



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 646**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 15/34 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02740122 .3**

96 Fecha de presentación : **14.06.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1407007**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2004**

54 Título: **Circovirus atenuados.**

30 Prioridad: **14.06.2001 AU PR5674**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.03.2010

73 Titular/es: **The University of Melbourne
Grattan Street
Parkville, Victoria 3052, AU**

72 Inventor/es: **Browning, Glenn, Francis;
Peters, Michelle, Alma;
Tivendale, Kelly, Ann;
Scott, Peter, Christopher;
Brown, Hayley, Kay y
Crabb, Brendan, Scott**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 334 646 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

Circovirus atenuados.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a virus atenuados, composiciones de vacunas virales, particularmente circovirus atenuados en forma de virus de la anemia del pollo.

10 **Técnica anterior**

El virus de la anemia del pollo (VAP) es un miembro de la familia Circoviridae. La familia circoviridae incluye una serie de virus vegetales y animales que se caracteriza por la posesión de un genoma de ADN circular, monocatenario y de sentido negativo. Existe una similitud mínima en la secuencia y organización genómica entre el VAP y los otros circovirus animales caracterizados. El virus de la enfermedad del pico y las plumas de las psitácidas (VEPPP), circovirus de las palomas, circovirus de las palomas y circovirus porcino (CVP) 1 Y 2. Recientemente se han identificado virus TT (TTV) en huéspedes humanos y otras especies en forma de un grupo heterogéneo de virus de ADN circular, monocatenario y de sentido negativo. El análisis de la secuencia de este grupo de virus ha demostrado la mayor homología global con el VAP y otros investigadores han propuesto recientemente la clasificación de TTV, SANBAN, YONBAN, TLMV ((minivirus similares al TTV) y los virus VAP como Paracircoviridae, no obstante, la filogenia sigue siendo un área de revisión activa. La mayor homología de secuencia con el VAP se observa en la región no codificadora y entre el marco de lectura abierto (ORF2) del TTV y el VP2 del VAP. El alto nivel de conservación de secuencia entre el VAP y el TTV sugiere que el VP2 puede desempeñar un papel crucial en la infección vírica y la patogenia.

El VAP sólo codifica tres proteínas, con ORF superpuestos en tres marcos. El ORF3 codifica la mayor proteína de la cápside VP1 de 45-52 kDa, el ORF2 codifica la VP3 de 11-13 kDa que ha mostrado actividad apoptótica en las líneas celulares transformadas y el ORF1 codifica una proteína no estructural VP2 de 28 kDa con función desconocida. La VP2 se expresa a niveles apenas detectables durante la infección, pero se ha demostrado que es esencial para la infección vírica y la replicación en las células. El bajo nivel de expresión de la VP2 es consistente con una proteína reguladora no estructura implicada en la replicación y la infección viral.

La patogenia del VAP se caracteriza por inmunosupresión y pancitopenia producida por panmielofitosis y depleción de timocitos. La inmunosupresión tiene como resultado mayores índices de morbilidad y mortalidad asociados con coinfecciones y fallos de vacunación en pollos infectados por el VAP. La infección por el VAP es directamente citotóxica para dos poblaciones de células T distintas del timo y el bazo. La infección del timo implica precursores linfoblásticos inmaduros, mientras que la infección esplénica es de linfocitos T maduros que están altamente activados. Existe un segundo componente indirecto de la inmunosupresión que se encuentra en las células efectoras inmunitarias no infectadas. Se han documentado reducciones en las funciones de los macrófagos y las CPA y las respuestas antigénicas de las células B. Los perfiles limitados de citoquinas de células infectadas sugieren una base de inmunosupresión indirecta generalizada. Existe una reducción en el índice de estimulación de interleucina 2 (IL-2), interferón gamma (IFN γ), linfocitos, la actividad del factor de crecimiento de las células T y los niveles del receptor Fc en linfocitos de aves infectadas. La base molecular de la modulación vírica de los perfiles de citoquinas y la inmunosupresión indirecta se desconoce.

Las comparaciones preliminares de la secuencia de la VP2 del VAP con las secuencias disponibles en la base de datos Genbank han sugerido la similitud con una serie de PTPasas receptoras eucarióticas (R-PTPasa alfa). Las búsquedas en bases de datos han identificado precursores de la R-PTPasa alfa en placenta humana, ratas, ratones y pollos como homólogos a la secuencia de la VP2 del VAP. La fosforilación reversible de proteínas es universal en la regulación de procesos celulares, entre los que se incluyen el metabolismo, la regulación génica, el control del ciclo celular, la organización del citoesqueleto y la adhesión celular. La familia de las PTPasas es considerablemente diversa e incluye proteínas transmembrana similares al receptor eucariótico y proteínas citosólicas, así como PTPasas bacterianas, tales como la PTPasa YopH de *Yersinia* patógena y una PTPasa VH1 que se encuentra en el virus Vaccinia, un miembro de la familia Poxviridae. Durante la infección por el virus Vaccinia, la proteína VH1 bloquea la señalización del interferón γ y, de este modo, evade la respuesta inmunitaria frente a la infección vírica. El papel de la PTPasa VH1 en la infección, aunque actualmente es la única PTPasa vírica con una función *in vivo* caracterizada, destaca la posibilidad de que las PTPasas codificadas en el virus estén implicadas en mecanismos de la invasión inmunitaria y la persistencia del virus.

Los productores de aves comerciales requieren una vacuna contra el virus de la anemia del pollo (VAP) que reduzca las pérdidas económicas en las que incurrir por las infecciones tanto clínicas como subclínicas. La eliminación de la enfermedad subclínica en aves adultas asociada con la infección por VAP requiere la superación de la inmunosupresión debido a la infección. La infección por el VAP tiene gran importancia económica en bandadas de pollos en engorde. Las infecciones tanto clínica como subclínica ejercen un gran impacto sobre el rendimiento y la rentabilidad del pollo de engorde comercial. Aunque la infección clínica produce una reducción más marcada de los parámetros de rendimiento, la infección subclínica es responsable de un mayor grado de pérdida económica que es de mayor incidencia. Existe una gran necesidad de una vacuna adecuada para gallinas menores de un año, pollos de engorde y pollos de cría. Tal vacuna puede administrarse a las aves en el momento de la puesta y, por tanto, debe ser segura en caso de transmisión vertical a los embriones.

ES 2 334 646 T3

El desarrollo de una vacuna contra el VAP tiene aplicaciones internacionales. El virus de la anemia del pollo (VAP) tiene una distribución mundial sobre la base de la investigación serológica y es endémico en bandadas SPF y de pollos para comercialización, con la excepción de las bandadas SPF australianas. Entre los países en los que se han caracterizado aislamientos del VAP y se ha publicado las secuencias completas de su genoma se incluyen
5 Alemania, Reino Unido, EE.UU., Japón, Australia y Países Bajos. Todos los aislamientos se clasifican dentro de un único serotipo basado en la reactividad cruzada en las pruebas de inmunofluorescencia y neutralización utilizando antisuero policlonal. La conservación de la secuencia del genoma es una característica clave de todos los aislamientos del VAP. Todos los aislamientos en campo demuestran una patogenicidad equivalente en la infección experimental y cualquier variación en la morbilidad y la gravedad de la enfermedad con la exposición al VAP se atribuye a una
10 serie de factores epidemiológicos que interactúan. La dosis de virus es el determinante clave de la gravedad de la enfermedad inducida por el VAP en el campo. Cabe esperar que las vacunas con microorganismos vivos atenuados desarrolladas a partir de un aislamiento cualquiera sean protectoras en bandadas de aves de corral internacionalmente.

Una cepa del VAP atenuada debería ser infecciosa, aunque con una patogenicidad reducida. La enfermedad clínica
15 se caracteriza mejor en la literatura en aves infectadas al día de edad. La enfermedad clínica en polluelos infectados al día de edad se caracteriza por debilidad, depresión, atrofia y anemia. A los 7 días de la infección se produce una anemia peraguda transitoria pero grave debido a la destrucción de las células eritroblastoides e inmunodeficiencia por depleción de linfocitos corticales. La hipoplasia intensa de la médula ósea, la atrofia linfóide y la trombocitopenia se ponen de manifiesto a los 14-21 días de la infección. Las hemorragias petequiales y equimóticas se desarrollan por una
20 coagulopatía primaria. La inmunosupresión es una característica significativa de la enfermedad inducida por el VAP y las infecciones secundarias son frecuentes. Las aves afectadas por el VAP presentan una mayor incidencia de edema maligno, dermatitis gangrenosa, colibacilosis y aspergilosis pulmonar. La fase de recuperación se extiende desde los 14 a los 35 días después de la infección. Durante la recuperación, la eritrocitopoyesis precede a la granulocitopoyesis. A los 16 días de la infección existe una elevada proporción de eritrocitos, trombocitos y granulocitos inmaduros
25 circulantes, y el hematocrito está completamente restablecido a los 28 días de la infección. El timo vuelve a repoblarse por la tercera ola de linfocitos en migración a los 21 días.

Las aves afectadas por el VAP desarrollan una anemia grave de mielofitosis. El hematocrito es menor del 27% y, normalmente, de 9-23% (normalmente en polluelos de 7-14 días de edad es de 32-37,5%). La cianosis se pone de manifiesto en el integumento sin plumas y sobre las membranas mucosas. Existe una leucopenia atribuible a una heterocitopenia y linfopenia. Los tiempos de coagulación prolongados se asocian con hemorragias petequiales y equimóticas observadas sobre el integumento, el músculo esquelético, la mucosa del proventrículo y, rara vez, en el pericardio.
30

La médula ósea aparece de color amarillo a blanco y de textura acuosa debido a panmielofitosis e hiperplasia adipocitaria compensatoria. Esto es más obvio en la cavidad medular femoral proximal.
35

El timo sufre una atrofia intensa. Los timos afectados tienen una reducción cuantificable del peso y un diámetro de 2-4 mm. Aparecen de color rojo-marrón en lugar de gris debido a una reducción de las poblaciones linfocitarias parenquimatosas, hiperplasia de las células reticulares e hiperemia del tejido.
40

Existe una depleción generalizada de los componentes foliculares linfoides de todos los tejidos. La bolsa de Fabricio sufre una atrofia moderada transitoria, pero no está inflamada ni edematosa. La atrofia bursal puede ser de leve a no evidente en los polluelos afectados clínicamente.
45

El hígado, los riñones y el bazo están difusamente decolorados e inflamados a los 14 días de la infección.

Las lesiones hemorrágicas dérmicas focales son más prominentes en las alas, pero también afectan a la cabeza, las ancas, los laterales del tórax y el abdomen, los muslos, las patas y los pies. Las lesiones progresan a úlceras grandes con una extravasación serosanguinolenta debido a necrosis isquémica de la dermis suprayacente. Se desarrolla un exudado purulento asociado con infecciones secundarias. Las lesiones tienden a ser lesiones complicadas abrasivas y de mutilación en el entorno de la unidad de cría de pollos de engorde para comercialización.
50

Para la valoración de la atenuación se requiere un modelo experimental de la patogenia del VAP. Tal modelo no necesita representar el espectro completo de la patología observado en la infección en campo, pero debe demostrar atenuación en las condiciones que produzcan la patología más grave. La inoculación en saco vitelino de embriones de 7 días de dosis elevadas del virus es el modelo más riguroso disponible. Este modelo es el que mejor se aproxima a la situación de campo en la que aves de cría en el momento de la puesta se exponen al VAP y transmiten el virus de forma transovarial. Los polluelos infectados por transmisión vertical tienen los mayores índices de morbilidad (100%) y mortalidad (10-70%) y la patología es de la gravedad mayor. Estudios extensos de la patología de los embriones infectados de forma experimental a los 7 días mediante inoculación en el saco vitelino no se han comunicado en la literatura.
60

Los polluelos de todas las edades son susceptibles a la infección por el VAP, no obstante hay una resistencia específica de edad al desarrollo de la enfermedad en polluelos mayores de 14 días. Los embriones y los polluelos de 1 día tienen la mayor susceptibilidad a la enfermedad. La resistencia por la edad puede estar relacionada con la capacidad de desarrollo del ave para producir una respuesta humoral neutralizante en suero. La co-infección con patógenos aviarios sinérgicos tales como el IBDV eliminará la resistencia relacionada con la edad y tendrá como resultado brotes de enfermedad aguda en las aves de más edad.
65

La mayoría de las bandadas de pollos de cría comerciales se han expuesto al VAP y tienen una inmunidad humoral neutralizante de duración prolongada. Los anticuerpos persisten durante al menos 20 semanas tras la seroconversión. Las investigaciones sexológicas de las bandadas de pollos de cría normalmente demuestran que un 97,5-100% de las aves permanecen seropositivas durante un prolongado periodo tras la infección. Los anticuerpos maternos son importantes en la protección contra la enfermedad clínica en polluelos de hasta 2 semanas de edad y persisten hasta las 3 semanas de edad. El deterioro de los anticuerpos maternos sigue una relación lineal y tiene una semivida de aproximadamente 1 semana. Los niveles bajos de anticuerpos maternos son eficaces en la prevención de la enfermedad clínica con la infección. La mayoría de las crías derivadas de las bandadas de aves de cría inmunes se han infectado horizontalmente siguiendo la disminución de los anticuerpos maternos, desarrollan enfermedad subclínica y se produce seroconversión entre 8-12 semanas después de la infección.

En una bandada expuesta, aproximadamente el 10% de las aves de cría serán seronegativas en cualquier momento después de la exposición. Una proporción menor de los polluelos se infecta verticalmente y excreta títulos elevados de virus que actúan como la fuente de infección horizontal para otras crías. Puede haber entre 16 y 25% de las aves afectadas subclínicamente en la progenia de las bandadas de aves de cría inmunes. Por tanto, la vacunación mejorará el rendimiento incluso en bandadas con VAP endémico e inmunidad humoral neutralizante persistente.

Los presentes inventores han desarrollado VAP vivos atenuados y ADN de VAP que se pueden usar en vacunas adecuadas para la inoculación en bandadas de gallinas menores de 1 año, pollos de engorde y pollos de cría. Según la identificación de la función de la VP2 como nueva proteína tirosina fosfatasa y la identificación de regiones de su secuencia requerida para la función completa.

Descripción de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un virus de la anemia del pollo (VAP) atenuado aislado que tiene una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo compuesto por las SEC ID N° 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 y 25.

Los presentes inventores han encontrado que la VP2 del VAP es una buena diana para la atenuación mediante mutagénesis debido a que existe la posibilidad de alterar la virulencia mientras que se conserva la capacidad de infección y la inmunogenicidad. El establecimiento de una función bioquímica precisa para la VP2 del VAP como una PTPasa, como parte de la presente invención, facilita considerablemente el proceso de atenuación racional y proporciona un punto focal para la estrategia de la mutagénesis. Se pueden diseñar mutaciones para modificar el papel de la PTPasa en la infección sobre la base del conocimiento de su efecto sobre la catálisis de la PTPasa *in vitro*. Se ha predicho que la VP2 del VAP es una proteína multifuncional con un papel esencial no estructural en la infección y la replicación víricas. Dado que la proteína no es estructural, es improbable que las mutaciones alteren los epítomos esenciales para la inmunogenicidad. Como los linfocitos son las células diana de la infección por el VAP, es probable que la virulencia se correlacione inversamente con la inmunogenicidad, siempre que se consiga la replicación vírica adecuada para la estimulación antigénica. Por tanto, las mutaciones que reducen la virulencia y la influencia inmunosupresora de la infección vírica pueden potenciar las propiedades inmunogénicas del virus con respecto al virus de tipo salvaje.

En una forma, una mutación está presente en la región del ácido nucleico que codifica los residuos clave en el motivo firma de la VP₂₂. Dichas mutaciones deberían modificar el papel de la PTPasa durante la infección vírica. Los sitios diana de la mutagénesis dentro de la VP2 del VAP son 86, 95, 97, 101, 103 y 169. Normalmente, el residuo 86 es C y estaba mutado a S (mut C 86 S) y las otras mutaciones demostrativas fueron mut C 95 S, mut C 97 S, mut R 101 G y mut H 103 Y. Las mutaciones mut C 95 S y mut C 97 S eliminan los residuos de cisteína que se ha predicho que son esenciales para la actividad PTPasa y que son cisteínas catalíticas implicadas en la formación del intermedio cisteinil-fosfato formado durante la catálisis. La mutación mut R 101 G elimina los residuos básicos cargados que se ha predicho que son esenciales para la actividad PTPasa y que están implicados en la coordinación del sustrato fosfotirosina con los residuos de cisteína catalítica. Los residuos 103 y 86 flanquean el motivo firma predicho y están altamente conservados en los virus TT y VAP.

En otra forma, está presente una mutación en la región del ácido nucleico que codifica dos regiones predichas de α -hélice antipática de los residuos 128 a 143 y la lámina β antipática de los residuos 151 a 158 en la VP2 del VAP. Entre otras regiones adecuadas se incluyen los residuos nucleicos 80 a 110, 128 a 143, 151 a 158 y 160 a 170 en la VP2 del VAP.

Los constructos del VAP se seleccionan de mut C 87 R, mut C 95 S, mut C 97 S, mut R 101 G, mut H 103 Y, mut R 129 G, mut Q 131 P, mut R/K/K 150/151/152 G/A/A, mut D/E 161/162 G/G, mut L 163 P, mut D 169 G, mut K 102 E, mut E 186 G y sus combinaciones.

Los VAP que se ha encontrado que son candidatos particularmente adecuados para una vacuna incluyen mut C 87 R, mut R 101 G, mut K 102 D, mut H 103 Y, mut R 129 G, mut N 131 P, mut R/K/K 150/151/152 G/A/A, mut D/E 161/162 G/G, mut L 163 P, mut D 169 G, mut K 102 E y mut E 186 G.

Como la estructura genómica del TTV es similar a la del VAP, la información de atenuación obtenida por los presentes autores sobre el VAP serían aplicables al TTV.

ES 2 334 646 T3

Esto viene avalado también por la demostración por los presentes inventores de que el ORF2 del TLMV tiene actividad de proteína tirosina fosfatasa. Por tanto, a partir de la amplia información obtenida por los presentes autores sobre el VAP, cabría esperar que el TTV atenuado (u otros circovirus similares) se podría formar introduciendo mutaciones en las regiones codificadoras ORF2 correspondientes o similares del TTV u otros circovirus.

5

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición de vacuna frente al VAP que comprende un VAP atenuado de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención junto con un transportador o diluyente aceptable.

10

En una forma preferida, el virus es VAP y el animal es un ave, preferentemente un pollo.

La composición de vacuna puede formularse de modo que contenga un transportador o diluyente y uno o más de los virus atenuados de la invención. Transportadores farmacéuticamente adecuados facilitan la administración de los virus pero son fisiológicamente inertes y/ no dañan al receptor. El experto en la técnica puede seleccionar transportadores. Entre los transportadores adecuados se incluyen solución salina estéril, lactosa, sacarosa, fosfato cálcico, gelatina, dextrina, agar, pectina, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo y agua. Además, el transportador o diluyente puede incluir un material que retrase la liberación del virus, tal como monoestearato de glicerol o diestearato de glicerol solo o con una cera. Además, se pueden usar formulaciones poliméricas de liberación lenta.

15

20

Opcionalmente, la composición de vacuna puede además contener conservantes, estabilizantes químicos, otras proteínas antigénicas e ingredientes farmacéuticos convencionales. Ingredientes adecuados que se pueden usar en una composición de vacuna junto con los virus incluyen, por ejemplo, ácidos de casamino, sacarosa, gelatina, rojo fenol, N-Z-amina, difosfato monopotásico, lactosa, hidrolizado de lactoalbúmina y leche desecada. Normalmente se optimizan los estabilizantes, adyuvantes y conservantes con el fin de determinar la mejor formulación para su eficacia en el animal o ser humano diana. Entre los conservantes adecuados se incluyen clorobutanol, sorbato potásico, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, los parabenes, etilvanillina, glicerina, fenol y paraclorofenol.

25

Una composición de vacuna de la presente invención se produce, más preferentemente, sin un adyuvante. Cuando es necesario, uno o más de los componentes de vacuna descritos en lo que antecede se pueden mezclar o adsorber con un adyuvante convencional. El adyuvante se usa como irritante no específico para atraer leucocitos o estimular una respuesta inmunitaria. Dichos adyuvantes incluyen, entre otros, aceite mineral y agua, hidróxido de aluminio, Amphigen, Avridina, L121/escualeno, D-lactido-poliláctido/glucósido, pliois plurónico, dipéptido de muramilo, microorganismos muertos de Bordetella, saponinas y Quil A.

30

35

Como alternativa, o además del virus de la invención, cabe esperar que otros agentes útiles en el tratamiento de la infección viral, tal como agentes inmunoestimuladores, sean útiles en la reducción y eliminación de los síntomas de enfermedad, particularmente en seres humanos. El desarrollo de composiciones de vacuna o terapéuticas que contienen estos agentes está dentro de la experiencia de un experto en la técnica a la luz de las enseñanzas de la presente invención.

40

De acuerdo con el procedimiento de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, un animal o ser humano puede ser vacunado contra la infección del VAP administrando una cantidad eficaz de una composición de vacuna descrita en lo que antecede. Una cantidad eficaz se define como la cantidad de vacuna contra el VAP capaz de inducir protección en el receptor contra la infección por el VAP. La vacuna puede administrarse por cualquier vía adecuada. Tal composición se puede administrar por vía parenteral, preferentemente por vía intramuscular o subcutánea. No obstante, también se puede formular para administrar por cualquier otra vía adecuada, incluidas las vías intranasal, oral, intravaginal, subcutánea o intradérmica, o *in ovo*.

45

Un experto en la técnica puede determinar las cantidades eficaces adecuadas de la vacuna contra el VAP de la presente invención según el nivel de respuesta inmunitaria deseada. Tal composición se puede administrar una vez y/o también se puede administrar un refuerzo. No obstante, el veterinario o médico encargado de la asistencia pueden realizar ajustes adecuados de las dosis según la edad, el sexo, el peso y el estado de salud general del sujeto animal o humano. Normalmente, el intervalo de dosificación para la vacuna es del orden de 1-00 millones DICT₅₀. Preferentemente, la dosificación es de alrededor de 1000 DICT₅₀.

50

De igual forma, un experto en la técnica puede determinar fácilmente dosis adecuadas de la composición de vacuna de la invención. La dosificación se puede ajustar en función de las especies animales que están siendo tratadas, es decir su peso, edad y estado de salud general.

55

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona uso de virus de acuerdo con el primer aspecto de la invención en la fabricación de una vacuna para conferir a un animal inmunidad frente a una infección por circovirus.

En una forma preferida, el virus es VAP y el animal es un ave, preferentemente un pollo.

60

La vacuna puede administrarse por cualquier vía adecuada, incluidas las vías intranasal, oral, intravaginal, subcutánea o intradérmica o *in ovo*.

ES 2 334 646 T3

Para aves tales como pollos, la vía de administración preferida es la administración mucosa, administración en aerosol o a través del agua de bebida.

5 La composición de vacuna administrada también se puede usar para prevenir los signos clínicos de la infección por circovirus.

La composición de vacuna administrada también se puede usar para inducir una respuesta inmunológica en el animal frente a un circovirus.

10 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un cebador de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7 ó 8.

15 En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una proteína viral 2 (VP2= del VAP mutante aislada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo compuesto por las SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 y 26.

20 En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona uso de una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención en la fabricación de una vacuna para conferir a un animal inmunidad frente a una infección por circovirus.

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una vacuna contra circovirus de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, que comprende:

25 (a) inocular una molécula de ácido nucleico aislada derivada u obtenida de un genoma de circovirus en el saco vitelino de un huevo embrionado, en la que la molécula de ácido nucleico incluye al menos una porción de una región codificadora de la proteína viral 2 (VP2) que tiene una mutación en su interior;

(b) permitir que el circovirus se replique a partir del ácido nucleico aislado; y

30 (c) recolectar el circovirus del huevo.

35 Preferentemente, el circovirus es el virus de la anemia del pollo (VAP), un virus TT (TTV) u otro virus similar. Más preferentemente, el circovirus es el virus de la anemia del pollo (VAP). Con la definición de circovirus se pretende incluir un VACP y cualquier otro virus que tenga un genoma de ADN circular, monocatenario y de sentido negativo y que exprese una proteína con una actividad funcionalmente equivalente como proteína VP2 del VAP.

40 Preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada incluye el genoma completo del circovirus que incorpora mutaciones en las regiones de inicio de la traducción de la VP2, los motivos de la PTPsa o las regiones de hélice alfa ácidas o las regiones de láminas beta básicas.

45 En la presente memoria, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entiende que la palabra “comprenden” o variaciones tales como “comprende” o “que comprende” implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa indicados, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

50 Toda discusión de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares incluidos en la presente especificación se realiza exclusivamente con el fin de proporcionar un contexto para la presente invención. No se debe tomar como admisión de que cualquiera o todas estas materias forman parte de la base de la técnica anterior o eran conocimientos generales habituales en el campo relevante a la presente invención ya que existían en Australia antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

55 Con el fin de entender la presente invención con mayor claridad, las formas preferidas se describirán con referencia a las siguientes figuras y ejemplos.

Breve descripción de las figuras

60 La figura 1 muestra gráficos de Chou-Fasman de dos regiones predichas de α -hélice anfipática de los residuos 128 a 143 y de lámina- β anfipática de los residuos 151 a 158 de la VP2.

La figura 2 muestra la transfección de la mut C86 R en células MSB1.

La figura 3 muestra la transfección de la mut C 95 S en células MSB1.

65 La figura 4 muestra la transfección de la mut C 97 S en células MSB1.

La figura 5 muestra la transfección de la mut R 101 G en células MSB1.

ES 2 334 646 T3

La figura 6 muestra la transfección de la mut H103 Y en células MSB1.

La figura 7 muestra la transfección de la mut R129 G en células MSB1.

5 La figura 8 muestra la transfección de la mut Q 131 P en células MSB1.

La figura 9 muestra la transfección de la mut R/K/K 150/151/152 G/A/A en células MSB1

10 La figura 10 muestra la transfección de la mut D/E 161/162 G/G en células MSB1.

La figura 11 muestra la transfección de la mut L 163 P en células MSB1.

La figura 12 muestra la transfección de la mut D169 G en células MSB1.

15 La figura 13 muestra homólogos de la R-PTPasa alineados con la secuencia de aminoácidos de la VP2 del VAP usando el software ECLUSTALW (WebANGIS) u mostrados gráficamente usando el software Seqvu (Garvin Institute). Fila 1: Proteína de pollo tirosina fosfatasa alfa (Z32749), residuos 302-306, puntuación de homología 30%. Fila 2: R-PTPasa humana (PP18433), residuos 301-353, puntuación de homología 32%. Fila 3: R-PTPasa de rata (Q03348), residuos 295-347, puntuación de homología 32%. Fila 4: R-PTPasa de ratón (P18052), residuos 328-380, puntuación de homología 32%. Fila 5: R-PTPasa humana (17011300A). Fila 6: Proteína tirosina fosfatasa de placenta humana (CAA38065), residuos 292-345, puntuación de homología 32%. Fila 7: VP2 del VAP.

20 La figura 14 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la VP2 del VAP y la secuencia del TTV SANBAN usando el software ECLUSTALW (WebANGIS) u mostrados gráficamente usando el software Seqvu (Garvin Institute). Se muestran los números de registro en Genbank para los virus TT.

30 La figura 15 muestra una separación electroforética de las proteínas de fusión glutatión-S-transferasa (GST) en un gel de poliacrilamida al 12,5% y la visualización con tinción con azul de Coomassie. Calle 1, patrones de peso molecular de amplio espectro (Biorad); calle 2, 2,6 mg de proteína de fusión GST-VP2 del VAP; Calle 3, 3,0 mg de GST.

35 La figura 16 muestra una transferencia de tinte western con sonda con un antisuero policlonal de ratón producido contra la región COOH terminal de la VP2. Calle 1, patrones de peso molecular de amplio espectro (Biorad); calle 2, 3,0 mg de GST; Calle 2,6 mg de la proteína de fusión VP2 del VAP-GST.

40 La figura 17 muestra una transferencia de tipo western con sonda con antisuero policlonal de conejo contra GST. Calle 1, patrones de peso molecular; calle 2, 3,0 μ g de GST; calle 3, 2,6 μ g de la proteína de fusión GST-VP2 del virus de la anemia de pollo.

45 La Figura 18 muestra un estudio de evolución en el tiempo de la liberación de fosfato de ENDY(Pi)INASL catalizada por VP2-GST o una preparación control de GST. Las reacciones se llevaron a cabo con sustrato 15 nmol. La actividad [V] se midió en nmol de fosfato liberados para cada punto de tiempo.

50 La figura 19 muestra la actividad PTPasa de VP2-GST y proteínas control GST en el ensayo de la PTPasa. Las reacciones se llevaron a cabo con 10 nmol de sustrato y durante 1 minuto. La actividad inicial [V_0] se midió en nmol de fosfato liberados para cada concentración de sustrato. El error estándar de la media para cada concentración de sustrato analizada fue inferior a 0,101.

55 La figura 20 muestra la actividad PTPasa de la VP2 del TLMV con respecto a la actividad de la VP2 del VAP.

Modo(s) para llevar a cabo la invención

Procedimientos Experimentales

55

I. Vacuna contra el VAP

Análisis del genoma del VAP y diseño de sitios para mutagénesis

60 Los estudios que se describen más adelante (Procedimientos Experimentales-VP2) han establecido la actividad de la PTPasa y se han identificado los residuos clave predichos en el motivo firma por comparación con los motivos firma conocidos de la PTPasa. Estos residuos han formado la base del diseño de una estrategia de mutagénesis en un clon de genoma completo infeccioso del VAP. Se pueden diseñar mutaciones para modificar el papel de la PTPasa durante la infección sobre la base del conocimiento de su efecto sobre la catálisis de la PTPasa *in vitro*. Los sitios diana de la mutagénesis dentro de la VP2 del VAP para demostrar la aplicabilidad de esta estrategia fueron 86, 95, 97, 101 y 103. Normalmente, el residuo 86 es C y estaba mutado a S (mut C 86 S) y las otras mutaciones demostrativas fueron mut C 95 S, mut C 97 S, mut R 101 G y mut H 103 Y. Las mutaciones mut C 95 S y mut C 97 S eliminan los residuos de cisteína que se ha predicho que son esenciales para la actividad PTPasa y que son cisteínas catalíticas implicadas

ES 2 334 646 T3

en la formación del intermedio cisteinil-fosfato formado durante la catálisis. Las mutación mut R 101 G elimina los residuos básicos cargados que se ha predicho que son esenciales para la actividad PTPasa y que están implicados en la coordinación del sustrato fosfotirosina con los residuos de cisteína catalítica. Los residuos 103 y 86 flanquean el motivo firma predicho y están altamente conservados en los virus TT y VAP.

Las predicciones estructurales de la proteína VP2 se realizaron usando un software disponible a través de la interfaz ANGIS (WebANGIS, Australian National Genomic Information Service). Se identificó una región de estructura secundaria de alto grado hacia el extremo carboxilo terminal de la VP2. Los gráficos Chou-Fasman de la región predicen una región ácida compuesta por hélice α , seguida por una región básica compuesta por hélice α y lámina- β , después una segunda región ácida de una hélice α . La estructura secundaria se subdivide además en una serie de residuos de prolina. Hay dos regiones predichas de α -hélice anfipática de los residuos 128 a 143 y de lámina- β anfipática de los residuos 151 a 158 (figura 1). Se ha predicho que el alto grado de estructura secundaria se correlaciona con un dominio proteico funcional. Las predicciones de estructura secundaria permiten la introducción de mutaciones diseñadas para romper la organización estructural de la región, de modo que se modifica la función de esta región. Para demostrar el efecto de la mutación dentro de la región de alfa-hélice anfipática básica predicha mut R 129 G y mut R/K/K 150/151/152 G/A/A se han construido para neutralizar la distribución de la carga básica polar en la estructura secundaria. También se ha introducido la mut Q 131 P en la hélice alfa en esta región para romper la hélice. Se empleó un idéntico enfoque para romper la región de hélice alfa ácida con la introducción de mut L 163 P. En la región de la hélice alfa ácida mut D/E 161/162 G/G y mut D 169 G se realizaron constructos con el objetivo de neutralizar la distribución de la carga ácida. Las secuencias nucleicas mutadas del genoma del VAP y las secuencias de aminoácidos de la VP2 se enumeran en secuencias nº 1 a 28.

Diseño del cebador

En todos los experimentos se usó el aislamiento australiano CAU269/7 del VAP. Para cada mutación introducida se sintetizaron oligonucleótidos superpuestos pareados complementarios a ambas hebras de la secuencia de la VP2 del VAP. Los pares de oligonucleótidos se diseñaron para incorporar sustituciones nucleotídicas que codifican las alteraciones de aminoácidos. El genoma del VAP codifica 3 genes en 3 marcos de lectura abiertos superpuestos. Las regiones de la VP2 del VAP diana para la mutagénesis se superponen en los ORF2 y ORF3, que están FRAMESHIFT con respecto a la VP2 por uno o dos pares de bases, respectivamente. Ninguna de las mutaciones introducidas cambia las secuencias de aminoácidos codificadas por los ORF2 y ORF3. La tabla 1 indica los cebadores usados en la introducción de las mutaciones en la VP2 del VAP.

TABLA 1

Cebadores que incorporan cambios de bases que codifican mutaciones dirigidas dentro de la secuencia de la VP2 del VAP. La numeración de las mutaciones se basa en la secuencia de aminoácidos del VP2. Los residuos mutados están indicados

Mutación introducida en la VP2 del VAP	oligonucleótido de sentido +	oligonucleótido de sentido -
mut C87R	ctgcgcgaaCgctcgc gttcccacgctaag	aacgcgagcGttcgcg cagccacacagcga
mut C 95 S	cgctaagatcAgcaact gcg	cgcagttgcTgatctta gcggtg
mut C 97 S	atctgcaacAgcggac aattc	attgtccgcTgttcgag atcttag
mut R 101 G	ctgcggacaattcGga	cagtgttttcCgaatt

ES 2 334 646 T3

	aaacactgg	gtccgcag	
5	mut H 103 Y	cagaaaaTactggttc aagaatgtgccggac	gaaaccagtAttttct gaattgtccgcag
10	mut R 129 G	ctgcgacccctcGgag tacaggg	ccctgtactcCgaggg gtcgcaggatcgc
15	mut Q131P	cgagtacCgggtaagc gagctaaaag	cgcttaccGgtactc ggagg
20	mut R/K/K 150/151/152 G/A/A	ccgaacGgcGCgGCg gtgtataag	atacaccGCcGCgcCg ttcggggtc
25	mut D/E 161/162 G/G	taagatggcaagGcg Ggctcgcagacc	tgcgagcCcgCcttgc catc
30	mut L 163 P	gacgagcCcgagacc gagag	ggcctctcggctctgcg Ggctcgtc
35	mut D 169 G	gagaggccgGttttac gccttcag	gcgtaaaaCcggcctc tcggtc
40	mut K 102 E	ctgcggaacaatcagaGa aactggtttc	gaaaccagtgttCtct gaattgtccgcag
45	mut E 186 G	gcgacttcgacgGaga tataaatttc	tttatatctCcgtcgaag tcgc
50			
55			

60 *Mutagénesis por PCR de extensión superpuesta*

Se introdujeron mutaciones en la secuencia de la VP2 del VAP por PCR de extensión superpuesta. El siguiente procedimiento se aplica a la mutagénesis de todos los constructos mutantes a menos que se indique otra cosa. El molde par PCR era un clon de genoma completo del VAP (*pCAU269/7*) en el vector plasmídico pGEX-4Z (Promega). El molde de ADN se preparó a partir de *E. coli* DH5 α que posee el clon *pCAU269/7* cultivado a 37°C en agar de Luria-Bertaniagar (LA) con selección en 50 μ g/ml de ampicilina. Se realizó una preparación de plásmido usando un kit qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen). La mutagénesis por PCR se realizó en dos etapas. La primera etapa consistió en un grupo de 2 reacciones de PCR: Una de un cebador adyacente en dirección 5' hacia el

ES 2 334 646 T3

5 cebador de mutagénesis sentido - y una desde un cebador adyacente en dirección 3' hacia el cebador de mutagénesis sentido +. En la segunda etapa de la mutagénesis por PCR, los productos del primer par de reacciones actuaron como molde en una reacción de PCR solapada utilizando los cebadores adyacentes. El producto de PCR generado está unido por las secuencias adyacentes y se incorpora en ambas hebras las mutaciones introducidas en el molde en la primera etapa de la PCR.

10 El cebador adyacente en dirección 5' del VAP 1-5' CTATCGAATTCGAGTGGTACTAT 3' y el cebador adyacente en dirección 3' CAV.10-5' TGCTCACGTATGTCAGGTTTC 3' se usaron en la PCR solapada para la construcción de mut C 95 S y mut C 97 S. En la primera etapa se preparó una mezcla de reacción de 100 μ l que contenía 300 μ M de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, MgSO₄ 2 mM, 200 μ M de cada cebador, 10 μ l de tampón 10x platino *Pfu* Taq ADN polimerasa, 2 U de platino *Pfu* Taq ADN polimerasa (Promega) y 1 μ l de ADN molde. La reacción de PCR se incubó a 95°C durante 2 minutos, seguido por 30 ciclos a 95°C durante 40 segundos, a 60°C durante 60 segundos, después a 68°C durante 40 segundos, y una incubación final a 68°C durante 5 minutos. El molde de la primera etapa se eliminó mediante digestión con la endonucleasa de restricción *DpnI* (Life Technologies). Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) y las bandas correspondientes a los productos de la etapa uno se escindieron y purificaron mediante extracción en gel Qiaex II (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Para la PCR solapada se preparó una mezcla de reacción de 100 μ l que contenía 300 μ M de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, MgSO₄ 2 mM, 200 μ M de cada cebador, 10 μ l de tampón 10x Hifidelity Taq ADN polimerasa, 2 U de Hifidelity Taq ADN polimerasa (Promega) y 1 μ l de ADN molde. La reacción de PCR se incubó a 95°C durante 2 minutos, seguido por 1 ciclo a 95°C durante 40 segundos, 57°C durante 90 segundos, después a 68°C durante 40 segundos, después 15 ciclos a 95°C durante 40 segundos, 57°C durante 60 segundos, después a 68°C durante 40 segundos y una incubación final a 68°C durante 5 minutos.

