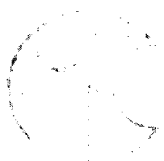


No. 12-047889- -00000-0000

Fecha: 2012-03-21 15:05:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 182



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE Nº _____

54. TÍTULO VACUNAS Y DIAGNÓSTICO PARA TORQUE TENO VIRUS
PORCINO.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12N 15/34

71. SOLICITANTE VIRGINIA TECH INTELLECTUAL PROPERTIES, INC.

DOMICILIO Virginia, Estados Unidos de América.

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C. _____

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: VIRGINIA TECH INTELLECTUAL
PROPERTIES, INC.

Dirección: 2200 Kraft Drive, Suite 1050,
Blacksburg, Virginia 24060, Estados Unidos de
América.

Nacionalidad o domicilio: Virginia, Estados
Unidos de América.

Lugar de Constitución: Estados Unidos de
América.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088 Fax: 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número 41.654.882
TP 20824 CSJ

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER HOJA ANEXA

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/046330 Fecha 23 de agosto de 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/031438 A9 Fecha 17 de marzo de 2011

6 TITULO (54) VACUNAS Y DIAGNÓSTICO PARA TORQUE TENO VIRUS PORCINO.

7

Clasificación Internacional (51) C12N 15/34

8 Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

Estados Unidos de América

Estados Unidos de América

(32) Fecha

21 de agosto de 2009

23 de marzo de 2010

23 de agosto de 2010

(31) Número de Solicitud

61/235.833

61/316.519

12/861.378

9

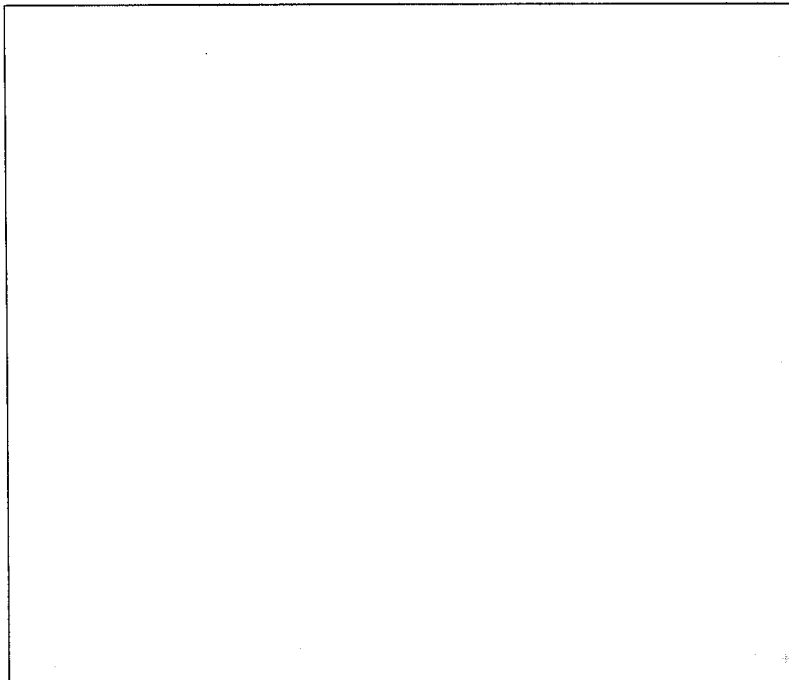
Comprobante de pago No. 12-740 // 12-741 // 12-20393 Fecha 03 de enero de 2012

10

ANEXOS

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

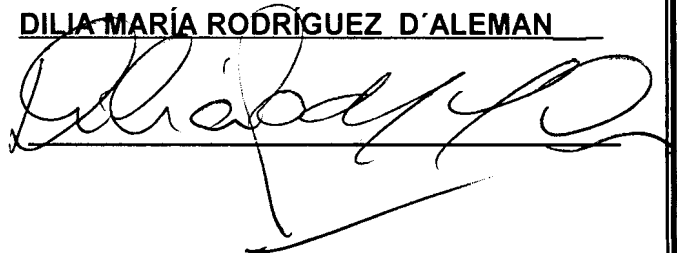
11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:



C.C. 41.654.882

T.P. 20824

ANEXO
INVENTORES

- 1.) **MENG, Xiang-Jin**
(212 Flippin Circle, Blacksburg, Virginia 24060, Estados Unidos de América);
- 2.) **HUANG, Yaowei**
(1708 Emerald St., Blacksburg, Virginia 24060, Estados Unidos de América).

000002

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 000740
		Bogotá D.C., Enero 03 de 2012 - 16:38:29

RECIBIDO DE : CLARKE MODET	NI 830.008.643
----------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426526122	03/01/2012	102.665.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	87 SOL. RENOVACION REGISTRO CON RECARGO POR SOL PLAZO	1.120.000.00	1.120.000.00
			\$1.120.000.00
		=====	

SON: **UN MILL&OACUTE;N CIENTO VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-047889- -00000-0000
Fecha: 2012-03-21 15:05:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 182

000003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 000741

Bogotá D.C., Enero 03 de 2012 - 16:38:29

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426526122	03/01/2012	102.665.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	87 SOL. RENOVACION REGISTRO CON RECARGO POR SOL PLAZO	1.120.000.00	1.120.000.00
				\$1.120.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N CIENTO VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-047889- -00000-0000

Fecha: 2012-03-21 15:05:52 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 182

000004

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Enero 3 de 2012 - 16:40:11

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0020393
		Bogotá D.C., Febrero 28 de 2012 - 06:32:04

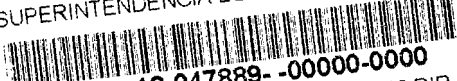
RECIBIDO DE : CLARKE MODET	NI 830.008.643
----------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325098616	24/02/2012	56.630.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE	30.000.00	30.000.00
				\$30.000.00
=====				

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-047889- -00000-0000
Fecha: 2012-03-21 15:05:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 182

000005

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona cuatro preparaciones purificadas que contienen una molécula de ácido polinucleico que codifica los genotipos del virus Torque teno porcino (PTTV) o
5 subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA. La presente invención también proporciona clones de ADN infecciosos, plásmido biológicamente funcional o vector vírico que contiene la molécula de genoma de ácido nucleico infeccioso de los mismos. La presente invención proporciona además vacunas víricas
10 exterminadas o subunidad de cápsida recombinantes purificadas y expresadas por vector, atenuadas, vivas para protección contra infección PTTV. La presente invención adicionalmente proporciona vacunas de subunidad que comprenden productos del gen específico PTTV, especialmente producto del gen de cápsida ORF1 para
15 protección contra infección PTTV. Además, la presente invención proporciona métodos para diagnosticar infección PTTV por medio de reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando cebador específico para genotipos PTTV1, PTTV2, y PTTV1 individual. Finalmente, la presente invención proporciona métodos para diagnosticar
20 infección PTTV por medio de métodos inmunológicos, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a la enzima (ELISA) y Western blot usando antígenos específicos de PTTV para detectar anticuerpos específicos PTTV de suero.

000006

VACUNAS Y DIAGNÓSTICO PARA TORQUE TENO VIRUS PORCINO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a vacunas para proteger
5 contra infección por Torque teno virus (TTV) porcino, y clones de
ADN infecciosos de TTV porcino (PTTV) y sus usos de los mismos.
La presente invención también se refiere al diagnóstico de la
infección por Torque teno virus (PTTV) porcina, particularmente
diagnóstico de la infección por PTTV específica de especie o
10 tipo, y simultáneamente infección de cepas múltiples de
diferentes genotipos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El torque teno virus (TTV) se descubrió primero en un
15 paciente japonés con hepatitis que no era A-E después de
transfusión en 1997 (Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K.,
Yoshizawa, H., Miyakawa, Y., y Mayumi, M. (1997). Un virus de ADN
(TTV) novedoso asociado con niveles de transaminasa elevados en
hepatitis posterior a una transfusión de etiología desconocida.
20 Biochem Biophys Res Commun 241(1), 92-7.). Desde entonces, un
gran número de cepas TTV humanas y dos grupos de virus
relacionados con TTV, designados posteriormente como Torque teno
mini virus (TTMV) y Torque teno midi virus (TTMDV), se han
identificado con alta prevalencia en suero y otros tejidos de
humanos saludables (Hino, S., and Miyata, H. (2007). Torque teno
virus (TTV): current status. Rev Med Virol 17(1), 45-57; Okamoto,
H. (2009a). History of discoveries and pathogenicity of TT
viruses. Curr Top Microbiol Immunol 331, 1-20). Los TTV, TTMV y

000007

TTMDV humanos son virus esféricos no envueltos con genomas de ADN de hebra sencilla circular (ssADN) de 3.6-3.9, 2.8-2.9 y 3.2 kb en longitud, respectivamente, y se clasifican actualmente en una familia recientemente establecida *Anelloviridae* por el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV; <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>) (Biagini, P. (2009). Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 21-33). Estos tres grupos de virus relacionados con TTV exhiben un alto grado de homogeneidad genética, cada uno consiste de muchos genogrupos y genotipos (Biagini, P., Gallian, P., Cantaloube, J. F., Attoui, H., de Micco, P., y de Lamballerie, X. (2006). Distribution and genetic analysis of TTV and TTMV major phylogenetic groups in French blood donors. *J Med Virol* 78(2), 298-304; Jelcic, I., Hotz-Wagenblatt, A., Hunziker, A., Zur Hausen, H., y de Villiers, E. M. (2004). Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. *J Virol* 78(14), 7498-507). La prevalencia de infecciones múltiples de TTV con genotipos diferentes así como infecciones dobles o triples de TTV, TTMV y TTMDV se han documentado en humanos, y se consideran que son un evento común en adultos humanos saludables (Niel, C., Saback, F. L., and Lampe, E. (2000). Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. *J Clin Microbiol* 38(5), 1926-30; Ninomiya, M., Takahashi, M., Hoshino, Y., Ichiyama, K., Simmonds, P., y Okamoto, H. (2009). Analysis of the entire genomes of torque teno midi virus variants in chimpanzees: infrequent cross-

000008

species infection between humans and chimpanzees. *J Gen Virol* 90(Pt 2), 347-58; Okamoto, H. (2009a). History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 1-20; Takayama, S., Miura, T., Matsuo, S., Taki, M., and Sugii, S. (1999). Prevalence and persistence of a novel DNA TT virus (TTV) infection in Japanese haemophiliacs. *Br J Haematol* 104(3), 626-9).

TTV infecta no sólo a humanos sino también a varias otras especies también incluyendo primates no humanos, tupaias, cerdos, ganado, gatos, perros y leones marinos (Biagini, P., Uch, R., Belhouchet, M., Attoui, H., Cantaloube, J. F., Brisbarre, N., y de Micco, P. (2007). Circular genomes related to anelloviruses identified in human and animal samples by using a combined rolling-circle amplification/sequence-independent single primer amplification approach. *J Gen Virol* 88(Pt 10), 2696-701; Inami, T., Obara, T., Moriyama, M., Arakawa, Y., y Abe, K. (2000). Full-length nucleotide sequence of a simian TT virus isolate obtained from a chimpanzee: evidence for a new TT virus-like species. *Virology* 277(2), 330-5; Ng, T. F., Suedmeyer, W. K., Wheeler, E., Gulland, F., y Breitbart, M. (2009). Novel anellovirus discovered from a mortality event of captive California sea lions. *J Gen Virol* 90(Pt 5), 1256-61; Okamoto, H. (2009b). TT viruses in animals. *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 35-52; Okamoto, H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Tawara, A., Peng, Y., Kishimoto, J., y Wang, Y. (2001). Genomic and evolutionary characterization of TT virus (TTV) in tupaias and comparison with species-specific TTVs in humans and non-human primates. *J Gen Virol* 82(Pt 9), 2041-50; Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Peng, Y.,

000009

Takahashi, M., Kishimoto, J., Tanaka, T., Miyakawa, Y., y Mayumi, M. (2000a). Species-specific TT viruses in humans and nonhuman primates and their phylogenetic relatedness. *Virology* 277(2), 368-78; Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Fukai, K., Muramatsu, U., Naito, Y., y Yoshikawa, A. (2002). Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaias. *J Gen Virol* 83(Pt 6), 1291-7). Además, los chimpancés también se infectan con TTMV y TTMDV (Ninomiya, M., Takahashi, M., Hoshino, Y., Ichiyama, K., Simmonds, P., y Okamoto, H. (2009). Analysis of the entire genomes of torque teno midi virus variants in chimpanzees: infrequent cross-species infection between humans and chimpanzees. *J Gen Virol* 90(Pt 2), 347-58; Okamoto et al., 2000a, supra). Aunque los tamaños genómicos de las cepas TTV animales identificadas, especialmente los TTV de animal no primate, son relativamente más pequeñas que las de TTV humano, comparten la misma estructura genómica con un mínimo de dos estructuras de lectura abierta parcialmente traslapadas (ORF1 y ORF2) traducidas del ssADN negativo así como una extensión corta de región no traducida (UTR) con alto contenido de GC (~90%) (Okamoto, 2009b, supra). La configuración de ORFs de TTV es completamente similar a la del virus de anemia del pollo (CAV) que pertenece al género *Gyrovirus* en la familia *Circoviridae* pero es diferente del circovirus porcino (PCV) tipos 1 (PCV1) y 2 (PCV2), que se clasifican también en la misma familia (Davidson, I., and Shulman, L. M. (2008). Unraveling the puzzle of human anellovirus infections by comparison with avian infections with the chicken anemia virus. *Virus Res* 137(1), 1-15;

000010

Hino, S., y Prasetyo, A. A. (2009). Relationship of Torque teno virus to chicken anemia virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 117-30). Los genomas de PCV1 y PCV2 son de ambos sentidos, en los cuales el ORF1 se codifica por la hebra genómica y el ORF2 se
 5 codifica por la hebra antígenómica (Hino y Miyata, 2007, supra). Recientemente, el patrón de transcripción y los productos traducidos de ambos genotipos TTV humanos 1 y 6 se han identificado por transfección de los clones de ADN infecciosos de TTV respectivos en células cultivadas (Mueller, B., Maerz, A.,
 10 Doberstein, K., Finsterbusch, T., y Mankertz, A. (2008). Gene expression of the human Torque Teno Virus isolate P/1C1. *Virology* 381(1), 36-45; Qiu, J., Kakkola, L., Cheng, F., Ye, C., Soderlund-Venermo, M., Hedman, K., and Pintel, D. J. (2005). Human circovirus TT virus genotype 6 expresses six proteins
 15 following transfection of a full-length clone. *J Virol* 79(10), 6505-10). La expresión de al menos seis proteínas, designadas ORF1, ORF2, ORF1/1, ORF2/2, ORF1/2 y ORF2/3, de tres o más mARNs empalmados, se han reportado (Kakkola, L., Hedman, K., Qiu, J., Pintel, D., y Soderlund-Venermo, M. (2009). Replication of and
 20 protein synthesis by TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 53-64; Mueller et al., 2008, supra; Qiu et al., 2005, supra). En consecuencia, es posible que, cuando más datos con respecto al TTV animal estén disponibles, necesitará modificarse la estructura de genoma presumida del TTV animal.

Aunque el TTV se identificó primero en un paciente con hepatitis criptogénica, no estuvieron disponibles estudios posteriores para producir evidencia de un papel importante de TTV en la patogénesis de hepatitis u otra enfermedad (Hino y Miyata, 2007, supra).

000011

2007, supra; Maggi, F., y Bendinelli, M. (2009). Immunobiology of the Torque teno viruses and other anelloviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 65-90; Okamoto, 2009a, supra). Aunque el TTV humano no se considera que está directamente asociado con una enfermedad, el TTV porcino (PTTV) recientemente mostró contribuir parcialmente a la inducción experimental de dermatitis porcina y síndrome de neuropatía (PDNS) combinado con infección por virus de síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) (Krakowka, S., Hartunian, C., Hamberg, A., Shoup, D., Rings, M., Zhang, Y., Allan, G., y Ellis, J. A. (2008). Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *Am J Vet Res* 69(12), 1615-22), y también a la inducción experimental de síndrome de atrofia multisistémica posterior al destete (PMWS) combinado con infección PCV2 en un modelo de cerdo gnotobiótico (Ellis, J. A., Allan, G., and Krakowka, S. (2008). Effect of coinfection with genogroup 1 porcine Torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 69(12), 1608-14). Los datos sugieren que el TTV porcino es patogénico en cerdos. Sin embargo, se necesitan estudios profundos adicionales con una forma biológicamente pura de virus PTTV para caracterizar definitivamente las enfermedades y lesiones asociadas con infección por PTTV.

Comparado con el TTV humano, la información genómica de PTTV es muy limitada. Actualmente, sólo una secuencia genómica de longitud completa y dos de longitud cuasi-completa de PTTV se reportan de cerdos en Japón y Brasil, respectivamente (Niel, C.,

000012

Diniz-Mendes, L., y Devalle, S. (2005). Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. J Gen Virol 86(Pt 5), 1343-7; Okamoto et al., 2002, 5 supra). Entre las tres cepas PTTV conocidas, las cepas Sd-TTV31 y TTV-1p se agruparon en conjunto en el genogrupo 1 (PTTV1), mientras que TTV-2p fue la única cepa clasificada en el genogrupo 2 (PTTV2) (Niel et al., 2005, supra). Sin embargo, la clasificación del genogrupo es un concepto vago en la taxonomía 10 de virología, y se necesita una clasificación más exacta y adicional de PTTV pero sólo puede realizarse cuando están disponibles más secuencias genómicas de longitud completa de cepas PTTV nuevas que representen genotipos múltiples.

Se demostró previamente que las infecciones por PTTV 15 estuvieron extendidas en cerdos de seis países diferentes incluyendo los Estados Unidos de América, Canadá, España, China, Corea y Tailandia (McKeown, N. E., Fenaux, M., Halbur, P. G., y Meng, X. J. (2004). Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. Vet 20 Microbiol 104(1-2), 113-7).

Todavía será debatible si los TTV porcinos juegan un papel importante en la patogénesis de enfermedades específicas del cerdo. En un modelo de cerdo gnotobiótico, se demostró que la infección por PTTV1 sola no desarrolla ninguna enfermedad clínica pero induce lesiones histológicas moderadas (Krakowka, S. and Ellis, J.A., 2008. Evaluation of the effects of porcine genogroup 1 torque teno virus in gnotobiotic swine. Am J Vet Res 69, 1623-9). Los cerdos gnotobióticos que se inocularon experimentalmente

000013

con virus de síndrome respiratorio y reproductivo tanto PTTV1 y porcino (PRRSV) desarrollan dermatitis porcina clínica y síndrome de nefropatía (PDNS) (Krakowka, S., Hartunian, C., Hamberg, A., Shoup, D., Rings, M., Zhang, Y., Allan, G. y Ellis, J.A., 2008.

5 Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *Am J Vet Res* 69, 1615-22), mientras que los cerdos inoculados con circovirus tipo 2 tanto PTTV1 como porcino (PCV2) desarrollan síndrome de atrofia multisistémica posterior
 10 al destete agudo (PMWS) (Ellis et al., 2008, supra). Aunque PCV2 se considera como el agente causante primario para PMWS clínico o enfermedades asociadas con PCV (PCVAD), se observó una prevalencia más alta de infección por PTTV2 en cerdos afectados con PMWS con bajo o sin PCV2 que en cerdos no afectados con PMWS
 15 en España (Kekarainen et al., 2006, supra). Los datos sugieren colectivamente que los TTVs porcinos pueden servir como cofactores involucrados en disparar o exacerbar enfermedades en cerdos.

El TTV porcino se ha detectado en muestras de suero, heces,
 20 saliva, semen y tejido porcinos de cerdos infectados, lo que indica sus rutas de transmisión diversas que incluyen transmisiones tanto horizontales como verticales (Kekarainen et al., 2007, supra; Pozzuto, T., Mueller, B., Meehan, B., Ringler, S.S., McIntosh, K.A., Ellis, J.A., Mankertz, A. y Krakowka, S., 2009. In utero transmission of porcine Torque teno virus. *Vet Microbiol* 137, 375-9; Sibila, M., Martinez-Guino, L., Huerta, E., Llorens, A., Mora, M., Grau-Roma, L., Kekarainen, T. and Segales, J., 2009. Swine torque teno virus (TTV) infection and excretion

000014

dynamics in conventional pig farms. Vet Microbiol 139, 213-8).

Sin embargo, la detección actual de infección TTV porcina se basó principalmente en ensayos PCR convencionales. Hasta ahora, ni el ensayo serológico ni el sistema de cultivo vírico se han

5 establecido. En particular, las amplificaciones PCR jerarquizadas de las regiones conservadoras en el UTR de PTTV1 y PTTV2, respectivamente, desarrolladas por un grupo español, se han usado

ampliamente (Kekarainen et al., 2006, supra). Ya que la cantidad de virus posiblemente se asocia con la severidad de las

10 enfermedades clínicas, como se demuestra por PCVAD inducido por PCV2 (Opriessnig, T., Meng, X.J. y Halbur, P.G., 2007. Porcine

circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. J Vet Diagn Invest 19, 591-615),

será importante determinar la carga vírica del TTV porcino por

15 PCR cuantitativa en tiempo real que la presencia de ADN TTV por PCR convencional. Además, la PR en tiempo real es más confiable,

rápida y menos cara que la PCR convencional. Recientemente, se

describieron dos ensayos PCR en tiempo real basados en la sonda

20 TaqMan para detección y cuantificación de dos especies de TTV porcino (Brassard, J., Gagne, M.J., Houde, A., Poitras, E. y

Ward, P., 2009. Development of a real-time TaqMan PCR assay for

the detection of porcine and bovine Torque teno virus. J Appl

Microbiol. Nov 14, 2009, Epub ahead of print; Gallei, A., Pesch,

S., Easking, W.S., Keller, C. y Ohlinger, V.F., 2009. Porcine

Torque teno virus: Determination of viral genomic loads by

genogroup-specific multiplex rt-PCR, detection of frequent

multiple infections with genogroups 1 or 2, and establishment of

000015

viral full-length sequences. Vet Microbiol. Dec 21, 2009, Epub adelantado al impreso). Una desventaja principal de los ensayos de sonda es que pueden obtenerse resultados negativos falsos en las secuencias enlazadas a la sonda que contienen mutaciones

5 (Anderson, T.P., Werno, A.M., Beynon, K.A. y Murdoch, D.R., 2003. Failure to genotype herpes simplex virus by real-time PCR assay and melting curve analysis due to sequence variation within probe binding sites. J Clin Microbiol 41, 2135-7). Considerando el alto

grado de heterogeneidad entre las secuencias de cepas TTV

10 porcinas conocidas, se esperan variaciones en las secuencias enlazadas a la sonda para cepas de campo de PTTVs. La PCR en

tiempo real basada en SYBR verde es un método alternativo que evita este problema potencial, a pesar de su especificidad relativamente inferior, que proporciona una trayectoria universal

15 para detectar y cuantificar las variantes TTV de porcino potenciales. Por otro lado, los análisis de curva de fusión (MCA) después de PCR en tiempo real con SYBR verde aseguran una especificidad de reacción y también permite la detección

multiplexada de distintos tipos de virus (Ririe, K.M., Rasmussen,

20 R.P. y Wittwer, C.T., 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem 245, 154-60). Los métodos de PCR en tiempo real de SYBR

verde basados en MCA han sido aplicados exitosamente a varios

virus humanos y veterinarios (Gibellini, D., Gardini, F., Vitone, F., Schiavone, P., Furlini, G. y Re, M.C., 2006. Simultaneous

detection of HCV and HIV-1 by SYBR Green real time multiplex RT-PCR technique in plasma samples. Mol Cell Probes 20, 223-9;

Martinez, E., Riera, P., Sitja, M., Fang, Y., Oliveira, S. y

Maldonado, J., 2008. Simultaneous detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. Res Vet Sci 85, 184-93; Mouillesseaux, K.P., Klimpel, K.R.
5 and Dhar, A.K., 2003. Improvement in the specificity and sensitivity of detection for the Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp by increasing the amplicon size in SYBR Green real-time RT-PCR. J Virol Methods 111, 121-7; Wilhelm, S., Zimmermann, P., Selbitz, H.J. y Truyen, U., 2006. Real-time
10 PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. J Virol Methods 134, 257-60).

Actualmente, se conoce poco acerca de la respuesta humoral específica de PTTV. Ya que los ensayos basados en PCR no reflejan el curso de la infección por PTTV en cerdos, es necesario un
15 ensayo inmunosorbente ligado a la enzima eficiente (ELISA) para la detección de anticuerpo de suero PTTV para evaluar la seroprevalencia de PTTV y ayudar a caracterizar el papel de PTTV en enfermedades porcinas.

Hasta ahora, no están disponibles vacunas de subunidad, eliminadoras y vivas para TTVs porcinos. Será deseable y
20 ventajoso expresar proteínas cápsida PTTV recombinantes de diferentes genotipos para el desarrollo de vacunas de subunidad PTTV, y construir clones de ADN molecular de PTTV infecciosos de diferentes genotipos para propagar la forma biológica pura de PTTVs en sistema de cultivo celular que se usan para desarrollar vacunas eliminadoras y vivas.

000017

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una molécula de ácido
5 nucleico infecciosa ("clon de ADN infeccioso") de Torque teno
virus porcino (PTTV) que comprende una molécula de ácido nucleico
que codifica un PTTV infeccioso que contiene al menos una copia
de secuencia genómica que tiene al menos 80% de homología con una
secuencia genómica seleccionada del grupo que consiste de
10 genotipos de PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, los
clones de ADN infecciosos de PTTV establecidos en la
reivindicación 1, en donde la secuencia genómica se selecciona de
secuencias establecidas en SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID
15 NO:11, y SEQ ID NO:12.

La presente invención proporciona un plásmido biológicamente
funcional o vector vírico que contiene los genomas PTTV
infecciosos.

La presente invención proporciona una célula hospedera
20 apropiada transfectada con el plásmido de ADN de clon infeccioso
o vector vírico.

La presente invención proporciona un PTTV infeccioso
producido por células transfectadas con los clones de ADN
infecciosos de PTTV.

La presente invención también proporciona una vacuna vírica
que comprende un portador no tóxico, fisiológicamente aceptable y
una cantidad inmunogénica de un miembro seleccionado del grupo
que consiste de (a) una molécula de ácido nucleico que contiene

000018

al menos una copia de secuencia genómica que tiene al menos 80% de homología con una secuencia genómica seleccionada del grupo que consiste de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA, o su hebra complementaria, (b) un
5 plásmido biológicamente funcional o vector vírico que contiene una molécula de ácido nucleico que contiene al menos una copia de secuencia genómica que tiene al menos 80% de homología con una secuencia genómica seleccionada del grupo que consiste de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, and
10 PTTV2c-VA, o su hebra complementaria, y (c) un PTTV no patogénico infeccioso, avirulento que contiene al menos una copia de secuencia genómica que tiene al menos 80% de homología con una secuencia genómica seleccionada del grupo que consiste de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y
15 PTTV2c-VA.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la vacuna contiene virus PTTV vivos derivados de los clones infecciosos PTTV. De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la vacuna contiene virus PTTV eliminadores derivados
20 de los clones infecciosos PTTV.

La presente invención proporciona proteínas recombinantes purificadas expresadas a partir de los genes de cápsida ORF1 de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, y PTTV2c-VA en sistema de expresión bacteriana, y el uso de estas proteínas de cápsida recombinantes como vacunas de subunidad contra infecciones PTTV. En una modalidad de la presente invención, las proteínas de cápsida recombinantes para el uso como vacunas de

000019

subunidad se expresan en sistema de expresión de baculovirus y otros sistemas de vector de expresión.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, contiene además un adyuvante.

5 La presente invención proporciona además un método para inmunizar un cerdo contra infección vírica de PTTV, que comprende administrar a un cerdo una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna vírica.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el
10 método comprende administrar la proteína cápsida de subunidad recombinante, la molécula de ácido nucleico infecciosa o virus PTTV vivos al cerdo.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, el método comprende administrar la vacuna parenteralmente,
15 intranasalmente, intradérmicamente, o transdérmicamente al cerdo. De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, el método comprende administrar la vacuna intralinfoidalmente o intramuscularmente al cerdo.

La presente invención también proporciona un polinucleótido
20 aislado que consiste de la secuencia de la secuencia de nucleótido de PTTV1a-VA establecida en SEQ ID NO:9.

La presente invención también proporciona un polinucleótido aislado que consiste de la secuencia de la secuencia de nucleótido de PTTV1b-VA establecida en SEQ ID No:10.

La presente invención también proporciona un polinucleótido aislado que consiste de la secuencia de la secuencia de nucleótido de PTTV2b-VA establecida en SEQ ID No:11.

000020

La presente invención también proporciona un polinucleótido aislado que consiste de la secuencia de la secuencia de nucleótido de PTTV2c-VA establecida en SEQ ID No:12.

La presente invención proporciona además una vacuna de subunidad que comprende un fragmento inmunogenético de una secuencia de polipéptido o una proteína completa traducida de acuerdo con una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste de ORF1, ORF2, ORF1/1, y ORF2/2 de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, and PTTV2c-VA, particularmente el ORF1 que codifica la proteína de cápsida.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la secuencia de polinucleótido está seleccionada del grupo que consiste de ORF1 de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la secuencia de polinucleótido es ORF1 del genotipo PTTV PTTV1a-VA. De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, la secuencia de polinucleótido es ORF1 del genotipo PTTV PTTV1b-VA. De acuerdo aún con otro aspecto de la presente invención, la secuencia de polinucleótido es ORF1 del subtipo PTTV PTTV2c-VA.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la secuencia de polipéptido está seleccionada del grupo que consiste de la secuencia establecida en SEQ ID No:13, SEQ ID No:14, SEQ ID No:15, SEQ ID No:16, SEQ ID No:17, SEQ ID No:18, SEQ ID No:19, SEQ ID No:20, SEQ ID No:21, SEQ ID No:22, SEQ ID No:23, SEQ ID No:24, SEQ ID No:25, SEQ ID No:26, SEQ ID No:27, y SEQ ID No:28.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la secuencia de polipéptido está establecida en SEQ ID No:13. De

000021

acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la secuencia de polipéptido está establecida en SEQ ID No:14. De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, la secuencia de polipéptido está establecida en SEQ ID No:16. En una modalidad
5 específica de la presente invención, la secuencia de polipéptido es de región de terminal C (aa 310-625) de SEQ ID No:16. De acuerdo aún con otro aspecto de la presente invención, la secuencia de polipéptido está establecida en SEQ ID No:20.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente
10 invención, la vacuna contiene además un adyuvante.

La presente invención proporciona además un método para inmunizar un cerdo contra infección vírica de PTTV, que comprende administrar a un cerdo una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna que comprende un fragmento inmunogenético de una
15 secuencia de polipéptido o una proteína completa traducida de acuerdo con una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste de ORF1, ORF2, ORF1/1, y ORF2/2 de los genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA.

20 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el método comprende administrar el fragmento inmunogenético o proteína cápsida recombinante al cerdo.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, el método comprende administrar la vacuna parenteralmente, intranasalmente, intradérmicamente, o transdérmicamente al cerdo. De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, el método comprende administrar la vacuna de forma intralinfoidal o intramuscular al cerdo.

000022

La presente invención proporciona adicionalmente un método para diagnosticar infección por PTTV1 y cuantificación de carga de PTTV1, que comprende extraer ADN de una muestra que se sospecha de infección por PTTV1, realizando reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando cebadores que comprenden las secuencias establecidas en SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:30, y detectar amplificación específica de PTTV1. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la reacción en cadena de polimerasa es una PCR en tiempo real de SYBR verde.

La presente invención proporciona además un método para diagnosticar infección por PTTV2 y cuantificación de carga de PTTV2, que comprende extraer ADN de una muestra que se sospecha de infección por PTTV2, realizando reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando cebadores que comprenden las secuencias establecidas en SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:32, y detectar amplificación específica de PTTV2. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la reacción en cadena de polimerasa es una PCR en tiempo real de SYBR verde.

La presente invención también proporciona un método para detectar y diagnosticar simultáneamente PTTV1 e infección por PTTV2, que comprende extraer ADN de una muestra que se sospecha de infección por PTTV, realizando reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando cebadores que comprenden las secuencias establecidas en SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:32, y detectar PTTV1 y amplificación específica de PTTV2. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la reacción en cadena de polimerasa es una PCR en tiempo real de SYBR verde.

000023

La presente invención, además, proporciona un método para detectar y diagnosticar simultáneamente infección por PTTV1a y PTTV1b, que comprende extraer ADN de una muestra que se sospecha de infección por PTTV1, realizando una primera reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando cebadores que comprenden las secuencias establecidas en SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:34, realizando una segunda PCR usando cebadores que comprende las secuencias establecidas en SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, y SEQ ID NO:38, y detectar amplificación específica de PTTV1a y PTTV1b.

La presente invención proporciona un método para diagnosticar infección por PTTV, que comprende inmovilizar un fragmento inmunogenético de una secuencia de polipéptido traducida de acuerdo con una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste de ORF1, ORF2, ORF1/1, y ORF2/2 de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA; poner en contacto una muestra de suero de un cerdo que se sospecha de infección por PTTV con el fragmento inmunogenético inmovilizado, y detectar anticuerpo capturado específico para el fragmento inmunogenético.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la secuencia de polinucleótido está seleccionada del grupo que consiste de ORF1 de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA.

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, la secuencia de polinucleótido es ORF1 del genotipo PTTV PTTV1a-VA. De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, la secuencia de polinucleótido es ORF1 del genotipo PTTV PTTV1b-VA.

000024

De acuerdo con una modalidad adicional de la presente invención, la secuencia de polinucleótido es ORF1 del subtipo PTTV PTTV2c-VA.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la
5 secuencia de polipéptido está seleccionada del grupo que consiste de la secuencia establecida en SEQ ID No:13, SEQ ID No:14, SEQ ID No:15, SEQ ID No:16, SEQ ID No:17, SEQ ID No:18, SEQ ID No:19, SEQ ID No:20, SEQ ID No:21, SEQ ID No:22, SEQ ID No:23, SEQ ID No:24, SEQ ID No:25, SEQ ID No:26, SEQ ID No:27, y SEQ ID No:28.

10 De acuerdo con una modalidad de la presente invención, la secuencia de polipéptido está establecida en SEQ ID No:13. De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la secuencia de polipéptido está establecida en SEQ ID No:14. De acuerdo con otra modalidad de la presente invención, la secuencia de
15 polipéptido está establecida en SEQ ID No:16. De acuerdo con una modalidad adicional de la presente invención, el fragmento inmunogenético es de región de terminal C (aa 310-625) de SEQ ID No:16. De acuerdo aún con otra modalidad de la presente invención, la secuencia de polipéptido está establecida en SEQ ID
20 No:20.

La presente invención proporciona tres ensayos inmunosorbentes ligados a la enzima estandarizados (ELISA) para diagnosticar infecciones PTTV y detectar anticuerpos en el suero de cerdos infectados por genotipos PTTV PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, y todos los subtipos conocidos en especies PTTV 2.

Las pruebas de diagnóstico ELISA se basan en la proteína cápsida ORF1 recombinante expresada en baculovirus o expresada en bacterias de genotipos PTTV PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, y PTTV2c-VA.

000025

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo capturado detectado es por medio de Western blot. De acuerdo aún con otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo capturado detectado es por medio de ensayo
5 inmunosorbente ligado a la enzima (ELISA).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 Las características antes mencionadas de la invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada de la invención leída en conjunto con las figuras en las cuales:

La Figura 1A y 1B representa el diagrama esquemático de
15 estructuras genómicas, estrategias para clonación genómica y ensambles de cuatro cepas de E.U.A. prototipo de cepas del virus TTV porcino grupo 1 (especie 1) and grupo 2 (especie 2);

La Figura 2 representa distribución PASC (siglas en inglés de comparaciones de secuencia en pares) de comparaciones de
20 secuencia de nucleótido de 121 cepas TTV disponibles en la base de datos del GenBank. Se exhiben el género, especies, tipos, subtipos y variantes y sus correspondientes porcentajes de identidades de secuencia de nucleótido;

La Figura 3A ilustra un árbol filogenético construido por el método de unir los vecinos con base en las secuencias de nucleótido genómicas de longitud completa;

000026

La Figura 3B ilustra árboles filogenéticos contruidos con base en secuencias de aminoácidos deducidas de ORF1 entre siete cepas de TTV porcino;

La Figura 3C ilustra árboles filogenéticos contruidos con base en secuencias de aminoácidos deducidas de ORF1/1 entre siete cepas de TTV porcino;

La Figura 3D ilustra árboles filogenéticos contruidos con base en secuencias de aminoácidos deducidas de ORF2 entre siete cepas de TTV porcino;

La Figura 3E ilustra árboles filogenéticos contruidos con base en secuencias de aminoácidos deducidas de ORF2/2 entre siete cepas de TTV porcino;

La Figura 4 representa una alineación de las secuencias de aminoácido de longitud completa de ORF1 entre siete cepas PTTV;

La Figura 5 representa una alineación de las secuencias de aminoácido de longitud completa de ORF2 entre siete cepas PTTV;

La Figura 6A ilustra curvas de fusión de productos PCR en tiempo real de PTTV1 después de 40 ciclos de amplificaciones de plantilla estándar respectiva (indicada en azul) y 20 muestras de suero porcino;

La Figura 6B ilustra curvas de fusión de productos PCR en tiempo real de PTTV2 después de 40 ciclos de amplificaciones de plantilla estándar respectiva y 20 muestras de suero porcino;

Las Figuras 7A-7E ilustran análisis de curva de fusión (MCA) de PCR en tiempo real doble basada en SYBR verde de PTTV1/PTTV2;

La Figura 8 representa una alineación de secuencia de nucleótidos localizada en la parte de terminal N del ORF1 supuesto entre siete cepas PTTV;

000027

Las Figuras 9A y 9B representan perfiles de hidrofiliidad y regiones conservadas de los cuatro TTV2 porcino conocidos;

Las Figuras 10A-10C ilustran la expresión y purificación de proteína cápsida ORF1 de PTTV2c recombinante;

5 Las Figuras 11A-11C muestran resultados representativos de análisis Western blot de muestras de suero porcino seleccionadas;

La Figura 12 ilustra la consistencia de Western blot y ELISA basado en PTTV2c-ORF1;

10 La Figura 13 exhibe gráficos de Box-and-Whisker (diagramas de distribución de datos) del nivel de anticuerpo en suero PTTV2 por carga vírica en 138 cerdos de fuentes diferentes;

La Figura 14A ilustra una evaluación retrospectiva de la carga vírica de PTTV2;

15 La Figura 14B ilustra el nivel de anticuerpo para proteína cápsida OFR1 de PTTV2 en 10 cerdos que han crecido desde que llegaron hasta dos meses después de haber llegado;

Las Figuras 15A-15C ilustran la expresión y purificación de proteína cápsida ORF1 recombinante de PTTV1a y PTTV1b; y

20 La Figura 16 muestra ejemplos de análisis Western blot basados en PTTV1a-ORF1 de muestras de suero porcino seleccionadas de una granja de Wisconsin.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, en un ejemplo específico, los cuatro subtipos de TTV porcino novedosos anteriormente mencionados se aíslan de un cerdo macho sencillo en Virginia.

000028

En la Fig. 1A, se muestran ambos de los genomas PTTV1 y PTTV2 en negrita y los tamaños y direcciones de los cuatro ORFs supuestas (ORF1, ORF2, ORF1/1 y ORF2/2) se indican por flechas. Las regiones ricas en GC también se muestran. Los arcos de línea punteada A y D representa las regiones usadas para detección de PTTV1 y PTTV2 de muestras de suero y semen por PCR anidado, respectivamente. Los arcos de línea punteada B y C representa los dos fragmentos PCR traslapados para clonación genómica de PTTV1 mientras que los arcos de línea punteada E y F representan los dos fragmentos PCR traslapados para clonación genómica de PTTV2. Las ubicaciones de los cebadores usados en el estudio (ver Tabla 1) también se muestran en las posiciones correspondientes.

