



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①Número de publicación: 2 818 148

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: 04.03.2016 PCT/US2016/021003

(87) Fecha y número de publicación internacional: 09.09.2016 WO16141338

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 04.03.2016 E 16711080 (8)

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 17.06.2020 EP 3265121

(54) Título: Sistema de marcadores, en particular para antígenos subunitarios expresados por baculovirus

(30) Prioridad:

05.03.2015 US 201562128744 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 09.04.2021 (73) Titular/es:

BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA INC. (100.0%) 3239 Satellite Blvd Duluth, GA 30096, US

(72) Inventor/es:

IYER, ARUN V.; HERMANN, JOSEPH RALPH; ROOF, MICHAEL B.; VAUGHN, ERIC MARTIN Y SCHAEFFER, MERRILL LYNN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

DESCRIPCIÓN

Sistema de marcadores, en particular para antígenos subunitarios expresados por baculovirus

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10

15

20

25

30

35

50

60

65

La presente invención pertenece al campo de los marcadores de cumplimiento y las vacunas marcadoras que permiten la diferenciación entre individuos infectados y vacunados. En particular, se refiere a un marcador de cumplimiento para vacunas que incluyen un antígeno subunitario y un sistema DIVA (diferenciación entre animales infectados y vacunados) que permite diferenciar los animales infectados con un patógeno de los animales tratados con un antígeno subunitario derivado de dicho patógeno, en donde el antígeno subunitario se expresó en células de insecto cultivadas, preferentemente mediante un baculovirus modificado por ingeniería genética.

Descripción del arte relacionado

Los baculovirus son virus grandes de ADN bicatenario en forma de bastón que infectan invertebrados, en particular, insectos, pero que no se replican en células de mamíferos u otros vertebrados. Desde la década de 1940, se usaron inicialmente como bioplaguicidas en los campos de cultivo. Además, después de la publicación de un primer artículo que describía la sobrexpresión del interferón beta humano en células de insecto (Smith *et al.* Mol Cell Biol. 3: 2156–2165 (1983)), los baculovirus modificados por ingeniería genética se han utilizado ampliamente para producir proteínas recombinantes complejas en cultivos de células de insecto, que incluyen la producción de antígenos para varias vacunas subunitarias humanas y veterinarias aprobadas (van Oers *et al.* J Gen Virol. 96: 6-23 (2015)).

La vacunación es una herramienta esencial para controlar la salud de rebaños, en particular, en entornos de confinamiento de alta densidad donde se crían muchos animales para alimento. Cuando se producen brotes de enfermedad en animales supuestamente vacunados, surgen dudas con respecto a si la vacuna no logró proteger a los animales o si la vacuna se administró de manera correcta, en donde esta última posibilidad con respecto a la administración correcta de la vacuna se denomina cumplimiento vacunal.

Por lo tanto, los productores desean usar en gran medida marcadores de cumplimiento para determinar si un animal se vacunó de manera adecuada. WO 2009/058835 A1 describe, por ejemplo, el uso de xilanasa purificada que se agregó como un marcador de cumplimiento a una vacuna contra la gripe porcina. Con respecto a las vacunas que comprenden antígenos subunitarios expresados por baculovirus, es posible usar antígenos de baculovirus como marcadores de cumplimiento, en donde, sin embargo, los sistemas que se usan actualmente tienen limitaciones en los animales que dan positivo y que necesitan una gran cantidad de antígeno (Gerber *et al.* Res Vet Sci. 95:775-81 (2013); Lehnert. Top Agrar 5: S11-S14 (2011)).

Las vacunas utilizadas en programas para controlar brotes e infecciones virales deben tener un sistema eficaz para monitorizar la presencia continua de infección viral dentro de la población. Sin embargo, la vacunación dificulta la vigilancia a gran escala para la propagación de la infección, por ejemplo, por medios serológicos, ya que tanto los individuos vacunados como los expuestos producen anticuerpos específicos contra el virus. La similitud antigénica entre la cepa de campo virulenta infecciosa del virus y la vacuna viral con frecuencia obstaculiza la diferenciación entre sujetos infectados y vacunados, debido a que la vacunación produce el surgimiento y la persistencia de anticuerpos que no se pueden distinguir entre individuos infectados y vacunados.

Existe un creciente interés a nivel mundial sobre las estrategias de vacunación DIVA (diferenciación entre animales infectados y vacunados). Por ejemplo, las reuniones conjuntas de OMS/FAO/OIE sobre la cepa H5N1 HPAI de gripe aviar recomendaron que todas las vacunaciones se practiquen usando DIVA, para poder monitorizar la propagación de la infección. Sin embargo, los métodos DIVA actuales son difíciles de ampliar y suelen tener problemas con la diferenciación de la vacunación con respecto a la infección con otras cepas virales en circulación.