25 Los procedimientos para la mutagénesis de todos los demás mutantes, a excepción de la mut C87R y la mut H 103 Y, fueron como se ha descrito para mut C 95 S y mut C 97 S, excepto que el cebador adyacente en dirección 5' fue el cebador CAV.2 5' GCGGAGCCGCGCAGGGGCAA 3' y el cebador adyacente en dirección 5' fue CAV.10. En la segunda etapa de la PCR solapada las reacciones se incubaron a 96°C durante 2 minutos, seguido por 15 ciclos a 96°C durante 40 segundos, 58°C durante 60 segundos, después a 72°C durante 60 segundos y una incubación final a 72°C durante 5 minutos.

30 Se probó sin éxito una serie de condiciones de PCR en un intento de solapar con PCR los productos de la mutagénesis para mut C87R y mut H 103 Y. Por tanto, se generaron mut C87R y mut H 103 mediante mutagénesis por extensión superpuesta de círculo completo en una única reacción de PCR. Se estableció una mezcla de reacción de 100 μ l tal como se ha descrito anteriormente, aunque usando únicamente los cebadores de mutagénesis relevantes. La reacción de PCR se incubó a 96°C durante 2 minutos, seguido por 1 ciclo a 96°C durante 40 segundos, 55°C durante 60 segundos, después 68°C durante 5 minutos, después 40 ciclos a 96°C durante 40 segundos, 60°C durante 60 segundos, después 68°C durante 5 minutos y una incubación final a 68°C durante 5 minutos. El ADN molde se eliminó mediante digestión con la endonucleasa de restricción *DpnI* y el producto de la PCR se purificó mediante extracción con fenol estándar, fenol-cloroformo y fenol-cloroformo-isoamilo y precipitación en etanol.

Clonación de constructos mutantes

45 El siguiente procedimiento se aplicó a la clonación de todos los constructos mutantes a menos que se indique otra cosa. Los productos de la PCR que contenían las secuencias mutantes se subclonaron en el clon infeccioso de VAP en el vector plasmídico pGEX-4Z, *pCAU269/7*. Los productos de la PCR se digirieron con las endonucleasas de restricción *StuI* y *BsmI* y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1%). Se escindió una banda de 357 pb y se purificó mediante extracción en gel Qiaex II (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El *pCAU269/7* se digirió de un modo similar con las endonucleasas de restricción *StuI* y *BsmI* para eliminar la región de 357 pb a sustituir con la secuencia mutante y la banda de 4687 pb se purificó en un gel de agarosa al 1%. Después, el producto de la PCR se ligó en la estructura VPA-pGEX-4T-2 (Promega) digerida siguiendo los protocolos estándar. La cepa DH5 α de *E. coli* se transformó mediante electroporación con el plásmido ligado y se cultivó a 37°C en agar de Luria-Bertani (LA) que contenía ampicilina a 50 μ g/ml. El plásmido se purificó en clones seleccionados usando un kit de Qiagen según las instrucciones del fabricante (Qiagen). Los clones se sometieron a detección selectiva para detectar la presencia del inserto mediante PCR usando el cebador directo CAV.2 y el cebador inverso CAV.10. El ADN clonado se secuenció usando un kit de secuenciación Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer), usando los cebadores CAV.2 y CAV.10.

60 Los procedimientos para la construcción de mut C87R y mut H 103 Y progresaron como se ha descrito, a excepción de las variaciones siguientes. El producto purificado de la PCR de la etapa 2 se clonó inicialmente en el vector pGEM-4T-2 (Promega) según las instrucciones del fabricante y después se digirió con las endonucleasas de restricción *StuI* y *BsmI* y se subclonaron en *pCAU269/7* como se ha descrito anteriormente. Los productos de la PCR mut C87R y mut H 103 Y, tras digestión con la endonucleasa de restricción *DpnI*, se ligaron siguiendo los protocolos estándar y se transformaron mediante electroporación en la cepa DH5 α de *E. coli* y se cultivaron a 37°C en agar de Luria-Bertani (LA) que contenía ampicilina a 50 μ g/ml. Los clones que contenían la secuencia mutante se sometieron después a detección selectiva y se seleccionaron como se ha descrito en lo que antecede.

ES 2 334 646 T3

Transfección de genomas víricos mutados en células MSB1

El clon control pCAU269/7, control pEGFP-C2 y los constructos mut C87R, mut C 95 S, mut C 97 S, mut R 101 G, mut H 103 Y, mut R 129 G, mut N 131 P, mut R/K/K 150/151/152 G/A/A, mut D/E 161/162 G/G, mut L 163 P, mut D 169 G y mut E 186 G se transfeccionaron en cultivos celulares.. El ADN del VAP para transfección se preparó usando un kit de purificación plasmídica Qiagen. Todos los constructos se digirieron con la endonucleasa de restricción *EcoRI* para liberar el inserto genómico, se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y las bandas de 2298 pb se escindieron del gel y se purificaron usando el kit de purificación plasmídica en gel Qiaex II según las instrucciones del fabricante, El ADN del VAP purificado se resuspendió en Tris 10 mM estéril (a pH 8 a 25°C). El ADN control para transfección pEGFP-C2 que contenía la proteína fluorescente verde (GFP) en dirección 3' de un promotor de CMV se preparó en forma de un plásmido sin digerir.

En todos los experimentos se utilizó la línea celular MDCC linfocítica transformada con el virus de la enfermedad de Marek-MSB1. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, EE.UU.) suplementado con glutamina 2 mM (Sigma), piruvato 2 mM, NaHCO₃ 0,2%, 50 µg/ml de ampicilina (CSL), 50 µg/ml de gentamicina (CSL) y 10% de suero bovino fetal (Flow Laboratories) (inactivada con calor a 52°C) (medio completo denominado RF-10), a 37°C en CO₂ al 5%. El cultivo se pasó a medio fresco 24 horas antes de la transfección para sincronizar el estadio del ciclo celular. Las células se lavaron dos veces en el RPMI sin FCS, se resuspendieron a una concentración final de 10⁷ células/ml y una alícuota de 700 µl se transfirió con 10 µg del ADN relevante a un tubo de microfuga en hielo para cada muestra. La transfección se consiguió mediante electrointernalización con un pulso de duración prolongada y alto voltaje en una cubeta de electroporación de 0,4 cm de hueco en un aparato Gene Pulser (Bio Rad). Se liberó un pulso a 400 v, 900 µF, ∞ resistencia y capacitancia de extensión. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, después se resuspendieron en 5 ml de medio de crecimiento precalentado. La eficiencia de la transfección se evaluó 48 horas después mediante determinación del porcentaje de células positivas para la expresión de GFP en la transfección control.

Evaluación de la competencia de la replicación y la infectividad de los constructos mutantes del VAP

La capacidad de los virus mutantes para infección y replicación en un cultivo celular se evaluó en células MDCC-MSB1 transfeccionadas con constructos víricos mutantes. Los cultivos se pasaron en serie a una dilución de 1/10 a intervalos de 48 horas para 10 pases. Las muestras (cada 48 horas) se evaluaron para determinar la infectividad por porcentaje de células que expresan VP3. La expresión de VP3 se detectó mediante ensayo de inmunofluorescencia. Las células infectadas se lavaron dos veces y se resuspendieron en 200 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4 y se aplicaron a un porta con múltiples pocillos. Las preparaciones se lavaron entre todas las incubaciones con tampón PBS que contenía 0,1% de BSA y 0,05% de Tween 20. Las células se fijaron en metanol al 90% helado durante 5 minutos y la preparación se bloqueó durante 1 hora con una solución de 5% de BSA/PBST a 37°C en una cámara humidificada. El anticuerpo primario fue un anticuerpo monoclonal de ratón anti-VP3 (TropBio) diluido a 1/200 en 0,1% de BSA/PBST y se incubó durante 1 hora a 37°C en una cámara humidificada. El anticuerpo secundario fue un anticuerpo monoclonal de oveja anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Dako) diluido a 1/100 en 0,1% de BSA/PBST y se incubó durante 1 hora. Los porcentajes de células fluorescentes contra el número de pases se cuantificaron respecto a la fluorescencia base control de MSB1.

Las preparaciones de virus mutantes se realizaron desde el primer pase de cultivo transfeccionado que demostró al menos un 5% de infección con el VAP. El cultivo se congeló y descongeló tres veces y después se aclaró con centrifugación a 6000 g durante 10 minutos. Después, las células MDCC-MSB1 se re infectaron con la preparación vírica. La preparación del virus mediante este procedimiento y la re infección del cultivo se repitieron para al menos tres pases víricos en cada caso. La recuperación del virus competente de replicación se demostró mediante ensayo de inmunofluorescencia (como se ha descrito en lo que antecede), PCR del lisado infectado seguida por transferencia de tipo southern con una sonda específica del VAP y transferencia de tipo western del lisado infectado. De las células MDCC-MSB1 se purificó una preparación de ADN celular 48 horas después de la infección con el VAP mutante mediante lisis con proteinasa K y dodecilsulfato sódico (SDS) y extracción en fenol/cloroformo, según el método de Meehan, B. M., Todd, D., Creelan, J. L., Earle, J. A., Hoey, E. M. y McNulty, M. S. (1992). Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anaemia agent: sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. Arch Virol 124, 301-319. Después, la secuencia mutante se amplificó usando el grupo de cebadores CAV.2 and CAV.10 y las correspondientes condiciones de la reacción PCR descritas en lo que antecede. El producto de la PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se transfirió a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham) usando transferencia capilar (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (ed. C. Nolan). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Tras la transferencia, la membrana se aclaró durante 10 minutos en tampón 6xSSC y se expuso a luz ultravioleta en un transiluminador durante 10 minutos. A partir del ADN del clon genómico del VAP se realizó una sonda radiomarcada específica del VAP usando cebado hexamérico aleatorio de síntesis de ADN con un kit comercial según las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim). La membrana se empapó en un tampón de pre-hibridación de 5xSSC, 5x solución de Denhart, 100 µg/ml de ADN desnaturizado de esperma de salmón y 0,5% de SDS, a la que se ha añadido la sonda radiomarcada preparada. La sonda se hibridó al ADN transferido durante la noche a 50°C. La transferencia se lavó tres veces durante 20 minutos con 2 xSSC y 0,1% de SDS a 68°C y se expuso una película radiográfica a la transferencia durante 4 horas a -70°C.

ES 2 334 646 T3

Las transferencias tipo western se realizaron de un lisado de 10^3 células MDCC-MSB1 infectadas con el VAP mutante. Las proteínas se sometieron a electroforesis en geles de poli(acrilamida) dodecilsulfato sódico (SDS) al 12,5% y se tiñeron con azul brillante de Coomassie (Laemmli, Reino Unido (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685). Las proteínas se electrotransferieron a una membrana de polivinildifluoruro (PVDF: Immobilon, Millipore). Las transferencias tipo western se sondaron con un anticuerpo monoclonal de ratón producido contra la VP3 del VAP (TropBio) diluido a 1/2000 en 0,1% de BSA/PBST y se incubaron durante 1 hora, seguido por un conjugado secundario de peroxidasa de rábano de oveja (HRP) anti-ratón diluido a 1/2000 y desarrollado con sustrato de quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia).

10

Demostración de un fenotipo in vitro para virus mutantes de VAP

Se investigaron las características de crecimiento y citopatogenicidad de los virus mutantes. Los virus mutantes del VAP se titularon en placas usando un virus control generado a partir de *pCAU269/7*. La titulación se realizó en una bandeja multipocillo de 8 x 12 (Nunc) en volúmenes de cultivo de 200 μ l a 5×10^5 de células MSB1/ml. Se realizaron diluciones en serie de 10 del virus madre con 6 duplicados y variaron desde los factores de dilución finales de 0,05 a $0,5 \times 10^{-10}$. A intervalos de 48 horas, las células infectadas se pasaron en serie a medio fresco a una dilución de 1 en 4. Cada pocillo se puntuó según la evidencia de existencia de un efecto citopatogénico (ECP). Las indicaciones de ECP son células hinchadas de mayor tamaño, vacuolación nuclear y ensamblajes de cromatina, fragmentación celular y alcalinización del medio. Los cultivos se pasaron en serie hasta que no se detectaron diferencias entre los sucesivos pases en el último punto o la dilución más baja a la que se observó el ECP en el 50% de los pocillos. La observación de ECP se confirmó mediante ensayos de inmunofluorescencia de la dilución de punto final. El título se calculó como la dosis infectiva de cultivo tisular para el 50% de infectividad ($DICT_{50}/ml$) usando el método de Karber. Normalmente eran necesarios 5-7 pases para establecer el último punto.

25

Los títulos de las reservas víricas obtenidas mediante filtración en placa se confirmaron mediante Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) con respecto a la reserva de virus parental como patrón. Se realizó una serie de dilución de diez veces de 10^0 a 10^{-4} de la reserva vírica en volúmenes de 0,5 ml de RPMI. Después, las diluciones víricas se adsorbieron en 4×10^6 células MSB1-MDCC y se resuspendieron en 4 ml de RF10 en una bandeja de cultivo de 6 pocillos. Tras 48 horas de infección, se sedimentaron 2 ml de células mediante centrifugación a 1500 g durante 5 minutos. Las células infectadas se prepararon para tinción con inmunofluorescencia mediante fijación, permeabilización y bloqueo de la reactividad inespecífica de superficie. Todos los lavados se realizaron con volúmenes de 5 ml de FCS al 1% y azida sódica 1 mM (NaN_3) en PBS. Las etapas de centrifugación entre las etapas tampón se realizaron a 1500 g durante 5 minutos. Las células se fijaron mediante durante 45 minutos a 4°C en 1 ml de formaldehído ultrapuro al 3% en PBS y NaN_3 1 mM. A continuación, las células fijadas se lavaron dos veces en 5 ml de glicina 0,1M y NaN_3 1 mM, después se permeabilizaron durante 5 segundos mediante resuspensión en 0,5 ml de 0,1% de Triton-X100 y NaN_3 1 mM en PBS, seguido por dilución en 4,5 ml de tampón de lavado y dos etapas de lavado posteriores. Tras la permeabilización, las células se colocaron en hielo en todas las etapas. La reactividad no específica se bloqueó mediante una incubación de 15 minutos a 4°C en FCS al 10% y NaN_3 1 mM en PBS, seguido por dos etapas de lavado. El anticuerpo primario fue 50 μ l de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-VP3 TropBio) diluido a 1/50 en tampón de lavado y las células se incubaron en éste durante 45 minutos a 4°C. El anticuerpo secundario fue un anticuerpo monoclonal de oveja anti-ratón conjugado con FITC (Dako) de nuevo diluido a 1/50 en tampón de lavado y las células se incubaron en éste durante 45 minutos a 4°C. Las células inmunoteñidas se almacenaron durante hasta 16 horas en 200 μ l de formaldehído ultrapuro al 1% en NaN_3 1 mM en PBS.

45

Las reservas víricas *pCAU269/7*, que se había titulado en placas tres veces anteriormente, se usaron como patrones para cada análisis de FACS. La adquisición y el análisis de los datos se realizó con el software Cellquest. Los parámetros del instrumento citómetro se indican en la tabla 2.

50

TABLA 2

Parámetros del instrumento citómetro

55

Parámetro	Detector	Voltaje	Ganancia A	Modo
P1	FSC	E01	1,81	Lineal
P2	SSC	366	1,00	Lineal
P3	FL1	469	1,00	Logarítmico

60

65

La población de linfocitos obtenida se mostró en forma de un histograma con la intensidad de la fluorescencia como variable dependiente. Se observaron dos poblaciones celulares distintas de distribución normal; un pico de intensidad de fluorescencia baja debido a la tinción de base y a la autofluorescencia, y un segundo pico de intensidad

ES 2 334 646 T3

de fluorescencia alta específica. Se estableció visualmente un marcador para que incluya a tinción de células con intensidad alta, específicamente para VP3 del VAP y para contener < 0,05% de las células en la muestra no infectada control negativo. A partir de las reservas víricas se construyó una curva estándar de dilución vírica frente al recuento celular en la región marcador. Las curvas se establecieron con independencia tres veces distintas. Las diluciones
5 relativas de las reservas víricas de prueba se establecieron calculando la transposición de la curva del FACS desde una curva estándar concurrente.

La citopatología *in vitro* se evaluó mediante microscopia de contraste de fases y mediante tinción de células fijadas con un anticuerpo monoclonal específico para VP3 como se ha descrito en lo que antecede. Las células se contratiñeron
10 durante 2 minutos en tinción de Hoescht. También se realizó tinción inmunofluorescente (IFA) con un anticuerpo policlonal de ratón producido contra la región C terminal de VP2, a una dilución de 1/100 y un anticuerpo secundario policlonal de oveja anti-ratón conjugado con FITC (Dako) de nuevo diluido a 1/100 en 0,1% de BSA/PBST.

15 *Modelo de exposición en huevos embrionados*

Se desarrolló un modelo de exposición en huevos embrionados con el fin de evaluar la infectividad y el fenotipo *in vivo* del VAP mutante. Inicialmente, el modelo se usó para verificar la equivalencia entre el virus generado de la transfección del ADN de *pCAU269/7* (virus clon) y la cepa de VAP parental *CAU269/7* (virus parental). La inoculación en el saco vitelino de embriones de días con el virus parental, *pCAU269/7* y el inóculo de MSB1 simulado se repitió tres
20 veces. Los virus mut C87R, mut R 101 G, mut H 103 Y, mut R 129 G, mut N 131 P, mut R/K/K 150/151/152 G/A/A, mut D/E 161/162 G/G, mut L 163 P, mut D 169 G y mut E 186 G se probaron en el modelo comparado con el virus clon y el inóculo de control de células MSB1 sin infectar. Los experimentos de exposición de mutantes se repitieron dos veces distintas.

25 *Inoculación de huevos embrionados*

Se prepararon reservas víricas a partir de 400 ml de cultivo infectado de células MDCC-MSB1 en un procedimiento adaptado de Todd, D., Mackie, D. P., Mawhinney, K. A., Conner, T. J., McNeilly, F. y McNulty, M. S (1990).
30 Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect serum antibody to chicken anemia agent. Avian Dis 34, 359-363. Brevemente, 400 ml de cultivo se sonicó a una frecuencia baja en un baño de hielo, se añadió SDS hasta 0,5% y el lisado se incubó durante 30 minutos a 37°C. Los residuos celulares se eliminaron mediante sedimentación a 10.000 g durante 30 minutos. Después, el virus se purificó mediante ultracentrifugación a 80.000 g durante 3 horas a 15°C. Los sedimentos víricos se lavaron en medio RPMI y se sedimentaron de nuevo a 80.000 g durante 3 horas. Las reservas víricas se titularon siguiendo el procedimiento descrito en lo que antecede y se resuspendieron a un título final de 10^{4,5} DICT₅₀/ml.

Los huevos sin patógenos específicos fértiles (SPF) se obtuvieron de SPAFAS Australia Pty. Ltd., James Rd (PO
40 Box 641), Woodend VIC 3442, Australia. Los huevos se incubaron en un incubador Múltiple Brooder con capacidad para 300 huevos y giro manual. Mediante una aguja de 0,56 mm se inoculó un inóculo del virus de 0,5 ml, o 104 DICT₅₀, en el saco vitelino de huevos embrionados de 7 días.

45 *Valoración de la infectividad y fenotipo in vivo de los virus mutantes*

La infectividad se valoró mediante la detección de la proteína vírica VP3 mediante inmunofluorescencia en células aisladas de médula ósea y de timo, bazo y bolsa. Se realizaron preparaciones finas de médula ósea extraída de la
50 cavidad medular femoral. El ensayo de inmunofluorescencia que se describe en lo que antecede para el cultivo celular se usó para detectar VP3 de VAP en médula ósea. El fenotipo *in vivo* se evaluó mediante el peso corporal, los pesos de los órganos linfoides y la puntuación de la lesión de la anatomo-patología macroscópica en embriones a los 21 días. Los pesos se midieron para el embrión completo y el timo, el bazo y la bolsa de Fabricio diseccionados. El hematocrito (PCV) se midió en sangre obtenida mediante venopunción de la vena vitelina o punción cardíaca. La anatomo-patología macroscópica se valoró usando un sistema estandarizado de puntuación de la lesión para órganos
55 diana de la infección por el VAP.

Puntuación de las lesiones

Se estableció un sistema de graduación para permitir la clasificación consistente de la gravedad de la lesión asociada con la infección por VAP. Las lesiones en el timo, médula ósea, bazo, bolsa de Fabricio y la incidencia de hemorragia se puntuaron todas ellas en una escala de 1 a 4. A partir de esto derivó una puntuación acumulada de la lesión para la gravedad global de la patología con puntuaciones dobles para el timo y la médula ósea porque son los principales
60 órganos diana de la infección. En todos los casos, una puntuación de 1 indica ausencia de patología. Las tablas 3-8 indican el sistema de puntuación usado para la anatomía-patológica macroscópica.

ES 2 334 646 T3

TABLA 3

Puntuación del timo

Puntos de graduación	Clasificación	Descripción
4	Grave	~80-100% pérdida de parénquima lobular, ± hemorragia grave, ± exudado serosanguinolento intenso
3	Moderado	~50-80% pérdida de parénquima lobular, ± hemorragia moderada, ± exudado serosanguinolento moderado
2	Leve	~10-50% pérdida menor de parénquima lobular, O hemorragia leve O exudado serosanguinolento leve

TABLA 4

Puntuación de la médula ósea

Puntos de graduación	Clasificación	Descripción
4	Grave	~80-100% pérdida prácticamente completa de médula, muy pálida
3	Moderado	~30-50% pérdida focal de médula, moderadamente pálida
2	Leve	Médula ligeramente más pálida que los normal O lisis aguda y hemorrágica

TABLA 5

Puntuación del bazo

Puntos de graduación	Clasificación	Descripción
4	Grave	~70-90% reducción del tamaño, muy pálido, ± hemorragia subcapsular
3	Moderado	~30-50% reducción del tamaño, moderadamente pálido, ± hemorragia subcapsular
2	Leve	<30% reducción del tamaño O ligeramente pálido O hemorragia subcapsular leve

ES 2 334 646 T3

TABLA 6

Puntuación de la bolsa de Fabricio

Puntos de graduación	Clasificación	Descripción
3	Grave	~50% reducción del tamaño, pliegues colapsados
2	Leve	~30% reducción del tamaño

TABLA 7

Puntuación de hemorragia

Puntos de graduación	Clasificación	Descripción
3	Grave	Extensa hemorragia petequial en tejidos subcutáneos y planos fasciales O mesenterio U órganos, O sangre visiblemente acuosa en la venopunción
2	Moderada a leve	Presencia de petequias de grado bajo sobre los muslos O los flancos O las puntas de las alas únicamente

TABLA 8

Puntuación total acumulada de las lesiones

Puntos de graduación	Clasificación
19-13	Lesiones graves por VAP
13-8	Lesiones moderadas por VAP
8-2	Lesiones leves por VAP

Resultados

I. Vacuna contra el VAP

5 Construcción de VAP con genotipos mutantes

Los constructos mut C87R, mut C 95 S, mut C 97 S, mut R 101 G, mut H 103 Y, mut R 129 G, mut Q 131 P, mut R/K/K 150/151/152 G/A/A, mut D/E 161/162 G/G, mut L 163 P, mut D 169 G y mut E 186 G se realizaron mediante mutagénesis por PCR y subclonación en un clon del VAP de genoma completo *pCAU269/7*. La presencia de las mutaciones en cada constructo se confirmó mediante secuenciación del constructo final dos veces en ambas direcciones a lo largo del sitio de la mutación. Los virus con genotipos mutantes se generaron a partir de la transfección del constructo en el cultivo celular. La eficiencia de la transfección se valoró con el número de células que expresan GFP tras la transfección con el plásmido *pEGFP* control. La eficiencia de la transfección fue variable y se encontró que entre 1 y 49% de las células eran positivas para la expresión de GFP 48 horas después de la transfección. La transfección de *pCAU269/7* tuvo como resultado una fase inicial de expresión transitoria de VP3 de VAP según se observa mediante IFA. La expresión transitoria no necesariamente representa replicación vírica activa. Se requirió un número variable de pases antes de que mediante IFA se pusiera de manifiesto un incremento exponencial en el número de células positivas para la expresión de VP3 control. El pase en serie se realizó con diluciones de 1/10. Por tanto, los incrementos exponenciales en el número de células positivas para VP3 de VAP representaron replicación vírica activa e infección en lugar de simplemente mantenimiento de los constructos de ADN transfeccionados. Se encontró que todos los constructos mutantes de VP2 del VAP analizados eran infecciosos y capaces de replicarse *in vitro* hasta cierto punto cuando se evaluaron en paralelo con los controles *pCAU269/7* y simulado (figuras 2 a 12). Para cada constructo, la presencia de virus de replicación competente independiente de las asociaciones celulares se confirmó mediante lisis y aclaración del cultivo transfeccionado, seguido por la reinfección del cultivo. Este procedimiento se repitió en serie para cuatro pases. La presencia de virus se confirmó mediante transferencia de tipo western para detectar VP3 de VAP, mediante transferencia de tipo southern usando una sonda específica del VAP y mediante PCR del cultivo digerido con la endonucleasa de restricción *DpnI* para eliminar cualquier ADN transfeccionado residual. Los genotipos mutantes se confirmaron mediante secuenciación del producto de la PCR del lisado.

Aunque los virus de replicación competente se generaron a partir de todos los constructos mutantes, los virus mut C 95 S y mut C 97 S produjeron títulos víricos log máximos ($\text{DICT}_{50}/\text{ml}$) de 1,5 y 1,7, respectivamente a pesar de los repetidos intentos de optimizar las condiciones de cultivo. Estos títulos víricos se consideraron demasiado bajos para inocular los embriones y los virus mut C 95 S y mut C 97 S no se siguieron investigando. Se obtuvieron títulos víricos log ($\text{DICT}_{50}/\text{ml}$) de 4,5 para los constructos mut C87R, mut R 101 G, mut H 103 Y, mut R 129 G, mut N 131 P, mut R/K/K 150/151/152 G/A/A, mut D/E 161/162 G/G, mut L 163 P, mut D 169 G y mut E 186 G cuando se prepararon en 4 pases en un volumen final de 400 ml de cultivo infectado, concentrado mediante ultracentrifugación, resuspendido a títulos equivalentes (Tabla 9). Los títulos se consideraron adecuados para inocular los embriones y se usaron 0,5 ml de la reserva o $10^{4.2} \text{DICT}_{50}$.

40

TABLA 9

45 *Títulos para reservas víricas concentradas usadas para la inoculación de los embriones. Los títulos se establecieron mediante titulación en placa y mediante FACS por correlación con un patrón vírico clon. Las reservas se evaluaron mediante PCR y secuenciación para confirmar el genotipo mutante. El título por FACS estimó una precisión de $\pm 10^{0.5} \text{DICT}_{50}/\text{ml}$*

Mutante	Log del título de FACS $\text{DICT}_{50}/\text{ml}$	Log del título en placa $\text{DICT}_{50}/\text{ml}$	PCR con la reserva	Secuenciación de la reserva para detección de mutación
<i>pCAU269/7</i>	4,5	4,5	Positiva	Correcta
mut C87R	4,5	4,5	Positiva	Correcta

65

mut C 95 S	1,5	1,5	Positiva	Correcta
mut C 97 S	1,5	1,7	Positiva	Correcta
mut R 101 G	4,5	4,5	Positiva	Correcta
mut H 103 Y	4,5	4,5	Positiva	Correcta
mut R 129 G	4,5	4,5	Positiva	Correcta
mut L 131 P	4,5	4,8	Positiva	Correcta
mutR/K/K150/ 151/152G/A/A	4,5	4,1	Positiva	Correcta
mutD/E 161/162G/G	4,5	4,5	Positiva	Correcta
mut163	4,5	4,5	Positiva	Correcta
mut D 169 G	4,5	3,9	Positiva	Correcta
mut E 186 G	No realizado	4,5	Positiva	Correcta

Modelo de infección en huevos embrionados

Se realizó una serie de experimentos de infección. Los experimentos 1 y 2 establecieron una infectividad y virulencia equivalentes entre el virus parental y el virus generado a partir del constructo clonado, *pCAU269/7* (virus clon). Todas las aves de los grupos de tratamiento del virus parental y clon tenían lesiones dentro del timo, la médula ósea, el bazo y hemorragias clasificadas con de patología grave por VAP. No se observaron diferencias significativas en los grupos determinado mediante una prueba de Mann Whitney. Ambos grupos fueron significativamente diferentes del grupo no infectado en todos los casos, con la excepción de las puntuaciones en médula ósea para el grupo del clon. La patología grave asociada con la infección por el virus de tipo salvaje (virus parental o clon) se puede resumir del siguiente modo: se encontró formación de petequias leve a moderada en los tejidos facial y subcutáneo en todos los polluelos o embriones. El tamaño del bazo se redujo entre 50-80% y, en general, aparecía anormalmente pálido y presentaba hemorragias subcapsulares. En todas las aves, la reducción del tamaño de todos los lóbulos tímicos se graduó como grave y, en la mayoría, el aspecto fue de hemorragia en los lóbulos o de un exudado serosanguinolento gelatinoso subcapsular en los lóbulos, consistente con citólisis aguda. Se produjo una reducción del contenido de la médula ósea y un aspecto pálido graso en la médula o hemorragia aguda grave y lisis. En una minoría de aves, la bolsa de Fabricio se redujo de tamaño y la cápsula y los pliegues parenquimatosos aparecían macroscópicamente colapsados.

Los experimentos 3-12 implicaban infección con virus mutantes y virus clon y controles no infectados. El análisis estadístico de las puntuaciones de las lesiones, los pesos corporales, los pesos de los órganos linfoides en comparación con los pesos corporales y el tamaño de las poblaciones de linfocitos en el timo, la bolsa de Fabricio y el bazo en los embriones infectados por virus mutantes o el virus de tipo salvaje y los controles no infectados se indican en las tablas 10-17. En resumen, las puntuaciones de las lesiones fueron significativamente menores en los embriones infectados con los virus mutantes que en los infectados con el virus de tipo salvaje, y, en la mayoría de los casos, las lesiones fueron significativamente menos graves en la mayoría de los órganos linfoides (Tabla 10). De igual forma se encontró una diferencia significativa en el peso corporal, las proporciones timo/peso corporal y bazo/peso corporal y, en la mayoría de los casos, la proporción bolsa/peso corporal entre los embriones infectados con virus mutantes y los infectados con CAU269/7 salvaje (Tabla 11).

Tabla 10. Puntuaciones de las lesiones en los tejidos linfoides, puntuaciones de hemorragia y puntuaciones acumuladas en embriones infectados por VAP.

Grupo de tratamiento	Mediana de las puntuaciones de las lesiones #																		Puntuaciones acumuladas										
	Timo						Bazo						Médula ósea						Hemorragia						S	I	n	P ₁	P ₂
	S	I	n	P ₁	P ₂	S	I	n	P ₁	P ₂	S	I	n	P ₁	P ₂	S	I	n	P ₁	P ₂									
CAU269/7	3	1-4	2	N	***	3	1	1	N	***	1	1	2	N	***	2	1	2	N	***	1	3-	1	3-	1	N	***		
Mut C87R	2	1-4	2	***	***	2	1	2	***	***	1	1	1	***	***	1	1	1	***	†	1	2-	1	2-	1	***	***		
Mut R101G	1	1-3	1	***	**	2	1	1	**	***	1	1	1	***	***	2	1	1	**	***	2	1	3-	1	***	***	***		
Mut H103Y	2	1-4	2	***	**	1	1	2	***	***	1	1	1	***	***	1	1	1	**	†	1	1-	1	1-	1	***	***		
Mut R129G	3	1-4	2	***	***	1	1	1	***	*	1	1	1	***	†	1	1	1	**	*	1	1	2-	1	***	***	***		
Mut Q131P	2	1-4	1	***	***	2	1	1	*	***	1	1	1	***	***	1	1	1	*	†	1	1	2-	1	***	***	***		

65	¶ Virus inoculado en los embriones E7
40	# mediana de las puntuaciones de las lesiones en los grupos de tratamiento
55	S mediana de la puntuación
60	n tamaño del grupo
55	I Intervalo
35	P ₁ valor P para la prueba de Mann Whitney entre CAU269.7 y el grupo de tratamiento
35	P ₂ valor P para la prueba de Mann Whitney entre el control negativo y el grupo de tratamiento
55	* valor P significativo al nivel 0,05
55	** valor P significativo al nivel 0,01
55	*** valor P significativo al nivel 0,001
55	* valor P significativo al nivel 0,05
5	
10	
15	
20	
25	
30	

Tabla 11. Proporciones peso corporal, tîmo:peso corporal, bazo:peso corporal y bolsa:peso corporal para los embriones infectados por VAP.

Grupo de tratamiento ¶	Peso corporal #			Tîmo:Peso corporal			Bazo: peso corporal			Bolsa: peso corporal					
	µ	SEM	n	P ₁	P ₂	µ	SD	n	P ₁	P ₂	µ	SD	n	P ₁	P ₂
CAU2697	24,8	1,9	24	NA	***	5,75	2,4	9	NA	***	0,21	0,06	9	NA	**
Mut C87R	34,60	1,4	20	***	†	9,85	3,3	23	***	†	0,34	0,1	23	*	**
Mut R101G	37,95	1,9	8	***	†	10,54	2,0	7	***	†	0,37	0,07	7	**	†
Mut H103Y	35,02	1,5	10	***	†	9,94	3,5	22	***	†	0,33	0,13	22	†	***
Mut R129G	34,13	1,8	14	**	†	10,68	3,5	19	***	†	0,39	0,12	19	**	†
Mut Q131P	36,95	1,6	10	***	†	9,38	3,4	13	**	†	0,39	0,2	13	*	†
Mut R/K/K150/151K152G/A/A	31,33	1,8	16	**	†	10,11	2,4	18	***	†	0,32	0,1	18	†	**
Mut D/E161/162G/G	34,38	3,8	5	*	†	11,35	3,4	5	***	†	0,39	0,05	5	†	*
Mut L163P	32,21	1,5	18	*	†	10,18	3,4	20	***	†	0,42	0,1	20	**	†
Mut D169G	33,10	3,5	10	*	†	9,15	2,5	9	**	†	0,28	0,1	9	*	†
Mut E186G	42,94	0,8	6	***	†	10,03	2,7	6	**	†	0,36	0,1	6	**	†
No infectada	37,12	2,4	11	***	NA	10,99	4,2	16	***	NA	0,39	0,1	16	**	NA

¶ Virus inoculado en los embriones E7

µ Peso medio* (g) o peso medio del òrgano (mg):peso corporal (g)

SEM error estándar de la media

SD desviación estándar

n número en el grupo de tratamiento

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

P₁ valor P para la prueba t entre CAUZ697 y el grupo de tratamiento
P₂ valor P para la prueba t entre el control negativo y el grupo de tratamiento
* valor P significativo al nivel 0,05
** valor P significativo al nivel 0,01
*** valor P significativo al nivel 0,001
‡ valor P significativo al nivel 0,05

ES 2 334 646 T3

Examen de las poblaciones linfocitarias

Se evaluó el efecto de la infección vírica sobre las poblaciones linfocitarias en los principales órganos linfoides. El timo, el bazo y la bolsa se diseccionaron del embrión y se colocaron en tampón de lavado PBS estéril frío que contenía 1% de BSA y NaN_3 1 mM. El tejido se maceró bruscamente y se filtró a través de una malla de nylon de 50 mm de poro. El filtro se aclaró con tampón de lavado PBS frío y el homogeneizado tisular se recogió y mezcló completamente. El peso del tejido residual en el filtro se comparó con el peso original del filtro. Las células extraídas se sedimentaron a 2000 g durante 7 minutos y se resuspendieron en 4 ml de tampón de lavado PBS. La suspensión celular se purificó mediante centrifugación durante 5 minutos a 1000 g en un gradiente de Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech) y las células recogidas se lavaron dos veces en tampón de lavado PBS. Se tomaron las lecturas por triplicado en el contador Coulter y el hemocitómetro.

El examen del tamaño de las poblaciones linfocitarias en el timo, el bazo y la bolsa (Tabla 12) estableció que todos los mutantes producían una depleción significativamente menor de las poblaciones linfocitarias que el virus virulento de tipo salvaje.

Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de las poblaciones linfocitarias

Las concentraciones se optimizaron para los AcMo de ratón anti-pollo TCR1 (Southern Biotechnology), TCR2 de ratón anti-pollo (Southern Biotechnology), TCR3 de ratón anti-pollo (Southern Biotechnology), conjugado CD4-FITC de ratón anti-pollo Southern Biotechnology), conjugado CD8-FITC de ratón anti-pollo (Southern Biotechnology) y AvBu-1 de ratón anti-pollo (suministrado por el Dr. Fred Davidson, Compton Laboratories, Reino Unido). Se procedió a la eutanasia de dos pollos White Leghorn (SPAFAS) mediante inmersión en una cámara de CO_2 y los bazos, timos y bolsas se extrajeron post-mortem y se introdujeron en PBS. Los leucocitos agrupados se purificaron tal como se ha descrito en lo que antecede. Para determinar las concentraciones óptimas de los anticuerpos usados para el análisis FACS, se evaluó el AcMo de TCR1 de ratón anti-pollo a diluciones de 1/100, 1/1000 y 1/5000. Los AcMo de TCR2 de ratón anti-pollo se evaluaron a las diluciones 1/50, 1/100 y 1/1000. Los AcMo de TCR3 de ratón anti-pollo y Abú-1 de ratón anti-pollo se evaluaron a las diluciones 1/20, 1/50 y 1/100. Los AcMo del CONJUGADO CD4-FITC de ratón anti-pollo y el conjugado CD8-FITC de ratón anti-pollo se titularon a las diluciones 1/20, 1/50, 1/100, 1/200 y 1/500. Las diluciones óptimas se decidieron sobre la base de la dilución de anticuerpos más elevada a la que había una definición más clara de la tinción de base y señal en el análisis FACS y, también, la intensidad máxima para la tinción específica.

Las poblaciones linfocitarias aisladas del timo y el bazo de cada embrión se analizaron para la proporción de células positivas en el análisis del FACS para los marcadores de superficie celular, TCR2, TCR3, CD4 y CD8 usando un protocolo de tinción doble. Para cada embrión se realizaron ocho tratamientos de tinción en muestras por duplicado de 10^6 linfocitos. En la primera etapa de tinción, las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C con AcMo de TCR1 de ratón anti-pollo a una dilución de 1/1000 en tampón de lavado PBS o AcMo de TCR2 de ratón anti-pollo a una dilución de 1/100 o AcMo de TCR3 de ratón anti-pollo a una dilución de 1/100 o los 3 AcMo combinados. Las células se lavaron y después se incubaron con el conjugado secundario de ficoeritrina (PE) de conejo anti-ratón (Sigma Aldrich) a una dilución de 1/1500 durante 30 minutos a 4°C , después se bloquearon mediante incubación con suero normal de ratón al 10% (Sigma Aldrich) en PBS durante 30 minutos a 4°C . En la tercera etapa de tinción, Cada grupo de 4 tratamientos se incubó durante 30 minutos a 4°C con el conjugado CD4 de ratón anti-pollo-FITC a una dilución de 1/100 o con el conjugado CD8 de ratón anti-pollo-FITC a una dilución de 1/100.

Las muestras de linfocitos del timo, el bazo y la bolsa de una selección de los polluelos experimentales se tiñeron y analizaron para detectar el marcador de células Bu-1 aviar (AvBu-1). Las muestras de 10^6 linfocitos se incubaron con el AcMo de Abú-1 de ratón anti-pollo a una dilución de 1/200, seguido por el AcMo secundario del conjugado de conejo anti-ratón-PE a una dilución de 1/1500 durante 30 minutos a 4°C .

Las proporciones de células dobles positivas o sencillas positivas se analizaron usando un citofluorómetro.

Los datos se analizaron usando el software Cellquest (Becton Dickinson). Las poblaciones muestra de 10^8 células se representaron en gráficos de densidad y los que la intensidad de la tinción FITC se mostró en el eje X y la intensidad de la tinción con PE se mostró en el eje Y. Los cuadrantes establecidos a partir de los gráficos de las células control se usaron para delinear las poblaciones con tinción positiva y negativa. El tamaño y la proporción absolutos del grupo de linfocitos totales se calculó para cada subpoblación de linfocitos.

El análisis de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en el timo, el bazo y la bolsa usando clasificación celular activada por fluorescencia estableció que los virus mutantes producían significativamente menor depresión en los números de CD4+TCR-, CD4+TCR1+, CD4+TCR2+, y en algunos casos de CD4+TCR3+, timocitos (Tabla 13), significativamente menor depresión en los números de CD8+TCR-, y en algunos casos de CD8+TCR1+, CD8+TCR2+ y CD8+TCR3+, timocitos (Tabla 14). En general, los mutantes también produjeron significativamente menor depresión en estas subpoblaciones de esplenocitos (Tablas 15 y 16). En algunos casos, los mutantes también tenían un efecto significativamente menor sobre las poblaciones de linfocitos B que el virus de tipo salvaje (Tabla 17). Estos hallazgos establecen que la mutación de VP2 disminuye significativamente los efectos inmunosupresores del VAP.

Tabla 12. Poblaciones de linfocito del timo, el bazo y la bolsa de embriones E21 infectados con CAU269/7 mutante de VP2 y de tipo salvaje

Grupo de tratamiento†	Media de las poblaciones linfocitarias (x10 ⁶)#																	
	Timo						Bazo						Bolsa					
	μ	SEM	n	P ₁	P ₂		μ	SEM	n	P ₁	P ₂		μ	SEM	n	P ₁	P ₂	
CAU269/7	760	22	9	**	NA	27	2	9	†	NA	13	2	9	***	NA			
Mut C87R	4002	78	10	†	**	27	4	10	†	†	49	10	10	†	**			
Mut R101G	1969	42	7	†	**	93	22	7	**	**	355	30	7	*	***			
Mut H103Y	4374	61	9	†	***	102	41	9	†	*	751	24	9	†	**			
Mut R129G	6080	28	7	†	*	155	64	7	*	*	118	6	7	†	*			
Mut Q131P	3735	85	5	†	***	36	2	5	†	†	73	3	5	†	**			
Mut	2452	74	5	†	**	105	23	5	**	***	120	9	5	**	***			
R/K150/151K152G/A/A																		
Mut D/E161/162G/G	5664	370	7	†	*	110	34	7	*	**	60	2	7	†	**			
Mut L163P	1838	22	7	†	**	163	5	7	**	***	107	3	7	†	**			
Mut D169G	4678	173	9	†	*	248	8	9	**	***	341	82	9	**	***			
Mut E186G	1938	94	10	*	***	80	2	10	†	*	105	2	10	*	***			
No infectada	3824	11	7	NA	**	31	2	7	NA	†	62	1	7	NA	***			

† Virus inoculado en los embriones E7

tamaño de la población medido con contador coulter

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

μ media
SEM error estándar de la media
N tamaño de la muestra
P ₁ valor P para la prueba t entre el grupo no infectado y el grupo de tratamiento
P ₁ valor P para la prueba t entre CAU269/7 y el grupo de tratamiento
* valor P significativo al nivel 0,05
** valor P significativo al nivel 0,01
*** valor P significativo al nivel 0,001
‡ valor P significativo al nivel 0,05

Tabla 13. Poblaciones de timocitos CD4+ de embriones E21 infectados con la mutante VP2 y el CAU269/7 de tipo salvaje

Grupo de tratamiento ¶	Media de las poblaciones de timocitos CD4+ (x10 ⁶)#														
	TCR			TCR1+			TCR2+			TCR3+					
p	SEM	n	P ₁	P ₂	μ	SEM	n	P ₁	P ₂	μ	SEM	n	P ₁	P ₂	
CAU269/7	133	29	19	***	NA	7	2	**	NA	35	24	7	**	NA	*
Mut C87R	728	251	18	‡	**	110	28	‡	**	222	85	11	*	*	**
Mut R101G	4008	1362	11	**	***	121	23	‡	***	355	151	7	‡	*	*
Mut H103Y	1985	21	22	‡	*	202	48	‡	**	332	64	8	‡	***	**
Mut R129G	9529	1839	20	***	***	323	134	‡	**	2060	577	7	*	**	***

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Mut Q131P	2747	366	18	***	***	87	32	6	‡	**	143	45	6	*	*	99	50	6	‡	‡
Mut R/K150/151K152G/A/A	885	184	15	‡	***	89	31	5	‡	***	177	70	5	*	*	214	82	5	‡	**
Mut D/E161/162G/G																				
Mut L163P	8392	1546	8	***	***	75	16	7	‡	***	544	277	7	‡	*	501	238	7	‡	*
Mut D169G	3204	1027	18	***	***	248	153	5	‡	***	1315	530	5	‡	**	639	287	7	‡	***
Mut E186G	8495	900	8	***	***	195	32	8	*	***	2911	926	8	**	**	1427	492	8	*	**
No infectada	977	178	19	NA	***	98	35	7	NA	**	692	213	7	NA	**	409	165	7	*	NA

¶ Virus inoculado en los embriones E7

poblaciones inmunoteñidas y análisis por FACS

μ media

SEM error estándar de la media

N tamaño de la muestra

P₁ valor P para la prueba t entre el grupo no infectado y el grupo de tratamiento

P₂ valor P para la prueba t entre CAU/269/7 y el grupo de tratamiento

* valor P significativo al nivel 0,05

** valor P significativo al nivel 0,01

*** valor P significativo al nivel 0,001

‡ valor P significativo al nivel 0,05

Tabla 14. Poblaciones de timocitos CD8+ de embriones E21 infectados con la mutante VP2 y el CAU269/7 de tipo salvaje

Grupo de tratamiento ¶	Media de las poblaciones de timocitos CD8+ (x10 ⁵)#																						
	TCR-						TCR1+						TCR2+						TCR3+				
p	SEM	n	P ₁	P ₂	μ	SEM	n	P ₁	P ₂	μ	SEM	n	P ₁	P ₂	μ	SEM	n	P ₁	P ₂				
CAU269/7	190	49	19	***	NA	15	4	7	**	NA	28	22	7	***	NA	20	15	7	NA	*			
Mut C87R	560	49	18	†	*	34	8	10	†	***	259	72	11	†	**	147	33	10	†	*			
Mut R101G	5127	1237	11	*	***	461	249	8	†	*	60	9	7	***	†	255	80	7	†	*			
Mut H103Y	2016	174	22	*	***	229	33	8	*	***	115	64	8	†	†	313	75	8	†	**			
Mut R129G	12893	2153	20	**	***	503	148	7	**	**	172	50	7	†	**	691	418	7	†	*			
Mut Q131P	2830	479	18	***	***	66	35	6	†	†	64	32	6	†	***	61	50	6	*	**			
Mut R/K/K150/151K152G/A/A	595	101	15	**	***	174	111	5	†	*	49	18	5	†	***	258	82	5	†	**			
Mut D/E161/162G/G	816	153	12	†	***	188	115	5	†	†	258	103	5	†	†	1704	77	5	†	†			
Mut L163P	8356	80	8	**	***	121	28	7	†	***	150	41	7	†	**	619	238	7	†	**			
Mut D169G	4162	1027	18	***	***	189	64	5	†	**	96	34	5	†	*	333	287	7	†	*			
Mut E186G	10172	1203	8	***	***	230	18	8	**	***	505	116	8	**	***	1919	492	8	†	†			
No infectada	1370	288	19	NA	***	118	93	7	NA	**	159	14	7	NA	***	93	25	7	*	NA			

¶ Virus inoculado en los embriones E7
poblaciones inmunoténidas y análisis por FACS
μ, media

5	
10	
15	
20	
25	
30	
35	
40	
45	
50	
55	SEM error estándar de la media
60	N tamaño de la muestra
65	P ₁ valor P para la prueba t entre el grupo no infectado y el grupo de tratamiento
	P ₂ valor P para la prueba t entre CAU269/7 y el grupo de tratamiento
	* valor P significativo al nivel 0,05
	** valor P significativo al nivel 0,01
	*** valor P significativo al nivel 0,001
	‡ valor P significativo al nivel 0,05

Tabla 15. Poblaciones de esplenocitos CD4+ de embriones E21 infectados con la mutante VP2 y el CAU269/7 de tipo salvaje

Grupo de tratamiento ¶	Media de las poblaciones de esplenocitos CD4+ (x10 ⁶)/#														
	TCR-			TCR1+			TCR2+			TCR3+					
	µ	SEM	n	P ₁	P ₂	µ	SEM	n	P ₁	P ₂	µ	SEM	n	P ₁	P ₂
CAU269/7	2	1	24	***	NA	11	6	8	*	NA	78	48	8	*	ADN
Mut C87R	3	2	31	***	†	519	30	11	†	*	307	101	11	†	†
Mut R101G	20	8	11	†	**	17	6	8	†	*	32	1	7	*	*
Mut H103Y	56	25	27	†	*	122	6	8	*	*	7058	291	7	*	**
Mut R129G	6	1	5	*	**	210	190	7	†	*	142	119	7	†	†
Mut Q131P	23	8	18	†	***	385	17	6	†	*	155	71	5	†	†
Mut R/K150/151K152G/A/A	14	5	15	†	***	2319	13	5	†	*	2223	55	5	*	**
Mut D/E161/162G/G	40	9	12	†	***	13	4	5	†	***	16	8	5	†	**
Mut L163P	24	12	10	†	*	121	83	7	†	*	64	28	6	*	***
Mut D169G	241	14	29	†	†	4363	3	10	†	*	3226	273	10	†	*
Mut E186G	7	1	10	**	***	200	10	8	†	†	40	1	8	†	*
No infectada	17	4	19	NA	***	98	35	7	NA	**	771	42	8	ADN	*

¶ Virus inoculado en los embriones E7
poblaciones inmunoteñidas y análisis por FACS
µ media
SEM error estándar de la media

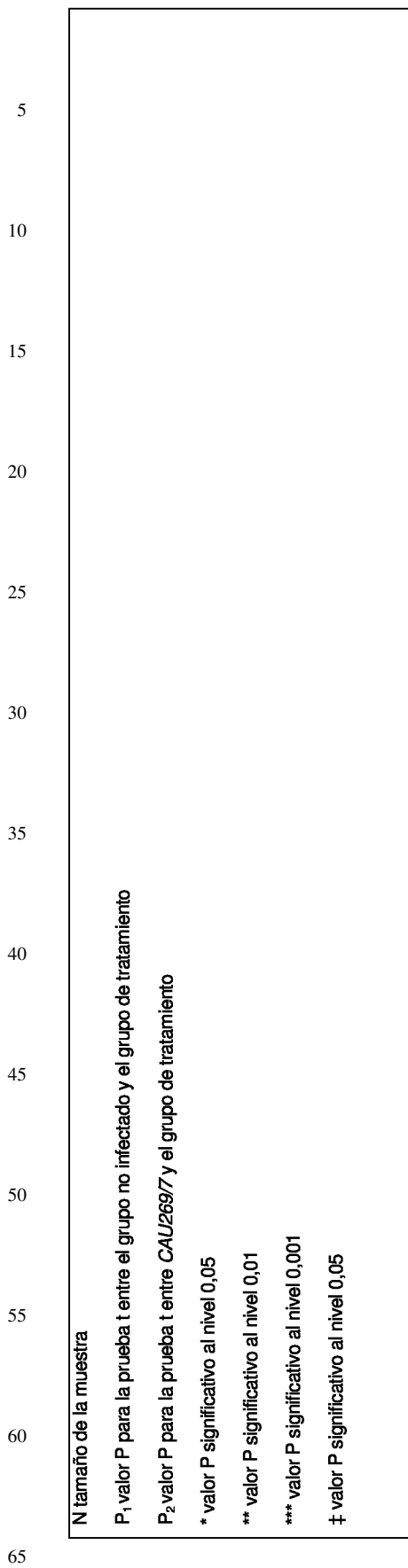


Tabla 16. Poblaciones de esplenocitos CD8+ de embriones E21 infectados con la mutante VP2 y el CAU269/7 de tipo salvaje

Grupo de tratamiento ¶	Media de las poblaciones de esplenocitos CD8+ (x10 ⁴)#																							
	TCR-						TCR1+						TCR2+						TCR3+					
	µ	SEM	n	P ₁	P ₂		µ	SEM	n	P ₁	P ₂	µ	SEM	n	P ₁	P ₂	µ	SEM	n	P ₁	P ₂			
CAU269/7	6	2	24	*	NA	45	24	8	8	**	NA	152	11	8	*	NA	99	7	8	**	NA			
Mut C87R	5	2	32	*	***	289	10	11	11	‡	*	755	28	11	‡	*	967	73	8	‡	*			
Mut R101G	16	7	10	‡	*	23	7	8	7	*	**	16	4	7	*	**	25	9	7	*	**			
Mut H103Y	63	4	27	‡	‡	1870	95	9	9	*	*	6417	28	9	*	*	7805	28	9	**	**			
Mut R129G	136	9	9	*	**	128	107	7	7	‡	‡	45	18	7	*	**	62	35	7	*	**			
Mut Q131P	28	1	18	‡	**	503	41	6	6	‡	‡	621	32	6	‡	*	954	57	5	‡	*			
Mut R/K150/151K152G/A/A	8	3	15	‡	‡	2246	64	5	5	**	***	1312	383	5	*	**	1410	36	5	**	***			

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Mut D/E161/162G/G	39	6	10	†	***	20	5	5	13	3	5	**	***	23	11	5	*	**
Mut L163P	22	5	11	†	**	38	13	7	32	6	8	†	†	54	24	6	*	**
Mut D169G	141	7	30	†	*	1922	69	10	1538	96	10	†	*	801	55	10	†	*
Mut E186G	5	2	10	†	†	40	10	8	40	10	8	†	**	70	20	8	†	**
No infectada	20	24	10	ADN	*	412	14	7	508	11	8	ADN	*	295	15	8	NA	**

¶ Virus inoculado en los embriones E7

poblaciones inmunotendidas y análisis por FACS

μ media

SEM error estándar de la media

N tamaño de la muestra

P₁ valor P para la prueba t entre el grupo no infectado y el grupo de tratamiento

P₂ valor P para la prueba t entre CAU2697 y el grupo de tratamiento

* valor P significativo al nivel 0,05

** valor P significativo al nivel 0,01

*** valor P significativo al nivel 0,001

† valor P significativo al nivel 0,05

Tabla 17. Poblaciones de linfocitos B del timo, el bazo y la bolsa de embriones e21 INFECTADOS CON CAU269/7 mutante de VP2 y de tipo salvaje

Grupo de tratamiento [¶]	Media de las poblaciones linfocitarias AvBul+ (x10 ⁶)#																			
	Timo						Bazo						Bolsa							
	μ	SEM	n	P ₁	P ₂	μ	SEM	n	P ₁	P ₂	μ	SEM	n	P ₁	P ₂	μ	SEM	n	P ₁	P ₂
CAU269/7	44	20	3	*	NA	9,5	0,3	3	***	NA	0,7	0,3	3	*	NA	0,7	0,3	3	*	NA
Mut C87R	213	40	9	†	*	2,5	0,5	9	†	**	2,9	0,7	9	†	**	2,9	0,7	9	†	**
Mut R101G	120	39	7	†	†	8,3	0,3	7	†	†	53	1,8	7	†	†	53	1,8	7	†	*
Mut H103Y	77	16	9	†	†	7,7	1,4	9	†	†	45	2,4	9	†	†	45	2,4	9	†	†
Mut R129G	116	45	7	†	†	2,9	1,5	8	†	†	24	1,2	8	†	†	24	1,2	8	†	†
Mut Q131P	556	219	5	†	*	14	3,4	5	†	*	45	7,3	5	*	**	45	7,3	5	*	**
Mut R/K150/151K152G/A/A	198	155	5	†	†	24	0,9	5	†	*	17	1	5	†	†	17	1	5	†	†
Mut D/E161/162G/G	191	92	8	†	†	6,4	0,2	8	†	†	13	0,6	8	†	†	13	0,6	8	†	*
Mut L163P	103	32	9	†	*	19	0,8	9	†	†	64	2,5	9	†	†	64	2,5	9	†	†
Mut D169G	118	13	10	†	**	3,3	0,8	10	***	***	8,9	0	8	*	*	8,9	0	8	*	*
Mut E186G	119	76	2	NA	*	6,5	0,3	2	NA	***	29	1,9	2	NA	*	29	1,9	2	NA	*
No infectada	44	20	3	*	NA	9,5	0,3	3	***	***	0,7	0,3	3	*	NA	0,7	0,3	3	*	NA

¶ Virus inoculado en los embriones E7 † valor P no significativo al nivel 0,05
poblaciones inmunoteñidas y análisis por FACS
μ media
SEM error estándar de la media

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

n tamaño de la muestra
P₁ valor P para la prueba t entre el grupo no infectado y el grupo de tratamiento
P₂ valor P para la prueba t entre CAU269/7 y el grupo de tratamiento
* valor P significativo al nivel 0,05
** valor P significativo al nivel 0,01
*** valor P significativo al nivel 0,001
‡ valor P significativo al nivel 0,05

ES 2 334 646 T3

II. Mutación de las señales de inicio de la traducción de la VP2 del VAP

Construcción de los genomas del VAP que contienen mutaciones en el codón ATG de la VP2

5 Todas las secuencias de ADN del VAP derivaban originariamente del plásmido pCAU269/7. Para generar secuencias de ADN que contuvieran los cambios nucleotídicos deseados se usó la extensión por PCR superpuesta. Un fragmento de ADN *Apal/BstBI* del genoma del VAP se amplificó por medio de PCR usando pares de oligonucleótidos sintéticos (CAV1/CAV20, CAV19/CAV11, CAV1/CAV22, CAV21/CAV11), véase la Tabla 18.

10

TABLA 18

Cebadores para PCR

15

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Contexto	Cambio de codificación
VAP 19	cgg t ccggg A ggatgcacggaaacg	Posición -3 ->A	Sin cambio de aa
VAP 20	gtgcatcc T cccgaccgccttgcgt	Posición -3 >A	Sin cambio de aa
VAP 21	cgg t ccgggtggatg G acggaaacgg	Posición +4 -> G	His->Arg en VP2 (aa nº 2)
VAP 22	gt C catccacc c ggaccgccttgcgt	Posición +4 -> G	His->Arg en VP2 (aa nº 2)
VAP 1	ctatcgaattccgagtggttactat	Directo	N/A
VAP 11 Reverse N/A	agctcgtcttgccatcttacagtcttatac	Inverso	N/A
N/A - no aplicable			

50

Los pares de oligonucleótidos, CAV1/CAV20, CAV19/CAV11, CAV1/CAV22 y CAV21/CAV11 que contienen los cambios nucleotídicos deseados, se usaron en las distintas amplificaciones de PCR de la 1ª ronda (25 ciclos) para generar productos de 347 pb, 495 pb, 347 pb y 495 pb, respectivamente. Los productos se analizaron mediante electroforesis en gel para verificar el tamaño y la cantidad y, posteriormente, se diluyeron a 25 ng/μl antes de usar (bien el producto de CAV1/CAV20 con el producto de CAV19/CAV11, o el producto de CAV1/CAV21 con el producto del CAV22/CAV11) para sembrar dos amplificaciones de PCR de la 2ª ronda (20 ciclos) en la que sólo se utilizó el par oligonucleotídico CAV1/CAV11. Los productos generados con esta PCR de extensión superpuesta fueron idénticos al fragmento CAV1/CAV11 excepto por la incorporación de los cambios nucleotídicos deseados (bien la sustitución de una T con una A en la posición -3 para pCAU283-3 o bien la sustitución de una C con una G en la posición +4 para pCAU283+4) en el codón ATG de la VP2. Los productos de la extensión superpuesta se digirieron con *Apal/BstBI* y los fragmentos de 153 pb del codón ATG de la VP2 se aislaron y ligaron por separado con el plásmido *pCAU269/7* digerido con las mismas enzimas. Los constructos resultantes se designaron pCAU283-3 y pCAU283+4 y se analizaron mediante digestiones con enzimas de restricción y secuenciación para confirmar las secuencias recién introducidas.

65

ES 2 334 646 T3

Análisis de la secuencia

Las secuencias de ADN se determinaron mediante el método dideoxi de terminación de cadena usando la química de secuenciación BigDye Terminator (ABI Prism) con la combinación de cebadores sintéticos específicos de vector (T7 y SP6) y específicos de la secuencia del VAP (CAV 12, 2, 10, 3, 9, 4, 7, 5).

Preparación de ADN y transfección

Los ADN víricos se prepararon para transfección mediante digestión de 10 μ g de ADN plasmídico con endotoxina, purificados con Triton X-100, con *EcoRI* para liberar el inserto del genoma del van. Los productos de restricción se extrajeron con fenol-cloroformo, se precipitaron con etanol y se resuspendieron a una concentración de 1 μ g/ml. Las alícuotas se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa para verificar la liberación del inserto y la eficiencia de la recuperación.

Las células MSB1 se lavaron 3 veces y se resuspendieron en medio RPM1 1640 templado sin suplementos hasta una concentración final de 4×10^6 en 700 μ l. Las células se transfeccionaron mediante electroporación en cubetas con hueco de 0,4 cm (BioRad) a 400 V y 375 μ F. Las células pulsadas se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 5 minutos antes de ser transferidas a bandejas de cultivo tisular de 6 pocillos que contienen 3 ml de RF10 precalentado y se incubaron a 37°C en 5% de CO₂. La eficiencia de la transfección (expresión de CMV-GFP- pEGFPC2, Clontech) en los pocillos control se estimó 24 horas después de la transfección. Se observaron las células transfeccionadas para detectar el efecto citopático (ECP) y se obtuvieron muestras para la expresión de VP3 determinado mediante tinción de fluorescencia.

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta

Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato y se sembraron a aproximadamente 30-50.000 células/pocillo en portas de 12 pocillos, se secaron al aire y se fijaron con acetona:metanol helado (90:10). Los portas se bloquearon con 5% de BSA en PBS/Tween 20 al 0,05% antes de hacerlos reaccionar con el anticuerpo monoclonal específico de VP3 de VAP derivado de ratón JCU/CAV/1C1 (JCU TropBio, Townsville, Queensland) durante 60 minutos en una cámara humidificada a 37°C y el anticuerpo inmunoglobulina G de conejo anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína en las mismas condiciones. Tras un tercer lavado, los portas se montaron con VectaShield y se visualizaron con microscopio de fluorescencia.

Resultados

Construcción de genomas del VAP que contienen mutaciones alrededor del codón ATG de la VP2

Para la producción de partículas infecciosas viables del VPA se puede usar el plásmido pCAU269/7. En este estudio, los presentes autores examinaron si los genomas de ADN del VAP mutado, pCAU283-3 y pCAU283+4, podían también producir virus de replicación eficiente. Con este fin, se procedió a la transfección de las células MDCC-MSB1 con estos genomas del VAP modificados en paralelo con el ADN del VAP salvaje (pCAU269/7).

Análisis de las diferencias en el índice de replicación del VAP mutado frente al VAP salvaje

Al establecer la competencia en la replicación de los genomas mutados se siguió la síntesis de la proteína VP3 del VAP en células MDCC-MSB1 transfeccionadas. A las 40 horas de la transfección, una muestra de los cultivos transfeccionados se analizó mediante inmunofluorescencia indirecta con AcMo JCU/CAV/1C1 frente a VP3. En paralelos, muestras de los cultivos transfeccionados se pasaron (1:10) a medio de cultivo fresco.

Los mutantes transfeccionados del VAP mostraron un porcentaje similar de células que expresan VP3 que el genoma del VAP salvaje (s) 40 horas después de la transfección. En las células que expresan VP3, los efectos citopáticos observados se caracterizaron mediante el aspecto de las células aumentadas de tamaño y eran consistentes con los de otros aislamientos comunicados del VAP. La degeneración celular total de estas células fue evidente a las 96 horas de la infección.

No se observaron diferencias evidentes en la localización celular o la intensidad de la fluorescencia de la tinción de VP3 en los genomas mutantes o salvajes, según se determinó mediante microscopía de fluorescencia. En varios puntos de tiempo tras la transfección, otras muestras de cultivos transfeccionados pasados se analizaron para determinar la producción de partículas infecciosas viables de VAP. En un plazo de 6 días no se pudo encontrar células positivas para VP3 en los cultivos de MDCC-MSB1 transfeccionados con genomas mutantes pCAU283-3 o pCAU283+4. Además, le medio tomado de los cultivos transfeccionados con estos genomas no produjo efectos citopáticos cuando se pasaron a las células MDCC MSB1 frescas.

ES 2 334 646 T3

Estos resultados sugieren que los ADN mutantes exhiben una citopatogenicidad intensamente reducida en las células MDCC-MSB1 con respecto al pCAU269 salvaje y sólo expresan transitoriamente proteínas del VAP tras la transfección. Dichos genomas de virus mutantes se pueden usar para la vacunación de ADN en pollos ya que no tendrán como resultado la generación de virus con capacidad de replicación pero sí podrán expresar de forma transitoria proteínas víricas.

III. Proteína vírica 2

Se ha demostrado que la proteína vírica 2 (VP2) del circovirus inmunosupresor Virus de la anemia del pollo (VAP) es esencial para la infectividad y la replicación del virus, aunque su función todavía no se ha establecido. La secuencia de aminoácidos de la VP2 del VAP tiene una homología significativa con una serie de proteínas receptoras eucarióticas, alfa tirosina quinasa, así como con un grupo de virus TT dentro del grupo SANBAN. El ORF que codifica la VP2 se amplificó por PCR y se clonó en el vector de expresión bacteriano pGEX4T-2. La proteína de fusión VP2-GST se expresó y purificó mediante cromatografía de afinidad. La VP2-GST purificada se analizó para detectar la actividad de proteína tirosina fosfatasa (PTPasa) usando el sustrato peptídico generalizado ENDY(Pi)INASL, detectándose el fosfato libre usando el ensayo colorimétrico con verde malaquita. La VP2-GST exhibió actividad de proteína tirosina fosfatasa con una $V_{máx}$ de 14280 U/mg.min y una K_m de 16,95 μ M. La actividad óptima se observó a un pH 6-7 y la actividad se inhibió de forma específica con ortovanadato 0,01 mM. Se ha propuesto un motivo de firma único para la PTP de VP2 del VAP. ICNCGQFRK codificada por los residuos de aminoácidos 94 a 102.

Procedimientos Experimentales - VP2

25 Análisis de la secuencia

Las secuencias proteicas con homología con VP2 del AP se identificaron mediante búsquedas de la base de datos Genbanl usando el software BLASTX (Basic Local Alignment Search Tool) mediante la interfaz del NCBI. Las secuencias identificadas por este procedimiento se alinearon después con la secuencia del VAP usando EclustalW (WebANGIS, Australian National Genomic Information Service).

Clonación molecular de la proteína vírica 2 del VAP y el ORF2 del TLMV

En todos los experimentos se usó el aislamiento australiano CAU269/7 del VAP. El ORF1 del VAP (VP2) se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la forma replicativa bicatenaria del genoma del VAP. De las células MDCC-MSB1 infectadas con VAP se purificó una preparación de ADN celular 48 horas después de la infección mutante mediante lisis con proteinasa K y dodecilsulfato sódico (SDS) y extracción en fenol/cloroformo, según el método de Meehan, B. M., Todd, D., Creelan, J. L., Earle, J. A., Hoey, E. M. y McNulty, M. S. (1992). Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anaemia agent: sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. El cebador oligonucleotídico directo CAV.1-5' CGGTCCGGATCCATGCACGGAAACGGCGGACAAC 3' y el cebador inverso CAV.2-5' GGTTTGGAATTCTCA CACTATACGTACCGGGGC 3' se sintetizaron para incorporar los sitios para las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI dentro de los respectivos extremos 5'. Se preparó una mezcla de reacción de 100 μ l que contenía 300 μ M de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, $MgSO_4$ 2 mM, 200 μ M de cada cebador, 10 μ l de tampón 10x *Taq* ADN polimerasa, 2 U de *Taq* ADN polimerasa (Promega) y 2 μ l de ADN molde. La reacción de PCR se incubó a 95°C durante 2 minutos, seguidos por 40 ciclos a 96°C durante 40 segundos, 60°C durante 40 segundos y 72°C durante 40 segundos, con una incubación final durante 5 minutos. Los productos de la PCR se analizaron mediante extracción en gel de agarosa (al 1%) y se escindió una banda de 677 pb y se purificó usando un kit de extracción en gel Qiaex II (Qiagen) según las instrucciones del fabricante, se digirió con *Bam*HI y *Eco*RI y se ligó en el pGEX-4T-2 (Promega) adecuadamente digerido. La cepa de *E. coli* DH5 α se transformó mediante electroporación con el plásmido ligado y se cultivó a 37°C en agar Luria-Bertani (LA) que contenía ampicilina a 50 μ g/ml. El ADN clonado se secuenció usando un kit de secuenciación *Taq* Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer), usando los cebadores de secuenciación comerciales específicos para pGEX-4T-2.

El producto purificado de la PCR anidada con los cebadores M-1360 a M-1363 (258 pb-886 pb) de la cepa CBD231 del TLMV fue amablemente suministrado por Shunji Mishiro (Takahashi y col., 2000). El RFP2 del TMLV se amplificó mediante PCR del molde M-1360 a M1363. El cebador oligonucleotídico directo TLMV.-5'TTGATCCATGAGC AGCTTTCTAACACCATC 3' y el cebador inverso TLMV.2-5' GGCGAATTCTTACCCATCGTCTTCTTCGAAATC 3' se sintetizaron para incorporar los sitios únicos para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI dentro de los extremos 5' respectivamente. Se preparó una mezcla de reacción de 50 μ l que contenía 300 μ M de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, $MgSO_4$ 2 mM, 200 μ M de cada cebador, 5 μ l de tampón 10x *Taq* ADN polimerasa, 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Promega) y 1 μ l de ADN molde. La reacción de la PCR se incubó a 96°C durante 2 minutos, seguido por 40 ciclos a 96°C durante 40 segundos, 56°C durante 40 segundos, después a 72°C durante 40 segundos y una incubación final a 72°C durante 5 minutos. La purificación digestión y clonación del producto de la PCR de 295 pb en el vector plasmídico pGEM-T Promega) progresó como se ha descrito en lo que antecede para la proteína vírica 2 del VAP. Posteriormente, el inserto se subclonó en el vector plasmídico pGEX-4T-2 y la secuencia y el marco del inserto se verificaron mediante secuenciación.

ES 2 334 646 T3

Expresión y purificación de la proteína

La VP2 del VAP se produjo en forma de una proteína de fusión en el extremo C con la glutatión-S-transferasa. Brevemente, cultivos de 1 l de la cepa DH5 α de *E. coli* que posee el constructo VAP VP2 pGEX-4T 2 se cultivaron en caldo de Luria-Bertani que contenía ampicilina a 50 μ g/ml. La expresión se indujo mediante la adición de β -D-tiogalactopiránosido de isopropilo (IPTG) a una concentración final de 1 mM cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,6 a 600 nm y el cultivo se incubó una hora adicional antes de la recogida. Las bacterias se recuperaron mediante centrifugación a 6000 g durante 30 minutos y los sedimentos se lavaron dos veces en solución salina tamporada con fosfato (PBS). Las células se resuspendieron en 25 ml de PBS que contenía EDTA 0,3M, 200 mg de lisozima y 100 μ g de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (sigma)/ml y se lisaron mediante ráfagas de sonicación de 10 segundos a frecuencia baja. El lisado se solubilizó en Triton X-100 0,1%, se incubó durante 10 minutos más a 4°C y los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 10.000 g durante 30 minutos. La proteína de fusión se purificó por afinidad usando una resina de glutatión sefarosa (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. El eluato se dializó ampliamente contra un tampón que contenía NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM y Tris HCl 25 mM (TBS) a pH de 7,4.

La glutatión-S-transferasa control negativo se purificó en DH5 α de *E. coli* transformada con pGEX-4T-2 siguiendo el mismo procedimiento usado para purificar la fusión GST-VP2.

La proteína purificada se separó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS al 12,5% y se tiñó con azul brillante de Coomassie (Laemmli, Reino Unido (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685). Las proteínas se electrotransferieron a una membrana de polivinildifluoruro (PVDF: Immobilon, Millipore). Las transferencias de tipo western de GST VP2 y GST se sondaron con antisuero policlonal de conejo contra GST a una dilución de 1/500, seguido por un conjugado secundario de HRP de cerdo anti-conejo (Dako) diluido a 1/1000 y desarrollado con sustrato Sigma Fast 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una segunda transferencia de tipo western se sondó con suero combinado inmune de pollo, seguido por conjugado HRP de conejo anti-pollo a una dilución de 1/500 y se desarrolló con sustrato DAB. La concentración de la proteína se cuantificó usando el ensayo de Bradford (BioRad) con un patrón de seroalbúmina bovina (BSA).

El ORF2 del TLMV se purificó de DH5 α de *E. coli* transformada con el clon TLMV ORF2 pGEX 4T-2 siguiendo el mismo procedimiento usado para purificar la proteína de fusión GST-VP2. No obstante, la expresión proteica sólo se indujo durante 30 minutos.

Síntesis del sustrato peptídico

En todos los ensayos enzimáticos se usó el sustrato de proteína tirosina fosfatasa generalizado descrito por Daum, G., Solca, F., Diltz, C. D., Zhao, Z., Cool, D.E. y Fischer, E.H. (1993). A general peptide substrate for protein tyrosine phosphatases. Anal Biochem 211, 50-54. La secuencia del fosfopéptido fue H-Glu-Asn-Asp Tyr(PO₃H₂)-Ile-Asn-Ala-Ser-Leu-OH. Brevemente, el nonapéptido se ensambló manualmente en la fase sólida usando la química de Fmoc. Todas las sustancias químicas para uso en la síntesis peptídica eran de grado analítico. Para la síntesis se usaron residuos de aminoácidos protegidos con fluoroenilmetoxicarbonilo (Fmoc) ((Auspep, Melbourne, Australia). Los residuos usados fueron Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Tyr(MDSPE), Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH y Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH. La resina de soporte PAC-PEG-PS (Perspective Biosystems, capacidad 0,18 mmol/g) se usó para la síntesis. Los aminoácidos se activaron mediante incubación con cantidades equimolares de obenzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluorofosfato (HBTU) (Auspep) y dos equivalentes de diisopropiletilamina (DIPEA) (Auspep). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo durante 60 minutos, seguido por la prueba del ácido trinitrobenzenosulfónico. Los grupos Fmoc se eliminaron después de cada reacción de acoplamiento mediante lavado en 2,5% de 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-eno (DBU). Para el acoplamiento de los residuos 4 a 9, cada ciclo se repitió dos veces. Los grupos protectores de la cadena lateral se eliminaron y el péptido se escindió de la resina mediante tratamiento con 885 de ácido trifluoroacético (TFA), 5% de fenol y 2% de tri-isopropilsilano (Aldrich, Milwaukee, WI) en agua. El péptido ruto se precipitó en dietiléter frío antes de la purificación mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) en una columna semipreparativa Vydac C4 en ácido trifluoroacético al 0,1% y se eluyó con un gradiente de 2%/min de acetonitrilo. La identidad del péptido se confirmó mediante espectroscopia de masas.