Una muestra de suero de cerdo macho (SR#5) que se mostró que es positiva para tanto PTTV1 como PTTV2 en la PCR de primera ronda, de esta manera es indicativa de carga vírica más alta, se usó para clonación genómica de longitud completa subsecuente de PTTV. Sorpresivamente, los intentos iniciales para utilizar dos conjuntos de cebador (NG372/NG373 y NG384/NG385) de una PCR inversa (Okamoto et al., 2002, supra) diseñado para la clonación de la primera cepa PTTV Sd-TTV31 para amplificar el ADN genómico del virus no fueron exitosos. No se obtuvo producto PCR después de varios ensayos. Con base en la secuencia inicial de la región A de PTTV1 y la región D de PTTV2, dos pares nuevos de cebadores (TTV1-If(SEQ ID NO:1)/TTV1-2340R(SEQ ID NO:2) y TTV1-2311F(SEQ ID NO:3)/TTV1-IR(SEQ ID NO:4)) se diseñaron posteriormente para amplificar las regiones B y C abarcando el genoma de PTTV1 supuesto, y dos pares adicionales de cebadores (TTV2-IF(SEQ ID NO:5)/TTV2-2316R(SEQ ID NO:6) y TTV2-GCF(SEQ ID NO:7)/TTV2-IR(SEQ

000029

ID NO:8)) para amplificar regiones E y F abarcando el genoma de PTTV2 supuesto, respectivamente (Fig. 1A y Tabla 1). Los cebadores TTV1-2340R(SEQ ID NO:2) y TTV1-2311F(SEQ ID NO:3) se dedujeron de una secuencia común en cepas PTTV1 Sd-TTV31 (Okamoto et al., 2002, supra) y TTV-1p (Niel et al., 2005) que está ausente en cepa PTTV2 TTV-2p (Niel et al., 2005, supra), mientras que los cebadores TTV2-2316R(SEQ ID NO:6) and TTV2-GCF(SEQ ID NO:7) se dedujeron de una secuencia de cepa TTV-2p que está ausente en las dos cepas PTTV1. Los cuatro productos PCR diferentes resultantes con tamaños esperados cada uno se insertaron en un vector de clonación de punta roma, y los plásmidos recombinantes resultantes se transformaron en *Escherichia coli*. Se identificaron ocho hasta quince clones bacterianos positivos (con color blanco) para cada constructo que representa los fragmentos B, C, E y F y posteriormente procesaron en secuencia.

Tabla 1. Cebadores de oligonucleótido usados para amplificaciones de PCR agrupada y PCR genómica de virus porcinos

Cebador ID	Secuencia (5' hasta 3')	Usado para:
TTV1-mF		
(SEQ ID NO:45)	TACACTTCGGGTTTCAGGAGGCT	Detección de TTV1 de porcino
TTV1-mR		
(SEQ ID NO:46)	ACTCAGCCATTTCGGAACCTCAC	Detección de TTV1 de porcino
TTV1-nF		
(SEQ ID NO:47)	CAATTTGGCTCGCTTCGCTCGC	Detección de TTV1 de porcino
TTV1-nR		
(SEQ ID NO:48)	TACTTATATTCGCTTTTCGTGGGAAC	Detección de TTV1 de porcino

000030

	TTV2-mF			
	(SEQ ID NO:49)	AGTTACACATAACCACCAAACC	Detección de TTV2 de porcino	
	TTV2-mR			
	(SEQ ID NO:50)	ATTACCGCCTGCCCCGATAGGC	Detección de TTV2 de porcino	
5	TTV2-nF			
	(SEQ ID NO:51)	CCAAACCACAGGAAACTGTGC	Detección de TTV2 de porcino	
	TTV2-nR			
	(SEQ ID NO:52)	CTTGACTCCGCTCTCAGGAG	Detección de TTV2 de porcino	
	TTV1-IF			
10	(SEQ ID NO:1)	CATAGGGTGTAACCAATCAGATTTAAGGCGTT	Clonación	genómica
	(fragmento B)			
	TTV1-2340R			
	(SEQ ID NO:2)	GGTCATCAGACGATCCATCTCCCTCAG	Clonación	genómica
	(fragmento B)			
15	TTV1-2311F			
	(SEQ ID NO:3)	CTTCTGAGGGAGATGGATCGTCTGATGA	Clonación	genómica
	(fragmento C)			
	TTV1-IR			
	(SEQ ID NO:4)	TTGAGCTCCCGACCAATCAGAATTGACT	Clonación	genómica
20	(fragmento C)			
	TTV2-IF			
	(SEQ ID NO:5)	TTGTGCCGGAGCTCCTGAGAGC	Clonación genómica (fragmento E)	
	TTV2-2316R			
	(SEQ ID NO:6)	AGGTGCTTGAGGAGTCGTCGCTTG	Clonación genómica (fragmento E)	
	TTV2-GCF			

(SEQ ID NO:7) CTCAAGCACGAGCAGTGGATCCTCTCA Clonación genómica (fragmento F)

TTV2-IR

(SEQ ID NO:8) TACCCAGGCGGTTAGACACTCAGCTCT Clonación genómica (fragmento F)

Inesperadamente, se identificaron dos grupos de datos de secuencia de cada constructo, lo que indica que existen dos tipos de PTTVs en el genogrupo 1 y genogrupo 2 del mismo cerdo. Con objeto de diferenciar y ensamblar las cuatro cepas PTTV, se realizaron comparaciones de secuencia junto con las tres cepas PTTV conocidas, Sd-TTV31, TTV-1p y TTV-2p (Fig. 1B y 1C).

La Fig. 1B ilustra la diferenciación y ensamble de secuencias genómicas de longitud completa de cepas PTTV1 PTTV1a-VA y PTTV1b-VA con fragmentos PCR B y C que se clonaron posteriormente. Los codones de inicio de ORF1 y ORF2 en el fragmento B así como los codones de terminación de ORF1 en el fragmento C se marcan por "^" o "*". Las secuencias correspondientes de dos cepas PTTV1 conocidas, Sd-TTV31 y TTV-1p, también se muestran. Se somborean las secuencias conservadas, y las punteadas indican eliminaciones de nucleótido.

Para PTTV1, el codón ATG de inicio y el codón TGA de terminación del ORF1 supuesto se localizaron en los fragmentos B y C, respectivamente (Fig. 1B). Las posiciones de los codones fueron diferentes en dos grupos PTTV1, el primero idéntico a Sd-TTV31 y el segundo idéntico a TTV-1p (Fig. 1B). Además, los codones de inicio ORF2 en los dos grupos también se localizaron en posiciones diferentes consistentes con la de ORF1. Por otro

000032

lado, los análisis filogenéticos que usan cuatro secuencias diferentes de la región B (dos de los datos de procesado en secuencia y dos de las cepas Sd-TTV31 y TTV-1p) y cuatro secuencias diferentes de la región C soportan que la primera
5 secuencia se agrupó con Sd-TTV31 y la segunda se agrupó con TTV-1p (datos no mostrados). Por lo tanto, los solicitantes fueron capaces de diferenciar y ensamblar dos grupos de datos de secuencia de ambos fragmentos B y C en dos genomas PTTV1 de longitud completa que se designaron como cepas PTTV1a-VA (SEQ ID
10 NO:9) y PTTV1b-VA (SEQ ID NO:10), respectivamente (Fig. 1B).

La Fig. 1C ilustra la diferenciación y ensamble de secuencias genómicas de longitud completa de cepas PTTV2 PTTV2b-VA y PTTV2c-VA con fragmentos PCR E y F que se clonaron posteriormente. La secuencia correspondiente de cepa TTV-2p se
15 incluye y se somborean las secuencias conservadas. Las punteadas indican eliminaciones de nucleótido. Los nucleótidos únicos dentro de la región traslapada (recuadro con línea punteada) para cada cepa (nucleótidos "AG" continuos para PTTV2b-VA (SEQ ID NO:11) y dos nucleótidos "A" y "G" sencillos para PTTV2c-VA (SEQ
20 ID NO:12)) se muestran, respectivamente.

La diferenciación de las dos cepas PTTV2 fue más fácil. Los nucleótidos "AG" continuos únicos localizados en la región traslapada de dos fragmentos PCR se sombreó por dos grupos de datos de secuencia de los fragmentos E y F, respectivamente (Fig. 1C). La secuencia genómica de longitud completa ensamblada representa una cepa PTTV2 y se designó como PTTV2b-VA (SEQ ID NO:11). Similarmente, la secuencia genómica completa de una segunda cepa designada como PTTV2c-VA (SEQ ID NO:12) se ensambló

000033

con base en dos nucleótidos sencillos únicos "A" y "G" compartidos en la región traslapada por otro conjunto de datos de secuencia de los fragmentos E y F, respectivamente (Fig. 1C). Los análisis filogenéticos que usan cuatro secuencias de los fragmentos E y F junto con las dos secuencias correspondientes de TTV-2p también soportan esta asignación (datos no mostrados).

La presente invención proporciona cuatro genotipos del virus TTV porcino aislado o subtipos que están asociados con infecciones víricas en cerdos. Esta invención incluye, pero no se limita a, genotipos de virus TTV porcino o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA, los genotipos de virus o subtipos que tienen las secuencias de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:9 (PTTV1a-VA), SEQ ID NO:10 (PTTV1b-VA), SEQ ID NO:11 (PTTV2b-VA), y SEQ ID NO:12 (PTTV2c-VA), su equivalente funcional o hebra complementaria. Se entenderá que los derivados de secuencia de nucleótido específicos de cualquier TTV porcino tendrán variaciones ligeras que existen naturalmente entre virus individuales. Estas variaciones en las secuencias pueden apreciarse en eliminaciones, sustituciones, inserciones y similares.

La estructura genómica propuesta para cada una de las cuatro cepas se analizó en detalle y se resume en la Tabla 2, junto con las tres cepas PTTV conocidas, Sd-TTV31, TTV-1p y TTV-2p. Las cuatro cepas E.U.A. de PTTV tienen un tamaño genómico similar de 2,878 bp (PTTV1a-VA SEQ ID NO:9), 2,875 bp (PTTV1b-VA SEQ ID NO:10), 2,750 bp (PTTV2b-VA SEQ ID NO:11), y 2,803 bp (PTTV2c-VA SEQ ID NO:12), respectivamente. Tanto PTTV1a-VA (SEQ ID NO:9) como Sd-TTV31 tienen la misma longitud genómica. Las secuencias

. 000034

publicadas de las cepas TTV-1p y TTV-2p todas tienen muchos nucleótidos indeterminados en la región rica en GC del UTR. Después del llenado artificial de estos nucleótidos con las secuencias de consenso correspondientes a PTTV1 y PTTV2, se

5 mostró que el TTV-1p está más cercanamente relacionados a PTTV1b-VA (SEQ ID NO:10), y que TTV-2p está más cercanamente relacionado a PTTV2b-VA (SEQ ID NO:11) en longitud genómica, respectivamente (datos no mostrados).

Las secuencias genómicas ensambladas de genotipos de virus

10 TTV porcino o subtipos PTTV1a-VA (SEQ ID NO:9), PTTV1b-VA (SEQ ID NO:10), PTTV2b-VA (SEQ ID NO:11), y PTTV2c-VA(SEQ ID NO:12) se exponen al Genbank® (Nucleic Acids Research, enero 2008; 36(publicación de base de datos):D25-30) con números de acceso GU456383, GU456384, GU456385, y GU456386, respectivamente.

Tabla 2. Comparación de la organización genómica y ORFs de las siete cepas de TTV porcino

Virus	TTV Porcino especie 1				TTV Porcino especie 2		
	Tipo 1a		Tipo 1b		Subtipo 2a	Subtipo 2b	Subtipo 2c
Cepa	PTTV1a-VA	Sd-TTV31	PTTV1b-VA	TTV-1p	TTV-2p	PTTV2b-VA	PTTV2c-VA
País	EUA	Japón	EUA	Brasil	Brasil	EUA	EUA
Longitud completa (nt)	2878	2878	2875	Incompleto	Incompleto	2750	2803
# de acceso al GenBank	GU456383	AB076001	GU456384	AY823990	AY823991	GU456385	GU456386
Caja TATA	288-291	288-291	288-291	288-291	233-236	233-236	285-288
Extremo mARN 5' supuesto	316	316	316	316	261	261	313
ORF1							
Tamaño(aa)	635	635	639	637	624	625	625

000035

	Exon#	1	1	1	1	1	1	
	Inicio	534	534	517	517	476	476	528
	Terminación	2441	2441	2436	2430	2350	2353	2405
	ORF2							
	Tamaño(aa)	73	73	72	72	68	68	68
5	# de Exón	1	1	1	1	1	1	1
	Inicio	430	430	428	428	393	393	445
	Terminación	651	651	646	646	599	599	651
	ORF1/1							
	Tamaño(aa)	174	174	182	182	178	178	178
	# de Exón	2	2	2	2	2	2	2
	Inicio	534	534	517	517	476	476	528
10	Empalmado	647/648	647/648	642/643	642/643	595/596	595/596	647/648
		2030/2031	2030/2031	2013/2014	2007/2008	1933/1934	1936/1937	1988/1989
	Terminación	2441	2441	2436	2430	2350	2353	2405
	ORF2/2(ORF3)							
	Tamaño(aa)	224	224	228	228	199	199	199
	# de Exón	2	2	2	2	2	2	2
	Inicio	430	430	428	428	393	395	445
15	Empalmado	647/648	647/648	642/643	642/643	595/596	595/596	647/648
		2030/2031	2030/2031	2013/2014	2007/2008	1933/1934	1936/1937	1988/1989
	Terminación	2487	2487	2485	2479	2330	2333	2385
	Señal de poliadenilación	2458-2463	2458-2463	2462-2467	2456-2461	2473-2478	2476-2481	2528-2533
	(AATAAA)							

20 Los números (excepto los tamaños del genoma de longitud completa, ORFs y los números de exón) indican las posiciones de nucleótido (nt) en el genoma de cepas PTTV respectivas.

Dos estudios recientes han identificado los mARNs víricos transcritos y la expresión de al menos seis proteínas víricas durante la replicación TTV humana (Mueller et al., 2008, supra; Qiu et al., 2005, supra), que es más que el número predicho de ORFs codificadas por TTV humano (Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Takahashi, M., Kishimoto, J., Sai, T., y Sugai

000036

(2000b). TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochem Biophys Res Commun* 279(2), 700-7), por lo tanto se incluye la nueva información genómica TTV humana para comparación con las secuencias PTTV. Los extremos 5' de los transcriptos de mARN de cepa TTV humana P/1C1 se mapearon a una "A" que es 25 nt cadena debajo de la caja TATA (Mueller et al., 2008, supra). Este punto de partida, su secuencia adyacente (CGAATGGCTGAGTTTATGCCGC (SEQ ID NO:39); el punto de partida se subrayó) y la distancia de la caja TATA cadena arriba (24 nt; Tabla 2) están muy conservadas en las siete cepas PTTV, lo que sugiere que PTTV y TTV humano pueden utilizar un extremo 5' común del mARN para traducción.

Se identificaron cinco regiones completamente conservadas adicionales en la vecindad de la caja TATA entre las siete cepas PTTV. Dos regiones de 11 nt cada una (AGTCCTCATTT (SEQ ID NO:40) y AACCAATCAGA (SEQ ID NO:41)) fueron localizadas en cadena arriba de la caja TATA, mientras que las tres regiones restantes (CTGGGCGGGTGCCGGAG de 17 nt (SEQ ID NO:42); CGGAGTCAAGGGGC de 14 nt (SEQ ID NO:43); TATCGGGCAGG de 11 nt (SEQ ID NO:44)) se localizan entre el extremo 5' propuesto del mARN y el codón de inicio de ORF2. Estas secuencias específicas de PTTV conservadas pueden contener los elementos comunes que regulan la expresión del gen vírico.

Previamente, tres ORFs (ORFs 1-3) se propusieron en el genoma de las tres cepas PTTV conocidas, respectivamente (Niel et al., 2005, supra; Okamoto et al., 2002, supra). Las cuatro cepas de E.U.A. prototipo de PTTV identificado en este estudio poseen esta estructura. El ORF3 correspondiente en TTV humano se ha

000037

renombrado como ORF2/2 ya que inicia en el mismo ATG en ORF2 y se mantiene en el mismo ORF (ORF2 extendido) después del empalme (Fig. 1A) (Mueller et al., 2008, supra; Qiu et al., 2005, supra). Se ha seguido la nomenclatura de TTV humano para revisar la clasificación de PTTV en este estudio. El TTV humano ORF1/1 es una proteína vírica recientemente identificada que se codifica por dos exones en ORF1 (Qiu et al., 2005, supra). ORF1/1 comparte la parte terminal N y C con ORF1. La contraparte PTTV ORF1/1 se identificó en las siete cepas PTTV (Fig. 1A y Tabla 2).

El ORF1 y ORF2 se codificaron por un mRNA vírico de ~2.8 kb mientras que el ORF1/1 y ORF2/2 se codificaron por un mRNA vírico empalmado con ~1.2 kb en TTV humano (Mueller et al., 2008, supra; Qiu et al., 2005, supra). Ya que estos cuatro ORFs también se dedujeron en genomas PTTV, y ya que las secuencias y posiciones del donador de empalme supuesto y sitios aceptores en las siete cepas PTTV son muy conservadas (Tabla 2), se especula que el TTV porcino probablemente también codifica los dos mRNAs correspondientes.

La mayoría de las cepas TTV humanas comparten una similitud genética con el CAV, que codifica una proteína que induce la apoptosis de TTV (TAIP) en la cual su contraparte CAV se nombró apoptina (de Smit, M. H., y Noteborn, M. H. (2009). Apoptosis-inducing proteins in chicken anemia virus and TT virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 131-49). El ORF de TAIP se incrusta dentro del ORF2. Sin embargo, el TAIP correspondiente no existe en el TTV porcino. Un estudio reciente muestra que se requirió la expresión de apoptina o TAIP para replicación de CAV en células cultivadas (Prasetyo, A. A., Kamahora, T., Kuroishi, A.,

000038

Murakami, K., y Hino, S. (2009). La replicación del virus de anemia del pollo (CAV) requiere apoptina y se complementa por VP3 de torque teno virus (TTV) humano. *Virology* 385(1), 85-92).

Las comparaciones de secuencia en pares (PASC) es un método
5 útil que agrupa la distribución de frecuencia de porcentajes de
identidad de secuencia de nucleótido en pares a partir de la
secuencia genómica disponible de virus en la misma familia (Bao,
Y., Kapustin, Y., y Tatusova, T. (2008). *Virus Classification by*
Pairwise Sequence Comparison (PASC). En "Encyclopedia of
10 *Virology, 5 vols.*" (B. W. J. Mahy, y M. H. V. Van Regenmortel,
Eds.), Vol. 5, pp. 342-8. Elsevier, Oxford). Los picos diferentes
generados por el programa PASC usualmente representan grupos de
géneros de virus, especies, tipos, subtipos y cepas (Fig. 2). En
este estudio, se ha realizado análisis PASC de TTV que usan 121
15 secuencias genómicas de longitud completa de cepas relacionadas
con TTV humano y animal disponibles en la base de datos del
GenBank (Fig. 2). Suponiendo que los miembros TTV se clasifican
en una familia separada, *Anelloviridae*, los dos picos
principales, a 36-55% y 55-67% de identidad de secuencia de
20 nucleótido, representan grupos de géneros y especies,
respectivamente (Fig. 2). En consecuencia, un tipo de TTV se
define como un grupo de TTV que tiene 67-85% de identidad de
secuencia de nucleótido mientras que un subtipo de TTV puede
definirse como un grupo de secuencias TTV que comparten 85-95% de
identidad de secuencia de nucleótido. Las cepas TTV que comparten
más del 95% de identidad de secuencia de nucleótido pueden
clasificarse además en variantes (Fig. 2). Una clasificación
similar se ha propuesto usando secuencias de 103 aislados TTV por

Jelcic et al (Jelcic, I., Hotz-Wagenblatt, A., Hunziker, A., Zur Hausen, H., y de Villiers, E. M. (2004). Isolation of multiple TT virus genotipos from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. J Virol 78(14), 7498-507).

Estos criterios propuestos de clasificación TTV se aplicaron a los análisis filogenéticos de las secuencias genómicas de las 4 cepas de E.U.A. prototipo de PTTV y las otras 3 cepas PTTV conocidas. La comparación en pares de secuencias de nucleótidos de longitud completa entre estas cepas demuestra que las cuatro cepas PTTV1 tienen 54.0-56.4% de identidad de secuencia de nucleótido comparado con las tres cepas PTTV2 (Tabla 3). Por lo tanto, el "genogrupo" previamente designado de PTTV en la literatura probablemente será más apropiado para designarse como "especies", y PTTV1 y PTTV2 probablemente debieran representar especies de TTV porcino 1 y especies 2, respectivamente. Las especies PTTV 1 consisten de dos tipos de virus designados como tipo 1a (incluyendo Sd-TTV31 y PTTV1a-VA (SEQ ID NO:9)) y tipo 1b (incluyendo TTV-1p y PTTV1b-VA (SEQ ID NO:10)), respectivamente, ya que la identidad de secuencia de nucleótido entre estos dos tipos de virus está entre 69.8-70.7% (Tabla 3). Se reconocen Sd-TTV31 y TTV1a-VA (SEQ ID NO:9) como cepas variantes de la misma especie debido a su identidad de secuencia más alta (95.1%). Sin embargo, las dos cepas tipo 1b, TTV-1p y PTTV1b-VA (SEQ ID NO:10), pueden pertenecer a dos subtipos diferentes (identidad de secuencia de nucleótido=86.4%). Para especies PTTV 2, posiblemente se clasifican tres cepas en subtipos separados (TTV-2p para subtipo 2a, PTTV2b-VA (SEQ ID NO:11) para subtipo 2b, y

000040

PTTV2c-VA (SEQ ID NO:12) para subtipo 2c, respectivamente) con base en su 86.5-90.9% de identidad de secuencia de nucleótido. Este sistema de clasificación nuevo propuesto para PTTV fue claramente evidente en el árbol filogenético (Fig. 3A). Los árboles filogenéticos contruidos con base en las secuencias de aminoácidos deducidas de ORF1, ORF1/1, ORF2 y ORF2/2 de PTTV también fueron consistentes con esta clasificación propuesta (Figs. 3B hasta 3E).

Tabla 3. Comparación de secuencias en pares de la secuencia genómica de longitud completa de las siete cepas de TTV porcino

TTV Porcino especie 1				TTV Porcino especie 2		
Tipo 1a		Tipo 1b		Subtipo 2a	Subtipo 2b	Subtipo 2c
PTTV1a-VA	Sd-TTV31	PTTV1b-VA	TTV-1p	TTV-2p	PTTV2b-VA	PTTV2c-VA
Tipo 1a						
PTTV1a-VA	95.1	70.5	69.8	55.7	55.1	56.2
Sd-TTV31	—	70.7	70.1	55.9	56.0	56.4
Tipo 1b						
PTTV1b-VA		—	86.4	54.0	54.7	55.2
TTV-1p			—	55.2	54.7	55.4
Subtipo 2a						
TTV-2p				—	86.5	86.8
Subtipo 2b						
PTTV2b-VA					—	90.9
Subtipo 2c						
PTTV2c-VA						—

Los datos se generaron usando el programa PASC, y los valores indican el % de identidades de secuencia de nucleótido.

000041

Las mutaciones y eliminaciones y/o inserciones únicas se dispersaron a través de los genomas entre las especies, tipos y subtipos PTTV. Por ejemplo, la ubicación de los codones de inicio y terminación de ORF1 y los codones de inicio ORF2 entre el PTTV tipo 1a y 1b, que se muestra en la Fig. 1B como se menciona arriba, son diferentes. Las dos cepas PTTV1b también tienen una eliminación de 2 codones después del inicio ORF2 comparado con PTTV1a (Fig. 1B).

De forma notable, tanto TTV-2p como PTTV2b-VA tienen una eliminación de 52-nt de largo, que tiene 39 nt cadena arriba de la primera secuencia conservada de 11-nt (AGTCCTCATTT (SEQ ID NO:40)) en el UTR, comparado con PTTV2c-VA. Debido a esta eliminación, el tamaño genómico de PTTV2b-VA (probablemente TTV-2p también) fue significativamente más pequeño que el de PTTV2c-VA (Tabla 2). Un número de clones TTV humanos "subvíricos" se han aislado de las muestras de suero que se consideran como genomas TTV de longitud completa ya que los ORFs en una mayoría de estas moléculas subvíricas usualmente se mantienen intactos (de Villiers et al., 2009; Leppik et al., 2007). Hay longitudes variables en el UTR que se eliminan completamente o parcialmente. La situación de TTV-2p y PTTV2b-VA parece semejar a la de las moléculas subvíricas TTV humanas, lo que implica que los subtipos PTTV2a y PTTV2b pueden ser las moléculas subvíricas derivadas del subtipo PTTV2c. De notar, la secuencia de terminal 3' de un cebador PCR anidado TTV2-nF (Tabla 1) que se usa comúnmente para la detección del PTTV2 de muestras de campo por otros grupos (Ellis et al., 2008, supra; Kekarainen et al., 2007, supra; Kekarainen et al., 2006, supra; Krakowka et al., 2008, supra)

localiza en ambos lados de la eliminación. Por lo tanto, el ensayo PCR anidado actual para detección de PTTV2 posiblemente no sea suficiente para identificar las cepas genéticamente diversas del subtipo PTTV2c.

5 La fuente de cepa de virus aislados es de las muestras de suero, heces, saliva, semen y tejido de cerdos que tienen la infección vírica TTV porcina. Sin embargo, se contempla que puede usarse tecnología de ADN recombinante para duplicar y sintetizar químicamente la secuencia de nucleótidos. Por lo tanto, el
10 alcance de la presente invención abarca el polinucleótido aislado que comprende, pero no se limita a, una secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, and SEQ ID NO:12, o su hebra complementaria; un polinucleótido que hibridiza a y es al menos al menos 67% complementario con la
15 secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, and SEQ ID NO:12, preferiblemente 85% complementario, o más preferiblemente 95% complementario; o un fragmento inmunogénico seleccionado del grupo que consiste de una secuencia de aminoácidos de proteína ORF1 establecida en SEQ ID
20 NO:13 (PTTV1a-VA), SEQ ID NO:14 (PTTV1b-VA), SEQ ID NO:15 (PTTV2b-VA), SEQ ID NO:16 (PTTV2c-VA), una secuencia de aminoácidos de proteína ORF2 establecida en SEQ ID NO:17 (PTTV1a-VA), SEQ ID NO:18 (PTTV1b-VA), SEQ ID NO:19 (PTTV2b-VA), SEQ ID NO:20 (PTTV2c-VA), una secuencia de aminoácidos de proteína ORF1/1 establecida en SEQ ID NO:21 (PTTV1a-VA), SEQ ID NO:22 (PTTV1b-VA), SEQ ID NO:23 (PTTV2b-VA), SEQ ID NO:24 (PTTV2c-VA), una secuencia de aminoácidos de proteína ORF2/2 establecida en SEQ ID NO:25 (PTTV1a-VA), SEQ ID NO:26 (PTTV1b-VA), SEQ ID NO:27

000043

(PTTV2b-VA), SEQ ID NO:28 (PTTV2c-VA). Las regiones de codificación inmunogénicas o antigénicas o fragmentos pueden determinarse por técnicas conocidas en el campo y luego usarse para hacer anticuerpo monoclonales o policlonales para selección
 5 inmunoreactiva u otros propósitos de diagnóstico. La invención abarca además la proteína inmunogénica, purificada, codificada por los polinucleótidos aislados. De forma deseable, la proteína puede ser una proteína ORF1 aislada o recombinante o una proteína ORF2 de al menos uno de los subtipos TTV porcino aislados de
 10 arriba, más deseablemente la proteína ORF1.

La ORF1 de TTV porcino se considera que codifica una proteína asociada con la replicación y estructural (Maggi, F., y Bendinelli, M. (2009). Immunobiology of the Torque teno viruses and other anelloviruses. Curr Top Microbiol Immunol 331, 65-90).
 15 Los productos que codifican ORF1 de siete cepas PTTV tienen 624-635 aa en longitud y poseen un alto número de residuos de arginina en la terminal N que se piensa que tienen la actividad de enlace al ADN (Fig. 4). En la Fig. 4, se somborean las secuencias conservadas. Las líneas punteadas indican
 20 eliminaciones de aminoácidos. Las porciones RCR se encuadran con líneas sólidas. Tres HVRs (PTTV1-HVRs 1, 2 y 3) de las cepas PTTV1 y dos HVRs (PTTV2-HVRs 1 y 2) de las cepas PTTV2 se encuadran con líneas punteadas. Los límites de conexión de ORF1/1 se indican por flechas. Las porciones de replicación de círculo giratorio (RCR) predichas (Ilyina, T. V., y Koonin, E. V. (1992). Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaebacteria. Nucleic Acids Res

000044

20(13), 3279-85) se presentan en diferentes posiciones en diferentes tipos de PTTV y subtipos que pueden ser específicos de tipo o subtipo. La porción RCR III (YxxK) se conserva en el PTTV tipo 1a (posición aa 14-17 de PTTV1a-VA SEQ ID NO:13) y cepas tipo 1b (posición aa 379-382 de PTTV1b-VA SEQ ID NO:14),
 5 respectivamente, mientras que la misma porción conservada identificada en las tres cepas PTTV2 es localizada en la posición aa 482-485 de PTTV2b-VA SEQ ID NO:15 (Fig. 4). Tanto PTTV2b-VA SEQ ID NO:15 como PTTV2c-VA SEQ ID NO:16 también tienen una
 10 porción RCR II (HxQ) conservada en la posición aa 331-333 de PTTV2b-VA que está ausente en TTV-2p (Fig. 4).

Las proteínas ORF1 de cepas PTTV entre especies 1 y especies 2 comparten una identidad de secuencia aa muy baja con sólo 22.4 hasta 25.8%, lo que hace difícil identificar secuencias aa
 15 conservadas de forma importante entre las dos especies (Fig. 4). En PTTV especie 1, la identidad aa de ORF1 entre las cepas tipo 1a y 1b son 50.3-52.7%. Se identificaron tres regiones hipervariables principales (HVR), PTTV1-HVRs 1 hasta 3, con un número relativamente alto de sustituciones aa, entre las cuatro
 20 cepas PTTV1, mientras que se observaron dos HVRs (PTTV2-HVRs 1 y 2) entre las tres cepas PTTV2 (Fig. 4). Las tres cepas PTTV2 tienen una eliminación de aproximadamente 20-aa en la región PTTV1-HVR1 correspondiente. Por otro lado, los dos HVRs de PTTV2 están dentro de la región PTTV1-HVR3 correspondiente (Fig. 4). Estos HVRs se localizan sólo en el ORF1 pero no en el ORF1/1 truncado. Posiblemente juegan un papel en evadir la sobrevivencia inmunitaria del hospedero y auxilian a PTTV a establecer una

000045

infección persistente, como se sugiere por los estudios de TTV humano.

Las secuencias aa de ORF2 difieren considerablemente entre las cuatro cepas PTTV1 (PTTV1a-VA SEQ ID NO:17; PTTV1b-VA SEQ ID NO:18) y tres cepas PTTV2 (PTTV2b-VA SEQ ID NO:19; PTTV2c-VA SEQ ID NO:20) (Fig. 5). Sin embargo, comparten una porción tipo proteína tirosina fosfatasa (PTPasa) conservada (Wx₇Hx₃CxCx₅H) en la terminal N (Fig. 4). Esta porción también se conserva entre todas las cepas TTV, TTMV y TTMDV humanas así como CAV. La TTMV o proteína CAV ORF2 también exhiben una actividad de serina/treonina fosfatasa (S/T PPasa) (Peters, M. A., Jackson, D. C., Crabb, B. S., y Browning, G. F. (2002). Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase. *J Biol Chem* 277(42), 39566-73). La especificidad doble de la proteína ORF2 se piensa que regula la transcripción del gen hospedero, transducción de señal y respuesta citocínica durante la replicación vírica. Recientemente, los análisis de mutagénesis de dos residuos aa básicos conservados antes del último residuo de histidina de la porción en CAV revelan que los dos residuos afectan la replicación del virus, citopatología in vitro y atenuación in vivo (Peters, M. A., Crabb, B. S., Washington, E. A., y Browning, G. F. (2006). Site-directed mutagenesis of the VP2 gene of Chicken anemia virus affects virus replication, cytopathology and host-cell MHC class I expression. *J Gen Virol* 87(Pt 4), 823-31; Peters, M. A., Crabb, B. S., Tivendale, K. A., y Browning, G. F. (2007). Attenuation of chicken anemia virus by site-directed mutagenesis of VP2. *J Gen Virol* 88(Pt 8), 2168-75). Los dos residuos aa básicos ("KK") se conservan en las tres cepas

000046

PTTV2. Sin embargo, sólo el primer residuo básico ("R") se mantiene en las dos cepas PTTV1a mientras que ambos residuos están sustituidos en las cepas PTTV1b (Fig. 5). En la Fig. 5, las punteadas indica eliminaciones de aminoácidos. Los cinco aminoácidos conservados dentro de la porción común $Wx_7Hx_3Cx_5H$ (subrayados) identificados en TTV, TTMV y CAV se sombrean. Las posiciones de los dos residuos aa básicos antes de la última histidina de la porción, que se han mostrado que afectan la replicación de virus, citopatología o atenuación in vivo en CAV, se indican por "^".

En resumen, la presente invención ha determinado las secuencias genómicas de longitud completa de cuatro cepas de TTV porcino que representan diferentes genotipos o subtipos en una muestra de suero de un cerdo macho sencillo en Virginia. El hallazgo de este estudio indica claramente que, igual que TTV humano, las infecciones PTTV múltiples con distintos genotipos o subtipos existen y probablemente son comunes en cerdos. También se ha proporcionado información nueva con respecto a la organización genómica, el grado de variabilidad y las características de las porciones de nucleótido y aminoácido conservadas de PTTV, que mejorarán el ensayo de detección PCR actual, ayudan en desarrollar reactivos para diagnóstico serológico y auxilian a iniciar el estudio estructural y funcional de PTTV. También se proporciona una nueva clasificación de PTTV en este estudio con base en los análisis filogenéticos y genéticos de las secuencias genómicas de siete cepas PTTV conocidas.

000047

La presente invención también proporciona métodos para el diagnóstico de infección por TTV porcino al detectar ADN vírico en muestras de cerdos infectados con TTV porcino u otros mamíferos. Una modalidad preferida de la presente invención involucra métodos para detectar secuencias de ácido nucleico de TTV porcino en una especie porcina u otro mamífero usando los cebadores de oligonucleótido para reacción en cadena de polimerasa (PCR) para auxiliar además en el diagnóstico de la infección vírica o enfermedad. Las pruebas de diagnóstico, que son útiles para detectar la presencia o ausencia de la secuencia de ácido nucleico vírico de TTV porcino en especies porcinas u otros mamíferos, comprende aislar ADN vírico de muestras de cerdos infectados con TTV porcino o cerdos que se sospecha que tienen infección de TTV, y realizar PCR cuantitativa en tiempo real de SYBR verde usando cebadores específicos de PTTV1 (SEQ ID NO:29/ SEQ ID NO:30) o específicos de PTTV2 (SEQ ID NO:31/ SEQ ID NO:32).

En otra modalidad de la presente invención, el método de diagnóstico puede adaptarse para detectar simultáneamente PTTV1 y PTTV2 usando PCR en tiempo real doble PTTV1/PTTV2. Más específicamente, el método comprende aislar el ADN vírico de muestras de cerdos infectados con TTV porcino o cerdos que se sospecha que están infectados de TTV, realizar PCR en tiempo real usando tanto cebadores específicos de PTTV1 (SEQ ID NO:29/ SEQ ID NO:30) como específicos de PTTV2 (SEQ ID NO:31/ SEQ ID NO:32) en la misma reacción PCR en tiempo real. Ya que el valor T_m entre PTTV1 y PTTV2 puede distinguirse MCA, la presencia de ADN PTTV1 y PTTV2 puede detectarse simultáneamente.

000048

En una modalidad adicional de la presente invención, el método de diagnóstico puede emplear PCR de anidado doble. El método comprende aislar ADN vírico de muestras de cerdos infectados con TTV porcina o cerdos que se sospecha que tienen
5 infección de TTV, realizar una primera ronda de PCR usando un par de cebadores Plab-mF (SEQ ID NO:33)/Plab-mR (SEQ ID NO:34), y realizar una segunda ronda de PCR usando una mezcla de dos pares de cebadores, Pla-nF (SEQ ID NO:35)/Pla-nR (SEQ ID NO:36) para detección de PTTV1a, y Plb-nF (SEQ ID NO:37)/Plb-nR (SEQ ID
10 NO:38) para detección de PTTV1b, y visualizar los productos PCR.

Los métodos de diagnóstico anteriores pueden optimizarse por alguien experto en la técnica de acuerdo a métodos bien conocidos en la técnica.

En consecuencia, una modalidad de la presente invención
15 desarrolla dos ensayos PCR en tiempo real de SYBR verde de plexado sencillo novedosos para cuantificar las cargas víricas de dos especies TTV porcino, respectivamente. Se diseñaron cebadores específicos de PTTV1 y PTTV2 para dirigir las regiones extremadamente conservadas a través de seis PTTV1 y cuatro PTTV2
20 genomas de longitud completa disponibles a la fecha, respectivamente. Otra modalidad de la presente invención combina los dos ensayos de plexado sencillo en un ensayo PCR en tiempo real doble seguido por MCA de los amplicones víricos que pueden identificarse por sus distintas temperaturas de fusión para eliminación simultánea de las dos especies de TTV porcino, PTTV1a y PTTV1b. En una tercera modalidad, se desarrolló un ensayo PCR anidado doble para amplificación simultánea de los ADN víricos de dos tipos de PTTV1 en PCR de primera ronda y detección

000049

diferencial de tipos 1a y 1b en la PCR de segunda ronda para la identificación de dos tipos de especies TTV porcino, PTTV1a y PTTV1b, en una muestra sencilla. Estos ensayos representan herramientas sencillas y prácticas para diagnóstico de TTVs porcinos específicos de tipo y especie.

Se identificaron las secuencias cebadoras potenciales por alineaciones de secuencia múltiple de 10 genomas de longitud completa TTV porcina disponibles. Se diseñaron cebadores TTV1F (SEQ ID NO:29) y TTV1R (SEQ ID NO:30) específicos de PTTV1 con base en dos regiones genómicas conservadas inmediatamente antes de la PRF2 supuesta a través de los seis genomas PTTV1, mientras que los cebadores TTV2F4 (SEQ ID NO:31) y TTV2R4 (SEQ ID NO:32) específicos de PTTV2 se diseñaron con base en dos regiones genómicas conservadas inmediatamente después de la ORF2/2 supuesta a través de cuatro genomas PTTV2 (Tabla 4). Los cebadores no muestran potenciales para auto-dimerización y dimerización cruzada. Los tamaños de amplicón esperados fueron un fragmento de 118-bp de los cebadores PTTV1 que corresponde al genoma PTTV1b-VA y un fragmento de 200-bp de los cebadores PTTV2 que corresponde al genoma PTTV2c-VA, respectivamente.

Tabla 4. Cebadores de oligonucleótido usados para eliminaciones por PCR en tiempo real y PCR anidada doble de TTV porcinos.