Los métodos actuales de monitorización incluyen etiquetado físico de animales vacunados, uso de animales centinela y evaluación virológica. No obstante, estos métodos actuales tienen diversas limitaciones por motivos logísticos y económicos.

El etiquetado físico de animales vacunados implica invertir mucho tiempo en la identificación individual de individuos vacunados por medios físicos, tales como etiquetas en las orejas, bandas en las piernas o etiquetas en las alas. Además, el uso de animales centinela sin vacunar es difícil a nivel logístico y económico, y también existe el riesgo de que si los centinelas son infectados con el virus, por ejemplo, aves de corral infectadas con el virus H5N1, habrá un mayor riesgo de propagación a seres humanos. La evaluación virológica de individuos mediante cribado y detección de virus vivo o evaluación de vigilancia RT-PCR es un proceso muy costoso y que requiere gran infraestructura, lo que no aplica a vacunas subunitarias, y solo proporciona información con respecto al estado actual de un individuo, y no permite el análisis de la infección y/o el historial de vacunación de dicho individuo.

En vista de estas limitaciones, el uso de vacunas marcadoras que permiten una diferenciación serológica de animales vacunados e infectados es de mayor preferencia, en donde las vacunas marcadoras se pueden preparar como vacunas marcadoras negativas o positivas.

- Una vacuna marcadora negativa se prepara mediante el uso de una porción antigénica del patógeno o mediante eliminación de un antígeno del patógeno, lo que produce anticuerpos específicos en animales infectados. Las vacunas marcadoras negativas son generalmente vacunas subunitarias o vacunas de virus vivos atenuados que contienen una cepa modificada por ingeniería genética que carece de un antígeno inmunógeno. Un ejemplo para una vacuna marcadora negativa es, por ejemplo, el uso de la proteína E2 del virus de la fiebre porcina clásica (CSFV) expresada por baculovirus como un antígeno subunitario para vacunar contra la fiebre porcina clásica, en donde una detección de anticuerpos específicos para otros antígenos de CSFV, por ejemplo, proteína E^{RNS} o proteína NS3, en sueros de cerdos vacunados, muestra una infección por CSFV.
- Una vacuna marcadora positiva contiene un antígeno adicional que induce anticuerpos específicos en individuos vacunados, pero no en individuos infectados. Un ejemplo de un enfoque de vacuna marcadora positiva se describe en WO 2007/053899 A1, en donde el virus H6N2 inactivado de la gripe aviar (AI) y la toxina tetánica, ambos producidos por separado, se combinaron en una inyección para vacunar aves, y posteriormente, se detectaron anticuerpos específicos contra la toxina tetánica en sueros obtenidos de dichas aves como marcadores que muestran que las aves se vacunaron.
 - No obstante, la producción por separado del antígeno de la vacuna y el antígeno marcador es relativamente costosa y, además, se necesita una etapa de mezcla para combinar ambos componentes en un agente de vacunación, en donde esto también puede afectar adicionalmente la estabilidad de los componentes/antígenos de la vacuna.
- Por ende, se necesita un sistema de marcadores simple para producir vacunas marcadoras positivas de bajo coste, en particular, vacunas subunitarias que comprendan antígenos expresados por baculovirus.
 - Además, se necesitan marcadores de cumplimiento eficaces que también permitan la identificación sensible de vacunaciones con una pequeña cantidad de antígeno subunitario expresado por baculovirus.
 - Faburay et al., Vector-Borne and Zoonotic Diseases 14(10), 746-756 (2014), Anderson et al., Clinical and Vaccine Immunology 21(3), 443-452 (2014) y Ahmad et al., Virology 192, 207-216 (1993) desvela el uso de sistemas de expresión recombinantes en baculovirus para el desarrollo de vacunas contra el virus de la fiebre del valle del Rift, el virus de la lengua azul y el virus de la estomatitis vesicular que permiten diferenciar los animales infectados de los vacunados. Zhang et al., Biologicals 22, 205-213 (1994) desvela que las células de insecto Sf9 son susceptibles de infección con diversos virus adventicios. Ma et al., J. Virology 88(12), 6576-7585 (2014) desvela un Rhabdovirus presente en líneas celulares Sf9.

