pESC-URA digerido con *EcoRI* y *BglII* para generar una segunda biblioteca, con inserciones al azar solo en el gen de VP2. La ligación se transformó como antes y se obtuvieron 65.000 clones. Se aisló y purificó ADN de plásmido de todos los clones para formar una segunda biblioteca de Tn5. El ADN de esta segunda biblioteca de Tn5 se digirió con *NotI* y se religó, para eliminar el gen de resistencia a kanamicina de la inserción. El producto de religación se transformó como antes para obtener 350.000 nuevos clones que constituyeron la biblioteca de inserción de Tn5 al azar de 19 aminoácidos final. Se transformaron células de levadura Y499 de *S. cerevisiae* con 10 µg de esta biblioteca de inserción de Tn5 al azar final y se sembró en placas de YNB/CSM-URA + 2% de glucosa. Se obtuvieron 110.000 clones de levadura y se transfirieron a placas que contienen galactosa. Las colonias cultivadas en presencia de galactosa se transfirieron a una membrana de PVDF para analizar la expresión de VLP de VP2 por inmunotransferencia de colonias usando anticuerpos específicos de VLP de VP2. Se cultivó individualmente un subconjunto de clones positivos en medio líquido de YNB/CSM-URA + 2% de galactosa y se analizó la expresión de VLP por ELISA de VLP. Se identificaron inserciones dentro de VP2 por secuenciación del producto de PCR obtenido de cada clon usando cebadores específicos de VP2 y Tn5. La mutagénesis por Tn5 condujo a la inserción de péptidos de 19 aminoácidos que consisten en uno de los tres posibles péptidos de núcleo de 15 restos y 4 restos variables dependiendo del sitio de inserción. La evaluación de la capacidad de construcciones de Tn5 para producir VLP produjo la identificación de varios sitios de inserción, enumerados en la Tabla 5, compatibles con la formación de VLP, y con posibilidades de generación de VLP de VP2 quiméricas con inserción o sustituciones con péptidos de interés.

La identificación de las locaciones de inserciones de Tn5 se llevó a cabo a partir del análisis limitado de 150 clones de la biblioteca de inserción de Tn5 al azar final. También pueden estar contenidas otras localizaciones de inserciones en dicha biblioteca de inserción y también representan posibles sitios de inserción o sustitución para péptidos de interés.

Tabla 5. Sitios de inserción de VP2 identificados por mutagénesis de transposón Tn5 al azar.

(Los péptidos de núcleo derivados de TN5 de 15 restos de largo se muestran subrayados)	
POSICIÓN DE INSERCIÓN	PÉPTIDO INSERTADO
E ₃₄ ↑K ₃₅	TVSCTHLAAARCVQETALE
E ₃₄ ↑K ₃₅	LSLVHILRPQDVYKRQTLE
E ₄₁ ↑T ₄₂	TVSCTHLAAARCVQETGSE
T ₄₄ ↑Y ₄₅	SVSCTHLAAARCVQETAST
G ₅₅ ↑L ₅₆	LSLVHILRPQDVYKRQSGG
Q ₇₅ ↑G ₇₆	AVSCTHLAAARCVQETALQ
G ₇₆ ↑N ₇₇	LSLVHILRPQDVYKRQLQG
S ₁₀₃ ↑R ₁₀₄	LSLVHILRPQDVYKRQLVS
S ₁₀₃ ↑R ₁₀₄	RCLLYTSCGRKMCTRDRVS
T ₁₀₇ ↑V ₁₀₈	VCLLYTSCGRKMCTRDRSTV
S ₁₁₁ ↑T ₁₁₂	TVSCTHLAAARCVQETGSS
T ₁₁₂ ↑L ₁₁₃	PVSCTHLAAARCVQETAST
G ₁₁₅ ↑G ₁₁₆	LSLVHILRPQDVYKRQLPG
G ₁₁₆ ↑V ₁₁₇	AVSCTHLAAARCVQETAGG
A ₁₁₉ ↑L ₁₂₀	PVSCTHLAAARCVQETVYA
V ₁₇₈ ↑R ₁₇₉	LSLVHILRPQDVYKRQGYV
P ₁₈₃ ↑I ₁₈₄	LSLVHILRPQDVYKRQGDP
A ₁₈₆ ↑I ₁₈₇	ICLLYTSCGRKMCTRDRSPA
G ₁₈₈ ↑L ₁₈₉	PVSCTHLAAARCVQETAIG
D ₁₉₀ ↑P ₁₉₁	PVSCTHLAAARCVQETGLD
C ₁₉₇ ↑D ₁₉₈	AVSCTHLAAARCVQETATC
D ₁₉₈ ↑S ₁₉₉	TVSCTHLAAARCVQETACD
D ₂₀₁ ↑R ₂₀₂	TVSCTHLAAARCVQETGSD
Y ₂₀₆ ↑T ₂₀₇	TCLLYTSCGRKMCTRDRVY
S ₂₄₀ ↑L ₂₄₁	PVSCTHLAAARCVQETVTS
N ₄₃₃ ↑S ₄₃₄	SVSCTHLAAARCVQETDLN
N ₄₃₃ ↑S ₄₃₄	SCLLYTSCGRKMCTRDRSLN
A ₄₅₀ ↑I ₄₅₁	ICLLYTSCGRKMCTRDRSRA
R ₄₅₂ ↑	LSLVHILRPQDVYKRQAIR

5 Ejemplo 6: Identificación de sitios de inserción de VP2 fuera de bucles P por mutagénesis por transposón al azar con Mu.

La inserción del transposón Mu produce la inserción de 15 nucleótidos que codifican un péptido de 5 aminoácidos. La secuencia de la inserción varió entre CGR, PRH o AAA, con dos restos flanqueantes al azar, dependiendo del sitio de inserción y marco de lectura. La mutagénesis de inserción al azar de VP2 de IBDV generó una biblioteca de clones de ADN con inserciones junto con la secuencia de VP2 452 completa. En particular, se usó un plásmido de expresión en levadura pESC-URA/VP2 para generar una biblioteca de inserción al azar usando el Entranceposon M1-Cam^R (M1-Cam) Mutation Generation F-701 (MGSTM). La reacción se hizo según instrucciones del fabricante y se usaron 0,5-1 µl para transformar *Transformax EC100 Electrocompetent cells*, obteniéndose > 100.000 clones con resistencia a ampicilina (proporcionada por el plásmido) y cloranfenicol (proporcionada por el transposón). El ADN de plásmido para todos los clones se purificó simultáneamente para formar una primera biblioteca de Mu. Esta primera biblioteca de Mu se digirió con *EcoRI* y *BglII* y se aisló la banda correspondiente a la secuencia codificante de VP2 con una inserción de Mu. Esta banda se clonó en el vector pESC-URA digerido con *EcoRI* y *BglII* para generar una segunda biblioteca, con inserciones al azar solo en el gen de VP2. La ligación se transformó en células electrocompetentes y se obtuvieron > 80.000 clones. Se purificó simultáneamente el ADN de plásmido para todos los clones para formar una segunda biblioteca de Mu. El ADN de la segunda biblioteca de Mu se digirió con *NotI* y se religó, para eliminar el gen de resistencia a cloranfenicol de la inserción. Este ADN se transformó como se ha descrito anteriormente obteniéndose > 100.000 clones nuevos que constituyeron la biblioteca de inserción de Mu al azar de 5 aminoácidos final. Se transformaron células de levadura Y449 de *S. cerevisiae* con 10 µg de biblioteca de inserción de Mu al azar y se sembraron en placas de YNB/CSM-URA + 2% de glucosa. Se obtuvieron -110.000 clones de levadura y se transfirieron a placas que contenían galactosa. Las colonias cultivadas en presencia de galactosa se transfirieron a una membrana de PVDF para analizar la expresión de VP2 por inmunotransferencia de colonias. Se cultivaron individualmente un subconjunto de clones positivos en medio líquido de YNB/CSM-URA + 2% de galactosa y se analizó la expresión de VLP por ELISA de VLP.

Se identificaron inserciones por secuenciación del producto de PCR obtenido de cada clon usando cebadores específicos de VP2 y Tn5. La mutagénesis de Mu condujo a la inserción de péptidos de 5 aminoácidos que consistían en uno de los tres posibles péptidos de núcleo de 3 restos y 2 restos variables dependiendo del sitio de

inserción. La evaluación de la capacidad de las construcciones de Mu para producir VLP produjo la identificación de varios sitios de inserción, enumerados en la Tabla 6, compatibles con la formación de VLP, y con posibilidades de generación de VLP de VP2 quiméricas que incorporan péptidos de interés por inserción o sustitución.

5 La identificación de las localizaciones de inserción de Mu se llevó a cabo a partir del análisis limitado de 200 clones a partir de la biblioteca de inserción de Mu al azar final. También pueden estar contenidas otras localizaciones de inserción en dicha biblioteca de inserción y también representar los posibles sitios de inserción o sustitución para péptidos de interés.

10 **Tabla 6: Sitios de inserción de VP2 identificados por mutagénesis por transposón Mu al azar.**

(Los péptidos de núcleo derivados de Mu se muestran subrayados)	
POSICIÓN DE INSERCIÓN	PÉPTIDO INSERTADO
M ₁ ↑T ₂	MRPHM
G ₅₀ ↑D ₅₁	<u>CGRMG</u>
Y ₇₂ ↑T ₇₃	<u>CGRNY</u>
G ₇₆ ↑N ₇₇	<u>AAAQG</u>
S ₁₀₃ ↑R ₁₀₄	<u>CGRMS</u>
V ₁₀₈ ↑R ₁₀₉	<u>AAATV</u>
L ₁₁₃ ↑P ₁₁₄	<u>RPHTL</u>
G ₁₁₆ ↑V ₁₁₇	<u>CGRSG</u>
G ₁₂₂ ↑T ₁₂₃	<u>CGRNG</u>
I ₁₈₄ ↑P ₁₈₅	<u>CGRTI</u>
A ₁₈₆ ↑I ₁₈₇	<u>AAAPA</u>
A ₁₈₆ ↑I ₁₈₇	<u>CGRTA</u>
G ₁₈₈ ↑L ₁₈₉	<u>CGRIG</u>
D ₁₉₈ ↑S ₁₉₉	<u>AAACD</u>
D ₂₀₁ ↑R ₂₀₂	MRPHD
L ₃₇₉ ↑A ₃₈₀	<u>RPHEL</u>
G ₃₉₃ ↑A ₃₉₄	<u>AAAPG</u>
N ₃₉₆ ↑Y ₃₉₇	<u>AAAMN</u>
M ₄₂₇ ↑E ₄₂₈	<u>DAAAM</u>
L ₄₃₆ ↑K ₄₃₇	<u>AAAPL</u>
G ₄₄₀ ↑A ₄₄₁	<u>CGRNG</u>
F ₄₄₄ ↑K ₄₄₅	<u>CGRSF</u>
R ₄₄₉ ↑A ₄₅₀	<u>VRPHR</u>

Ejemplo 7: Clonación de Flag o cMyc fuera de regiones de bucle P de VP2.

15 La eliminación de transposones Tn5 o Mu insertados al azar en el genoma de VP2 produjo inserciones de 57 o 15 nucleótidos que codifican inserciones de 19 o 5 aminoácidos, respectivamente. Las inserciones resultantes contuvieron un sitio de restricción *NotI* que permitió la clonación del ADN de interés. Los vectores resultantes [por ejemplo: pESC-URA/VP2(G₇₆↑Tn5↑N₇₇); la localización de inserción de Tn5 se indica por las flechas] se digirieron con *NotI* y se ligaron a un ADN de interés, tal como Flag (SEQ. ID. NO: 2) o cMyc (SEQ. ID. NO: 3), con extremos cohesivos de *NotI*. Las construcciones resultantes [por ejemplo: pESC-URA/VP2(G₇₆↑Tn5-Flag↑N₇₇)] se transformaron en Y449 de *S. cerevisiae* y la capacidad para formar VLP, mostrada en la Tabla 7, se determinó cuantitativamente por ELISA de VLP en extractos de células de levadura totales.

25 Además, también se construyeron vectores de inserción por mutagénesis dirigida al sitio para generar sitios de restricción *SpeI* en sitios de inserción de transposón previamente identificados. La inserción del sitio de restricción *SpeI* generó la inserción de serina-treonina (TS) en los puntos previamente identificados deseados dentro de VP2. Para la inserción de ADN de interés, los vectores inserción resultantes [por ejemplo: pESC-URA/VP2(G₇₆↑TS↑N₇₇)] se digirieron con *SpeI* y se ligaron a un ADN de interés, tal como Flag o cMyc, extremos cohesivos de *SpeI*. Las construcciones resultantes [por ejemplo: pESC-URA/VP2(G₇₆↑TS-Flag↑N₇₇)] se transformaron en Y449 de *S. cerevisiae* y la capacidad para formar VLP, mostrada en la Tabla 7, se determinó cuantitativamente por ELISA de VLP en extractos de células de levadura totales.

35 La inserción de péptidos de interés en las inserciones de Tn5 o Mu generalmente produjo eficiencia de formación de VLP reducida, pero todavía igual o superior al 20%, en comparación con las construcciones que contienen Tn5 o Mu. Sin embargo, los datos demostraron la viabilidad del enfoque en identificar posibles localizaciones de inserciones o sustituciones de VP2 para péptidos de interés por medio de mutagénesis por transposón.

Tabla 7: Inserciones de VP2 en sitios fuera de las regiones de bucle P.

(Los péptidos insertados de interés se muestran subrayados con los aminoácidos resultantes restantes del transposón Tn5 o Mu insertado, o el sitio de TS manipulado; BG: expresión del ruido de fondo; % de VLP: eficiencia de formación de VLP).