Ensayo de la proteína tirosina fosfatasa

Todas las reacciones con proteína tirosina fosfatasa se adaptaron a partir del método de Tonks, N K., diltz, C D. y Fischer, E. H (1991). Purification and assay of CD45: an integral membrane protein-tyrosine phosphatase. Methods Enzymol 201, 442-451. Las siguientes condiciones de reacción se aplican para todos los ensayos a menos que se indique lo contrario. Se preparó un tampón (TE) de ensayo con Tris 50 mM (pH 7 a 25°C), EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 50 mM y 1% de BSA (p/v). Un segundo tampón (TB) se preparó con Tris 50 mM (pH 7 a 25°C y 0,01% p/v de Brij 35 (Sigma). Todas las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 200 ml en una placa de microtitulación. Se preparó una solución 1 mM de sustrato fosfopéptido en tampón TE. A cada una de las 14 mezclas de reacción por triplicado de los tampones TA y TB a 1:1 se añadieron quince nanomoles del sustrato. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 9 μ g de VP2-GST o GST. Las reacciones se incubaron con agitación a temperatura ambiente durante 0, 1, 2,

ES 2 334 646 T3

3, 4, 5 o 10 minutos y se terminaron mediante la adición de reactivo verde malaquita. Todos los ensayos se repitieron al menos tres veces y la actividad media se representó para cada punto de tiempo. La actividad se ajustó por un factor de 0,52 para justificar la contribución a la masa de la marca de fusión de GST de 24 kDa y se expresó en forma de nanomoles de sustrato catalizado por microgramo de enzima.

5

Detección con verde malaquita de fosfato soluble

10 La liberación de fosfato libre en la solución se detectó mediante el ensayo colorimétrico con verde malaquita. Brevemente, la solución reserva de verde malaquita se realizó mediante la adición lenta de 60 ml de ácido sulfúrico concentrado a 300 ml de agua, seguido por enfriamiento hasta la temperatura ambiente y, después, se añadieron 0,44 g de verde malaquita (Fisher Scientific). Inmediatamente antes de usar se preparó el reactivo colorimétrico a partir de 10 ml de la reserva de verde malaquita, 3% de $(\text{NH}_4)_3\text{MoO}_3$ (p/v) (Sigma) y 0,15% de Tween 20 (Sigma).

15 Al volumen de reacción de 200 μl se añadieron cincuenta microlitros del reactivo colorimétrico en una placa de microtitulación y se dejó equilibrar durante 20 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 620 nm y la liberación de fosfato se calibró contra una curva estándar de fosfato.

20 Se preparó una curva estándar de fosfato para valores de fosfato de 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 45 nmol. Las soluciones fosfato se prepararon en tampón en una proporción de 1:1 de TE y TB y a cada uno de los tres pocillos en una placa de microtitulación se añadieron 200 μl . Para cada concentración se añadieron 50 μl del reactivo colorimétrico y se dejaron equilibrar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después se midió la absorbancia a 620 nm.

25

Estudios de cinética e inhibición enzimáticas

30 A las mezclas de reacción por triplicado se añadió sustrato a 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30 y 40 nmol. Las incubaciones fueron de 1 minuto y todas las demás condiciones de reacción fueron como se ha descrito en lo que antecede. Para cada concentración de sustrato se midió la actividad en al menos 6 reacciones duplicadas y se calculó el error estándar de la actividad media para cada valor. Las estimaciones de la $V_{\text{máx}}$ y la K_m derivaron mediante análisis de regresión lineal a partir de un gráfico recíproco doble y se calculó el error estándar y el valor P para la constante $1/V_{\text{máx}}$ y el coeficiente $K_m/V_{\text{máx}}$ del gráfico.

35 La reserva de $\text{Na}_3\text{VO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 1 mM se realizó en agua destilada y el pH se ajustó a un valor de 10 con ácido sulfúrico. Una vez disuelta, se añadió $\text{Na}_3\text{VO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ reserva al TE y el TB en una proporción de 1:1:1 y el pH se ajustó a un valor de 7. Los estudios de inhibición se realizaron con 0,1 mM, 0,01 mM y 0,001 mM de ortovanadato sódico. Las demás condiciones de reacción fueron tal como se ha descrito en lo que antecede. Los ensayos se realizaron con 10 nmol de sustrato y 9 μg de VP2-GST del VAP y se realizaron por triplicado para cada concentración del inhibidor.

40

pH óptimo de la enzima

45 Se estableció el pH de las reacciones por triplicado a pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 y pH 9. Los ensayos se realizaron con 10 nmol de sustrato y 9 μg de VP2-GST del VAP y las demás condiciones de reacción fueron tal como se ha descrito en lo que antecede. Antes de la adición del reactivo verde malaquita, el pH se neutralizó a un pH de 7 con ácido sulfúrico y con hidróxido sódico.

50

Ensayo de fusión de VP2 GST de TLMV

La proteína TLMV-GST se analizó siguiendo las condiciones de reacción descritas para la VP2 del VAP. Las reacciones se repitieron 4 veces.

55

Resultados-VP2

Análisis de la secuencia

60

Una búsqueda en base de datos de secuencias proteicas con homología con la VP2 del VAP identificó una serie de proteínas receptoras tirosina fosfatasa alfa (R-PTPasa) de ser humano, rata, ratón y pollo. La homología de la VP2 del VAP fue con el bucle WPD adyacente al bucle P en todos los homólogos de la R-PTPasa. El bucle WPD está implicado en la actividad PTPasa. El bucle P contiene el sitio catalítico y el motivo firma. La similitud entre la VP2 del VAP y los homólogos de R-PTPasa estaba en el intervalo de 30-32%. Las secuencias de aminoácidos de los homólogos de la R-PTPasa y la VP2 del VAP se han alineado en la Figura 13.

65

ES 2 334 646 T3

En la base de datos Genbank se identificó un segundo grupo de secuencias altamente homólogas a la VP2 del VAP. El grupo SANBAN de virus TT poseen una homología significativa con la VP2 del VAP. En todas las secuencias víricas SANBAN, la región de homología se extiende de los residuos 54-80 de la secuencia de aminoácidos codificada por el ORF1 putativo. La homología era con la misma región de la proteína que para los homólogos de la PTPasa, no obstante, el patrón de residuos homólogos era variable. La homología entre la VP2 del VAP y las secuencias víricas SANBAN fue del 48%. La alineación de la secuencia de VP2 del VAP con los virus SANBAN se ilustra en la figura 14.

10 *Expresión y purificación de la proteína*

El ORF1 del VAP se amplificó del aislamiento australiano CAU269/7 del VAP. El aislamiento CAU269/7 fue equivalente en patogenicidad e infectividad a otros aislamientos equivalentes del VAP. El producto de la PCR se clonó en el vector pGEX 4T-2 y la proteína VP2 del VAP se produjo en forma de proteína de fusión recombinante con glutatión-S-transferasa en un sistema de expresión bacteriana. El tamaño y la identidad de la proteína se verificaron mediante electroforesis en SDS PAGE al 12,5%, seguido por tinción con azul brillante de Coomassie y transferencia de tipo western (figuras 15 a 17). Mediante SDS-PAGE se identificó una banda de 58 kDa de peso molecular correspondiente a la proteína de fusión CAV VP2-GST en el eluato purificado por afinidad. La banda proteica reaccionó específicamente con antisuero producido contra el marcador GST y también con el suero combinado hiperinmune de pollo. La proteína dializada era fácilmente soluble en tampón TBS y se usó directamente en los ensayos con PTPasa. La concentración de la proteína se determinó mediante el ensayo de Bradford contra una curva estándar de BSA.

25 *Síntesis del sustrato peptídico*

El sustrato peptídico se sintetizó en un soporte sólido usando la química estándar de Fmoc. Tras la adición del residuo de fosfotirosina, todos los ciclos posteriores se duplicaron para contabilizar la potencial hidrancia estérica al acoplamiento mediante el grupo fosfato grande. En la RP-HPLC analítica se observó un único pico consistente con fosfopéptido puro y el peso de la fórmula se confirmó como de 1116,3 mediante espectroscopia de masas.

30 *Ensayos de la proteína tirosina fosfatasa*

Para las condiciones de ensayo se estableció una curva estándar de la absorbancia a 620 nm en forma de una función de la concentración del fosfato. La sensibilidad de la detección colorimétrica con verde malaquita fue de 2,5 nmol de fosfato y la relación entre el $\log[\text{Pi}]$ y la absorbancia a 620 nm fue lineal en el intervalo de 0 a 45 nmol de fosfato. Las concentraciones de fosfato superiores a 45 nmol tuvo como resultado una precipitación de fosfomolibdato de modo que se elimina la linealidad de la relación.

40 Claramente se mostró que la proteína de fusión VP2-GST tenía actividad de proteína tirosina fosfatasa. La evolución en el tiempo de la liberación de fosfato por la CAV VP2-GST con respecto a la proteína GST control se muestra en la figura 18. Sobre la base de la región lineal de la curva del estudio de la evolución en el tiempo, en todas las reacciones posteriores se midió la V_o a 1 min. La VP2-GST mostró una cinética de Michaelis-Menten y la relación entre V_o y $[S]$ fue $1/[V_o] = (1,292) \cdot 1/[S] + 0,060$. Los gráficos de la actividad de VP2-GST y las proteínas control GST se ilustran en la figura 19. El gráfico recíproco doble de Lineweaver-Burk para VP2-GST se muestra en la figura 45 20. Del gráfico de the Lineweaver-Burk, mediante regresión lineal se encontró que la $1/V_{\text{máx}}$ era 0,060 (desviación estándar= 0,0137, $P < 0,0001$) y se encontró que la $K_m/V_{\text{máx}}$ era 1,292 (desviación estándar= 0,1085, $P < 0,0001$).

Según estos resultados se estimó que la $V_{\text{máx}}$ era de 14.280 U/mg min y la K_m 16,95 μM . Todos los ensayos se repitieron tres veces usando 2 preparaciones diferentes de proteína VP2-GST y cada concentración de sustrato se repitió al menos 4 veces.

55 *Efecto del pH de la reacción y la inhibición con ortovanadato sobre la actividad tirosina fosfatasa*

La actividad de proteína tirosina fosfatasa se midió a un pH de reacción variable (Tabla 4). Se encontró que la actividad PTPasa óptima de VP2-GST estaba en el intervalo de pH 6-pH 7.

El efecto inhibitor del ortovanadato sódico sobre la actividad PTPasa de VP2-GST se muestra en la tabla 20. Las concentraciones de ortovanadato de 00,001, 0,01 y 0,1 mM inhibieron completamente la actividad PTPasa de VP2-GST.

65

ES 2 334 646 T3

TABLA 19

Efecto del pH de la reacción sobre la actividad PTPasa de VP2-GST

pH	S (nmol)	V₀ media (nmol)	SD
4	10	1,746	0,007
5	10	1,474	0,018
6	10	5,636	0,156
7	10	5,612	0,041
8	10	1,829	0,049
9	10	0,000	0,000

TABLA 20

Efecto de la inhibición del ortovanadato de sodio sobre la cinética de la actividad PTPasa de VP2-GST

[ortovanadato] mMol	[S] nmol	Vo
-	10	5,612
0,001	10	0,002
0,01	10	0,000
0,1	10	0,000

Actividad PTPasa del producto del ORF2 del TLMV

Se demostró la actividad PTPasa para la proteína de fusión ORF-GST del TLMV con respecto al ensayo CAV VP2-GST. La actividad en el equilibrio fue equivalente a la demostrada para la VP2 del VAP (Figura 20).

III. VP2

Un objetivo de este estudio era investigar si la VP2 del VAP era una nueva PAPasa vírica. Esta investigación surgió principalmente del hallazgo de la homología entre la VP2 del VAP y una serie de PTPasas y la propuesta de un motivo de firma de la PTPasa dentro de la secuencia de VP2. Las PTPasas se caracterizan por el motivo de firma mínimo de PTPasa CXXXXXR y por la catálisis de fosforilación usando un intermedio enzimático cisteinil-fosfato. Los dominios que rodean a la proteína están implicados en la regulación de la actividad enzimática y en la especificidad de sustrato. El perfil de la VP2 como proteína no estructural expresada a niveles muy bajos pero esencial para la infectividad y una proteína altamente conservada entre los virus VAP y TT es consistente con una proteína reguladora esencial tal como la PTPasa.

Este trabajo es el primero en definir una función para la VP2 y ha establecido que la VP2 es una nueva PTPasa. Estas enzimas (PTPasas) se definen por su capacidad para eliminar fosfato específicamente de los residuos de fosfotirosina en los sustratos de fosfoproteína. Se ha encontrado que las PTPasas varían en su actividad específica para diferentes sustratos proteicos complejos. El sustrato peptídico generalizado ENDY(Pi)INASL usado en estos ensayos se ha descrito anteriormente. Una amplia gama de PTPasas utilizan este sustrato, que permite la comparación de parámetros cinéticos. La evolución en el tiempo y los estudios cinéticos demuestran claramente que la VP2 del VAP tiene actividad de proteína tirosina fosfatasa. Se ha definido una serie de otras características descriptivas para la familia de PTPasa. Como familia, estas enzimas son resistentes a la inhibición de la actividad con EDTA y muestran un pH neutro óptimo dentro del intervalo de 5,5-7. Los estudios con VP2 de VAP han encontrado que la inclusión de EDTA en el tampón de ensayo era esencial para la actividad y que la actividad era óptima para pH 6-7. Estos resultados son consistentes con los descritos para la familia como un todo.

ES 2 334 646 T3

Las PTPasas catalizan la eliminación de fosfato de la fosfotirosina mediante un producto intermedio de cisteinil-fosfato formado con la cisteína activa en la hendidura catalítica. El mecanismo de catálisis es único para la familia de las PTPasas, ya que es la inhibición de la actividad por concentraciones bajas de ortovanadato. El compuesto ortovanadato es un análogo estructural del fosfato y, como tal, inhibe de forma competitiva el producto intermedio de cisteinil fosfato. Se ha mostrado que los miembros de la familia de las PTPasas varían en la concentración de ortovanadato requerida para la inhibición. La inhibición máxima de la actividad de la VP2 del VAP se consiguió con concentraciones de ortovanadato tan bajas como de 0,001 mM.

En las condiciones de ensayo descritas, la VP2 del VAP tenía una $V_{\text{máx}}$ de 14.280 U/mg.min y una K_m de 16,95 μM . La actividad de la VP2 del VAP es intermedia entre la característica de las PTPasas de masa molecular alta y baja (Mr). Las PTPasas de baja Mr tienden a tener una actividad específica elevada. Un ejemplo es la PTP1B que tiene una $V_{\text{máx}}$ de 20.000 U/mg.min. Las PTP de alta Mr tienen menores actividades específicas en general, aunque la actividad depende de las especificidades de sustrato. Por ejemplo, la CD45 de bazo humano tiene una $V_{\text{máx}}$ de 1.000 U/mg.min.

La estructura cristalográfica y los mecanismos catalíticos de algunas proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas) se han estudiado con detalle. A partir de los estudios de PTPasas de alta Mr se ha definido el motivo firma consenso como (I/V)HCXAGXGR(S/T). El residuo de cisteína es crucial en la unión del fosfato y la arginina coordina la fosfotirosina en la hendidura catalítica. Se ha definido un motivo firma mínimo para la superfamilia de las PTPasas como CXXXXXR. Esta definición se basa en un subgrupo de PTP de baja Mr que carecen de homología de secuencia global con el dominio conservado de la PTPasa pero que contiene este motivo firma mínimo. Las PTP de baja Mr también se caracterizan por actividad en un amplio abanico de pH. El motivo catalítico propuesto en la VP2 del VAP es ICNCGQFRK, codificado por los residuos de aminoácidos 94 a 102. No obstante, la VP2 del VAP tiene una homología de secuencia con las PTPasas de alta Mr en una región extendida que no se aprecia para las PTP de baja Mr. Además, las propiedades cinéticas tales como el pH óptimo son características del subgrupo de PTP de alta Mr.

Las búsquedas de homología en bases de datos identificaron una serie de PTPasas receptoras eucarióticas (R-PTPasas) con puntuaciones de identidad de 30-32% con la VP2 del VAP en una región extendida de aproximadamente 53 aminoácidos, incluido el motivo firma propuesto. Este grupo de R-PTPasas tiene una homología significativa entre sí. Paradójicamente, la homología de secuencia entre la VP2 del VAP y las PTPasas eucarióticas es con una región en dirección 5' del motivo catalítico definido de las proteínas eucarióticas. Se ha mostrado que los dominios proteicos de las PTPasas eucarióticas tienen una organización modular y en muchas PTPasas se han identificado dos dominios catalíticos conservados en tándem, solo uno de los cuales es funcional. La significativa homología entre el pliegue catalítico de la VP2 activa y el pliegue de la proteína adyacente al motivo eucariótico de función idéntica puede indicar redundancia funcional en las proteínas eucarióticas. La redundancia dentro de las PTPasas puede existir no sólo como dominios completos como se entendía previamente sino también al nivel de la estructura secundaria dentro de los pliegues proteicos.

De interés adicional es el hallazgo de una homología significativa en la misma región entre la VP2 del VAP y el subgrupo SANBAN de los virus TT. Recientemente se han identificado virus TT de huéspedes humanos como un grupo heterogéneo de virus de ADN circular, monocatenario y de sentido negativo. El análisis de secuencia de este grupo de virus ha mostrado mayor homología global con el VAP. La mayor homología de secuencia con el VAP se observa en la región no codificadora y entre el ORF2 de los virus TTV y la VP2 del VAP. Todos los virus TTV, SANBAN, YONBAN y TLMV (minivirus del tipo TTV) tienen en común con el VAP la secuencia $\text{WX}_7\text{HX}_3\text{CXCX}_5\text{H}$ en el ORF2. Esta secuencia homóloga corresponde al extremo 5' del motivo firma predicho de la PTPasa. No obstante, la homología entre los aislamientos SANBAN y la VP2 del VAP es más extensa e incluye toda la secuencia del motivo firma propuesto. Recientemente, otros autores han propuesto la clasificación de los virus TTV, SANBAN, YONBAN, TLMV y VAP como virus Paracircoviridae. La designación actual de los ORF en los virus TT se basa solo en el análisis de la secuencia, ya que estos virus no se han cultivado todavía en cultivos ni se han caracterizado los perfiles de expresión de la proteína vírica.

Los resultados mostrados en lo que antecede identifican con claridad el ORF2 del TLMV como una segunda y nueva PTPasa vírica. La demostración de actividad PTPasas por el ORF2 del TLMV es indicativa de una estrategia vírica común para la infección y la replicación entre el VAP y los virus TT. El hallazgo es consistente con la estrecha similitud encontrada en la organización del genoma y la homología de secuencia entre TTV y VAP.

Se sabe que las proteínas tirosina fosfatasas funcionan en la regulación de la mitogénesis, la transcripción génica, la transducción de la señal, las interacciones célula-célula, la diferenciación celular y en las respuestas de citoquinas de los linfocitos. La infección por el VAP de las poblaciones de linfocitos T y de hemocitoblastos de pollos de hasta 21 días de edad conduce a una profunda inmunosupresión y anemia. La actividad PTPasa de la VP3 durante la infección puede representar un mecanismo de virulencia a través de cambios reguladores inducidos por el virus en las poblaciones linfocitarias infectadas. Todas las proteínas reguladoras anteriores codificadas por virus han implicado virus con genomas de tamaño grande y amplia capacidad de codificación. Se ha sugerido que estos virus pueden mantener proteínas reguladoras celulares además de proteínas víricas cruciales replicativas y estructurales. Esto incluye la PTPasa del VH1 previamente descrita del virus Vaccinia. Por tanto, el presente hallazgo es inusual en cuanto a que el VAP tiene un genoma extremadamente pequeño (2,3 kb) y sólo tres proteínas víricas que se expresan a partir de marcos de lectura superpuestos. Por tanto, el VAP es altamente dependiente de la función del huésped para la finalización de su ciclo de replicación y es posible que una capacidad para regular el ciclo celular de los linfocitos pueda ser una función vírica crucial. Que los presentes autores sepan, la PTPasa de la VP2 del VAP sólo es la segunda PTPasa vírica que se ha descrito y es la única PTPasa descrita en un virus de este tipo.

IV. Inoculación de ADN de embriones con genoma del VAP monocatenario y bicatenario

Introducción

5 Noteborn, M.H., de Boer, G.F., van Roozelaar, D.J., Karreman, C., Kranenburg, O., Vos, J. G., Jeurissen, S. H.,
 Hoeben, R.C., Zantema, A. and Koch, G. (1991) han descrito el procedimiento estándar usado para la generación de
 virus infecciosos a partir del genoma del VAP mediante la transfección de ADN bicatenario en células MDCC-MSB1
 en Characterisation of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle.
 10 J Virol 65, 3131-3139. No se han investigado metodologías alternativas para la generación de viriones del VAP a partir
 del genoma y no hay informes publicados de la inoculación de genomas desnudos de ningún virus en el saco vitelino
 del polluelo. Una capacidad para generar virus infecciosos in ovo a partir de genoma de ADN desnudo permitiría la
 producción de vacunas sin una etapa intermedia de transfección en células MDCC-MSB1. Esta metodología tendría
 el potencial de estimular la bioseguridad, ya que la línea celular MDCC-MSB1 transformada contiene el genoma del
 15 la vacuna. virus de la enfermedad de Marek latente, y el pase celular porta el riesgo de contaminación accidental con el virus de

El virus de la anemia del pollo, en común con otros miembros de la familia Circoviridae, tiene un genoma de
 ADN circular, monocatenario y de sentido negativo dentro de una cápside sin cubierta. El ciclo infeccioso normal del
 virus se ha investigado y la replicación del virus progresa a través de un intermedio de replicación de doble cadena.
 20 Las formas replicativas de doble hebra de 2,3 kpb, 1,3 kpb y 0,8 kpb y las formas circulares abiertas y cerradas se
 han identificado en las células MDCC-MSB1 infectadas con el VAP. El orden en el que el intermedio de replicación
 de doble hebra, el transcrito, y el genoma monocatenario encapsidado se sintetizan no se conoce. Se ha demostrado
 que los virus infecciosos podrían recuperarse con facilidad de las células MDCC-MSB1 transfeccionadas con la forma
 bicatenaria del genoma sola. Por tanto, la secuencia de ADN del VAP clonada de 2319 pb contiene toda la información
 25 genética requerida para la generación del virus infeccioso dentro de la célula huésped. La recuperación del virus de
 replicación competente a partir de la transfección del genoma de ADN monocatenario no se ha investigado. Para que
 la replicación del virus progrese a partir de la transfección del genoma de ADN monocatenario se requeriría la síntesis
 de una forma replicativa bicatenaria a partir del genoma monocatenario citoplasmático.

30 El objetivo de este estudio era investigar si la replicación del virus puede progresar a partir de la transfección
 de células MDCC-MSB1 con diferentes constructos genómicos del VAP. Se ha investigado la capacidad para que
 la replicación vírica progrese a partir de las formas monocatenaria o bicatenaria del genoma, de las formas lineal o
 circular y de las hebras de sentido positivo o negativo. Otro objetivo era investigar si la replicación del virus puede
 progresar *in vivo* tras la inoculación de estos constructos de ADN en el saco vitelino e investigar la eficiencia relativa de
 35 los diferentes constructos genómicos en la generación de virus infeccioso tras la inoculación dentro del saco vitelino.

Clonación bidireccional del genoma del VAP en el bacteriófago M13.t130

40 Con el fin de obtener genoma del VAP monocatenario de sentido positivo y de sentido negativo, el genoma se
 subclonó desde el vector plasmídico pGEX-4Z en el bacteriófago M13.t130. La construcción del clon genómico
pCAU269/7 en el vector pGEX-4Z ha sido descrita por Brown, H.K., Browning, G. F., Scott, P. C. and Crabb, B. S.
 (2000). Fulllength infectious clone of a pathogenic Australian isolate of chicken anaemia virus. Aust Vet J 78, 637-
 640. El genoma de *CAU269/7* se subclonó bidireccionalmente desde el vector plasmídico pGEX-4Z en el bacteriófago
 45 M13.t130. La orientación del inserto genómico dentro del vector bacteriófago M13.t130 se determinó a partir del
 análisis del patrón de digestión con *PstI*. Se observaron bandas de aproximadamente 8,9 kpb y 0,6 kpb tras la digestión
 con *PstI* de un clon M13.t130 que contiene el genoma del VAP insertado con la hebra de sentido positiva orientado de
 5' a 3' (designado CAV.M13.pos.). Se observaron bandas de aproximadamente 7,8 kpb y 1,8 kpb tras la digestión con
 50 *PstI* de un clon M13.t130 que contiene el genoma del VAP insertado con la hebra de sentido positiva orientado de 5' a
 3' (designado CAV.M13.neg.). La orientación de la secuencia genómica del VAP en estos clones además se confirmó
 mediante secuenciación en ambas direcciones usando cebadores que hibridaban con las secuencias adyacentes al sitio
 de clonación.

55 Transfección de células MDCC-MSB1 con constructos genómicos del VAP

Se evaluó la eficacia del crecimiento del virus tras la transfección de diferentes constructos genómicos del AP en
 las células MDCC-MSB1. Se prepararon formas monocatenarias y bicatenarias del genoma del VAP. El ADN bicate-
 nario del VAP se preparó a partir de un cultivo del plásmido *pCAU269/7*. Una banda del tamaño correcto del genoma
 60 del VAP liberado del clon *pCAU269/7* mediante digestión con *EcoRI* se purificó mediante electroforesis en gel al 1%
 y se circularizó mediante ligadura. Las bandas del tamaño correcto se purificaron mediante electroforesis en gel al 1%
 para el ADN monocatenario del VAP preparado a partir de cultivos de los clones del bacteriófago CAV.M13.pos and
 CAV.M13.neg. La presencia de únicamente ADN monocatenario en la preparación se confirmó mediante digestión de
 todo el ADN con la nucleasa Mung Bean que digiere específicamente ADN monocatenario. Los cebadores que hibri-
 65 daron con las secuencias adyacentes a los sitios de clonación se hibridaron con ambas preparaciones de CAV.M13.pos
 and CAV.M13.neg monocatenarias y, después, se digirieron con *EcoRI*. El ADN se circularizó mediante ligadura y
 después se cuantificó mediante espectroscopia.

ES 2 334 646 T3

La regeneración del virus tras la transfección con estos constructos de ADN se evaluó mediante inmunofluorescencia en pases secuenciales de cultivo celular y se preparó virus sin célula a partir de los lisados celulares. El virus se recuperó tras la transfección con los siguientes constructos de ADN genómico:

- (i) ADN de VAP monocatenario, circularizado, de sentido positivo preparado a partir del clon CAVM13.pos.
- (ii) ADN de VAP monocatenario, lineal, de sentido positivo preparado a partir del clon CAVM13.pos.
- (iii) ADN de VAP monocatenario, circularizado, de sentido negativo preparado a partir del clon CAVM13.neg.
- (iv) ADN de VAP monocatenario, lineal, de sentido negativo preparado a partir del clon CAVM13.neg; y
- (v) ADN de VAP bicatenario, circularizado, derivado a partir de digestión con *EcoR1* de pCAU269/7.

No se recuperó virus tras la transfección con ADN del plásmido control. La eficiencia de la transfección para ADN bicatenario fue del 10% según se evaluó mediante la proporción de células fluorescentes a las 48 horas de la transfección con el plásmido pEGFP.

La transfección con todos los constructos monocatenarios tuvo como resultado en una proporción de células infectadas marcadamente mayor que la transfección con el constructo de ADN bicatenario. Tras la transfección con todas las formas de genoma monocatenario se observó al menos un 50% de infección de las células MDCC-MSB1 por el segundo pase de cultivo. No obstante, no se observó el 50% de infectividad hasta el cuarto pase tras la transfección con el genoma bicatenario del VAP. No se observaron diferencias en la proporción de células infectadas tras la transfección entre genomas monocatenarios de sentido positivo o negativo ni entre los genomas lineales y circularizados.

Inoculación de ADN en los embriones

Se evaluó la eficacia del crecimiento del virus tras la inoculación *in ovo* de diferentes constructos genómicos del VAP. Los diferentes constructos genómicos del VAP se inocularon en el saco vitelino de grupos de cinco embriones de 7 días de edad (E7). Los títulos de virus en homogeneizados aclarados de embriones de polluelos E18 se determinaron mediante inoculación de cultivos de células MDCC-MSB1 (Tabla 21). El virus se recuperó de los embriones E18 homogeneizados inoculados con los siguientes constructos de ADN genómico (Tabla 21):

- (i) ADN de VAP monocatenario, circularizado, de sentido positivo preparado a partir del clon CAVM13.pos.
- (ii) ADN de VAP monocatenario, lineal, de sentido positivo preparado a partir del clon CAVM13.pos.
- (iii) ADN de VAP monocatenario, circularizado, de sentido negativo preparado a partir del clon CAVM13.neg.
- (iv) ADN de VAP monocatenario, lineal, de sentido negativo preparado a partir del clon CAVM13.neg; y
- (v) ADN de VAP bicatenario, circularizado, derivado a partir de digestión con *EcoR1* de pCAU269/7.

NO se recuperó virus de los embriones E18 homogeneizados inoculados con el ADN del plásmido control (Tabla 21). La eficiencia del crecimiento del virus de la inoculación de genoma monocatenario, circularizado y positivo fue muy baja, con virus recuperado de únicamente uno de 5 embriones (Tabla 21). La mayor eficacia de crecimiento de virus se observó en la inoculación de genoma monocatenario circularizado y de sentido negativo, que es la forma de genoma presente en el virión. El título medio para el genoma monocatenario, circularizado y de sentido negativo fue significativamente mayor al nivel de 0,001 que el título medio para la inoculación de genoma bicatenario.

Los hallazgos de ese estudio se confirmaron después mediante la inoculación del saco vitelino de huevos tras 6 días de incubación con genomas víricos mutantes clonados todavía contenidos dentro del vector plasmídico. Los tres genomas mutantes fueron mut C87R, mut H103Y y mut Q131. A los 16 días de la incubación se prepararon frotis de membranas corioalantoideas y de médula ósea de los embriones y se tiñeron con anticuerpo inmunofluorescente contra VP3 del VAP. En todos los huevos inoculados había signos de replicación vírica demostrable mediante tinción específica para VP3.

V. Inoculación de ADN de embriones con genoma del VAP monocatenario y bicatenario

En este estudio se desarrolló una nueva metodología para el crecimiento del VAP *in ovo* tras la inoculación de embriones E6 o E7 con genoma de ADN desnudo. Este es el primer estudio en demostrar para el VAP que el crecimiento del virus *in vivo* puede progresar a partir de la inoculación de ADN y la primera descripción de la inoculación del genoma vírico desnudo en el saco vitelino para cualquier patógeno vírico aviar.

ES 2 334 646 T3

Este estudio ha demostrado la eficacia de la inoculación de ADN en el saco vitelino para el cultivo de VAP. La liberación de ADN del VAP en el saco vitelino de embriones o por otras vías *in ovo* se puede usar como vía de vacunación.

5 Esta metodología representa un significativo avance en la bioseguridad debido a la capacidad para generar virus infecciosos a partir de genoma manipulado en un sistema sin células. El cultivo del virus mediante la transfección del genoma manipulado en las células MDCC-MSB1 expone el posible inoculado de vacuna a los componentes del sistema del cultivo celular, lo que puede plantear riesgos de bioseguridad. La capacidad para generar virus a partir del genoma de ADN inoculado en el saco vitelino embrionario es, por tanto, significativa para la estimulación de la bioseguridad.
10 El título de 10^5 a 10^6 DICT50 obtenido normalmente para el cultivo del VAP en cultivo de células MDCC-MSB1 es restrictivamente bajo. La amplificación del título podría ser posible mediante otros ciclos de inoculación en el saco vitelino.

15 La eficacia de la inoculación en el saco vitelino fue mayor para el genoma monocatenario, circularizado y de sentido negativo (Tabla 21). Se recuperaron títulos elevados de virus infecciosos de la inoculación de genoma monocatenario, circularizado y de sentido negativo y se obtuvieron títulos moderados de la inoculación en el saco vitelino de genoma bicatenario y circularizado (Tabla 21). El título obtenido de la inoculación de embriones con genoma monocatenario, circularizado y de sentido negativo fue 3 log más elevado que para el genoma bicatenario (Tabla 21). Se observó una diferencia significativa en los títulos obtenidos de la inoculación de genoma de sentido negativo circularizado frente a lineal. Los títulos víricos obtenidos de la inoculación de genoma lineal de sentido negativo, genoma circularizado de sentido positivo o de genoma lineal de sentido positivo fueron bajos. Dado que no se observaron diferencias en la eficacia de la transfección en células MDCC MSB1 entre las diferentes formas de constructos de ADN monocatenario, las diferencias en la eficacia tras la inoculación en el saco vitelino se pueden atribuir, probablemente, a las influencias en dirección 5' con respecto al procesamiento del genoma vírico una vez que está en el citoplasma.
20 Los constructos de ADN inoculados extracelularmente en el saco vitelino deben persistir en el saco son degradarse y entrar en las células diana huésped para que comience la replicación vírica. Por tanto, muy probablemente, la diferencia observada entre los constructos de sentido positivo y de sentido negativo esté relacionada con la estabilidad del constructo tras la inoculación en el saco vitelino y su capacidad para su captación en las células diana. El plegamiento y la conformación de la hebra circularizada de sentido negativo puede determinar esta diferencia.
30

Se pueden generar virus infecciosos a partir del genoma monocatenario tras la transfección de células MDCC-MSB1. No se observaron diferencias entre las hebras de sentido positivo y negativo ni entre los constructos circularizados y lineales.

35 Probablemente esto se debe a que el intermedio replicativo bicatenario y circular se puede sintetizar a partir de la hebra de sentido positivo o negativo una vez que está en el citoplasma. La transfección del genoma monocatenario de sentido negativo tuvo como resultado una infectividad más elevada en pasajes anteriores que la transfección con el genoma bicatenario.

40 Noteborn, M.H., de Boer, G.F., van Roozelaar, D. J., Jeurissen, S. H., Hoeben, R. C., Zantema, A. and Koch, G. (1991) han descrito procedimientos para la transfección del genoma del VAP bicatenario en células MDCC-MSB1 en Characterisation of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. J Virol 65, 3131-3139, y esta técnica se ha repetido en muchos estudios publicados. Usando esta técnica, el genoma del ADN se puede manipular fácilmente *in vitro* y las alteraciones se pueden definir con precisión antes de la generación de viriones en el cultivo celular. La transfección de constructos monocatenarios puede incrementar la eficacia de este procedimiento. Un procedimiento que proporcione una mayor eficacia de la transfección sería particularmente beneficioso para el cultivo de cepas mutantes con características alteradas del crecimiento, tal como periodos ampliados de latencia o tamaño bajo de eclosión. La mutagénesis por cebadores en el sistema de clonación en el bacteriófago M13 implica únicamente una sola etapa de mutagénesis para la generación del genoma mutante monocatenario y es, por tanto, una técnica más rápida y más sencilla. El vector bacteriófago M13 es un sistema adecuado alternativo a la propagación plasmídica para la manipulación del genoma del VAP.
50

En otros estudios se ha mostrado que el uso del genoma clonado en un vector plasmídico también podía inocularse en el saco vitelino de huevos embrionados como procedimiento para generar virus infecciosos. Por tanto, este procedimiento se puede usar para recuperar genomas mutantes y también para la producción de vacunas. También se ha mostrado que la inoculación directa de genomas clonados de mutantes del VAP en huevos se puede usar como método de vacunación, especialmente dada la demostración de que los virus mutantes están atenuados para los embriones de polluelos.
55

60

65

ES 2 334 646 T3

TABLA 21

Títulos medios del VAP en embriones E18 tras la inoculación en el saco vitelino de diferentes constructos genómicos

	Inóculo de ADN	Título medio	SD	Valor P[#]
5	Control negativo	0	0	NA
	ds ^a	2,9	0,6	***
10	(-ve) ^b ss ^{cc} circ ^d	5,5	0,7	***
	(-ve) ssclin ^e	1,3	0,9	**
15	(+ve) ^f ss circ	0,6	0,9	‡
	(+ve) ss lin	1,6	0,3	***
20	¶ Título medio en log ₁₀ DICT ₅₀ /embrión			
	SD desviación estándar			
	# valor P para la prueba t entre el control negativo y el grupo de tratamiento			
25	a bicatenario			
	b sentido negativo			
	c monocatenario			
	d genoma circularizado			
30	e genoma lineal			
	f sentido positivo			
	NA no aplicable			
35	* valor P significativo al nivel 0,05			
	** valor P significativo al nivel 0,01			
	*** valor P significativo al nivel 0,001			
40	‡ valor P no significativo al nivel 0,05			

VI. *Evaluación de determinados virus mutantes de VAP para atenuación y para inducción de inmunidad protectora en polluelos de días*

45 *Objetivo*

Evaluar la seguridad de determinados mutantes del VAP en polluelos de días y evaluar la inmunidad protectora inducida por la inoculación de mutantes del VAP en polluelos de días

50 *Procedimiento*

Hubo seis grupos experimentales:

	Grupo	Día 1 de tratamiento	Día 21 de tratamiento
55	1	Medio	Medio
	2	Medio	VAP salvaje
60	3	VAP salvaje	VAP salvaje
	4	Mutante 169	VAP salvaje
65	5	Mutante 101	VAP salvaje
	6	Mutante 161/162	VAP salvaje

ES 2 334 646 T3

Cada grupo experimental estaba constituido por 10 aves y cada grupo estaba en un aislador distinto de fibra de vidrio con presión positiva con filtros de aire en la entrada y e la salida de aire con filtros de partículas de alta eficiencia y toda la comida y el agua esterilizada antes de su introducción en los aisladores. Todos los polluelos se identificaron individualmente con bandas en las alas.