Breve descripción de los dibujos

20

30

35

40

50

- Figura 1: Los productos amplificados se hicieron correr en un gel para verificar el tamaño.
- Figura 2: El inserto y el vector recortados se hicieron correr en un gel para verificar la linealización del vector.
- Figura 3: Los clones positivos de los pocillos 2, 5, 7, 10, 11 y 12 se secuenciaron, y los cóntigos se alinearon con la secuencia de referencia de la construcción para identificar mutaciones; todos los clones mostraron una coincidencia perfecta.
 - Figura 4: Transferencias Western para evaluar la expresión de la construcción de gen G.
 - Figura 5: Las fracciones de células sobrenadantes, solubles e insolubles se sondearon para identificar la proteína; en ese momento, la proteína estaba presente en la porción insoluble.
- Figura 6: Resultados de la ejecución de cromatografía de exclusión por tamaño mediante el uso de condiciones isocráticas en AKTA. La elución de proteínas de la columna se monitorizó con absorción UV a 280 nm.
 - Figura 7: Resultados de PCR en tiempo real: La columna 1 indica los números de pocillo. La columna 2 muestra el fluoróforo 6-carboxifluoresceína (FAM) ligado a la sonda específica utilizada. La columna 3 indica las fracciones de antígeno de SfRV derivadas de la cromatografía de exclusión por tamaño (fracciones A11, A12, B1, B5, B12 y C6) o los estándares con cantidades conocidas de ácido nucleico específico de SfRV utilizado para generar la curva estándar (pocillos 7 -14). El pocillo 15 es el control negativo (sin plantilla), y el pocillo 16 es el control positivo que contiene antígeno de SfRV concentrado antes del fraccionamiento por tamaño (SEC).
- Figura 8: ELISA; Las placas de ELISA se recubrieron con cuatro antígenos diferentes, que incluyen SfRV semipurificado (panel A), fracciones de exclusión por tamaño A11 (panel B), A12 (panel C) y B1 (panel D). Las placas se sondearon con sueros de animales de control negativo (triángulos invertidos) o sueros del Día 28 de

animales a los que se administró una vacuna experimental que contenía SfRV (círculos).

Descripción de la invención

5 La solución a los problemas técnicos anteriores se logra mediante la descripción y las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones.

Por ende, la invención en sus diferentes aspectos se implementa de acuerdo con las reivindicaciones.

10 La presente invención proporciona:

20

25

30

50

55

- (1) Un método para determinar si un individuo ha recibido una composición inmunogénica que comprende una proteína recombinante producida por un sistema de expresión de baculovirus en células cultivadas de *Spodoptera frugiperda* (Sf) o células cultivadas de una línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda*,
- en donde dicho método comprende determinar en una muestra biológica obtenida de dicho individuo la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para uno o más antígenos de un virus de ARN capaz de infectar células de *Spodoptera frugiperda* (Sf) o células de una línea celular obtenida de *Spodoptera frugiperda* en donde dicho virus de ARN es un virus que pertenece a la familia *Rhabdoviridiae*.
 - y en donde la presencia de dichos anticuerpos en dicha muestra biológica indica que dicho individuo ha recibido dicha composición inmunogénica.
 - (2) El método de (1), en donde dicho uno o más antígenos de un virus de ARN capaz de infectar células de insecto es una proteína que comprende o que consiste en una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1.
 - (3) El método de (1) o (2) que comprende las etapas de:
 - a. poner en contacto la muestra biológica con un reactivo de captura inmovilizado para un soporte sólido, en donde el reactivo de captura inmovilizado es capaz de unirse a dichos anticuerpos; y
 - b. determinar la presencia o ausencia de dichos anticuerpos unidos al reactivo de captura, en donde la presencia de dichos anticuerpos unidos al reactivo de captura es indicativo de la presencia de dichos anticuerpos en dicha muestra biológica.
- 35 (4) El método de (3), en donde dicho reactivo de captura se selecciona del grupo que consiste en:
 - a. una proteína que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 6;
- b. un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, en donde dicho virus de ARN es un virus que pertenece a la familia *Rhabdoviridiae*, y en donde opcionalmente dicho virus se ha inactivado y/o en donde dicho virus es opcionalmente un virus completo semipurificado.
 - (5) El método de una cualquiera de (1) a (4), en donde
- 45 dicho virus de ARN capaz de infectar células de insecto es un virus que comprende:
 - i. una proteína que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácido que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1; y/o
 - ii. una proteína que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:7; y/o
 - iii. dicho virus de ARN capaz de infectar células de insecto es un virus cuyo genoma comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende o que consiste en una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1: v/o
 - iv. una proteína que comprende o que consiste en una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:7; y/o
 - v. dicho virus de ARN capaz de infectar células de insecto es un virus cuyo genoma comprende una molécula de ARN que tiene una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:9;
 - vi. y/o una secuencia que es inversamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:15.
 - (6) El método de una cualquiera de (1) a (5) en donde dicho método comprende:
- determinar en dicha muestra biológica la presencia o ausencia de dicho uno o más marcadores, en donde dichos marcadores son anticuerpos específicos para una proteína que comprende o que consiste en una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1;

| y en donde dicho método compren | ide las etapas de: | | | | | |
|---------------------------------|--------------------|--|--|--|--|---------|
| | | | | | | , II. I |