POSICIÓN	Inserción	PÉPTIDO INSERTADO	% de VLP
Q ₇₆ ↑N ₇₇	Tn5	LSLVHILRPQDVYKRQLQG	66
	Tn5-cMyc	LSLVHILRPEQKLISEEDLSRPQDVYKRQLQG	45
	TS-cMyc	TSEQKLISEEDLTS	88
	Tn5-Flag	LSLVHILRPDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKRPQDVYKRQLQG	55
	TS-Flag	TSDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKTS	77
T ₁₁₂ ↑L ₁₁₃	Tn5	PVSCTHLAAARCVQETAST	56
	Tn5-cMyc	PVSCTHLAAEQKLISEEDLSPAARCVQETAST	22
	TS-cMyc	TSEQKLISEEDLTS	71
	Tn5-Flag	PVSCTHLAATS DYKDDDDKGGSSDYKDDDDK TSSPAARCVQETAST	BG
	TS-Flag	TSDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKTS	80
A ₁₁₉ ↑L ₁₂₀	Tn5	PVSCTHLAAARCVQETVYA	116
	Tn5	PVSCTHLAAEQKLISEEDLSPAARCVQETVYA	33
	Tn5-cMyc	TSEQKLISEEDLTS	100
	TS-cMyc	PVSCTHLAATS DYKDDDDKGGSSDYKDDDDK TSSPAARCVQETVYA	25
	Tn5-Flag	TSDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKTS	97
G ₁₈₈ ↑L ₁₈₉	Tn5	PVSCTHLAAARCVQETAIG	37
	Tn5-cMyc	PVSCTHLAAEQKLISEEDLSPAARCVQETAIG	BG
	TS-cMyc	TSEQKLISEEDLTS	43
	Tn5-Flag	PVSCTHLAATS DYKDDDDKGGSSDYKDDDDK TSSPAARCVQETAIG	25
	TS-Flag	TSDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKTS	43
I ₁₈₄ ↑P ₁₈₅	Mu	ICGR TIP	65
	Mu-cMyc	ICGPTEQKLISEEDLSGR TIP	56
	cMyc	TSEQKLISEEDLSTS	63
	Mu-Flag	ICGP DYKDDDDKGGSSDYKDDDDK SGR TIP	64
	Flag	TSDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKTS	70
L ₃₇₉ ↑A ₃₈₀	Mu	LRPHELA	65
	Mu-cMyc	LRPTEQKLISEEDLSRPHELA	56
	cMyc	TSEQKLISEEDLSTS	67
	Mu-Flag	LRP DYKDDDDKGGSSDYKDDDDK SRPHELA	56
	Flag	TSDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKTS	63

Ejemplo 8: VLP de VP2 quiméricas que incorporan inserciones de VP2 múltiples.

5 Con el fin de evaluar la capacidad de VLP de VP2 para incorporar inserciones de péptido en dos sitios diferentes, se generaron una serie de construcciones como se muestra en la Figura 4. Se digirieron los plásmidos pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₅₄) y pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑cMyc↑G₂₅₄) con enzimas de restricción *RsrII* y *NarI*. Se purificaron y clonaron fragmentos de ADN que codifican la parte del extremo N terminal de VP2 que incluye las inserciones en H₂₅₃↑G₂₅₄ en plásmidos pESC-URA/VP2(A₃₂₁↑Flag↑G₃₂₂) y pESC-URAA/P2(A₃₂₁↑cMyc↑G₃₂₂) digeridos con *RsrII*, *NarI*. Los plásmidos resultantes, concretamente, pESC-10 URAA/P2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₅₄/A₃₂₁↑Flag↑G₃₂₂), pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₅₄/A₃₂₁↑cMyc↑G₃₂₂), pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑cMyc↑G₂₅₄/A₃₂₁↑Flag↑G₃₂₂) y pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑cMyc↑G₂₅₄/A₃₂₁↑cMyc↑G₃₂₂), se usaron para transformar la cepa Y449 de *S. cerevisiae* para evaluar la expresión de VP2 y la capacidad de formación de VLP de VP2 quiméricas por ELISA de VLP cuantitativa. Como se muestra en la Tabla 8, proteínas VP2 452 con dos inserciones de región de bucle P son capaces de formar VLP. En general, se observó que la segunda inserción redujo la eficiencia de formación de VLP ligeramente, pero se formaron VLP en todos los casos con eficiencias iguales o superiores al 20%, y la presencia de VLP se confirmó por análisis de ME.

Tabla 8: Capacidad de producción de VLP de construcciones de VP2 con inserciones múltiples.

(Los péptidos de núcleo se muestran en negrita y subrayados; % de VLP: eficiencia de formación de VLP).

POSICIÓN DE INSERCIÓN (SECUENCIA DE PÉPTIDOS INSERTADA)	POSICIÓN DE INSERCIÓN (SECUENCIA DE PÉPTIDOS INSERTADA)	% de VLP
H ₂₅₃ ↑Flag↑G ₂₅₄ (TSDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKTS)	ninguna	100
	A ₃₂₁ ↑Flag↑G ₃₂₂ (TSDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKTS)	66
	A ₃₂₁ ↑cMyc↑G ₃₂₂ (TSEQKLISEEDLTS)	45
H ₂₅₃ ↑cMyc↑G ₂₅₄ (TSEQKLISEEDLTS)	ninguna	84
	A ₃₂₁ ↑Flag↑G ₃₂₂ (TSDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKTS)	33
	A ₃₂₁ ↑cMyc↑G ₃₂₂ (TSEQKLISEEDLTS)	82
ninguna	A ₃₂₁ ↑Flag↑G ₃₂₂ (TSDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKTS)	62

)	
	A ₃₂₁ ↑cMyc↑G ₃₂₂ (TSEQKLISEEDLTS)	67

Ejemplo 9: VLP de VP2 quiméricas resultantes de proteínas de fusión VP2 quiméricas que incorporan la inserción o sustitución con un péptido de interés, además de un péptido de interés terminalmente fusionado.

5 Para probar la posibilidad de combinar inserciones o sustituciones de VP2 con fusiones terminales, se prepararon una serie de construcciones de inserción o sustitución de VP2 con fusiones de péptidos del extremo N o C terminal como se muestra en la Figura 5. Para la construcción de un sitio de fusión del extremo C terminal, se manipularon genéticamente construcciones de ADN que incorporan la inserción de un ADN de interés, Flag o cMyc, dentro de VP2 en el sitio H₂₅₃↑G₂₅₄ o A₃₂₁↑G₃₂₂ y construcciones de ADN que codifican un mutante de sustitución de 4K, que
 10 contiene cuatro restos de lisina en regiones de bucle P, para contener sitios de restricción *NotI* y *HindIII* únicos en el extremo C terminal del gen de VP2 [por ejemplo: pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑cMyc↑G₂₅₄)-*Not Hind*; y pESC-URA/VP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀K)-*Not Hind*]. La doble digestión de los vectores de inserción o sustitución de VP2 con *NotI* - *HindIII* y la religación para incorporar un fragmento lineal de *NotI* - *HindIII* que codifica cMyc o Flag produjo la fusión del extremo C terminal del segundo ADN de interés, o mismo, o en la combinación de la fusión del extremo
 15 C terminal y sustituciones de 4K [por ejemplo: pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₅₄)-Flag; o pESC-URA/VP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀K)-cMyc].

Para la construcción de fusiones del extremo N terminal, construcciones de ADN que incorporan la inserción de un ADN de interés, Flag (SEQ. ID. NO: 2) o cMyc (SEQ. ID. NO: 3), dentro de VP2 en el sitio H₂₅₃↑G₂₅₄ o A₃₂₁↑G₃₂₂,
 20 H₂₅₃↑G₂₅₄ y construcciones de ADN que codifican el mutante de sustitución de 4K, se digirieron con *EcoRI*, situada inmediatamente en la dirección 5' del codón de iniciación, y se ligaron a un fragmento de ADN que codifica Flag con extremos cohesivos de *EcoRI*. La transformación del producto de ligación en *E. coli* supercompetentes condujo al aislamiento de plásmidos que codifican mutantes con fusiones Flag del extremo N terminal en combinación con inserciones o sustituciones de VP2 [por ejemplo: pESC-URA/Flag-VP2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₅₄); o pESC-URA/Flag-VP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀K)]. La transformación de todas las construcciones en Y449 de *S. cerevisiae* y el aislamiento de colonias de levadura transformadas fue seguido de la evaluación de la eficiencia de producción de VLP, como se muestra en la Tabla 11. En general, la fusión de un péptido de interés con el extremo C terminal redujo la eficiencia de formación de VLP, pero se formaron VLP en todos los casos con eficiencias iguales o superiores al 20%, y la presencia de VLP se confirmó por microscopía electrónica (ME).
 30

Tabla 9. Capacidad de producción de VLP de construcciones de VP2 que incorporan la inserción de un péptido de interés y una fusión del extremo C o N terminal de un segundo péptido de interés.

(% de VLP: eficiencia de formación de VLP; BG: expresión del ruido de fondo; NT: no probado)		
POSICIÓN DE INSERCIÓN (SECUENCIA DE PÉPTIDOS INSERTADA)	POSICIÓN DE FUSIÓN TERMINAL (SECUENCIA DE PÉPTIDOS INSERTADA)	% de VLP
H ₂₅₃ ↑Flag↑G ₂₅₄ (TSDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSTS)	Ninguna	100
	R ₄₅₂ ↑Flag(SSGDYKDDDDK)	23
	R ₄₅₂ ↑cMyc(SSGDYKDDDDK)	30
	Flag↑M ₁ (MDYKDDDDKGNSEF)	45
A ₃₂₁ ↑Flag↑G ₃₂₂ (TSDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSTS)	Ninguna	62
	R ₄₅₂ ↑Flag(SSGDYKDDDDK)	67
	R ₄₅₂ ↑cMyc(SSGDYKDDDDK)	NT
	Flag↑M ₁ (MDYKDDDDKGNSEF)	34
H ₂₅₃ ↑cMyc↑G ₂₅₄ (TSEQKLISEEDLSTS)	Ninguna	84
	R ₄₅₂ ↑Flag(SSGDYKDDDDK)	55
	R ₄₅₂ ↑cMyc(SSGDYKDDDDK)	30
	Flag↑M ₁ (MDYKDDDDKGNSEF)	78
A ₃₂₁ ↑cMyc↑G ₃₂₂ (TSEQKLISEEDLTSTS)	Ninguna	67
	R ₄₅₂ ↑Flag(SSGDYKDDDDK)	85
	R ₄₅₂ ↑cMyc(SSGDYKDDDDK)	NT
	Flag↑M ₁ (MDYKDDDDKGNSEF)	56
Q ₂₂₁ K-H ₂₅₃ K-G ₂₈₅ K-H ₃₂₀ K (4K)	Ninguna	45
	R ₄₅₂ ↑Flag(SSGDYKDDDDK)	34
	R ₄₅₂ ↑cMyc(SSGDYKDDDDK)	40
	Flag↑M ₁ (MDYKDDDDKGNSEF)	55

Ejemplo 10: Producción en baculovirus de VLP T=13 que incorporan inserciones de VP2 y fusiones terminales de VP3 por expresión de genes de poliproteína pVP2-VP4-VP3 quimérica.

35 Para la generación de VLP T=13 de IBDV que incorporan inserciones de péptidos de interés dentro de VP2, se construyeron plásmidos para la expresión de la poliproteína pVP2-VP4-VP3 de IBDV. Más específicamente, se usaron plásmidos de expresión de baculovirus, concretamente pFastBacDual (pFBD) de Invitrogen™, y genes sintéticos de pVP2 (SEQ. ID. NO: 21), VP4 (SEQ. ID. NO: 23) y VP3 (SEQ. ID. NO: 25) de la cepa Soroa de IBDV en
 40

pUC57 (NCIB N.º AAD30136) clonados como se muestra en las Figuras 6, 7 y 8, para la construcción plásmidos de pFBD/poliproteínas pVP2-VP4-VP3 [es decir: pFBD/pVP2-VP4-VP3-pp]. La construcción de plásmidos se expone brevemente en la Figura 9 y del siguiente modo:

- 5 En una primera etapa, se clonó el gen que codifica pVP2 de 512 aminoácidos de longitud completa (SEQ. ID. NO: 21) en el plásmido de pFBD en la dirección 3' del promotor de PH. El plásmido pUC57-pVP2 se digirió con enzimas de restricción *Bgl*II y *Hind*III y el fragmento de ADN se clonó en el plásmido pFBD digerido con *Bam*HI y *Hind*III generando pFBD/pVP2-pp.
- 10 En una segunda etapa, se clonaron los genes de proteínas de fusión VP3 en pFBD/VP2 en la dirección 3' del gen de pVP2. Se obtuvieron por PCR fragmentos de ADN que codifican VP3-Flag y VP3-cMyc usando el gen de VP3 sintético (pUC57-VP3) mostrado en la Figura 8 como molde y cebadores de oligonucleótidos BV VP3 5' *Hind*III (SEQ. ID. NO: 10) y BV VP3-Flag 3'*Hind*III (SEQ. ID. NO: 11), BV VP3-cMyc 3'*Hind*III (SEQ. ID. NO: 12), respectivamente, como se muestra en la Figura 9. Se digirieron fragmentos de ADN purificados con enzimas de restricción *Hind*III y se clonaron en pFBD/pVP2-pp digerido con *Hind*III generando pFBD/pVP2-VP3-Flag-pp y pFBD/pVP2-VP3-cMyc-pp.

- 20 En una tercera etapa, se clonaron fragmentos de ADN que codifican las inserciones de VP2 en plásmidos pFBD/pVP2-VP3(X)-pp. Para este fin, se digirieron plásmidos de inserción de bucle [por ejemplo: pFBD/VP2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₅₄); pFBD/VP2(H₂₅₃↑cMyc↑G₂₅₄); o pFBD/VP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀K)] con la enzima de restricción *Rsr*II y *Nco*I, que corta dentro del gen de VP2 en las posiciones de aminoácidos G₂₄-H₃₃₈ y se clonó el fragmento de gen de VP2 purificado en plásmidos pFBD/pVP2-VP3-Flag-pp y pFBD/pVP2-VP3-cMyc-pp digeridos con *Rsr*II y *Nco*I, generando los plásmidos pFBD/pVP2(H₂₅₃↑Flag o Myc↑G₂₅₄)-VP3-Flag-pp, pFBD/pVP2(H₂₅₃↑Flag o Myc↑G₂₅₄)-VP3-cMyc-pp, pFBD/pVP2(A₃₂₁↑Flag o Myc↑G₃₂₂)-VP3-Flag-pp, pFBD/pVP2(A₃₂₁↑Flag o Myc↑G₃₂₂)-VP3-cMyc-pp, pFBD/pVP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀K)-VP3-Flag-pp y pFBD/pVP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀-K)-VP3-cMyc-pp, como se muestra en la Figura 9.

- 30 En una etapa final de la construcción, se insertó el gen de VP4 entre los genes de pVP2 y VP3 para crear el marco de lectura abierto de pVP2-VP4-VP3. Para llevar a cabo esto, se digirió el plásmido pUC57-VP4 con enzimas de restricción *Pvu*II y *Bsg*I y el fragmento de ADN de pVP4 se clonó en plásmidos pFBD/pVP2(X)-VP3-X digeridos con *Pvu*II y *Bsg*I (por ejemplo pFBD/pVP2(H₂₅₃↑Flag o Myc↑G₂₅₄)-VP3-Flag-pp y pFBD/pVP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀-K)-VP3-cMyc-pp)

- 35 Los plásmidos resultantes [por ejemplo: pFBD/pVP2(H₂₅₃↑Flag o Myc↑G₂₅₄)-VP4-VP3-Flag-pp y pFBD/pVP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀-K)-VP4-VP3-cMyc-pp] se introdujeron en baculovirus recombinantes (rBV) que en el transcurso de su ciclo de replicación expresaron las poliproteínas pVP2(X)-VP4-VP3-X. Se llevó a cabo la producción de VLP en células de insecto infectadas por rBV y la purificación de VLP T=13 siguiendo procedimientos convencionales.