Cebador	ID	Secuencia (5' hasta 3')	Propósito
TTV1F	SEQ ID NO:29	TCCGAATGGCTGAGTTTATGC	PCR en tiempo real específica de PTTV1
TTV1R	SEQ ID NO:30	TCCGCTCAGCTGCTCCT	PCR en tiempo real específica de PTTV1
TTV2F4	SEQ ID NO:31	GGTGGTAAAGAGGATGAA	PCR en tiempo real específica de PTTV2

000050

TTV2R4		
SEQ ID NO:32	AATAGATTGGACACAGGAG	PCR en tiempo real específica de PTTV2
Plab-mF		
SEQ ID NO:33	TATCGGGCAGGAGCAGCT	PCR anidada doble
Plab-mR		
SEQ ID NO:34	TAGGGGCGCGCTCTACGT	PCR anidada doble
Pla-nF		
SEQ ID NO:35	CCTACATGAAGGAGAAAGACT	PCR anidada doble
Pla-nR		
SEQ ID NO:36	CCAGCGTCTCCAGGGTC	PCR anidada doble
Plb-nF		
SEQ ID NO:37	AAGCTACCAAGGGCTGG	PCR anidada doble
Plb-nR		
SEQ ID NO:38	GCGGTC(T/G)GTAGCGGTAGT	PCR anidada doble

De acuerdo con una modalidad específica de la presente invención, puede usarse PCR en tiempo real sencilla de SYBR verde usando cebadores específicos de PTTV1 y PTTV2 para detectar ADN de TTV1 y TTV2 porcino, respectivamente. Para PTTV1, se estableció una curva estándar sobre un intervalo de concentraciones de ADN objetivo por 25 µl. El intervalo lineal se mostró que abarca 4.4×10^1 hasta 4.4×10^8 copias. El límite de detección mínimo (44 copias) corresponde a un ciclo de umbral (C_t) de 37.57. Para PTTV2, también se generó una curva estándar y se usa para detectar la concentración de ADN en un intervalo desde 8.6×10^0 hasta 8.6×10^8 copias ppr 25 µl de reacción. El C_t correspondiente de límite de detección mínimo (8.6 copias) fue 36.53.

De acuerdo con otra modalidad específica de la presente invención, se utiliza PCR en tiempo real doble de SYBR verde para la detección simultánea de ADN de TTV1 y TTV2 de porcino. La diferencia de 7 grados del valor T_m entre PTTV1 (87.0°C) y PTTV2 (80.0°C) hace posible distinguirlos de otro por el MCA. Por lo

tanto, pueden acoplarse dos ensayos de plexado sencillo en un ensayo PCR en tiempo real doble para la detección simultánea de PTTV1 y PTTV2. Una muestra positiva fue una que tiene un pico de fusión simétrica con el T_m conocido para tal producto. Este nuevo ensayo primero se validó al usar una dilución de 10 veces de mezcla de estándares PTTV1 y PTTV2. El control negativo no de plantilla que usa agua estéril como la plantilla muestra una amplificación no específica causada por la dimerización cruzada entre los cebadores PTTV1 y PTTV2 no apreciada en los ensayos de plexado sencillo (Fig. 7a). Esto produce un pico de fundido distinto entre 72.0°C y 76.0°C. La Figura 7A muestra picos de fundido de estándar PTTV1 (rojo; $T_m=87.0^\circ\text{C}$), estándar PTTV2 (verde; $T_m=80.0^\circ\text{C}$) y control negativo no de plantilla (causado por la dimerización cruzada del cebador; negro). Las Figuras 7B-7E muestran los picos de fundido de muestras de suero representativos con cargas víricas distintas de PTTV1 y PTTV2. La Figura 7B exhibe la muestra de suero de cerdo macho no. 5: cargas víricas relativamente altas tanto de PTTV1 como PTTV2, pero PTTV2>PTTV1; la Figura 7C exhibe una muestra de suero de cerdo macho no. 12: cargas víricas relativamente altas de tanto PTTV1 como PTTV2, pero PTTV1>PTTV2; la Figura 7D exhibe la muestra de suero de cerdo macho no. 14: cargas víricas bajas de tanto PTTV1 como PTTV2; la Figura 7E exhibe la muestra de suero de cerdo macho no. 10: PTTV1 positivo, pero PTTV2 negativo. Las cargas víricas (unidad: copias genómicas/ml) de PTTV1 y PTTV2 en cada muestra se determinaron por PCR en tiempo real de plexado sencillo se indicaron en la parte superior del pico de fundido correspondiente.

000052

En un ejemplo, cuando se aplicó el ensayo en tiempo real doble a las 20 muestras de suero de cerdos macho adultos, las muestras con cargas víricas relativamente altas de tanto PTTV1 como PTTV2 exhiben dos curvas de fundido distintas que corresponden a PTTV1 y PTTV2 sin un pico de fundido no específico (Fig. 7B y 7C), mientras que las muestras con carga vírica baja de ya sea PTTV1 o PTTV2 muestran curvas de fundido no específicas así como específicas de virus (Fig. 7D y 7E). Aunque los dos picos de fundido en la muestra #14 son muy pequeños, se consideraron positivos ya que exhiben una elevación simétrica y visualmente distinta y caen en el T_m apropiado de PTTV1 y PTTV2 (Fig. 7D). En contraste, la muestra #10 se consideró sólo PTTV1 positiva debido a que un pico PTTV2 simétrico no se presentó evidentemente (Fig. 7E). Estos resultados fueron consistentes con los de los dos ensayos de plexado sencillo (Tabla 5). Por otro lado, el tamaño y la forma de los picos de fundido reflejan cualitativamente la carga vírica correspondiente en la muestra detectada.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la PCR anidada doble se usa para detección diferencial de dos tipos de TTV porcino, PTTV1a y PTTV1b.

Los inventores de la presente invención han demostrado la existencia de dos genotipos distintos, llamados tentativamente PTTV1a y PTTV1b, en especies TTV porcino 1. Para determinar además si la co-infección de PTTV1a y PTTV1b es común en cerdos, se desarrolló un ensayo PCR de anidado doble novedoso para distinguir rápidamente entre los dos. La alineación de las secuencias de ADN genómico TTV porcino identifican una

000053

genómica conservada localizada en la parte de terminal N de la ORF1 supuesta que codifica la proteína de cápsida vírica (Fig. 8). Esta región también contiene la ORF2 completa y la UTR parcial cadena arriba. Los cebadores Plab-mF (SEQ ID NO:33)/Plab-mR (SEQ ID NO:34) se diseñaron para amplificar simultáneamente los ADNs tanto PTTV1a como PTTV1b en la PCR de primera ronda. Una mezcla de cebadores específicos de PTTV1a Pla-nF (SEQ ID NO:35)/Pla-nR (SEQ ID NO:36) y cebadores específicos de PTTV1b Plb-nF (SEQ ID NO:37)/Plb-nR (SEQ ID NO:38) se usó para amplificar diferencialmente cada genotipo en la PCR de segunda ronda. Los productos de PCR finales de PTTV1a y PTTV1b fueron de 162 bp y 96 bp en tamaño, respectivamente, que pudieran distinguirse fácilmente por electroforesis en gel en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Este ensayo no se espera que detecte el ADN de PTTV2 debido a la especificidad de los cebadores (Fig. 8). En la Fig. 8, se indicaron las secuencias conservadas por puntos y sombras. Las punteadas indican eliminaciones de nucleótido. Las ubicaciones y direcciones de tres pares de cebadores usados para PCR anidada doble se marcaron por flechas.

En un ejemplo, las 20 muestras de suero de cerdos macho adultos que se sometieron al ensayo de PCR anidado doble se encontraron todas que son positivas tanto para PTTV1a como PTTV1b, como se determina al visualizar dos bandas de los tamaños esperados y la conformación de procesado por secuencia posterior de productos PCR (datos no mostrados). No se amplificaron productos PCR en las 19 muestras de semen, lo que fue consistente

000054

con los resultados de ensayos PCR anidada convencional PTTV1 y PCR en tiempo real descritos antes.

La infección de cerdos con las dos especies de TTV porcino se ha encontrado de vuelta en 1985 en granjas de cerdos de España de acuerdo con una investigación en retrospectiva (Segales et al., 2009, supra). Sin embargo, permanece evasivo si los TTV porcinos están asociados con cualquiera de las enfermedades de cerdos particulares. Ya que ambas de las especies de TTV porcino tienen una alta prevalencia en cerdos domésticos, la determinación de cargas víricas TTV presumiblemente es más importante que evaluar la presencia de ADN TTV. El nivel de cargas víricas en muestras de suero y semen se ha indicado como un marcador importante para PCVAD en infección PCV2 (Opriessnig et al., 2007, supra). Por lo tanto, el establecimiento de ensayos PCR cuantitativos en tiempo real específicos de PTTV ayudaría a identificar las condiciones de enfermedad potencial asociados con TTV porcinos.

Se han descrito recientemente dos ensayos de PCR en tiempo real basados en sonda TaqMan. El ensayo de plexado sencillo desarrollado por un grupo canadiense no fue específico de especies y sólo se diseñó para cuantificar las cargas víricas totales de las dos especies PTTV (Brassard et al., 2009, supra). El ensayo doble establecido por un grupo alemán permite la detección específica y simultánea de ambas especies (Gallei et al., 2009, supra). Las secuencias objetivo de cebadores usados en aquellos dos ensayos se determinaron al alinear las tres secuencias genómicas de TTV porcino (Sd-TTV31, TTV-1p y TTV-2p) y se localizaron en el UTR. En el estudio actual, con 7 secuencias

000055

genómicas PTTV completas adicionales disponibles (4 secuencias PTTV1 y 3 PTTV2), se ha analizado y re-determinado las regiones conservadas a través de los 10 genomas PTTV de longitud completa. Con base en la alineación actualizada que resulta de este estudio, se desarrollaron dos ensayos PCR en tiempo real basados en SYBR verde de plexado sencillo específico de especies para cuantificar las cargas víricas de PTTV1 y PTTV2, respectivamente. Los cebadores usados en los ensayos del solicitante se diseñaron para unirse a regiones genómicas conservadas distintas de los estudios previos, que puede incrementar la exactitud de la cuantificación. Nuestros ensayos muestra una especificidad y sensibilidad de especies considerable de detección con 44 copias genómicas para PTTV1 y 8.8 copias genómicas para PTTV2 por 25 μ l de reacción, mientras que el límite de detección de 10 copias genómicas por reacción se reportó en el PCR en tiempo real doble basado en la sonda TaqMan (Gallei et al., 2009, supra). Además, el ensayo de PCR en tiempo real basado en SYBR verde es un enfoque flexible y barato que puede llevarse a cabo directamente sin la necesidad de usar sondas fluorescentemente etiquetadas. Finalmente, al considerar que los TTVs porcinos exhiben un alto grado de diversidad genética, los resultados de ensayos basados en SYBR verde es poco probable que se afecten por los diferentes respaldos genéticos de variantes TTV porcinas que posiblemente contiene mutaciones en las secuencias enlazadas a la sonda en los ensayos basados en sonda TaqMan.

A pesar de la presencia de ADN TTV, todas las muestras de suero de cerdos saludables probadas en este estudio tienen cantidades bajas de PTTV1 y PTTV2 que fueron menores que 2×10^6

000056

copias/ml. Por otro lado, sólo una titulación extremadamente baja de ADN PTTV2 se detectó en tres muestras de semen. La mayoría de las muestras de suero probadas también fueron positivas para ADN PCV2 como se determina por PCR anidado convencional (datos no mostrados). Muchos cerdos positivos en PCV2 con carga vírica baja no desarrollan PCVAD clínico. Un umbral propuesto para desarrollar PCVAD es 10^7 o mayor de copias genómicas PCV2/ml de suero (Opriessnig et al., 2007, supra). Además, el ADN de PCV2 en semen positivamente también es un marcador del estado de enfermedad (Opriessnig et al., 2007, supra; Pal, N., Huang, Y.W., Madson, D.M., Kuster, C., Meng, X.J., Halbur, P.G. y Opriessnig, T., 2008. Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of porcine circovirus type 2 and an internal control on porcine semen samples. J Virol Methods 149, 217-25). La situación de PTTV específico de especies puede ser análoga a la de PCV2 y una titulación PTTV mayor que 10^7 copias/ml puede requerirse para la inducción de enfermedades porcinas. Los ensayos PCR en tiempo real específicos de especies desarrollados en este estudio ofrecerán herramientas sencillas y prácticas para investigaciones futuras de asociación PTTV con enfermedades que usan un gran número de muestras clínicas de varias condiciones de enfermedad.

Adicionalmente, al acoplar los dos ensayos de plexado sencillo específicos de especie, se ha desarrollado y validado una selección rápida, barata y confiable para la detección y diferenciación simultánea de las dos especies de TTV porcino, PTTV1 y PTTV2, en un ensayo PCR en tiempo real doble basado en MCA. Aunque este ensayo no se presenta para cuantificación exacta

000057

para ambas especies, es un enfoque más conveniente que pudiera reemplazar la PCR anidada convencional para propósitos de detección. En comparación con PCR de tiempo real, el ensayo de PCR anidada convencional para detección de TTVs porcinos consume tiempo (requiere un total de 4 rondas de PCR), laborioso y propenso a contaminación de muestra que ocurre durante las rondas múltiples de procesamiento por PCR. Debido a la diferencia de valor T_m entre las especies PTTV1 y PTTV2, una amplificación PCR doble seguida por MCA es capaz de asegurar una especificidad de reacción distinta. Otra ventaja de este ensayo en tiempo real doble es que la inclusión de estándares PTTV1 y PTTV2 es dispensable cuando se realiza el protocolo descrito, lo que hace más fácil para uso mucho más amplio en cualquier laboratorio de diagnóstico equipado con un instrumento de PCT en tiempo real automatizado.

La infección múltiple de TTVs porcinos con distintos genotipos o subtipos de la misma especie se ha demostrado (Gallei et al., 2009, supra). En particular, los estudios previos del solicitante muestra que la especie TTV 1 consiste de dos tipos distintos, PTTV1a (incluyendo cepas Sd-TTV31 y PTTV1a-VA) y PTTV1b (incluyendo cepas TTV-1p y PTTV1b-VA). Los dos aislados PTTV1 recientemente publicados con genomas de longitud completo, swSTHY-TT27 (GQ120664) de Canadá y TTV1 #471819 (GU188045) de Alemania, ambos fueron clasificados en tipo 1b con base en el análisis filogenético (datos no mostrados). La PCR anidada doble descrita en este estudio confirma que la infección doble de dos genotipos PTTV1 ocurre frecuentemente en cerdos. Este ensayo novedoso es el primer enfoque PCR de diagnóstico desarrollado

000058

para distinguir entre PTTV1a y 1b etc. Ya que actualmente no se conoce si una o ambas de la infección por PTTV1a y PTTV1b representan un factor relevante asociado con la enfermedad, en ensayo PCR diferencial del solicitante debiera ser de gran valor para asociaciones de enfermedad potencial futuras de estos dos tipos PTTV.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, las proteínas ORF de TTV porcino se expresaron y usaron en ensayos de inmunodetección para detectar la presencia de anticuerpo específicos de TTV porcino. En una modalidad de la presente invención, tres proteínas ORF1 etiquetadas con Histidina y truncadas de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2, se expresaron y purificaron en *Escherichia coli* (*E. coli*), respectivamente. Adicionalmente, ambos ensayos de suero Western blot y ELISA que se basan en estos antígenos recombinantes se desarrollaron y validaron usando muestras de suero porcino de fuentes diferentes. En particular, la prueba serológica usando el ELISA específico PTTV1a, PTTV1b y PTTV2 proporciona una herramienta exacta y sencilla para revelar la asociación de infección TTV porcina con enfermedades.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, las proteínas ORF TTV porcino se expresaron y unificaron como proteína cápsida ORF1 recombinante en sistema de expresión de *E.coli* (Fig. 10, Fig. 15). Se expresaron y purificaron tres proteínas de cápsida ORF1 etiquetada con His y truncadas de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2, en *Escherichia coli* (*E. coli*), respectivamente, y sirven como vacunas de subunidad cápsida recombinante contra infección por PTTV.

Cuatro cepas TTV2 de porcino, TTV-2p, TTV2#472142, PTTV2b-VA y PTTV2c-VA, tienen secuencias genómicas completas disponibles a la fecha. Aunque se clasifican filogenéticamente en tres subtipos supuestos, un análisis comparativo de perfiles de hidrofiliidad de los aminoácidos que codifican ORF1 de cuatro PTTV2 muestran que comparten tres regiones hidrofílicas, una región rica en arginina desde aa 1-49 en la terminal N y dos dominios particulares (I y II) localizado a la mitad y la parte de terminal C, respectivamente (Fig. 9A). La región de terminal C usada para la expresión de ORF1 de PTTV2c-VA truncada y las regiones correspondientes compartidas en otras tres cepas PTTV2se indicaron por recuadro punteado. Las alineaciones de secuencias de aminoácidos demuestran altos niveles de conservación de secuencias de dominios I (aa 322-349) y II (aa 536-625) a través de las cuatro cepas PTTV2 (Fig. 9B).

Ya que los dominios hidrofílicos se consideran que son importantes para la antigenicidad de muchas proteínas, la región de terminal C (aa 310-625) de la ORF1 de PTTV2c-VA SEQ ID NO:16 que contiene los dos dominios se eligió para expresión de proteína, que debiera usarse como antígeno para la detección de anticuerpo específico de PTTV2 en suero porcino. De acuerdo con un aspecto de la invención, la expresión de ORF1 de PTTV2c fue suficiente para la detección de todos los subtipos d PTTV2 (2a, 2b y 2c; también ver Fig. 3A).

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, la parte de terminal C del gen ORF1 de PTTV2c fusionado con 8 × etiquetas His se construyó y expresó en *E.coli*. La proteína recombinante fue insoluble y se expresa dentro de los cuerpos de

000060

inclusión bacterianos. La Figura 10A muestra SDS-PAGE de productos 2c-ORF1 no purificados. La Figura 10B muestra SDS-PAGE de productos 2c-ORF1 purificados. La Figura 10C muestra análisis Western blot de productos 2c-ORF1 purificados usando un mAb etiquetado con anti-His. Las puntas de flecha blancas indican la proteína ORF1 con el tamaño esperado y su producto truncado mientras que las puntas de flecha negras muestran los dímeros supuestos de las proteínas esperadas y truncadas. M: marcadores de proteína. En la Fig. 10A, se producen dos polipéptidos importantes (puntas de flechas blancas) en la muestra no purificada de 2c-ORF1 en comparación con la muestra de control. La banda de ~40 KDa fue consistente con el tamaño esperado de 2c-ORF1 mientras que el polipéptido de ~30 KDa probablemente fue un producto truncado de terminal N del anterior. Después de la purificación con una columna de afinidad en níquel, se mostraron cuatro polipéptidos incluyendo las dos bandas importantes descritas en SDS-PAGE (Fig. 10B). También se detectaron por western blot usando un mAb etiquetado con anti-His (Fig. 10C). Dos bandas de alta masa molecular (puntas de flecha negras) fueron los homodímeros formados por los dos polipéptidos de ~40 KDa y ~30 KDa, respectivamente, con base en los tamaños predichos (~80 KDa y ~60 KDa). Los resultados demuestran que el PTTV2c-ORF1 de terminal C purificado se produjo exitosamente y debiera usarse para detección de anticuerpo TTV2 de porcino en suero de porcino.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, los anticuerpos TTV2 porcinos en varias muestras de suero de porcino pueden detectarse por Western blot usando PTTV2c-ORF1 de terminal C purificado. Las puntas de flechas blancas indican la proteína

000061

ORF1 con el tamaño esperado y su producto truncado. Debe señalarse que sólo las bandas en color verde se reconocieron como positivas. Se recolectaron un total de más de 200 muestras de suero de cerdos convencionales (saludables o enfermos), cerdos CD/CD y cerdos gnotobióticos de diferentes fuentes. Las muestras se seleccionaron aleatoriamente para detección de anticuerpos IgG anti-PTTV2c-ORF1 usando el PTTV2c-ORF1 de terminal C purificado como antígeno. La Figura 11A muestra los resultados de análisis Western blot de muestras de suero porcino seleccionadas de cerdos convencionales, la Figura 11B muestra cerdos CD/CD, y la Figura 11C muestra cerdos gnotobióticos. Se usaron productos PTTV2c-ORF1 purificados como los antígenos. Las dos bandas ~40 KDa y ~30 KDa marcadas se detectaron en la mayoría de las muestras de los cerdos convencionales (Fig. 11A) y cerdos CD/CD (Fig. 11B), indicando ampliamente infección PTTV2 en estos cerdos. Sin embargo, todos los cerdos gnotobióticos de dos fuentes diferentes (Blacksburg, VA y Ames, IA) no tienen anticuerpo PTTV2 detectable (Fig. 11C). También se observaron bandas de masa molecular baja adicionales (Fig. 11A y 11B). Fueron probables de reactividad no específica en el Western blot.

De acuerdo con aún otro aspecto de la presente invención, ELISA específico de PTTV2 puede usarse como una prueba serológica TTV2 porcino. Los resultados seronegativos también se mostraron en unas pocas muestras de cerdos convencionales de una granja de Wisconsin (Fig. 12). Estas muestras negativas se agruparon y usaron como una referencia negativa en el desarrollo de un ELISA específico de PTTV2. Las muestras restantes de esta fuente fueron positivas (Fig. 12, los cuatro carriles a la izquierda). Además,

000062

el suero porcino de una compañía comercial usado en cultivo celular (supuesto para estar libre de enfermedades OIE) también muestra positividad anti-PTTV2-ORF2 fuerte (Fig. 12), que se usó como un control positivo para ELISA. Las concentraciones de antígeno 2c-ORF1 purificado, el suero porcino y conjugado IgG se determinaron por titulación con tabla de revisión para presentar señal de fondo baja y dar la diferencia más alta del valor OD₄₀₅ entre los controles positivos y negativos. La cantidad de antígeno óptima fue 69 ng por pozo, y los resultados ELISA óptimos se obtuvieron por uso de una dilución 1:100 de muestras de suero y una dilución 1:4000 de conjugados IgG. Los valores de corte ELISA en el intervalo desde 0.25 hasta 0.5 en cada prueba. La Figura 4 muestra un resultado representativo que refleja la consistencia de western blot de suero y el ELISA desarrollado.

Se eligieron 138 muestras de sueros de cerdo convencional de 3 manadas para analizar la correlación entre carga vírica PTTV2 por PCR en tiempo real y nivel de anticuerpo IgG anti-PTTV2 por ELISA. Los resultados muestran que cerdos con carga vírica PTTV2 superior o no detectable (108 copias/ml) fueron más probables para tener una titulación de anticuerpo PTTV2 de suero inferior que cerdos con valores medios de carga vírica PTTV2 (Fig. 13).

En particular, los sueros de 10 cerdos en la misma manada también se analizaron al comparar las cargas víricas PTTV2 y niveles de anticuerpo anti-PTTV2 de sus sueros a su llegada en la nueva instalación a dos meses después de la llegada. Nueve de los 10 cerdos tienen cargas víricas disminuidas (tres tienen virus no detectable) después de 2 meses aunque las titulaciones de anticuerpo anti-PTTV2 incrementan en nueve de 10 cerdos (Fig. 14A

000063

y 14B). Los resultados sugieren que los 10 cerdos adquieren infección PTTV2 en etapa temprana, lo que induce respuesta humoral y produce anticuerpo IgG de cápsida anti-ORF1 progresivamente. El anticuerpo IgG PTTV2-ORF1 fue capaz de neutralizar o aún eliminar el virus, indicando que el ORF1 en efecto codifica una proteína cápsida vírica y puede contener epítomos neutralizantes contra PTTV2.

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, las proteínas PTTV1a y PTTV1b-ORF1 de terminal C se expresaron y purificaron en un sistema de E. coli, respectivamente. SDS-PAGE y análisis western blot usando un mAb etiquetado anti His muestra que tanto los productos 1a como 1b-ORF tienen dos polipéptidos, uno con tamaño esperado (~40 KDa) y otro como el homodímero supuesto (~80 KDa) (Fig. 15A-C). La Figura 15A muestra SDS-PAGE de productos 1a-ORF1 purificados y no purificados. La Figura 15B muestra SDS-PAGE de productos purificados 1b-ORF1 y 1b-ORF1ctruc. La Figura 15C muestra análisis Western blot de productos 1a y 1b-ORF1 purificados usando un mAb etiquetado anti-His. Las puntas de flecha blancas indican la proteína ORF1 con el tamaño esperado mientras que las puntas de flechas negras muestran el dímero supuesto de las proteínas ORF1. Comparado con la expresión 2c-ORF1, no se observó polipéptido truncado. Como un control comparativo, la expresión de una región 1b-ORF1 truncada de terminal C (1b-ORF1ctruc) resulta en un polipéptido de masa molecular inferior comparado con su 1b-ORF1 de contraparte no truncada de terminal C (Fig. 15B).

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, las proteínas PTTV1a- y PTTV1b-ORF1 de terminal C purificadas se

000064

usaron para desarrollar Western blots y ELISA de suero específico de genotipo como se describe para PTTV2 de arriba. La Figura 16 muestra ejemplos negativos (carriles 1-2) y positivos (carriles 3-5) de Western blot de suero usando 1a-ORF1 como antígeno. La misma cantidad de antígeno (69 ng), dilución de suero (1:100) y dilución de conjugado IgG (1:4000) como PTTV2-ORF1 se usaron en ELISA específica de PTTV1a y PTTV1b (datos no mostrados).

Adicionalmente, la presente invención proporciona un reactivo de diagnóstico útil para detectar la infección TTV porcino que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal purificado de un hospedero natural tal como, por ejemplo, al inocular un cerdo con el TTV porcino o la composición inmunogénica de la invención en una cantidad inmunogénica efectiva para producir una infección vírica y recuperar el anticuerpo del suero del cerdo infectado. Alternativamente, los anticuerpos pueden elevarse en animales experimentales contra los polipéptidos naturales o sintéticos derivados o expresados de las secuencias de aminoácidos o fragmentos inmunogénicos codificados por la secuencia de nucleótidos del TTV porcino aislado. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse de células de hibridoma que se obtienen de ratones tales como, por ejemplo, Balb/c, inmunizados con un antígeno de polipéptido derivado de la secuencia de nucleótidos del TTV porcino aislado. La selección de las células de hibridoma se hace por crecimiento en hipoxantina, timidina y aminopterina en un medio de cultivo celular estándar tipo medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) o medio esencial mínimo. Las células de hibridoma que producen anticuerpos pueden clonarse de acuerdo

000065

procedimientos conocidos en la técnica. Luego, las colonias discretas que se forman pueden transferirse en pozos separados de placas de cultivo para cultivo en un medio de cultivo adecuado. La identificación de células que secretan anticuerpo se hace por métodos de selección convencionales con el antígeno o inmunógeno apropiado. Cultivar las células de hibridoma *in vitro* o *in vivo* al obtener fluido de ascitos en ratones después de inyectar el hibridoma produce el anticuerpo monoclonal deseado por medio de técnicas bien conocidas.

Para otro método alternativo, la proteína de cápsida de TTV porcino puede expresarse en un sistema de expresión baculovirus o sistema de expresión *E. coli* de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. La proteína de cápsida de TTV porcino recombinante expresada puede usarse como el antígeno para diagnóstico en un Ensayo inmunoabsorbente ligado a la enzima (ELISA). El ensayo ELISA basado en el antígeno de cápsida recombinante porcino, por ejemplo, puede usarse para detectar anticuerpos para TTV porcino en especie porcina y mamífera. Aunque el ensayo ELISA se prefiere, otras pruebas de diagnóstico conocidas pueden emplearse tal como ensayo de inmunofluorescencia (IFA), ensayo de inmunoperoxidasa (IPA), etc.

De forma deseable, un ensayo de diagnóstico ELISA comercial de acuerdo con la presente invención puede usarse para diagnosticar infección TTV porcino en cerdos. Los ejemplos se ilustran usando proteínas ORF1 y ORF2 purificadas de TTV porcino para desarrollar un ensayo ELISA para detectar anticuerpos anti-TTV en cerdos. El suero recolectado de cerdos infectados con TTV porcino, y el suero negativo de cerdos de control se usan para

000066

validar el ensayo. Los anticuerpos específicos de PTTV2, específicos de PTTV1a, y específicos de PTTV1b se demostraron para reconocer específicamente proteínas ORF PTTV. La estandarización adicional de la prueba por técnicas conocidas para aquellos experimentados en la técnica puede optimizar la comercialización de un ensayo de diagnóstico para TTV porcino.

Otro aspecto de la presente invención es la composición inmunogénica única que comprende el TTV porcino aislado o una proteína antigénica codificada por un polinucleótido aislado descrito anteriormente y su uso para levantar o producir anticuerpos. La composición contiene un portador no tóxico, fisiológicamente aceptable y, opcionalmente, uno o más adyuvantes. Los portadores adecuados, tales como, por ejemplo, agua, solución salina, etanol, etilenglicol, glicerol, etc., se seleccionan fácilmente de excipientes convencionales y pueden agregarse co-formulantes. Las pruebas de rutina pueden realizarse para asegurar compatibilidad física y estabilidad de la composición final.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan además moléculas de ácido nucleico y moleculares infecciosas de Torque teno porcino (TTV), virus vivos producidos de la molécula de ácido nucleico y vacunas veterinarias para proteger cerdos de infección vírica TTV porcino o enfermedad provocada por co-infección TTV porcino con otros virus. La invención proporciona además productos de expresión de polipéptido inmunogénico que pueden usarse como vacunas.

La molécula de ADN infecciosa novedosa de TTV porcino comprende una molécula de ácido nucleico que codifica

000067

una porción de un genoma PTTV1a-VA infeccioso (SEQ ID NO:9), PTTV1b-VA (SEQ ID NO:10), PTTV2c-VA (SEQ ID NO:11), o PTTV2c-VA (SEQ ID NO:12). El clon de ADN de PTTV infeccioso preferiblemente contiene al menos uno del gen ORF1, ORF2, ORF1/1, y ORF2/2 del PTTV1 o PTTV2. Múltiples copias del genoma PTTV1a-VA (SEQ ID NO:9), PTTV1b-VA (SEQ ID NO:10), PTTV2c-VA (SEQ ID NO:11), o PTTV2c-VA (SEQ ID NO:12) pueden insertarse en una molécula de ADN sencilla para construir clones PTTV infecciosos en tándem.

El ADN genómico clonado de PTTV, particularmente PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2c-VA, y PTTV2b-RR tándem, PTTV2c-RR, descrito en la presente se muestra para ser infeccioso *in vitro* o *in vivo* cuando se transfecta en células PK-15 y se da a cerdos. Este agente patogénico nuevo, fácilmente reproducible se deja por sí mismo para el desarrollo de un programa de vacunación adecuado para prevenir infección PTTV en cerdos.

De acuerdo con una modalidad adicional de la presente invención, tres clones de ADN de PTTV de copia de un genoma se derivaron de los PTTV1a-VA, PTTV1b-VA y PTTV2c-VA aislados US de prototipo por PCR de fusión, respectivamente. Cada uno del ADN genómico de longitud completa se insertó en un vector de clonación pSC-B-amp/kan por ligación del extremo romo. Este sitio de restricción BamH I es el sitio único en los tres genomas PTTV, que se prepararon por ingeniería en ambos extremos de los tres genomas para facilitar la generación de concatémeros y de esta manera imita el genoma circular TTV. Las digestiones sencillas BamH I del ADN plásmido seleccionado de cada clon claramente resulta en dos fragmentos diferentes de 4.3-Kb y 2.8-Kb en tamaño (Fig. 18A). Los fragmentos 4.3-Kb representan el vector de fondo

000068

mientras que los fragmentos 2.8-Kb representan el ADN genómico PTTV insertado. El vector vacío pSC-B-amp/kan digerido con la misma enzima sólo muestra una banda 4.3-Kb (Fig. 18A). Los clones PTTV resultantes se designaron pSC-PTTV1a, pSC-PTTV1b y pSC-PTTV2c, respectivamente (Fig. 17A-C).

Adicionalmente, dos copias del genoma PTTV2c-VA de longitud completa derivadas del clon pSC-PTTV2c se ligaron en tándem en el vector pSC-B-amp/kan para generar el clon pSC-2PTTV2c-RR (Fig. 17D). La comparación de los patrones de digestión sencillos Afl II entre pSC-PTTV2c y pSC-2PTTV2c-RR muestra que el último plásmido tiene un fragmento 2.8-Kb adicional que representa la segunda copia del genoma PTTV2c (Fig. 18B, panel derecho). Posteriormente, se utilizó la misma estrategia de clonación para producir un clon de ADN PTTV2b dimerizado por tándem derivado del clon TTV de Alemania TTV2-#471942-completo. Un fragmento 2.8-Kb adicional que representa la segunda copia del genoma PTTV2b se presentó en este constructo, designado pSC-2PTTV2b-RR (Fig. 17F), que se digirió con el Hind III solo cuando se compara con su contraparte de un genoma de copia (Fig. 18B, panel izquierdo), confirmando la construcción exitosa.

Las competencias de replicación de los clones infecciosos PTTV contruidos se probaron por transfección *in vitro* de células PK-15. IFA usando los anticuerpos policlonales de conejo comercialmente generados contra PTTV2c ORF1 confirma que tanto los concatémeros de clones TTV2-#471942-completo y pSC-PTTV2c fueron competentes de replicación, respectivamente (Fig. 19A y Fig. 20A). El paso de las células transfectadas no elimina ni reduce las señales fluorescentes (Fig. 19B y Fig. 20B).

000069

sugiriendo que la expresión de proteínas ORF1 fue resultado de los concatémeros PTTV2 que imitan las moléculas circulares PTTV2b o PTTV2c naturales. No se observó señales fluorescentes en células transfectadas simuladas o células transfectadas por ADN usando suero de conejo pre-inmunitario como el anticuerpo para detección IFA (datos no mostrados). Los concatémeros del clon pSC-PTTV1a también se muestran para ser competentes de replicación usando un anticuerpo ORF1 anti-PTTV1a (Fig. 21). Las señales fluorescentes positivas se localizaron en el núcleo de células transfectadas o pasadas, indicando que TTVs porcinos probablemente se replican en el núcleo celular. No es inesperado debido a que el circovirus porcino (PCV, por sus siglas en inglés) tiene un patrón de expresión similar *in vitro*.

La transfección directa del clon dimerizado por tándem pSC-2PTTV2b-RR o pSC-2PTTV2c-RR en células PK-15 resulta en replicación vírica y produce el antígeno de cápsida ORF1. IFA usando anticuerpos contra PTTV2 ORF1 confirma que ambos clones también fueron competentes en replicación y los antígenos ORF1 positivos se localizaron en el núcleo (Fig. 22A y B).

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, los clones infecciosos de TTV porcino pueden usarse para inocular cerdos, que luego producirán una respuesta inmunitaria del animal hospedero y estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes. En una modalidad particular de la presente invención, los dos clones PTTV2 dimerizados por tándem fueron infecciosos cuando se inyectan en los ganglios linfáticos y músculos de cerdos convencionales.

. 000070

Para probar la infectividad *in vivo* de clones moleculares PTTV2, se inocularon cerdos convencionales con el clon pSC-2TTV2b-RR o pSC-2TTV2c-RR. Las muestras de suero se recolectaron de animales en los días 0, 7, 14, 21 y 28 después de la inoculación (DPI). Se detectó ADN de PTTV2 en cerdos inoculados con pSC-2TTV2c-RR iniciando en 7 DPI (#92), 14 DPI (#188 y #191) y 21 DPI (#180), respectivamente (Fig. 23A, panel derecho). El PTTV viremia apareció al final para cerdos inoculados con el clon pSC-2TTV2b-RR: dos inician en 14 DPI (#189 y #192), uno en 21 DPI (#181) y uno en 28 DPI (#193) (Fig. 23A, panel izquierdo). Las cargas víricas incrementan durante el curso en todos los cerdos inoculados que tienen las cargas víricas más altas en 28 DPI antes de la necropsia, como se determina por PCR de tiempo real específico de PTTV2 (Fig. 23A). Los productos PCR de tiempo real amplificados de cerdos seleccionados se procesaron por secuencia y encontraron para tener secuencias idénticas a las regiones correspondientes de pSC-2TTV2b-RR o pSC-2TTV2c-RR (datos no mostrados).

Todos los cerdos inoculados fueron negativos para anticuerpos PTTV2 ORF1 en 0 y 7 DPI. En 14 DPI, todos los cuatro cerdos inoculados por pSC-2TTV2b-RR se seroconvirtieron a IgG ORF1 anti-PTTV2, mientras que los cerdos en el grupo inoculado por pSC-2TTV2c-RR se seroconvierte en 14 (#92 y #180), 21 (#191) y 28 (#188) DPI, respectivamente (Fig. 23B). Los resultados indican que la infección TTV2b porcino o TTV2c activa ha ocurrido.

Las vacunas de los clones de ADN moleculares infecciosos y víricos infecciosos, y métodos para usarlos, también se incluyen

000071

dentro del alcance de la presente invención. Los cerdos inoculados se protegen de infección vírica y enfermedades asociadas provocadas por infección o co-infección TTV2. El método novedoso protege a cerdos que necesitan de protección contra
5 infección vírica al administrar al cerdo una cantidad inmunológicamente efectiva de una vacuna de acuerdo con la invención, tal como, por ejemplo, una vacuna que comprende una cantidad inmunogénica del ADN de PTTV infeccioso, un plásmido o vector vírico que contiene el clon de ADN infeccioso de PTTV, el
10 ADN de PTTV recombinante, los productos de expresión del polipéptido, la proteína de cápsida ORF1 recombinante purificada expresada por baculovirus o expresada por bacterias, etc. Otros antígenos tales como PRRSV, PPV, otros agentes del puerco infeccioso y estimulante inmunitarios pueden darse
15 concurrentemente al cerdo para proporcionar un espectro amplio de protección contra infecciones víricas.

Las vacunas comprenden, por ejemplo, los clones de ADN moleculares y víricos infecciosos, el genoma de ADN infeccioso de PTTV clonado en plásmidos o vectores adecuados tales como, por
20 ejemplo, el vector pSC-B, una no virulenta, virus vivo, un virus inactivado, vacuna de subunidad de cápsida recombinante expresada, etc. en combinación con un portador no tóxico, fisiológicamente aceptable y, opcionalmente, uno o más adyuvantes. La vacuna también puede comprender el clon de ADN molecular TTV2 infeccioso descrito en la presente. El ADN de PTTV infeccioso, el ADN de plásmido que contiene el genoma vírico infeccioso y el virus vivo se prefieren con el virus vivo siendo el más preferido. La vacuna vírica viva, no virulenta de la

000072

presente invención proporciona una ventaja sobre vacunas víricas tradicionales que usan ya sea virus vivos, atenuados que corren el riesgo de revertirse de nuevo al estado virulento o virus completo propagado de cultivo celular exterminado que no puede inducir respuesta inmunitaria de anticuerpo suficiente para protección contra la enfermedad vírica.

Las vacunas y métodos para usarlos también se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Las especies mamíferas inoculadas se protegen de infección vírica seria, también pueden proporcionar protección para enfermedad relacionada con co-infección de PTTV, tal como dermatitis porcina y síndrome de nefropatía (PDNS, por sus siglas en inglés), síndrome de desgaste multisistémico posterior al destete (PMWS, por sus siglas en inglés), y otra enfermedad relacionada. Las vacunas comprenden, por ejemplo, un virus TTV porcino inactivado o atenuado, un portador no tóxico, fisiológicamente aceptable y, opcionalmente, uno o más adyuvantes.