- a. poner en contacto la muestra biológica con un reactivo de captura inmovilizado a un soporte sólido, en donde el reactivo de captura se selecciona del grupo que consiste en:
 - i. una proteína que comprende o que consiste en una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO:1 a 6,
 - ii. un virus opcionalmente inactivado que comprende una proteína que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1; y/o
 - iii. un virus cuyo genoma comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácido que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1 v/o
 - una proteína que comprende o que consiste en una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:7, en donde dicho virus opcionalmente se ha inactivado,
 - iv. un virus cuyo genoma comprende una molécula de ARN que comprende una secuencia que es inversamente complementaria con una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:9 y/o una secuencia que es inversamente complementaria con una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:15, en donde dicho virus opcionalmente se ha inactivado; y/o
 - v. un péptido sintético que tiene una secuencia seleccionada de las secuencias que consisten en 5 a 11 restos amino consecutivos de la SEQ ID NO:1; y
- b. separar la muestra biológica del reactivo de captura inmovilizado;

5

10

15

20

25

30

45

50

55

60

- c. poner en contacto el complejo reactivo de captura inmovilizado-anticuerpo con un agente detectable que se une al anticuerpo del complejo reactivo-anticuerpo; y
- d. medir el nivel de anticuerpo unido al reactivo de captura usando un medio de detección para el agente detectable.
- (7) El método de (6), en donde la etapa de medición (d) comprende además una comparación con una curva patrón para determinar el nivel de anticuerpo unido al reactivo de captura, y/o en donde dicho agente detectable que se une al anticuerpo del complejo reactivo-anticuerpo es un anticuerpo detectable, preferentemente un anticuerpo secundario marcado.
- (8) El método de una cualquiera de (3) a (7), en donde dicho reactivo de captura es una proteína expresada en baculovirus, y en donde dicha proteína expresada en baculovirus preferentementemente se expresa mediante un baculovirus recombinante, en donde dicho baculovirus comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína que comprende o que consiste en
 - una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 6; v/o
 - en donde dicho baculovirus comprende una secuencia de ADN que comprende o que consiste en: una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:9 a 14.
 - (9) El método de una cualquiera de (1) a (8) que comprende adicionalmente la etapa de determinar en dicha muestra biológica la presencia de uno o más analitos seleccionados del grupo que consiste en los anticuerpos específicos para dicha proteína recombinante, un polipéptido específico para dicha proteína recombinante, una secuencia de nucleótidos específica para la secuencia de ADN que codifica dicha proteína recombinante.
 - (10) El método de una cualquiera de (1) a (9), en donde dicha proteína recombinante se selecciona del grupo que consiste en proteína ORF2 de PCV2, en donde dicha proteína ORF2 de PCV2 es preferentemente una proteína que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:23; y hemaglutinina de la gripe, preferentemente hemaglutinina de la gripe aviar, en particular proteína H5 del virus H5N1, en donde dicha hemaglutinina de la gripe aviar o proteína H5 del virus H5N1 es preferentemente una proteína que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:24.
 - (11) El método de una cualquiera de (1) a (10), en donde dicha composición inmunogénica es

- una composición inmunogénica que comprende una proteína recombinante producida mediante un sistema de expresión de baculovirus en células de insecto cultivadas, y uno o más antígenos de un virus que es un virus de ARN capaz de infectar células de insecto o
- una composición inmunogénica que comprende una proteína recombinante producida por un sistema de expresión de baculovirus en células de insecto cultivadas, y uno o más antígenos de un virus que es un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, en donde dicho virus de ARN capaz de infectar células de insecto se ha inactivado,
- 10 y/o en donde dicha proteína recombinante se selecciona del grupo que consiste en:

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- a. una proteína ORF2 de PCV2 que comprende preferentemente o que consiste en una secuencia que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:23,
- b. hemaglutinina de la gripe, preferentemente hemaglutinina de la gripe aviar, en particular una proteína H5 del virus H5N1, en donde dicha hemaglutinina de la gripe aviar o proteína H5 del virus H5N1 es preferentemente una proteína que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:24; y
 - c. una proteína que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 8, y/o dicho virus de ARN capaz de infectar células de insecto es un virus que comprende una proteína que comprende o consiste en:
 - i. una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1; y/o
 - ii. una proteína que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:7; y/o

un virus de ARN capaz de infectar células de insecto y cuyo genoma comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende o que consiste en:

- i. una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1 y/o
- ii. una proteína que comprende o que consiste en una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:7: v/o

c.un virus de ARN capaz de infectar células de insecto cuyo genoma comprende:

- i. una molécula de ARN que tiene una secuencia que es inversamente complementaria con una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:9; y/o
- ii. una secuencia que es inversamente complementaria con una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 15;

y/o en donde la muestra biológica se ha aislado de un mamífero o un ave, preferentemente de un cerdo o un pollo, y/o en donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, plasma sanguíneo, suero, orina y fluidos orales, y/o en donde el reactivo de captura inmovilizado se usa para recubrir una placa de microtítulo.