Se procedió a la eutanasia de la mitad de los polluelos el día 14 y se retiraron para la evaluación de la seguridad de los mutantes. El resto de los polluelos permaneció en los aisladores durante otros 21 días.

En las aves se inoculó por vía subcutánea 0,5 ml de VAP que contenían una mediana de dosis infecciosas en cultivo tisular de 10^4 del virus o 0,5 ml de un lisado de células MSB1 no infectadas.

El día 14, se procedió a sacrificar a 5 aves de cada grupo mediante exposición a halotano. Tras la muerte se midieron los pesos corporales y se realizó la anatomía-patológica macroscópica de todos los órganos linfoides, la médula ósea, el hígado, el bazo y la dermis (en busca de signos de hemorragia). La cadena tímica se diseccionó y se pesó.

El día 21, en las aves restantes de cada grupo se inoculó por vía subcutánea 0,5 ml de VAP que contenían una mediana de dosis infecciosas en cultivo tisular de 10^4 del virus o 0,5 ml de un lisado de células MSB1 no infectadas.

El día 35, se sacrificó al resto de las aves mediante exposición a halotano. Tras la muerte se midieron los pesos corporales y se realizó la anatomía-patológica macroscópica/fotografió todos los órganos linfoides, la médula ósea, el hígado, el bazo y la dermis (en busca de signos de hemorragia). La cadena tímica se diseccionó y se pesó.

Resultados y discusión

No se observaron signos de que las aves infectadas con el virus tuvieran pesos corporales menores que las aves no infectadas el día 14 y tampoco se observaron signos de que hubiera diferencias en el peso corporal entre cualquiera de los grupos el día 35.

El día 14 No se observaron signos de una diferencia en el peso del timo o la proporción del timo/peso corporal entre las aves infectadas con los virus mutantes 101 y 161/162 y las aves no infectadas. No obstante, el peso del timo y la proporción timo/peso corporal de las aves infectadas con el virus virulento salvaje fueron significativamente menores que los de las aves no infectadas. El peso del timo y la proporción timo/peso corporal de las aves infectadas con el mutante 169 no fueron significativamente diferentes de los de las aves no infectadas o las aves infectadas con el virus virulento salvaje.

Resultados el día 14

Grupo	Día 1 de tratamiento	Peso del timo (g)	Proporción timo/Peso corporal (mg/g)
1	No infectado	$1,3 \pm 0,3^a$	$8,8 \pm 1,6^a$
2	No infectado	$1,1 \pm 0,3^{ab}$	$8,4 \pm 1,6^a$
3	VAP salvaje	$0,8 \pm 0,3^b$	$4,9 \pm 2,0^b$
4	Mutante 169	$1,1 \pm 0,3^{ab}$	$7,1 \pm 2,1^{ab}$
5	Mutante 101	$1,3 \pm 0,4^a$	$8,9 \pm 2,3^a$
6	Mutante 161/162	$1,3 \pm 0,3^a$	$8,3 \pm 1,5^a$

Los valores en la misma columna con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.

Estos resultados muestran que los virus mutantes que estaban atenuados para los embriones de polluelos también estaban atenuados para los polluelos de días de edad, con la atenuación del mutante 169 intermedio de algún modo comparada con la de los mutantes 101 y 161/162.

Experimento de protección

El día 35 no se observaron signos de una diferencia en el peso tímico o la proporción timo/peso corporal entre las aves vacunadas con el virus mutante 169 y después expuestas al VAP virulento salvaje a los 21 días, las aves que no se habían infectado y las aves a las que se había inoculado el VAP virulento salvaje al día de edad y después expuestas al VAP virulento salvaje a los 21 días. No obstante, el peso del timo y la proporción del timo/peso corporal de las aves no expuestas al VAP al día de edad pero que se habían infectado con el virus virulento salvaje a los 21 días de edad fueron significativamente menores que los de estos grupos. Las aves que habían sido vacunadas con los mutantes 101 o 161/162 y después expuestas al virus virulento salvaje tenían niveles intermedios de protección.

Resultados el día 35

Grupo	Día 1 de tratamiento	Día 21 de tratamiento	Peso del timo (g)	Proporción timo/peso corporal (mg/g)
1	No infectado	No infectado	4,1 ± 0,8 ^a	9,5 ± 1,4 ^a
2	No infectado	VAP salvaje	1,3 ± 0,3 ^b	3,3 ± 0,9 ^b
3	VAP salvaje	VAP salvaje	5,1 ± 1,2 ^a	10,5 ± 1,9 ^a
4	Mutante 169	VAP salvaje	3,5 ± 0,4 ^a	9,0 ± 0,8 ^a
5	Mutante 101	VAP salvaje	2,2 ± 0,4 ^c	5,0 ± 1,4 ^b
6	Mutante 161/162	VAP salvaje	2,0 ± 1,0 ^{bc}	5,2 ± 2,1 ^b

Los valores en la misma columna con el mismo superíndice no son significativamente diferentes.

Estos resultados muestran que la vacunación con virus mutantes pudo proteger a los pollos contra los efectos de la infección por el VAP.

Por tanto, los virus VAP mutantes no sólo estaban atenuados sino también eran capaces de inducir inmunidad protectora en pollos de 1 día de edad.

*Discusión**I. Vacuna contra el VAP*

Los presentes inventores han desarrollado vacunas de ADN y con microorganismos vivos atenuados del VAP adecuadas para la inoculación de bandadas de gallinas menores de un año, de pollos para engorde y de pollos para cría. En este procedimiento estaban implicadas varias etapas, incluidas:

- establecimiento de un sistema de cultivo celular *in vitro* para el análisis y crecimiento del virus;
- análisis del virus para determinar los sitios adecuados para mutagénesis e investigación de la función del virus;
- mutagénesis dirigida por sitio mediante PCR con un clon de genoma completo;
- transfección de virus mutantes en un sistema de cultivo celular y evaluación de la infectividad, los efectos citopatogénicos y los cambios específicos en la función vírica;
- análisis de los virus mutantes como posibles candidatos a vacuna en un modelo de exposición usando embriones de polluelo SPF; y
- evaluación del fenotipo y la infectividad *in vivo* de los virus mutantes en el modelo de exposición.

ES 2 334 646 T3

Los resultados de los análisis de la patogenicidad en embriones de polluelos demostraron claramente que la mutación de la VP2 en las regiones clave de la estructura y función identificada podría usarse para generar virus atenuados que serían adecuados para vacunación, bien como virus atenuados o como vacuna de ADN. Todos los mutantes, con la excepción del mut 163, estaban significativamente atenuados, medido mediante la puntuación total de la lesión. No obstante, el mut 163 estaba significativamente atenuado medido mediante las puntuaciones de lesiones en el timo y el bazo.

Cabe destacar que los efectos más significativos sobre la atenuación se consiguieron mediante la mutación de los residuos predichos que están implicados directamente en la función PTPasa de la VP2, pero que se consiguió también alguna atenuación mediante la mutación de las regiones ácidas y básicas en el extremo carboxilo de la VP2.

Además, la mutación de la secuencia de Kozac en el punto de inicio de la traducción del gen VP2, de modo que se produciría más VP2, tuvo como resultado un constructo que ya no podía realizar una replicación productiva. Tal constructo, aunque no útil como base para el desarrollo de una vacuna con microorganismos vivos atenuados, se puede usar como vacuna de ADN.

Estos estudios también han demostrado que la VP2 tiene un potente efecto inmunomodulador. Por tanto, la VP2 mutante puede usarse para efectuar cambios menos potentes en el sistema inmunitario.

II. Mutación de las señales de inicio de la traducción de la VP2 del VAP

Estos estudios han demostrado la aplicación general de la mutación del gen para la VP2 en el VAP y sus homólogos en otros circovirus para la generación de cepas atenuadas para usar como vacunas vivas o vacunas de ADN y para la generación de clones genómicos no replicantes que se puedan usar como vacunas de ADN.

Además, los presentes inventores han demostrado claramente el papel que la VP2 desempeña en la inmunomodulación durante las infecciones por VAP. Se ha encontrado que la VP2 y sus homólogos se pueden usar para influir sobre la función del sistema inmunológico.

Existe algún potencial para el uso de mutantes deficientes en la replicación, pCAU283-3 y pCAU283+4 como vacunas de ADN en pollos en cuanto a que la expresión transitoria de VP2/VP3 puede ser suficiente para provocar una respuesta inmunitaria.

Resumen

Los presentes inventores han descubierto que la mutagénesis dirigida es una estrategia factible para la producción de una cepa de virus atenuados, en primer lugar porque el genoma del VAP puede manipularse debido a su pequeño tamaño y, en segundo lugar, porque las partículas víricas se pueden generar con facilidad mediante transfección del genoma solo. Las mutaciones dirigidas se pueden introducir en el genoma en una célula y un sistema sin virus y caracterizar con precisión antes de la producción del virus. Por tanto, esta estrategia es muy eficiente y emplea una bioseguridad óptima. Una limitación del empleo de una vacuna con microorganismos vivos atenuados es el título bajo al que el virus crece *in vitro* y la incomodidad menor debido a la necesidad para la producción de virus en huevos libres de patógenos (SPF) específicos embrionados. El desarrollo de una vacuna de ADN elimina el riesgo de bioseguridad de la producción del cultivo y las limitaciones de títulos víricos bajos y puede probarse que es eficaz para la inoculación *in ovo*. Enfoques alternativos a la vacuna con microorganismos vivos atenuados son las vacunas inactivadas o las vacunas vivas atenuadas mediante pases. La inoculación de polluelos con VP1 y VP2 co-expresadas genera una respuesta de anticuerpos neutralizantes en suero protectora contra la exposición. No obstante, los virus vivos atenuados normalmente tienen una capacidad mayor de inmunogenicidad debido a la inducción de inmunidad tanto humoral como celular. Las cepas que se han atenuado mediante pases son subóptimas como candidatos a vacuna porque conservan niveles bajos de patogenicidad. Además, las cepas atenuadas pasadas retiran rápidamente a sus formas virulentas con pases en los polluelos. Por tanto, hay significativas ventajas en el uso de la mutagénesis dirigida por sitio en un genoma recombinante para usar como una vacuna de ADN o para la derivación de cepas vivas atenuadas. El diseño del programa vacunal puede incorporar la administración de vacunas de ADN a huevos embrionados y de vacunas vivas atenuadas para aves más viejas.

Las características de organización del genoma del VAP limitan y potencia las posibilidades de atenuación mediante mutagénesis mientras que conservan al mismo tiempo la infectividad y la inmunogenicidad. El VAP es extremadamente económico en su capacidad de codificación. El genoma sólo tienen 2,3 kb y codifica tres ORF superpuestos, lo que limita las opciones disponibles para mutagénesis. Las mutaciones en un ORF deben diseñarse de un modo que no rompan los ORF superpuestos. Las funciones de las tres proteínas víricas son cruciales para la infectividad vírica y, por tanto, las mutaciones introducidas deben garantizar la conservación de la función proteica. La estabilidad de la atenuación se puede potenciar mediante un enfoque multifactorial. La reversión a la virulencia se espera que se produzca a una frecuencia baja con dependencia de sencillas mutaciones puntuales. El VAP tiene una extrema conservación de la secuencia en todos los aislamientos caracterizados en las regiones de codificación que contienen los marcos de lectura superpuestos. Esto sugiere que en la situación de campo, la capacidad del virus para tolerar mutaciones espontáneas se conserva muy por debajo del índice previsto de mutaciones naturales asociadas con el índice

ES 2 334 646 T3

de error del sistema de la enzima polimerasa. Muy probablemente ésta es una consecuencia de la restricción impuesta sobre el cambio de codón en un marco debido a los cambios concurrentes en el marco superpuesto que pueden ser perjudiciales. Este argumento también sugiere que una estrategia de atenuación por pases será extremadamente lenta y puede no producir una atenuación óptica que pueda conseguirse con la mutagénesis dirigida. Las mutaciones naturales sólo se tolerarán a una frecuencia mensurable en los codones para los que el marco de lectura superpuesto tiene un codón móvil. Por tanto, la mutagénesis dirigida por sitio es óptima y no depende de la probabilidad de baja frecuencia de acontecimientos mutacionales y los sitios en los que el ORF superpuesto tiene una mínima movilidad del codón se pueden muta fácilmente mediante un cuidadoso diseño.

10 Las mutaciones introducidas mediante mutagénesis dirigida por sitio *in vitro* que conservan el marco superpuesto tendrán una menor frecuencia de reversión debido a la necesidad de conservar el codón en el marco superpuesto. La atenuación requiere una estrategia de diseño racional de mutaciones construidas cuidadosamente usando mutagénesis dirigida por sitio.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 334 646 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Un virus de la anemia del pollo (VAP) atenuado aislado capaz de replicación celular y que tiene una secuencia de ácido nucleico seleccionado del grupo constituido por las SEC ID N° 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 y 25.

2. El virus de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N° 23.

3. El virus de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la mutación-mut D 169 G.

10 4. Una composición de vacuna contra el VAP que comprende un VAP atenuado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 junto con un portador o diluyente adecuado.

15 5. Una proteína vírica 2 (VP2) del VAP mutante aislado que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por la SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 y 26.

6. La VP2 del VAP de acuerdo con la reivindicación 5 que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 24.

20 7. Un cebador de ácido nucleico para introducir una mutación en la VP2 de VAP que tiene una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo constituido por ctgctcgaaCgctcgcgttcccacgctaag o aacgcgagcGttcgcgcagccacacagcga que introduce la mut C87R cgctaagatcAgcaactcgcg o cgcagttgcTgatcttagcgtg que introduce la mut C95S, atctgcaacAgcggacaattc o attgtccgcTgttcagatcttag que introduce la mut C97S, ctgctggacaattcGgaaaactcgg o cagtgtttcCgaattgtccgcag que introduce la R101G, cagaaaaTactggttcaagaatgtccggac o gaaaccagtAttttctgaattgtccgcag que introduce H103Y, ctgctgaccctcGgagtacaggg o ccctgtactcCgaggggtcgcaggatcgc que introduce R129G, cgagtacCgggtaagcagctaaaag o cgcttaccGgtactcggagg introducing mut Q131P, ccgaacGgcGCgGCggtgtataag o atacaccGCcGCgcCgttcggggtc que introduce la mut R/K/K150/151/152G/A/A, taagatggcaagGcgGgctcgcagacc o tgcgagcCcgCcttgccatc que introduce la mut D/E 161/162 G/G, gacgagcCcgagaccgagag o ggcctctcgggtcgcGgctcgtc que introduce la mut L163P, gagagcccgGttttacgccttcag o gcgtaaaaCcggcctcctcggtc que introduce la mut D169G y ctgctggacaattcagaGaaactcgtttc o gaaaccagtgttCtctgaattgtccgcag que introduce la mut K102E.

30 8. El cebador de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7 que es gagagcccgGttttacgccttcag o gcgtaaaaCcggcctcctcggtc que introduce mut D169G.

35 9. Uso del virus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la fabricación de una vacuna para conferir inmunidad en un animal contra una infección por circovirus.

10. Uso del cebador de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 en la fabricación de una vacuna para conferir inmunidad en un animal contra una infección por circovirus.

40 11. Un procedimiento para producir un circovirus atenuado que comprende:

(a) inocular el cebador de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 en el saco vitelino de un huevo embrionado;

45 (b) permitir que el circovirus se replique a partir de la molécula de ácido nucleico aislado; y

(c) recolectar el circovirus del huevo.