- 40 Brevemente, se infectaron cultivos de células de insecto H5 (Invitrogen™) con rBV a una multiplicidad de infección de 5 ufp/célula. 30 h después de la infección, las células se recogieron, se lisaron y la VLP se purificó por centrifugación en gradiente de sacarosa. Se evaluó la capacidad de formación de VLP T13 para todas las construcciones por ELISA de VLP y ME de muestras de VLP purificadas. Como se muestra en la Tabla 10, todas las construcciones probadas produjeron VLP T=13, lo que indica que las proteínas de fusión VP2 químicas que contienen inserciones son de hecho compatibles con la formación de VLP T=13 y además que VLP T=13 puede prepararse para incorporar la combinación de péptidos de interés insertados en VP2 y fusionados con VP3.

Tabla 10: Capacidad de producción de VLP de VLP T=13 que incorpora inserciones de VP2 y fusiones terminales de VP3 y producidas por la expresión del gen de poli-proteína pVP2-VP4-VP3 en baculovirus.

(* % de eficiencia de formación de VLP en comparación con pVP2-HisVP3 generada por co-expresión de pVP2 y VP3).			
POSICIÓN DE INSERCIÓN (SECUENCIA DE PÉPTIDOS INSERTADA)	Fusión de VP3	POSICIÓN/SECUENCIAS DE PÉPTIDOS	% de VLP*
H ₂₅₃ ↑Flag↑G ₂₅₄ (TSDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKTS)	VP3-Flag	E ₂₅₉ /SSGDYKDDDDK	80
	VP3-cMyc	E ₂₅₉ /EQKLISEEDL	92
H ₂₅₃ ↑cMyc↑G ₂₅₄ (TSEQKLISEEDLTS)	VP3-Flag	E ₂₅₉ /SSGDYKDDDDK	77
	VP3-cMyc	E ₂₅₉ /EQKLISEEDL	55
A ₃₂₁ ↑Flag↑G ₃₂₂ (TSDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKTS)	VP3-Flag	E ₂₅₉ /SSGDYKDDDDK	44
	VP3-cMyc	E ₂₅₉ /EQKLISEEDL	77
A ₃₂₁ ↑cMyc↑G ₃₂₂ (TSEQKLISEEDLTS)	VP3-Flag	E ₂₅₉ /SSGDYKDDDDK	82
	VP3-cMyc	E ₂₅₉ /EQKLISEEDL	76
Q ₂₂₁ K-H ₂₅₃ K-G ₂₈₅ K-H ₃₂₀ K (4K)	VP3-Flag	E ₂₅₉ /SSGDYKDDDDK	66
	VP3-cMyc	E ₂₅₉ /EQKLISEEDL	45

- 50 **Ejemplo 11: Producción en *S. cerevisiae* de levadura de VLP T=13 que incorporan una inserción de VP2 y VP3 terminalmente fusionada con el extremo N y C terminal.**

Para la generación de VLP T=13 que incorporan inserciones de péptidos de interés dentro de VP2, se construyeron plásmidos para la co-expresión de VP2 y VP3 de genes separados. Se usaron plásmidos de expresión individuales, concretamente pESC-URA de Stratagene™, que permitió la expresión en levadura. Se clonaron genes sintéticos para pVP2-512 (SEQ. ID. NO: 21) y VP3 (SEQ. ID. NO: 25) de la cepa Soroa de IBDV en pUC57 (NCIB N.º AAD30136) como se muestra en las Figuras 6 y 8, y se usaron para las construcciones de plásmido. La construcción de plásmidos se expone brevemente en la Figura 10.

En una primera etapa, la construcción de plásmidos pESC-URA/pVP2-VP3, se clonaron genes de proteínas de fusión VP3 en pESC-URA en la dirección 3' del promotor GAL10 (MSC1). Se obtuvieron fragmentos de ADN que codifican His-VP3, His-VP3-Flag y His-VP3-cMyc por PCR usando el gen de VP3 sintético (pUC57-VP3) mostrado en la Figura 8 como molde y cebadores de oligonucleótidos Y His-VP3 5'(SEQ. ID. NO: 13) y Y VP3 3'(SEQ. ID. NO: 14), Y VP3-Flag 3'(SEQ. ID. NO: 15), Y VP3-cMyc 3 (SEQ. ID. NO: 16), respectivamente, como se muestra en la Figura 1. Los fragmentos de ADN purificados se digirieron con enzimas de restricción *NotI* y *SacI* y se clonaron en pESC-URA digerido con *NotI* y *SacI* generando los siguientes plásmidos de pESC-URA/ His-VP3(X), pESC-URA/ His-VP3, pESC-URA/ His-VP3-Flag y pESC-URA/ His-VP3-cMyc.

En una segunda etapa, se clonó el gen que codifica pVP2 de 512 aminoácidos de longitud completa en plásmidos pESC-URA/His-VP3-X, donde X es el ADN de interés de ejemplo, concretamente cMyc (SEQ. ID. NO: 3) o Flag (SEQ. ID. NO: 2), en la dirección 3' del promotor GAL1 (MCS2). El plásmido pUC57-pVP2 se digirió con enzimas de restricción *BglI* y *HindIII* y el fragmento de ADN se clonó en plásmidos pESC-URA/His-VP3-X digeridos con *BamHI* y *HindIII*, generando los siguientes plásmidos de pESC-URA/pVP2-VP3-X, pESC-URA/pVP2-His-VP3, pESC-URA/pVP2-His-VP3-Flag y pESC-URA/pVP2-His-VP3-cMyc.

En una tercera etapa, se clonaron fragmentos de ADN que codifican las inserciones de VP2 en plásmidos pESC-URA/pVP2-His-VP3-X. Para este fin, se digirieron plásmidos de inserción de bucle [por ejemplo: pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₅₄), o pESC-URA/VP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀K)] con las enzimas de restricción *RsrII* y *MscI*, que se cortaron dentro del gen de VP2 en las posiciones de aminoácidos G₂₄-W₄₁₄ y se clonó el fragmento de gen de VP2 purificado en plásmidos pESC-URA/pVP2-His-VP3-X digeridos con *RsrII* y *MscI*.

Se usaron los plásmidos resultantes, concretamente pESC-URA/pVP2(H₂₅₃↑Flag o cMyc↑G₂₅₄)-His-VP3, pESC-URA/pVP2(A₃₂₁↑Flag o cMyc↑G₃₂₂)-His-VP3, pESC-URA/pVP2(H₂₅₃↑Flag o cMyc↑G₂₅₄)-His-VP3-Flag, pESC-URA/pVP2(H₂₅₃↑Flag o cMyc↑G₂₅₄)-His-VP3-cMyc, pESC-URA/pVP2(A₃₂₁↑Flag o cMyc↑G₃₂₂)-His-VP3-Flag, pESC-URA/pVP2(A₃₂₁↑Flag o cMyc↑G₃₂₂)-His-VP3-cMyc, pESC-URA/VP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀K)-His-VP3, pESC-URA/VP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀K)-His-VP3-Flag y pESC-URA/VP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀K)-His-VP3-cMyc, para transformar Y449 de *S. cerevisiae* para evaluar la expresión de VP2/VP3 y la capacidad de formación de VLP por ELISA de VLP cuantitativa usando extractos de células de levadura totales. Se confirmó la formación de T=13 por ME de muestras de VLP purificadas y se compararon con la formación de VLP de una construcción de pVP2-His-VP3 que carece de inserciones de VP2. Como se muestra en la Tabla 11, todas las construcciones probadas produjeron la formación de VLP T=13 con grados de eficiencia variables por encima del 20% que indican que las proteínas de fusión VP2 quiméricas que contienen inserciones son de hecho compatibles con la formación de VLP T=13 en levadura, y además que VLP T=13 puede prepararse para incorporar proteínas de fusión VP2 quiméricas y VP3 quimérica.

Tabla 11. Capacidad de producción de VLP de VLP T=13 que incorporan inserciones de VP2 y fusiones terminales de VP3 generadas por expresión de pVP2 y VP3 en levadura.

(* % de eficiencia de formación de VLP en comparación con pVP2-HisVP3 generado por co-expresión de pVP2 y VP3).			
POSICIÓN DE INSERCIÓN (SECUENCIA DE PÉPTIDOS INSERTADA)	Fusión de VP3	POSICIÓN / SECUENCIAS DE PÉPTIDO	% de VLP*
H ₂₅₃ ↑Flag↑G ₂₅₄ (<u>TSDYKDDDDKSGGGSSDYKDDDDKSTS</u>)	His-VP3	His-VP3:M ₁ /HHHHHHSSG	44
	His-VP3-Flag	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /SSGDYKDDDDK	23
	His-VP3-cMyc	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /EQKLISEEDL	12
H ₂₅₃ ↑cMyc↑G ₂₅₄ (<u>TSEQKLISEEDLSTS</u>)	His-VP3	His-VP3:M ₁ /HHHHHHSSG	66
	His-VP3-Flag	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /SSGDYKDDDDK	62
	His-VP3-cMyc	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /EQKLISEEDL	44
A ₃₂₁ ↑Flag↑G ₃₂₂ (<u>TSDYKDDDDKSGGGSSDYKDDDDKSTS</u>)	His-VP3	His-VP3:M ₁ /HHHHHHSSG	53
	His-VP3-Flag	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /SSGDYKDDDDK	42
	His-VP3-cMyc	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /EQKLISEEDL	66
A ₃₂₁ ↑cMyc↑G ₃₂₂ (<u>TSEQKLISEEDLSTS</u>)	His-VP3	His-VP3:M ₁ /HHHHHHSSG	22
	His-VP3-Flag	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /SSGDYKDDDDK	12
	His-VP3-cMyc	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /EQKLISEEDL	59
Q ₂₂₁ K-H ₂₅₃ K-G ₂₈₅ K-H ₃₂₀ K (4K)	His-VP3	His-VP3:M ₁ /HHHHHHSSG	55
	His-VP3-Flag	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /SSGDYKDDDDK	33
	His-VP3-cMyc	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /EQKLISEEDL	56

Ejemplo 12: Expresión de proteínas de fusión VP2 quiméricas y VP3 en baculovirus para la producción de VLP T=13 que incorporan inserciones de VP2 y fusiones terminales de VP3.

Para la generación de VLP T=13 de IBDV que incorporan inserciones de péptidos de interés dentro de VP2, se construyeron plásmidos para la co-expresión de VP2 de IBDV y VP3 de genes separados. Se usaron plásmidos de expresión individuales, concretamente pFastBacDual (pFBD) de Invitrogen™, que permitió la expresión en células de insecto. Se usaron genes sintéticos para pVP2 512 (SEQ. ID. NO: 21) y VP3 (SEQ. ID. NO: 25) de la cepa Soroa de IBDV clonada en pUC57 (NCIB N.º AAD30136) como se muestra en las Figuras 6 y 8 para las construcciones de plásmido (véase la Figura 11) del siguiente modo:

En una primera etapa en la construcción de plásmidos pFBD/pVP2-VP3, se clonaron genes de proteínas de fusión VP3 en pFBD en la dirección 3' del promotor p10. Se obtuvieron fragmentos de ADN que codifican His-VP3, His-VP3-Flag y His-VP3-cMyc por PCR usando el gen de VP3 sintético (pUC57-VP3) mostrado en la Figura 6 como molde y cebadores de oligonucleótidos BV His-VP3 5'(SEQ. ID. NO: 17) y BV VP3 3'(SEQ. ID. NO: 18), BV VP3-Flag 3' (SEQ. ID. NO: 19), BV VP3-cMyc 3' (SEQ. ID. NO: 20), respectivamente, como se muestra en la Figura 2.

Se digirieron fragmentos de ADN purificados con enzimas de restricción *SmaI* y *KpnI* y se clonaron en pFBD digerido con *SmaI* y *KpnI* generando plásmidos pFBD/His-VP3-X, donde X es ADN de interés, concretamente, Flag (SEQ. ID. NO: 2) de cMyc (SEQ. ID. NO: 3).

En una segunda etapa, se clonó el gen que codifica la VP2 de 512 aminoácidos de longitud completa en plásmidos pFBD/ His-VP3-X en la dirección 3' del promotor PH. Se digirió plásmido pUC57-pVP2 con enzimas de restricción *BglII* y *HindIII* y el fragmento de ADN se clonó en plásmidos pFBD/VP3-X digeridos con *BamHI* y *HindIII* generando los siguientes plásmidos de pFBD/pVP2-His-VP3-X, pFBD/pVP2-His-VP3, pFBD/pVP2-His-VP3-Flag y pFBD/pVP2-His-VP3-cMyc.

En una tercera etapa, se clonaron fragmentos de ADN que codifican las inserciones de VP2 en plásmidos de pFBD/pVP2-VP3-X. Para este fin, se digirieron plásmidos de inserción de bucle [por ejemplo: pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₅₄); pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑cMyc↑G₂₅₄ o pESC-URA/VP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀K)] con la enzima de restricción *RsrII* y *NcoI*, que corta dentro del gen de VP2 en las posiciones de aminoácidos G₂₄-H₃₃₈ y el fragmento de gen de VP2 purificado se clonó en plásmidos pFBD/pVP2-His-VP3-X digeridos con *RsrII* y *NcoI*.