- (12) Un kit para determinar si un individuo ha recibido una composición inmunogénica que comprende una proteína recombinante producida por un sistema de expresión de baculovirus en células cultivadas de *Spodoptera frugiperda* (Sf) o células de una línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda* en donde dicho kit contiene uno o más reactivos de captura inmovilizados para un soporte sólido, en donde los uno o más reactivos de captura inmovilizados son capaces de la unión de anticuerpos específicos para uno o más antígenos de un virus de ARN capaz de infectar células de *Spodoptera frugiperda* (Sf) o células de una línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda*, en donde dicho virus de ARN es un virus que pertenece a la familia *Rhabdoviridiae*, y en donde dichos uno o más reactivos de captura se seleccionan del grupo que consiste en:
 - a. una proteína que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70
 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a
 6;
 - b. un virus de ARN capaz de infectar células de Spodoptera frugiperda (Sf) o células de una línea celular

| | derivada de <i>Spodoptera frugiperda</i> , en donde dicho virus de ARN es un virus que pertenece a la familia <i>Rhabdoviridiae</i> , y en donde dicho virus se ha inactivado. |
|---------|--|
| 5 | (13) El kit de (12), en donde dicho virus de ARN comprende o consiste en: |
| 5 | a. un virus de ARN capaz de infectar células de insecto que comprende una proteína que comprende o que consiste en: |
| 10 | i. una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1; y/o |
| | ii. una proteína que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:7; y/o |
| 15 | b. un virus de ARN capaz de infectar célula de insecto cuyo genoma comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende o que consiste en: |
| 20 | i. una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID $NO:1; y/o$ |
| 20 | ii. una proteína que comprende o que consiste en una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:7; y/o |
| 25 | c. un virus de ARN capaz de infectar células de insecto cuyo genoma comprende: |
| 20 | i. una molécula de ARN que tiene una secuencia que es inversamente complementaria con una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:9; y/o |
| 30 | ii. una secuencia que es inversamente complementaria con una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:15. |
| 25 | (14) El kit de una cualquiera de (12) o (13), en donde dichos uno o más antígenos de un virus de ARN capaz de infectar células de insecto es una proteína que comprende o que consiste en una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1. |
| 35 | (15) El método de una cualquiera de (1) a (11), o el kit de una cualquiera de (12) a (14), en donde dichas células de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf) o células de una línea celular derivada de <i>Spodoptera frugiperda</i> se seleccionan del grupo que consiste en células Sf9 y células Sf+. |
| 40 | (16) El método de una cualquiera de (3) a (11) o (15), o el kit de una cualquiera de (12) a (15), en donde dicho reactivo de captura comprende o consiste en partículas víricas y/o partículas de tipo virus de un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, y en donde dicha composición o dicho reactivo de captura se puede obtener mediante un método que comprende las etapas de |
| 45 | i) obtener sobrenadante de un cultivo de células de insecto infectadas con un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, en donde dicho sobrenadante comprende partículas víricas y/o partículas de tipo virus del virus de ARN, y en donde dichas células de insecto infectadas con un virus de ARN capaz de infectar células de insecto preferentemente no están infectadas con un baculovirus y/o preferentemente no están transfectadas con un plásmido. |
| 50 | están transfectadas con un plásmido, |
| <i></i> | ii) separar los restos de células de dichas partículas víricas y/o partículas de tipo virus mediante una etapa de separación que incluye una microfiltración a través de al menos un filtro, preferentemente dos filtros, en donde al menos un filtro tiene preferentemente un tamaño de poro mayor que dichas partículas víricas y/o partículas de tipo virus, en particular, que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,1 mm a |
| 55 | aproximadamente 4 mm, preferentemente de aproximadamente 0,2 mm a aproximadamente 2 mm, |
| | iii) y, opcionalmente, someter al filtrado de ii) que contiene dichas partículas víricas y/o partículas de tipo virus a cromatografía de exclusión por tamaño, en donde la presencia de proteína en el eluyente se mide midiendo la absorbancia de la luz a 260 nm o 280 nm (A ₂₆₀ o A ₂₈₀), y en donde preferentemente se recolecta |

7

a. un virus de ARN capaz de infectar células de insecto que comprende una proteína que comprende o que

el eluyente que presenta el primer pico de A260 o A280.