El adyuvante, que puede administrarse en conjunto con la vacuna de la presente invención, es una sustancia que incrementa la respuesta inmunológica del cerdo para la vacuna. El adyuvante puede administrarse al mismo tiempo y en el mismo sitio que la vacuna, o en un tiempo diferente, por ejemplo, como un refuerzo. Los adyuvantes también pueden administrarse ventajosamente al cerdo en una manera o en un sitio diferente de la manera o sitio en el cual la vacuna se administra. Los adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de aluminio (alum), complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), polímeros o copolímeros de bloque no iónico, citocinas (tipo IL-1, IL-2, IL-7, IFN- α , IFN- β ,

000073

IFN- γ , etc.), saponinas, monofosforilo de lípido A (MLA),
dipéptidos de muramilo (MDP) y similares. Otros adyuvantes
adecuados incluyen, por ejemplo, sulfato de aluminio potasio,
enterotoxina inestable al calor o estable al calor aislada de
5 Escherichia coli, toxina de cólera o la subunidad B de la misma,
toxina de difteria, toxina de tétanos, toxina de tos ferina,
adyuvante completo o incompleto de Freund, etc. Los adyuvantes
basados en toxina, tales como toxina de difteria, toxina de
tétanos y toxinas de tos ferina pueden inactivarse antes del uso,
10 por ejemplo, por tratamiento con formaldehído.

Las vacunas pueden contener además antígenos adicionales
para promover la actividad inmunológica de los clones de ADN PTTV
infecciosos tales como, por ejemplo, virus del síndrome
respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV, por sus siglas en
15 inglés), parvovirus porcino (PPV, por sus siglas en inglés),
otros agentes del puerco infecciosos y estimulantes inmunitarios.

Las vacunas nuevas de esta invención no se restringen a
cualquier tipo o método particular de preparación. Las vacunas
víricas clonadas incluyen, pero no se limitan a, vacunas de ADN
20 infecciosas (esto es, usando plásmidos, vectores u otros
portadores convencionales para inyectar directamente ADN en
cerdos), vacunas vivas, vacunas vivas modificadas, vacunas
inactivadas, vacunas de subunidad, vacunas atenuadas, vacunas
genéticamente preparadas por ingeniería, etc. Estas vacunas se
prepararon por métodos estándares conocidos en la técnica.

Como un beneficio adicional, el virus vivo preferido de la
presente invención proporciona una vacuna genéticamente estable

000074

que es más fácil de hacer, almacenar y suministrar que otros tipos de vacunas atenuadas.

Otra vacuna preferida de la presente invención utiliza plásmidos adecuados para suministrar el clon de ADN no patogénico a cerdos. En contraste a la vacuna tradicional que usa cultivo celular exterminado o vivo propagados de virus completo, esta invención se proporciona para la inoculación directa de cerdos con el ADN plásmido que contiene el genoma vírico infeccioso.

Las vacunas genéticamente preparadas por ingeniería adicionales, que son deseables en la presente invención, se producen por técnicas conocidas en la técnica. Tales técnicas involucran, pero no se limitan a, manipulación adicional de ADN recombinante, modificación de o sustituciones a las secuencias de aminoácidos de las proteínas recombinantes y similares.

Las vacunas genéticamente preparadas por ingeniería basadas en tecnología de ADN recombinante se hacen, por ejemplo, al identificar porciones alternativas del gen vírico que codifica proteínas responsables para inducir una respuesta protectora o inmunitaria más fuerte en cerdos (por ejemplo, proteínas derivadas de ORF1, ORF1/1, ORF2, ORF2/2, etc.). Tales genes identificados o fragmentos inmuno-dominantes pueden clonarse en vectores de expresión de proteína estándar, tal como el vector de baculovirus, y usarse para infectar células hospederas apropiadas (ver, por ejemplo, O'Reilly et al., "Baculovirus Expression Vectors: A Lab Manual," Freeman & Co., 1992). Las células hospederas se cultivan, de esta manera expresando las proteínas de vacuna deseadas, que pueden purificarse a la extensión deseada y formularse en un producto de vacuna adecuado. Las vacunas de

000075

subunidad recombinantes están basadas en proteínas de cápsida ORF1 expresadas por bacterias (Fig. 10, Fig. 15) o expresadas por baculovirus de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2.

Si los clones retienen cualquiera de las capacidades naturales indeseables de la enfermedad provocada, también es posible señalar las secuencias de nucleótido en el genoma vírico responsable para cualquier virulencia residual, y genéticamente preparar por ingeniería el virus no virulento a través de, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio. La mutagénesis dirigida al sitio es capaz de agregar, eliminar o cambiar uno o más nucleótidos (ver, por ejemplo, Zoller et al., DNA 3:479-488, 1984). Un oligonucleótido se sintetiza que contiene la mutación deseada y alineado a una porción de ADN vírico de hebra sencilla. La molécula híbrida, que resulta de tal procedimiento, se emplea para transformar bacterias. Luego el ADN de hebra doble, que se aísla contiene la mutación apropiada, se usa para producir ADN de longitud completa por ligación a un fragmento de restricción del último que se transfecta posteriormente en un cultivo celular adecuado. La ligación del genoma en el vector adecuado para transferencia puede realizarse a través de cualquier técnica estándar conocida para aquellos de experiencia ordinaria en la técnica. La transfección del vector en células hospederas para la producción de progenie vírica puede hacerse usando cualquiera de los métodos convencionales tales como transfección mediada por calcio-fosfato o DEAE-dextrano, electroporación, fusión de protoplastos y otras técnicas bien conocidas (por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). El virus clonado luego

. 000076

muestra la mutación deseada. Alternativamente, dos oligonucleótidos pueden sintetizarse que contienen la mutación apropiada. Estos pueden combinarse en sus pares de bases para formar ADN de hebra doble que puede insertarse en el ADN vírico para producir ADN de longitud completa.

Una cantidad inmunológicamente efectiva de las vacunas de la presente invención se administra a un cerdo que necesita de protección contra infección vírica. La cantidad inmunológicamente efectiva o la cantidad inmunogénica que inocular el cerdo puede determinarse fácilmente o titularse fácilmente por prueba de rutina. Una cantidad efectiva es una en la cual una respuesta inmunológica suficiente para la vacuna se logra para proteger al cerdo expuesto al virus PTTV. Preferiblemente, el cerdo está protegido a una extensión en la cual uno hasta todos de los síntomas fisiológicos adversos o efectos de la enfermedad vírica se reducen significativamente, alivian o previenen totalmente.

La vacuna puede administrarse en una dosis sencilla o en dosis repetidas. Las dosis pueden estar en el intervalo, por ejemplo, desde alrededor de 1 microgramo hasta alrededor de 1,000 microgramos del ADN plásmido que contiene el genoma de ADN quimérico infeccioso (dependiente de la concentración del componente inmuno-activo de la vacuna), preferiblemente 100 hasta 200 microgramos del clon de ADN de TTV porcino, pero no debe contener una cantidad de antígeno basado en virus suficiente para resultar en una reacción adversa o síntomas fisiológicos de la infección vírica. Los métodos se conocen en la técnica para determinar o titular dosificaciones adecuadas de agente antigénico activo para encontrar dosificaciones efectivas mínimas.

000077

basadas en el peso del cerdo, concentración del antígeno y otros factores típicos. Preferiblemente, el clon de ADN vírico infeccioso se usa como una vacuna, o un virus infeccioso vivo puede generarse in vitro y luego el virus vivo se usa como una
5 vacuna. En tal caso, desde alrededor de 50 hasta alrededor de 10,000 de la dosis infectiva del cultivo de tejido al 50% (TCID₅₀) de virus vivo, por ejemplo, puede darse a un cerdo.

Las nuevas vacunas de esta invención no se restringen a ningún tipo o método particular de preparación. Las vacunas
10 incluyen, pero no se limitan a, vacunas vivas modificadas, vacunas inactivadas, vacunas de subunidad, vacunas atenuadas, vacunas genéticamente preparadas por ingeniería, etc.

Las ventajas de vacunas vivas son que todas las respuestas inmunitarias posibles se activan en el receptor de la vacuna,
15 incluyendo respuestas inmunitarias mediadas sistémicas, locales, humoral y por células. Las desventajas de vacunas de virus vivos, que pueden ser mayores que las ventajas, radican en el potencial para contaminación con agentes víricos extraños vivos o el riesgo que el virus puede revertir la virulencia en el campo.

20 Para preparar vacunas de virus inactivados, por ejemplo, la propagación de virus y producción de virus puede ocurrir en líneas celulares porcinas cultivadas tales como, sin limitación células PK-15. La inactivación del virus en serie luego se optimiza por protocolos generalmente conocidos para aquellos de experiencia ordinaria en la técnica o, preferiblemente, por los métodos descritos en la presente.

Las vacunas de virus inactivadas pueden prepararse al tratar el TTV porcino con agentes inactivados tales como formalina o

000078

solventes hidrofóbicos, ácidos, etc., por irradiación con luz ultravioleta o rayos X, por calentamiento, etc. La inactivación se conduce en una manera entendida en la técnica. Por ejemplo, en inactivación química, una muestra de suero o muestra de virus adecuada que contiene el virus se trata durante una longitud suficiente de tiempo con una concentración o cantidad suficiente de agente inactivado a una temperatura suficientemente alta (o baja, dependiendo del agente inactivado) o pH para inactivar el virus. La inactivación por calentamiento se conduce a una temperatura y durante una longitud de tiempo suficiente para inactivar el virus. La inactivación por irradiación se conduce usando una longitud de onda de luz u otra fuente de energía durante una longitud de tiempo suficiente para inactivar el virus. El virus se considera inactivado si es incapaz de infectar una célula susceptible a infección.

La preparación de vacunas de subunidad típicamente difiere de la preparación de una vacuna viva modificada o una vacuna inactivada. Antes de la preparación de una vacuna de subunidad, los componentes antigénicos o protectores de la vacuna deben identificarse. En la presente invención, los componentes antigénicos de PTTV se identificaron como las proteínas de cápsida ORF1 de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2, que se expresaron y purificaron en *Escherichia coli* (*E. coli*) en esta invención, y otro sistema de expresión, tal como sistema de expresión de baculovirus, para uso como vacunas de cápsida recombinantes de subunidad. Tales componentes antigénicos o protectores incluyen ciertos segmentos o fragmentos de aminoácido de las proteínas de cápsida víricas que levantan una respuesta inmunológica o

000079

5 protectora particularmente fuerte en cerdos; proteínas de cápsida
víricas múltiples o sencillas por sí mismas, oligómeros de los
mismos, y asociaciones de orden superior de las proteínas de
cápsida víricas que forman subestructuras de virus o partes o
10 unidades identificables de tales subestructuras; oligoglicósidos,
glicolípidos o glicoproteínas presentes en o cerca de la
superficie del virus o en subestructuras víricas tales como las
lipoproteínas o grupos de lípido asociados con el virus, etc.
Preferiblemente, la proteína ORF1 se emplea como el componente
15 antigénico de la vacuna de subunidad. Otras proteínas también
pueden usarse tales como aquellas codificadas por la secuencia de
nucleótidos en el gen ORF2, ORF1/1, y ORF2/2. Estos componentes
inmunogénicos se identifican fácilmente por métodos conocidos en
la técnica. Una vez identificados, las porciones protectoras o
20 antigénicas del virus (esto es, la "subunidad") se purifican y/o
clonan posteriormente por procedimientos conocidos en la técnica.
La vacuna de subunidad proporciona una ventaja sobre otras
vacunas basadas en el virus vivo ya que la subunidad, tal como
subunidades altamente purificadas del virus, es menos tóxica que
el virus completo.

Si la vacuna de subunidad se produce a través de técnicas
genéticas recombinantes, la expresión de la subunidad clonada tal
como los ORF1, ORF2, ORF1/1, y ORF2/2, por ejemplo, pueden
expresarse por el método proporcionado arriba, y también pueden
optimizarse por métodos conocidos para aquellos en la técnica
(ver, por ejemplo, Maniatis et al., "Molecular Cloning: A
Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring
Harbor, Mass. (1989)). Por otro lado, si la subunidad se emplea

000080

representa una característica estructural intacta del virus, tal como una proteína de cápsida completa, el procedimiento para su aislamiento del virus luego debe optimizarse. En cualquier caso, después de la optimización del protocolo de inactivación, el
5 protocolo de purificación de la subunidad puede optimizarse antes de la fabricación.

Para preparar vacunas atenuadas, el virus patogénico, vivo primero se atenúa (no patogénicas prestadas o inofensivas) por métodos conocidos en la técnica o, preferiblemente, como se
10 describe en la presente. Por ejemplo, los virus atenuados pueden prepararse por la técnica de la presente invención que involucra el paso en serie novedoso a través de huevos de cerdo embrionados. Los virus atenuados pueden encontrarse en la naturaleza y pueden tener eliminaciones de gen que se presentan
15 naturalmente o, alternativamente, los virus patogénicos pueden atenuarse al hacer eliminaciones de gen o produciendo mutaciones de gen. Las vacunas de virus inactivados y atenuados comprenden las vacunas preferidas de la presente invención.

Las vacunas genéticamente preparadas por ingeniería, que
20 también son deseables en la presente invención, se producen por técnicas conocidas en la técnica. Tales técnicas involucran, pero no se limitan a, el uso de ARN, ADN recombinante, proteínas recombinantes, virus vivos y similares.

Por ejemplo, después de la purificación, el virus tipo natural puede aislarse de muestras biológicas, clínicas adecuadas tales como muestras de suero, fecal, saliva, semen y tejido por métodos conocidos en la técnica, preferiblemente por el método enseñado en la presente usando cerdos infectados o líneas

000081

celulares adecuadas infectadas. El ADN se extrae del agente infeccioso o virus biológicamente puro por métodos conocidos en la técnica, y purificados por métodos conocidos en la técnica, preferiblemente por ultracentrifugación en un gradiente CsCl. El cADN de genoma vírica se clona en un hospedero adecuado por métodos conocidos en la técnica (ver Maniatis et al., id.), y el genoma de virus luego se analiza para determinar regiones esenciales del genoma para producir porciones antigénicas del virus. De aquí en adelante, el procedimiento es generalmente el mismo como aquel para la vacuna viva modificada, una vacuna inactivada o una vacuna de subunidad.

Se hacen vacunas genéticamente preparadas por ingeniería basadas en tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, al identificar la porción del gen vírico que se codifica para proteínas responsables para inducir una respuesta protectora o inmunitaria más fuerte en cerdos (por ejemplo, proteínas derivadas de ORF1, ORF2, ORF1/1, y ORF2/2, etc.). Tales genes identificados o fragmentos inmuno-dominantes pueden clonarse en vectores de expresión de proteína estándar, tal como el vector de baculovirus, y usarse para infectar células hospederas apropiadas (ver, por ejemplo, O'Reilly et al., "Baculovirus Expression Vectors: A Lab Manual," Freeman & Co. (1992)). Las células hospederas se cultivan, de esta manera expresan las proteínas de vacuna deseadas, que pueden purificarse a la extensión deseada y formularse en un producto de vacuna adecuado.

Las proteínas genéticamente preparadas por ingeniería, útiles en vacunas, por ejemplo, pueden expresarse en células de insecto, células de levadura o células mamíferas. Las proteínas

000082

genéticamente preparadas por ingeniería, que pueden purificarse o aislarse por métodos convencionales, pueden inocularse directamente en una especie porcina o mamífera para conferir protección contra TTV porcino.

5 Una línea celular de insecto (tipo sf9, sf21, o HIGH-FIVE) puede transformarse con un vector de transferencia que contiene ácidos polinucleótidos obtenidos del virus o copiados del genoma vírico que codifica una o más de las proteínas inmuno-dominantes del virus. El vector de transferencia incluye, por ejemplo, ADN
10 de baculovirus linealizado y un plásmido que contiene los polinucleótidos deseados. La línea celular hospedera puede co-transfectarse con el ADN de baculovirus linealizado y un plásmido con objeto de hacer un baculovirus recombinante.

Alternativamente, el ADN del TTV porcino aislado que
15 codifica una o más proteínas cápsida puede insertarse en los vectores vivos, tales como un poxvirus o un adenovirus y usarse como una vacuna.

Una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna de la presente invención se administra a una especie porcina o mamífera
20 que necesita de protección contra la infección o síndrome. La "cantidad inmunológicamente efectiva" puede determinarse fácilmente o titularse fácilmente por prueba de rutina. Una cantidad efectiva es una en la cual una respuesta inmunológica suficiente para la vacuna se logra para proteger al cerdo u otro mamífero expuesto al virus TTV porcino, o co-infección TTV porcino, que puede provocar dermatitis porcina y síndrome de nefropatía (PDNS), síndrome de desgaste multisistémico posterior al destete (PMWS) o enfermedad relacionada. Preferiblemente, el

000083

cerdo u otra especie mamífera están protegidos para una extensión en la cual uno hasta todos de los síntomas fisiológicos adversos o efectos de la enfermedad vírica se encuentran para reducirse significativamente, aliviarse o prevenirse totalmente.

5 La vacuna puede administrarse en una dosis sencilla o en dosis repetidas. Las dosificaciones pueden contener, por ejemplo, desde 1 hasta 1,000 microgramos de antígeno basado en virus (dependiente de la concentración del componente inmuno-activo de la vacuna), pero no debe contener una cantidad de antígeno basado
10 en virus suficiente para resultar en una reacción adversa o síntomas fisiológicos de infección vírica. Los métodos se conocen en la técnica para determinar o titular dosificaciones adecuadas de agente antigénico activo basado en el peso del pájaro o mamífero, concentración del antígeno y otros factores típicos.

15 La vacuna puede administrarse a cerdos. También, la vacuna puede darse a humanos tales como criadores de cerdos quienes están en riesgo alto de infectarse por el agente vírico. Es contempla que una vacuna basada en el TTV porcino puede diseñarse para proporcionar protección amplia contra tanto TTV porcino como
20 humano. En otras palabras, la vacuna basada en el TTV porcino puede diseñarse preferencialmente para proteger contra infección TTV humana a través del así llamado "enfoque Jenneriano" (esto es, vacuna del virus de la viruela bovina puede usarse contra la viruela humana por Edward Jenner). Deseablemente, la vacuna se administra directamente a un porcino u otra especie mamífera sin aún exponerse al virus TTV. La vacuna puede convenientemente administrarse oralmente, intrabucalmente, intranasalmente, transdérmicamente, parenteralmente, etc. La ruta parenteral de

000084

administración incluye, pero no se limita a, rutas intramusculares, intravenosas, intraperitoneales y subcutáneas.

Cuando se administra como un líquido, la vacuna actual puede prepararse en la forma de una solución acuosa, un jarabe, un
5 elixir, una tintura y similares. Tales formulaciones se conocen en la técnica y se preparan típicamente por disolución del antígeno y otros aditivos típicos en los sistemas de solvente o portador apropiados. Los solventes o portadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, etanol,
10 etilenglicol, glicerol, etc. Los aditivos típicos son, por ejemplo, pigmentos certificados, sabores, edulcorantes y conservadores antimicrobianos tales como timerosal (etilmercuritiosalicilato de sodio). Tales soluciones pueden estabilizarse, por ejemplo, por adición de gelatina parcialmente
15 hidrolizada, sorbitol o medio de cultivo celular, y pueden amortiguarse por métodos convencionales usando reactivos conocidos en la técnica, tales como fosfato ácido de sodio, fosfato diácido de sodio, fosfato ácido de potasio, fosfato diácido de potasio, una mezcla de los mismos, y similares.

20 Las formulaciones líquidas también pueden incluir suspensiones y emulsiones que contienen agentes de suspensión o emulsionantes en combinación con otros co-formulantes estándares. Estos tipos de formulaciones líquidas pueden prepararse por métodos convencionales. Las suspensiones, por ejemplo, pueden prepararse usando un molino de coloide. Las emulsiones, por ejemplo, pueden prepararse usando un homogenizado.

Las formulaciones parenterales, diseñarse para inyección en sistemas de fluido corporales, requieren isotonicidad apropiada y

000085

solución amortiguadora de pH para los niveles correspondiente de fluidos corporales mamíferos. La isotonicidad puede ajustarse apropiadamente con cloruro de sodio y otras sales como sean necesarias. Los solventes adecuados, tales como etanol o propilenglicol, pueden usarse para incrementar la solubilidad de los ingredientes en la formulación y la estabilidad de la preparación líquida. Los aditivos adicionales que pueden emplearse en la vacua actual incluyen, pero no se limitan a, dextrosa, antioxidantes convencionales y agentes quelantes convencionales tales como ácido etilendiamina tetraacético (EDTA). Las formas de dosificación parenterales también deben esterilizarse antes del uso.

Los siguientes ejemplos demuestran ciertos aspectos de la presente invención. Sin embargo, es para entenderse que estos ejemplos son para ilustración solamente y no aparentan para ser completamente definitivos en cuanto a las condiciones y alcance de esta invención. Debe apreciarse que cuando las condiciones de reacción típicas (por ejemplo, temperatura, tiempos de reacción, etc.) se han dado, también pueden usarse las condiciones tanto de arriba como de debajo de los intervalos específicos, aunque generalmente menos conveniente. Los ejemplos se conducen a temperatura ambiente (alrededor de 23°C. hasta alrededor de 28°C.) y a presión atmosférica. Todas las partes de porcentajes referidos en la presente son en una base en peso y todas las temperaturas se expresan en grados centígrados a menos que se especifique de otra manera.

000086

Ejemplo 1.*Extracción de ADN vírica, PCR anidado y PCR genómico:*

Las muestras de semen y suero convenientes de 20 cerdos adultos convencionales de un criadero de cerdos de Virginia se usaron en el estudio. El ADN total se aisló de 20 muestras de suero y 19 de semen usando mini kit de ADN QIAamp (Qiagen). Para seleccionar las muestras que contienen PTTV positivas, amplificaciones PCR anidadas de las regiones conservadas en el UTR de PTTV1 y PTTV2 se realizaron inicialmente al usar polimerasa AmpliTag Gold (Applied Biosystems). Los dos pares de cebador usados para amplificar el fragmento A de PTTV1 fueron TTV1-mF (SEQ ID NO:45)/TTV1-mR (SEQ ID NO:46) (para el PCR de primera ronda) y TTV1-nF (SEQ ID NO:47)/TTV1-nR (SEQ ID NO:48) (para el PCR de segunda ronda), mientras que los dos pares de cebador usados para amplificar el fragmento D de PTTV2 fueron TTV2-mF (SEQ ID NO:49)/TTV2-mR (SEQ ID NO:50) (para el PCR de primera ronda) y TTV2-nF (SEQ ID NO:51)/TTV2-nR (SEQ ID NO:52) (para el PCR de segunda ronda; Fig. 1A y Tabla 1).

Con objeto de amplificar la secuencias genómicas de longitud completa de tanto PTTV1 como PTTV2, se realizaron primero en PCR genómico inverso usando un par de cebadores específicos del gen conservado TTV1-IF (SEQ ID NO:1)/TTV1-IR (SEQ ID NO:4) localizado en la región A para PTTV1 y otro par de cebadores específicos del gen TTV2-IF (SEQ ID NO:5)/TTV2-IR (SEQ ID NO:8) localizado en la región D para PTTV2, respectivamente, con polimerasa de ADN de Fusión Herculanase II (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. No se detectaron productos PCR con tamaños esperados. Posteriormente se diseñaron nuevos conjuntos de

000087

cavadores para amplificar dos regiones que cubren los genomas PTTV1 y PTTV2 completos en el PCR de segunda ronda, respectivamente (Fig. 1A). Los pares de cebador usados para amplificar fragmentos B y C de PTTV1 fueron TTV1-IF (SEQ ID NO:1)/TTV1-2340R (SEQ ID NO:2) y TTV1-2311F (SEQ ID NO:3)/TTV1-IR (SEQ ID NO:4), respectivamente, mientras que los pares de cebador usados para amplificar fragmentos E y F de PTTV2 fueron TTV2-IF (SEQ ID NO:5)/TTV2-2316R (SEQ ID NO:6) y TTV2-GCF (SEQ ID NO:7)/TTV2-IR (SEQ ID NO:8), respectivamente (Fig. 1A y Tabla 1).

Los fragmentos C y F contienen las regiones ricas en GC de PTTV1 y PTTV2, respectivamente. Los productos PCR amplificados se eliminaron individualmente, purificaron y clonaron posteriormente en un vector pSC-B-amp/kan (Stratagene) por estrategia de clonación PCR StrataClone Blunt PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Stratagene) seguido por procesado por secuencia de ADN.

Ejemplo 2.

Cribado para muestras positivas de TTV porcino recolectadas de cerdos en una granja de Virginia:

El ADN de TTV porcino se detectó previamente de cerdos en regiones geográficas diferentes por PCR anidado basado en la secuencia UTR de una PTTV1 japonesa de cepa Sd-TTV31 (McKeown et al., 2004, supra). Con la identificación reciente de PTTV2, dos diferentes conjuntos de cebadores PCR anidados se han usado para amplificar la región A de PTTV1 y región D de PTTV2, respectivamente (Fig. 1A) (Ellis et al., 2008, supra; Kekarainen,

000088

T., Sibila, M., y Segales, J. (2006). Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected y non-PMWS-affected cerdos in Spain. J Gen Virol 87(Pt 4), 833-7; Krakowka et al., 2008, supra). Un enfoque de detección similar también se utilizó en el estudio actual para identificar cepas PTTV de cerdos en los Estados Unidos. Con objeto de seleccionar de muestras positivas PTTV1- o PTTV2 indígenas para uso posterior para determinar las secuencias genómicas de longitud completa, 20 muestras de suero (SR#1-20) y 19 de semen (SM#1-18, y SM#20) recolectadas de 20 cerdos en una granja de Virginia se sometieron a análisis PCR anidados. De manera sorpresiva, todas las 20 muestras de suero fueron positivas para PTTV1 y 19 también fueron positivas para PTTV2 (excepto para SR#18). En contraste, sólo 1 muestra de semen (SM#6) fue PTTV1-positiva y 3 muestras de semen (SM#8, 9 y 20) fueron PTTV2-positivas. El resultado fue consistente con un estudio reciente en tales muestras de semen del cerdo se mostraron para ser positivas para ADN de PTTV en España (Kekarainen, T., Lopez-Soria, S., y Segales, J. (2007). Detection of swine Torque teno virus genogroups 1 y 2 in boar sera y semen. Theriogenology 68(7), 966-71), y de esta manera sugiere una transmisión vertical potencial de PTTV. Sin embargo, las tasas de prevalencia de tanto PTTV1 como PTTV2 en semen fueron mucho inferiores que en suero, sugiriendo que no existe asociación directa para la presencia de ADNs de PTTV en suero y semen del mismo cerdo.

000089

Ejemplo 3.*Análisis de secuencias y filogenético:*

5 Los análisis genéricos y la alineación de secuencias de ADN y de aminoácidos se realizaron usando el paquete Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI). Las secuencias genómicas de tres cepas PTTV conocidas y sus números de acceso al GenBank correspondientes usados para la alineación y comparación son Sd-
 10 TTV31 (AB076001), TTV-1p (AY823990) y TTV-2p (AY823991). Las comparaciones de secuencia en pares (PASC) se realizaron usando 121 secuencias genómicas de longitud completa de cepas relacionadas con TTV de animal y humanas disponibles en el GenBank con un programa en línea PASC
 15 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/pasc/viridty.cgi?textpage=overview>) (Bao et al., 2008).

Los árboles filogenéticos se construyeron por el método de uniones vecinas en el programa PAUP 4.0 (David Swofford, Smithsonian Institute, Washington, DC, distribuido por Sinauer
 20 Associate Inc.) basado en las secuencias genómicas de longitud completa y las secuencias de aminoácido deducidas de 4 ORFs de siete cepas PTTV. Los datos se obtuvieron de 1000 re-muestreos.

Ejemplo 4.*Diseño de cebadores PCR para infección PTTV porcina diagnosticada*

Los análisis y alineación de secuencias de ADN se realizaron usando paquete Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI). Las secuencias genómicas de longitud completa de diez cepas TTV

. 000090

porcino y sus números de acceso al GenBank correspondientes usados para la alineación fueron como sigue. Especie PTTV1: Sd-TTV31 (AB076001), PTTV1a-VA (GU456383), TTV-1p (AY823990), PTTV1b-VA (GU456384), swSTHY-TT27 (GQ120664) y TTV1 #471819 (GU188045). Especie PTTV2: PTTV2b-VA (GU456385), PTTV2c-VA (GU456386), TTV-2p (AY823991) y TTV2 #472142 (GU188046). Las secuencias conservadas entre los genomas 6 PTTV1 y 4 PTTV2 se identificaron, respectivamente, y posteriormente se usaron para guiar las selecciones del cebador PCR en tiempo real usando el programa Beacon Designer (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA). Los cebadores usados para el PCR anidado doble de PTTV1 se diseñaron por el paquete Lasergene.

Ejemplo 5.

15 Curvas estándar de PCR en tiempo real de PTTV1 y PTTV2

Una región de 2091 bp correspondiente al fragmento PCR B de genoma PTTV1b-VA se volvió a amplificar del mismo fragmento PCR usando cebadores TTV1-IF (5'-CATAGGGTGTAACCAATCAGATTTAAGGCGTT-3') y TTV1-2340R (5'-GGTCATCAGACGATCCATCTCCCTCAG-3') como se describen previamente (Huang et al., 2010). El amplicón resultante fue gel purificado por Kit de Extracción de Gel QIAquick (Qiagen) y cuantificado por un espectrofotómetro NanoDrop que se usó para la plantilla estándar PCR en tiempo real de TTV porcino especie 1. Un clon de ADN de longitud completa de cepa PTTV2c-VA, pSC-PTTV2c, se construyó al ensamblar fragmentos PCR E y F de PTTV2c-VA en el vector pSC-B-amp/kan (Huang et al., datos no publicados). El pSC-PTTV2c plásmido (7082 bp) se usó para la plantilla estándar PCR en tiempo real de TTV porcino

000091

especie 2 y la concentración de ADN plásmido se midió por un espectrofotómetro NanoDrop. Una serie de dilución 10 veces de las dos plantillas se usó para generar las curvas estándares PCR en tiempo real, respectivamente.

5

Ejemplo 6.

Extracción de ADN vírico para ensayos PCR

El ADN total se aisló de 20 muestras de suero y 19 de semen recolectadas de 20 cerdos adultos convencionales (sin síntomas clínicos) de un criadero de cerdos en Virginia usando mini kit de ADN QIAamp (Qiagen) como se describe previamente (Huang et al., 2010). Un volumen de muestra de 400 µl para suero y semen se usó para extraer ADN con un eluido final de 50 µl de agua estéril. Todas las muestras de ADN extraídas se almacenaron a -20°C hasta la prueba PCR en tiempo real. La detección de TTV porcinos en estas muestras por PCR anidado convencional se ha descrito previamente (Huang et al., 2010). El ADN total extraído de una muestra de suero de cabra con el mismo procedimiento se usó como el control negativo.

20

Ejemplo 7.

Ensayos PCR cuantitativos en tiempo real para SYBR verde

Se realizaron PCR en tiempo real específicos de PTTV1 y PTTV2, respectivamente, usando kit de fluoresceína y SensiMix SYBR (Quantace Ltd) y el instrumento PCR en Tiempo Real MyiQ iCYCLER (BIO-RAD Laboratories). Cada 25-µl de

• 000092

reacción contiene 12.5 µl de Mezcla Maestra verde SYBR, 4 µl de ADN extraído, 0.5 µl de cada cebador (10 nM) y 7.5 µl de agua estéril. La condición PCR para PTTV1 fue 10 min a 95°C seguido por 40 ciclos de amplificación (15 seg a 95°C, 30 seg a 59.4°C, 10 seg a 72°C). Esto se siguió inmediatamente por un análisis de punto de fusión obtenido al incrementar gradualmente la temperatura desde 55°C hasta 95°C con la señal de fluorescencia siendo medida cada 0.5°C. La condición PCR para PTTV2 fue el mismo como PTTV1 excepto que la temperatura de combinación de los pares de bases fue 56°C. Las plantillas estándares PTTV1 y PTTV2 se incluyeron como controles positivos en cada corrida. Se llevaron a cabo análisis de datos y amplificación usando software MyiQ System (BIO-RAD Laboratories). Todas las muestras se corrieron por duplicado en la misma placa.

Ejemplo 8.

Especificidad y sensibilidad de dos ensayos de plexado sencillo

Las temperaturas óptimas de combinación de los pares de bases para amplificación de ensayos específicos de PTTV1 y PTTV2 fueron 59.4°C y 56°C, respectivamente, como se determina por una dilución de 10 veces de amplificaciones usando un gradiente de temperaturas de combinación de pares de bases. La amplificación del producto 118-bp usando cebadores TTV1F/TTV1R se obtuvo solamente como plantilla PTTV1 mientras que la amplificación del producto 200-bp con plantilla PTTV2 sólo se observó cuando se usaron cebadores

000093

TTVF4/TTVR4. Ningún ensayo proporciona ninguna amplificación cruzada de la otra, confirmando la especificidad de los cebadores y objetivos (datos no mostrados).

Una curva estándar PTTV1 se estableció sobre un intervalo de concentraciones de ADN objetivas por 25 μ l. El intervalo lineal se mostró para abarcar 4.4×10^1 hasta 4.4×10^8 copias. El límite de detección mínimo (44 copias) corresponde a un ciclo de umbral (C_t) de 37.57. Las muestras probadas con $C_t > 37.57$ se consideraron como abajo del límite de detección y no fueron cuantificables. Similarmente, una curva estándar PTTV2 se generó y usó para detectar concentración de ADN en el intervalo desde 8.6×10^0 hasta 8.6×10^8 copias por 25 μ l de reacción. El C_t correspondiente del límite de detección mínimo (8.6 copias) fue 36.53. Todas las muestras que se consideraron como PTTV1 o PTTV2 positivas tienen números de copias menores que el límite de detección máximo respectivo. Las curvas de fusión usando una dilución de 10 veces de plantilla estándar PTTV1 o PTTV2 (Fig. 6a y 6b; curvas azules), así como 20 muestras de suero de cerdo, muestran temperaturas de fusión (T_m) de 87.0°C para PTTV1 y 80.0°C para PTTV2, respectivamente (Fig. 6a y 6b; curvas rojas). No se observaron picos para los controles negativos usando agua estéril o ADN de suero de cabra como plantillas (Fig. 6a y 6b; líneas negras).

000094

Ejemplo 9.**Cuantificación de TTV 1 y TTV2 porcino en muestras de suero y semen de cerdo**

Se expresó la carga vírica como números de copia de genomas PTTV1 o PTTV2 por ml de muestras de suero de cerdo originales. El ADN de PTTV1 se detectó en todas las 20 muestras de suero en el intervalo desde 1.91×10^3 hasta 3.25×10^5 copias/ml mientras que el ADN de PTTV2 se detectó en 19 muestras de suero (excepto #10) en el intervalo desde 3.59×10^2 hasta 1.39×10^6 copias/ml. El resultado fue consistente para nuestro estudio previo al usar PCR anidado convencional (Tabla 5). Ninguna de las muestras de semen fueron PTTV1-positivas mientras que tres muestras de semen fueron PTTV2-positivas con cargas víricas muy bajas (230, 244 y 357 copias/ml, respectivamente).

Tabla 5. Comparación de detección de TTVs porcinos por diferentes ensayos en 20 muestras de suero y 19 de semen de cerdos adultos en una granja de Virginia.

Muestras	No. de positivo/ no total probado por ensayo diferente				
	PCR en tiempo real PTTV1	PCR anidado PTTV1	PCR en tiempo real PTTV2	PCR anidado PTTV2	PCR en tiempo real doble PTTV1/PTTV2
PTTV1 de suero	20/20	20/20	-	-	20/20
PTTV2 de suero	-	-	19/20	19/20	19/20

000095

PTTV1 de suero	0/19	1/19	-	-	-
PTTV2 de suero	-	-	3/19	3/19	-

5

Ejemplo 10.

Ensayo PCR en tiempo real doble PTTV1/PTTV2

10 El ensayo PCR en tiempo real doble PTTV1/PTTV2 se realizó en un sistema PCR de 25-µl que contiene 12.5 µl de Mezcla Maestra verde SYBR, 0.5 µl de cada cebadores PTTV1, 0.5 µl de cada cebadores PTTV2, 4 µl de ADN y 6.5 µl de agua estéril. La condición PCR doble y análisis del punto de fusión fueron el mismo como PTTV1 excepto que la temperatura de combinación de los
15 pares de bases fue 58°C. Los picos de fusión se analizaron para distinguir los amplicones específicos de PTTV1 y PTTV2.

Ejemplo 11.

PCR anidado doble

20 Se realizó el PCR de primera ronda con una Supermezcla Platinum PCR HiFi (Invitrogen) usando 4 µl de ADN extraído en un volumen total de 50 µl. La condición PCR fue 30 ciclos de 94°C durante 30 seg, 55°C durante 30 seg, 72°C durante 30 seg con una desnaturalización inicial del ADN de plantilla a 94°C durante 2 min. Una alícuota de 4-µl del producto PCR de primera ronda se usó para el PCR de segunda ronda con la misma condición y reactivos PCR. Un par de cebadores Plab-mF/Plab-mR se usó en el PCR de primera ronda mientras que una mezcla de dos pares de

cebadores, Pla-nF/Pla-nR para detección de PTTV1a, y Plb-nF/Plb-nR para detección de PTTV1b, se usaron en el PCR de segunda ronda (Tabla 1). Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis de gel en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y dos bandas específicas para cada tipo se diferenciaron por luz UV.

Ejemplo 12.

Construcción de plásmidos de expresión PTTV1 y PTTV2 ORF

10 Las partes de terminal C de ORF1 de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2c se amplificaron de los clones de ADN de longitud completa respectivos (pSC-PTTV1a, pSC-PTTV1b y pSC-PTTV2c; descritos en cualquier lugar). Los fragmentos amplificados se esperaron para codificar productos de proteína con 319 aa durante PTTV1a (ORF1
15 aa posiciones 317-635 (SEQ ID NO:13); no de acceso al GenBank GU456383), 318 aa para PTTV1b (ORF1 aa posiciones 322-639 (SEQ ID NO:14); no. de acceso al GenBank GU456384), y 316 aa para PTTV2c (ORF1 aa posiciones 310-625 (SEQ ID NO:16); no. de acceso al GenBank GU456386), respectivamente. Un fragmento truncado de
20 terminal C de PTTV1b que codifica 248 aa (ORF1 aa posiciones 322-569 (SEQ ID NO:14)) también se amplificó y usó como un control de comparación para análisis SDS-PAGE. Todos los plásmidos se construyeron por clonación de los productos PCR en un vector de expresión triple de E.coli/baculovirus/células mamíferas pTriEx1.1-Neo (Novagen) entre los sitios de restricción NcoI y XhoI para generar proteínas de fusión etiquetadas 8 x His de terminal C. Los cuatro plásmidos recombinantes se designaron pTri-PTTV1a-ORF1, pTri-PTTV1b-ORF1, pTri-PTTV1b-ORF1ctruc y pTri-

000097

PTTV2c-ORF1. Todas las secuencias clonadas se confirmaron por procesador por secuencia de ADN.

Ejemplo 13.

5 Expresión de proteínas PTTV1 y PTTV2 recombinantes

Los cuatro plásmidos de expresión se transformaron en células competentes Rosetta 2 (DE3) pLacI (Novagen), respectivamente, y las bacterias se colocaron en placas en placas de agar LB que contienen 100 µg/ml de ampicilina durante la noche a 37°C. Una colonia de transformación sencilla para cada constructo se usó para inocular 3 ml de medio LB que contiene 100 µg/ml de ampicilina (LB/amp), y creció 6-8 horas a 37°C. El cultivo de 3 ml turbio para cada constructo luego se usó para hacer reservas bacterianas al agregar glicerol esterilizado de filtro al 25%, y congelar el cultivo completamente a -80°C. Antes de la purificación, 10 µl de la reserva bacteriana congelada para cada constructo se usó para inocular un cultivo iniciador de 3 ml de LB/amp, y creció durante 6-8 horas a 37°C. Unos 100 ml de Medio TB Exprés Durante la Noche (Novagen) se inocularon con el cultivo iniciador para inducir expresión de proteína, y se hizo crecer 16-18 horas a 37°C. Después de la incubación, el cultivo de autoinducción se sometió a centrifugación a 3400 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante para cada constructo se descartó, y cada uno de los peletizados bacterianos se reservó a -20°C hasta el uso.