Los plásmidos resultantes, mostrados en la Figura 11, concretamente pFBD/pVP2(H₂₅₃↑Flag o cMyc↑G₂₅₄)-His-VP3, pFBD/pVP2(H₂₅₃↑Flag o cMyc↑G₂₅₄)-His-VP3-Flag, pFBD/pVP2(H₂₅₃↑Flag o cMyc↑G₂₅₄)-His-VP3-cMyc, pFBD/pVP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀K)-His-VP3, pFBD/pVP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀K)-VP3-Flag y pFBD/pVP2(Q₂₂₁K-H₂₅₃K-G₂₈₅K-H₃₂₀K)-His-VP3-cMyc, se introdujeron en baculovirus recombinantes (rBV) que en el transcurso de su ciclo de replicación expresaron ambas proteínas, fusiones de VP2 y fusiones de VP3, simultáneamente. Se llevó a cabo el mismo procedimiento con inserciones de Flag y cMyc VP2 en la localización A₃₂₁↑G₃₂₂ como se muestra en la Figura 11. Se llevó a cabo la producción de VLP en células de insecto infectadas por rBV y la purificación de VLP T=13 siguiendo los procedimientos convencionales. Brevemente, se infectaron cultivos de células de insecto H5 (Invitrogen™) con rBV a una multiplicidad de infección de 5 ufp/célula. 30 h después de la infección, las células se recogieron, se lisaron y se purificaron VLP por centrifugación en gradiente de sacarosa. Se evaluó la capacidad de formación de VLP T13 para todas las construcciones por ELISA y TEM de muestras de VLP purificadas y se comparó con la formación de VLP de una construcción de pVP2-His-VP3 que carece de inserciones de VP2 (véase la Figura 12). Como se muestra en la Tabla 12, todas las construcciones probadas produjeron VLP T=13 con eficiencias de formación superiores al 20%, lo que indica que las inserciones de VP2 son de hecho compatibles con la formación de VLP T=13 en células infectadas por baculovirus y además que VLP T=13 puede prepararse para incorporar la combinación de péptidos de interés insertada en V=VP2 y fusionada con VP3.

Tabla 12: Capacidad de producción de VLP de VLP T=13 que incorporan inserciones de VP2 y fusiones terminales de VP3 generadas por co-expresión de pVP2 y VP3.

(* % de eficiencia de formación de VLP en comparación con pVP2-HisVP3 generado por co-expresión de pVP2 y VP3).			
POSICIÓN DE INSERCIÓN (SECUENCIA DE PÉPTIDOS INSERTADA)	Fusión de VP3	POSICIÓN / SECUENCIAS DE PÉPTIDOS	% VLP*
H ₂₅₃ ↑Flag↑G ₂₅₄ (TSDYKDDDDKGGSSDYKD DDDKSTS)	His-VP3	His-VP3:M ₁ /HHHHHHSSG	66
	His-VP3-Flag	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /SSGDYKDDDDK	45
	His-VP3-cMyc	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /EQKLISEEDL	35
H ₂₅₃ ↑cMyc↑G ₂₅₄ (TSEQKLISEEDLSTS)	His-VP3	His-VP3:M ₁ /HHHHHHSSG	78
	His-VP3-Flag	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /SSGDYKDDDDK	55
	His-VP3-cMyc	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /EQKLISEEDL	34

(* % de eficiencia de formación de VLP en comparación con pVP2-HisVP3 generado por co-expresión de pVP2 y VP3).			
POSICIÓN DE INSERCIÓN (SECUENCIA DE PÉPTIDOS INSERTADA)	Fusión de VP3	POSICIÓN / SECUENCIAS DE PÉPTIDOS	% VLP*
A ₃₂₁ ↑Flag↑G ₃₂₂ (TSDYKDDDDKGGSSDYKD DDDKSTS)	His-VP3	His-VP3:M ₁ /HHHHHHSSG	78
	His-VP3-Flag	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /SSGDYKDDDDK	22
	His-VP3-cMyc	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /EQKLISEEDL	88
A ₃₂₁ ↑cMyc↑G ₃₂₂ (TSEQKLISEEDLSTS)	His-VP3	His-VP3:M ₁ /HHHHHHSSG	33
	His-VP3-Flag	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /SSGDYKDDDDK	56
	His-VP3-cMyc	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /EQKLISEEDL	88
Q ₂₂₁ K-H ₂₅₃ K-G ₂₈₅ K-H ₃₂₀ K (4K)	His-VP3	His-VP3:M ₁ /HHHHHHSSG	55
	His-VP3-Flag	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /SSGDYKDDDDK	33
	His-VP3-cMyc	M ₁ /HHHHHHSSG,E ₂₅₉ /EQKLISEEDL	56

Ejemplo 13: Cribado de array para inserciones contra una biblioteca que incorpora vectores de inserción de VP2 previamente identificados.

5 Para limitar el número de aciertos positivos falsos durante los cribados, se preparó una segunda generación de vectores de inserción de bucle de VP2 para contener un sitio de clonación múltiple (MCS) para la eficiente clonación direccional de un ADN de interés. Para este fin, se digirieron vectores que contienen un sitio *SpeI* en cada una de las posibles posiciones de inserción de VP2 con *SpeI* y se religaron para incorporar una inserción de MCS que permitió la clonación direccional de ADN de interés usando sitios de restricción *NotI* y *SpeI* (véase la Figura 13). La inserción de MCS contuvo varios codones de terminación en marco para garantizar que la religación de vectores que contienen MSC codificaran una proteína VP2 delecionada incapaz de ensamblarse en forma de VLP.

15 Para el cribado de la prueba en array realizada, se sembraron una selección de 7 vectores de inserción de MCS de VP2 en forma de un array, un vector por pocillo, como triplicados en placas de 96 pocillos. La selección de vectores incluyó construcciones con sitios de inserción en las regiones de bucle P de VP2 o fuera de dichas regiones de bucle P de VP2. Se digirieron simultáneamente vectores con *NotI* y *SpeI* durante 2 h en condiciones de tampón apropiado. Tras la inactivación por calor a 65 °C durante 30 minutos, se añadió un fragmento de ADN purificado del péptido de interés, concretamente Flag (SEQ. ID. NO: 2) y cMyc (SEQ. ID. NO: 3), con extremos cohesivos de *NotI* y *SpeI*, y se realizó ligación con T4 ligasa a 16 °C durante 18 h. A cada uno de los pocillos se añadieron 200 µl de Y449 supercompetentes de *S. cerevisiae* para transformación, seguido después de 30 minutos de la adición de 750 µl de medio de cultivo selectivo. Después del cultivo a 30 °C durante 16 h, las células se lisaron por 3 ciclos de congelación-descongelación y se probó la eficiencia de formación de VLP por ELISA de VLP cuantitativo. La eficiencia de expresión de VLP para cada uno de los clones varió para los diferentes vectores según el sitio de inserción como se muestra en la Tabla 13.

25 Se calculó la eficiencia de formación de VLP para cada construcción como un valor promedio de los pocillos triplicados. Los datos obtenidos para los vectores de inserción H₂₅₃↑G₂₅₄, F₂₄₉↑R₂₅₀, T₂₈₆↑D₂₈₇, D₃₂₃↑Q₃₂₄ y G₁₈₈↑L₁₈₉ concordaron bien con los datos de formación de VLP previamente obtenidos para estos vectores (véase la Tabla 1), lo que indica que el cribado de array puede predecir con exactitud el sitio de inserción óptimo para el péptido de interés y que los cribados de array son de hecho una herramienta útil para la identificación de sitio de inserción preferido para un péptido de interés particular.

Tabla 13: La expresión de VLP tras la inserción de un péptido de interés en vectores de inserción de VP2 dispuestos en un formato de array.

(% de VLP: eficiencia de formación de VLP)				
POCILLO	POSICIÓN	DESCRIPCIÓN DE LOCALIZACIÓN /	% de VLP	
			Péptido Flag	Péptido cMyc
1	H ₂₅₃ ↑G ₂₅₄	Bucle P superficial DE	88	85
2	F ₂₄₉ ↑R ₂₅₀	Bucle P superficial DE	BG	25
3	T ₂₈₆ ↑D ₂₈₇	Bucle P superficial FG	70	45
4	D ₃₂₃ ↑Q ₃₂₄	Bucle P superficial HI	55	85
5	Q ₇₆ ↑N ₇₇	Fuera del bucle P	77	54
6	S ₁₁₁ ↑T ₁₁₂	Fuera del bucle P	55	67
7	G ₁₈₈ ↑L ₁₈₉	Fuera del bucle P	34	45

Ejemplo 14: Cribado de conjuntos para inserciones de Flag contra una biblioteca que incorpora la inserción previamente identificada de vectores de VP2.

40 Para el cribado de conjuntos, se mezcló una selección equimolar de ADN de plásmido de 7 vectores de inserción de VP2 previamente seleccionados que contienen un MCS, que incluye un sitio de clonación *NotI*/*SpeI* en el sitio de inserción deseado. La selección de vectores incluyó sitios de clonación de bucle P y fuera del bucle P como se muestra en la Tabla 14. Los vectores reunidos se digirieron con *NotI* y *SpeI* durante 2 h en condiciones de tampón apropiado, se incubaron a 65 °C durante 30 minutos y se purificaron por electroforesis en gel. Se mezcló un

fragmento lineal, con extremos cohesivos de *NotI* y *SpeI*, del ADN de interés que codifica Flag (SEQ. ID. NO: 2) como un péptido de interés de ejemplo, con el conjunto de vectores digeridos y se ligó con T4 ligasa a 16 °C durante 18 h. La transformación de *E. coli* electrocompetente con 1 ul de mezcla de ligación produjo una biblioteca de inserción de VP2 para el péptido de interés que contiene inserción en las 10 localizaciones preseleccionadas diferentes. Se purificó el plásmido de ADN reunido y se transformaron 10 µg en levadura Y449 de *S. cerevisiae* y se sembraron en YNB/CSM-URA + 2% de glucosa. Los clones de levadura aislados se transfirieron a placas que contenían galactosa y las colonias individuales resultantes se transfirieron a una membrana de PVDF para analizar la producción de VLP por inmunotransferencia de colonia contra anticuerpos específicos de VLP de VP2. Se recogieron una selección de 50 clones positivos y se cultivaron individualmente en medio líquido selectivo (YNB/CSM-URA + 2% de galactosa) y se llevó a cabo ELISA de VLP cuantitativo para confirmar la producción de VLP de clones positivos. Se secuenciaron veinte colonias con eficiencias de formación de VLP por encima del 50% para identificar el sitio de inserción dentro de VP2. Los clones positivos confirmados tuvieron inserciones en sitios previamente identificados como preferidos para las inserciones [por ejemplo: H₂₅₃↑G₂₅₄, D₃₂₃↑Q₃₂₄, Q₇₆↑N₇₇] mostradas en la Tabla 14. Por otra parte, no se identificaron clones con inserciones en un sitio de inserción menos preferido [por ejemplo: F₂₄₉↑R₂₅₀] en el cribado de conjuntos, lo que indica que el cribado de array podría predecir con exactitud el sitio de inserción óptimo para un péptido de interés y que los cribados de conjuntos son de hecho una herramienta útil para la identificación de sitios de inserción preferidos para un péptido de interés particular.

Tabla 14: Sitios de inserción de VLP de VP2 preferidos para Flag resultante de un cribado contra un conjunto de 7 vectores de inserción de VP2 previamente identificados.

POSICIÓN	DESCRIPCIÓN DE LOCALIZACIÓN	RESULTADO DEL CRIBADO DE CONJUNTOS / Número de clones identificados con la eficiencia de formación de VLP >50% de control de VP2 452
H ₂₅₃ ↑G ₂₅₄	Bucle P DE	6
F ₂₄₉ ↑R ₂₅₀	Bucle P DE	0
T ₂₈₆ ↑D ₂₈₇	Bucle P FG	2
D ₃₂₃ ↑Q ₃₂₄	Bucle P HI	8
Q ₇₆ ↑N ₇₇	Fuera del bucle P	4
S ₁₁₁ ↑T ₁₁₂	Fuera del bucle P	3
G ₁₈₈ ↑L ₁₈₉	Fuera del bucle P	1

Ejemplo 15: Cribado de inserción de péptidos basados en transposón al azar.

Se dirigió una biblioteca de VP2 452 que contiene inserciones al azar del transposón Mu junto con VP2 452 completa con *NotI* en el sitio único proporcionado por el transposón Mu. El conjunto de plásmidos linealizados se religó para incorporar tres adaptadores de ADN con extremos cohesivos de *NotI* que codifican el péptido Flag (SEQ. ID. NO: 2) o cMyc (SEQ. ID. NO: 3) en cada uno de los tres posibles marcos de lectura. Se usaron 0,5-1 µl de la mezcla de ligación para transformar *Transformax EC100 Electrocompetent E. coli* para obtener una biblioteca de inserción de Flag de VP2 al azar en *E. coli*. La biblioteca se expandió y el ADN de plásmido reunido se purificó y se usaron 10 µg para transformar levadura Y449 de *S. cerevisiae* antes de sembrar en placas de YNB/CSM-URA + 2% de glucosa. Se obtuvieron 10.000 clones de levadura y se transfirieron a placas de selección que contenían galactosa. Las colonias cultivadas en presencia de galactosa se transfirieron a una membrana de PVDF para analizar la expresión de VP2 y la formación de VLP por inmunotransferencia de colonias. Se cultivaron individualmente una selección de 180 clones positivos en medio líquido selectivo o (YNB/CSM-URA + 2% de galactosa) y se llevó a cabo ELISA de VLP cuantitativo para confirmar la producción de VLP de clones positivos. 16 muestras de los clones positivos seleccionados del cribado de Flag y cMyc mostraron eficiencias de formación de VLP por encima del 50% del control de VP2 452 y el gen de VP2 quimérica de estos clones se secuenció para identificar el sitio de inserción. La Tabla 15 muestra la capacidad de producción de VLP de inserciones de VP2 del péptido Flag resultantes de un cribado de inserción de péptidos basados en transposón al azar.

Como se muestra en la Tabla 15, algunos de los clones positivos confirmados contuvieron la inserción del péptido de interés, Flag (SEQ. ID. NO: 2), en sitios preferidos previamente identificados tales como M₁↑T₂, I₁₈₄↑P₁₈₅, G₁₈₈↑L₁₈₉, L₄₃₆↑K₄₃₇, mientras que otros mostraron inserciones en localizaciones previamente no identificadas de las regiones de bucle P. Dos clones en las posiciones de inserción I₁₈₄↑P₁₈₅, L₃₇₉↑A₃₈₀ mostraron la inserción de dos copias indicando que éstas podrían ser el sitio de inserción preferido para grandes inserciones. Se encontraron tres clones de inserción de Flag independientes en dos sitios de inserción previamente identificados (I₁₈₄↑P₁₈₅, L₄₃₆↑K₄₃₇) sugiriendo que estos sitios constituyen un sitio de inserción preferido fuera de la región de bucle P.

Tabla 15: Capacidad de producción de VLP de las inserciones de VP2 de péptido Flag resultantes de un cribado de inserción de péptidos basados en transposón.

(Se muestran péptidos insertados de interés subrayados con los restantes aminoácidos resultantes del transposón Mu insertado; % de VLP: eficiencia de formación de VLP).