(17) El kit o el método de (16), en donde dicho virus de ARN comprende o consiste en:

60

65

consiste en:

- i. una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1; y/o
- ii. una proteína que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:7; y/o
- b. un virus de ARN capaz de infectar células de insecto cuyo genoma comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende o que consiste en:
- i. una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1; y/o
 - ii. una proteína que comprende o que consiste en una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:7; y/o
- c. un virus de ARN capaz de infectar células de insecto cuyo genoma comprende:

5

10

15

- i. una molécula de ARN que tiene una secuencia que es inversamente complementaria con una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:9; y/o
- ii. una secuencia que es inversamente complementaria con la secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:15.
- La invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que el uso de células Sf+, infectadas con un rhabdovirus, para producir antígenos expresados por baculovirus permite la producción eficaz y económica de vacunas marcadoras positivas, y una marca de cumplimiento fácil e inherente a la producción que permite un método sensible que muestra la administración adecuada de la vacuna subunitaria.
- En un primer aspecto, por ende, la divulgación proporciona un método para determinar si un individuo recibió una composición inmunógena, en particular, una vacuna, que comprende una proteína recombinante producida por un sistema de expresión, preferentemente, por un sistema de expresión de baculovirus, en células de insecto cultivadas, en donde el método comprende las etapas de: obtener una muestra biológica de un individuo; y determinar en la muestra biológica la presencia o ausencia de uno o más marcadores que muestran que el individuo recibió uno o más antígenos de un virus que es un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, en donde la presencia de uno o más marcadores en la muestra biológica indica que el individuo recibió la composición inmunógena, o en donde la ausencia de uno o más marcadores en la muestra biológica indica que el individuo no recibió la composición inmunógena.
- 40 Como se usa en la presente, la expresión "proteína recombinante" se refiere particularmente a una molécula de proteína que se expresa de una molécula de ADN recombinante, tal como un polipéptido que se produce mediante técnicas de ADN recombinante. Un ejemplo de estas técnicas incluye el caso donde el ADN que codifica la proteína expresada se inserta en un vector de expresión adecuado, preferentemente, un vector de expresión de baculovirus, que, a su vez, se usa para transfectar o, en el caso de un vector de expresión de baculovirus, para infectar una célula hospedadora para producir la proteína o el polipéptido codificados por el ADN. Como se usa en la presente, por lo tanto, la expresión "proteína recombinante" se refiere particularmente a una molécula de proteína que se expresa de una molécula de ADN recombinante.
- De acuerdo con un ejemplo particular, la proteína recombinante se produce mediante un método con las siguientes etapas: el gen que codifica la proteína se clona en un vector de transferencia de baculovirus; el vector de transferencia se usa para preparar el baculovirus recombinante que contiene dicho gen mediante recombinación homóloga en células de insecto; y la proteína luego se expresa en células de insecto durante la infección con el baculovirus recombinante.
- De acuerdo con un ejemplo alternativo, la proteína recombinante se expresa en células de insecto de un plásmido de expresión recombinante. En el caso de este ejemplo alternativo, no se necesita baculovirus.
- También se entiende que la expresión "proteína recombinante que consiste en una secuencia" también se refiere particularmente a cualquier modificación durante la traducción y/o después de la traducción de la secuencia afectada por la célula en la que se expresa el polipéptido. Por lo tanto, la expresión "proteína recombinante que consiste en una secuencia", como se describe en la presente, también se refiere a la secuencia que tiene una o más modificaciones realizadas por la célula en la que se expresa el polipéptido, en particular, modificaciones de residuos de aminoácidos realizadas en la biosíntesis de proteínas y/o el procesamiento de proteínas, preferentemente, seleccionadas del grupo que consiste en glucosilaciones, fosforilaciones y acetilaciones.
 - Preferentemente, la proteína recombinante de la presente divulgación se produce o se puede obtener mediante un

sistema de expresión de baculovirus, en particular, en células de insecto cultivadas.

5

10

15

20

25

30

45

50

Como se usa en la presente, la expresión "sistema de expresión" incluye particularmente vehículos o vectores para la expresión de un gen en una célula hospedadora, así como vehículos o vectores que producen una integración estable de un gen en el cromosoma hospedador.