000098

Ejemplo 14.*Purificación y diálisis de proteínas recombinantes*

Las proteínas recombinantes fueron insolubles y expresadas
dentro de los cuerpos de inclusión bacterianos. Cada uno de los
peletizados bacterianos se trató con BugBuster y rLysozyme de
acuerdo con el protocolo del fabricante (Novagen), y Nucleasa
Benzonasa (Novagen) se agregó para degradación de ADN y ARN. Cada
uno de los peletizados del cuerpo de inclusión se volvió a
suspender posteriormente con 840 µl de solución amortiguadora de
lisis (clorhidrato de Guanidina 6M, fosfato de sodio 0.1M, Tris-
Cloruro de 0.01M, imidazol 0.01M, pH 8.0), y congeló a -80°C
durante al menos 30 minutos. Luego se descongeló, diluyó con
unos 2.5 ml adicionales de solución amortiguadora de lisis y giró
suavemente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los
sobrenadantes de lisado se recolectaron por centrifugación a
15,000 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una mezcla
espesa de enlace HIS Ni-NTA al 50% (Novagen) se agregó a cada uno
de los sobrenadantes decantados, y las mezclas se agitaron
durante 60 minutos a temperatura ambiente para promover enlace
his-tag. Las mezclas de lisado/resina se cargaron en una columna
de cromatografía al vacío. Después del flujo inicial a través
de, unos 7 ml de solución amortiguadora de lisis se agregó a la
columna y se permitió fluir a través. Cada columna luego se lavó
2 veces con 7 mL de solución amortiguadora de lavado (Urea 8M,
fosfato de sodio 0.1M, cloruro de sodio 0.15M, imidazol 0.02M, pH
8.0). La elución de la proteína objetivo se alcanzó al agregar 4
alícuotas de 1 ml separadas de solución amortiguadora de elución

0000??

(Urea 8M, fosfato de sodio 0.05M, cloruro de sodio 1M, Imidazol 0.5M, pH 8.0) a la columna. Las cuatro fracciones de elución se analizaron por SDS Page y Tinción con azul de Coomasie.

Las eluciones que contienen concentraciones importantes de la proteína objetivo se inyectaron en un casete de diálisis 0.5ml - 3ml con un corte de peso molecular de 20,000 (Pierce). Una serie de 4 soluciones amortiguadoras de diálisis se usaron para diálisis; solución amortiguadora de diálisis 1 (Urea 6M, fosfato de sodio 0.05M, cloruro de sodio 0.8M, Imidazol 0.3M, pH 8.0), solución amortiguadora de diálisis 2 (Urea 4M, fosfato de sodio 0.033M, cloruro de sodio 0.533M, Imidazol 0.2M, pH 8.0), solución amortiguadora de diálisis 3 (Urea 2.67M, fosfato de sodio 0.022M, cloruro de sodio 0.356M, Imidazol 0.133M, pH 8.0) y solución amortiguadora de diálisis 4 (Urea 1.5M, fosfato de sodio 0.0148, cloruro de sodio 0.237M, Imidazol 0.089M, pH 8.0). El casete de diálisis se sumergió y giró secuencialmente en cada solución amortiguadora de diálisis durante 6 horas a 4°C. Cuando la diálisis se completó, las proteínas de fusión etiquetadas His recombinantes cada una se removió de los casetes, cuantificadas usando un NanoDrop y congeladas a -80°C.

Ejemplo 15.

SDS-PAGE y Western blot etiquetado anti-His

Un western blot se desarrolló para detectar proteínas recombinantes purificadas al usar un anticuerpo monoclonal etiquetado anti-6 x His (Rockland). Los volúmenes iguales de cada una de las proteínas ORF1 truncadas purificadas y LDS / 10% β -ME se mezclaron, e hirvieron a 95°C durante 10 minutos.

000100

Unos 10- μ l de la muestra hervida se agregó a cada pozo apropiado de un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 4-12% (Invitrogen), y se corrió en 200 volts durante 43 minutos en 1 x solución amortiguadora de corrida MES (Invitrogen). Las proteínas se transflectaron a una membrana PVDF (Bio-Rad) usando un aparato de transferencia semi seco Trans blot y 1 x de solución amortiguadora de transferencia (Invitrogen). Una vez que la transferencia se completó, la membrana PVDF se incubó en solución amortiguadora de bloqueo Odyssey (Li-Cor) a temperatura ambiente durante 1 hora. El Mab etiquetado anti-6 x His se diluyó en 1:1000 en solución amortiguadora de bloqueo Odyssey / tween 20 al 0.2%, y transfirió a la membrana después de que se removió la solución amortiguadora de bloqueo Odyssey previa. El MAb se dejó en un balancín para incubarse con la membrana durante ya sea 2 horas a temperatura ambiente o 4°C durante la noche, y luego la membrana se lavó 3 veces con solución amortiguadora salina tris / tween 20 al 0.05% (TBS-T, Sigma). Un anticuerpo IRDye 800 IgG anti-conejo de cabra (Li-Cor) se diluyó en 1:5000 en solución amortiguadora de bloqueo Odyssey / tween 20 al 0.2% / SDS al 0.1%. Se transfirió a la membrana PVDF frescamente lavada, y se permitió incubarse durante 1 hora a temperatura ambiente mientras se balanceó suavemente. La membrana se lavó 3 veces con TBS-T, 1 vez con TBS y se formó en imagen con el Li-Cor Odyssey.

000101

Ejemplo 16.*Western blot de suero*

15 Un western blot de suero se desarrolló, y usó para identificar controles de suero positivos y negativos para desarrollo ELISA. Después del SDS-PAGE como se describe arriba, las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF que se incubó posteriormente en solución amortiguadora de bloqueo Odyssey (Li-
10 Cor) a temperatura ambiente durante 1 hora. Una muestra de suero seleccionada se diluyó en 1:100 en solución amortiguadora de bloqueo Odyssey / tween 20 al 0.2%, y transfirió a la membrana después de que se removió la solución amortiguadora de bloqueo Odyssey previa. La muestra de suero se dejó en un balancín para
15 incubarse con la membrana durante 2 horas a temperatura ambiente, y luego la membrana se lavó 3 veces con solución amortiguadora salina tris / tween 20 al 0.05% (TBS-T, Sigma). Un anticuerpo IRDye 800 IgG anti-cerdo de cabra (Rockland) se diluyó en 1:2500 en solución amortiguadora de bloqueo Odyssey / tween 20 al 0.2% /
20 SDS al 0.1%. Se transfirió a la membrana PVDF frescamente lavada, y se permitió incubar durante 1 hora a temperatura ambiente mientras se balanceó suavemente. La membrana se lavó 3 veces con TBS-T, 1 vez con TBS y se formó en imagen con el Li-Cor Odyssey.

000102

Ejemplo 17.*ELISA específico de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2 indirecto*

5 Las concentraciones óptimas de los antígenos usados para recubrir las placas y diluciones de antisuero y conjugados se determinaron por titulación de la tabla de revisión. El ELISA se inició al diluir cada una de las proteínas de fusión etiquetadas His recombinantes purificadas (PTTV1a, PTTV1b y PTTV2c, 10 respectivamente) a 680 ng/ml en 1x de solución amortiguadora de Recubrimiento de Carbonato (CCB) a un pH de 9.6, y placas ELISA de enlace de medio de recubrimiento (Greiner) con 100 µl/pozo. Las placas se recuperaron, y permitieron para incubar a 37°C durante 2 horas. Después del recubrimiento, las proteínas 15 diluidas se removieron, y cada pozo se lavó 3 veces con 300 µl de 1 x TBS-T. La solución amortiguadora de bloqueo libre de proteína (Pierce) luego se agregó en un volumen de 300 µl/pozo, y las placas se permitieron incubar a 37°C durante 1 hora. Mientras tanto, en un bloque de dilución de 96 pozos, las 20 muestras de suero se diluyeron en 1:100 en 150 µl de solución amortiguadora de bloqueo libre de proteína. El bloque luego se removi6, y 100 µl de cada muestra de suero diluida se transfirió para cada pozo correspondiente en las placas ELISA. Las placas se permitieron incubar a 37°C durante 2 horas, después de lo cual cada pozo se lavó 3 veces con 300 µl de TBS-T. Después, el anticuerpo IgG anti-cerdo conjugado HRP (Rockland) se diluyó en 1:4000 en 12 ml de bloque libre de proteína, y 100 µl se agregó a cada pozo de las placas. Esto se incubó a 37°C durante 1 hora, y

. 000103

luego cada pozo se lavó 3 veces con 300 µl de TBS-T. Con objeto de desarrollar el ELISA, 100 µl de Componente de Reserva 1 Sure Blue (KPL) se agregó a cada pozo de las placas. Después de 20 minutos, 100 µl de HCL 1N se agregó a cada pozo para detener el desarrollo. Las placas luego se leyeron en 450 nm.

Ejemplo 18.

Análisis de datos

Los sueros porcinos usados en la investigación del cultivo celular de una compañía comercial (fabricada en Nueva Zelanda y considerada libre de todas las enfermedades OIE) se usaron como un control positivo para los tres protocolos ELISA debido a que el suero fueron todos los PTTV1a, PTTV1b y PTTV2 positivos como se detecta por western blot de suero y muestra valores OD altos (> 2.0). Inicialmente se usa suero de cerdo gnotobiótico agrupado como un control negativo ya que fueron negativos en detección western blot. Posteriormente, en comparación del suero de cerdo gnotobiótico negativo, se selección algún suero porcino recolectado de un criadero de cerdos convencional en Wisconsin. También fueron negativos en detección western blot y sus valores OD corresponden a aquellos de suero de cerdo gnotobiótico negativo. Estos sueros porcinos convencionales se agruparon y usaron como un control negativo. El valor de corte para cada ELISA se calculó como el valor OD medio para el grupo de control negativo ($n=4$) más 3 veces de la desviación estándar.

000104

Ejemplo 19.

Construcción de clones de ADN genómicos de longitud completa de TTV1a, 1b y 2c porcino

5 Los fragmentos B y C de PCR del PTTV1a-VA aislado US (no. de acceso al GenBank GU456383) se volvieron a amplificar de los constructos descritos previamente, y se ensamblaron posteriormente en un ADN genómico de longitud completa con un sitio BamH I en los ambos extremos del genoma por PCR de traslape
10 usando la polimerasa de ADN de Fusión Herculase II (Stratagene) en el vector pSC-B-amp/kan (Stratagene). El constructo resultante se designó pSC-PTTV1a (Fig. 17A). Usando la misma estrategia, el clon pSC-PTTV1b (Fig. 17B) originado del PTTV1b-VA aislado US (no. de acceso al GenBank GU456384) y el clon pSC-PTTV2c (Fig.
15 17C) originado del PTTV2c-VA aislado US (no. de acceso al GenBank GU456386) se construyeron con los mismos sitios de restricción (BamH I) en el mismo vector de fondo. El TTV2-#471942-completo de plásmido (Fig. 17E) que contiene un ADN genómico de longitud completa originado de un aislado TTV2 porcino patogénico de
20 Alemania. TTV2-#471942 fue un regalo del Dr. Andreas Gallei (BIVI, Alemania). TTV2-#471942 se clasificó en el TTV porcino subtipo 2b junto con el PTTV1b-VA aislado US basado en el análisis filogenético (datos no mostrados).

000105

Ejemplo 20.

Construcción de clones de ADN dimerizados por tándem de TTV2b y
5 *2c porcino*

El genoma PTTV2c de longitud completa se elimina del clon pSC-PTTV2c por digestión BamH I, purifica y liga para formar concatémeros. Los concatémeros ligados se clonaron en el vector BamH I-pre-digerido pSC-B-amp/kan para producir un clon de ADN
10 dimerizado por tándem, pSC-2PTTV2c-RR (Fig. 1D). Similarmente, un clon de ADN dimerizado por tándem, pSC-2PTTV2b-RR, se generó del clon TTV2-#471942-completo usando sitios de restricción EcoR V (Fig. 1F).

Ejemplo 21.

15 *Generación de anticuerpos policlonales anti-ORF1 específicos de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2*

El producto que codifica ORF1 es la proteína cápsida
supuesta de TTV. Para generar anticuerpos policlonales anti-ORF1
20 específicos de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2 para detectar la expresión de proteínas ORF1 PTTV y para determinar la infectividad de clones de ADN PTTV, las tres proteínas ORF1 de PTTV1a, PTTV1b y PTTV2c se expresaron en E.coli, purificaron y se usaron posteriormente para inmunizar conejos blancos de Nueva Zelanda, respectivamente, como un servicio de producción de anticuerpo de costumbre en Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA). Cada anticuerpo policlonal anti-ORF1 se produjo de suero de conejos inmunizados.

. 000105

Ejemplo 22.*Transfección in vitro de clones infecciosos PTTV*

Se sembraron células PK-15 en 2×10^5 células por pozo en una
 5 placa de 6 pozos y se hicieron crecer hasta 60%-70% de
 confluencia antes de la transfección. Los clones de ADN pSC-
 2PTTV2b-RR y pSC-2PTTV2c-RR se transfectaron directamente en
 células PK-15, respectivamente, usando Lipofectamina LTX
 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para
 10 clones pSC-PTTV1a, pSC-PTTV2c y TTV2-#471942-completo, sus
 concatémeros ligados, producidos como se describe arriba, se
 usaron para transfección, respectivamente. Las células se
 cultivaron durante 3 hasta 5 días, y luego se aplicaron a un
 ensayo de inmunofluorescencia (IFA) para detectar la expresión de
 15 ORF1 de TTVs porcinos. Alternativamente, las células
 transfectadas se pasaron en placas de 6 pozos nuevas y
 continuaron para cultivo durante 3 días antes de la detección
 IFA.

20

Ejemplo 23.*Ensayo de inmunofluorescencia (IFA)*

Las células transfectadas o pasadas se lavaron 2 veces con
 PBS y fijaron con acetona. Quinientos microlitros de los
 anticuerpos, específicos para PTTV1a o PTTV2 en dilución 1:500 en
 PBS, se agregaron sobre las células e incubaron durante 1 hora a
 temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con PBS y
 500 μ l de IgG anti-conejo de cabra etiquetado Alexa Flúor 488 o
 rojo Texas (Invitrogen) en dilución 1:200 luego se agregó.

. 000107

Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente y lavado con PBS, las células se tiñeron con 500 µl DAPI (KPL, Inc.) en dilución 1:1000 y se visualizaron bajo un microscopio de fluorescencia.

5

Ejemplo 24.

Inoculación in vivo de cerdos convencionales con los clones TTV2 porcino dimerizados con tándem.

Se realizó un estudio de inoculación en cerdos para determinar las infectividades de los dos clones TTV2 porcino dimerizados con tándem: pSC-2TTV2b-RR y pSC-2TTV2c-RR. Brevemente, ocho cerdos convencionales de 4 semanas de edad que fueron seronegativos y negativos de ADN vírico para TTV2 porcino se asignaron aleatoriamente en dos grupos de cuatro cada uno. Cada grupo de cerdos se alojó separadamente y mantuvo bajo condiciones que cumplen todos los requerimientos del Comité Institucional en el Cuidado y Uso Animal.

Todos los cerdos en cada grupo se inyectaron por una combinación de tanto la ruta intramuscular como ruta intraganglio. Los cuatro cerdos (nos. 181, 189, 192 y 193) se inyectaron cada uno con 200 µg del ADN plásmido pSC-2TTV2b-RR mientras que otros cuatro cerdos (nos. 92, 180, 188 y 191) se inocularon cada uno con 200 µg del clon pSC-2TTV2c-RR. Los cerdos se vigilaron diariamente para signos clínicos de enfermedad para un total de 28 días. Todos los cerdos se les aplicó la necropsia en 28 días después de la inoculación.

Aunque la presente invención se ha ilustrado por descripción de varias modalidades y aunque las modalidades ilustrativas se han descrito en detalle, no es la intención de los solicitantes

000108

restringir o de ninguna manera limitar el alcance de las reivindicaciones anexas para tal detalle. Las modificaciones adicionales fácilmente aparecerán para aquellos experimentados en la técnica. La invención en sus aspectos más amplios por lo tanto no se limita a los detalles específicos, aparatos y métodos representativos, y los ejemplos ilustrativos se muestran y describe. En consecuencia, las salidas pueden hacerse de tales detalles sin alejarse del espíritu o alcance del concepto inventivo general de los solicitantes.

10

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad, y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

15

20

000109

REIVINDICACIONES

5 1. Una molécula de ácido nucleico infecciosa de virus Torque
teno porcino (PTTV) caracterizada porque comprende una molécula
de ácido nucleico que codifica un PTTV infeccioso que contiene al
menos una copia de secuencia genómica que tiene al menos 85% de
homología con una secuencia genómica seleccionada del grupo que
consiste de PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA.

10 2. La molécula de ácido nucleico infecciosa de conformidad
con la reivindicación 1, caracterizada porque al menos una copia
de secuencia genómica que tiene al menos 95% de homología con la
secuencia genómica es seleccionada del grupo que consiste de
PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA.

15 3. La molécula de ácido nucleico infecciosa de conformidad
con la reivindicación 1, caracterizada porque la secuencia
genómica se selecciona de secuencias establecidas en SEQ ID NO:9,
SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, y SEQ ID NO:12.

20 4. Un plásmido biológicamente funcional o vector vírico
caracterizado porque contiene la molécula de ácido nucleico
infecciosa de conformidad con la reivindicación 3.

5. El plásmido biológicamente funcional o vector vírico de
conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque
contiene más de una copia de la molécula de ácido nucleico
infecciosa.

6. Una célula hospedera apropiada transfectada por el
vector, caracterizada porque comprende la molécula de ácido
nucleico infecciosa de conformidad con la reivindicación 4.

. 000110

7. Un PTTV infeccioso, no virulento producido por células caracterizado porque contiene la molécula de ácido nucleico infecciosa de conformidad con la reivindicación 6.

5 8. Una vacuna caracterizada porque comprende un portador fisiológicamente aceptable, no tóxico y una cantidad inmunogénica de un miembro seleccionado del grupo que consiste de:

(a) una molécula de ácido nucleico que contiene al menos una copia de secuencia genómica que tiene al menos 80% de homología con una secuencia genómica seleccionada del grupo que consiste de
10 genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA, o su hebra complementaria;

(b) un plásmido biológicamente funcional o vector vírico que contiene una molécula de ácido nucleico que contiene al menos una copia de secuencia genómica que tiene al menos 80% de homología
15 con una secuencia genómica seleccionada del grupo que consiste de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA, o su hebra complementaria;

(c) un virus Torque teno porcino no patogénico infeccioso, no virulento, que se deriva de y contiene una secuencia genómica
20 que tiene al menos 85% de homología con una secuencia genómica seleccionada del grupo que consiste de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA; y

(d) un fragmento inmunogénico de una secuencia de polipéptido o una proteína completa traducida de acuerdo con una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste de ORF1, ORF2, ORF1/1, y ORF2/2 de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA.

000111

9. La vacuna de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque la vacuna contiene virus PTTV vivo.

10. La vacuna de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque la vacuna contiene virus PTTV exterminados.

5 11. La vacuna de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque el fragmento inmunogénico de una secuencia de polipéptido o una proteína completa que comprende proteínas recombinantes expresadas por baculovirus o expresadas bacterianas purificadas expresadas de ORF1, ORF2, ORF1/1 y ORF2/2 de
10 genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA.

12. La vacuna de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada porque el fragmento inmunogénico de una secuencia de polipéptido o una proteína completa que comprende proteínas
15 recombinantes expresadas por baculovirus o expresadas bacterianas purificadas expresadas de ORF1 de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA.

13. La vacuna de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque además contiene un adyuvante.

20 14. Un método para inmunizar un cerdo contra infección vírica PTTV, caracterizado porque comprende administrar a un cerdo una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna de conformidad con la reivindicación 8.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque comprende administrar la vacuna parenteralmente, intranasalmente, intradérmicamente, o transdérmica al cerdo.

000112

16. El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque comprende administrar la vacuna por vía intralinfoide o intramuscular al cerdo.

5 17. Un polinucleótido aislado caracterizado porque consiste de una secuencia de ácido polinucleico que tiene 85% de homología con una secuencia de nucleótidos de PTTV1a-VA establecida en la SEQ ID NO:9.

10 18. El polinucleótido aislado de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque la secuencia de ácido polinucleico que tiene 95% de homología con la secuencia de nucleótidos de PTTV1a-VA establecida en SEQ ID NO:9.

15 19. El polinucleótido aislado de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque la secuencia de ácido polinucleico consiste de la secuencia de nucleótidos de PTTV1a-VA establecida en SEQ ID NO:9.

20 20. Un polinucleótido aislado caracterizado porque consiste de una secuencia de ácido polinucleico que tiene 85% de homología con una secuencia de nucleótidos de PTTV1b-VA establecida en SEQ ID NO:10.

21. El polinucleótido aislado de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque la secuencia de ácido polinucleico que tiene 95% de homología con la secuencia de nucleótidos de PTTV1b-VA establecida en SEQ ID NO:10.

22. El polinucleótido aislado de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque la secuencia de ácido polinucleico consiste de la secuencia de nucleótidos de PTTV1b-VA establecida en SEQ ID NO:10.

. 000113

23. Un polinucleótido aislado caracterizado porque consiste de una secuencia de ácido polinucleico que tiene 85% de homología con una secuencia de nucleótidos de PTTV2b-VA establecida en SEQ ID NO:11.

24. El polinucleótido aislado de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque la secuencia de ácido polinucleico que tiene 95% de homología con la secuencia de nucleótidos de PTTV2b-VA establecida en SEQ ID NO:11.

25. El polinucleótido aislado de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque la secuencia de ácido polinucleico consiste de la secuencia de nucleótidos de PTTV2b-VA establecida en SEQ ID NO:11.

26. Un polinucleótido aislado caracterizado porque consiste de una secuencia de ácido polinucleico que tiene 85% de homología con una secuencia de nucleótidos de PTTV2c-VA establecida en SEQ ID NO:12.

27. El polinucleótido aislado de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque la secuencia de ácido polinucleico que tiene 95% de homología con la secuencia de nucleótidos de PTTV2c-VA establecida en SEQ ID NO:12.

28. El polinucleótido aislado de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque la secuencia de ácido polinucleico consiste de la secuencia de nucleótidos de PTTV2c-VA establecida en SEQ ID NO:12.

29. Una vacuna caracterizada porque comprende un fragmento inmunogenético de una secuencia de polipéptido o una proteína completa traducida de acuerdo con una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste de ORF1, ORF2, ORF1/1, y

000114

ORF2/2 de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA.

30. La vacuna de conformidad con la reivindicación 29, caracterizada porque el fragmento inmunogénico o proteína completa es una proteína cápsida de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA.

31. La vacuna de conformidad con la reivindicación 29, caracterizada porque la secuencia de polinucleótido es seleccionada del grupo que consiste de ORF1 de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA.

32. La vacuna de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque la secuencia de polinucleótido es ORF1 del genotipo PTTV PTTV1a-VA.

33. La vacuna de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque la secuencia de polinucleótido es ORF1 del genotipo PTTV PTTV1b-VA.

34. La vacuna de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque la secuencia de polinucleótido es ORF1 de subtipo PTTV PTTV2c-VA.

35. La vacuna de conformidad con la reivindicación 29, caracterizada porque la secuencia de polipéptido es seleccionada del grupo que consiste de la secuencia establecida en SEQ ID No:13, SEQ ID No:14, SEQ ID No:15, SEQ ID No:16, SEQ ID No:17, SEQ ID No:18, SEQ ID No:19, SEQ ID No:20, SEQ ID No:21, SEQ ID No:22, SEQ ID No:23, SEQ ID No:24, SEQ ID No:25, SEQ ID No:26, SEQ ID No:27, y SEQ ID No:28.

000115

36. La vacuna de conformidad con la reivindicación 35, caracterizada porque la secuencia de polipéptido está establecida en SEQ ID No:13.

5 37. La vacuna de conformidad con la reivindicación 36, caracterizada porque la secuencia de polipéptido es una región de terminal C (aa 317-635) de SEQ ID No:13.

38. La vacuna de conformidad con la reivindicación 35, caracterizada porque la secuencia de polipéptido está establecida en SEQ ID No:14.

10 39. La vacuna de conformidad con la reivindicación 38, caracterizada porque la secuencia de polipéptido es una región de terminal C (aa 322-639) de SEQ ID No:14.

15 40. La vacuna de conformidad con la reivindicación 35, caracterizada porque la secuencia de polipéptido está establecida en SEQ ID No:16.

41. La vacuna de conformidad con la reivindicación 40, caracterizada porque la secuencia de polipéptido es la región de terminal C (aa 310-625) de SEQ ID No:16.

20 42. La vacuna de conformidad con la reivindicación 35, caracterizada porque la secuencia de polipéptido está establecida en SEQ ID No:20.

43. La vacuna de conformidad con la reivindicación 29, caracterizada porque además contiene un adyuvante.

44. Un método para inmunizar un cerdo contra infección vírica PTTV, caracterizado porque comprende administrar a un cerdo una cantidad inmunológicamente efectiva de la vacuna de conformidad con la reivindicación 29.

000116

45. El método de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado porque comprende administrar el fragmento inmunogenético o proteína completa para un cerdo.

46. El método de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado porque comprende administrar la vacuna parenteralmente, intranasalmente, intradérmicamente, o transdérmicamente al cerdo.

47. El método de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado porque comprende administrar la vacuna por vía intralinfoide o intramuscular al cerdo.

48. Un método para diagnosticar infección PTTV1 y cuantificación de carga PTTV1, caracterizado porque comprende:

extraer el ADN de una muestra sospechada de infección PTTV1;

realizar reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando cebadores que comprenden las secuencias establecidas en SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:30; y

detectar amplificación específica PTTV1.

49. El método de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque la reacción en cadena de polimerasa es una PCR en tiempo real verde SYBR.

50. Un método para diagnosticar infección PTTV2 y cuantificación de carga PTTV2, caracterizado porque comprende:

extraer el ADN de una muestra sospechada de infección PTTV2;

realizar la reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando cebadores que comprenden las secuencias establecidas en SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:32; y

detectar amplificación específica de PTTV2.

000117

51. El método de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado porque la reacción en cadena de polimerasa es una PCR en tiempo real por SYBR verde.

52. Un método para detectar y diagnosticar simultáneamente infección por PTTV1 y PTTV2, caracterizado porque comprende:

extraer ADN de una muestra sospechosa de infección por PTTV;
realizar la reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando cebadores que comprenden las secuencias establecidas en SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:32; y

detectar amplificación específica de PTTV1 y PTTV2.

53. El método de conformidad con la reivindicación 52, caracterizado porque la reacción en cadena de polimerasa es una PCR en tiempo real por SYBR verde.

54. Un método para detectar y diagnosticar simultáneamente infección por PTTV1a y PTTV1b, caracterizado porque comprende:

extraer el ADN de una muestra sospechosa de infección PTTV1;
realizar una primera reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando cebadores que comprenden las secuencias establecidas en SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:34;

realizar una segunda PCR usando cebadores que comprenden las secuencias establecidas en SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, y SEQ ID NO:38; y

detectar amplificación específica de PTTV1a y PTTV1b.

55. Un método para diagnosticar infección por PTTV, caracterizado porque comprende

inmovilizar un fragmento inmunogenético o una proteína completa de una secuencia de polipéptido traducida de acuerdo con una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que

. 000115

consiste de ORF1, ORF2, ORF1/1, y ORF2/2 de subtipos PTTV PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA;

poner en contacto una muestra de suero de un cerdo sospechoso de infección PTTV con el fragmento inmunogenético
5 inmovilizado o proteína completa; y

detectar el anticuerpo capturado específico para el fragmento inmunogenético.

56. El método de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado porque la secuencia de polinucleótido es
10 seleccionada del grupo que consiste de ORF1 de genotipos PTTV o subtipos PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, y PTTV2c-VA.

57. La vacuna de conformidad con la reivindicación 56, caracterizada porque la secuencia de polinucleótido es ORF1 del genotipo PTTV PTTV1a-VA.

15 58. El método de conformidad con la reivindicación 56, caracterizado porque la secuencia de polinucleótido es ORF1 del genotipo PTTV PTTV1b-VA.

59. El método de conformidad con la reivindicación 56, caracterizada porque la secuencia de polinucleótido es ORF1 de
20 subtipo de PTTV, PTTV2c-VA.

60. El método de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado porque la secuencia de polipéptido es seleccionada del grupo que consiste de la secuencia establecida en SEQ ID No:13, SEQ ID No:14, SEQ ID No:15, SEQ ID No:16, SEQ ID No:17, SEQ ID No:18, SEQ ID No:19, SEQ ID No:20, SEQ ID No:21, SEQ ID No:22, SEQ ID No:23, SEQ ID No:24, SEQ ID No:25, SEQ ID No:26, SEQ ID No:27, y SEQ ID No:28.

000119

61. El método de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque la secuencia de polipéptido está establecida en SEQ ID No:13.

62. La vacuna de conformidad con la reivindicación 60, caracterizada porque la secuencia de polipéptido está establecida en SEQ ID No:16.

63. La vacuna de conformidad con la reivindicación 62, caracterizada porque el fragmento inmunogenético es la región de terminal C (aa 317-635) de SEQ ID No:13, (aa 322-639) de SEQ ID No:14, o (aa 310-625) of SEQ ID No:16.

64. La vacuna de conformidad con la reivindicación 60, caracterizada porque la secuencia de polipéptido está establecida en SEQ ID No:20.

65. El método de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado porque el anticuerpo capturado detectado es por medio de Western blot.

66. El método de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado porque el anticuerpo capturado detectado es por medio de ensayo inmunosorbente ligado a la enzima (ELISA).

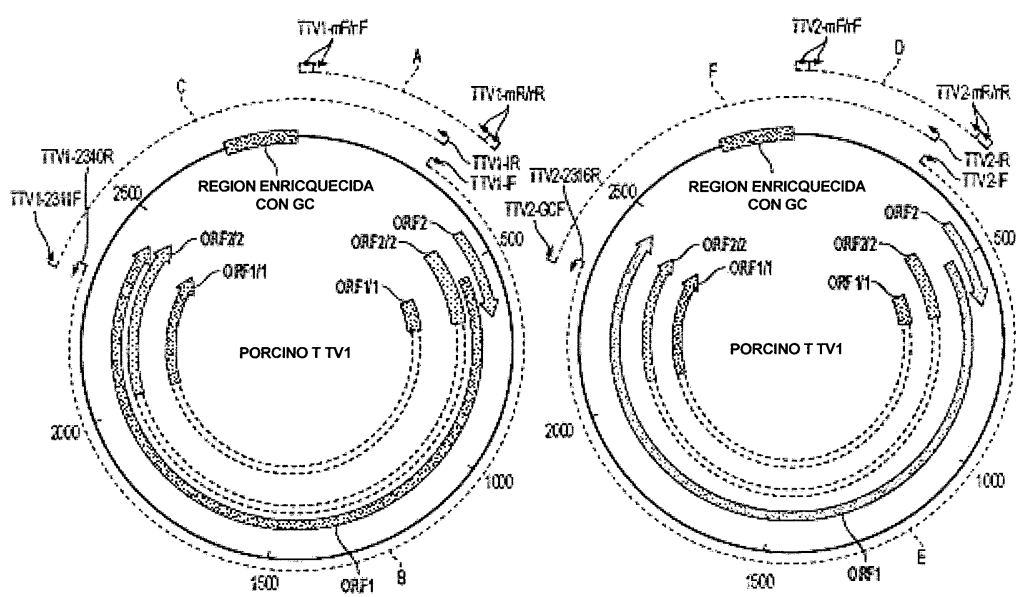


FIG 1A

000123

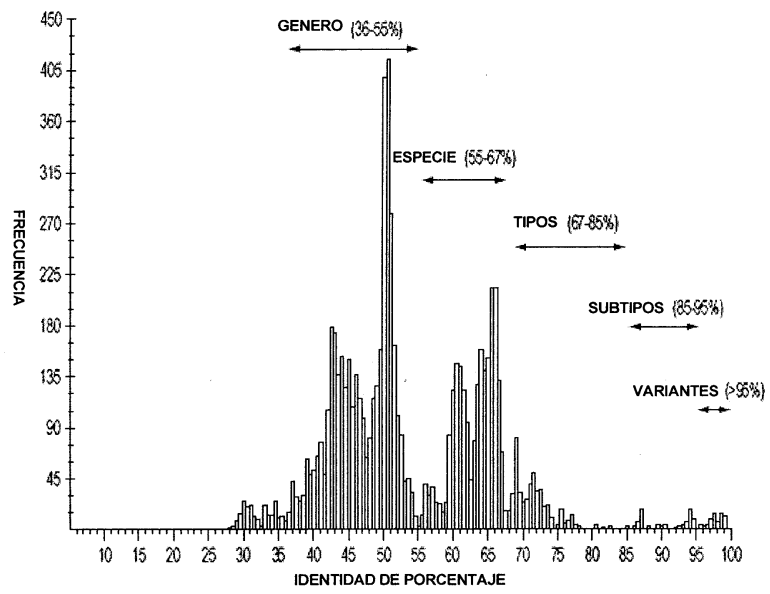
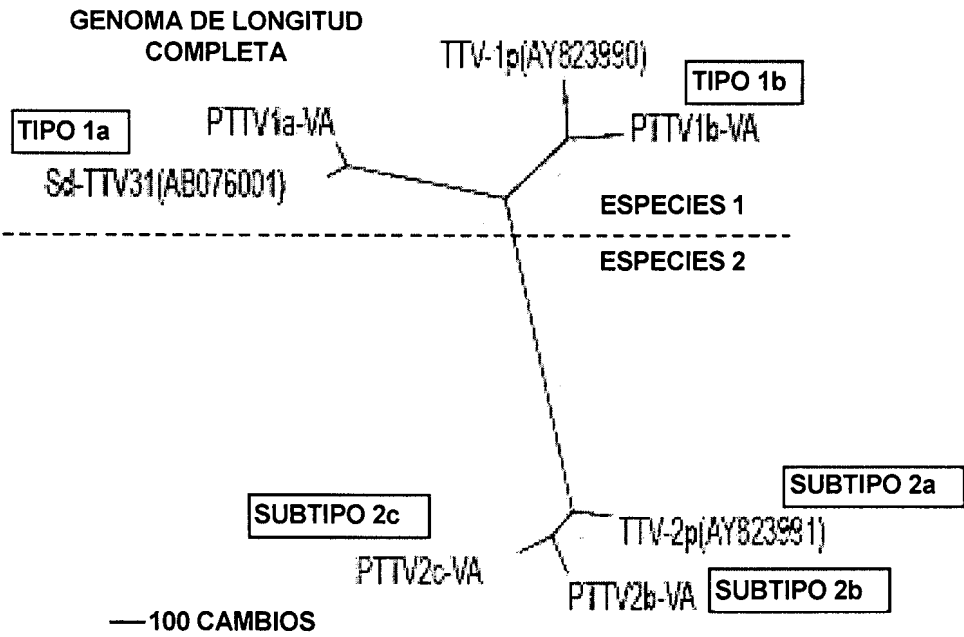