POSICIÓN DE INSERCIÓN	SECUENCIA INSERTADA	% DE VLP
M ₁ ↑T ₂	MMR P <u>DYKDDDDK</u> KGSGSSDYKDDDDK SRPHMT	77
Q ₉ ↑Q ₁₀	QCG P <u>DYKDDDDK</u> KGSGSSDYKDDDDK SGRTQQ	79

(Se muestran péptidos insertados de interés subrayados con los restantes aminoácidos resultantes del transposón Mu insertado; % de VLP: eficiencia de formación de VLP).		
POSICIÓN DE INSERCIÓN	SECUENCIA INSERTADA	% DE VLP
I ₁₈₄ ↑P ₁₈₅	SCGPDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSGPDYKDDDDKGGSSDYKDD DKSGRTI	87
I ₁₈₄ ↑P ₁₈₅	ICGPDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSGRTIP	63
I ₁₈₄ ↑P ₁₈₅	ICGPDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSGRTIP	54
G ₁₈₈ ↑L ₁₈₉	GCGPDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSGRIGL	85
A ₂₁₁ ↑D ₂₁₂	AAADYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSPAAAAD	59
D ₂₈₇ ↑N ₂₈₈	DAADYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSPAATDN	52
G ₃₂₂ ↑D ₃₂₃	GAADYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSGAAGD	33
L ₃₇₉ ↑A ₃₈₀	LRPDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSRPDYKDDDDKGGSSDYKDDDDK SRPHELA	39
L ₄₃₆ ↑K ₄₃₇	LNAADYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSRPHLK	67
L ₄₃₆ ↑K ₄₃₇	LMRPDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSPHLK	77
L ₄₃₆ ↑K ₄₃₇	LNAADYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSRPHLK	57
F ₄₄₄ ↑K ₄₄₅	FCGPDYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSSRSFK	70
D ₄₄₆ ↑I ₄₄₇	DAADYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSAKDI	100
I ₄₄₇ ↑I ₄₄₈	IAADYKDDDDKGGSSDYKDDDDKSPAADII	88

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> CHIMERA PHARMA, S.L.U
 - <120> Proteínas de fusión quiméricas y partículas similares a virus de VP2 de Birnavirus
 - <130> Referencia de la solicitud
 - <160> 26
 - <170> PatentIn version 3.3
 - <210> 1
 - 10 <211> 2
 - <212> PRT
 - <213> Artificial
 - <220>
 - <223> péptido TS
 - 15 <400> 1
- Thr Ser
- 1
- <210> 2
 - <211> 23
 - <212> PRT
 - 20 <213> Artificial
 - <220>
 - <223> péptido Flag
 - <400> 2
- Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Gly Ser Ser Asp Tyr
- 1 5 10 15
- Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ser
- 20
- 25 <210> 3
 - <211> 11
 - <212> PRT
 - <213> Artificial
 - <220>
 - 30 <223> péptido cMyc
 - <400> 3
- Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser
- 1 5 10
- <210> 4
 - <211> 15
 - 35 <212> PRT
 - <213> Artificial

ES 2 659 586 T3

<220>
 <223> péptido V5
 <400> 4

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Ser

1 5 10 15

5 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

10 <223> péptido VSV-G
 <400> 5

Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys Ser

1 5 10

15 <210> 6
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido VP2-452EcoRI-fw
 <400> 6

20 gcccggaattc atgacaaacc tgtcagatca aacc 34
 <210> 7
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido VP2-452NotI-rev
 <400> 7

30 gcccgcgggcc gcttacctta tggcccggat tatgtc 36
 <210> 8
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido VP2 456-rev
 <400> 8

40 gcccgcgggcc gcttacacag ctatcctct tatggcccg 39
 <210> 9
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido VP2 441-rev
 <400> 9

50 gcccgcgggcc gcttatgctc ctgcaatctt caggggaga 39
 <210> 10
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido BV VP3 5' HindIII
 <400> 10

60 ctgaaagctt tcaactcaagg tcctcatcag ag 32
 <210> 11
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Artificial

65 <220>
 <223> Oligonucleótido BV VP3-Flag 3'HindIII
 <400> 11

ctgaaagctt tcatttatca tcatcatctt tataatcacc tgatgactca aggtcctcat 60

cagag 65

ES 2 659 586 T3

5	<p><210> 12 <211> 62 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Oligonucleótido BV VP3-c-Myc 3' <i>HindIII</i> <400> 12</p>	<p>ctgaaagctt tcacaaatct tcttcggaaa tcaattttg ttctcaagg tcctcatcag 60 ag 62</p>
10	<p><210> 13 <211> 60 <212> ADN <213> Artificial <220></p>	
15	<p><223> Oligonucleótido Y His-VP3 5' <400> 13 atcgcgccg catgcatcat catcatcatc acagcagcgg cgctgcatca gaggtaaag 60</p>	
20	<p><210> 14 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Oligonucleótido Y VP3 3' <400> 14</p>	
25	<p>ctgagagctc tcaactcaagg tcctcatcag ag 32 <210> 15 <211> 65 <212> ADN <213> Artificial</p>	
30	<p><220> <223> Oligonucleótido Y VP3-Flag 3' <400> 15</p>	
	<p>ctgagagctc tcaattatca tcatcatctt tataatcacc tgatgactca aggtcctcat 60 cagag 65</p>	
35	<p><210> 16 <211> 62 <212> ADN <213> Artificial <220></p>	
40	<p><223> Oligonucleótido Y VP3-cMyc 3' <400> 16</p>	
	<p>ctgagagctc tcacaaatct tcttcggaaa tcaattttg ttctcaagg tcctcatcag 60 ag 62</p>	
45	<p><210> 17 <211> 59 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Oligonucleótido BV His-VP3 5' <400> 17</p>	
50	<p>atcgcccggg atgcatcatc atcatcatca cagcagcggc gctgcatcag agttcaaag 59 <210> 18 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial <220></p>	
55	<p><223> Oligonucleótido BV VP3 3' <400> 18 ctgaggacc tcaactcaagg tcctcatcag 30 <210> 19</p>	
60	<p><211> 65</p>	

ES 2 659 586 T3

5	<212> ADN <213> Artificial <220> <223> Oligonucleótido BV VP3-Flag 3' <400> 19	ctgaggtacc tcattatca tcatcatctt tataatcacc tgatgactca aggtctcat cagag	60 65
10	<210> 20 <211> 62 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Oligonucleótido BV VP3-cMyc 3' <400> 20	ctgaggtacc tcacaaatct tcttcggaaa tcaattttg ttctcaagg tctctcatcag ag	60 62
15	<210> 21 <211> 1536 <212> ADN <213> Artificial <220>		
20	<223> gen pVP2 sintético <400> 21		

ES 2 659 586 T3

tgaagatcta tgacaaacct gtcagatcaa acccagcaga ttgtccggt catacggagc 60
ctctgatgc caacaaccgg accggcgtec attccggacg acaccctgga gaagcacact 120
ctcagggtcag agacctcgac ctacaatttg actgtggggg acacagggtc agggctaatt 180
gtcttttcc ctggattccc tggctcaatt gtgggtgctc actacacact gcagggcaat 240
gggaactaca agttcgatca gatgctcctg actgcccaga acctaccggc cagttacaac 300
tactgcagge tagtgagtcg gagtctcaca gtgagggtcaa gcacacttec tgggtggcgtt 360
tatgcactaa acggcaccat aaacgccgtg acctccaag gaagcctgag tgaactgaca 420
gatgttagct acaatgggtt gatgtctgca acagccaaca tcaacgacaa aattgggaac 480
gtcctagtag gggaaggggt caccgtctc agcttaccca catcatatga tcttgggtat 540
gtgaggcttg gtgacccat tcccgaata gggcttgacc caaaaatggt agccacatgt 600
gacagcagtg acaggcccag agtctacacc ataactgcag ccgatgatta ccaatttca 660
tcacagtacc aaccaggtgg ggtaacaatc aactgttct cagccaacat tgatccatc 720
acaagcctca gcgtggggg agagctcgtg ttcgaacaa gcgtccacgg cttgtactg 780
gggccacca tctacctcat aggtttgat gggacaacgg taatcaccag ggctgtgccc 840
gcaacaatg ggctgacgac cggcaccgac aacctatgc cattcaatc tgtgattcca 900
acaaacgaga taaccagcc aatcacatcc atcaaactgg agatagtgac ctccaaaagt 960
gggtggtcagg caggggatca gatgtcatgg tcggcaagag ggagcctagc agtgacgatc 1020
catggtggca actatccagg ggccctccgt cccgtcacgc tagtggccta cgaagagtg 1080
gcaacaggat ccgtcgttac ggtcgtggg gtgagcaact tcgagctgat cccaaatct 1140
gaactagcaa agaacctggt tacagaatac ggccgattg acccaggagc catgaactac 1200
acaaaatga tactgagtga gagggaccgt ctggcatca agaccgtctg gccacaagg 1260
gagtacactg actttcgtga atactcatg gaggtggccg acctcaactc tcccctgaag 1320
attcaggag cattcggctt caaagacata atccgggcca taaggaggat agctgtgccg 1380
gtggtctcca cattgtccc acctgccgt cccctagccc atgcaattgg ggaaggtgta 1440
gactacctgc tgggcgatga ggcccaggcc gcttcaggaa ctgctcgagc cgcgtcagga 1500
aaagcaagag ctgcctcagg ccgcataagg cagctgactc tcgcctaaaa gctttcag 1558

5 <210> 22
<211> 512
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> proteína pVP2 sintética
<400> 22

ES 2 659 586 T3

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
 305 310 315 320
 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
 385 390 395 400

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
 465 470 475 480

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

<210> 23
 <211> 840
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> gen VP4 sintético
 <400> 23

5

ES 2 659 586 T3

aggcagctga ctctgccgc cgacaagggg tacgaggtag tcgcgaatct attccaggtg 60
 cccagaatc ccgtagtga cgggattctt gcttcacctg gggfactccg cgggtcacac 120
 aacctcgact gcgtgtaag agagggtgcc acgctattcc ctgtggttat tacgacagtg 180
 gaagacgcca tgacacccaa agcattgaac agcaaaatgt ttgctgtcat tgaaggcgtg 240
 cgagaagacc tccaacctcc atctcaaaga ggatccttca tacgaactct ctctggacac 300
 agagtctatg gatatgtcc agatggggta ctccactgg agactgggag agactacacc 360
 gttgtccaa tagatgatgt ctgggacgac agcattatgc tgtccaaaga tccatacct 420
 cctattgtgg gaaacagtgg aatctagcc atagcttaca tggatgtgt tcgacccaaa 480
 gtccaatcc atgtggctat gacgggagcc ctcaatgctt gtggcgagat tgagaaagta 540
 agctttagaa gcaccaagct cgctactgcg caccgacttg gccttaggtt ggctgggtccc 600
 ggagcattcg atgtaaacac cgggccaac tgggcaacgt tcatcaaacg tttccctcac 660
 aatccacgcg actgggacag gctcccctac ctcaacctac catacctcc acccaatgca 720
 ggacgccagt accacctgc catggctgca tcagagtca aagagacccc cgaactcgag 780
 agtgccgta gagcaatgga agcagcagcc aacgtggacc cactattcca atctgcactc 840

<210> 24

<211> 280

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> proteína VP4 sintética

<400> 24

ES 2 659 586 T3

Arg Gln Leu Thr Leu Ala Ala Asp Lys Gly Tyr Glu Val Val Ala Asn
 1 5 10 15
 Leu Phe Gln Val Pro Gln Asn Pro Val Val Asp Gly Ile Leu Ala Ser
 20 25 30
 Pro Gly Val Leu Arg Gly Ala His Asn Leu Asp Cys Val Leu Arg Glu
 35 40 45
 Gly Ala Thr Leu Phe Pro Val Val Ile Thr Thr Val Glu Asp Ala Met
 50 55 60
 Thr Pro Lys Ala Leu Asn Ser Lys Met Phe Ala Val Ile Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Arg Glu Asp Leu Gln Pro Pro Ser Gln Arg Gly Ser Phe Ile Arg Thr
 85 90 95
 Leu Ser Gly His Arg Val Tyr Gly Tyr Ala Pro Asp Gly Val Leu Pro
 100 105 110
 Leu Glu Thr Gly Arg Asp Tyr Thr Val Val Pro Ile Asp Asp Val Trp
 115 120 125
 Asp Asp Ser Ile Met Leu Ser Lys Asp Pro Ile Pro Pro Ile Val Gly
 130 135 140
 Asn Ser Gly Asn Leu Ala Ile Ala Tyr Met Asp Val Phe Arg Pro Lys
 145 150 155 160
 Val Pro Ile His Val Ala Met Thr Gly Ala Leu Asn Ala Cys Gly Glu
 165 170 175
 Ile Glu Lys Val Ser Phe Arg Ser Thr Lys Leu Ala Thr Ala His Arg
 180 185 190
 Leu Gly Leu Arg Leu Ala Gly Pro Gly Ala Phe Asp Val Asn Thr Gly
 195 200 205
 Pro Asn Trp Ala Thr Phe Ile Lys Arg Phe Pro His Asn Pro Arg Asp
 210 215 220
 Trp Asp Arg Leu Pro Tyr Leu Asn Leu Pro Tyr Leu Pro Pro Asn Ala
 225 230 235 240
 Gly Arg Gln Tyr His Leu Ala Met Ala Ala Ser Glu Phe Lys Glu Thr
 245 250 255

ES 2 659 586 T3

Pro Glu Leu Glu Ser Ala Val Arg Ala Met Glu Ala Ala Ala Asn Val

260

265

270

Asp Pro Leu Phe Gln Ser Ala Leu

275

280

5

<210> 25
 <211> 780
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> gen VP3 sintético
 <400> 25

atggctgcat cagagttcaa agagaccccc gaactcgaga gtgccctcag agcaatggaa 60
 gcagcagcca acgtggaccc actattccaa tctgcaactca gtgtgttcat gtggctggaa 120
 gagaatggga ttgtgactga catggccaac ttcgcaactca gcgacccgaa cgcccatcgg 180
 atgcgaaatt ttctgcaaa cgcaccacaa gcaggcagca agtcgcaaag ggccaagtac 240
 gggacagcag gctacggagt ggaggctcgg ggccccacac cagaggaagc acagagggaa 300
 aaagacacac ggatecmetaa gaagatggag accatgggca tctactttgc aacaccagaa 360
 tgggtagcac tcaatgggca ccgagggcca agcccaggcc aggtaaagta ctggcagaac 420
 aaacgagaaa taccggaccc aaacgaggac tatctagact acgtgcatgc agagaagagc 480
 cggttgcat cagaagaaca aatcctaagg gcagctacgt cgatctacgg ggctccagga 540
 caggcagagc caccccaagc ttcatagac gaagttgcca aagtctatga aatcaacat 600
 ggacgtggcc caaaccaaga acagatgaaa gatctgctct tgactgcat ggagatgaag 660
 catgcaatc ccaggcgggc tctaccaag cccaagccaa aaccaatgc tccaacacag 720
 agacccccctg gtcggctggg ccgctggatc aggaccgtct ctgatgagga ccttgagtga 780