50

55

60

65

Figura 1

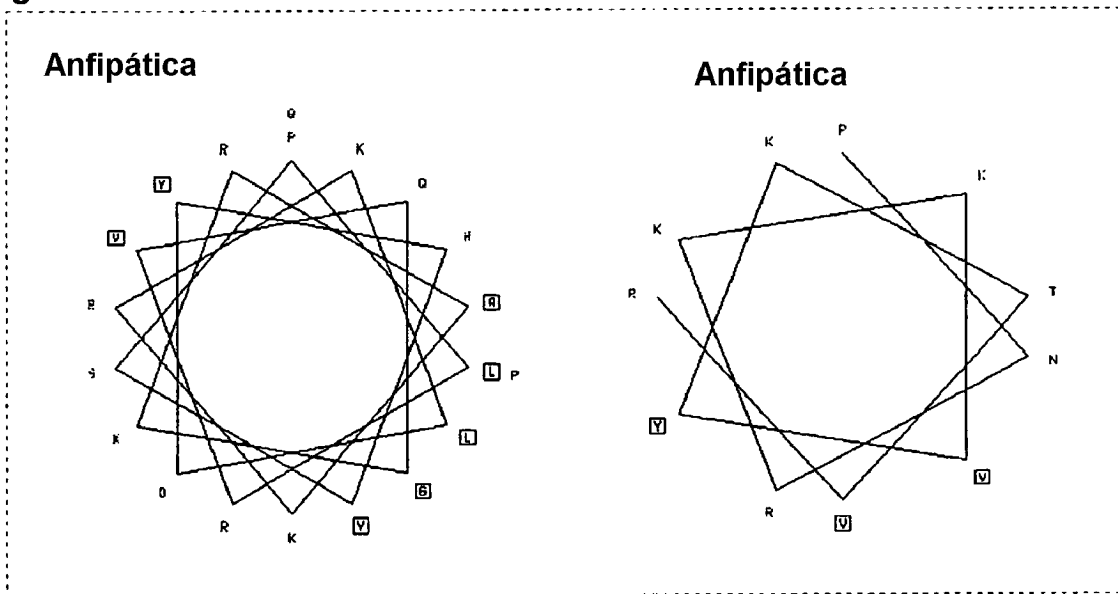


Figura 2: Transfección de mut C86 R en células MSB1

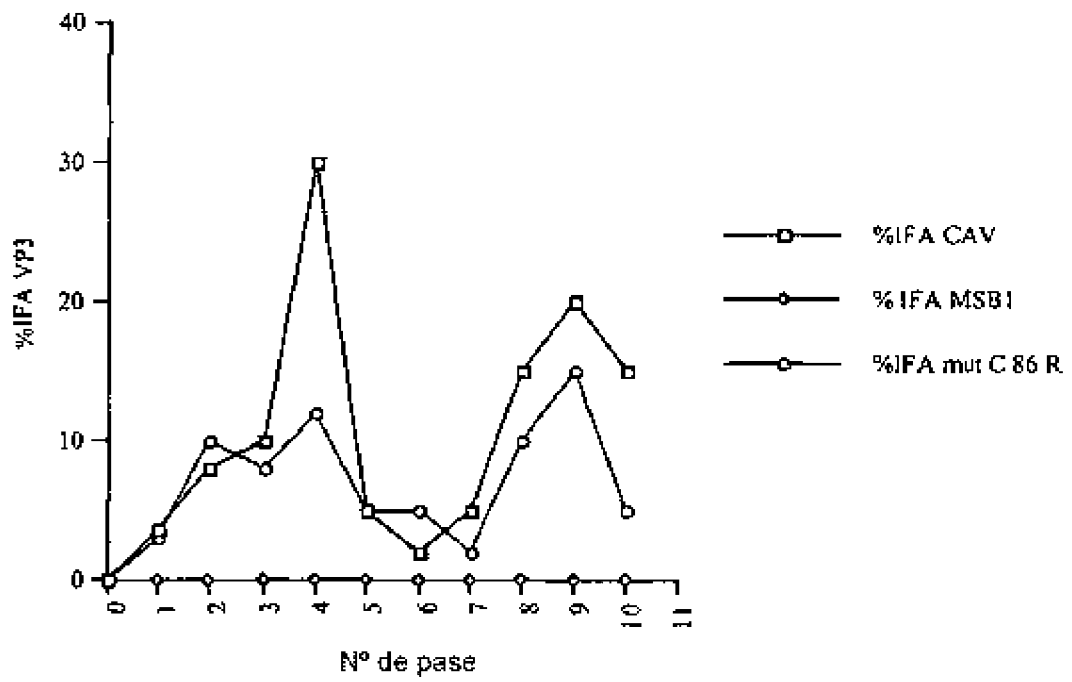


Figura 3: Transfección de mut C95 S en células MSB1

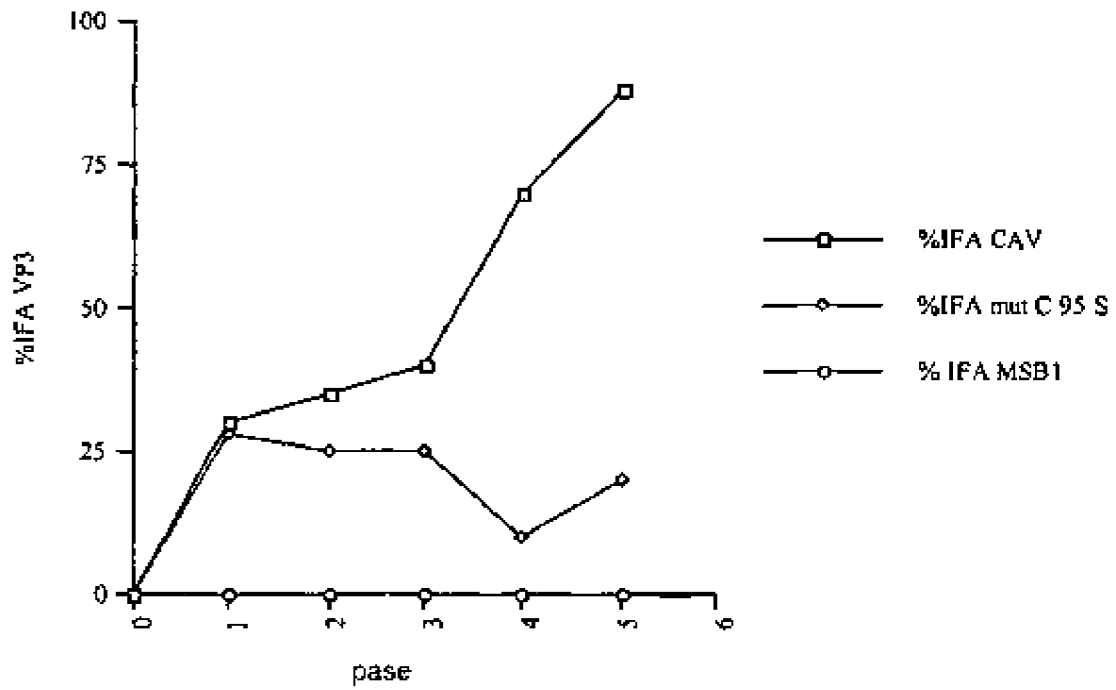


Figura 4: Transfección de mut C97 S en células MSB1

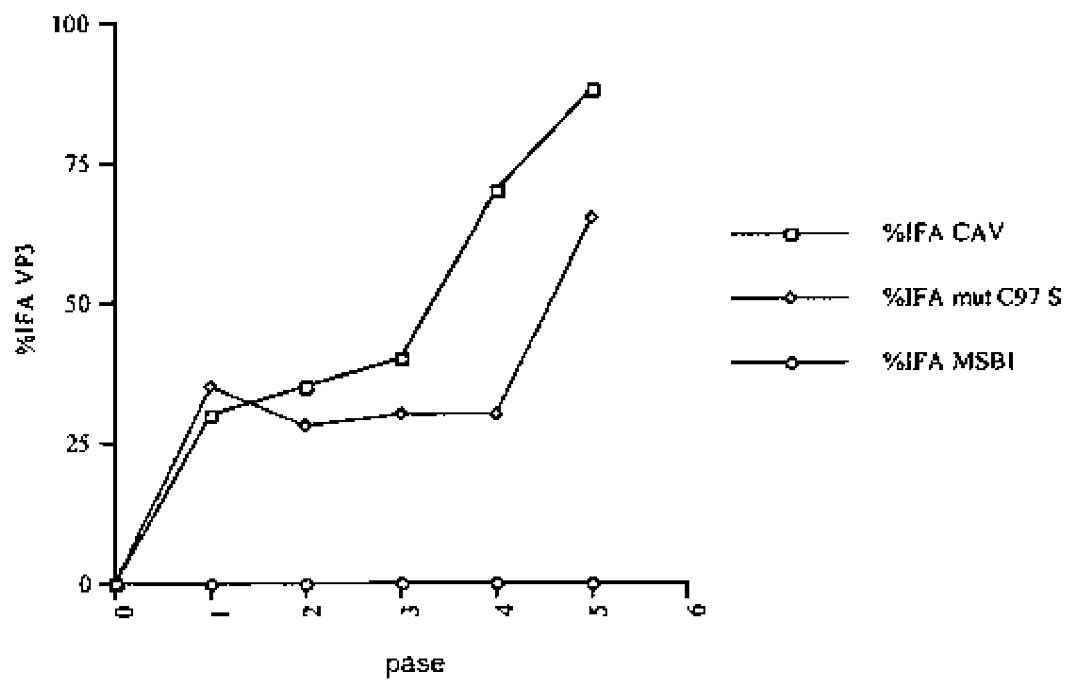


Figura 5: Transfección de mut R 101 G en células MSB1

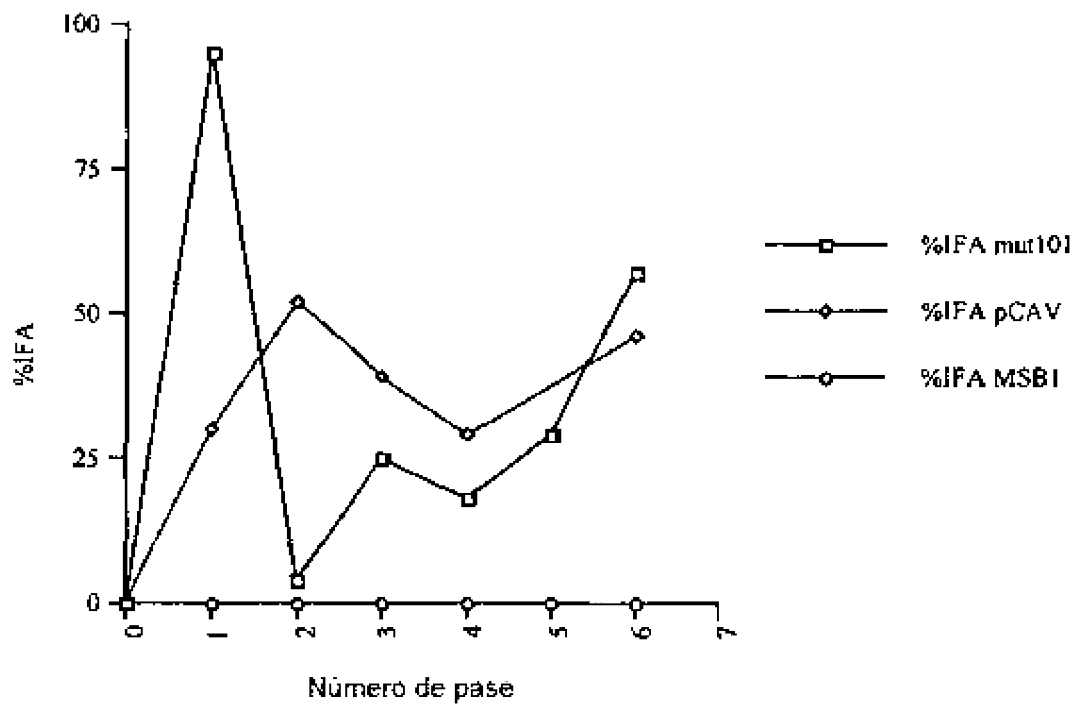


Figura 6: Transfección de mut H 103 Y en células MSB1

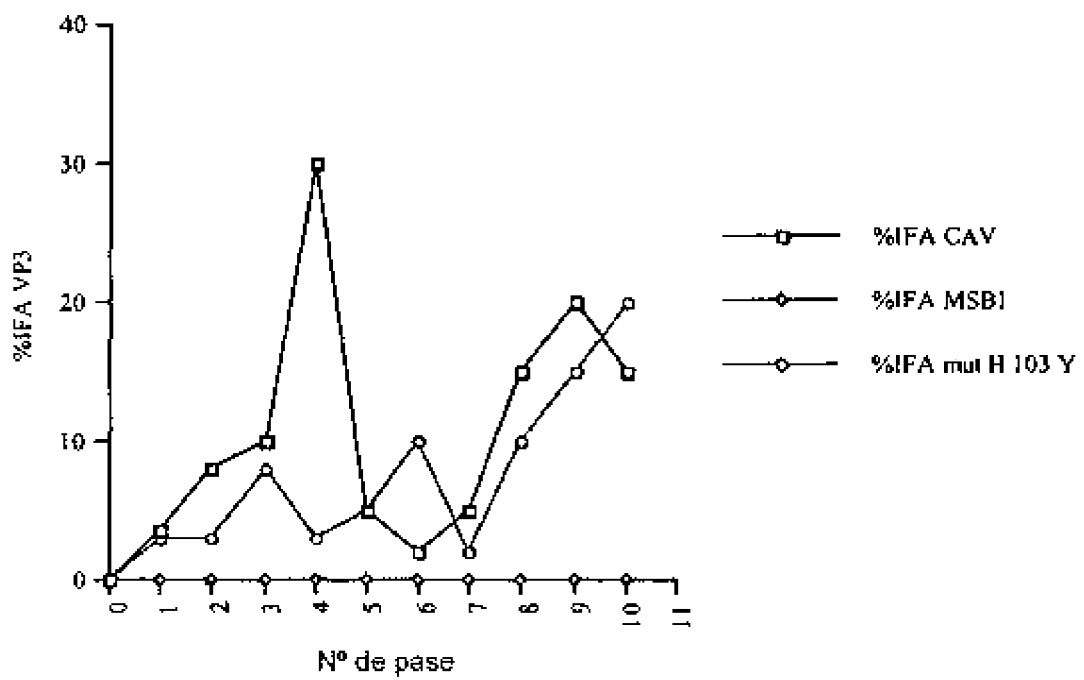


Figura 7: Transfección de mut R 129 G en células MSB1

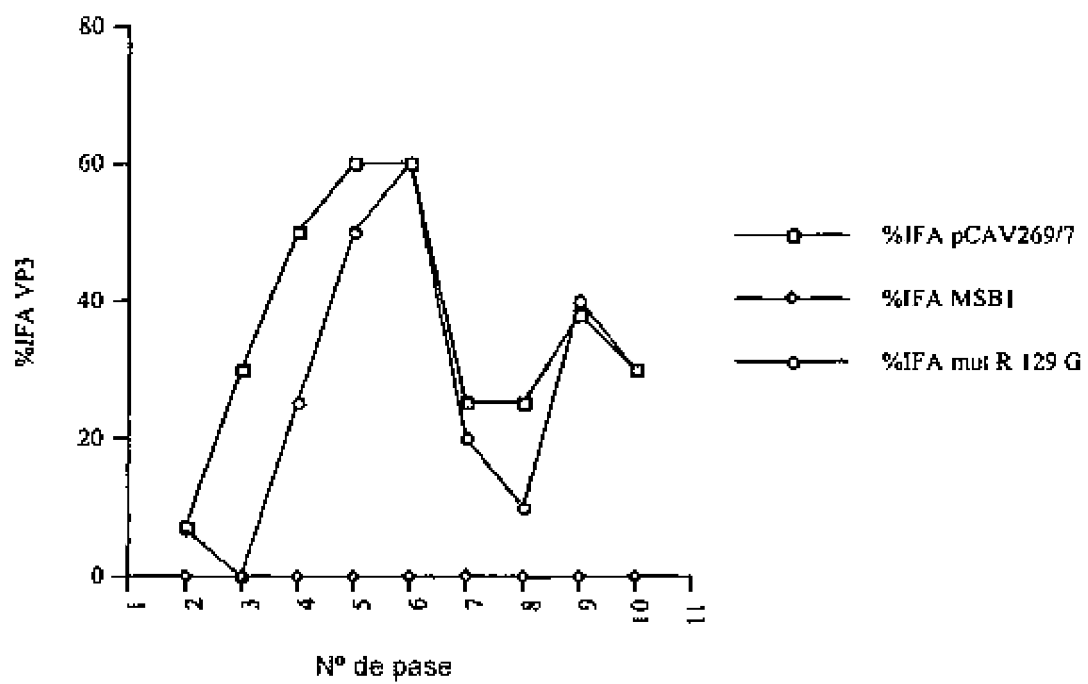


Figura 8: Transfección de mut N 131 P en células MSB1

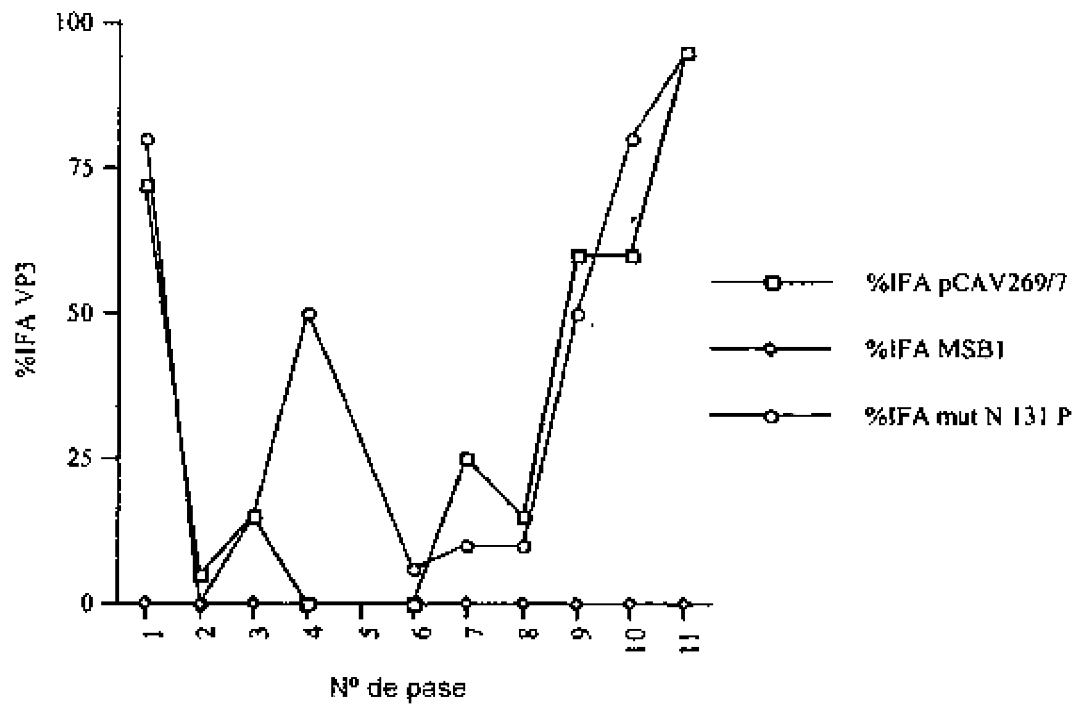


Figura 9: Transfección de mut R/K/K150/151/152G/A/A en células MSB1

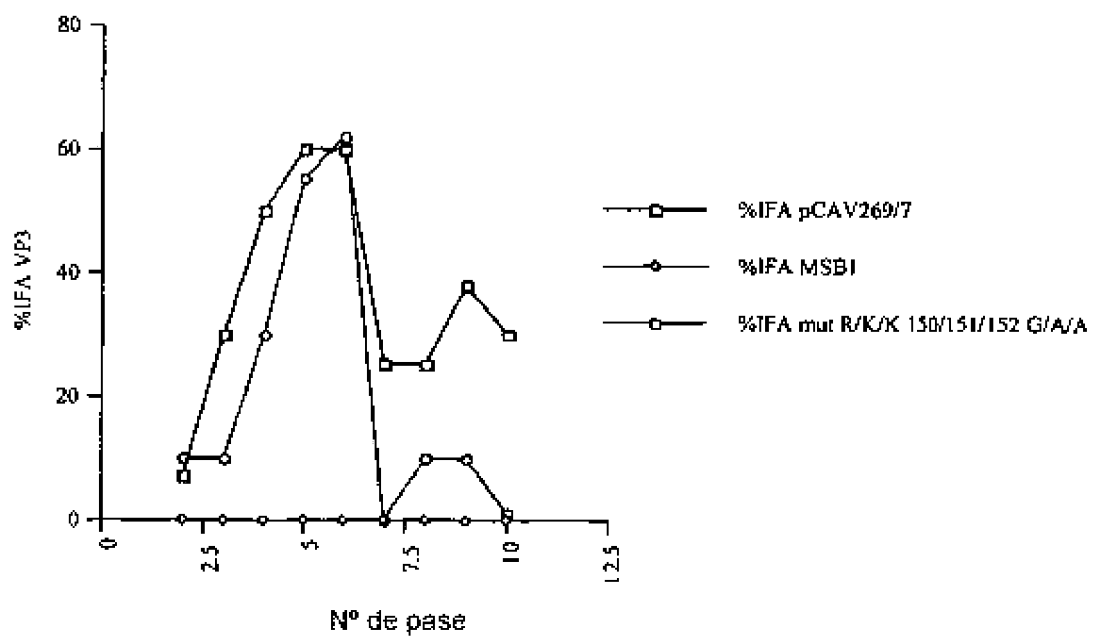


Figura 10: Transfección de mut D/E 161/162 G/G en células MSB1

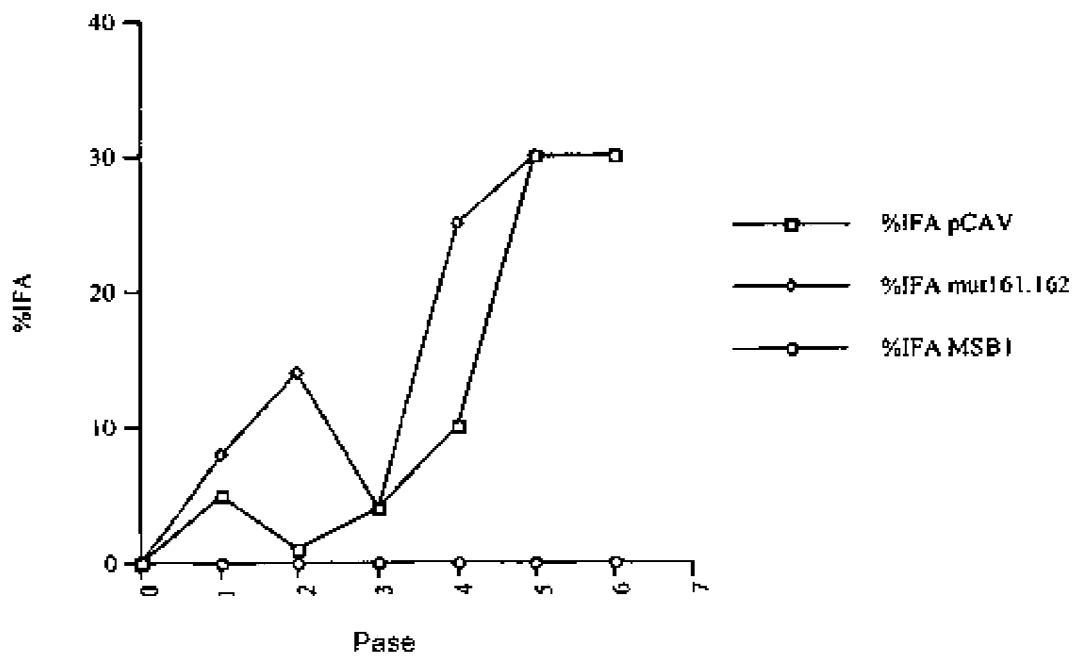


Figura 11: Transfección de mut L 163 P en células MSB1

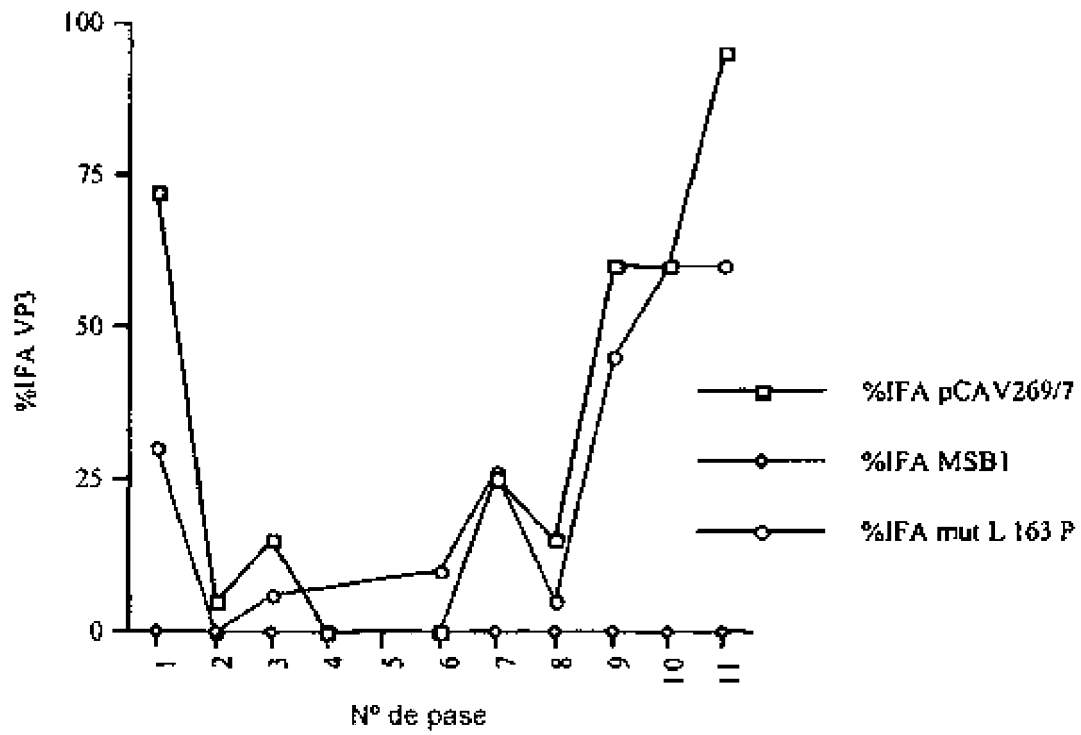
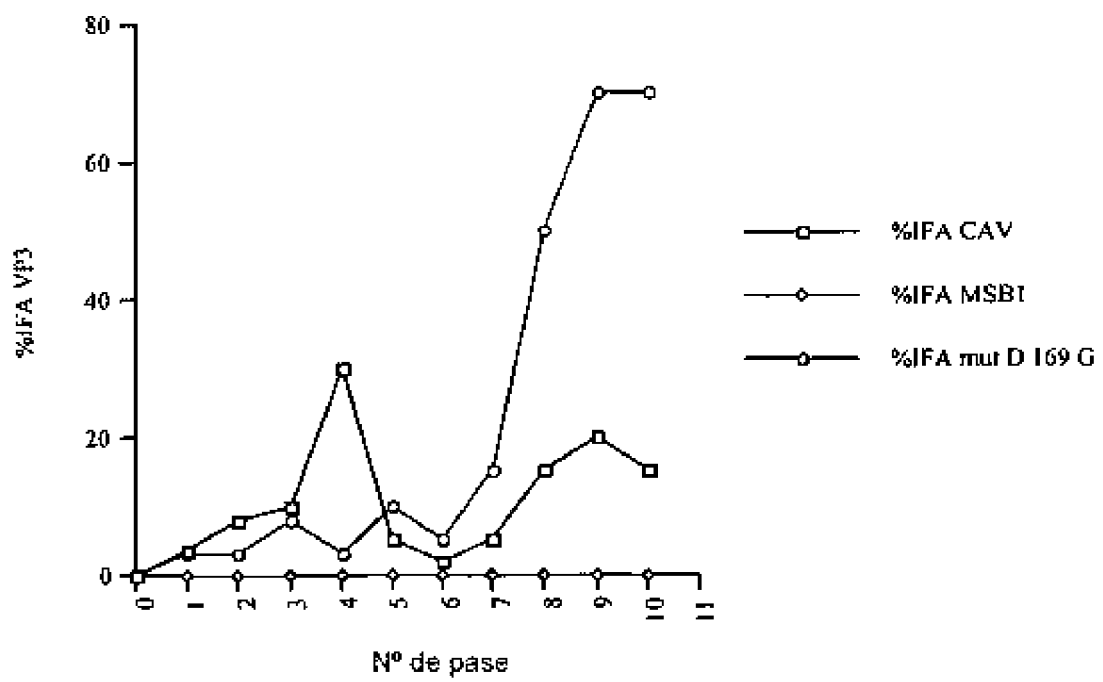


Figura 12: Transfección de mut D 169 G en células MSB1



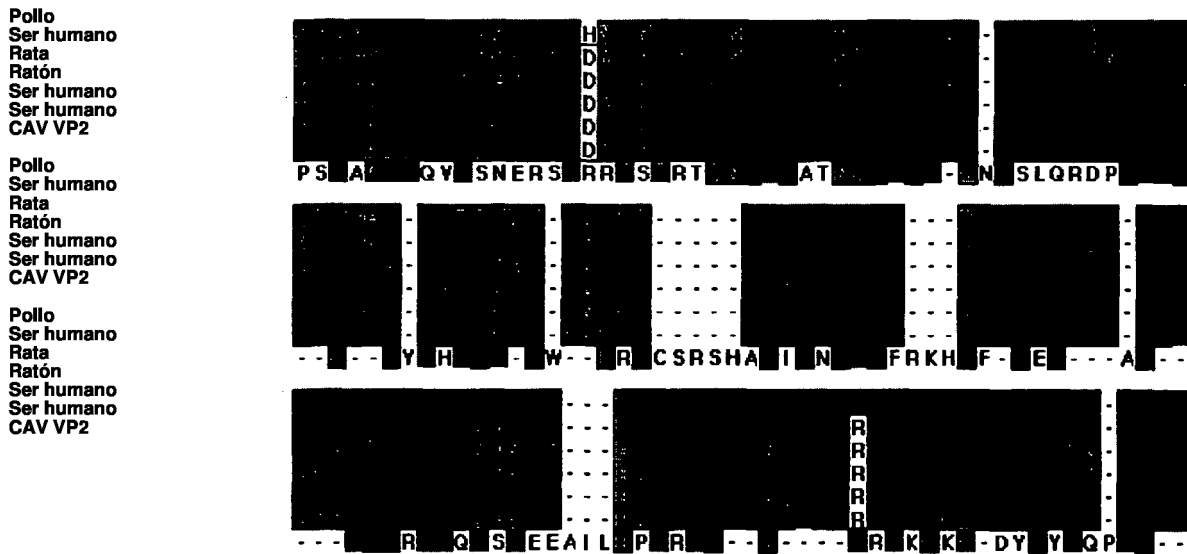


Figura 13. Homólogos de R-PTPasa alineados con la secuencia de aminoácidos de la VP2 del VAP usando el software ECLUSTALW (WebANGIS) y mostrados gráficamente usando el software Seqvu (Garvin Institute). Fila 1; proteína tirosina fosfatasa alfa de pollo (Z32749), residuos 302-306, puntuación de homología 30%. Fila 2: R-PTPasa alfa humana (PP18433), residuos 301-353, puntuación de homología 32%. Fila 3: R-PTPasa alfa de rata (Q03348), residuos 295-347, puntuación de homología 32%. Fila 4: R-PTPasa alfa de ratón (P18052), residuos 328-380, puntuación de homología 32%. Fila 5: R-PTPasa alfa humana (17011300A). Fila 6: proteína tirosina fosfatasa de placenta humana (CAA38065), residuos 292-345, puntuación de homología 32%. Fila 7: VP2 de VAP.

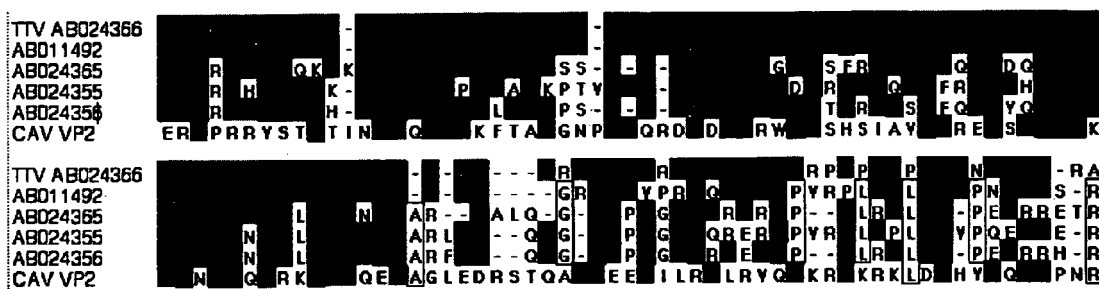


Figura 14. Alineación de la secuencia de aminoácidos de la VP2 del AVP y la secuencia SANBAN TTV usando el software ECLUSTALW (WebANGIS) y mostradas gráficamente usando el software Seqvu (Garvin Institute). Se muestran los números de registro en Genbank para los virus TT.

Figura 15. electroforesis de las proteínas de fusión con glutatión-S-transferasa en un gel de poliacrilamida al 12,5% y visualización con tinción con azul de Coomassie. Calle 1, patrones de peso molecular de amplio rango (Biorad); calle 2, 2,6 μg de proteína de fusión VP2 del VAP-GST; calle 3, 3,0 μg de GST.

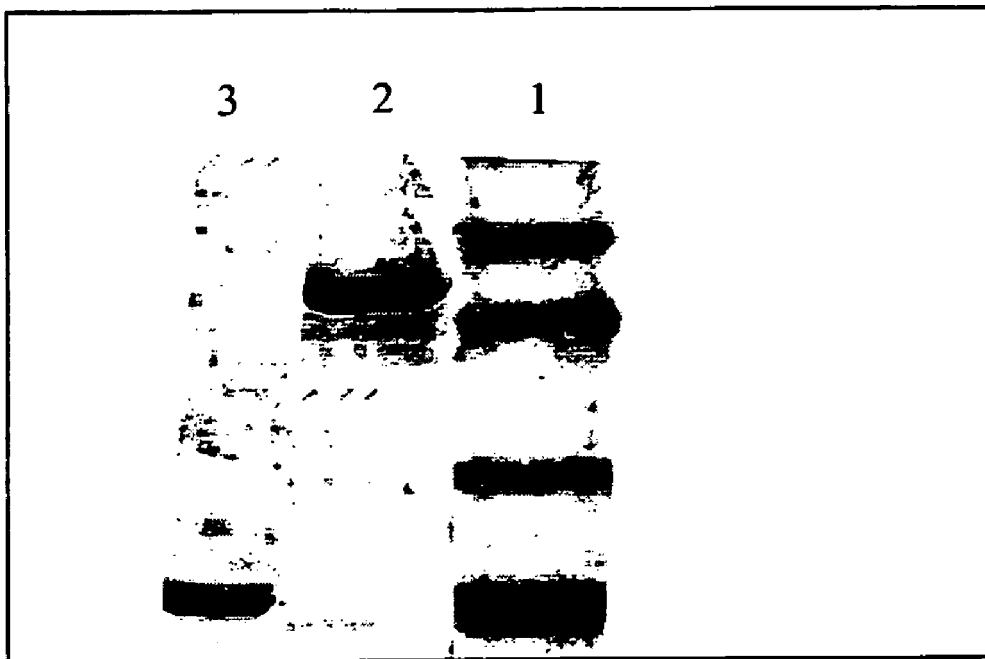


Figura 16. Transferencia de tipo western con sonda de antisuero policlonal de ratón producido contra la región COOH-terminal de la VP2. Calle 1, patrones de peso molecular de amplio rango (Biorad); calle 2, 3,0 μg de GST; calle 3, 2,6 μg de proteína de fusión VP2 del VAP-GST.

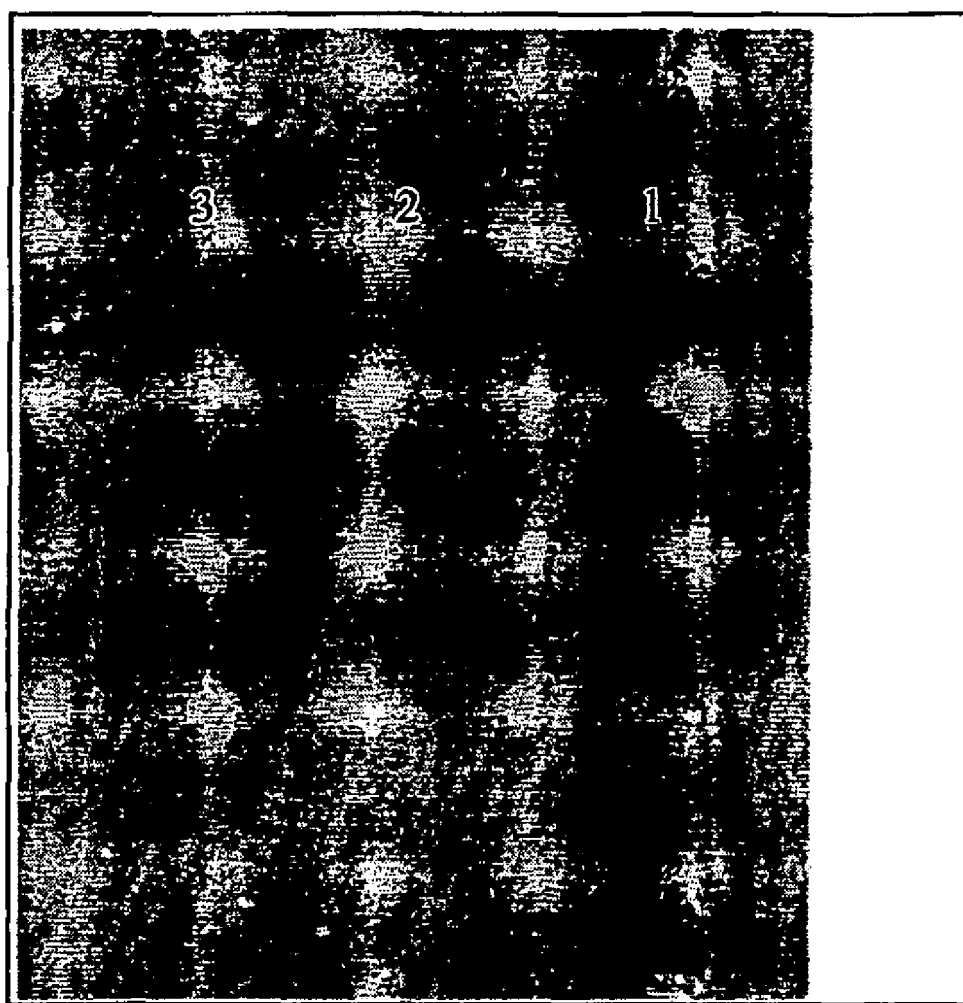


Figura 17- Transferencia de tipo western con sonda de antisuero policlonal de conejo producido contra GST. Calle 1, patrones de peso molecular; calle 2, 3,0 μg de GST; calle 3, 2,6 μg de proteína de fusión VP2 del virus de la anemia del pollo-GST.



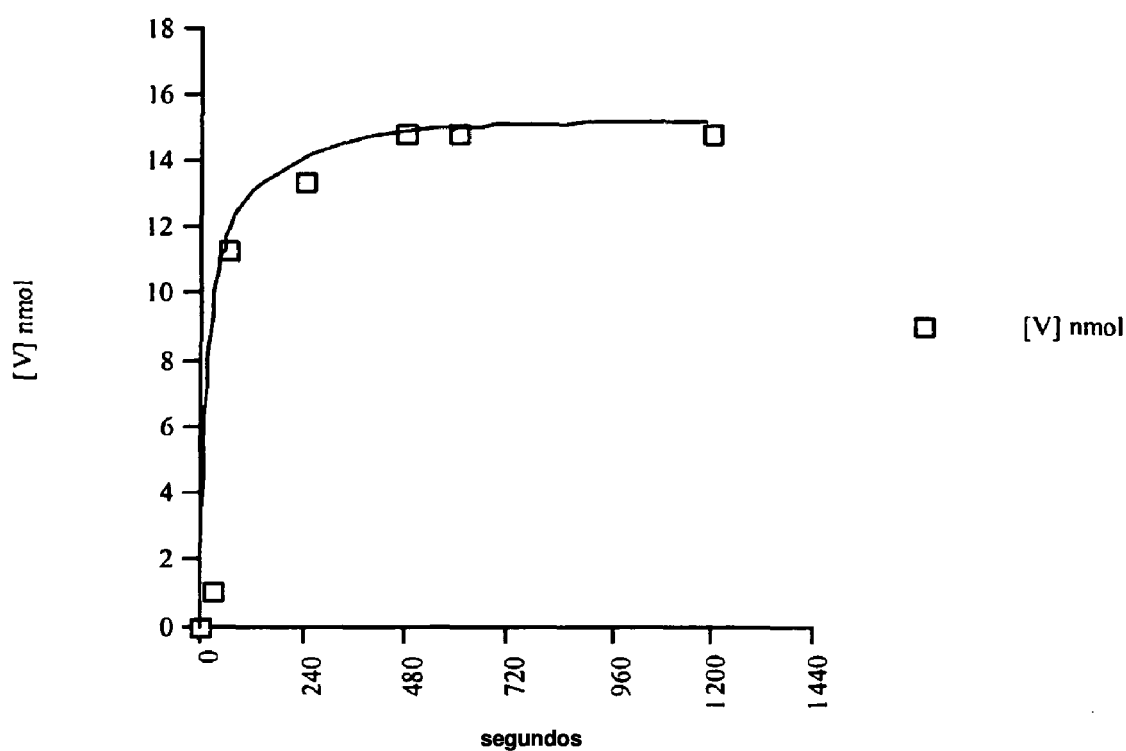


Figura 18. Estudio de la evolución en el tiempo de la liberación de fosfato de ENDY(Pi)NASL catalizada mediante VP2-GST o una preparación control de GST. Las reacciones se llevaron a cabo con 15 nmol de sustrato. La actividad [V] se midió en nmol de fosfato liberados para cada punto de tiempo.

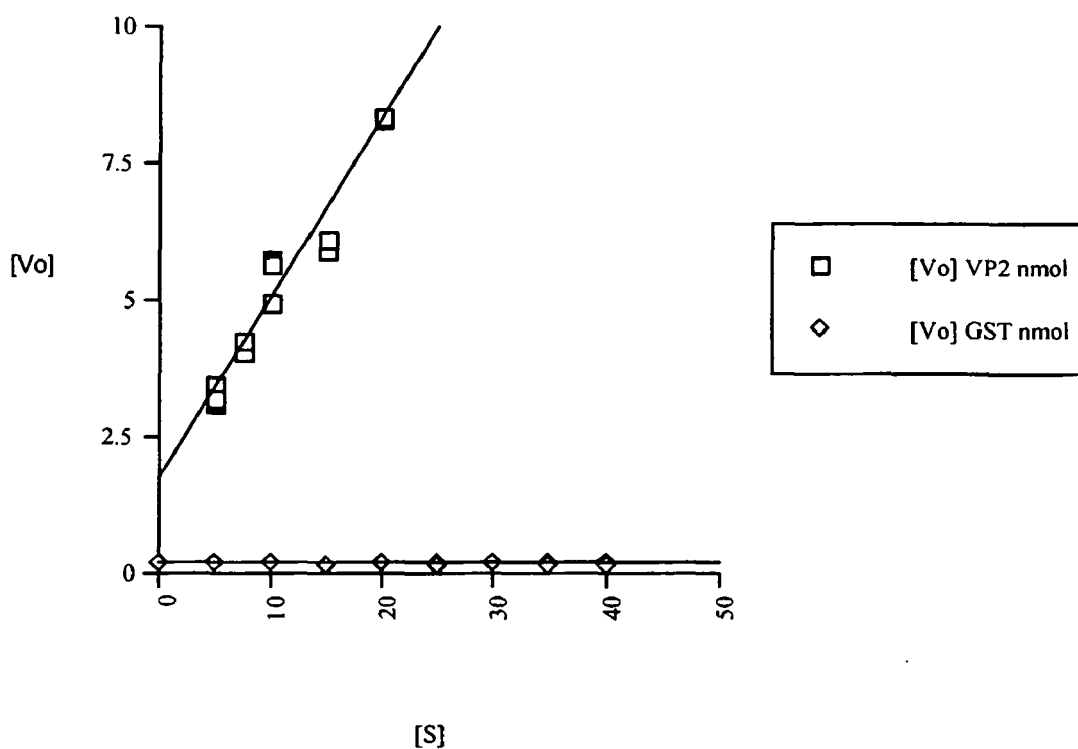


Figura 19. Actividad PTPasa de VP2-GST y proteínas control GST en el ensayo de PTP. Las reacciones se llevaron a cabo con 10 nmol de sustrato y durante 1 minuto. La actividad inicial $[V_0]$ se midió en nmol de sustrato liberado para cada valor del sustrato. El error estándar de la media para cada valor de sustrato analizado fue inferior a 0,101.

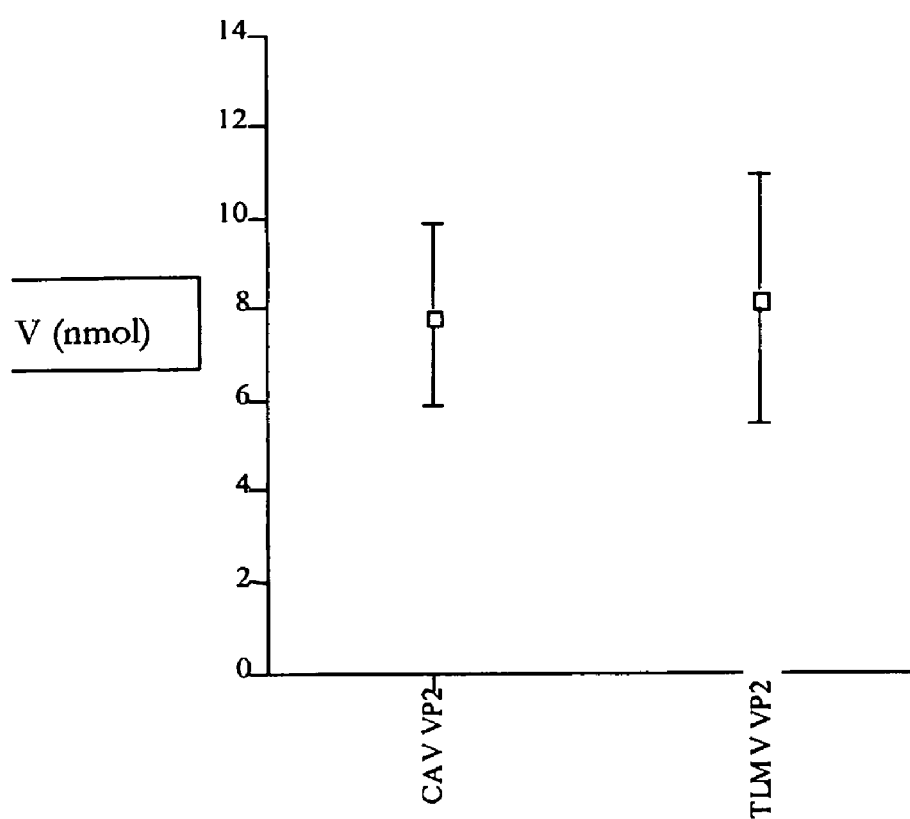


Figura 20. Actividad PTPasa de la VP2 del TLMV con respecto a la actividad de la VP2 del van.

ES 2 334 646 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> The University of Melbourne
<120> Vacunas de Circovirus
5 <130> KYI:TYD:305017633
<150> PR5674
<151> 2001-06-14
10 <160> 68
<170> PatentIn versión 3.1
<210> 1
<211> 2286
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
20 <223> Secuencia de ADN del pCAU269/7
<400> 1

25 cccccttga accccccctt gggggggatt cccccccaga ccccccttt ataaagcact 60
caataaacgc agctaattcg ttcaccgcac aatcgcttcc cgagtgggta ctattccatc 120
accattctag cctgtacaca aaaagtaaag atggacgaat cgctcgactt cgctcgcgat 180
tcgtcgaagg cggggggccg gaggcccccc ggtggcccc tccaaggagt ggagcgtgta 240
30 caggggggta cgtcatccgt acagggggggg tacgtcacia gaaggcggtc ccgtacaggg 300
gggtacgtaa catgttcagg ggggtacgtc acaaccaatc aggagctgcc acgttgcgaa 360
agtgacgttt cgaaaatggg cggcgcaaga ctccctatat attgcgcgca cataccggtc 420
ggcagtaggt atacgcaagg cggtcggggt ggatgcacgg aaacggcgga caaccggccg 480
35 ctgggggagc tgaatcggcg cttagccgag aggggcaacc tgggcccagc ggagccgcgc 540
aggggcaagt aatttcaaat gaacgctcac caagaagata ctccaccagg accatcaacg 600
gtgttcaggc caccaacaag ttcacggccg ttggaaaccc ctactgcag agagatccgg 660
40 attggtatcg ctggaattac agtactctc tgcctgtgtg gctgcgcaa tgctcgcgtt 720
cccacgctaa gatctgcaac tgcggacaat tcagaaaaca ctggtttcaa gaatgtgccg 780
gacttgagga ccgatcaacc caagcctccc tcgaagaagc gatcctgcga cccctccgag 840
tacagggtaa gcgagctaaa agaaagcttg attaccacta ctcccagccg accccgaacc 900
45 gcaagaaggt gtataagact gtaagatggc aagacgagct cgcagaccga gaggccgatt 960
ttacgccttc agaagaggac ggtggacca cctcaagcga cttcgacgaa gatataaatt 1020
tcgacatcgg aggagacagc ggtatcgtag acgagctttt aggaaggcct ttacaaccc 1080
ccgccccggt acgtatagtg tgaggctgcc aaacccccag tccacgatga ctatccgctt 1140
50 ccaaggagtc atctttctca ccgaaggact cattctacct aaaaacagca cagctggggg 1200
ctatcgggac cacatgtacg gggcgagagt cgccaagatc tcagtgaacc tgaaagagtt 1260
cctcctagca tcaatgaacc tgacatacgt gagcaagata ggaggcccca tcgccggtga 1320
55 gttgattgcg gacgggtcta aatcgcaagc cgcggagaac tggccaaatt gctggctgcc 1380
gctagataat aacgtgccct ccgctacacc atctgcatgg tggagatggg cttaaatgat 1440
gatgcagcca acggactcct gccggtttt taatcccct aagcaaatga ccctgcaaga 1500
60 catgggtcgg atgtttgggg gctggcatct gttccgacac attgaaacc gctttcagct 1560
ccttgccact aagaatgagg gatccttcag ccccgtggcg agtcttctct cccagggaga 1620
gtacctcagc cgccgcgacg atgttaagta cagcagcgac caccagaacc ggtggcgaaa 1680
aggcgagcaa ccgatgacgg gggggattgc ttacgcgacc ggtaaaatga gactcgacga 1740
65 gcaacaatac cctgctatgc ccccggaccc ccgatcacc accactacca ctgcgcaagg 1800
cacgcaagtc cgctgcatga atagcacgca agcttgggtg tcgtgggaca catatatgag 1860

ES 2 334 646 T3

ctttgcaaca ctcacagcac tcggtgctca atggtctttt cctccagggc aacgttcagt 1920
 ttctagacgg tccttcaacc atcacaaggc cegaggagcc ggggaccca aggccagag 1980
 5 gtggcacacg ctggtgccgc tcggcacaga gaccataacc gacagctaca tgagagcacc 2040
 ggcatcagag ctggacacga atttctcac gctttacgta gcgcaaggca ctaataaatc 2100
 gcagcaatac aagttcggca cagcaacata cgcgctaaag gaaccctgaa tgaagagcga 2160
 10 ttcattgggca gtggtgcgcg tccagtccgt ctggcaactg ggtaacaggc aaaggccata 2220
 cccgtgggac gttaactggg ccaacagcac catgtactgg gggtcgcagc cctgaaaagg 2280
 gggggg 2286

15 <210> 2
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia proteica de VP2 del pCAU269/7

<400> 2
 25 Met His Gly Asn Gly Gly Gln Pro Ala Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ala
 1 5 10 15
 30 Leu Ser Arg Glu Gly Gln Pro Gly Pro Ser Gly Ala Ala Gln Gly Gln
 20 25 30
 35 Val Ile Ser Asn Glu Arg Ser Pro Arg Arg Tyr Ser Thr Arg Thr Ile
 35 40 45
 40 Asn Gly Val Gln Ala Thr Asn Lys Phe Thr Ala Val Gly Asn Pro Ser
 50 55 60
 45 Leu Gln Arg Asp Pro Asp Trp Tyr Arg Trp Asn Tyr Ser His Ser Ile
 65 70 75 80
 50 Ala Val Trp Leu Arg Glu Cys Ser Arg Ser His Ala Lys Ile Cys Asn
 85 90 95
 55 Cys Gly Gln Phe Arg Lys His Trp Phe Gln Glu Cys Ala Gly Leu Glu
 100 105 110
 60 Asp Arg Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ile Leu Arg Pro Leu
 115 120 125
 65 Arg Val Gln Gly Lys Arg Ala Lys Arg Lys Leu Asp Tyr His Tyr Ser
 130 135 140
 Gln Pro Thr Pro Asn Arg Lys Lys Val Tyr Lys Thr Val Arg Trp Gln
 145 150 155 160
 Asp Glu Leu Ala Asp Arg Glu Ala Asp Phe Thr Pro Ser Glu Glu Asp

ES 2 334 646 T3

165 170 175

Gly Gly Thr Thr Ser Ser Asp Phe Asp Glu Asp Ile Asn Phe Asp Ile
180 185 190

Gly Gly Asp Ser Gly Ile Val Asp Glu Leu Leu Gly Arg Pro Phe Thr
195 200 205

Thr Pro Ala Pro Val Arg Ile Val
210 215

- 15 <210> 3
- <211> 2286
- <212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> mut C87R del genoma del virus de la anemia de pollo
- 25 <400> 3

cccccttga accccccct gggggggatt cccccccaga ccccccttt ataaagcact 60
caataaacgc agctaattcg ttcaccgcac aatcgcttc cgagtggta ctattccatc 120
30 accattctag cctgtacaca aaaagtaaag atggacgaat cgctcgactt cgctcgcgat 180
tcgtcgaagg cggggggccg gaggccccc ggtggccccc tccaaggagt ggagcgtgta 240
caggggggta cgtcatccgt acaggggggg tacgtcacia gaaggcgttc ccgtacaggg 300
gggtacgtaa catgttcagg ggggtacgtc acaaccaatc aggagctgcc acgttgcgaa 360
35 agtgacgttt cgaatatggg cggcgcaaga ctccctatat attgcgcgca cataccggtc 420
ggcagtaggt atacgcaagg cgttccgggt ggatgcacgg aaacggcgga caaccggccg 480
ctgggggcag tgaatcggcg cttagccgag aggggcaacc tgggccagc ggagccgcgc 540
40 aggggcaagt aatttcaaat gaacgtcac caagaagata ctccaccagg accatcaacg 600
gtgttcaggc caccacaag ttcacggccg ttggaaaccc ctactgcag agagatccgg 660
attggtatcg ctggaattac agtactcta tcgtgtgtg gctgcgcaa cgctcgcgtt 720
cccacgtaa galctgcaac tgcggacaat tcagaaaaca ctggttcaa gaatgtgccg 780
45 gacttgagga ccgatcaacc caagcctccc lcgaagaagc gatcctgcga cccctccgag 840
tacagggtaa gcgagctaaa agaaagcttg attaccacta ctccagccg accccgaacc 900
gcaagaaggt gtataagact gtaagatggc aagacgagct cgcagaccga gaggccgatt 960
50 ttacgcctc agaagaggac ggtggacca cctcaagcga cttcgacgaa gatataaatt 1020
tcgacatcgg aggagacagc ggtatcgtag acgagctttt aggaaggcct tcacaaccc 1080
ccgccccggt acgtatagtg tgaggctgcc aaacccccag tccacgatga ctatccgctt 1140
ccaaggagtc atctttctca ccgaaggact cactctacct aaaaacagca cagctggggg 1200
55 ctatcgggac cacatgtacg gggcgagagt cgccaagatc tcagtgaacc tgaagagtt 1260
cctcctagca tcaatgaacc tgacatacgt gagcaagata ggaggccca tcgccggtga 1320
gttgattgcg gacgggtcta aatcgaagc cgcggagaac tggccaaatt gctggctgcc 1380
60 gctagataat aacgtgcct cgcctacacc atctgatgg tggagatggg cttaatat 1440
gatgcagcca acggactcct gccggtttt taatccct aagcaaatga cctgcaaga 1500
catgggtcgg atggtgggg gctggcatct gttccgacac attgaaaccc gcttcagct 1560
ccttgccact aagaatgagg gatcctcag ccccggtggc agtcttctc cccagggaga 1620
65 gtacctcag cggcgcgagc atgtaagta cagcagcgac caccagaacc ggtggcgaaa 1680
aggcgagcaa ccgatgacgg gggggattgc ttacgcgacc ggtaaaatga gactcgacga 1740

ES 2 334 646 T3

gcaacaatac cctgctatgc ccccggaccc cccgatcatc accactacca ctgcgcaagg 1800
 cacgcaagtc cgtgcatga atagcacgca agcttggtgg tcgtgggaca catatatgag 1860
 cttgcaaca ctcacagcac tcggtgctca atggtctttt cctccagggc aacgttcagt 1920
 5 tcttagacgg tcttcaacc atcacaaggc ccgaggagcc ggggaccca agggccagag 1980
 gtggcacacg ctggtgccgc tcggcacaga gaccataacc gacagctaca tgagagcacc 2040
 ggcacagag ctggacacga atttctcac gctttacgta gcgcaaggca ctaataaatc 2100
 10 gcagcaatac aagttcggca cagcaacata cgcgctaaag gaacccgtaa tgaagagcga 2160
 ttcatgggca gtggtgcgcg tccagtcctg ctggcaactg ggtaacaggc aaaggccata 2220
 cccgtgggac gttactggg ccaacagcac catgtactgg gggtcgcagc cctgaaaagg 2280
 15 gggggg 2286

<210> 4

<211> 216

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> mut C 86 R de la VP2 del virus de la anemia del pollo

<400> 4

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

ES 2 334 646 T3

Asp Glu Leu Ala Asp Arg Glu Ala Asp Phe Thr Pro Ser Glu Glu Asp
165 170 175

5 Gly Gly Thr Thr Ser Ser Asp Phe Asp Glu Asp Ile Asn Phe Asp Ile
180 185 190

10 Gly Gly Asp Ser Gly Ile Val Asp Glu Leu Leu Gly Arg Pro Phe Thr
195 200 205

15 Thr Pro Ala Pro Val Arg Ile Val
210 215

<210>

<211> 2286

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> mut C 95 S del genoma del virus de la anemia del pollo