Como se usa en la presente, "sistema de expresión de baculovirus" significa, en particular, un sistema para producir una proteína deseada en una célula de insecto usando un vector de baculovirus recombinante diseñado para expresar dicha proteína. Un sistema de expresión de baculovirus generalmente comprende todos los elementos necesarios para lograr la expresión de proteínas recombinantes en células de insecto y, en general, implica la modificación por ingeniería genética de un vector de baculovirus para expresar una proteína deseada, la introducción del vector de baculovirus modificado por ingeniería genética en células de insecto, el cultivo de células de insecto que contienen el vector de baculovirus modificado por ingeniería genética en un medio de cultivo adecuado de modo que se exprese la proteína deseada, y la recuperación de la proteína. En general, la modificación por ingeniería genética de un vector de baculovirus implica la construcción y el aislamiento de baculovirus recombinantes en los que la secuencia de codificación para un gen elegido se inserta detrás del promotor para un gen viral no esencial, en donde la mayoría de los sistemas de expresión de baculovirus utilizados en la presente se basan en la secuencia del virus de la poliedrosis nuclear Autographa californica (AcMNPV) ((Virology 202 (2), 586-605 (1994), N.º de acceso de NCBI: NC 001623). Los sistemas de expresión de baculovirus se conocen en el estado de la técnica y se describieron, por ejemplo, en "Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual" de David R. O'Reilly, Lois Miller, Verne Luckow, pub. de Oxford Univ. Press (1994), "The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide" de Linda A. King, R. D. Possee, publicado por Chapman & Hall (1992). Un ejemplo no limitativo de un sistema de baculovirus para producir una proteína recombinante se describe, por ejemplo, en el documento WO 2006/072065 A2.

De acuerdo con el primer aspecto, la presente divulgación, por lo tanto, proporciona un método para determinar si un individuo recibió una composición inmunógena que comprende una proteína recombinante producida mediante un sistema de expresión en células de insecto cultivadas, en donde el método también se denomina "el método de la presente divulgación" en adelante, en donde el método comprende particularmente determinar en una muestra biológica obtenida de dicho individuo la presencia o ausencia de uno o más marcadores que muestran que el individuo recibió uno o más antígenos de un virus, que es un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, y en donde la presencia de uno o más marcadores en la muestra biológica indica que el individuo recibió la composición inmunógena.

Como se usa en la presente, "célula de insecto" significa una célula o un cultivo celular derivado de una especie de insecto. Las células de insecto derivadas de las especies *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni* son de particular interés con respecto a la presente invención.

Como se usa en la presente, un "virus capaz de infectar células de insecto" se entiende particularmente como un virus que alberga estructuras en la superficie viral que son capaces de interactuar con las células de insecto en tal medida que el virus, o al menos el genoma viral, se incorpora en la célula de insecto.

La infección de una célula de insecto incluye, más en particular, la unión del virus a una célula hospedadora, el ingreso del virus a la célula, la eliminación de la envoltura del virión en el citoplasma, la replicación y transcripción del genoma viral, la expresión de proteínas virales y el ensamblaje y la liberación de nuevas partículas virales infecciosas.

Preferentemente, la composición inmunógena de la presente divulgación es una vacuna marcadora, en particular, una vacuna marcadora positiva.

Como se describe en la presente, la expresión "vacuna marcadora" especifica, en particular, una vacuna que produce una inmunización en el organismo inmunizado, que difiere de la inmunización del organismo causado por el patógeno real.

Una "vacuna marcadora positiva" se refiere, en particular, a una vacuna marcadora que contiene un antígeno adicional que induce la producción de anticuerpos específicos presentes en individuos vacunados, pero no en individuos infectados.

Como se usa en el contexto de la presente divulgación, el término "marcador" es preferentemente equivalente al término "biomarcador", y en particular, se refiere a una sustancia o un compuesto medibles que indican que un individuo se expuso a una composición inmunógena, preferentemente, a una vacuna marcadora positiva o, más en particular, al antígeno adicional de una vacuna marcadora positiva que induce la producción de anticuerpos específicos que se encuentran en sujetos vacunados, pero no en sujetos infectados.

65 Como se usa en la presente, la expresión "composición inmunógena" se refiere, en particular, a una composición que provocará una respuesta inmunitaria en un individuo que se expuso a la composición. Una respuesta inmunitaria

puede incluir inducción de anticuerpos y/o inducción de una respuesta de linfocitos T. Según cuál sea la función que se pretende de la composición, se pueden incluir uno o más antígenos. Preferentemente, la composición inmunógena descrita en la presente es una vacuna.