10

<210> 26
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

15

<223> proteína VP3 sintética
 <400> 26

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

ES 2 659 586 T3

195 200 205
Met Lys Asp Leu Leu Leu Thr Ala Met Glu Met Lys His Arg Asn Pro
210 215 220
Arg Arg Ala Leu Pro Lys Pro Lys Pro Lys Pro Asn Ala Pro Thr Gln
225 230 235 240

Arg Pro Pro Gly Arg Leu Gly Arg Trp Ile Arg Thr Val Ser Asp Glu
245 250 255
Asp Leu Glu

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión, capaz de formar una partícula similar a virus, que consiste en la incorporación en localizaciones distintas del extremo N o C terminal de una o más secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria, distintas de una secuencia del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa, dentro de una proteína VP2 de virus *Birnaviridae*, donde preferiblemente la proteína VP2 es la proteína VP2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa o una VP2 que comparte al menos el 30% de homología de secuencia de aminoácidos con la proteína VP2 del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa, y donde las secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria están seleccionadas de la lista que consiste en: componentes de vacuna, antígenos y epítomos, secuencias de direccionamiento, secuencias de unión, dominios catalíticos, moduladores de farmacología, inmunoestimuladores, toxinas y antitoxinas.
2. Una proteína de fusión según la reivindicación 1, donde la proteína VP2 es una pVP2 de longitud completa de 512 aminoácidos, o fragmento de la misma de 456, o 452 o 441 aminoácidos, o comprende al menos 400 aminoácidos de VP2.
3. Una proteína de fusión según las reivindicaciones 1 a 2, donde las secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria se incorporan en uno o más sitios dentro de la proteína VP2 dentro de las regiones de bucle P de VP2 BC (Q219-G224), DE (R249-G254), FG (T283-D287) y HI (S315-Q324), y/o fuera de dichas regiones de bucle P de VP2, donde las secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria son iguales o diferentes para cada incorporación.
4. Una proteína de fusión según las reivindicaciones 1 a 3, donde la incorporación de secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria consiste en inserciones.
5. Una proteína de fusión según las reivindicaciones 1 a 4 que está terminalmente fusionada en su extremo carboxi (C) o amino (N) terminal, con una segunda secuencia de aminoácidos relevante para la salud humana o veterinaria que puede ser igual o diferente a las secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria insertadas en la región de bucle P o fuera de dichas regiones de bucle P, donde las secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria están seleccionadas de la lista que consiste en: componentes de vacuna, antígenos y epítomos, secuencias de direccionamiento, secuencias de unión, dominios catalíticos, moduladores de farmacología, inmunoestimuladores, toxinas y antitoxinas.
6. Una partícula similar a virus constituida por el ensamblaje de cualquiera de las proteínas de fusión como se define en cada una de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una partícula similar a virus constituida por el ensamblaje de las proteínas de fusión de la reivindicación 6 y la proteína VP3, donde la proteína VP3 está terminalmente fusionada, ya sea en el extremo N o C terminal, con una secuencia de aminoácidos relevante para la salud humana o veterinaria que puede ser igual o diferente a aquellas incorporadas en VP2, donde las secuencias de aminoácidos relevantes para la salud humana o veterinaria están seleccionadas de la lista que consiste en: componentes de vacuna, antígenos y epítomos, secuencias de direccionamiento, secuencias de unión, dominios catalíticos, moduladores de farmacología, inmunoestimuladores, toxinas y antitoxinas.
8. Una partícula similar a virus según las reivindicaciones 6 a 7 que se obtiene por la co-expresión de pVP2 y VP3 de construcciones génicas independientes o por la expresión de construcciones que comprenden la poliproteína pVP2-VP4-VP3.
9. Un ácido nucleico que codifica las proteínas de fusión definidas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
10. Una construcción génica que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 9.
11. Un sistema de expresión que comprende una construcción génica según la reivindicación 10 operativamente unida a elementos de control de la transcripción, y opcionalmente de la traducción.
12. Una célula hospedadora que contiene un ácido nucleico según la reivindicación 9 o una construcción génica según la reivindicación 10 o un sistema de expresión según la reivindicación 11.
13. El uso *in vitro* del sistema de expresión génica como se define en la reivindicación 11 para producir partículas similares a virus.
14. Las partículas similares a virus quiméricas de las reivindicaciones 6 a 8 para su uso en medicina, administración de fármacos, terapia génica, como agentes dirigidos, agentes de obtención de imágenes, en vacunación, como antitoxinas, en diagnóstico, o en técnicas de obtención de imágenes aplicables a la salud humana o veterinaria.
15. Un método de cribado para la localización de los sitios de inserción preferidos dentro de las proteínas VP2, o

proteínas de fusión de las mismas, que se ensamblan eficientemente en partículas similares a virus, que comprende:

- 5 a. Disponer, tanto individualmente como en conjuntos, un conjunto de cualquier combinación de vectores de biblioteca de ADN para la proteína VP2 de *Birnaviridae*, o proteínas de fusión de la misma, incorporar uno o más vectores con sitios de clonación preseleccionados o vectores con sitios de inserción al azar para la incorporación de ADN de interés que conduce a cualquiera de las proteínas de fusión VP2 según las reivindicaciones 1 a 5;
- 10 b. Poner en contacto el conjunto de vectores de ADN de a) con un ADN de interés que codifica una secuencia de aminoácidos relevante para la salud humana o veterinaria, para la incorporación de dicho ADN de interés, donde la secuencia de aminoácidos relevante para la salud humana o veterinaria está seleccionada de la lista que consiste en: componentes de vacuna, antígenos y epítomos, secuencias de direccionamiento, secuencias de unión, dominios catalíticos, moduladores de farmacología, inmunoestimuladores, toxinas y antitoxinas;
- 15 c. Transfectar, transformar o infectar células hospedadoras con los vectores de expresión de ADN resultantes de b) para la expresión de proteínas de fusión VP2 quiméricas;
- d. Evaluar la eficiencia de formación de VLP de las células hospedadoras de c) y seleccionar clones que expresan partículas similares a virus quiméricas con eficiencias más altas;
- e. Determinar o confirmar la localización de inserción preferida del ADN de interés.

FIG 1

Nombre de oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Secuencia
VP2-452 <i>EcoRI</i> -fw	GCCCGAATTCATGACAAACCTGTCAGATCAAACC	SEQ ID NO 6
VP2-452 <i>NotI</i> -rev	GCCCGCGGCCGCTTACCTTATGGCCCGGATTATGTC	SEQ ID NO 7
VP2 456-rev	GCCCGCGGCCGCTTACACAGCTATCCTCCTTATGGCCCG	SEQ ID NO 8
VP2 441-rev	GCCCGCGGCCGCTTATGCTCCTGCAATCTTCAGGGGAGA	SEQ ID NO 9
BV VP3 5' <i>HindIII</i>	CTGAAAGCTTTCACCTCAAGGTCCTCATCAGAG	SEQ ID NO 10
BV VP3-Flag 3' <i>HindIII</i>	CTGAAAGCTTTCATTTATCATCATCATCTTTATAATCACCT GATGACTCAAGGTCCTCATCAGAG	SEQ ID NO 11
BV VP3-c-Myc 3' <i>HindIII</i>	CTGAAAGCTTTCACAAATCTTCTTCGGAAATCAATTTTTGT TCCTCAAGGTCCTCATCAGAG	SEQ ID NO 12
Y His-VP3 5'	ATCGCGGCCGCATGCATCATCATCATCACAGCAGCG GCGCTGCATCAGAGTTCAAAG	SEQ ID NO 13
Y VP3 3'	CTGAGAGCTCTCACTCAAGGTCCTCATCAGAG	SEQ ID NO 14
Y VP3-Flag 3'	CTGAGAGCTCTCATTTATCATCATCATCTTTATAATCACCT GATGACTCAAGGTCCTCATCAGAG	SEQ ID NO 15
Y VP3-cMyc 3'	CTGAGAGCTCTCACAAATCTTCTTCGGAAATCAATTTTTGT TCCTCAAGGTCCTCATCAGAG	SEQ ID NO 16
BV His-VP3 5'	ATCGCCCGGGATGCATCATCATCATCACAGCAGCGG CGCTGCATCAGAGTTCAAAG	SEQ ID NO 17
BV VP3 3'	CTGAGGTACCTCACTCAAGGTCCTCATCAG	SEQ ID NO 18
BV VP3-Flag 3'	CTGAGGTACCTCATTTATCATCATCATCTTTATAATCACCT GATGACTCAAGGTCCTCATCAGAG	SEQ ID NO 19
BV VP3-cMyc 3'	CTGAGGTACCTCACAAATCTTCTTCGGAAATCAATTTTTGT TCCTCAAGGTCCTCATCAGAG	SEQ ID NO 20

FIG 2

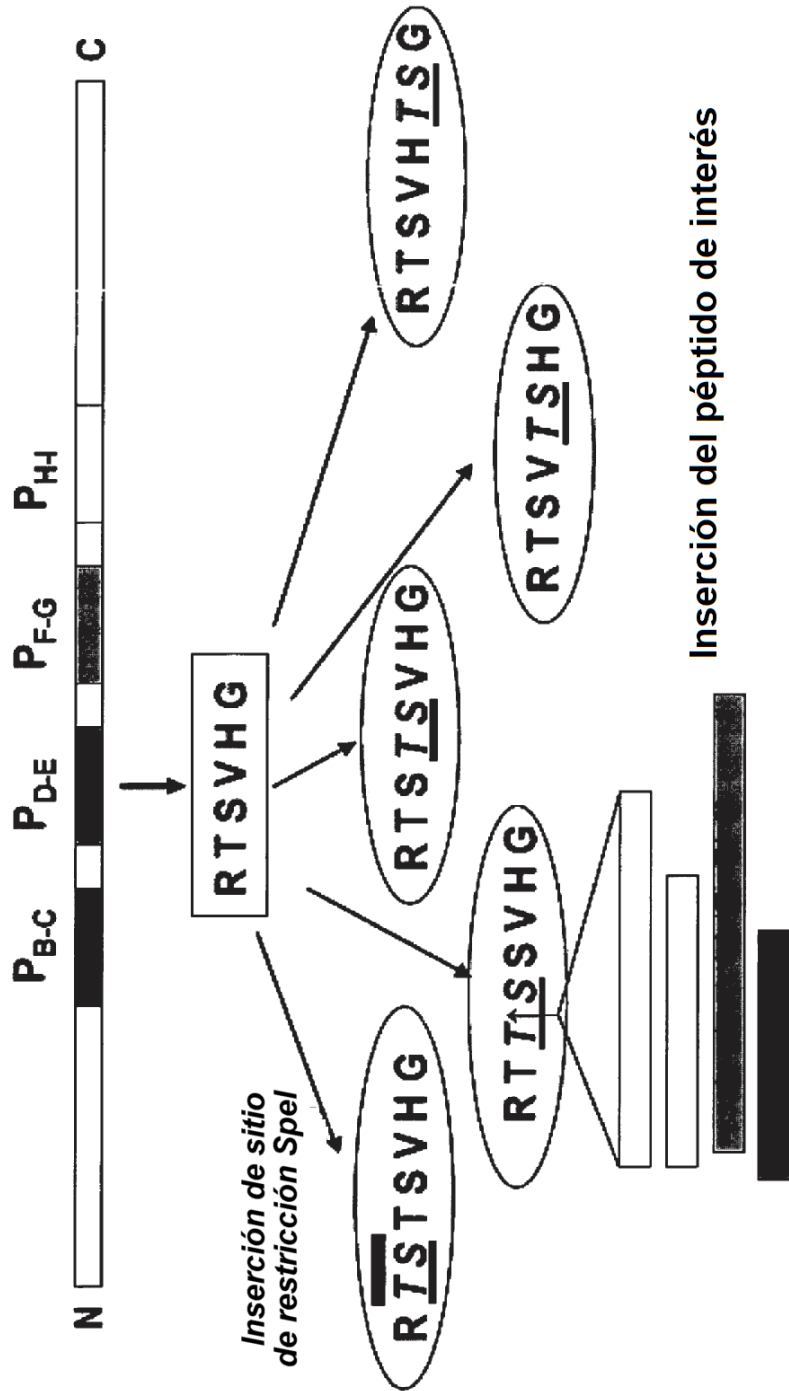


FIG 3

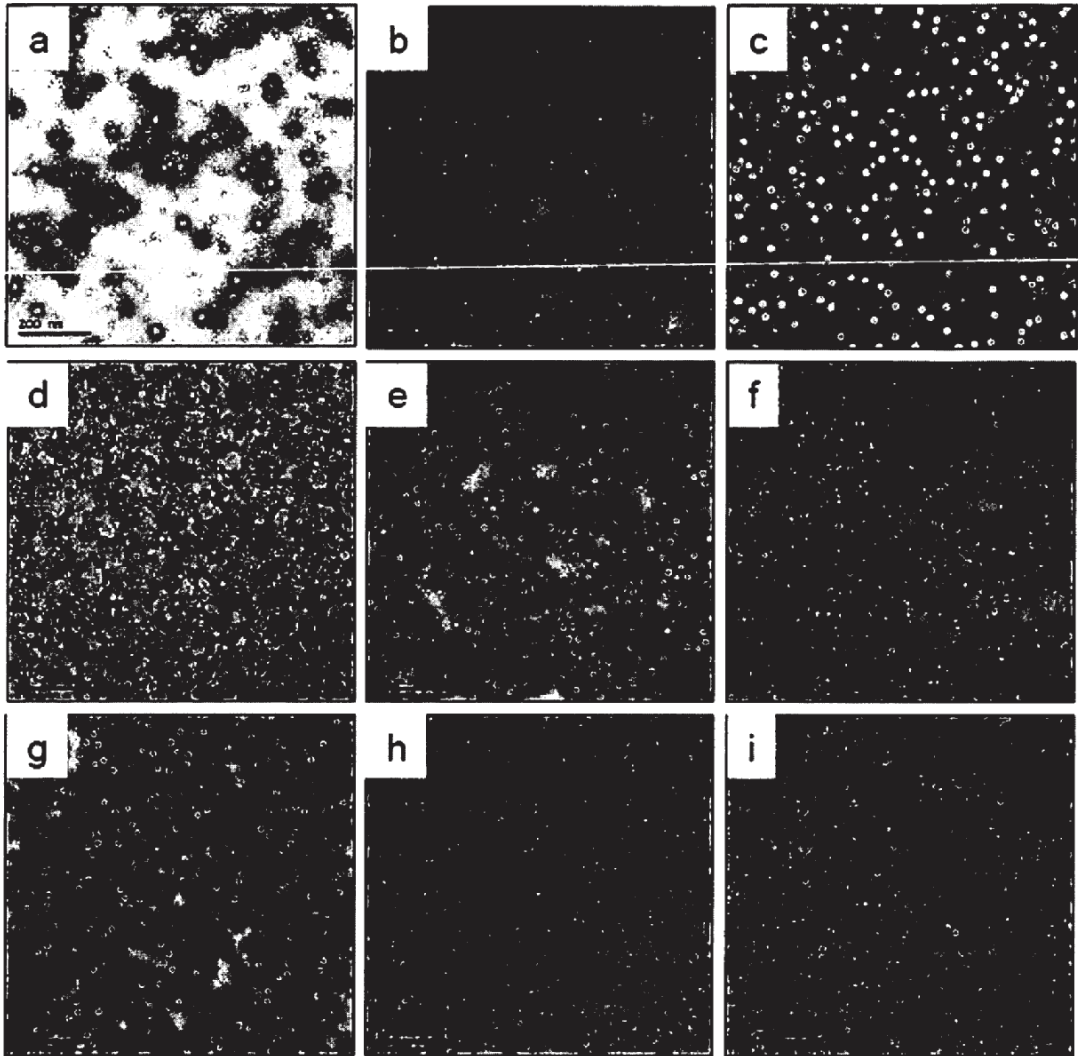
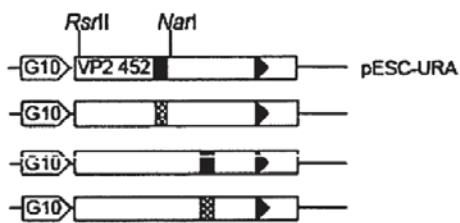