FIG 2

FIG 3A



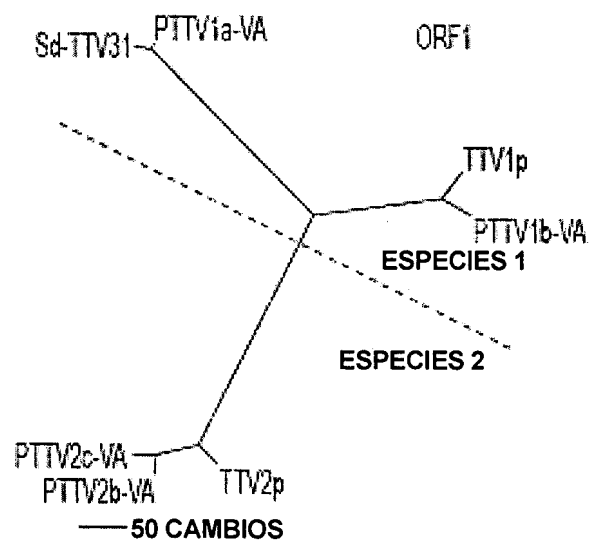


FIG. 3B

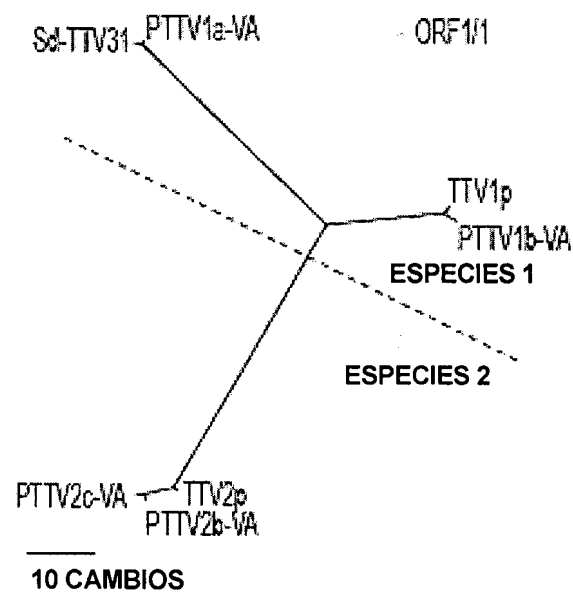


FIG. 3C

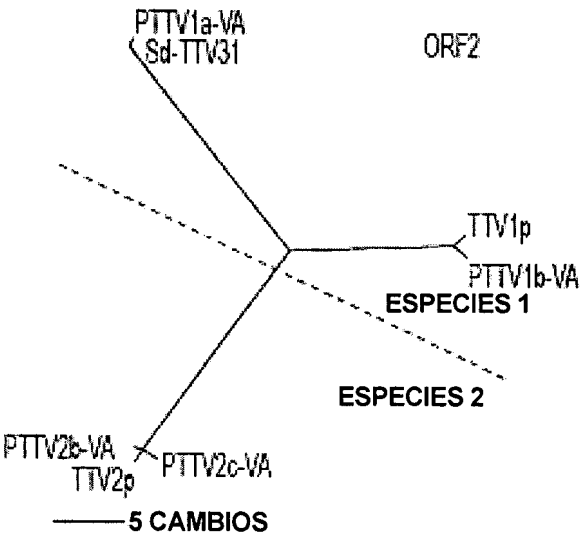


FIG. 3D

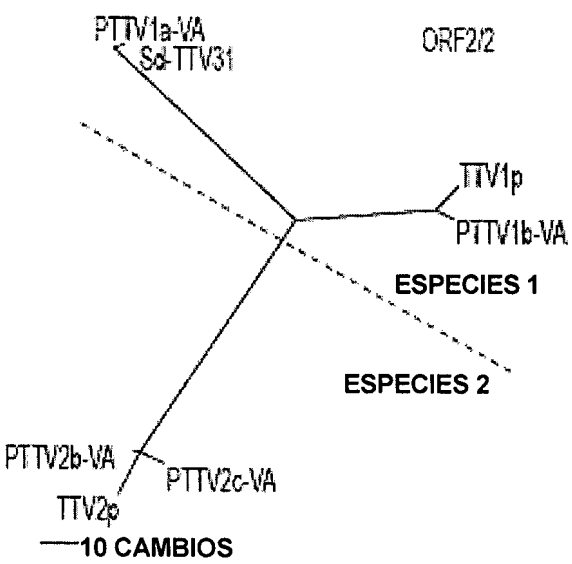


FIG. 3E

FIG 4A

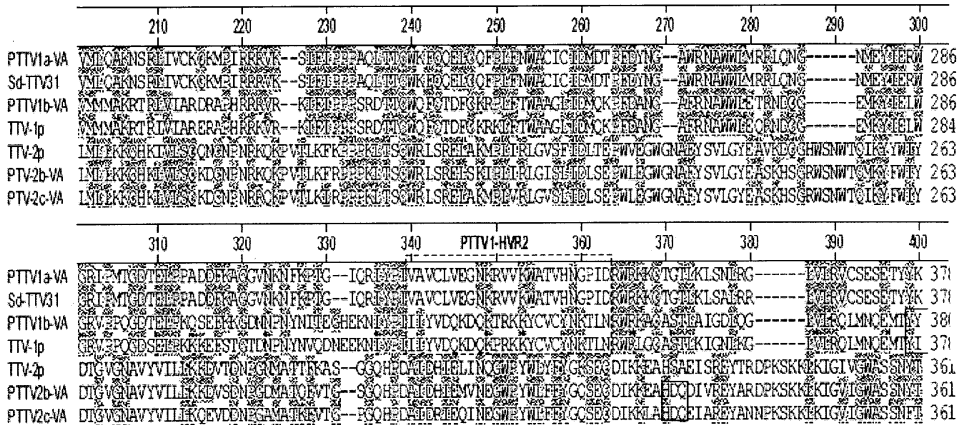


FIG 4B

	PTTV1-HVR3	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
PTTV1a-VA	WTGSEFTGARQQDMEVVG--TEYPLCTIKMDEPENETVEVWSWKNIPTSG-TLKDYRGLST-GQWMDTDFARIQLPSSHNWDFGHKAREGPRVVK	475										
S4-TTV31	WTASEFTGARQQDMEVVG--TEYPLCTIKMEPEPENETVEVWSWKATISTAG-TLKDYRGLSS-GQWMDTDFARIQLPSSHNWDFGHKAREGPRVVK	475										
PTTV1b-VA	WTGSEFTSSPELQRWK---G-TRLITIDAR-KADTENPKVSSWEGQMMNTSGTVLQEVNISIINMTQIRQDDFAKITLPKSPHDIIDFGHHSRFGPRVKN	475										
TTV-1p	WTGSEYSAPFVWRK---G-SRFVVIDAR-KADQENPKVSTWELRGTMNTQUTVLKDVFGINLQVQFRAADFGKITLPKSPHDIIDFGHHSRFGPRVKN	473										
TTV-2p	TTGSCQNSGGST-SALQGGYVAYAGSGVIGASSIGNLQQQWFSNQWFWTN-RDKTNLWGLRGLCLR---DNHLGSGELDDECTMLTLFGPVEKA	456										
PTTV2b-VA	TPGSSQNSVLQTPPAIQGGYVAYAGSRIPGAGSITNLFGQWEGDQWPPTN-QDCTNFWGLRGLCLR---DNKLGAQELDDECTMLSLFGPVEKA	457										
PTTV2c-VA	TPGSSQNSVLTQTPPAIQGGYVAYAGSLQGGATNLTYTDWEGDQWPPTN-RDCTNFWGLRGLCLR---DNKLGAQELDDECTMLTLFGPVEKA	457										
	PTTV2-RV1				PTTV2-HVR2							
		510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
PTTV1a-VA	PFVEFRDTA-----ENFLNIWVKYTFYRFG--GYCPPTGIDQDCTSNPTYPVR---MVGAVTHPKYAGQGGITTOIGDQGITAASTRASAPPDY	564										
S4-TTV31	PFVEFRDTA-----ENFLNIWVKYTFYRFG--GYCPPTGIDQDCTSNPTYPVR---MVGAVTHPKYAGQGGITTOIGDQGITAASTRASAPPDY	564										
PTTV1b-VA	EPLERQLLE-----PEPTNLWFKYKFFRFG--GYCPPTGIDQDCTIDTPAYFVP---QSGSVTHPKYAGQGGITTOIGDQGITAASTRASAPPDY	564										
TTV-1p	EPLERQLLE-----PEPTNLWFKYKFFRFG--GYCPPTGIDQDCTIDTPAYFVP---QSGSVTHPKYAGQGGITTOIGDQGITAASTRASAPPDY	562										
TTV-2p	NPIFATTPCKFKPELKDYNHIMYAFRQWGGHSTERFKTIGESTIECPFERGERVHHGVQDPARKVNTVLNWDYDQGIIVRTDTLKRLLELPET	556										
PTTV2b-VA	NIAFATNDCKFKPELKDYNHIMYAFRQWGGHSTERFKTIGESTIECPFERGERVHHGVQDPARKVNTVLNWDYDQGIIVRTDTLKRLLELPET	556										
PTTV2c-VA	NIAFATNDCKFKPELKDYNHIMYAFRQWGGHSTERFKTIGESTIECPFERGERVHHGVQDPARKVNTVLNWDYDQGIIVRTDTLKRLLELPET	557										
		610	620	630	640	650	660	670				
PTTV1a-VA	TQSAFLKAP---ETEKEERESETSPTSASSSSQDSSDQAERRAARK---RVIKILLKRIADRPTVNRKRRFSE	635										
S4-TTV31	TQSAFLKAP---ETEKEERESETSPTSASSSSQDSSDQAERRAARK---RVIKILLKRIADRPTVNRKRRFSE	635										
PTTV1b-VA	AGSALLRGDAEKGEETEETASSSSTSAESSSTEGDSSDDEETIRRRRTWKRLRMVWQQLRRPMCHKQRHL	639										
TTV-1p	AGSALLRGDAEKGEETEETASSSSTSAESSSTEGDSSDDEETIRRRRTWKRLRMVWQQLRRPMCHKQRHL	637										
TTV-2p	EETEKAYPEL---LQKTEKEPLSDSDEESVISSTSSGSGDEETQRRKH---KPSKRRLIKHLQVVRVMTL	624										
PTTV2b-VA	EETEKAYPEL---LQKTEKEPLSDSDEESVISSTSSGSGDEETQRRKH---KPSKRRLIKHLQVVRVMTL	625										
PTTV2c-VA	EETEKAYPEL---LQKTEKEPLSDSDEESVISSTSSGSGDEETQRRKH---KPSKRRLIKHLQVVRVMTL	625										

FIG 4C

	10	20	30	40	50	60	70							
PTTV1a-VA	MKEKDYWE	EANLTSCT	SLDHHN	SGSWRD	HLWTL	CALDDA	DIAAAA	DI IERE	EADGGED	FGFVDG	--DPGD	DAGG	73	
Sd-TTV31	MKEKDYWE	EANLTSCT	SLDHHN	SGSWRD	HLWTL	CALDDA	DIAAAA	DI IERE	EADGGED	FGFVDG	--DPGD	DAGG	73	
PTTV1b-VA	MP--EH	WEANLE	ATKGN	DLLER	SGNWQD	HLWLL	LADG	DAALAA	AVDAIER	-DAMG	GEDVT	TATDR	VTIG	72
TTV-1p	MP--EH	WEANLE	ATKGN	DLLER	SGNWQD	HLWLL	LADG	DAALAA	AVDAIER	-DAMG	GEDVT	TATDR	VTIG	72
TTV-2p	M-----	EERNLT	WAYCA	AGLES	SKDP	KKHLE	KCLTD	---	AIADA	EEDRH	GDG	GTGG	DATF	68
PTTV1b-VA	M-----	EERNLT	WAYCA	AGLES	SKDP	KKHLE	KCLTD	---	AIADA	EEDRH	GDG	GTGG	DATF	68
PTTV1c-VA	M-----	EERNLT	WAYCA	AGLES	SKDP	KKHLE	KCLTD	---	AIADA	EEDRH	GDG	GTGG	DATF	68

AA

FIG 5

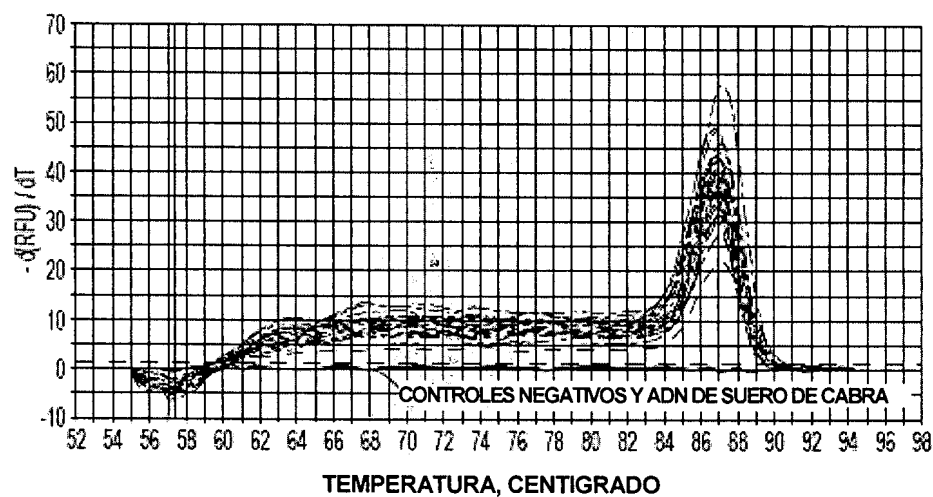


FIG. 6A

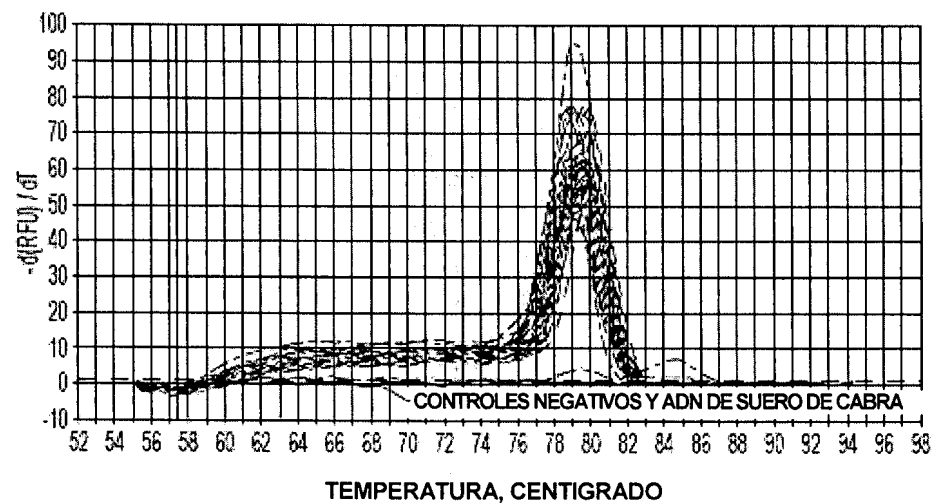


FIG. 6B

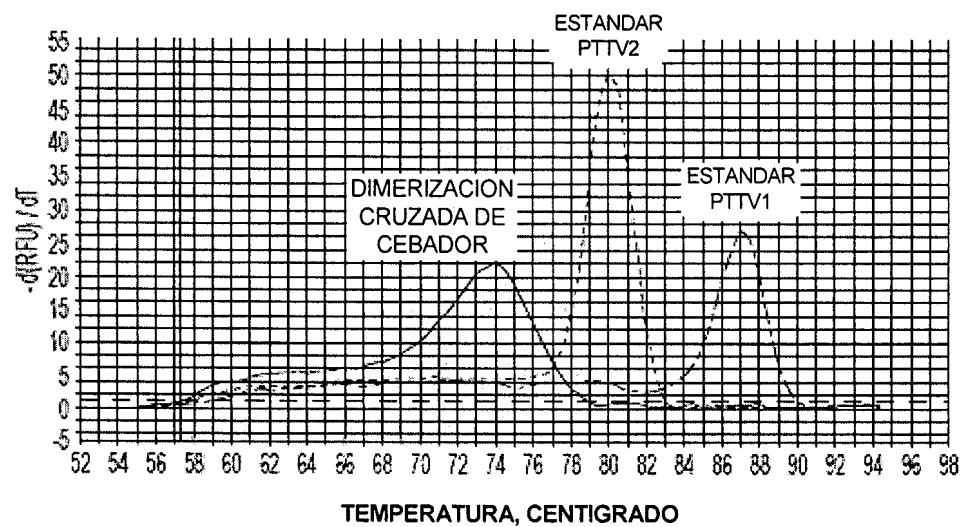


FIG. 7A

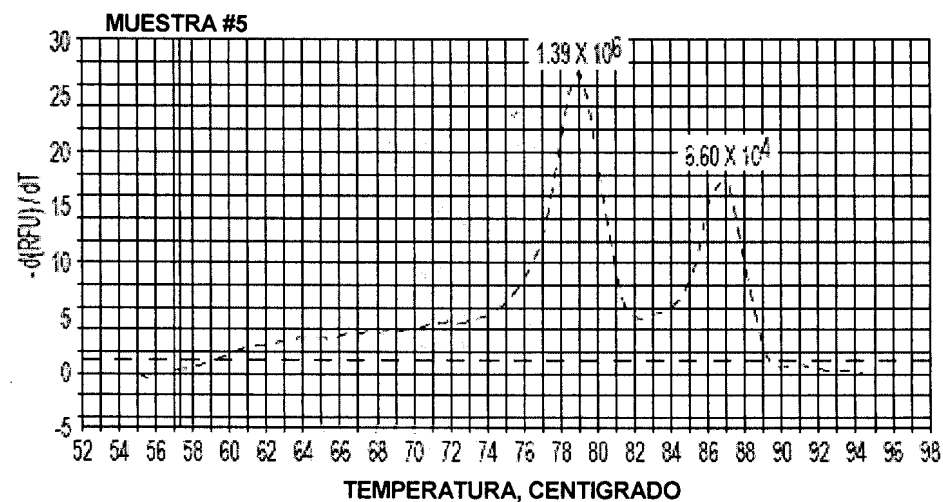


FIG. 7B

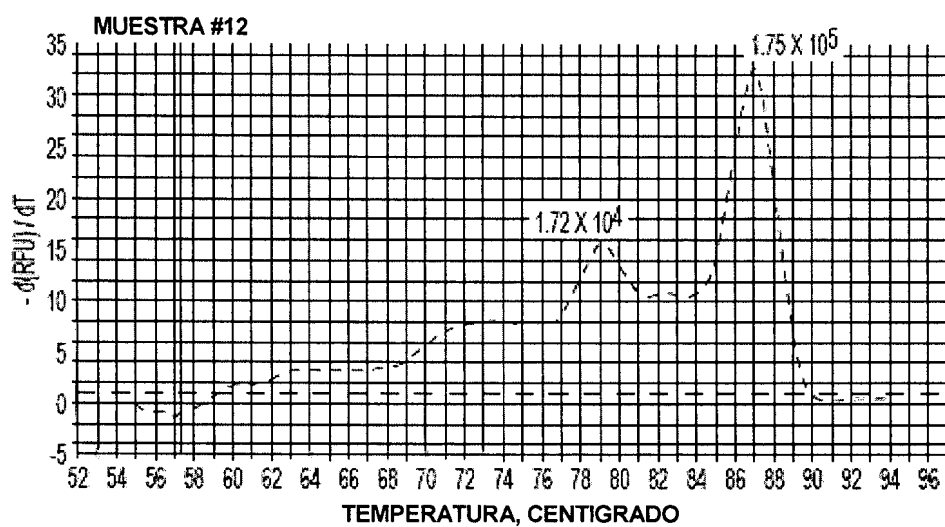


FIG. 7C

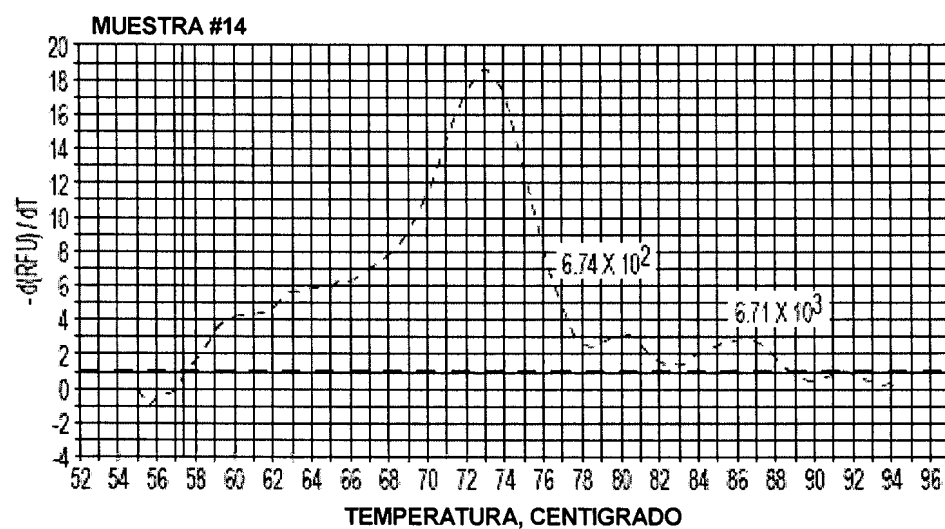


FIG. 7D

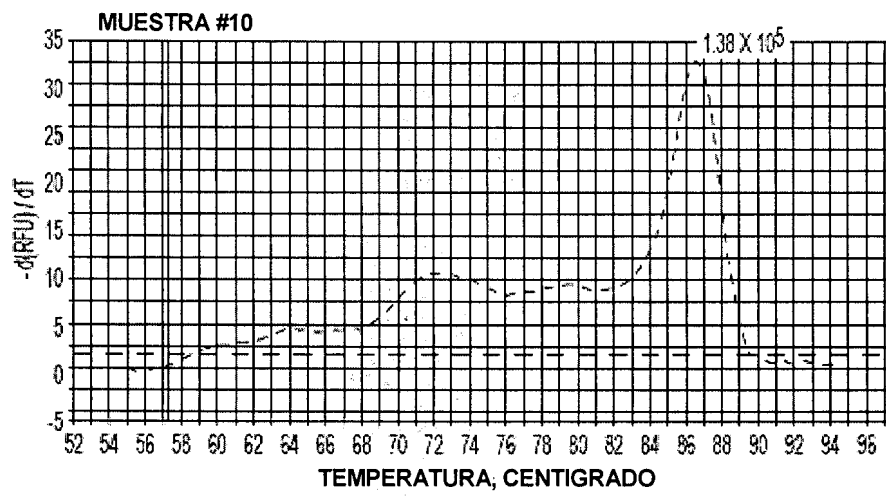


FIG. 7E

. 000134

000135

FIG. 8

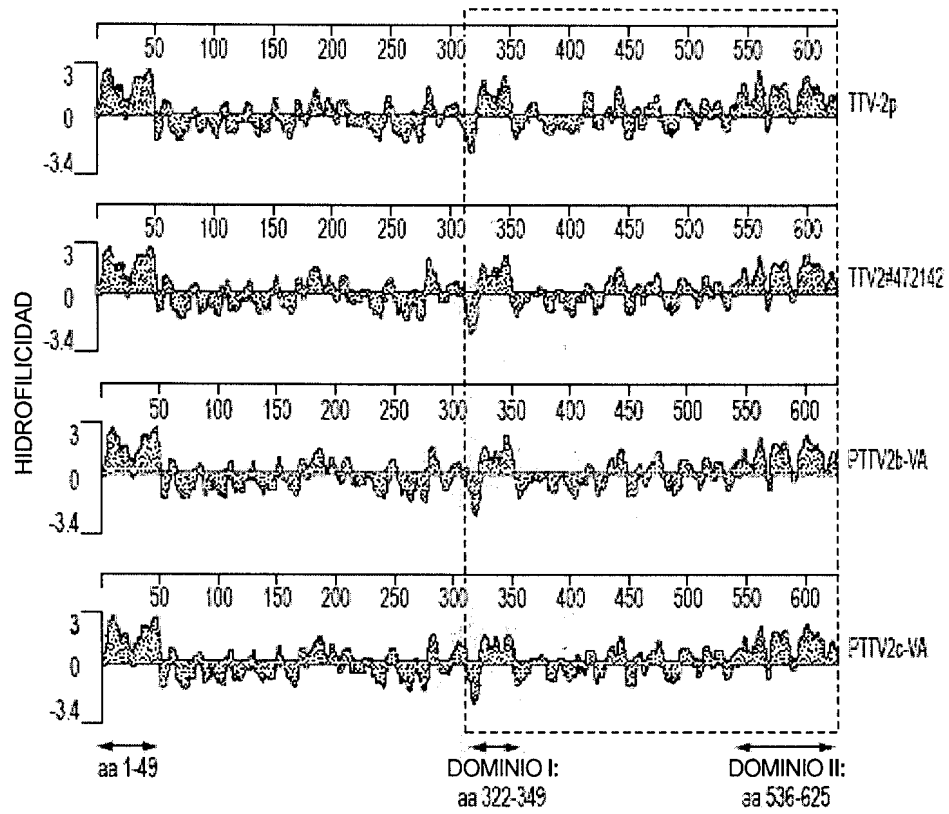


FIG. 9A

000136

DOMINIO I 322 349
CONSENSO SEQDIKKIAHDCXIAREYARDPKSKKLK
PTIV2c-VA E NN
PTIV2b-VA D TV
ITV2#472142 D
ITV-2 E SAE S T

DOMINIO II 536 625
CONSENSO YDCDGIVRTDLKRLLELPTEETEKAYPELLGQKTEKEPLSDSDEESVISSTSSGSSQEEETQRRXHKPSKRLLKHLQRVVKRMKL
PTIV2c-VA Q
PTIV2b-VA KH
ITV2#472142 Q
ITV-2 K E H

FIG. 9B

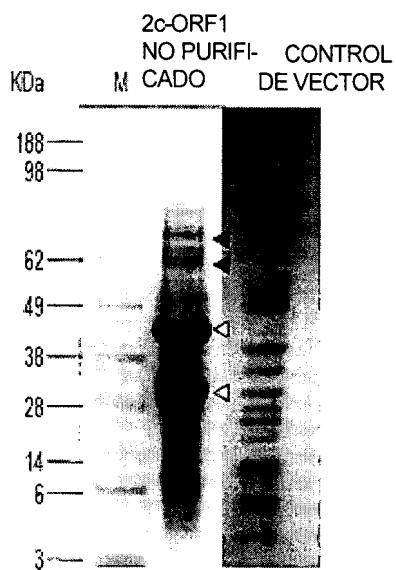


FIG. 10A

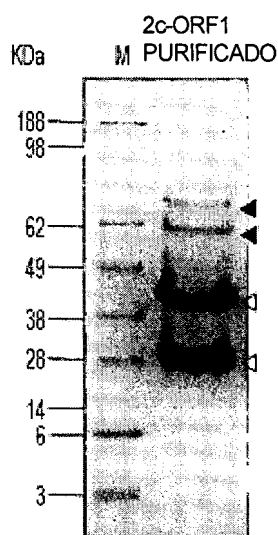


FIG. 10B

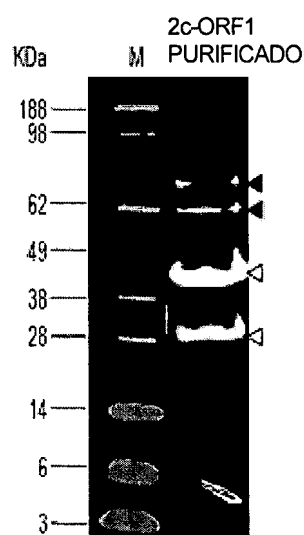


FIG. 10C

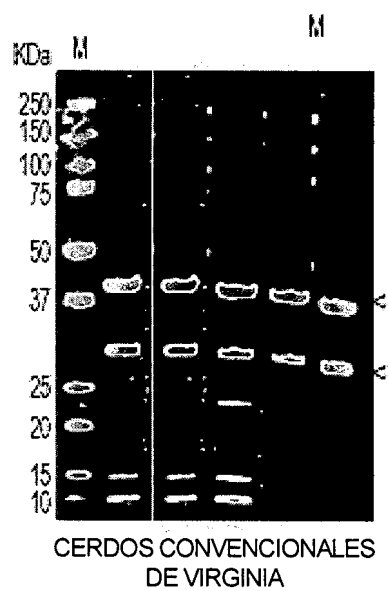


FIG. 11A

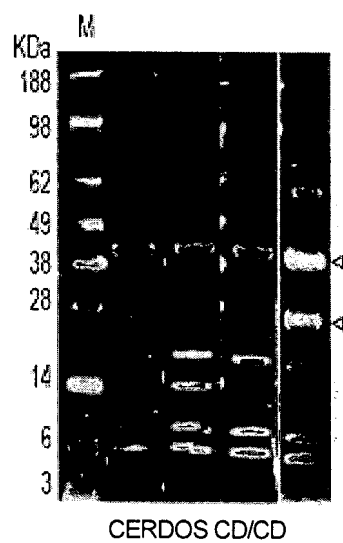


FIG. 11B

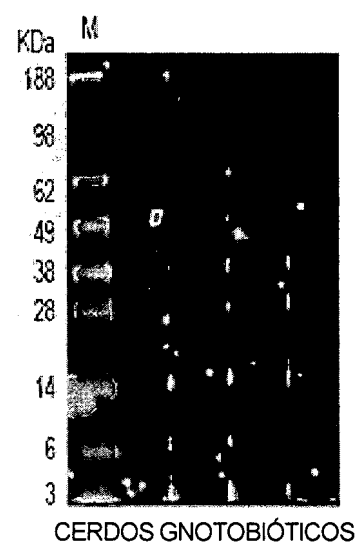


FIG. 11C

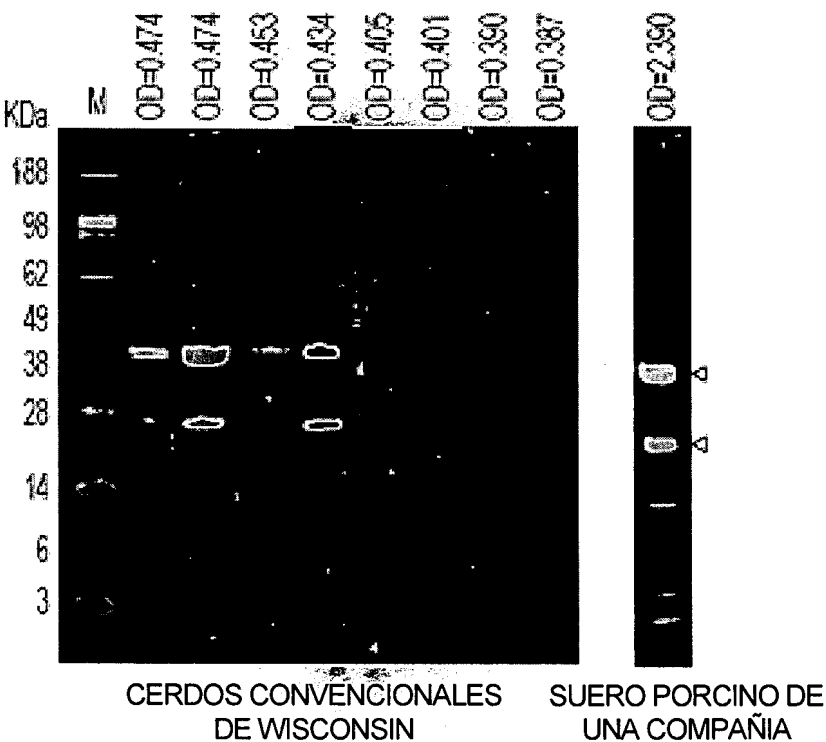


FIG. 12

000140

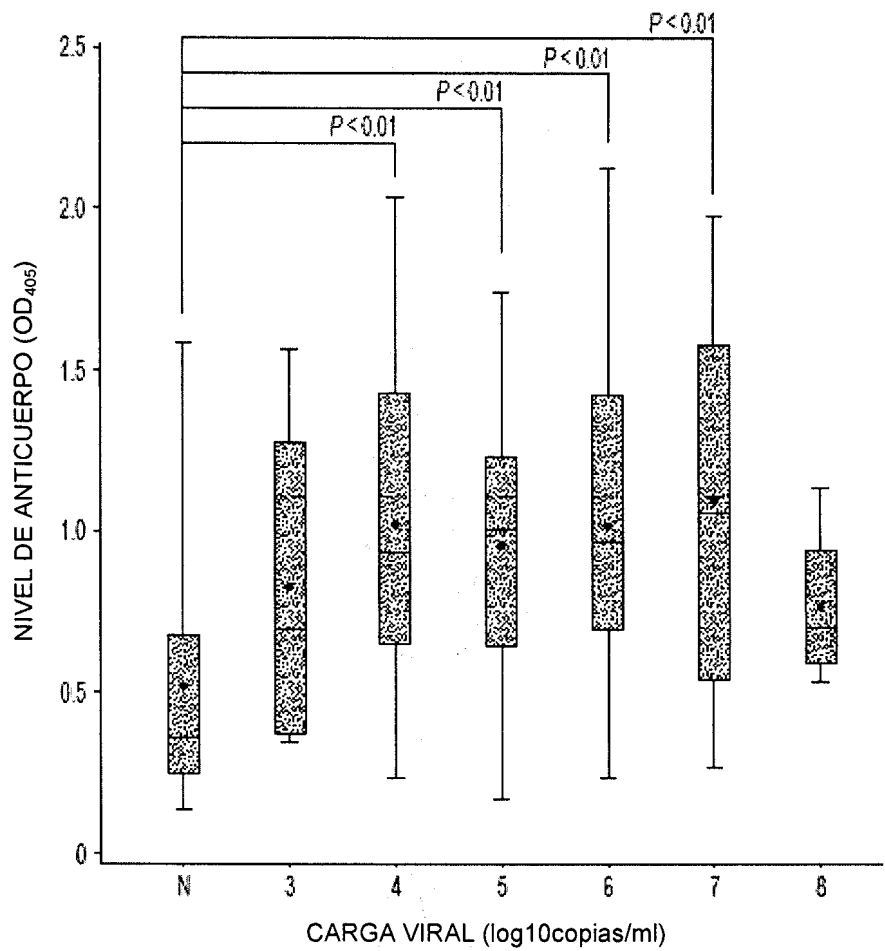


FIG. 13

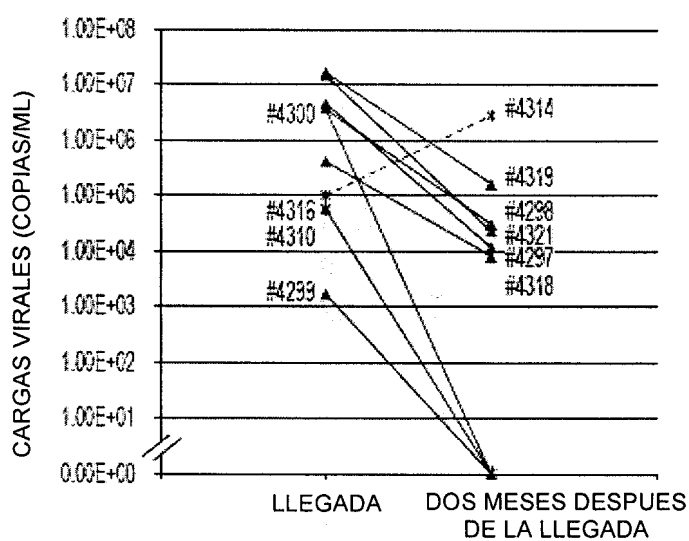


FIG. 14A

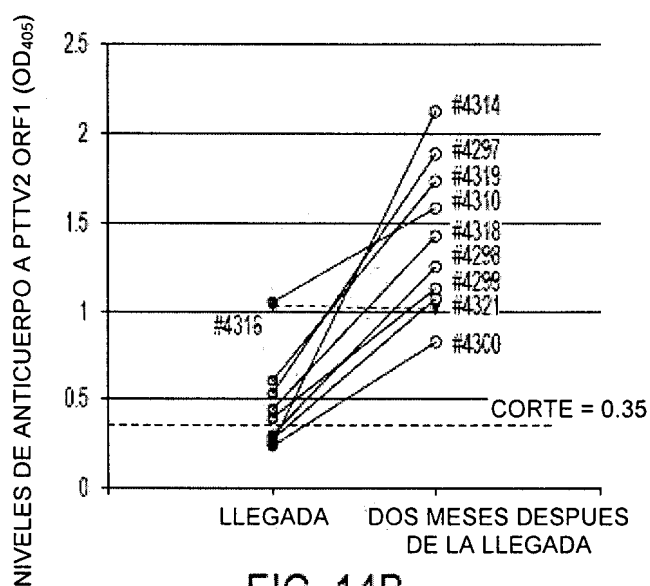


FIG. 14B

000142



FIG. 15A

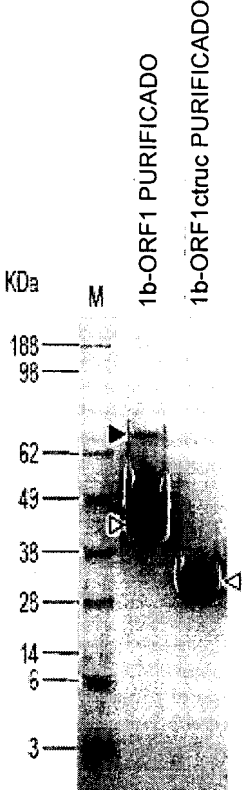


FIG. 15B

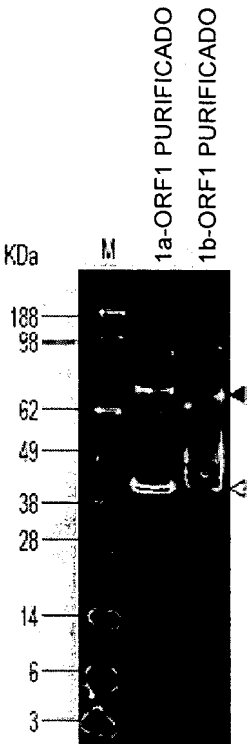


FIG. 15C

000143

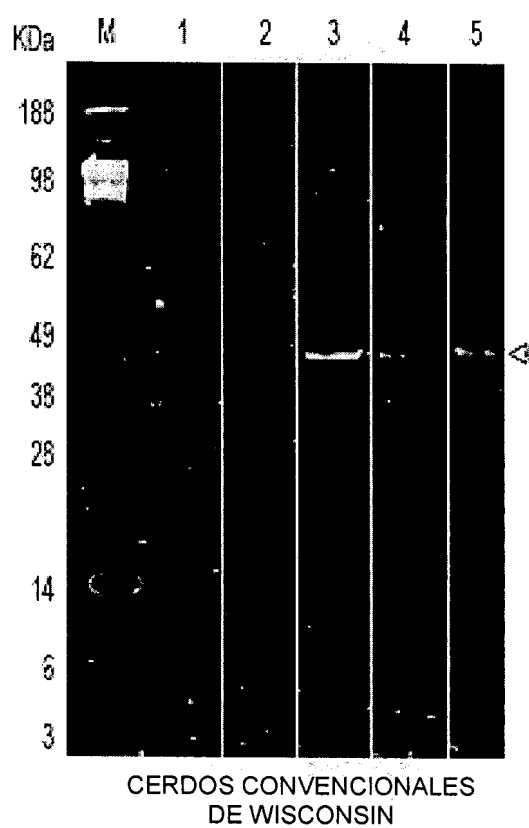


FIG. 16

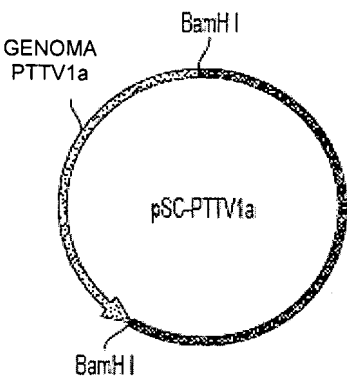


FIG. 17A

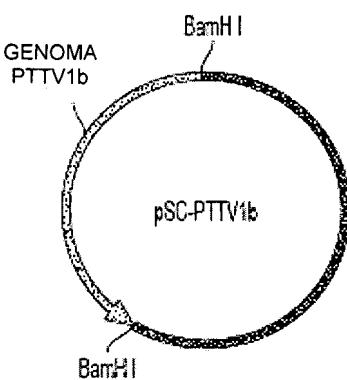


FIG. 17B

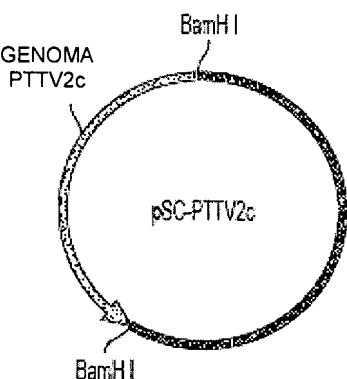


FIG. 17C

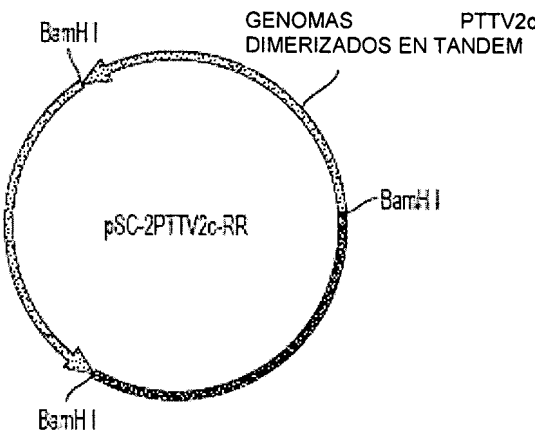


FIG. 17D

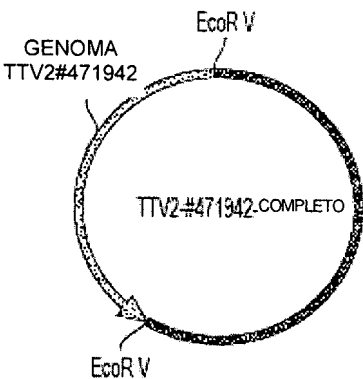


FIG. 17E

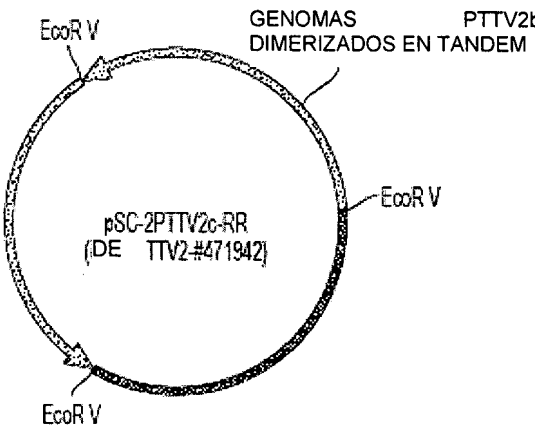


FIG. 17F

FIG. 18A



FIG. 18B



000146

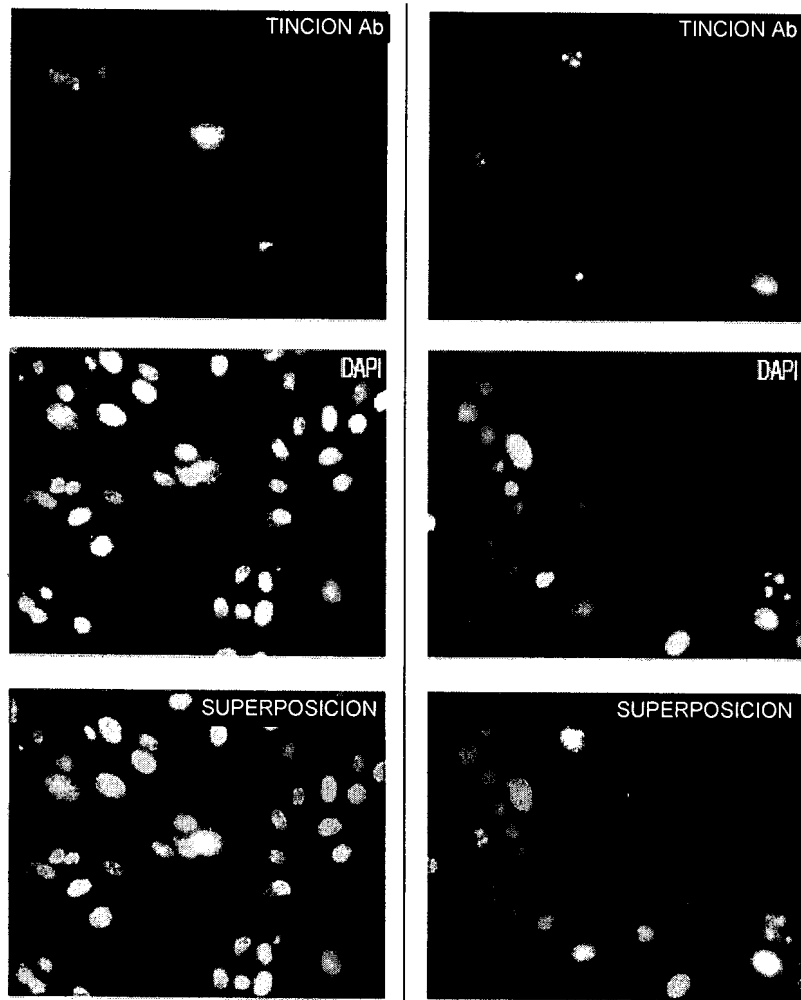


FIG. 19A

FIG. 19B

000147

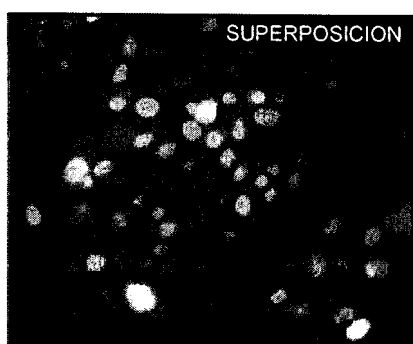
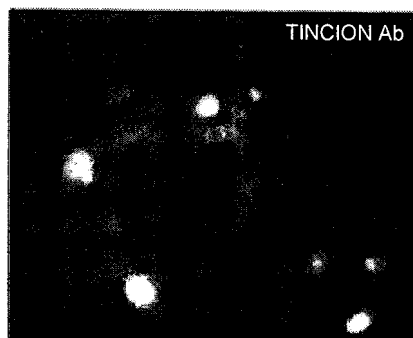