25

<400> 5

cccccttga accccccct gggggggatt ccccccaaga ccccccttt ataaagcact 60
caataaacgc agctaattcg ttcaccgcac aategctttc cgagtggta ctattccatc 120
30 accattctag cctgtacaca aaaagtaaag atggacgaat cgctcgactt cgctcgcgat 180
tcgtcgaagg cggggggccg gaggcccc ggtggcccc tccaaggagt ggagcgtgta 240
caggggggta cgtcatccgt acaggggggg tacgtcaca gaaggcgttc ccgtacaggg 300
35 ggttacgtaa catgttcagg ggggtacgtc acaaccaatc aggagctgcc acgttgcgaa 360
agtgcgttt cgaaaatggg cggcgcaaga ctccctatat attgcgcgca cataccggtc 420
ggcagtaggt atacgcaagg cggtcgggtt ggatgcacgg aaacggcgga caaccggccg 480
ctgggggcag tgaatcggcg cttagccgag aggggcaacc tgggccagc ggagccgcgc 540
40 aggggcaagt aattcaaat gaacgctcac caagaagata ctccaccagg accatcaacg 600
gtttcaggc caccaacaag ttcacggccg ttggaaccc ctactgcag agagatccgg 660
attggtatcg ctggaattac agtactcta tcgctgtgtg gctgcgcgaa tgctcgcgtt 720
45 cccacgctaa gatcagcaac tgcggacaat tcagaaaaca ctggttcaa gaatgtgccg 780
gacttgagga ccgatcaacc caagcctccc tcgaagaagc gatcctgcga cccctccgag 840
tacagggtaa gcgagctaaa agaaagcttg attaccacta ctcccagccg accccgaacc 900
gcaagaaggt gtataagact gtaagatggc aagacgagct cgcagaccga gaggccgatt 960
50 ttacgccttc agaagaggac ggtggacca cctcaagcga cttcgacgaa gatataaatt 1020
tcgacatcgg aggagacagc ggtatcgtag acgagctttt aggaaggcct tcacaaccc 1080
ccgccccggt acgtatagtg tgaggctgcc aaacccccag tccacgatga ctatccgctt 1140
55 ccaaggagtc atcttttca ccgaaggact cattctacct aaaaacagca cagctggggg 1200
ctatcggac cacatgtacg gggcgagagt cgccaagatc tcagtgaacc tgaagagtt 1260
cctcctagca tcaatgaacc tgacatacgt gagcaagata ggaggccca tcgccggtga 1320
gttgaltgag gacgggtcta aatcgaagc cgcggagaac tggccaaatt gctggctgcc 1380
60 gctagataat aacgtgccct ccgtacacc atctgatgg tggagatggg cttaaatgat 1440
gatgcagcca acggactcct gccggtttt taatcacct aagcaaatga cctgcaaga 1500
catgggtcgg atgttgggg gctggcatct gttccgacac attgaaaccc gcttccagct 1560
65 ccttgccact aagaatgagg gatcctcag ccccgctggcg agtcttctct cccagggaga 1620
gtacctcacg cggcgcgacg atgtaagta cagcagcgcac caccagaacc ggtggcgaaa 1680
aggcgagcaa ccgatgacgg gggggattgc ttacgcgacc ggtaaaatga gactcgacga 1740

ES 2 334 646 T3

gcaacaatac cctgctatgc ccccggaccc cccgatcacc accactacca ctgcgcaagg 1800
 cacgcaagtc cgctgcatga atagcacgca agcttggtgg tcgtgggaca catatatgag 1860
 ctttgcaaca ctcacagcac tcggtgctca atggtctttt cctccagggc aacgttcagt 1920
 5 ttctagacgg tcctcaacc atcacaaggc ccgaggagcc ggggacccca agggccagag 1980
 gtggcacacg ctggtgccgc tcggcacaga gaccataacc gacagctaca tgagagcacc 2040
 ggcatcagag ctggacacga atttcttcac gctttacgta gcgcaaggca ctaataaatc 2100
 10 gcagcaatac aagttcggca cagcaacata cgcgctaaag gaaccgtaa tgaagagcga 2160
 ttcattgggca gtggtgcgcg tccagtcctg ctggcaactg ggtaacaggc aaaggccata 2220
 cccgtgggac gtttaactggg ccaacagcac catgtactgg gggtcgcagc cctgaaaagg 2280
 gggggg 2286

15 <210> 6
 <211> 216
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> mut C 95 S de la VP2 del virus de la anemia del pollo

25 <400> 6
Met His Gly Asn Gly Gly Gln Pro Ala Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ala
 1 5 10 15
 30 **Leu Ser Arg Glu Gly Gln Pro Gly Pro Ser Gly Ala Ala Gln Gly Gln**
 20 25 30
 35 **Val Ile Ser Asn Glu Arg Ser Pro Arg Arg Tyr Ser Thr Arg Thr Ile**
 35 40 45
 40 **Asn Gly Val Gln Ala Thr Asn Lys Phe Thr Ala Val Gly Asn Pro Ser**
 50 55 60
 45 **Leu Gln Arg Asp Pro Asp Trp Tyr Arg Trp Asn Tyr Ser His Ser Ile**
 65 70 75 80
 50 **Ala Val Trp Leu Arg Glu Cys Ser Arg Ser His Ala Lys Ile Ser Asn**
 85 90 95
 55 **Cys Gly Gln Phe Arg Lys His Trp Phe Gln Glu Cys Ala Gly Leu Glu**
 100 105 110
 60 **Asp Arg Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ile Leu Arg Pro Leu**
 115 120 125
 65 **Arg Val Gln Gly Lys Arg Ala Lys Arg Lys Leu Asp Tyr His Tyr Ser**
 130 135 140
 65 **Gln Pro Thr Pro Asn Arg Lys Lys Val Tyr Lys Thr Val Arg Trp Gln**
 145 150 155 160

ES 2 334 646 T3

Asp Glu Leu Ala Asp Arg Glu Ala Asp Phe Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 165 170 175

5 Gly Gly Thr Thr Ser Ser Asp Phe Asp Glu Asp Ile Asn Phe Asp Ile
 180 185 190

10 Gly Gly Asp Ser Gly Ile Val Asp Glu Leu Leu Gly Arg Pro Phe Thr
 195 200 205

15 Thr Pro Ala Pro Val Arg Ile Val
 210 215

- 15 <210> 7
- <211> 2286
- <212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> mut C 97 S del genoma del virus de la anemia del pollo
- 25 <400> 7

cccccttga accccccct gggggggatt cccccaga cccccctt ataaagcact 60
 caataaacgc agctaattcg taccgcac aategcttc cgagtggta ctatccatc 120
 30 accattctag cctgtacaca aaaagtaaag atggacgaat cgctcgactt cgctcgcat 180
 tcgtcgaagg cggggggccg gagggcccc ggtggcccc tccaaggagt ggagcgtgta 240
 caggggggta cgctatccgt acaggggggg tacgtcaca gaaggcgtc ccgtacaggg 300
 35 gggtacgtaa catgttcagg ggggtacgtc acaaccaatc aggagctgcc acgttgcgaa 360
 agtgacgtt cgaatggg cggcgcaaga ctccctatat attgcgcgca cataccggtc 420
 ggcagtaggt atacgcaagg cggtcgggt ggatgcacgg aaacggcgga caaccggccg 480
 ctgggggcag tgaatcggcg cttagccgag aggggcaacc tgggccagc ggagccgccc 540
 40 aggggcaagt aattcaaat gaacgctcac caagaagata ctccaccagg accatcaacg 600
 gtgttcaggc caccaacaag ttcacggccg ttggaaacct ctactgcag agagatccgg 660
 attggtatcg ctggaattac agtcaacta tcgctgtgtg gctgcgcaa tgctcgctt 720
 45 cccacgctaa gatctgcaac agcggacaat tcagaaaaca ctggttcaa gaatgtgccg 780
 gacttgagga ccgatcaacc caagcctccc tcgaagaagc gatcctgcga cccctccgag 840
 tacagggtaa gcgagctaaa agaaagcttg attaccacta ctcccagccg accccgaacc 900
 gcaagaaggt gtataagact gtaagatggc aagacgagct cgagaccga gaggccgatt 960
 50 ttacgccttc agaagaggac ggtggcacca cctcaagcga cttcgacgaa gatataaatt 1020
 tcgacatcgg aggagacagc ggtatcgtag acgagctttt aggaaggcct tcacaacct 1080
 ccgccccggt acgtatagtg tgaggctgcc aaacccccag tccacgatga ctatccgctt 1140
 55 ccaaggagtc atctttctca ccgaaggact cattctacct aaaacagca cagctggggg 1200
 ctatgcggac cacatgtacg gggcgagagt cgccaagatc tcagtgaacc tgaagagatt 1260
 cctctagca tcaatgaacc tgacatacgt gagcaagata ggaggcccca tcgccggtga 1320
 60 gttgattgcg gacgggtcta aatcgcaagc cgcggagaac tggccaaatt gctggctgcc 1380
 gctagataat aacgtgccct ccgctacacc atctgcatgg tggagatggg cttaaatgat 1440
 gatgcagcca acgactcct gccggtttt taatcacct aagcaaatga ccctgcaaga 1500
 65 catgggtcgg atgtttgggg gctggcatct gtccgacac attgaaacct gctttcagct 1560
 ccttgccact aagaatgagg gatcctcag ccccggtggcg agtcttctct cccagggaga 1620

ES 2 334 646 T3

gtacctcag cgccgcgacg atgtaagta cagcagcgac caccagaacc ggtggcgaaa 1680
 aggcgagcaa ccgatgacgg gggggattgc ttacgcgacc ggtaaatga gactcgacga 1740
 5 gcaacaatac cctgctatgc ccccggaacc cccgatcacc accactacca ctgcgcaagg 1800
 cacgcaagtc cgctgcatga atagcacgca agcttgggtg tcgtgggaca catatatgag 1860
 ctttgaaca ctacagcac tcggtgctca atggtcttt cctccagggc aacgttcagt 1920
 ttctagacgg tcctcaacc atcacaaggc cggaggagcc ggggacccca agggccagag 1980
 10 gtggcacacg ctgggtccgc tcggcacaga gaccataacc gacagctaca tgagagcacc 2040
 ggcacagag ctggacacga attcttcac gctttacgta gcgcaaggca ctaataaatc 2100
 gcagcaatac aagttcggca cagcaacata cgcgctaaag gaaccgtaa tgaagagcga 2160
 15 ttcattgggca gtgggtgcgcg tccagtccgt ctggcaactg ggtaacaggc aaaggccata 2220
 cccgtgggac gtaactggg ccaacagcac catgtactgg gggtcgcagc cctgaaaagg 2280
 gggggg 2286

20 <210> 8

<211> 216

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mut C 97 S de la VP2 de la secuencia del virus de la anemia del pollo

30 <400> 8

Met His Gly Asn Gly Gly Gln Pro Ala Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ala
 1 5 10 15

35 **Leu Ser Arg Glu Gly Gln Pro Gly Pro Ser Gly Ala Ala Gln Gly Gln**
 20 25 30

40 **Val Ile Ser Asn Glu Arg Ser Pro Arg Arg Tyr Ser Thr Arg Thr Ile**
 35 40 45

45 **Asn Gly Val Gln Ala Thr Asn Lys Phe Thr Ala Val Gly Asn Pro Ser**
 50 55 60

50 **Leu Gln Arg Asp Pro Asp Trp Tyr Arg Trp Asn Tyr Ser His Ser Ile**
 65 70 75 80

55 **Ala Val Trp Leu Arg Glu Cys Ser Arg Ser His Ala Lys Ile Cys Asn**
 85 90 95

60 **Ser Gly Gln Phe Arg Lys His Trp Phe Gln Glu Cys Ala Gly Leu Glu**
 100 105 110

65 **Asp Arg Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ile Leu Arg Pro Leu**
 115 120 125

Arg Val Gln Gly Lys Arg Ala Lys Arg Lys Leu Asp Tyr His Tyr Ser
 130 135 140

ES 2 334 646 T3

Gln Pro Thr Pro Asn Arg Lys Lys Val Tyr Lys Thr Val Arg Trp Gln
 145 150 155 160

Asp Glu Leu Ala Asp Arg Glu Ala Asp Phe Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 165 170 175

Gly Gly Thr Thr Ser Ser Asp Phe Asp Glu Asp Ile Asn Phe Asp Ile
 180 185 190

Gly Gly Asp Ser Gly Ile Val Asp Glu Leu Leu Gly Arg Pro Phe Thr
 195 200 205

Thr Pro Ala Pro Val Arg Ile Val
 210 215

- 20 <210> 9
- <211> 2286
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> mut R 101 G del genoma del virus de la anemia del pollo
- 30 <400> 9

```

cccccttga accccccct gggggggatt cccccccaga ccccccttt ataaagcact   60
caataaacgc agctaattcg ttcaccgcac aatcgcttc cgagtggta ctattccatc   120
accattctag cctgtacaca aaaagtaaag atggacgaat cgctcgactt cgctcgcgat   180
tcgtcgaagg cggggggccg gaggccccc ggtggcccc tccaaggagt ggagcgtgta   240
caggggggta cgctatccgt acaggggggg tacgtcacia gaagcgttc ccgtacaggg   300
gggtacgtaa catgttcagg ggggtacgtc acaaccaatc aggagctgcc acgttgcgaa   360
agtgacgttt cgaaaatggg cggcgcgaaga ctccctatat attgcgcgca cataccggtc   420
ggcagtaggt atacgcaagg cggctccggg ggatgcacgg aaacggcgga caaccggccg   480
ctgggggcag tgaatcggcg cttagccgag aggggcaacc tgggccagc ggagccgcgc   540
aggggcaagt aattcaaat gaacgctcac caagaagata ctccaccagg accatcaacg   600
gtgttcaggc caccaacaag ttcacggccg ttggaaacct ctactgcag agagatccgg   660
attggtatcg ctggaattac agtcaacta tcgtgtgtg gctgcgcgaa tgctcgcgtt   720
cccacgctaa gatctgcaac tgcggacaat tcggaaaaca ctggttcaa gaatgtgccg   780
gacttgagga ccgatcaacc caagcctccc tcgaagaagc gatcctgcga cccctccgag   840
tacagggtaa gcgagctaaa agaaagcttg attaccacta ctcccagccg accccgaacc   900
gcaagaaggt gtataagact gtaagatggc aagacgagct cgcagaccga gaggccgatt   960
ttacgccttc agaagaggac ggtggcacca cctcaagcga cttcgacgaa gatataaatt  1020
tcgacatcgg aggagacagc ggtatcgtag acgagctttt aggaaggcct tcacaacct  1080
ccgccccggt acgtatagtg tgaggctgcc aaacccccag tccacgatga ctatccgctt  1140
ccaaggagtc atctttctca ccgaaggact cattctacct aaaaacagca cagctggggg  1200
ctatgcggac cacatgtacg gggcgagagt cgccaagatc tcagtgaacc tgaagagtt  1260
cctctagca tcaatgaacc tgacatacgt gagcaagata ggaggcccca tcgccggtga  1320
gttgattgcg gacgggtcta aatcgcaagc cgcggagaac tggccaaatt gctggctgcc  1380
gctagataat aacgtgccct ccgctacacc atctgcatgg tggagatggg cttaatatg  1440
    
```

ES 2 334 646 T3

gatgcagcca acggactcct gccggtttt taatcacct aagcaaatga ccctgcaaga 1500
 catgggtcgg atgtttgggg gctggcatct gtccgacac attgaaacc gtttcagct 1560
 5 cttgccact aagaatgagg gatcctcag ccccgtagcg agtcttctct cccagggaga 1620
 gtacctcag cgccgcgacg atgttaagta cagcagcgac caccagaacc ggtggcgaaa 1680
 aggcgagcaa ccgatgacgg gggggattgc ttacgcgacc ggtaaaatga gactcgacga 1740
 gcaacaatac cctgctatgc ccccgaccc cccgatcacc accactacca ctgcgcaagg 1800
 10 cagcaagtc cgctgcatga atagcagcga agcttggtag tctgtggaca catatatgag 1860
 ctttgaaca ctacagcac tcggtgctca atggtcttt cctccagggc aacgttcagt 1920
 ttctagacgg tcctcaacc atcacaaggc ccgaggagcc ggggacccca agggccagag 1980
 15 gtggcacacg ctggtgccgc tcggcacaga gaccataacc gacagctaca tgagagcacc 2040
 ggcatcagag ctggacacga attcttcac gctttacgta gcgcaaggca ctaataatc 2100
 gcagcaatac aagttcggca cagcaacata cgcgctaaag gaaccgtaa tgaagagcga 2160
 20 ttcattgggca gtggtgcgcg tccagtccgt ctggcaactg ggtaacaggc aaaggccata 2220
 cccgtgggac gttactggg ccaacagcac catgtactgg gggtcgcagc cctgaaaagg 2280
 gggggg 2286

25 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> mut R 101 G de la VP2 del virus de la anemia del pollo

<400> 10
 35 Met His Gly Asn Gly Gly Gln Pro Ala Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ala
 1 5 10 15
 40 Leu Ser Arg Glu Gly Gln Pro Gly Pro Ser Gly Ala Ala Gln Gly Gln
 20 25 30
 45 Val Ile Ser Asn Glu Arg Ser Pro Arg Arg Tyr Ser Thr Arg Thr Ile
 35 40 45
 50 Asn Gly Val Gln Ala Thr Asn Lys Phe Thr Ala Val Gly Asn Pro Ser
 50 55 60
 55 Leu Gln Arg Asp Pro Asp Trp Tyr Arg Trp Asn Tyr Ser His Ser Ile
 65 70 75 80
 60 Ala Val Trp Leu Arg Glu Cys Ser Arg Ser His Ala Lys Ile Cys Asn
 85 90 95
 65 Cys Gly Gln Phe Gly Lys His Trp Phe Gln Glu Cys Ala Gly Leu Glu
 100 105 110
 Asp Arg Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ile Leu Arg Pro Leu
 115 120 125

ES 2 334 646 T3

Arg Val Gln Gly Lys Arg Ala Lys Arg Lys Leu Asp Tyr His Tyr Ser
 130 135 140

5 Gln Pro Thr Pro Asn Arg Lys Lys Val Tyr Lys Thr Val Arg Trp Gln
 145 150 155 160

10 Asp Glu Leu Ala Asp Arg Glu Ala Asp Phe Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 165 170 175

15 Gly Gly Thr Thr Ser Ser Asp Phe Asp Glu Asp Ile Asn Phe Asp Ile
 180 185 190

Gly Gly Asp Ser Gly Ile Val Asp Glu Leu Leu Gly Arg Pro Phe Thr
 195 200 205

20 Thr Pro Ala Pro Val Arg Ile Val
 210 215

<210> 11

25 <211> 2286

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> mut H 103 Y del genoma del virus de la anemia del pollo

<400> 11

35 cccccctga accccccct gggggggatt ccccccaaga ccccccttt ataaagcact 60
 caataaacgc agctaattcg ttcaccgcac aatcgettic cgagtggta ctattccatc 120
 accattctag cctgtacaca aaaagtaaag atggacgaat cgctcgactt cgctcgcgat 180
 40 tcgtcgaagg cggggggccg gaggcccccc ggtggcccc tccaaggagt ggagcgtgta 240
 caggggggta cgtcatccgt acagggggggg tacgtcaca gaaggcgtc ccgtacaggg 300
 ggttacgtaa catgttcagg ggggtacgtc acaaccaatc aggagctgcc acgttgcgaa 360
 agtgacgttt cgaaaatggg cggcgcaaga ctccctatat attgcgcgca cataccggtc 420
 45 ggcagtaggt atacgcaagg cggtcgggt ggatgcacgg aaacggcgga caaccggccg 480
 ctgggggcag tgaatcggcg cttagccgag aggggcaacc tgggccagc ggagccgcgc 540
 aggggcaagt aattcaaat gaacgctcac caagaagata ctccaccagg accatcaacg 600
 50 gtgttcaggc caccaacaag ttacggccg ttggaaacct ctactgcag agagatccgg 660
 attggtatcg ctggaattac agtcactcta tcgctgtgtg gctgcgcgaa tgctcgcgtt 720
 cccacgctaa gatctgcaac tgcggacaat tcagaaaata ctggttcaa gaatgtgccg 780
 55 gacttgagga ccgatcaacc caagcctccc tcgaagaagc gatcctgcga cccctccgag 840
 tacagggtaa gcgagctaaa agaaagcttg attaccaata ctccagccg accccgaacc 900
 gcaagaaggt gtataagact gtaagatggc aagacgagct cgcagaccga gaggccgatt 960
 60 ttacgccttc agaagaggac ggtggacca cctcaagcga cttcgacgaa gatataaatt 1020
 tcgacatcgg aggagacagc ggtatcgtag acgagctttt aggaaggcct tcacaacct 1080
 ccgccccggt acgtatagtg tgaggctgcc aaacccccag tccacgatga ctatccgctt 1140
 ccaaggagtc atctttctca ccgaaggact cattctacct aaaaacagca cagctggggg 1200
 65 ctatcgggac cacatgtacg gggcgagagt cgccaagatc tcagtgaacc tgaagaggtt 1260
 cctcctagca tcaatgaacc tgacatacgt gagcaagata ggaggccca tcgccggtga 1320

ES 2 334 646 T3

gttgattgcg gacgggtcta aatcgcaagc cgcggagaac tggccaaatt gctggctgcc 1380
 gtagataat aacgtgccct ccgctacacc atctgcatgg tggagatggg cttaatgat 1440
 gatgcagcca acggactcct gccggtttt taatcacctt aagcaaatga cctgcaaga 1500
 5 catgggtcgg atgttgggg gctggcatct gtccgacac attgaaaccc gctttcagct 1560
 cttgccact aagaatgagg gatccttcag ccccggtggcg agtcttctct cccagggaga 1620
 gtacctcag cgcgcgacg atgttaagta cagcagcagc caccagaacc ggtggcgaaa 1680
 10 aggcgagcaa ccgatgacgg gggggattgc ttacgcgacc ggtaaatga gactcgacga 1740
 gcaacaatac cctgctatgc ccccgaccc cccgatcacc accactacca ctgcgcaagg 1800
 cacgcaagtc cgctgcatga atagcagca agcttgggtg tcgtgggaca catalatgag 1860
 15 ctttgaaca ctacagcac tcggtgctca atggtcttt cctccagggc aacgttcagt 1920
 ttctagacgg tcctcaacc atcacaaggc ccgaggagcc ggggacccca agggccagag 1980
 gtggcacag ctggtgccgc tcggcacaga gaccataacc gacagctaca tgagagcacc 2040
 ggcatcagag ctggacacga atttctcac gctttacgta gcgcaaggca ctaataaatc 2100
 20 gcagcaatac aagtteggca cagcaacata cgcgctaaag gaaccgtaa tgaagagcga 2160
 ttcatgggca gtggtgcgcg tccagtcctg ctggcaactg ggtaacaggc aaaggccata 2220
 cccgtgggac gtaactggg ccaacagcac catgtactgg gggtcgcagc cctgaaaagg 2280
 25 gggggg 2286

<210> 12

<211> 216

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> mut H 103 Y de la VP2 del virus de la anemia del pollo

35

<400> 12

Met His Gly Asn Gly Gly Gln Pro Ala Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ala
 40 1 5 10 15

Leu Ser Arg Glu Gly Gln Pro Gly Pro Ser Gly Ala Ala Gln Gly Gln
 45 20 25 30

Val Ile Ser Asn Glu Arg Ser Pro Arg Arg Tyr Ser Thr Arg Thr Ile
 50 35 40 45

Asn Gly Val Gln Ala Thr Asn Lys Phe Thr Ala Val Gly Asn Pro Ser
 55 50 55 60

Leu Gln Arg Asp Pro Asp Trp Tyr Arg Trp Asn Tyr Ser His Ser Ile
 65 70 75 80

Ala Val Trp Leu Arg Glu Cys Ser Arg Ser His Ala Lys Ile Cys Asn
 60 85 90 95

Cys Gly Gln Phe Arg Lys Tyr Trp Phe Gln Glu Cys Ala Gly Leu Glu
 65 100 105 110

ES 2 334 646 T3

Asp Arg Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ile Leu Arg Pro Leu
 115 120 125

5 Arg Val Gln Gly Lys Arg Ala Lys Arg Lys Leu Asp Tyr His Tyr Ser
 130 135 140

10 Gln Pro Thr Pro Asn Arg Lys Lys Val Tyr Lys Thr Val Arg Trp Gln
 145 150 155 160

15 Asp Glu Leu Ala Asp Arg Glu Ala Asp Phe Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 165 170 175

20 Gly Gly Thr Thr Ser Ser Asp Phe Asp Glu Asp Ile Asn Phe Asp Ile
 180 185 190

Gly Gly Asp Ser Gly Ile Val Asp Glu Leu Leu Gly Arg Pro Phe Thr
 195 200 205

25 Thr Pro Ala Pro Val Arg Ile Val
 210 215

<210> 13

30 <211> 2286

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> mut R 129 G del genoma de la anemia del pollo

<400> 13

40 cccccctga accccccct gggggggatt cccccccaga ccccccttt ataaagcact 60
 caataaacgc agctaattcg ttcaccgcac aatcgcttc cgagtggta ctattccatc 120
 accattctag cctgtacaca aaaagtaaag atggacgaat cgctcgactt cgctcgcgat 180
 45 tcgtcgaagg cggggggccg gagggcccc ggtggcccc tccaaggagt ggagcgtgta 240
 caggggggta cgatcaccgt acagggggggg tacgtcacia gaaggcgtc ccgtacaggg 300
 ggtacgtaa catgttcagg ggggtacgtc acaaccaatc aggagctgcc acgttgcgaa 360
 agtgacgttt cgaaaatggg cggcgcaaga ctccctatat attgcgcgca cataccggtc 420
 50 ggcagtaggt atacgcaagg cggtcgggt ggtgcacgg aaacggcgga caaccggccc 480
 ctgggggcag tgaatcggcg cttagccgag aggggcaacc tgggccagc ggagccgccc 540
 aggggcaagt aattcaaat gaacgctcac caagaagata ctccaccagg accatcaac 600
 55 gtgttcaggc caccaacaag ttcacggccc ttggaaccc ctactgcag agagatccgg 660
 attggtatcg ctggaattac agtactcta tcgctgtgtg gctgcgcaa tgctcgcgtt 720
 cccacgctaa gatctgcaac tgcggacaat tcagaaaaca ctggtttcaa gaatgtgccg 780
 gacttgagga ccgatcaacc caagcctccc tcgaagaagc gatcctgca cccctcggag 840
 60 tacagggtaa gcgagctaaa agaaagcttg attaccacta ctcccagccg accccgaacc 900
 gcaagaaggt gtataagact gtaagatggc aagacgagct cgcagaccga gaggccgatt 960
 ttacgcctc agaagaggac ggtggacca cctcaagcga ctccgacgaa gatataaatt 1020
 65 tcgacatcgg aggagacagc ggtatcgtag acgagctttt aggaaggcct ttcacaacc 1080
 ccgccccgtt acgtatagtg tgaggctgcc aaacccccag tccacgatga ctatccgctt 1140

ES 2 334 646 T3

ccaaggagtc atctttctca ccgaaggact cattctacct aaaaacagca cagctggggg 1200
 ctatgcggac cacatgtacg gggcgagagt cgccaagatc tcagtgaacc tgaagagtt 1260
 cctcctagca tcaatgaacc tgacatacgt gagcaagata ggaggcccca tcgccggtga 1320
 5 gttgattgcg gacgggtcta aatcgcaagc cgcggagaac tggccaaatt gctggctgcc 1380
 gctagataat aacgtgccct ccgctacacc atcgtcatgg tggagatggg cttaatgat 1440
 gatgcagcca acggactcct gccggtttt taatcacct aagcaaatga ccctgcaaga 1500
 10 catgggtcgg atgtttgggg gctggcatct gticcagac attgaaaccc gctttcagct 1560
 ccttgccact aagaatgagg gatccttcag ccccgtagcg agtcttctct ccaggggaga 1620
 gtacctcagc cgccgcgacg atgttaagta cagcagcagc caccagaacc ggtggcgaaa 1680
 aggcgagcaa ccgatgacgg gggggattgc ttacgcgacc ggtaaaatga gactcgacga 1740
 15 gcaacaatac cctgctatgc cccggacce cccgateatc accactacca ctgcgcaagg 1800
 cacgcaagtc cgctgcatga atagcagcga agcttgggtg tctgtgggaca catatatgag 1860
 ctttgcaaca ctcacagcac tcggtgctca atgggtttt cctccagggc aacgttcagt 1920
 20 ttctagacgg tccttcaacc atcacaaggc ccgaggagcc ggggacccca agggccagag 1980
 gtggcacacg ctggtgccgc tcggcacaga gaccataacc gacagctaca tgagagcacc 2040
 ggcatcagag ctggacacga atttctcagc gctttacgta gcgcaaggca ctaataaatc 2100
 gcagcaatac aagttcggca cagcaacata cgcgctaaag gaacccgtaa tgaagagcga 2160
 25 ttcatgggca gtggtgcgcg tccagtcctg ctggcaactg ggtaacaggc aaaggccata 2220
 cccgtgggac gttaactggg ccaacagcac catgtactgg gggtcgcagc cctgaaaagg 2280
 gggggg 2286

30 <210> 14
 <211> 216
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> mut R129 G de la VP2 del virus de la anemia del pollo
 40 <400> 14

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

ES 2 334 646 T3

Cys Gly Gln Phe Arg Lys His Trp Phe Gln Glu Cys Ala Gly Leu Glu
 100 105 110

5 Asp Arg Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ile Leu Arg Pro Leu
 115 120 125

10 Gly Val Gln Gly Lys Arg Ala Lys Arg Lys Leu Asp Tyr His Tyr Ser
 130 135 140

15 Gln Pro Thr Pro Asn Arg Lys Lys Val Tyr Lys Thr Val Arg Trp Gln
 145 150 155 160

20 Asp Glu Leu Ala Asp Arg Glu Ala Asp Phe Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 165 170 175

Gly Gly Thr Thr Ser Ser Asp Phe Asp Glu Asp Ile Asn Phe Asp Ile
 180 185 190

25 Gly Gly Asp Ser Gly Ile Val Asp Glu Leu Leu Gly Arg Pro Phe Thr
 195 200 205

30 Thr Pro Ala Pro Val Arg Ile Val
 210 215

<210> 15

<211> 2286

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> mut Q 131 P del genoma del virus de la anemia del pollo

<400> 15

45 ccccccttga accccccctt ggggggggatt cccccccaga ccccccttt ataaagcact 60
 caataaacgc agctaattcg taccgcac aatgccttc cgagtggta ctattccatc 120
 accattctag cctgtacaca aaaagtaaag atggacgaat cgctcgactt cgctcgcgat 180
 50 tcgtcgaagg cggggggccg gagcccccc ggtggcccc tccaaggagt ggagcgtgta 240
 caggggggta cgtcatcctg acaggggggg tacgtcaca gaagcgttc ccgtacaggg 300
 gggtagtaa catgttcagg ggggtacgtc acaaccaatc aggagctgcc acgttgcgaa 360
 agtgacgtt cgaaaatggg cggcgcaaga ctccctatat attgcgcgca cataccggtc 420
 55 ggcagtaggt atacgcaagg cgtccgggt ggtatgcagg aacggcgga caaccggccg 480
 ctgggggcag tgaatcggcg cttagccgag aggggcaacc tgggccagc ggagccgccc 540
 aggggcaagt aattcaaat gaacgctcac caagaagata ctccaccagg accatcaacg 600
 60 gtgttcagc caccaacaag taccggccg ttgaaacc ctactgcag agagatccgg 660
 attggtatc ctggaattac agtactcta tcgtgtgtg gctcgcgaa tgctcgcgtt 720
 cccacgctaa gatctgaac tgcggacaat tcgaaaaca ctggttcaa gaatgtgccg 780
 gacttgagga ccgatcaacc caagcctccc tcgagaagc gatcctgcga cccctccgag 840
 65 taccgggtaa gcgagctaaa agaaagcttg attaccacta ctcccagccg accccgaacc 900
 gcaagaaggt gtataagact gtaagatggc aagacgagct cgcagaccga gaggccgatt 960

ES 2 334 646 T3

ttacgccttc agaagaggac ggtggcacca cctcaagcga ctfcgacgaa gatataaatt 1020
 tcgacatcgg aggagacagc ggtatcgtag acgagctttt aggaaggcct ttcacaacc 1080
 ccgccccgt acgtatagtg tgaggctgcc aaacccccag tccacgatga ctatccgctt 1140
 5 : ccaaggagtc atctttctca ccgaaggact cattctacct aaaaacagca cagctggggg 1200
 ctatgcggac cacatgtacg gggcgagagt cgccaagatc tcagtgaacc tgaaagagtt 1260
 cctcctagca tcaatgaacc tgacatacgt gagcaagata ggaggcccca tcgccggtga 1320
 10 gttgattgcg gacgggteta aatcgcaagc cgcggagaac tggccaaatt gctggctgcc 1380
 gctagataat aacgtgccct ccgctacacc atctgcatgg tggagatggg ctftaatgat 1440
 gatgcagcca acggactcct gccggtttt taatcacct aagcaaatga ccctgcaaga 1500
 15 catgggtcgg atgtttgggg gctggcatct gttccgacac attgaaacc gctttcagct 1560
 ccttgccact aagaatgagg gatccttcag ccccggtggc agtcttctet cccagggaga 1620
 gtacctcag cgcgcgacg atgttaagta cagcagcgc caccagaacc ggtggcgaaa 1680
 20 aggcgagcaa ccgatgacgg gggggattgc ttacgcgacc ggtaaatga gactcgacga 1740
 gcaacaatac cctgctatgc ccccggaacc cccgatcacc accactacca ctgcgcaagg 1800
 cacgcaagtc cgctgcatga atagcagca agcttgggtg tegtgggaca catatatgag 1860
 ctttgcaaca ctacagcac tcggtgctca atggtcttt ctccagggc aacgttcagt 1920
 25 ttctagacgg tcctcaacc atcacaagc ccgaggagcc ggggaccca agggccagag 1980
 gtggcacacg ctggtgccgc tcggcacaga gaccataacc gacagctaca tgagagcacc 2040
 ggcatcagag ctggacacga attcttcac gctttacgta gcgcaaggca ctaataaatc 2100
 30 gcagcaatac aagttcggca cagcaacata cgcgctaaag gaaccgtaa tgaagagcga 2160
 ttcatgggca gtggtgcgcg tccagtcctg ctggcaactg ggtaacaggc aaaggccata 2220
 cccgtgggac gtaactggg ccaacagcac catgtactgg gggtcgcagc cctgaaaagg 2280
 35 gggggg 2286

<210> 16

<211> 216

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mut Q 131 P de la VP2 del virus de la anemia del pollo

45 <400> 16

Met His Gly Asn Gly Gly Gln Pro Ala Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ala

1 5 10 15

50

Leu Ser Arg Glu Gly Gln Pro Gly Pro Ser Gly Ala Ala Gln Gly Gln

20 25 30

55

Val Ile Ser Asn Glu Arg Ser Pro Arg Arg Tyr Ser Thr Arg Thr Ile

35 40 45

60

Asn Gly Val Gln Ala Thr Asn Lys Phe Thr Ala Val Gly Asn Pro Ser

50 55 60

65

Leu Gln Arg Asp Pro Asp Trp Tyr Arg Trp Asn Tyr Ser His Ser Ile

65 70 75 80

ES 2 334 646 T3

Ala Val Trp Leu Arg Glu Cys Ser Arg Ser His Ala Lys Ile Cys Asn
 85 90 95

5 Cys Gly Gln Phe Arg Lys His Trp Phe Gln Glu Cys Ala Gly Leu Glu
 100 105 110

10 Asp Arg Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ile Leu Arg Pro Leu
 115 120 125

15 Arg Val Pro Gly Lys Arg Ala Lys Arg Lys Leu Asp Tyr His Tyr Ser
 130 135 140

20 Gln Pro Thr Pro Asn Arg Lys Lys Val Tyr Lys Thr Val Arg Trp Gln
 145 150 155 160

25 Asp Glu Leu Ala Asp Arg Glu Ala Asp Phe Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 165 170 175

30 Gly Gly Thr Thr Ser Ser Asp Phe Asp Glu Asp Ile Asn Phe Asp Ile
 180 185 190

35 Gly Gly Asp Ser Gly Ile Val Asp Glu Leu Leu Gly Arg Pro Phe Thr
 195 200 205

Thr Pro Ala Pro Val Arg Ile Val
 210 215

<210> 17

40 <211> 2286

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> mut R/K/K 150/151/152 G/A/A del genoma del virus de la anemia del pollo

<400> 17

50 cccccctga accccccct gggggggatt ccccccaaga ccccccttt ataaagcaact 60
 caataaacgc agctaattcg ttcaccgcac aatcgcttc cgagtggta ctattccatc 120
 accattctag cctgtacaca aaaagtaaag atggacgaat cgctcgactt cgctcgcgat 180
 55 tcgtcgaagg cggggggccg gaggcccc ggtggcccc tccaaggagt ggagcgtgta 240
 caggggggta cgtcatcctg acaggggggg tacgtcaca gaaggcgttc ccgtacaggg 300
 gggtagctaa catgttcagg ggggtacgtc acaaccaatc aggagctgcc acgttgcgaa 360
 agtgacgttt cgaatggg cggcgcaaga ctccctatat attgcgcgca cataccggtc 420
 60 ggcagtaggt atacgcaagg cgtccgggt ggatgcacgg aaacggcgga caaccggccg 480
 ctgggggcag tgaatcggcg cttagccgag aggggcaacc tgggccagc ggagccgcgc 540
 aggggcaagt aattcaaat gaacgctcac caagaagata ctccaccagg accatcaacg 600
 65 gtgttcaggc caccaacaag ttcacggccg ttggaacc ctcactgcag agagatccgg 660
 attggtatcg ctggaattac agtcactcta tcgtgtgtg gctgcgcgaa tgctcgcgtt 720
 cccacgctaa gatctgcaac tgcggacaat tcagaaaaca ctggttcaa gaatgtgccg 780