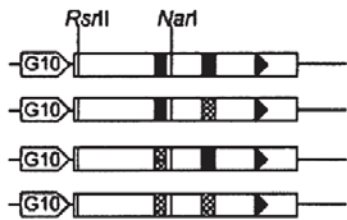
FIG 4

Nombre de construcciones



pESC-URA/VP2(X)

- pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₆₄)
- pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑cMyc↑G₂₆₄)
- pESC-URA/VP2(A₃₂₁↑Flag↑G₃₂₂)
- pESC-URA/VP2(A₃₂₁↑cMyc↑G₃₂₂)



pESC-URA/VP2(X-X)

- pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₆₄ / A₃₂₁↑Flag↑G₃₂₂)
- pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑Flag↑G₂₆₄ / A₃₂₁↑cMyc↑G₃₂₂)
- pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑cMyc↑G₂₆₄ / A₃₂₁↑Flag↑G₃₂₂)
- pESC-URA/VP2(H₂₅₃↑cMyc↑G₂₆₄ / A₃₂₁↑cMyc↑G₃₂₂)



FIG 5

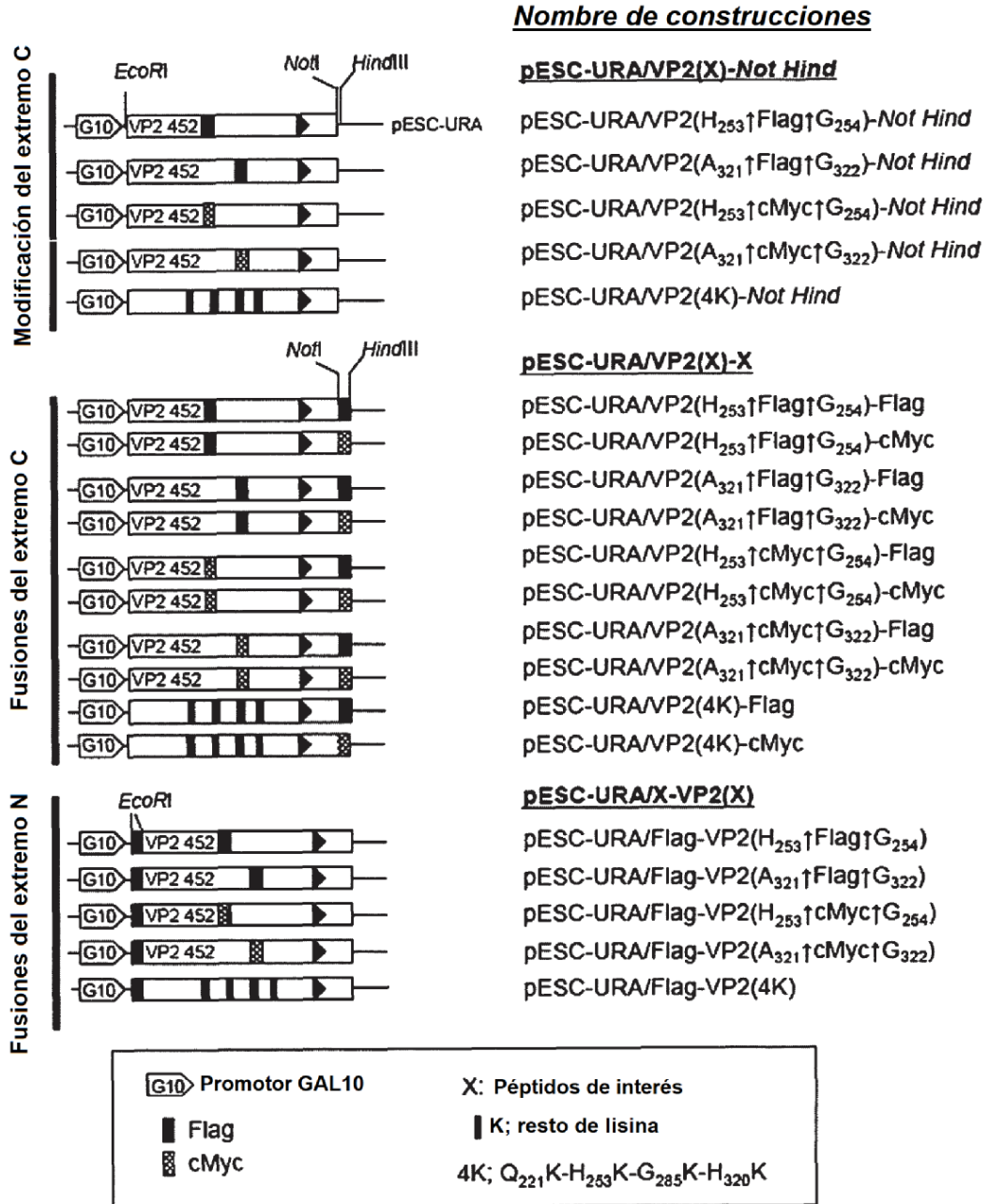


FIG 6

BglII
tgaagatctatgacaaacctgtcagatcaaaccagcagattgttccgttcatacggagc
 M T N L S D Q T Q Q I V P F I R S 17

RsrII
cttctgatgccacaaccggaccggcgtccattccggagcagaccctggagaagcacact
 L L M P T T G P A S I P D D T L E K H T 37
ctcaggtcagagacctcgacctacaatttgactgtgggggacacagggtcagggctaatt
 L R S E T S T Y N L T V G D T G S G L I 57
gtctttttccctggattccctggctcaattgtgggtgctcactacacactgcagggcaat
 V F F P G F P G S I V G A H Y I L Q G N 77
gggaactacaagttcagatcagatgctcctgactgcccagaacctaccggccagttacaac
 G N Y K F D Q M L L T A Q N L P A S Y N 97
Tactgcaggtcagtagtgagtcggagtcctcacagtgaggtcaagcacacttccctggggcgtt
 Y C R L V S R S L T V R S S T L P G G V 117
Tatgcactaaaacggcaccataaacgcgtgacsttccaaggaagcctgagtgaaactgaca
 Y A L N G T I N A V T F Q G S L S E L T 137
gatgttagctacaatgggttgatgtctgcaacagccaacatcaacgacaaaattggggaac
 D V S Y N G L M S A T A N I N D K I G N 157
gtcctagtaggggaaggggtcaccgtcctcagcttaccacacatcatatgatcttgggtat
 V L V G E G V T V L S L P T S Y D L G Y 177
Gtgaggcttggtgacccattcccgcaatagggcttgacccaaaaatggtagccacatgt
 V R L G D P I P A I G L D P K M V A T C 197
gacagcagtgacaggcccagagtctacaccataactgcagccgatgattaccaattctca
 D S S D R P R V Y T I T A A D D Y Q F S 217
tcacagtaccaaccaggtggggtaacaatcacactgttctcagccaacattgatgccatc
S Q Y Q P G G V T I T L F S A N I D A I 237
acaagcctcagcgttgggggagagctcgtgtttcgaacaagcgtccacggccttctgactg
 T S L S V G G E L V F R T S V H G L V L 257

NarI
ggcgcaccatctacctcataggcctttgatgggacaacggtaatcaccagggcctgtggcc
 G A T I Y L I G F D G T T V I T R A V A 277
gcaaacaaatgggctgacgaccggcaccgacaaccttatgccattcaatcttggattcca
 A N N G L T T G T D N L M P F N L V I P 297
acaacagagataacccagccaatcacatccatcaaaactggagatagtgacctccaaaagt
 T N E I T Q F I T S I K L E I V T S K S 317
ggtggtcaggcaggggatcagatgcatggtcggcaagagggagccttagcagtgacgatc
G G Q A G D Q M S W S A R G S L A V T I 337

NcoI
catggtggcaactatccaggggcccctccgtcccgtcacgctagtgccctacgaaagagtg
 H G G N Y P G A L R P V T L V A Y E R V 357
gcaacaggatccgtcgttacggctcgctgggggtgagcaacttcgagctgatcccaaatcct
 A I G S V V T V A G V S N F E L I P N P 377
gaactagcaagaacctggttacagaatacggccgatttgaccaggagccatgaactac
 E L A K N L V T E Y G R F D P G A M N Y 397

MscI
acaaaattgatactgagtgagagggaccgtcttggcatcaagaccgtctggccaacaagg
 T K L I L S E R D R L G I K T V W P T R 417
gagtacactgactttcgtgaatacttcatggagggtggccgacctcaactctcccctgaag
 E Y T D F R E Y F M E V A D L N S P L K 437
attgcaggagcattcggcttcaaaagacataatccggggccataaggaggatagctgtgccc
 I A G A F G F K D I I R A I R R I A V P 457
gtggtctccacattgttcccacctgcccgtccccctagcccacatgcaattgggggaaggtgta
 V V S T L F P P A A P L A H A I G E G V 477
gactacctgtggggcagtagggcccaggccgcttcaggaactgctcgagccgctcagga
 D Y L L G D E A Q A A S G T A R A A S G 497
aaagcaagagctgcctcaggccgcataaggcagctgactctcgccctaaaggctttcag
 K A R A A S G R I R Q L T L A - HindIII 512

FIG 7

PvuII

aggcagctgactctcgccgcccagacaaggggtacgaggtagtcgcggaatctattccaggtg
 R Q L T L A A D K G Y E V V A N L F Q V 14
 cccagaatcccgtagtcgacgggattcttgcttcacctgggggtactccgcggtgcacac
P Q N P V V D G I L A S P G V L R G A H 34
 aacctcgactgctgtgtaagagaggggtgccacgctattccctgtggttattacgacagtg
N L D C V L R E G A T L F P V V I T T V 54
 gaagacgccatgacacccaaagcattgaacagcaaaatgtttgctgtcattgaaggcgtg
E D A M T P K A L N S K M F A V I E G V 74
 cgagaagacctccaacctccatctcaaagaggatccttcatacgaactctctctggacac
R E D L Q P P S Q R G S F I R T L S G H 94
 agagtctatggatgctccagatggggtactccactggagactgggagagactacacc
R V Y G Y A P D G V L P L E T G R D Y T 114
 gttgtcccaatagatgatgtctgggacgacagcattatgctgtccaaagatcccatacct
V V P I D D V W D D S I M L S K D P I P 134
 cctattgtgggaaacagtggaatctagccatagcttacatggatgtgtttcgacccaaa
P I V G N S G N L A I A Y M D V F R P K 154
 gtcccaatccatgtggctatgacgggagccctcaatgcttgggagagattgagaaagta
V P I H V A M T G A L N A C G E I E K V 174
 agctttagaagcaccaagctcgctactgcgacccgacttggccttaggttggctgggtccc
S F R S T K L A T A H R L G L R L A G P 194
 ggagcattcgatgtaaacaccgggcccactgggcaacgttcatcaaacgtttccctcac
G A F D V N T G P N W A T F I K R F P H 214
 aatccacgcgactgggacagggtcccctacctcaacctaccataccttccacccaatgca
N P R D W D R L P Y L N L P Y L P P N A 234
 ggacgccagtaccaccttgccatggctgcatcagagttcaaagagacccccgaactcgag
G R Q Y H L A M A A S E F K E T P E L E 242

BsgI

agtgccgtcagagcaatggaagcagcagccaacgtggaccactattccaatctgcaactc
 S A V R A M E A A A N V D P L F Q S A L

FIG 8

atggctgcatcagagttcaaagagacccccgaactcgagagtgccgctcagagcaatggaa
M A A S E F K E T P E L E S A V R A M E 20
gcagcagccaacgtggaccactattccaatctgcactcagtggttcatgtggctggaa
A A A N V D P L F Q S A L S V F M W L E 40
gagaatgggattgtgactgacatggccaacttcgcactcagcgcacccgaacgcccacg
E N G I V T D M A N F A L S D P N A H R 60
atgcgaaaattttcttgcaaacgcaccacaagcaggcagcaagtcgcaaagggccaagtac
M R N F L A N A P Q A G S K S Q R A K Y 80
gggacagcaggctacggagtgaggctcggggcccccacaccagaggaagcacagagggaa
G T A G Y G V E A R G P T P E E A Q R E 100
aaagacacacggatctcaaagaagatggagaccatgggcatctactttgcaacaccagaa
K D T R I S K K M E T M G I Y F A T P E 120
tggttagcactcaatgggcaccgagggccaagcccaggccaggtaaagtactggcagaac
W V A L N G H R G P S P G Q V K Y W Q N 140
aaacgagaaaataccggaccctaaacgaggactatctagactacgtgcatgcagagaagagc
K R E I P D P N E D Y L D Y V H A E K S 160
cggttggcatcagaagaacaaatcctaagggcagctacgtcgatctacggggctccagga
R L A S E E Q I L R A A T S I Y G A P G 180
caggcagagccacccccaaagctttcatagacgaagttgccaaagtctatgaaatcaaccat
Q A E P P Q A F I D E V A K V Y E I N H 200
ggacgtggcccaaaccaagaacagatgaaagatctgctcttgactgcgatggagatgaag
G R G P N Q E Q M K D L L L T A M E M K 220
catcgcaatcccaggcgggctctaccaaagcccaagccaaaacccaatgctccaacacag
H R N P R R A L P K P K P K P N A P T Q 240
agacccccctggctcggctgggcccgtggatcaggaccgtctctgatgaggaccttgagtga
R P P G R L G R W I R T V S D E D L E - 259