FIG. 20A

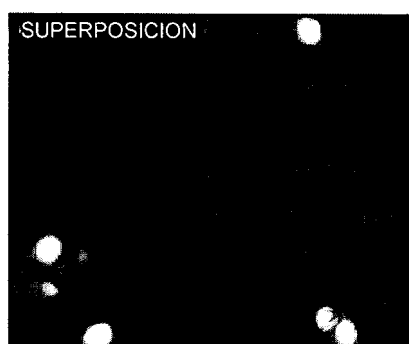
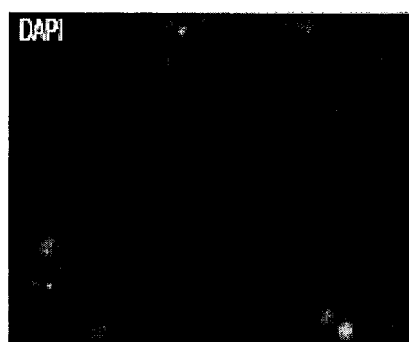
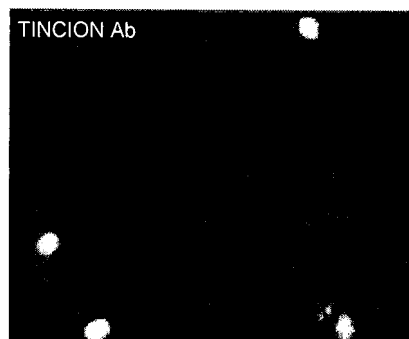


FIG. 20B

000148

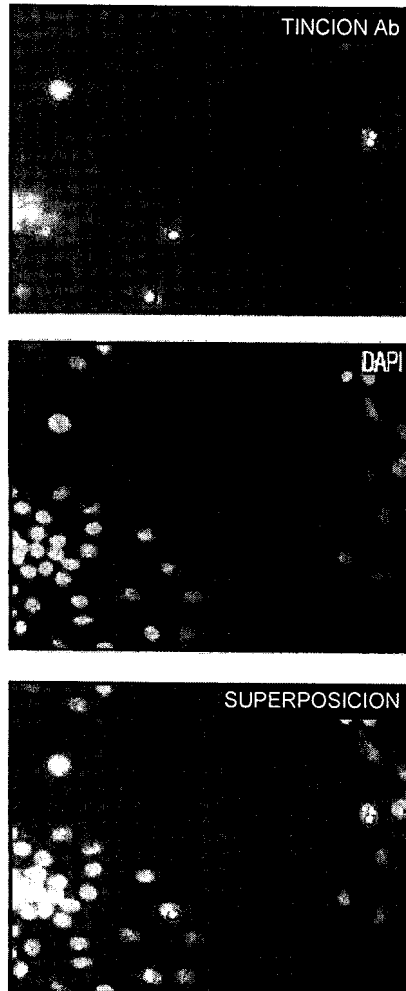


FIG. 21

000149

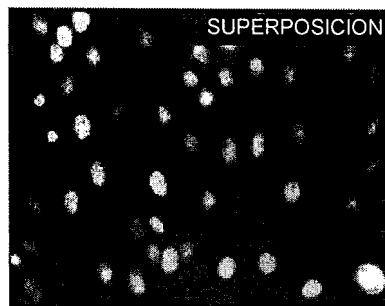
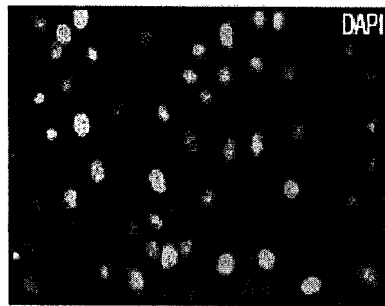
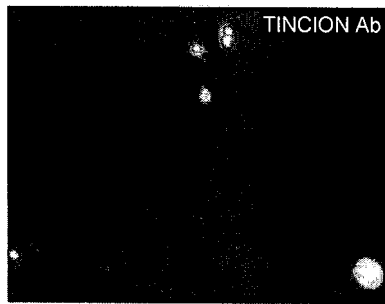


FIG. 22A

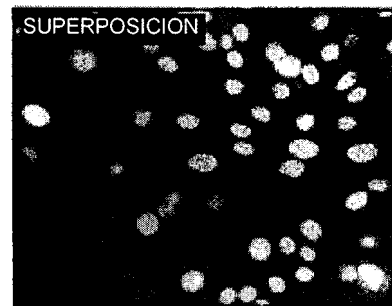
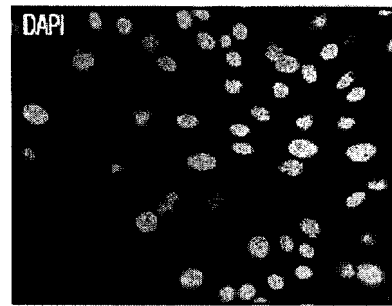
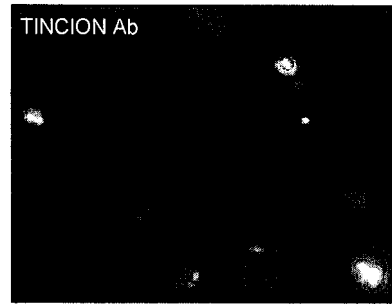


FIG. 22B

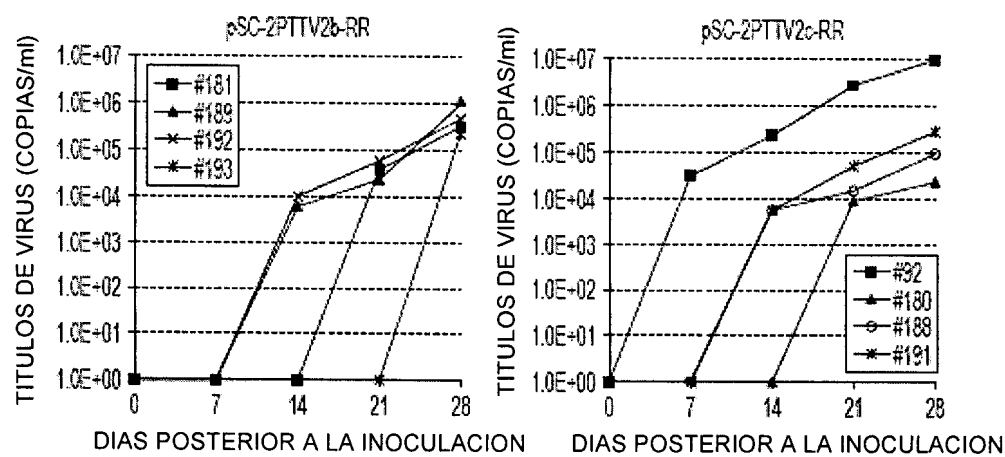


FIG. 23A

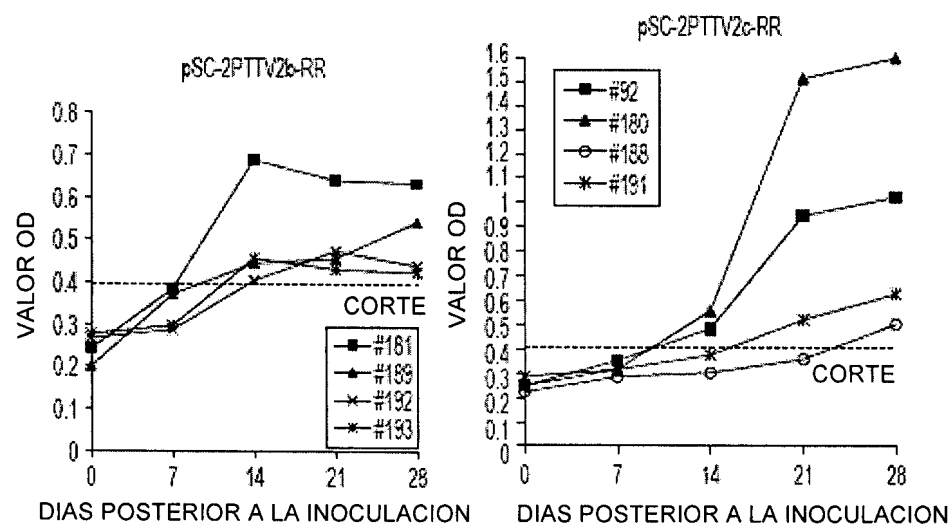


FIG. 23B

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Virginia Tech Intellectual Properties
Huang, Yaowei Dr.
Meng, Xiang-Jin Dr.

<120> VACUNAS Y DIAGNÓSTICO PARA TORQUE TENO VIRUS PORCINO

<130> 124617-00306

<150> US 61/235,833
<151> 2009-08-21

<150> US 61/316,519
<151> 2010-03-23

<160> 52

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 32
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 1
cataggggtgt aaccaatcag atttaaggcg tt 32

<210> 2
<211> 27
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 2
ggatcatcaga cgatccatct ccctcag 27

<210> 3
<211> 28
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 3
cttctgaggg agatggatcg tctgatga 28

<210> 4
<211> 28
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 4
ttgagctccc gaccaatcag aattgact 28

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 5
ttgtgccgga gctcctgaga gc 22

<210> 6

000152

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus

<400> 6
 aggtgcttga ggagtcgtcg cttg

24

<210> 7
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus

<400> 7
 taccagggcg gttagacact cagctct

27

<210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus

<400> 8
 ctcaagcacg agcagtggat cctctca

27

<210> 9
 <211> 2878
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus

<400> 9
 tacacttccg gggtcaggag gctcaatttg gctagcttcg ctgcaccac gtttgctgcc 60
 aggcggacct gattgaagac tgaaaaccgt taaattcaaa tttgaaaatg gcgggcaaaa 120
 tggcggaagg gggcgaggat ttatgcaaat taatttatgc aaagtaggag gagctcgatt 180
 ttaatttatg caaagtagga ggagtcaatt ctgattggtc gggagctcaa gtcctcat 240
 gcataggggtg taaccaatca gatttaaggc gttcccccaa aagtgaatat aagtaagcgc 300
 agttccgaat ggctgagttt atgccgccag cggtagacag aactgtctag cgactgggag 360
 ggtgocggag gatccctgat ccggagtcaa ggggcctatc gggcaggagc agctgagcgg 420
 agggcctaca tgaaggagaa agactactgg gaggaagcct ggctgaccag ctgtacatct 480
 atacacgacc accactgcaa ctgcggtagc tggagagacc acctgtggac gctatgcgct 540
 ttagacgacg cagattttggc cgccgccgca gatattatag aaagagaaga ggcggatgga 600
 ggagaagatt tcggattcgt agacggagac cctggagacg ctggcgggta aggagatggc 660
 ggcgttccgt cttccgtaga gggggacgta gagcgcgccc ctaccgcatt agcgcttgga 720
 accctaaggt tctcagaaac tgccgcatca cgggatgggt gccagttata cagtgtatgg 780
 acgggatgga gtggataaaa tacaagccta tggacttaag agtcgaggca aactggatat 840
 tcaataaaca ggacagtaaa atagagacag aacagatggg atacctgatg cagtatggag 900
 gaggggtggc aagcggagta atcagcttag agggactatt caatgaaaac agactgtgga 960
 gaaatatatg gtcaaaaagc aatgacggga tggacttggc cagatacttt ggctgtagaa 1020
 ttagactata tccaacagag aatcaggact acttggtctg gtatgacaca gaatttgacg 1080

- 000153

aacagcaaag gagaatgcta gatgaataca cacaacctag tgtgatgctg caggctaaaa 1140
 actcgctgtct aatagtgtgt aaacagaaga tgccaattag acgcagagta aaaagtattt 1200
 ttataccgcc gcctgcacag ttaacaactc agtggaaatt tcaacaggaa ctatgtcagt 1260
 ttocactgtt taactgggcc tgtatctgca tagacatgga cacgccgttc gactacaacg 1320
 gcgcattggc aaatgcctgg tggctaata gaaggctgca aaacggaaac atggagtaca 1380
 tagaaagatg gggcagaata ccaatgacag gagacacaga actaccacca gcagacgact 1440
 tcaaggcagg aggggtgaac aaaaacttca aaccgacagg tattcaaaga atatacccca 1500
 tagtagcggc atgccttgta gaagggaaca aaagagtagt caaatgggcc acagtacaca 1560
 atggtcccat agacagatgg agaaaaaac agacaggaac tttaaagctc tctaacctga 1620
 gaggcctagt actgagagta tgctcagaga gtgaaacata ctataagtgg acaggatcag 1680
 aatttacagg ggcatttcaa caagactggc ggccagtagg cggaacagaa taccgccttt 1740
 gtaccattaa aatggacca gaatatgaaa accctacagt agaggtatgg tcctggaaag 1800
 caaatatacc gacatcaggg actcttaaag actacttcgg actgagtaca gggcaacagt 1860
 ggaaagacac tgactttgcg aggtgcaac tacctagaag cagccacaat gtggactttg 1920
 gacataaagc tagatttggg ccattttgcg ttaaaaagcc tccagtagag ttcagagata 1980
 cagcccaaaa cccactaaat atatgggtaa aatacacgtt ctattttcag ttcggcggca 2040
 tgtaccagcc tcccaccgga atccaagatc cctgcacttc taaccggacc tatcctgtca 2100
 gaatggtcgg agcagttaca cccccaaat acgccgggca aggcggaatc acgacccaaa 2160
 ttggagatca aggtatcacc gctgcctcta tccgtgccat cagtgcagct ccaccagata 2220
 cctacacgca gtcggcggtc ctcaaagccc cggaaccgga gaaagaagag gaaagagaga 2280
 gtgagaccag tttcacgagt gccgaaagct cttctgaggg agatggatcg tctgatgacc 2340
 aagcagagag acgcgctgcc agaaagcgag tcatcaagtt acttctcaag cgactcgctg 2400
 acagaccgct ggacaacaag cgacgacgat tttcagagt accctgacct cctaccaat 2460
 aaacgcaaaa aacgcttgca attctaactc tgtctctgtg acttcattgg gggggtccgg 2520
 gggggcttgc cccccgtta gttgggttct cgactcccg cctgccaagt gaaactcggg 2580
 gaggagttag tgccggacat cccgtgtaat ggctacataa ctaccggct ttgcttcgac 2640
 agtggccgtg gctcgaccct cacacaacac tgcagatagg gggcgcaatt gggatcgta 2700
 gaaaactatg gccgagcatg gggggggctc cgccccccc aaccccccg gtgggggggc 2760
 caaggcccc cctacacccc cccatggggg gctgccgcc cccaaacccc ccgcgtcgg 2820
 tggggggggc tgcgcccc ccaaaccccc cttgccggg gctgtgcccc ggaccccc 2878

<210> 10
 <211> 2875
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus
 <400> 10

000154

tacacttccg ggttcaggag gctcaatttg gctcgcttcg ctcgaccac gtttgetgcc	60
aagcggacct gattgaagac tgacaaccgt tacattcaaa tttgaaaatg gcgcccac	120
atggcggcgg ggggcggagt ttatgcaaat taatttatgc aaagtaggag gagctccatt	180
ttaatttatg caaagtagga ggagtcaatt ctgattggtc gggagctcaa gtcctcattt	240
gcataggggtg taaccaatca gatttaaggc gttcccatta aagcgaatat aagtaagtga	300
ggttccgaat ggctgagttt atgccgccag cggtagacag aactgtctag cgactggg	360
ggtgccggag gatccctgat ccggagtcaa ggggcctatc gggcaggagc agctgagcgg	420
agggcctatg ccggaacact gggaggaagc ctggttgga gctaccaagg gctggcacga	480
tctcgactgc cgctgcggtg actggcagga ccacctatgg ctctactcg ccgatggaga	540
cgccgctttg gccgcgcgcg tagacgctat agaaagagac gctatgggtg gagaagacgt	600
tactaccgct acagaccgcg ttactatagg agacgatggc tggttaaggag aaggcggcgt	660
tccgtctacc gtagaggtgg acgtagagcg cgccctacc gaataagtgc ttttaacca	720
aaagtaatgc ggaggggtgt gattagaggt tgggtggcaa tattacagtg tctaaaagga	780
caggaatcac taagatatag accactgcag tgggacactg aaaaacagtg gagagtaaag	840
aaagactatg aggacaacta cggtactttg gtgcagtacg gaggaggttg ggggagtggt	900
gaagtgacat tggagggatt atatcaggaa cacttactct ggagaaactc ttggtcaaag	960
ggaaatgatg gcatggacct agtgagatac tttggctgca tagtatacct gtacccactg	1020
caggaccaag actactggtt ttggtgggat acagacttta aagaactata cgagagagc	1080
atcaaagaat actcccagcc aagtgttatg atgatggcca aacgcactag actagtaata	1140
gctagagaca gagcaccaca cagaagaaga gtaagaaaaa tttcatacc ccgccaagc	1200
agagacacca cacaatggca atttcagaca gacttctgca aaaggccact attcacatgg	1260
gcggcaggat taatagacat gcagaaacca tttgatgcaa acggagcgtt tagaaacgcc	1320
tgggtggctag aaacaaggaa tgaccaggga gaaatgaaat acattgaact atggggaagg	1380
gtgccaccac agggtgacac agaactgcc aacagagtg agtttaagaa gggagataat	1440
aaccctaact ataacataac ggaaggacat gaaaaaata tttaccaat aatcatatac	1500
gttgaccaga aagaccagaa aacaagaaaa aaatactgtg tatgctacaa caaaacttta	1560
aatagatgga gaaaagccca ggcgagtaca ttagcaatag gagatcttca aggactagta	1620
ctgcgtcagc ttatgaatca ggagatgaca tactactgga aatcgggaga gtttctctca	1680
ccattcctgc aaagatggaa aggaactagg ctaataacca tagacgcaag aaaggcagac	1740
acagaaaacc caaaagtaag ttcgtgggaa tgggggcaaa actggaacac aagcggaaca	1800
gtgctacagg aggtattcaa catttcaactg aacaacactc aaataagaca ggatgacttt	1860
gcaaaattga cactgccaaa gtcaccacat gacatagact ttggacatca cagcagattt	1920
ggaccattct gtgttaaaaa cgaaccacta gaattccaac tactgcctcc aacaccaact	1980
aacctatggt ttcagtacaa atttctcttt cagtttggcg gtgaatacca gccaccaaca	2040

000155

ggtatccgcg atccctgcat tgatacacca gcctatcctg tgccgcagtc aggaagtgtt 2100
 acacacccca aattcgccgg aaagggcgga atgctcacgg aaacagaccg ttgggggtatc 2160
 actgctgcct cttccagaac cctcagtgcg gatacaccca ccgaagcagc gcaaagtgcg 2220
 cttctcagag gggacgcgga aaagaaagga gaggaaaccg aggaaaccgc gtcacgtcc 2280
 agtatcacga gtgcgaaaag ctctactgag ggagatggat cgtctgatga tgaagagaca 2340
 atcagacgca gaaggaggac ctggaagcga ctcagacgga tggtcagaca gcagcttgac 2400
 cgacgaatgg accacaagcg acagcgactt cattgatacc cccataagag aaagatgcct 2460
 caataaaaaa caaaaaaac gctaaacagt gtccgcctat tagtgggggg gtccgggggg 2520
 gcttgccccc ccgtaagcgg ggttaccgca ctaactccct gccaaagtga actcggggac 2580
 gagtgagtgc gggacatccc gtgtaatggc tacataacta cccggctttg cttcgacagt 2640
 ggccgtggct cgaccctcgc acaacactgc aggtaggggg cgcaattggg atcgttagaa 2700
 aactatggcc gagcatgggg ggggctccgc ccccccaac cccccggtg ggggggcaa 2760
 ggccctccct acaccccccc atgggggggt gccgcccccc aaaccccccg cgtcggatgg 2820
 ggggggctgc gccccccca aacccccctt gcccggggct gtgccccgga cccc 2875

<210> 11
 <211> 2750
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus

<400> 11
 taatgacagg gttcacggga aaggctgcaa aattacagct aaaaccacaa tcataacaca 60
 ataaaccaca aactattaca ggaaactgca ataaattaag aaataaatta cacataacca 120
 cctaaccaca ggaaactttg caaaaaaggg gaaataaatc tcattggctg ggccagaagt 180
 cctcattaga ataagaaaag aaccaatcag aaacacttcc tcttttagag tatataagta 240
 agtgcgcaga cgaatggctg agtttatgcc gctggtggtg gacacgaaca gagctgagtg 300
 tctaaccgcc tgggcgggtg ccggagctcc tgagagcgga gtcaaggggc ctatcgggca 360
 ggcggtaatc cagcggaaact gggccccct ccatggaaga aagatggctg acggtagcgt 420
 actgcgcgca cggattatc tgcgactgta aaaaccgaa aaaacatctt gaaaaatgcc 480
 ttacagacgc tatcgccgac gccgaaggag accgacacgg agatggaggc accggaggtg 540
 gagacgctac tttcgatatc ggtatcgacg cgctcctcgc cgccgccgcc caaaggtaag 600
 gagacggagg aggaaagctc cggtcattca atggttcct cctagccgga gaacctgcct 660
 catagagggc ttctggccgt tgagctacgg aactgggttc cgtacctgtc tccctatgag 720
 aaggctaaac ggactgattt tcacgggtgg aggatgtgac tggactcaat ggagtttaca 780
 aaatttatc catgaaaaat taaactggag aaatatatgg acagcttcta atgtaggcat 840
 ggagtttgct agatttttta gaggaaaatt ttacttcttc agacaccctt ggagaagcta 900
 tatagtaaca tgggaccaag acataccctg taaaccgctc ccatatcaaa acttacaacc 960

000156

tctattaatg ctcctcaaaa aacagcataa attagtccctc tctcaaaaag attgcaaccc	1020
gaacagaaaa caaaaaccag ttacattaaa attcaggcct ccaccaaata taacatcaca	1080
gtggagacta agcagagaac tctcaaaaat acccttaata agactaggaa taagtctcat	1140
agacctgtca gaacatggt tagaaggctg gggaaatgct ttttacagtg tactaggata	1200
tgaagctagt aaacacagtg gcagatgggc caactggaca caaatgaaat atttttggat	1260
ctatgacaca ggcgtgggaa acgcagtcta cgttatttta ctgaaaaaag acgtgagtga	1320
caatccagga gacatggcta cacagtttgt aacaggctca ggacaacacc cagacgcaat	1380
agatcatata gaaatggtaa acgaaggatg gccttactgg ctattttttt atggacaatc	1440
agaacaagat ataaaaaac tagcacatga ccaagatata gtcagagaat atgccagaga	1500
ccctaaatca aaaaaattaa aaataggagt cataggatgg gccagcagta actacacaac	1560
agcagggagc aaccaaaca gtgtacttca aacgccagaa gcaatacaag gtggatatgt	1620
agcttatgca ggatccagaa taccaggcgc aggatctatc acaaatttat ttcaaatggg	1680
atggccagga gatcaaaact ggccaccac aaaccaagac caaaccaatt ttaactggg	1740
actcagagga ctttgtgtat taagagataa catgaaacta ggagcacaag agctagacga	1800
tgaatgcaca atgctctcct tatttggacc atttgttgaa aaagcaaaca cagcttttgc	1860
tacaaacgac caaaatatt ttaggcctga actaaaggac tacaacgtag taatgaaata	1920
tgcttttaaa tttcagtggg gaggacatgg caccgaaaga tttaaaaca ccatcggaga	1980
tcccagcacc ataccatgtc cctttgaacc cggggaacgg taccaccacg ggttacaaga	2040
ccccgccaag gtacaaaaca cagtccctca cccttgggac tatgactgtg acgggattgt	2100
tagaacagat actctcaaaa gacttctcga actccccaca gagacggagg agacggagaa	2160
ggcgtacca ctccttggac aaaaaacaga gaaagagcca ttatcagact ccgacgaaga	2220
gagcgttatc tcaagcacga gcagtggatc ctctcaagaa gaagagacgc agagacgaaa	2280
gcaccacaag ccaagcaagc gacgactcct caagcacctc cagcgggtgg taaagaggat	2340
gaaaacactg tgatagataa atacagaaac ctagcagacc cctcactcaa tgtcacagga	2400
cacatggaaa aattcatgca actacacata caaaacatac aagaaataag agctaaaaat	2460
gctaaaaaat ccctcaataa actttacttt tctgattaat agcggcctcc tgtgtccaat	2520
ctatttttcc tacacccctt caaaatggcg ggaggaacac aaaatggcgg agggactaag	2580
gggggggcaa gcccccccc gggggttgag ggggggtttc cccccctccc cccggtgcag	2640
ggggcgagc cccgcaccc cccatgcggg ggctccgcc cctgcacccc cgggaggggg	2700
ggaaaccccc cctcaacccc ccgcggggg caagcccccc tgcaccccc	2750

<210> 12

<211> 2803

<212> ADN

<213> Torque teno virus

<400> 12

tcatgacagg gttcacgga agggctgcaa aattacagct aaaaccacaa gtctaacaca

60* 000157

ataaaccaca aagtattaca ggaaactgca ataaatttag aaatagatta cacataacca	120
ccaaaccaca ggaaacctac acataaccac caaaccacag gaaacataac caccaaacca	180
caggaaactg tgcaaaaaag gggaaataaa ttctattggc tgggcctgaa gtcctcatta	240
gaataataaa agaaccaatc agaagaactt cctcttttag agtatataag taagtgcgca	300
gacgaatggc tgagtttatg ccgctggtgg tagacacgaa cagagctgag tgtctaaccg	360
cctgggcggg tgccggagct cctgagagcg gagtcaaggg gcttatcggg caggcggtaa	420
tccagcggaa ccgggcccc ctcgatggaa gaaagatggc tgacggtagc gtactgcgcc	480
cacggattat tctgcggatg taaagacccg aaaaaacacc ttgaaaaatg ccttacagac	540
gctatcgag acgccgaagg agaccgacac ggagatggag gcaccggagg tggagacgct	600
tctttcgata tcggtatcga cgcgctctc gccgccgcg cacaaggta aggagacgga	660
ggagaaaagc tccggtcata caatggttcc ctcctagccg gaggacctgc ctcatagagg	720
gcttctggcc gttgagctac ggacactggc tccgtacctg tctccctatg agaaggctga	780
acggactcat tttcacgggt gccggttgtg actggacaca gtggagttta caaaacttat	840
accatgaaaa acttaactgg agaaatatat ggacagcttc taatgttggc atggaatttg	900
ctagattttt aagaggaaaa ttttacttct tcagacaccc ctggagaagc tatattatta	960
cttgggacca agacattcct tgcaaacctt taccatacca aaacttacat ccactactta	1020
tgctattaaa aaaacaacat aaacttgtag tatctcaaaa agactgtaat ccaaacagaa	1080
gacaaaaacc agtaacttta aaaataagac ctccaccaa attaacatca cagtggagat	1140
taagcagaga actagcaaaa atgccacttg tcagactagg agtcagtcta atagacctct	1200
cagaaccatg gttagaaggc tggggaaatg ctttttacag cgtactggga tatgaagcta	1260
gtaaacactc agggagatgg tcaaactgga cacaataaaa atacttctgg atatatgaca	1320
caggagtagg aaatgcagtt tatgtcattt tattaaaaca agaggtggat gataatccag	1380
gggcaatggc aacaaaattt gtaactggac caggacaaca ccagatgcc atagacagga	1440
tcgaacaaat aaatgaagga tggccttact ggcttttctt ttacggacag tcagaacaag	1500
acataaaaaa attagcacac gatcaagaaa tagcaaggga atatgcaaac aatccaaaat	1560
ctaaaaaatt aaaaatagga gtgataggat gggctagcag taactttaca acagcaggca	1620
gctcacaaaa tcaaacacca caaacaccag aagccatata aggaggatac gtagcatatg	1680
caggctcaaa aatacaagga gcaggagcaa ttacaaactt atacacagat gcatggccgg	1740
gagaccaaaa ttggccacct ctaaatagag aacaaacaaa ctttaactgg ggcttaagag	1800
gactctgtat aatgagagat aatatgaaac tgggagctca agaactagat gatgaatgta	1860
caatgctcac actttttgga cttttgtgg aaaaagcaaa cacagctttt gctacaaatg	1920
accctaaata cttcagacca gaactcaaag actataacat agtaatgaaa tatgccttta	1980
aatttcagtg gggaggccac ggaaccgaaa gattcaaaac aaccatcgga gatcccagca	2040

ccataccatg tccctttgaa cccggggaac ggtaccacca cggggtacaa gaccccgcca 2100
 aggtacaaaa cacagtcctc aacccttggg actatgactg tgacgggatt gttagaacag 2160
 atactctcaa aagacttctc gaactcccca cagagacgga ggagacggag aaggcgtacc 2220
 cactccttgg acaaaaaaca gagaaagagc cattatcaga ctccgacgaa gagagcgta 2280
 tctcaagcac gagcagtgga tcctctcaag aagaagagac gcagagaaga agacagcaca 2340
 agccaagcaa gcgacgactc ctcaagcacc tccagcgggt ggtaaagaga atgaagacac 2400
 tgtgatagat aaatatagaa acctagcaga cccctcactc aatgtcacag gacacatgga 2460
 aaaattcatg caactgcaca taaaaacgt acaagaaata agagctaaaa atgctaaaaa 2520
 atccctcaat aaactttact tttctgatta ataccggcct cctgtgtcca atctattttt 2580
 cctacacccc ttcaaatgg cgggcgggac acaaatggc ggaggaaact aagggggggg 2640
 caagcccccc cccgggggtt gagggggggt ttcccccoct cccccggtg cagggggcgg 2700
 agcccccgca cccccctgc gggggctccg cccctgcac ccccgggagg gggggaaacc 2760
 cccctcaac ccccgcggg gggaagccc cctgcaccc ccc 2803

<210> 13
 <211> 635
 <212> PRT
 <213> Torque teno virus

<400> 13

Met Arg Phe Arg Arg Arg Arg Phe Gly Arg Arg Arg Arg Tyr Tyr Arg
 1 5 10 15

Lys Arg Arg Gly Gly Trp Arg Arg Arg Phe Arg Ile Arg Arg Arg Arg
 20 25 30

Pro Trp Arg Arg Trp Arg Val Arg Arg Trp Arg Arg Ser Val Phe Arg
 35 40 45

Arg Gly Gly Arg Arg Ala Arg Pro Tyr Arg Ile Ser Ala Trp Asn Pro
 50 55 60

Lys Val Leu Arg Asn Cys Arg Ile Thr Gly Trp Trp Pro Val Ile Gln
 65 70 75 80

Cys Met Asp Gly Met Glu Trp Ile Lys Tyr Lys Pro Met Asp Leu Arg
 85 90 95

Val Glu Ala Asn Trp Ile Phe Asn Lys Gln Asp Ser Lys Ile Glu Thr
 100 105 110

Glu Gln Met Gly Tyr Leu Met Gln Tyr Gly Gly Gly Trp Ser Ser Gly
 115 120 125

Val Ile Ser Leu Glu Gly Leu Phe Asn Glu Asn Arg Leu Trp Arg Asn
 130 135 140

000150

Ile Trp Ser Lys Ser Asn Asp Gly Met Asp Leu Val Arg Tyr Phe Gly
145 150 155 160

Cys Arg Ile Arg Leu Tyr Pro Thr Glu Asn Gln Asp Tyr Leu Phe Trp
165 170 175

Tyr Asp Thr Glu Phe Asp Glu Gln Gln Arg Arg Met Leu Asp Glu Tyr
180 185 190

Thr Gln Pro Ser Val Met Leu Gln Ala Lys Asn Ser Arg Leu Ile Val
195 200 205

Cys Lys Gln Lys Met Pro Ile Arg Arg Arg Val Lys Ser Ile Phe Ile
210 215 220

Pro Pro Pro Ala Gln Leu Thr Thr Gln Trp Lys Phe Gln Gln Glu Leu
225 230 235 240

Cys Gln Phe Pro Leu Phe Asn Trp Ala Cys Ile Cys Ile Asp Met Asp
245 250 255

Thr Pro Phe Asp Tyr Asn Gly Ala Trp Arg Asn Ala Trp Trp Leu Met
260 265 270

Arg Arg Leu Gln Asn Gly Asn Met Glu Tyr Ile Glu Arg Trp Gly Arg
275 280 285

Ile Pro Met Thr Gly Asp Thr Glu Leu Pro Pro Ala Asp Asp Phe Lys
290 295 300

Ala Gly Gly Val Asn Lys Asn Phe Lys Pro Thr Gly Ile Gln Arg Ile
305 310 315 320

Tyr Pro Ile Val Ala Val Cys Leu Val Glu Gly Asn Lys Arg Val Val
325 330 335

Lys Trp Ala Thr Val His Asn Gly Pro Ile Asp Arg Trp Arg Lys Lys
340 345 350

Gln Thr Gly Thr Leu Lys Leu Ser Asn Leu Arg Gly Leu Val Leu Arg
355 360 365

Val Cys Ser Glu Ser Glu Thr Tyr Tyr Lys Trp Thr Gly Ser Glu Phe
370 375 380

Thr Gly Ala Phe Gln Gln Asp Trp Trp Pro Val Gly Gly Thr Glu Tyr
385 390 395 400

000160

Pro Leu Cys Thr Ile Lys Met Asp Pro Glu Tyr Glu Asn Pro Thr Val
 405 410 415

Glu Val Trp Ser Trp Lys Ala Asn Ile Pro Thr Ser Gly Thr Leu Lys
 420 425 430

Asp Tyr Phe Gly Leu Ser Thr Gly Gln Gln Trp Lys Asp Thr Asp Phe
 435 440 445

Ala Arg Leu Gln Leu Pro Arg Ser Ser His Asn Val Asp Phe Gly His
 450 455 460

Lys Ala Arg Phe Gly Pro Phe Cys Val Lys Lys Pro Pro Val Glu Phe
 465 470 475 480

Arg Asp Thr Ala Pro Asn Pro Leu Asn Ile Trp Val Lys Tyr Thr Phe
 485 490 495

Tyr Phe Gln Phe Gly Gly Met Tyr Gln Pro Pro Thr Gly Ile Gln Asp
 500 505 510

Pro Cys Thr Ser Asn Pro Thr Tyr Pro Val Arg Met Val Gly Ala Val
 515 520 525

Thr His Pro Lys Tyr Ala Gly Gln Gly Gly Ile Thr Thr Gln Ile Gly
 530 535 540

Asp Gln Gly Ile Thr Ala Ala Ser Ile Arg Ala Ile Ser Ala Ala Pro
 545 550 555 560

Pro Asp Thr Tyr Thr Gln Ser Ala Phe Leu Lys Ala Pro Glu Thr Glu
 565 570 575

Lys Glu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Thr Ser Phe Thr Ser Ala Glu Ser
 580 585 590

Ser Ser Glu Gly Asp Gly Ser Ser Asp Asp Gln Ala Glu Arg Arg Ala
 595 600 605

Ala Arg Lys Arg Val Ile Lys Leu Leu Leu Lys Arg Leu Ala Asp Arg
 610 615 620

Pro Val Asp Asn Lys Arg Arg Arg Phe Ser Glu
 625 630 635

<210> 14
 <211> 639
 <212> PRT
 <213> Torque teno virus

<400> 14

000161

Met Ala Pro Thr Arg Arg Trp Arg Arg Arg Phe Gly Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Lys Arg Arg Tyr Gly Trp Arg Arg Arg Tyr Tyr Arg Tyr
20 25 30