ES 2 334 646 T3

gacttgagga cccatcaacc caagcctccc tcgaagaagc gatcctgca cccctccgag 840
 tacagggtaa gcgagctaaa agaaagcttg attaccacta ctcccagccg accccgaacg 900
 5 gcgcggcggt gtataagact gtaagatggc aagacgagct cgcagaccga gaggccgatt 960
 ttacgccttc agaagaggac ggtggcacca cctcaagcga cttegacgaa gatataaatt 1020
 tcgacatcgg aggagacagc ggtatcgtag acgagctttt aggaaggcct tcacaaccc 1080
 ccgccccggt acgtatagtg tgaggctgcc aaacccccag tccacgatga ctatccgctt 1140
 10 ccaaggagtc atctttctca ccgaaggact cattctacct aaaaacagca cagctggggg 1200
 ctatgcggac cacatgtacg gggcgagagt cgccaagatc tcagtgaacc tgaagagtt 1260
 cctcctagca tcaatgaacc tgacatacgt gagcaagata ggaggcccca tcgccggtga 1320
 15 gttgattgcg gacgggtcta aatcgcaagc cgcggagaac tggccaaatt gctggctgcc 1380
 gctagataat aacgtgccct ccgctacacc atctgcatgg tggagatggg cttaaatgat 1440
 gatgcagcca acggactcct gccggtttt taatcacct aagcaaatga ccctgcaaga 1500
 20 catgggtcgg atgtttgggg gctggcatct gtccgacac attgaaaccc gctttcagct 1560
 ccttgccact aagaatgagg gatccttcag ccccgtagcg agtctctct cccagggaga 1620
 gtacctcag cgccgcgacg atgtaagta cagcagcagc caccagaacc ggtggcgaaa 1680
 aggcgagcaa ccgatgacgg gggggattgc ttacgcgacc ggtaaaatga gactcgacga 1740
 25 gcaacaatac cctgctatgc ccccggaccc ccgatcacc accactacca ctgcgcaagg 1800
 cacgcaagtc cgtgcatga atagcacgca agcttgggtg tctgggaca catatatgag 1860
 ctttgaaca ctacacgac tcggtgctca atggtcttt cctccagggc aacgttcagt 1920
 30 ttctagacgg tcttcaacc atcacaaggc ccgaggagcc ggggacccca agggccagag 1980
 gtggcacacg ctggtgccgc tcggcacaga gaccataacc gacagctaca tgagagcacc 2040
 ggcatcagag ctggacacga attttctac gctttacgta gcgcaaggca ctaataaatc 2100
 35 gcagcaatac aagtctggca cagcaacata cgcgctaaag gaacccgtaa tgaagagcga 2160
 ttcattgggca gtggtcgcgc tccagtcctg ctggcaactg ggtaacaggc aaaggccata 2220
 cccgtgggac gtaactggg ccaacagcac catgtactgg gggtcgcagc cctgaaaagg 2280
 gggggg 2286

40 <210> 18
 <211> 216
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> mut R/K/K of VP2 del virus de la anemia del pollo
 50 <400> 18

Met His Gly Asn Gly Gly Gln Pro Ala Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ala
 1 5 10 15
 55 Leu Ser Arg Glu Gly Gln Pro Gly Pro Ser Gly Ala Ala Gln Gly Gln
 20 25 30
 60 Val Ile Ser Asn Glu Arg Ser Pro Arg Arg Tyr Ser Thr Arg Thr Ile
 35 40 45
 65 Asn Gly Val Gln Ala Thr Asn Lys Phe Thr Ala Val Gly Asn Pro Ser
 50 55 60

ES 2 334 646 T3

Leu Gln Arg Asp Pro Asp Trp Tyr Arg Trp Asn Tyr Ser His Ser Ile
65 70 75 80

5 Ala Val Trp Leu Arg Glu Cys Ser Arg Ser His Ala Lys Ile Cys Asn
 85 90 95

10 Cys Gly Gln Phe Arg Lys His Trp Phe Gln Glu Cys Ala Gly Leu Glu
 100 105 110

15 Asp Arg Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ile Leu Arg Pro Leu
 115 120 125

20 Arg Val Gln Gly Lys Arg Ala Lys Arg Lys Leu Asp Tyr His Tyr Ser
 130 135 140

25 Gln Pro Thr Pro Asn Gly Ala Ala Val Tyr Lys Thr Val Arg Trp Gln
145 150 155 160

30 Asp Glu Leu Ala Asp Arg Glu Ala Asp Phe Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 165 170 175

35 Gly Gly Thr Thr Ser Ser Asp Phe Asp Glu Asp Ile Asn Phe Asp Ile
 180 185 190

40 Gly Gly Asp Ser Gly Ile Val Asp Glu Leu Leu Gly Arg Pro Phe Thr
 195 200 205

45 Thr Pro Ala Pro Val Arg Ile Val
 210 215

<210> 19

45 <211> 2286

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> mut D/E 161/162 G/G del genoma del virus de la anemia del pollo

50

<400> 19

cccccttga accccccct gggggggatt cccccaga cccccctt ataaagcact 60
55 caataaacgc agctaattcg taccgcac aatcgcttc cgagtggta ctattccatc 120
accattctag cctgtacaca aaaagtaaag atggacgaat cgctcgactt cgctcgcat 180
tcgtcgaagg cggggggccg gaggcccc ggtggcccc tccaaggagt ggagcgtgta 240
60 caggggggta cgtcatcct acaggggggg tacgtcaca gaaggcgttc ccgtacaggg 300
gggtacgtaa catgttcagg ggggtacgtc acaaccaatc aggagctgcc acgttgcgaa 360
agtgcgctt cgaatggg cggcgcaaga ctccctatat attgcgcgca cataccggtc 420
ggcagtaggt atacgcaagg cggctccgggt ggatgcacgg aaacggcgga caaccggccg 480
65 ctgggggcag tgaatcggcg ctagccgag aggggcaacc tgggcccagc ggagccgcgc 540
aggggcaagt aattcaaat gaacgtcac caagaagata ctccaccagg accatcaacg 600

ES 2 334 646 T3

5 gtgttcaggc caccaacaag ttacggccg ttggaaccc ctactgcag agagatccgg 660
 attggtatcg ctggaattac agtactcta tcgctgtgtg gctgcgcgaa tgctcgcgtt 720
 cccacgctaa gatctgcaac tgcggacaat tcagaaaaca ctggtttcaa gaatgtgccg 780
 10 gacttgagga cccgatcaacc caagcctccc tcgaagaagc gatcctgcga cccctccgag 840
 tacagggtaa gcgagctaaa agaaagcttg attaccacta ctcccagccg accccgaacc 900
 gcaagaaggt gtataagact gtaagatggc aaggcgggct cgcagaccga gaggccgatt 960
 15 ttacgccttc agaagaggac ggtggcacca cctcaagcga cttcgacgaa gatataaatt 1020
 tcgacatcgg aggagacagc ggtatcgtag acgagctttt aggaaggcct ttacaaccc 1080
 ccgccccggt acgtatagtg tgaggctgcc aaacccccag tccacgatga ctatccgctt 1140
 20 ccaaggagtc atctttctca ccgaaggact cattctacct aaaaacagca cagctggggg 1200
 ctatcgggac cacatgtacg gggcgagagt cgccaagatc tcagtgaacc tgaagagtt 1260
 cctcctagca tcaatgaacc tgacatacgt gagcaagata ggaggcccca tcgccggtga 1320
 25 gltgattgcg gacgggtcta aatcgcaagc cgcgggagaac tggccaaatt gctggctgcc 1380
 gctagataat aacgtgccct ccgctacacc atctgcatgg tggagatggg cttaatgat 1440
 gatgcagcca acgactcct gccggttttt taatcacct aagcaaatga ccttgcaaga 1500
 catgggtcgg atgtttgggg gctggcatct gttccgacac attgaaaccc gtttcagct 1560
 30 ccttgccact aagaatgagg gatccttcag ccccgtagcg agtcttctct cccagggaga 1620
 gtacctcag cgccgcgacg atgtaagta cagcagcgac caccagaacc ggtggcgaaa 1680
 aggcgagcaa ccgatgacgg gggggattgc ttacgcgacc ggtaaaatga gactcgacga 1740
 35 gcaacaatac cctgctatgc ccccgaccc cccgatcacc accactacca ctgcgcaagg 1800
 cagcaagtc cgctgcatga atagcagcga agcttgggtg tcgtgggaca catatatgag 1860
 ctttgcaaca ctacagcac tcggtgctca atggtctttt cctccagggc aacgttcagt 1920
 ttctagacgg tccttaacc atcacaaggc ccgaggagcc ggggacccca agggccagag 1980
 40 gtggcacacg ctggtgccgc tcggcacaga gaccataacc gacagctaca tgagagcacc 2040
 ggcacagag ctggacacga atttctcac gctttacgta gcgcaaggca ctaataaatc 2100
 gcagcaatac aagttcgga cagcaacata cgcgctaaag gaaccgtaa tgaagagcga 2160
 45 ttcatgggca gtggtgcgcg tccagtccgt ctggcaactg ggtaacaggc aaaggccata 2220
 cccgtgggac gttactggg ccaacagcac catgtactgg ggtcgcagc cctgaaaagg 2280
 gggggg 2286

45 <210> 20
 <211> 216
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> mut D/E 161/162 G/G de la VP2 del virus de la anemia del pollo
 55 <400> 20

60 Met His Gly Asn Gly Gly Gln Pro Ala Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ala
 1 5 10 15
 Leu Ser Arg Glu Gly Gln Pro Gly Pro Ser Gly Ala Ala Gln Gly Gln
 20 25 30
 65 Val Ile Ser Asn Glu Arg Ser Pro Arg Arg Tyr Ser Thr Arg Thr Ile
 35 40 45

ES 2 334 646 T3

Asn Gly Val Gln Ala Thr Asn Lys Phe Thr Ala Val Gly Asn Pro Ser
 50 55 60

5 Leu Gln Arg Asp Pro Asp Trp Tyr Arg Trp Asn Tyr Ser His Ser Ile
 65 70 75 80

10 Ala Val Trp Leu Arg Glu Cys Ser Arg Ser His Ala Lys Ile Cys Asn
 85 90 95

15 Cys Gly Gln Phe Arg Lys His Trp Phe Gln Glu Cys Ala Gly Leu Glu
 100 105 110

20 Asp Arg Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ile Leu Arg Pro Leu
 115 120 125

Arg Val Gln Gly Lys Arg Ala Lys Arg Lys Leu Asp Tyr His Tyr Ser
 130 135 140

25 Gln Pro Thr Pro Asn Arg Lys Lys Val Tyr Lys Thr Val Arg Trp Gln
 145 150 155 160

30 Gly Gly Leu Ala Asp Arg Glu Ala Asp Phe Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 165 170 175

35 Gly Gly Thr Thr Ser Ser Asp Phe Asp Glu Asp Ile Asn Phe Asp Ile
 180 185 190

40 Gly Gly Asp Ser Gly Ile Val Asp Glu Leu Leu Gly Arg Pro Phe Thr
 195 200 205

Thr Pro Ala Pro Val Arg Ile Val
 210 215

45 <210> 21

<211> 2286

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mut L 163 P del genoma del virus de la anemia del pollo

55 <400> 21

cccccttga accccccct gggggggatt cccccaga ccccccttt ataaagcact 60
 caataaacgc agctaattcg tcaccgcac aatcgcttc cgagtggta ctattccatc 120
 60 accattctag cctgtacaca aaaagtaaag atggacgaat cgctcgactt cgctcggat 180
 tcgtcgaagg cggggggccg gaggcccc ggtggcccc tccaaggagt ggagcgtgta 240
 caggggggta cgtcatcgt acagggggg tacgtcaca gaaggcgtc ccgtacaggg 300
 65 ggtacgtaa catgtcagg ggggtacgc acaaccaatc aggagctgcc acgttcgaa 360
 agtgacgtt cgaaaatgg cggcgcaaga ctccctatat attgcgcgca cataccggtc 420

ES 2 334 646 T3

ggcagtaggt atacgcaagg cgggccgggt ggatgcacgg aaacggcgga caaccggccg 480
ctgggggcag tgaatcggcg cttagccgag aggggcaacc tgggccagc ggagccgcgc 540
aggggcaagt aatttcaaat gaacgctcac caagaagata ctccaccagg accatcaacg 600
5 gtgttcaggc caccaacaag ttcacggccg ttgaaaccc ctactgcag agagatccgg 660
attggtatcg ctggaattac agtcactcta tcgctgtgtg gctgcgcgaa tgctcgcgtt 720
cccacgctaa gatctgcaac tgcggacaat tcagaaaaca ctggtttcaa gaatgtgccg 780
gacttgagga ccgatcaacc caagcctccc tcgaagaagc gatcctgcga cccctccgag 840
10 tacagggtaa gcgagctaaa agaaagcttg attaccacta ctcccagccg accccgaacc 900
gcaagaaggt gtataagact gtaagatggc aagacgagcc cgcagaccga gaggccgatt 960
ttacgccttc agaagaggac ggtggcacca cctcaagcga ctctgacgaa gatataaatt 1020
15 tcgacatcgg aggagacagc ggtatcgtag acgagctttt aggaaggcct tcacaaccc 1080
ccgccccggt acgtatagtg tgaggctgcc aaacccccag tccacgatga ctatccgctt 1140
ccaaggagtc atctttctca ccgaaggact cattctacct aaaaacagca cagctggggg 1200
ctatgcggac cacatgtacg gggcgagagt cgccaagatc tcagtgaacc tgaagagtt 1260
20 cctcctagca tcaatgaacc tgacatacgt gagcaagata ggaggcccca tcgccgtga 1320
gttgattcgc gacgggtcta aatcgaagc cgcgggagaac tggccaaatt gctggtgcc 1380
gctagataat aacgtgccct ccgctacacc atctgcatgg tggagatggg cttaaatgat 1440
gatgcagcca acggactcct gccggtttt taatcacct aagcaaatga cctgcaaga 1500
25 catgggtcgg atgtttgggg gctggcatct gtccgacac attgaaaccc gctttcagct 1560
ccttgccact aagaatgagg gatccttcag ccccgctggcg agtcttctct cccagggaga 1620
gtacctcacg cgccgcgacg atgtaagta cagcagcgc caccagaacc ggtggcgaaa 1680
30 aggcgagcaa ccgatgacgg gggggattgc ttacgcgacc ggtaaaatga gactcgacga 1740
gcaacaatac cctgctatgc ccccgacc cccgatcacc accactacca ctgcgcaagg 1800
cacgcaagtc cgctgcatga atagcagcga agcttgggtg tcgtgggaca catatatgag 1860
ctttgcaaca ctacagcac tcggtgctca atggtcttt cctccagggc aacgttcagt 1920
35 ttctagacgg tcttcaacc atcaaaaggc ccgaggagcc ggggacccca agggccagag 1980
gtggcacacg ctggtgccgc tcggcacaga gaccataacc gacagctaca tgagagcacc 2040
ggcatcagag ctggacacga atttctcac gcttacgta gcgcaaggca ctaataaatc 2100
40 gcagcaatac aagttcggca cagcaacata cgcgctaaag gaaccgtaa tgaagagcga 2160
ttcatgggca gtggtgcgcg tccagtcctg ctggcaactg ggtaacaggc aaaggccata 2220
cccgtgggac gtaactggg ccaacagcac catgtactgg gggtcgcagc cctgaaaagg 2280
ggggggg 2286

45 <210> 22
<211> 216
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> mut L 163 P de la VP2 del virus de la anemia del pollo
55 <400> 22

60 Met His Gly Asn Gly Gly Gln Pro Ala Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ala
1 5 10 15

65 Leu Ser Arg Glu Gly Gln Pro Gly Pro Ser Gly Ala Ala Gln Gly Gln
20 25 30

ES 2 334 646 T3

Val Ile Ser Asn Glu Arg Ser Pro Arg Arg Tyr Ser Thr Arg Thr Ile
35 40 45

5

Asn Gly Val Gln Ala Thr Asn Lys Phe Thr Ala Val Gly Asn Pro Ser
50 55 60

10

Leu Gln Arg Asp Pro Asp Trp Tyr Arg Trp Asn Tyr Ser His Ser Ile
65 70 75 80

15

Ala Val Trp Leu Arg Glu Cys Ser Arg Ser His Ala Lys Ile Cys Asn
85 90 95

20

Cys Gly Gln Phe Arg Lys His Trp Phe Gln Glu Cys Ala Gly Leu Glu
100 105 110

25

Asp Arg Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ile Leu Arg Pro Leu
115 120 125

30

Arg Val Gln Gly Lys Arg Ala Lys Arg Lys Leu Asp Tyr His Tyr Ser
130 135 140

35

Gln Pro Thr Pro Asn Arg Lys Lys Val Tyr Lys Thr Val Arg Trp Gln
145 150 155 160

40

Asp Glu Pro Ala Asp Arg Glu Ala Asp Phe Thr Pro Ser Glu Glu Asp
165 170 175

45

Gly Gly Thr Thr Ser Ser Asp Phe Asp Glu Asp Ile Asn Phe Asp Ile
180 185 190

50

Gly Gly Asp Ser Gly Ile Val Asp Glu Leu Leu Gly Arg Pro Phe Thr
195 200 205

55

Thr Pro Ala Pro Val Arg Ile Val
210 215

60 <210> 23

<211> 2286

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> mut D 169 G del genoma del virus de la anemia del pollo

ES 2 334 646 T3

<220>

<223> mut D 169 G de la VP2 del virus de la anemia del pollo

5 <400> 24

Met His Gly Asn Gly Gly Gln Pro Ala Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ala
1 5 10 15

10 **Leu Ser Arg Glu Gly Gln Pro Gly Pro Ser Gly Ala Ala Gln Gly Gln**
20 25 30

15 **Val Ile Ser Asn Glu Arg Ser Pro Arg Arg Tyr Ser Thr Arg Thr Ile**
35 40 45

20 **Asn Gly Val Gln Ala Thr Asn Lys Phe Thr Ala Val Gly Asn Pro Ser**
50 55 60

25 **Leu Gln Arg Asp Pro Asp Trp Tyr Arg Trp Asn Tyr Ser His Ser Ile**
65 70 75 80

30 **Ala Val Trp Leu Arg Glu Cys Ser Arg Ser His Ala Lys Ile Cys Asn**
85 90 95

35 **Cys Gly Gln Phe Arg Lys His Trp Phe Gln Glu Cys Ala Gly Leu Glu**
100 105 110

40 **Asp Arg Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ile Leu Arg Pro Leu**
115 120 125

45 **Arg Val Gln Gly Lys Arg Ala Lys Arg Lys Leu Asp Tyr His Tyr Ser**
130 135 140

50 **Gln Pro Thr Pro Asn Arg Lys Lys Val Tyr Lys Thr Val Arg Trp Gln**
145 150 155 160

55 **Asp Glu Leu Ala Asp Arg Glu Ala Gly Phe Thr Pro Ser Glu Glu Asp**
165 170 175

60 **Gly Gly Thr Thr Ser Ser Asp Phe Asp Glu Asp Ile Asn Phe Asp Ile**
180 185 190

Gly Gly Asp Ser Gly Ile Val Asp Glu Leu Leu Gly Arg Pro Phe Thr
195 200 205

65 **Thr Pro Ala Pro Val Arg Ile Val**
210 215

ES 2 334 646 T3

<210> 25

<211> 2286

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mut K 102 E del genoma del virus de la anemia del pollo

10 <400> 25

cccccttga accccccct gggggggatt cccccca cccccctt ataaagcact 60
caataaacgc agctaattcg taccgcac aatcgcttc cgagtggta ctattccatc 120
 15 **accattctag cctgtacaca aaaagtaaag atggacgaat cgctcgactt cgctcgcgat 180**
tcgtcgaagg cggggggccg gaggcccc ggtggcccc tccaaggagt ggagcgtgta 240
caggggggta cgatccgt acagggggg tacgtcaca gaagcgctt ccgtacagg 300
 20 **gggtacgtaa catgttcagg ggggtacgtc acaaccaatc aggagctgcc acgttgcgaa 360**
agtgcagttt cgaaaatggg cggcgcaaga ctccctatat attgcgcgca cataccggtc 420
ggcagtaggt atacgcaagg cgggtccgggt ggatgcacgg aaacggcgga caaccggccg 480
 25 **ctgggggag tgaatcggc cttagccgag aggggcaacc tgggccagc ggagccgcgc 540**
aggggcaagt aattcaaat gaacgctcac caagaagata ctccaccagg accatcaacg 600
gtgttcaggc caccaacaag ttcacggccg ttgaaacce ctactgcag agagatccgg 660
attggtatcg ctggaattac agtactcta tcgtgtgtg gctgcgcgaa tgctcgcgtt 720
 30 **cccacgctaa gatctgaac tgcggacaat tcagagaaca ctggttcaa gaatgtgccg 780**
gacttgagga ccgatcaacc caagcctccc tcgaagaagc gatcctgca cccctccgag 840
tacagggtaa gcgagctaaa agaaagctt attaccacta ctccagccg accccgaacc 900
 35 **gcaagaaggt gtataagact gtaagatggc aagacgagct cgcagaccga gaggccgatt 960**
ttacgccttc agaagaggac ggtggcacca cctcaagcga cttegacgaa gatataaatt 1020
tcgacatcgg aggagacagc ggtatcgtag acgagctttt aggaaggcct tcacaacce 1080
ccgccccggt acgtatagtg tgaggctgcc aaacccccag tccacgatga ctatccgctt 1140
 40 **ccaaggagtc attttctca ccgaaggact cattctacct aaaacagca cagctggggg 1200**
ctatgcggac cacatgtac gggcgagagt cgccaagatc tcagtgaacc tgaagagtt 1260
cctcctagca tcaatgaacc tgacatacgt gagcaagata ggaggcccca tcgccgtgta 1320
 45 **gttgattcgc gacgggtcta aatcgcaagc cgcggagaac tggccaaatt gctggctgcc 1380**
gctagataat aacgtgccct ccgctacacc atctgcatgg tggagatggg cttaaatgat 1440
gatgcagcca accgactcct gccggtttt taatcacct aagcaaatga ccctgcaaga 1500
catgggtcgg atgtttggg gctggcatct gttccgacac attgaaacce gctttcagct 1560
 50 **ccttgccact aagaatgagg gatcctcag ccccgaggc agtcttctct cccagggaga 1620**
gtacctcacg cgccgcgacg atgtaagta cagcagcag caccagaacc ggtggcgaaa 1680
aggcgagcaa ccgatgacgg gggggattgc ttacgcgacc ggtaaatga gactcgacga 1740
gcaacaatac cctgctatgc ccccgagcc ccgatcacc accactacca ctgcgcaagg 1800
 55 **cacgcaagtc cgctgcatga atagcacgca agcttgggtg tcgtgggaca catatatgag 1860**
ctttgcaaca ctacagcac tcggtgctca atggtcttt cctccagggc aacgttcagt 1920
ttctagacgg tcttcaacc atcacaaggc ccgaggagcc ggggaccca agggccagag 1980
 60 **gtggcacacg ctggtgccgc tcggcacaga gaccataacc gacagctaca tgagagcacc 2040**
ggcatcagag ctggacacga attttcac gctttacgta gcgcaaggca ctaataaatc 2100
gcagcaatac aagttcggca cagcaacata cgcgctaaag gaaccgtaa tgaagagcga 2160
 65 **ttcatgggca gtggtgcgcg tccagtcctg ctggcaactg ggtaacaggc aaaggccata 2220**
cccgtgggac gtaactggg ccaacagcac catgtactgg ggtcgcagc cctgaaaagg 2280
gggggg 2286

ES 2 334 646 T3

<210> 26

<211> 216

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mut K 102 E de la VP2 del virus de la anemia del pollo

10 <400> 26

Met His Gly Asn Gly Gly Gln Pro Ala Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ala

1 5 10 15

Leu Ser Arg Glu Gly Gln Pro Gly Pro Ser Gly Ala Ala Gln Gly Gln

20 25 30

Val Ile Ser Asn Glu Arg Ser Pro Arg Arg Tyr Ser Thr Arg Thr Ile

35 40 45

Asn Gly Val Gln Ala Thr Asn Lys Phe Thr Ala Val Gly Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Gln Arg Asp Pro Asp Trp Tyr Arg Trp Asn Tyr Ser His Ser Ile

65 70 75 80

Ala Val Trp Leu Arg Glu Cys Ser Arg Ser His Ala Lys Ile Cys Asn

85 90 95

Cys Gly Gln Phe Arg Glu His Trp Phe Gln Glu Cys Ala Gly Leu Glu

100 105 110

Asp Arg Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ile Leu Arg Pro Leu

115 120 125

Arg Val Gln Gly Lys Arg Ala Lys Arg Lys Leu Asp Tyr His Tyr Ser

130 135 140

Gln Pro Thr Pro Asn Arg Lys Lys Val Tyr Lys Thr Val Arg Trp Gln

145 150 155 160

Asp Glu Leu Ala Asp Arg Glu Ala Asp Phe Thr Pro Ser Glu Glu Asp

165 170 175

Gly Gly Thr Thr Ser Ser Asp Phe Asp Glu Asp Ile Asn Phe Asp Ile

180 185 190

Gly Gly Asp Ser Gly Ile Val Asp Glu Leu Leu Gly Arg Pro Phe Thr

195 200 205

Thr Pro Ala Pro Val Arg Ile Val

210 215

65 <210> 27

<211> 2286

ES 2 334 646 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> mut E 186 G del genoma del virus de la anemia del pollo

<400> 27

```

10      cccccctga accccccct gggggggatt ccccccaaga ccccccttt ataaagcact   60
      caataaacgc agctaattcg ttcaccgcac aatcgcttc cgagtggta ctattccatc  120
      accattctag cctgtacaca aaaagtaaag atggacgaat cgctcgactt cgctcgcgat  180
15      tcgtcgaagg cgggggggccg gaggcccccc ggtggcccc tccaaggagt ggagcgtgta  240
      caggggggta cgtcatccgt acagggggggg tacgtcaca gaaggcgttc ccgtacaggg  300
      ggttacgtaa catgttcagg ggggtacgtc acaaccaatc aggagctgcc acgttgcgaa  360
20      agtgacgttt cgaaaatggg cggcgcaaga ctccctatat attgcgcgca cataccggtc  420
      ggcagtaggt atacgcaagg cgggtccgggt ggatgcacgg aaacggcgga caaccggccg  480
      ctgggggcag tgaatcggcg cttagccgag aggggcaacc tgggcccagc ggagccgcgc  540
25      aggggcaagt aatttcaaat gaacgctcac caagaagata ctccaccagg accatcaacg  600
      gtgttcaggc caccaacaag ttcacggccg ttgaaaccc ctactgcag agagatccgg  660
      attggtatcg ctggaattac agtcactcta tcgtgtgtg gctgcgcgaa tgctcgcgtt  720
      cccacgctaa gatctgcaac tgcggacaat tcagaaaaca ctggtttcaa gaatgtgccg  780
30      gacttgagga ccgatcaacc caagcctccc tcgaagaagc gatcctgca cccctccgag  840
      tacagggtaa gcgagctaaa agaaagcttg attaccacta ctcccagccg accccgaacc  900
      gcaagaaggt gtataagact gtaagatggc aagacgagct cgcagaccga gaggccgatt  960
35      ttacgccttc agaagaggac ggtggcacca cctcaagcga cttcgacgga gatataaatt 1020
      tcgacatcgg aggagacagc ggtatcgtag acgagctttt aggaaggcct tcacaaccc 1080
      ccgccccggt acgtatagtg tgaggctgcc aaacccccag tccacgatga ctatccgctt 1140
      ccaaggagtc atctttctca ccgaaggact cattctacct aaaaacagca cagctggggg 1200
40      ctatgcggac cacatgtacg gggcgagagt cgccaagatc tcagtgaacc tgaagagtt 1260
      cctcctagca tcaatgaacc tgacatacgt gagcaagata ggaggccca tcgccggtga 1320
      gttgattgcg gacgggtcta aatcgcaagc cgcgggagaac tggccaaatt gctggctgcc 1380
      gctagataat aacgtgccct ccgctacacc atctgcatgg tggagatggg cttaaatgat 1440
45      gatgcagcca acgactcct gccggtttt taatcaccct aagcaaatga ccctgcaaga 1500
      catgggtcgg atgtttgggg gctggcatct gttccgacac attgaaaccc gcttcagct 1560
      ccttgccact aagaatgagg gatcctcag ccccgtagcg agtcttctct cccagggaga 1620
      gtacctcagc cgccgcgacg atgttaagta cagcagcagc caccagaacc ggtggcgaaa 1680
50      aggcgagcaa ccgatgacgg gggggattgc ttacgcgacc ggtaaatga gactcgacga 1740
      gcaacaatac cctgctatgc cccgggacc cccgatcacc accactacca ctgcgcaagg 1800
      cacgcaagtc cgctgatga atagcagcga agcttggtgg tcgtgggaca catatatgag 1860
55      ctttgaaca ctacagcac tcggtgctca atggtcttt cctccagggc aacgttcagt 1920
      ttetagacgg tcttcaacc atcacaagge ccgaggagcc ggggacccca agggccagag 1980
      gtggcacacg ctggtgccgc tcggcacaga gaccataacc gacagctaca tgagagcacc 2040
      ggcatcagag ctggacacga atttcttac gctttacgta gcgcaaggca ctaataaate 2100
60      gcagcaatac aagttcggca cagcaacata cgcgctaaag gaacccgtaa tgaagagcga 2160
      ttcattgggca gtggtgcgcg tccagtccgt ctggcaactg ggtaacaggc aaaggccata 2220
      cccgtgggac gttactggg ccaacagcac catgtactgg gggtcgcagc cctgaaaagg 2280
65      gggggg
      2286
  
```

ES 2 334 646 T3

<210> 28

<211> 216

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> mut E 186 G de la VP2 del virus de la anemia del pollo

10 <400> 28

Met His Gly Asn Gly Gly Gln Pro Ala Ala Gly Gly Ser Glu Ser Ala
1 5 10 15

15

Leu Ser Arg Glu Gly Gln Pro Gly Pro Ser Gly Ala Ala Gln Gly Gln
20 25 30

20

Val Ile Ser Asn Glu Arg Ser Pro Arg Arg Tyr Ser Thr Arg Thr Ile
35 40 45

25

Asn Gly Val Gln Ala Thr Asn Lys Phe Thr Ala Val Gly Asn Pro Ser
50 55 60

30

Leu Gln Arg Asp Pro Asp Trp Tyr Arg Trp Asn Tyr Ser His Ser Ile
65 70 75 80

35

Ala Val Trp Leu Arg Glu Cys Ser Arg Ser His Ala Lys Ile Cys Asn
85 90 95

40

Cys Gly Gln Phe Arg Lys His Trp Phe Gln Glu Cys Ala Gly Leu Glu
100 105 110

Asp Arg Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ile Leu Arg Pro Leu
115 120 125

45

Arg Val Gln Gly Lys Arg Ala Lys Arg Lys Leu Asp Tyr His Tyr Ser
130 135 140

50

Gln Pro Thr Pro Asn Arg Lys Lys Val Tyr Lys Thr Val Arg Trp Gln
145 150 155 160

Asp Glu Leu Ala Asp Arg Glu Ala Asp Phe Thr Pro Ser Glu Glu Asp
165 170 175

55

Gly Gly Thr Thr Ser Ser Asp Phe Asp Gly Asp Ile Asn Phe Asp Ile
180 185 190

60

Gly Gly Asp Ser Gly Ile Val Asp Glu Leu Leu Gly Arg Pro Phe Thr
195 200 205

65

Thr Pro Ala Pro Val Arg Ile Val
210 215

ES 2 334 646 T3

	<210> 29		
	<211> 30		
	<212> ADN		
5	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> mut C87R +oligo		
10	<400> 29		
	ctgcgcgaa c gctcgcgttc ccacgctaag		30
15	<210> 30		
	<211> 30		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> mut C87R-oligo		
25	<400> 30		
	aacgcgagcg ttcgcgcagc cacacagcga		30
30	<210> 31		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> mut C95 S +oligo		
	<400> 31		
40	cgctaagatc agcaactgcg		20
	<210> 32		
45	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> mut C 95 S-oligo		
	<400> 32		
55	cgcagttgct gatcttagcg tg		22
	<210> 33		
60	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
65	<223> mut C 97 S +oligo		

ES 2 334 646 T3

	<400> 33	
	atctgcaaca gcggacaatt c	21
5	<210> 34	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> mut C 97 S-oligo	
15	<400> 34	
	attgtccgct gttgcagatc ttag	24
20	<210> 35	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> mut R 101 G +oligo	
30	<400> 35	
	ctgcggacaa ttcggaaaac actgg	25
35	<210> 36	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> mut R 101 G-oligo	
	<400> 36	
45	cagtgttttc cgaattgtcc gcag	24
	<210> 37	
50	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> mut H 103 Y +oligo	
	<400> 37	
60	cagaaaatac tggtttcaag aatgtgccgg ac	32
	<210> 38	
	<211> 29	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 334 646 T3

	<220>	
	<223> mut H 103 Y-oligo	
5	<400> 38	
	gaaaccagta ttttctgaat tgtccgcag	29
10	<210> 39	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> mut R 129 G +oligo	
	<400> 39	
20		
	ctgcgacccc tcggagtaca ggg	23
	<210> 40	
25	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> mut R 129 G-oligo	
	<400> 40	
35		
	ccctgtactc cgaggggtcg caggatcgc	29
	<210> 41	
40	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> mut Q 131 P +oligo	
	<400> 41	
50		
	cgagtaccgg gtaagcgagc taaaag	26
	<210> 42	
	<211> 21	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> mut Q 131 P-oligo	
	<400> 42	
65		
	cgcttaccgg gtactcggag g	21
	<210> 43	
	<211> 24	

ES 2 334 646 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> mut R/K/K 150/151/152 G/A/A +oligo	
	<400> 43	
10	ccgaacggcg cggcgggtga taag	24
	<210> 44	
	<211> 25	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> mut R/K/K 150/151/152 G/A/A-oligo	
	<400> 44	
25	atacaccgcc ggcgcttcg gggtc	25
	<210> 45	
	<211> 27	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> mut D/E 161/162 G/G +oligo	
35	<400> 45	
40	taagatggca aggcgggctc gcagacc	27
	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> mut D/E 161/162 G/G	
50	<400> 46	
55	tgcgagcccg cctgccatc	20
	<210> 47	
	<211> 21	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> mut L 163 P +oligo	
65	<400> 47	
	gacgagcccg cagaccgaga g	21

ES 2 334 646 T3

	<210> 48	
	<211> 24	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> mut L 163 P-oligo	
10	<400> 48	
	ggcctctcgg tctgcgggct cgtc	24
15	<210> 49	
	<211> 24	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> mut D 169 G +oligo	
25	<400> 49	
	gagaggccgg ttttacgct tcag	24
30	<210> 50	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> mut D 169 G-oligo	
40	<400> 50	
	gcgtaaaacc ggcctctcgg tc	22
45	<210> 51	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> mut K 102 E +oligo	
55	<400> 51	
	ctgcggacaa ttcagagaac actggttc	29
60	<210> 52	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> mut K 102 E-oligo	

ES 2 334 646 T3

	<400> 52	
	gaaaccagtg ttctctgaat tgtccgcag	29
5	<210> 53	
	<211> 26	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> mut E 186 G +oligo	
15	<400> 53	
	gcgacttcga cggagatata aatttc	26
20	<210> 54	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> mut E 186 G-oligo	
30	<400> 54	
	tttatatctc cgtcgaagtc gc	22
35	<210> 55	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador CAV.1	
	<400> 55	
45	ctatcgaatt ccgagtggtt actat	25
	<210> 56	
50	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador CAV.10	
	<400> 56	
60	tgctcacgta tgcaggttc	20
	<210> 57	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 334 646 T3

	<220>	
	<223> Cebador CAV.2	
5	<400> 57	
	gcggagccgc gcaggggcaa	20
10	<210> 58	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> CAV 19 oligo	
	<400> 58	
20		
	cggtcggga ggatgcacgg aaacgg	26
	<210> 59	
25	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> CAV 20 oligo	
	<400> 59	
35		
	gtgcatcctc ccgaccgct tgcgt	25
	<210> 60	
40	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> CAV 21 oligo	
	<400> 60	
50		
	cggtcgggt ggatggacgg aaacgg	26
	<210> 61	
	<211> 26	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> CAV 22 oligo	
	<400> 61	
65		
	gtccatccac ccgaccgcc ttgcgt	26
	<210> 62	
	<211> 25	

ES 2 334 646 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> CAV 1 oligo	
	<400> 62	
10	ctatcgaatt ccgagtggtt actat	25
	<210> 63	
	<211> 30	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> CAV 11 oligo	
	<400> 63	
25	agctcgtcctt gccatcttac agtcttatac	30
	<210> 64	
	<211> 9	
30	<212> PRT	
	<213> Virus de la anemia del pollo- motivo firma CAV VP2 PTP	
	<400> 64	
35	Ile Cys Asn Cys Gly Gln Phe Arg Lys	
	1 5	
40	<210> 65	
	<211> 34	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador CAV.1	
50	<400> 65	
	cggtccggat ccatgcacgg aaacggcgga caac	34
55	<210> 66	
	<211> 33	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador CAV.2	
65	<400> 66	
	ggtttggaat tctcacacta tacgtaccgg ggc	33

ES 2 334 646 T3

<210> 67

<211> 31

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador TLMV.1

10 <400> 67

ttggatccat ggcagcttt ctaacacat c

31

15 <210> 68

<211> 33

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador TLMV.2

25 <400> 68

ggcgaattct taccatcgt cttctcgaa atc

33

30

35

40

45

50

55

60

65