FIG 9

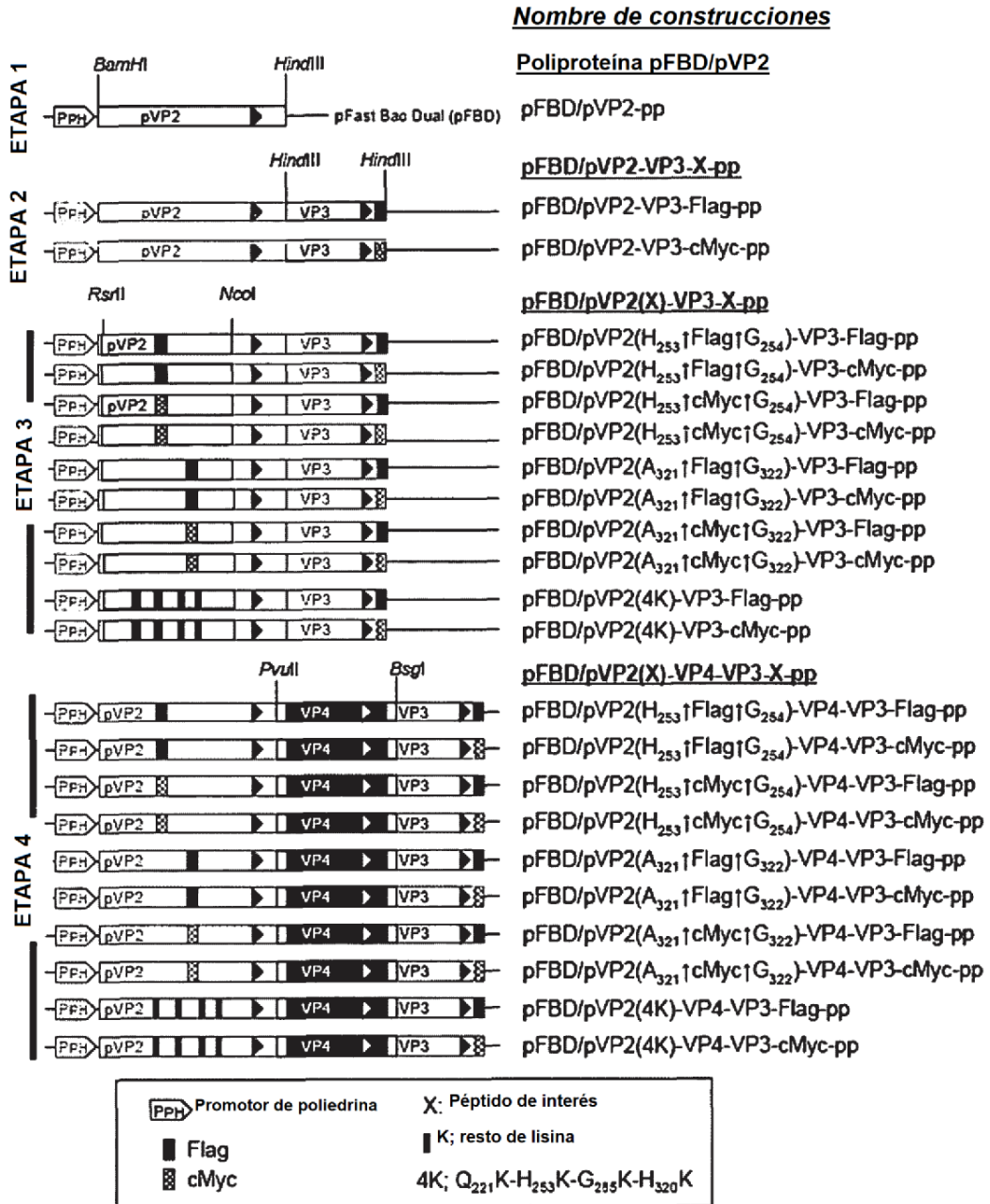


FIG 10

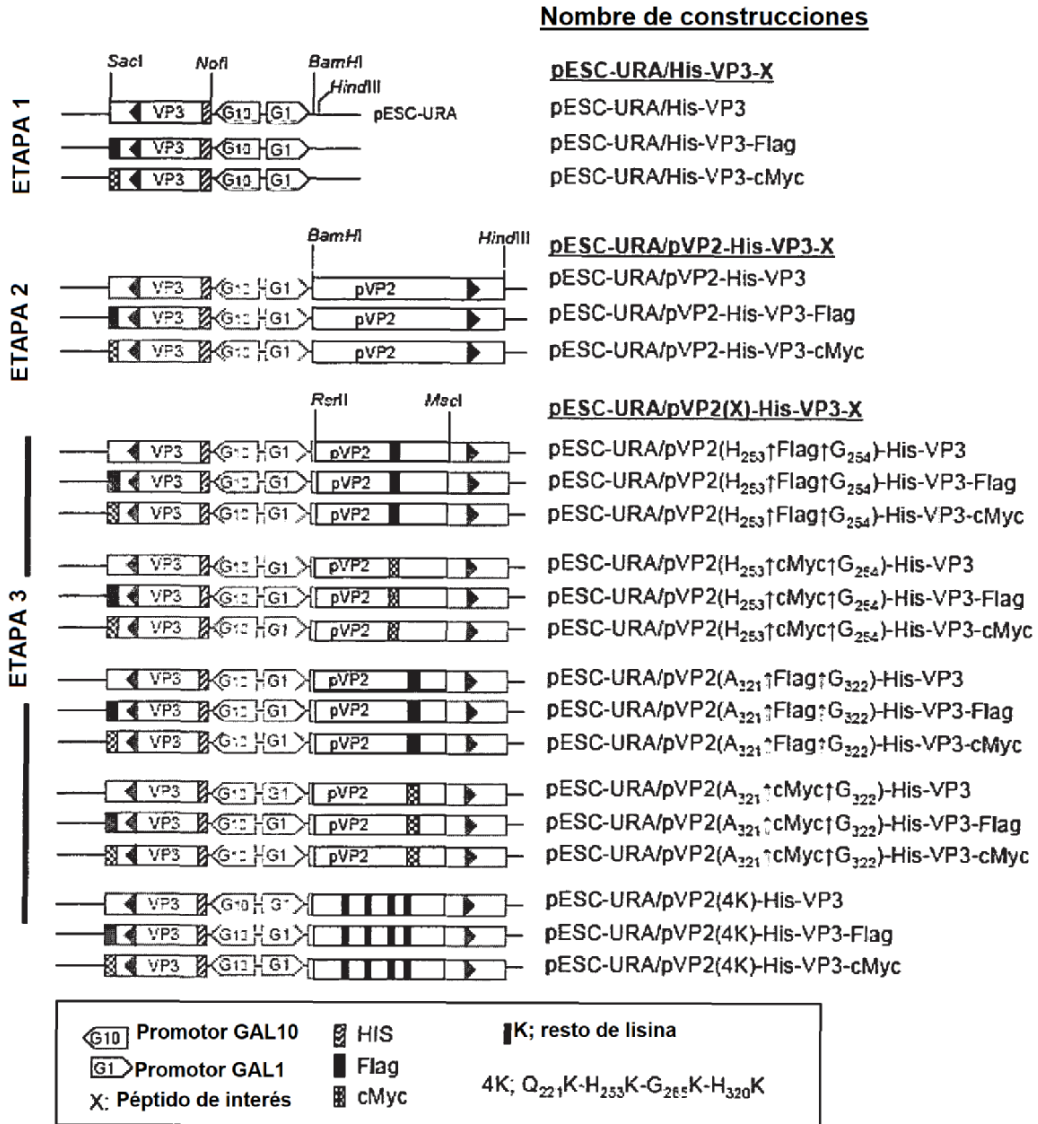


FIG 11

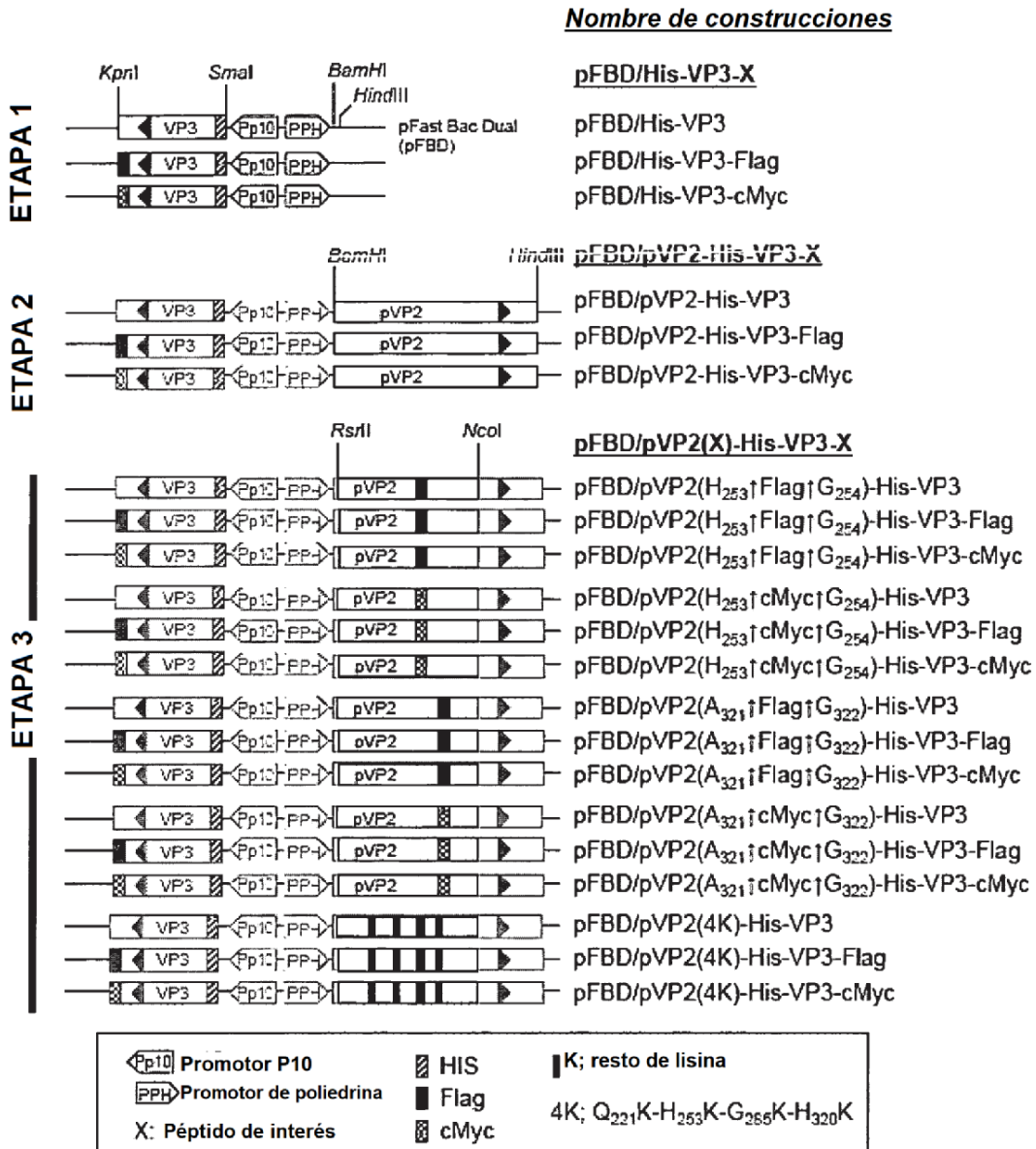


FIG 12

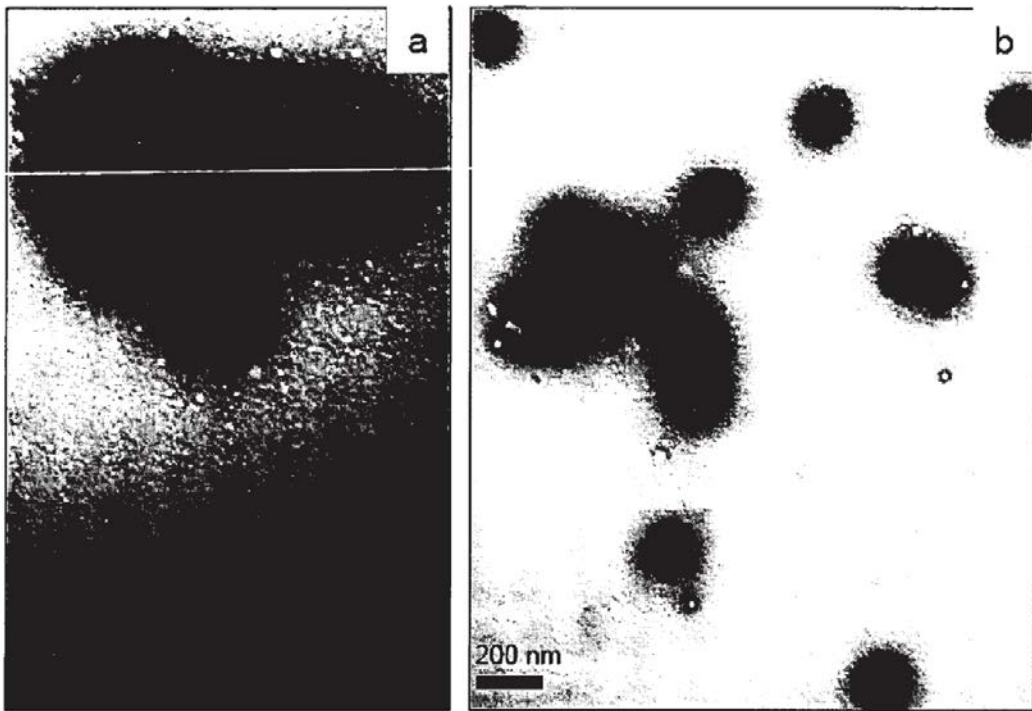


FIG 13

Vectores de inserción de *SpeI*-VP2
(Vectores de inserción de VP2-TS o pESC-URA/VP2/*SpeI*)