Arg Pro Arg Tyr Tyr Arg Arg Arg Trp Leu Val Arg Arg Arg Arg Arg
35 40 45

Ser Val Tyr Arg Arg Gly Gly Arg Arg Ala Arg Pro Tyr Arg Ile Ser
50 55 60

Ala Phe Asn Pro Lys Val Met Arg Arg Val Val Ile Arg Gly Trp Trp
65 70 75 80

Pro Ile Leu Gln Cys Leu Lys Gly Gln Glu Ser Leu Arg Tyr Arg Pro
85 90 95

Leu Gln Trp Asp Thr Glu Lys Gln Trp Arg Val Lys Lys Asp Tyr Glu
100 105 110

Asp Asn Tyr Gly Tyr Leu Val Gln Tyr Gly Gly Gly Trp Gly Ser Gly
115 120 125

Glu Val Thr Leu Glu Gly Leu Tyr Gln Glu His Leu Leu Trp Arg Asn
130 135 140

Ser Trp Ser Lys Gly Asn Asp Gly Met Asp Leu Val Arg Tyr Phe Gly
145 150 155 160

Cys Ile Val Tyr Leu Tyr Pro Leu Gln Asp Gln Asp Tyr Trp Phe Trp
165 170 175

Trp Asp Thr Asp Phe Lys Glu Leu Tyr Ala Glu Ser Ile Lys Glu Tyr
180 185 190

Ser Gln Pro Ser Val Met Met Met Ala Lys Arg Thr Arg Leu Val Ile
195 200 205

Ala Arg Asp Arg Ala Pro His Arg Arg Arg Val Arg Lys Ile Phe Ile
210 215 220

Pro Pro Pro Ser Arg Asp Thr Thr Gln Trp Gln Phe Gln Thr Asp Phe
225 230 235 240

Cys Lys Arg Pro Leu Phe Thr Trp Ala Ala Gly Leu Ile Asp Met Gln
245 250 255

Lys Pro Phe Asp Ala Asn Gly Ala Phe Arg Asn Ala Trp Trp Leu Glu
260 265 270

000162

Thr Arg Asn Asp Gln Gly Glu Met Lys Tyr Ile Glu Leu Trp Gly Arg
 275 280 285

Val Pro Pro Gln Gly Asp Thr Glu Leu Pro Lys Gln Ser Glu Phe Lys
 290 300

Lys Gly Asp Asn Asn Pro Asn Tyr Asn Ile Thr Glu Gly His Glu Lys
 305 310 315 320

Asn Ile Tyr Pro Ile Ile Ile Tyr Val Asp Gln Lys Asp Gln Lys Thr
 325 330 335

Arg Lys Lys Tyr Cys Val Cys Tyr Asn Lys Thr Leu Asn Arg Trp Arg
 340 345 350

Lys Ala Gln Ala Ser Thr Leu Ala Ile Gly Asp Leu Gln Gly Leu Val
 355 360 365

Leu Arg Gln Leu Met Asn Gln Glu Met Thr Tyr Tyr Trp Lys Ser Gly
 370 375 380

Glu Phe Ser Ser Pro Phe Leu Gln Arg Trp Lys Gly Thr Arg Leu Ile
 385 390 395 400

Thr Ile Asp Ala Arg Lys Ala Asp Thr Glu Asn Pro Lys Val Ser Ser
 405 410 415

Trp Glu Trp Gly Gln Asn Trp Asn Thr Ser Gly Thr Val Leu Gln Glu
 420 425 430

Val Phe Asn Ile Ser Leu Asn Asn Thr Gln Ile Arg Gln Asp Asp Phe
 435 440 445

Ala Lys Leu Thr Leu Pro Lys Ser Pro His Asp Ile Asp Phe Gly His
 450 455 460

His Ser Arg Phe Gly Pro Phe Cys Val Lys Asn Glu Pro Leu Glu Phe
 465 470 475 480

Gln Leu Leu Pro Pro Thr Pro Thr Asn Leu Trp Phe Gln Tyr Lys Phe
 485 490 495

Leu Phe Gln Phe Gly Gly Glu Tyr Gln Pro Pro Thr Gly Ile Arg Asp
 500 505 510

Pro Cys Ile Asp Thr Pro Ala Tyr Pro Val Pro Gln Ser Gly Ser Val
 515 520 525

Thr His Pro Lys Phe Ala Gly Lys Gly Gly Met Leu Thr Glu Thr Asp

000163

530

535

540

Arg Trp Gly Ile Thr Ala Ala Ser Ser Arg Thr Leu Ser Ala Asp Thr
 545 550 555 560

Pro Thr Glu Ala Ala Gln Ser Ala Leu Leu Arg Gly Asp Ala Glu Lys
 565 570 575

Lys Gly Glu Glu Thr Glu Glu Thr Ala Ser Ser Ser Ser Ile Thr Ser
 580 585 590

Ala Glu Ser Ser Thr Glu Gly Asp Gly Ser Ser Asp Asp Glu Glu Thr
 595 600 605

Ile Arg Arg Arg Arg Arg Thr Trp Lys Arg Leu Arg Arg Met Val Arg
 610 615 620

Gln Gln Leu Asp Arg Arg Met Asp His Lys Arg Gln Arg Leu His
 625 630 635

<210> 15
 <211> 625
 <212> PRT
 <213> Torque teno virus

<400> 15

Met Pro Tyr Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Thr Arg Arg
 1 5 10 15

Trp Arg His Arg Arg Trp Arg Arg Tyr Phe Arg Tyr Arg Tyr Arg Arg
 20 25 30

Ala Pro Arg Arg Arg Arg Pro Lys Val Arg Arg Arg Arg Arg Lys Ala
 35 40 45

Pro Val Ile Gln Trp Phe Pro Pro Ser Arg Arg Thr Cys Leu Ile Glu
 50 55 60

Gly Phe Trp Pro Leu Ser Tyr Gly His Trp Phe Arg Thr Cys Leu Pro
 65 70 75 80

Met Arg Arg Leu Asn Gly Leu Ile Phe Thr Gly Gly Gly Cys Asp Trp
 85 90 95

Thr Gln Trp Ser Leu Gln Asn Leu Phe His Glu Lys Leu Asn Trp Arg
 100 105 110

Asn Ile Trp Thr Ala Ser Asn Val Gly Met Glu Phe Ala Arg Phe Leu
 115 120 125

Arg Gly Lys Phe Tyr Phe Phe Arg His Pro Trp Arg Ser Tyr Ile Val
 130 135 140

000164

Thr Trp Asp Gln Asp Ile Pro Cys Lys Pro Leu Pro Tyr Gln Asn Leu
145 150 155 160

Gln Pro Leu Leu Met Leu Leu Lys Lys Gln His Lys Leu Val Leu Ser
165 170 175

Gln Lys Asp Cys Asn Pro Asn Arg Lys Gln Lys Pro Val Thr Leu Lys
180 185 190

Phe Arg Pro Pro Pro Lys Leu Thr Ser Gln Trp Arg Leu Ser Arg Glu
195 200 205

Leu Ser Lys Ile Pro Leu Ile Arg Leu Gly Ile Ser Leu Ile Asp Leu
210 215 220

Ser Glu Pro Trp Leu Glu Gly Trp Gly Asn Ala Phe Tyr Ser Val Leu
225 230 235 240

Gly Tyr Glu Ala Ser Lys His Ser Gly Arg Trp Ser Asn Trp Thr Gln
245 250 255

Met Lys Tyr Phe Trp Ile Tyr Asp Thr Gly Val Gly Asn Ala Val Tyr
260 265 270

Val Ile Leu Leu Lys Lys Asp Val Ser Asp Asn Pro Gly Asp Met Ala
275 280 285

Thr Gln Phe Val Thr Gly Ser Gly Gln His Pro Asp Ala Ile Asp His
290 295 300

Ile Glu Met Val Asn Glu Gly Trp Pro Tyr Trp Leu Phe Phe Tyr Gly
305 310 315 320

Gln Ser Glu Gln Asp Ile Lys Lys Leu Ala His Asp Gln Asp Ile Val
325 330 335

Arg Glu Tyr Ala Arg Asp Pro Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ile Gly Val
340 345 350

Ile Gly Trp Ala Ser Ser Asn Tyr Thr Thr Ala Gly Ser Asn Gln Asn
355 360 365

Ser Val Leu Gln Thr Pro Glu Ala Ile Gln Gly Gly Tyr Val Ala Tyr
370 375 380

Ala Gly Ser Arg Ile Pro Gly Ala Gly Ser Ile Thr Asn Leu Phe Gln
385 390 395 400

Met Gly Trp Pro Gly Asp Gln Asn Trp Pro Pro Thr Asn Gln Asp Gln

000165

405	410	415
Thr Asn Phe Asn Trp Gly Leu Arg Gly Leu Cys Val Leu Arg Asp Asn 420 425 430		
Met Lys Leu Gly Ala Gln Glu Leu Asp Asp Glu Cys Thr Met Leu Ser 435 440 445		
Leu Phe Gly Pro Phe Val Glu Lys Ala Asn Thr Ala Phe Ala Thr Asn 450 455 460		
Asp Pro Lys Tyr Phe Arg Pro Glu Leu Lys Asp Tyr Asn Val Val Met 465 470 475 480		
Lys Tyr Ala Phe Lys Phe Gln Trp Gly Gly His Gly Thr Glu Arg Phe 485 490 495		
Lys Thr Thr Ile Gly Asp Pro Ser Thr Ile Pro Cys Pro Phe Glu Pro 500 505 510		
Gly Glu Arg Tyr His His Gly Val Gln Asp Pro Ala Lys Val Gln Asn 515 520 525		
Thr Val Leu Asn Pro Trp Asp Tyr Asp Cys Asp Gly Ile Val Arg Thr 530 535 540		
Asp Thr Leu Lys Arg Leu Leu Glu Leu Pro Thr Glu Thr Glu Glu Thr 545 550 555 560		
Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Lys Thr Glu Lys Glu Pro Leu 565 570 575		
Ser Asp Ser Asp Glu Glu Ser Val Ile Ser Ser Thr Ser Ser Gly Ser 580 585 590		
Ser Gln Glu Glu Glu Thr Gln Arg Arg Lys His His Lys Pro Ser Lys 595 600 605		
Arg Arg Leu Leu Lys His Leu Gln Arg Val Val Lys Arg Met Lys Thr 610 615 620		
Leu 625		

<210> 16
 <211> 625
 <212> PRT
 <213> Torque teno virus

 <400> 16

000166

Met Pro Tyr Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Thr Arg Arg
1 5 10 15

Trp Arg His Arg Arg Trp Arg Arg Phe Phe Arg Tyr Arg Tyr Arg Arg
20 25 30

Ala Pro Arg Arg Arg Arg Thr Lys Val Arg Arg Arg Arg Arg Lys Ala
35 40 45

Pro Val Ile Gln Trp Phe Pro Pro Ser Arg Arg Thr Cys Leu Ile Glu
50 55 60

Gly Phe Trp Pro Leu Ser Tyr Gly His Trp Phe Arg Thr Cys Leu Pro
65 70 75 80

Met Arg Arg Leu Asn Gly Leu Ile Phe Thr Gly Gly Gly Cys Asp Trp
85 90 95
Thr Gln Trp Ser Leu Gln Asn Leu Tyr His Glu Lys Leu Asn Trp Arg
100 105 110

Asn Ile Trp Thr Ala Ser Asn Val Gly Met Glu Phe Ala Arg Phe Leu
115 120 125

Arg Gly Lys Phe Tyr Phe Phe Arg His Pro Trp Arg Ser Tyr Ile Ile
130 135 140

Thr Trp Asp Gln Asp Ile Pro Cys Lys Pro Leu Pro Tyr Gln Asn Leu
145 150 155 160

His Pro Leu Leu Met Leu Leu Lys Lys Gln His Lys Leu Val Leu Ser
165 170 175

Gln Lys Asp Cys Asn Pro Asn Arg Arg Gln Lys Pro Val Thr Leu Lys
180 185 190

Ile Arg Pro Pro Pro Lys Leu Thr Ser Gln Trp Arg Leu Ser Arg Glu
195 200 205

Leu Ala Lys Met Pro Leu Val Arg Leu Gly Val Ser Leu Ile Asp Leu
210 215 220

Ser Glu Pro Trp Leu Glu Gly Trp Gly Asn Ala Phe Tyr Ser Val Leu
225 230 235 240

Gly Tyr Glu Ala Ser Lys His Ser Gly Arg Trp Ser Asn Trp Thr Gln
245 250 255

Ile Lys Tyr Phe Trp Ile Tyr Asp Thr Gly Val Gly Asn Ala Val Tyr
260 265 270

Val Ile Leu Leu Lys Gln Glu Val Asp Asp Asn Pro Gly Ala Met Ala

000167

275					280					285					
Thr	Lys	Phe	Val	Thr	Gly	Pro	Gly	Gln	His	Pro	Asp	Ala	Ile	Asp	Arg
290						295					300				
Ile	Glu	Gln	Ile	Asn	Glu	Gly	Trp	Pro	Tyr	Trp	Leu	Phe	Phe	Tyr	Gly
305					310					315					320
Gln	Ser	Glu	Gln	Asp	Ile	Lys	Lys	Leu	Ala	His	Asp	Gln	Glu	Ile	Ala
				325					330					335	
Arg	Glu	Tyr	Ala	Asn	Asn	Pro	Lys	Ser	Lys	Lys	Leu	Lys	Ile	Gly	Val
			340					345					350		
Ile	Gly	Trp	Ala	Ser	Ser	Asn	Phe	Thr	Thr	Ala	Gly	Ser	Ser	Gln	Asn
	355						360					365			
Gln	Thr	Pro	Gln	Thr	Pro	Glu	Ala	Ile	Gln	Gly	Gly	Tyr	Val	Ala	Tyr
	370					375					380				
Ala	Gly	Ser	Lys	Ile	Gln	Gly	Ala	Gly	Ala	Ile	Thr	Asn	Leu	Tyr	Thr
385					390					395					400
Asp	Ala	Trp	Pro	Gly	Asp	Gln	Asn	Trp	Pro	Pro	Leu	Asn	Arg	Glu	Gln
				405					410					415	
Thr	Asn	Phe	Asn	Trp	Gly	Leu	Arg	Gly	Leu	Cys	Ile	Met	Arg	Asp	Asn
			420					425					430		
Met	Lys	Leu	Gly	Ala	Gln	Glu	Leu	Asp	Asp	Glu	Cys	Thr	Met	Leu	Thr
	435						440					445			
Leu	Phe	Gly	Pro	Phe	Val	Glu	Lys	Ala	Asn	Thr	Ala	Phe	Ala	Thr	Asn
	450					455					460				
Asp	Pro	Lys	Tyr	Phe	Arg	Pro	Glu	Leu	Lys	Asp	Tyr	Asn	Ile	Val	Met
465					470					475					480
Lys	Tyr	Ala	Phe	Lys	Phe	Gln	Trp	Gly	Gly	His	Gly	Thr	Glu	Arg	Phe
				485					490					495	
Lys	Thr	Thr	Ile	Gly	Asp	Pro	Ser	Thr	Ile	Pro	Cys	Pro	Phe	Glu	Pro
			500					505					510		
Gly	Glu	Arg	Tyr	His	His	Gly	Val	Gln	Asp	Pro	Ala	Lys	Val	Gln	Asn
	515						520					525			
Thr	Val	Leu	Asn	Pro	Trp	Asp	Tyr	Asp	Cys	Asp	Gly	Ile	Val	Arg	Thr
	530					535					540				

• 000168

Asp Thr Leu Lys Arg Leu Leu Glu Leu Pro Thr Glu Thr Glu Glu Thr
545 550 555 560

Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Lys Thr Glu Lys Glu Pro Leu
565 570 575

Ser Asp Ser Asp Glu Glu Ser Val Ile Ser Ser Thr Ser Ser Gly Ser
580 585 590

Ser Gln Glu Glu Glu Thr Gln Arg Arg Arg Gln His Lys Pro Ser Lys
595 600 605

Arg Arg Leu Leu Lys His Leu Gln Arg Val Val Lys Arg Met Lys Thr
610 615 620

Leu
625

<210> 17
<211> 73
<212> PRT
<213> Torque teno virus

<400> 17

Met Lys Glu Lys Asp Tyr Trp Glu Glu Ala Trp Leu Thr Ser Cys Thr
1 5 10 15

Ser Ile His Asp His His Cys Asn Cys Gly Ser Trp Arg Asp His Leu
20 25 30

Trp Thr Leu Cys Ala Leu Asp Asp Ala Asp Leu Ala Ala Ala Asp
35 40 45

Ile Ile Glu Arg Glu Glu Ala Asp Gly Gly Glu Asp Phe Gly Phe Val
50 55 60

Asp Gly Asp Pro Gly Asp Ala Gly Gly
65 70

<210> 18
<211> 72
<212> PRT
<213> Torque teno virus

<400> 18

Met Pro Glu His Trp Glu Glu Ala Trp Leu Glu Ala Thr Lys Gly Trp
1 5 10 15

His Asp Leu Asp Cys Arg Cys Gly Asn Trp Gln Asp His Leu Trp Leu
20 25 30

000163

Leu Leu Ala Asp Gly Asp Ala Ala Leu Ala Ala Ala Val Asp Ala Ile
 35 40 45

Glu Arg Asp Ala Met Gly Gly Glu Asp Val Thr Thr Ala Thr Asp Arg
 50 55 60

Val Thr Ile Gly Asp Asp Gly Trp
 65 70

<210> 19
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Torque teno virus

<400> 19

Met Glu Glu Arg Trp Leu Thr Val Ala Tyr Cys Ala His Gly Leu Phe
 1 5 10 15

Cys Asp Cys Lys Asn Pro Lys Lys His Leu Glu Lys Cys Leu Thr Asp
 20 25 30

Ala Ile Ala Asp Ala Glu Gly Asp Arg His Gly Asp Gly Gly Thr Gly
 35 40 45

Gly Gly Asp Ala Thr Phe Asp Ile Gly Ile Asp Ala Leu Leu Ala Ala
 50 55 60

Ala Ala Gln Arg
 65

<210> 20
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Torque teno virus

<400> 20

Met Glu Glu Arg Trp Leu Thr Val Ala Tyr Cys Ala His Gly Leu Phe
 1 5 10 15

Cys Gly Cys Lys Asp Pro Lys Lys His Leu Glu Lys Cys Leu Thr Asp
 20 25 30

Ala Ile Ala Asp Ala Glu Gly Asp Arg His Gly Asp Gly Gly Thr Gly
 35 40 45

Gly Gly Asp Ala Ser Phe Asp Ile Gly Ile Asp Ala Leu Leu Ala Ala
 50 55 60

Ala Ala Gln Arg
 65

<210> 21
 <211> 174

000170

<212> PRT
 <213> Torque teno virus

<400> 21

Met Arg Phe Arg Arg Arg Arg Phe Gly Arg Arg Arg Arg Tyr Tyr Arg
 1 5 10 15

Lys Arg Arg Gly Gly Trp Arg Arg Arg Phe Arg Ile Arg Arg Arg Arg
 20 25 30

Pro Trp Arg Arg Trp Arg Phe Gly Gly Met Tyr Gln Pro Pro Thr Gly
 35 40 45

Ile Gln Asp Pro Cys Thr Ser Asn Pro Thr Tyr Pro Val Arg Met Val
 50 55 60

Gly Ala Val Thr His Pro Lys Tyr Ala Gly Gln Gly Gly Ile Thr Thr
 65 70 75 80

Gln Ile Gly Asp Gln Gly Ile Thr Ala Ala Ser Ile Arg Ala Ile Ser
 85 90 95

Ala Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Thr Gln Ser Ala Phe Leu Lys Ala Pro
 100 105 110

Glu Thr Glu Lys Glu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Thr Ser Phe Thr Ser
 115 120 125

Ala Glu Ser Ser Ser Glu Gly Asp Gly Ser Ser Asp Asp Gln Ala Glu
 130 135 140
 Arg Arg Ala Ala Arg Lys Arg Val Ile Lys Leu Leu Leu Lys Arg Leu
 145 150 155 160

Ala Asp Arg Pro Val Asp Asn Lys Arg Arg Arg Phe Ser Glu
 165 170

<210> 22
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Torque teno virus

<400> 22

Met Ala Pro Thr Arg Arg Trp Arg Arg Arg Phe Gly Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Arg Tyr Arg Lys Arg Arg Tyr Gly Trp Arg Arg Arg Tyr Tyr Arg Tyr
 20 25 30

Arg Pro Arg Tyr Tyr Arg Arg Arg Trp Leu Phe Gly Gly Glu Tyr Gln
 35 40 45

Pro Pro Thr Gly Ile Arg Asp Pro Cys Ile Asp Thr Pro Ala Tyr Pro

000171

50	55	60
Val 65	Pro 65	Gln 65
Ser 65	Gly 65	Ser 65
Val 65	Thr 65	His 65
Pro 65	Lys 65	Phe 65
Ala 65	Gly 65	Lys 65
Gly 65	Lys 65	Gly 65
Gly 85	Met 85	Leu 85
Thr 85	Thr 85	Asp 85
Arg 85	Arg 85	Trp 85
Gly 85	Ile 85	Thr 85
Ala 85	Ala 85	Ser 85
Ser 85	Ser 85	Ser 85
Arg 100	Thr 100	Leu 100
Ser 100	Ala 100	Asp 100
Thr 100	Pro 100	Thr 100
Glu 100	Ala 100	Ala 100
Gln 100	Ser 100	Ala 100
Leu 100	Leu 100	Leu 100
Leu 115	Arg 115	Gly 115
Asp 115	Ala 115	Glu 115
Lys 115	Lys 115	Gly 115
Glu 115	Glu 115	Thr 115
Glu 115	Glu 115	Thr 115
Ala 115	Ala 115	Ala 115
Ser 130	Ser 130	Ser 130
Ser 130	Ser 130	Ser 130
Ile 130	Thr 130	Thr 130
Ala 130	Ala 130	Ala 130
Glu 130	Glu 130	Glu 130
Ser 130	Ser 130	Ser 130
Thr 130	Thr 130	Thr 130
Glu 130	Glu 130	Glu 130
Gly 130	Gly 130	Gly 130
Asp 130	Asp 130	Asp 130
Gly 130	Gly 130	Gly 130
Ser 145	Ser 145	Ser 145
Ser 145	Ser 145	Ser 145
Asp 145	Asp 145	Asp 145
Glu 145	Glu 145	Glu 145
Glu 145	Glu 145	Glu 145
Thr 145	Thr 145	Thr 145
Ile 145	Ile 145	Ile 145
Arg 145	Arg 145	Arg 145
Arg 145	Arg 145	Arg 145
Arg 145	Arg 145	Arg 145
Thr 145	Thr 145	Thr 145
Trp 145	Trp 145	Trp 145
Lys 145	Lys 145	Lys 145
Arg 165	Leu 165	Arg 165
Arg 165	Arg 165	Arg 165
Met 165	Met 165	Met 165
Val 165	Val 165	Val 165
Gln 165	Gln 165	Gln 165
Gln 165	Gln 165	Gln 165
Leu 165	Leu 165	Leu 165
Asp 165	Asp 165	Asp 165
Arg 165	Arg 165	Arg 165
Arg 165	Arg 165	Arg 165
Met 165	Met 165	Met 165
Asp 165	Asp 165	Asp 165
His 165	His 165	His 165
Lys 180	Lys 180	Lys 180
Arg 180	Arg 180	Arg 180
Gln 180	Gln 180	Gln 180
Leu 180	Leu 180	Leu 180
His 180	His 180	His 180
<210> 23	<211> 178	<212> PRT
<213> Torque teno virus	<400> 23	
Met 1	Pro 1	Tyr 1
Arg 1	Arg 1	Arg 1
Tyr 1	Tyr 1	Tyr 1
Arg 1	Arg 1	Arg 1
Arg 1	Arg 1	Arg 1
Arg 1	Arg 1	Arg 1
Pro 1	Pro 1	Pro 1
Thr 1	Thr 1	Thr 1
Arg 1	Arg 1	Arg 1
Arg 1	Arg 1	Arg 1
Trp 20	Arg 20	His 20
Arg 20	Arg 20	Arg 20
Trp 20	Trp 20	Trp 20
Arg 20	Arg 20	Arg 20
Arg 20	Arg 20	Arg 20
Tyr 20	Tyr 20	Tyr 20
Phe 20	Phe 20	Phe 20
Arg 20	Arg 20	Arg 20
Tyr 20	Tyr 20	Tyr 20
Arg 20	Arg 20	Arg 20
Arg 20	Arg 20	Arg 20
Ala 35	Pro 35	Arg 35
Arg 35	Arg 35	Arg 35
Arg 35	Arg 35	Arg 35
Arg 35	Arg 35	Arg 35
Pro 35	Pro 35	Pro 35
Lys 35	Lys 35	Lys 35
Trp 35	Trp 35	Trp 35
Gly 35	Gly 35	Gly 35
Gly 35	Gly 35	Gly 35
His 35	His 35	His 35
Gly 35	Gly 35	Gly 35
Thr 35	Thr 35	Thr 35
Glu 35	Glu 35	Glu 35
Arg 35	Arg 35	Arg 35
Phe 50	Lys 50	Thr 50
Thr 50	Thr 50	Thr 50
Ile 50	Ile 50	Ile 50
Gly 50	Gly 50	Gly 50
Asp 50	Asp 50	Asp 50
Pro 50	Pro 50	Pro 50
Ser 50	Ser 50	Ser 50
Thr 50	Thr 50	Thr 50
Ile 50	Ile 50	Ile 50
Pro 50	Pro 50	Pro 50
Cys 50	Cys 50	Cys 50
Pro 50	Pro 50	Pro 50
Phe 50	Phe 50	Phe 50
Glu 50	Glu 50	Glu 50
Pro 65	Gly 65	Glu 65
Arg 65	Arg 65	Arg 65
Tyr 65	Tyr 65	Tyr 65
His 65	His 65	His 65
Gly 65	Gly 65	Gly 65
Val 65	Val 65	Val 65
Gln 65	Gln 65	Gln 65
Asp 65	Asp 65	Asp 65
Pro 65	Pro 65	Pro 65
Ala 65	Ala 65	Ala 65
Lys 65	Lys 65	Lys 65
Val 65	Val 65	Val 65
Gln 65	Gln 65	Gln 65
Asn 85	Thr 85	Val 85
Leu 85	Leu 85	Leu 85
Asn 85	Asn 85	Asn 85
Pro 85	Pro 85	Pro 85
Trp 85	Trp 85	Trp 85
Asp 85	Asp 85	Asp 85
Tyr 85	Tyr 85	Tyr 85
Asp 85	Asp 85	Asp 85
Cys 85	Cys 85	Cys 85
Asp 85	Asp 85	Asp 85
Gly 85	Gly 85	Gly 85
Ile 85	Ile 85	Ile 85
Val 85	Val 85	Val 85
Arg 85	Arg 85	Arg 85
Thr 100	Asp 100	Thr 100
Leu 100	Leu 100	Leu 100
Lys 100	Lys 100	Lys 100
Arg 100	Arg 100	Arg 100
Leu 100	Leu 100	Leu 100
Leu 100	Leu 100	Leu 100
Glu 100	Glu 100	Glu 100
Leu 100	Leu 100	Leu 100
Pro 100	Pro 100	Pro 100
Thr 100	Thr 100	Thr 100
Glu 100	Glu 100	Glu 100
Thr 100	Thr 100	Thr 100
Glu 100	Glu 100	Glu 100
Glu 100	Glu 100	Glu 100

000172

Thr Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Lys Thr Glu Lys Glu Pro
115 120 125

Leu Ser Asp Ser Asp Glu Glu Ser Val Ile Ser Ser Thr Ser Ser Gly
130 135 140

Ser Ser Gln Glu Glu Glu Thr Gln Arg Arg Lys His His Lys Pro Ser
145 150 155 160

Lys Arg Arg Leu Leu Lys His Leu Gln Arg Val Val Lys Arg Met Lys
165 170 175

Thr Leu

<210> 24

<211> 178

<212> PRT

<213> Torque teno virus

<400> 24

Met Pro Tyr Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Thr Arg Arg
1 5 10 15

Trp Arg His Arg Arg Trp Arg Arg Phe Phe Arg Tyr Arg Tyr Arg Arg
20 25 30

Ala Pro Arg Arg Arg Arg Thr Lys Trp Gly Gly His Gly Thr Glu Arg
35 40 45

Phe Lys Thr Thr Ile Gly Asp Pro Ser Thr Ile Pro Cys Pro Phe Glu
50 55 60

Pro Gly Glu Arg Tyr His His Gly Val Gln Asp Pro Ala Lys Val Gln
65 70 75 80

Asn Thr Val Leu Asn Pro Trp Asp Tyr Asp Cys Asp Gly Ile Val Arg
85 90 95

Thr Asp Thr Leu Lys Arg Leu Leu Glu Leu Pro Thr Glu Thr Glu Glu
100 105 110

Thr Glu Lys Ala Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Lys Thr Glu Lys Glu Pro
115 120 125

Leu Ser Asp Ser Asp Glu Glu Ser Val Ile Ser Ser Thr Ser Ser Gly
130 135 140

Ser Ser Gln Glu Glu Glu Thr Gln Arg Arg Arg Gln His Lys Pro Ser
145 150 155 160

Lys Arg Arg Leu Leu Lys His Leu Gln Arg Val Val Lys Arg Met Lys

000173

165

170

175

Thr Leu

<210> 25
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Torque teno virus

<400> 25

Met Lys Glu Lys Asp Tyr Trp Glu Glu Ala Trp Leu Thr Ser Cys Thr
 1 5 10 15

Ser Ile His Asp His His Cys Asn Cys Gly Ser Trp Arg Asp His Leu
 20 25 30

Trp Thr Leu Cys Ala Leu Asp Asp Ala Asp Leu Ala Ala Ala Asp
 35 40 45

Ile Ile Glu Arg Glu Glu Ala Asp Gly Gly Glu Asp Phe Gly Phe Val
 50 55 60

Asp Gly Asp Pro Gly Asp Ala Gly Gly Ser Ala Ala Cys Thr Ser Leu
 65 70 75 80

Pro Pro Glu Ser Lys Ile Pro Ala Leu Leu Thr Arg Pro Ile Leu Ser
 85 90 95

Glu Trp Ser Glu Gln Leu His Thr Pro Asn Thr Pro Gly Lys Ala Glu
 100 105 110

Ser Arg Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Ser Pro Leu Pro Leu Ser Val
 115 120 125

Pro Ser Val Gln Leu His Gln Ile Pro Thr Arg Ser Arg Arg Ser Ser
 130 135 140

Lys Pro Arg Lys Pro Arg Lys Lys Arg Lys Glu Arg Val Arg Pro Val
 145 150 155 160

Ser Arg Val Pro Lys Ala Leu Leu Arg Glu Met Asp Arg Leu Met Thr
 165 170 175

Lys Gln Arg Asp Ala Leu Pro Glu Ser Glu Ser Ser Ser Tyr Phe Ser
 180 185 190

Ser Asp Ser Leu Thr Asp Pro Trp Thr Thr Ser Asp Asp Asp Phe Gln
 195 200 205

Ser Asp Pro Asp Pro Leu Thr Asn Lys Arg Lys Lys Arg Leu Gln Phe

- 000174

210 215 220

 <210> 26
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Torque teno virus

 <400> 26

 Met Pro Glu His Trp Glu Glu Ala Trp Leu Glu Ala Thr Lys Gly Trp
 1 5 10 15

 His Asp Leu Asp Cys Arg Cys Gly Asn Trp Gln Asp His Leu Trp Leu
 20 25 30

 Leu Leu Ala Asp Gly Asp Ala Ala Leu Ala Ala Val Asp Ala Ile
 35 40 45

 Glu Arg Asp Ala Met Gly Gly Glu Asp Val Thr Thr Ala Thr Asp Arg
 50 55 60

 Val Thr Ile Gly Asp Asp Gly Cys Leu Ala Val Asn Thr Ser His Gln
 65 70 75 80

 Gln Val Ser Ala Ile Pro Ala Leu Ile His Gln Pro Ile Leu Cys Arg
 85 90 95

 Ser Gln Glu Val Leu His Thr Pro Asn Ser Pro Glu Arg Ala Glu Cys
 100 105 110

 Ser Arg Lys Gln Thr Val Gly Val Ser Leu Leu Pro Leu Pro Glu Pro
 115 120 125

 Ser Val Gln Ile His Pro Pro Lys Gln Arg Lys Val His Phe Ser Glu
 130 135 140

 Gly Thr Arg Lys Arg Lys Glu Arg Lys Pro Arg Lys Pro Arg His Arg
 145 150 155 160

 Pro Val Ser Arg Val Pro Lys Ala Leu Leu Arg Glu Met Asp Arg Leu
 165 170 175

 Met Met Lys Arg Gln Ser Asp Ala Glu Gly Gly Pro Gly Ser Asp Ser
 180 185 190
 Asp Gly Trp Ser Asp Ser Ser Leu Thr Asp Glu Trp Thr Thr Ser Asp
 195 200 205

 Ser Asp Phe Ile Asp Thr Pro Ile Arg Glu Arg Cys Leu Asn Lys Lys
 210 215 220

 Gln Lys Lys Arg
 225

000175

<210> 27
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Torque teno virus

<400> 27

Met Glu Glu Arg Trp Leu Thr Val Ala Tyr Cys Ala His Gly Leu Phe
 1 5 10 15

Cys Asp Cys Lys Asn Pro Lys Lys His Leu Glu Lys Cys Leu Thr Asp
 20 25 30

Ala Ile Ala Asp Ala Glu Gly Asp Arg His Gly Asp Gly Gly Thr Gly
 35 40 45

Gly Gly Asp Ala Thr Phe Asp Ile Gly Ile Asp Ala Leu Leu Ala Ala
 50 55 60

Ala Ala Gln Ser Gly Glu Asp Met Ala Pro Lys Asp Leu Lys Gln Pro
 65 70 75 80

Ser Glu Ile Pro Ala Pro Tyr His Val Pro Leu Asn Pro Gly Asn Gly
 85 90 95

Thr Thr Thr Gly Tyr Lys Thr Pro Pro Arg Tyr Lys Thr Gln Ser Ser
 100 105 110

Thr Leu Gly Thr Met Thr Val Thr Gly Leu Leu Glu Gln Ile Leu Ser
 115 120 125

Lys Asp Phe Ser Asn Ser Pro Gln Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 130 135 140

Thr His Ser Leu Asp Lys Lys Gln Arg Lys Ser His Tyr Gln Thr Pro
 145 150 155 160
 Thr Lys Arg Ala Leu Ser Gln Ala Arg Ala Val Asp Pro Leu Lys Lys
 165 170 175

Lys Arg Arg Arg Asp Glu Ser Thr Thr Ser Gln Ala Ser Asp Asp Ser
 180 185 190

Ser Ser Thr Ser Ser Gly Trp
 195

<210> 28
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Torque teno virus

<400> 28

Met Glu Glu Arg Trp Leu Thr Val Ala Tyr Cys Ala His Gly Leu Phe
 1 5 10 15

• 000176

Cys Gly Cys Lys Asp Pro Lys Lys His Leu Glu Lys Cys Leu Thr Asp
 20 25 30

Ala Ile Ala Asp Ala Glu Gly Asp Arg His Gly Asp Gly Gly Thr Gly
 35 40 45

Gly Gly Asp Ala Ser Phe Asp Ile Gly Ile Asp Ala Leu Leu Ala Ala
 50 55 60

Ala Ala Gln Ser Gly Glu Ala Thr Glu Pro Lys Asp Ser Lys Gln Pro
 65 70 75 80

Ser Glu Ile Pro Ala Pro Tyr His Val Pro Leu Asn Pro Gly Asn Gly
 85 90 95

Thr Thr Thr Gly Tyr Lys Thr Pro Pro Arg Tyr Lys Thr Gln Ser Ser
 100 105 110

Thr Leu Gly Thr Met Thr Val Thr Gly Leu Leu Glu Gln Ile Leu Ser
 115 120 125

Lys Asp Phe Ser Asn Ser Pro Gln Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 130 135 140

Thr His Ser Leu Asp Lys Lys Gln Arg Lys Ser His Tyr Gln Thr Pro
 145 150 155 160
 Thr Lys Arg Ala Leu Ser Gln Ala Arg Ala Val Asp Pro Leu Lys Lys
 165 170 175

Lys Arg Arg Arg Glu Glu Asp Ser Thr Ser Gln Ala Ser Asp Asp Ser
 180 185 190

Ser Ser Thr Ser Ser Gly Trp
 195

<210> 29
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus

<400> 29
 tccgaatggc tgagtttatg c

21

<210> 30
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus

<400> 30
 tccgctcagc tgctcct

17

<210> 31

- 000177

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus

<400> 31
 ggtggtaaag aggatgaa 18

<210> 32
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus

<400> 32
 aatagattgg acacaggag 19

<210> 33
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus

<400> 33
 tatcgggcag gagcagct 18

<210> 34
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus

<400> 34
 taggggcgcg ctctacgt 18

<210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus

<400> 35
 cctacatgaa ggagaaagac t 21

<210> 36
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus

<400> 36
 ccagcgtctc cagggtc 17

<210> 37
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus

<400> 37
 aagctaccaa gggctgg 17

<210> 38
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Torque teno virus

000178

<400> 38
gcggtctggt agcggtagt 19

<210> 39
<211> 22
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 39
cgaatggctg agtttatgcc gc 22

<210> 40
<211> 11
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 40
agtcctcatt t 11

<210> 41
<211> 11
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 41
aaccaatcag a 11

<210> 42
<211> 17
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 42
ctgggcgggt gccggag 17

<210> 43
<211> 14
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 43
cggagtcaag gggc 14

<210> 44
<211> 11
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 44
tatcgggcag g 11

<210> 45
<211> 23
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 45
tacacttccg gggtcaggag gct 23

000179

<210> 46
<211> 22
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 46
actcagccat tcggaacctc ac 22

<210> 47
<211> 22
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 47
caatttggtc cgcttcgctc gc 22

<210> 48
<211> 25
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 48
tacttatatt cgctttcgtg ggaac 25

<210> 49
<211> 22
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 49
agttacacat aaccacaaa cc 22

<210> 50
<211> 21
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 50
attaccgcct gcccgatagg c 21

<210> 51
<211> 21
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 51
ccaaaccaca ggaaactgtg c 21

<210> 52
<211> 20
<212> ADN
<213> Torque teno virus

<400> 52
cttgactccg ctctcaggag 20

000180

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 March 2011 (17.03.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/031438 A9

(51) International Patent Classification:

C12N 15/34 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2010/046330

(22) International Filing Date:

23 August 2010 (23.08.2010)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/235,833 21 August 2009 (21.08.2009) US
61/316,519 23 March 2010 (23.03.2010) US
12/861,378 23 August 2010 (23.08.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): VIRGINIA TECH INTELLECTUAL PROPERTIES, INC. [US/US]; 2200 Kraft Drive, Suite 1050, Blacksburg, VA 24060 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MENG, Xiang-Jin [CN/US]; 212 Flippin Circle, Blacksburg, VA 24060 (US). HUANG, Yaowei [CN/US]; 1708 Emerald St., Blacksburg, VA 24060 (US).

(74) Agent: GREENBAUM, Michael, C.; Blank Rome LLP, 600 New Hampshire Avenue, Nw, Washington, DC 20037 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

[Continued on next page]

(54) Title: PORCINE TORQUE TENO VIRUS VACCINES AND DIAGNOSIS

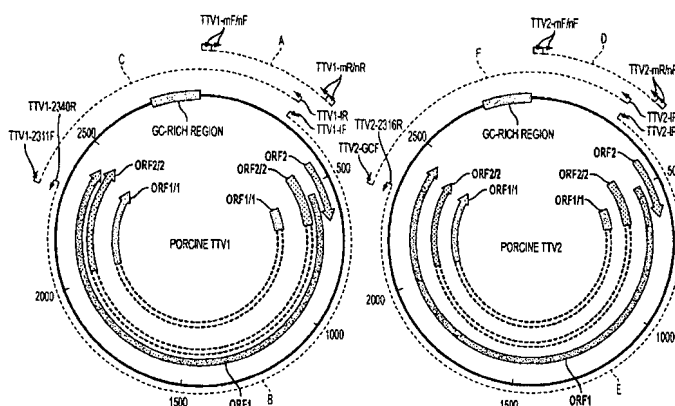


FIG. 1A

(57) Abstract: The present invention provides four purified preparation containing a polynucleic acid molecule encoding porcine Torque teno virus (PTTV) genotypes or subtypes PTTV1a-VA, PTTV1b-VA, PTTV2b-VA, and PTTV2c-VA. The present invention also provides infectious DNA clones, biologically functional plasmid or viral vector containing the infectious nucleic acid genome molecule of the same. The present invention further provides live, attenuated, vector-expressed and purified recombinant capsid subunit or killed viral vaccines for protection against PTTV infection. The present invention additionally provides subunit vaccines comprising PTTV specific gene products, especially ORF1 capsid gene product for protection against PTTV infection. Further, the present invention provides methods for diagnosing PTTV infection via polymerase chain reaction (PCR) using specific primer for PTTV1, PTTV2, and individual PTTV1 genotypes. Finally, the present invention provides methods for diagnosing PTTV infection via immunological methods, e.g., enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) and Western blot using PTTV specific antigens for detecting serum PTTV specific antibodies.

WO 2011/031438 A9



— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(48) Date of publication of this corrected version:

18 August 2011

(88) Date of publication of the international search report:
30 June 2011

(15) Information about Correction:
see Notice of 18 August 2011

000182



No. 12-047889- -00000-0000

Fecha: 2012-03-21 15:05:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 182

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