5 Como se usa en la presente, el término "vacuna" se define de acuerdo con el estado de la técnica pertinente y se refiere a una composición que induce o mejora la inmunidad de un individuo a una enfermedad particular. Con este fin, la vacuna comprende un compuesto que es similar al patógeno o un compuesto de dicho patógeno que provoca la enfermedad. Al entrar en contacto con este compuesto, se genera que el sistema inmunitario del individuo reconozca el compuesto como extraño y lo destruya. Posteriormente, el sistema inmunitario recuerda el contacto con este compuesto, de modo que, en un contacto posterior con el patógeno que causa la enfermedad, se garantice el 10 reconocimiento y la destrucción fáciles y eficaces del patógeno. De acuerdo con la presente divulgación, la vacuna puede estar en cualquier formulación para vacunas conocidas en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo, vacunas para inyección intramuscular, vacunas mucosas o vacunas para inyección subcutánea o intradérmica, así como vacunas para inhalación, tales como, p. ej., aerosoles. Las formulaciones vacunales se conocen en el estado 15 de la técnica y se describieron, por ejemplo, en Neutra MR et al. 2006 Mucosal vaccines: the promise and the challenge 6(2): 148-58 o F. P. Nijkamp, Michael J. Parnham 2011; Principles of Immunopharmacology ISBN-13: 978-3034601351

Por lo tanto, el método de la presente invención es, en particular, un método para determinar si un individuo recibió una composición inmunógena que comprende una proteína recombinante producida mediante un sistema de expresión de baculovirus en células de insecto cultivadas, en donde el método comprende determinar en una muestra biológica obtenida de dicho individuo la presencia o ausencia de uno o más marcadores que muestran que el individuo recibió uno o más antígenos de un virus que es un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, y en donde la presencia de uno o más marcadores en la muestra biológica indica que el individuo recibió la composición inmunógena.

Preferentemente, la muestra biológica se obtiene del individuo al menos 14 días después y, con máxima preferencia, 14 a 35 días después del día en que el individuo se vacunó o, respectivamente, se supone que se vacunó.

Preferentemente, la célula de insecto, como se mencionó en la presente, es una célula de *Spodoptera frugiperda* (Sf) o una célula de una línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda* y, con mayor preferencia, se selecciona del grupo que consiste en célula Sf9 y célula Sf+. Respectivamente, las células de insecto, como se mencionó en la presente, son preferentemente células de *Spodoptera frugiperda* (Sf) o células de una línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda* y, con mayor preferencia, se seleccionan del grupo que consiste en células Sf9 y células Sf+.

Uno o más marcadores que muestran que el individuo recibió uno o más antígenos de un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, como se menciona en la presente, que también se denominan "uno o más marcadores de la presente divulgación" en adelante, son, preferentemente, uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en: anticuerpos específicos para uno o más antígenos de un virus que es un virus de ARN capaz de infectar células de insecto; uno o más antígenos de un virus que es un virus de ARN capaz de infectar células de insecto; y una o más moléculas de ácidos nucleicos específicas para un virus de ARN capaz de infectar células de insecto.

Con máxima preferencia, uno o más marcadores de la presente divulgación son anticuerpos específicos para un antígeno de un virus que es un virus de ARN capaz de infectar las células de insecto.

Preferentemente, los anticuerpos descritos en la presente son anticuerpos policionales.

35

40

45

50

55

60

65

Como se usa en la presente, la expresión "anticuerpos específicos para" un antígeno definido se refiere, en particular, a anticuerpos, preferentemente anticuerpos policionales, que se fijan a un antígeno con una afinidad o K_a (es decir, una constante de asociación de equilibrio de una interacción de fijación particular con unidades de 1/M), por ejemplo, mayor o igual a alrededor de $10^5 \, \text{M}^{-1}$, $10^6 \, \text{M}^{-1}$, $10^7 \, \text{M}^{-1}$, $10^9 \, \text{M}^{-1}$, $10^{10} \, \text{$

Uno o más antígenos de un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, como se menciona en la presente, que también se denominan "uno o más antígenos de acuerdo con la presente divulgación" en adelante, son preferentemente una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1 y/o una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7.

Con respecto a la expresión "al menos 90 %", como se menciona en el contexto de la presente divulgación, se entiende que la expresión se refiere, preferentemente, a "al menos 91 %", con mayor preferencia, a "al menos 92 %", aun con mayor preferencia, a "al menos 93 %" o, en particular, a "al menos 94 %".

Con respecto a la expresión "al menos 95 %", como se mencionó en el contexto de la presente divulgación, se entiende que la expresión se refiere, preferentemente, a "al menos 96 %", con mayor preferencia, a "al menos 97 %", aun con mayor preferencia, a "al menos 98 %" o, en particular, a "al menos 99 %".

Como se usa en la presente, la expresión "que tiene 100 % de identidad de secuencia" es equivalente a la expresión "que es idéntica".

10

40

45

50

55

60

65

Como se usa en la presente, la expresión "antígeno" se refiere, en particular, a cualquier molécula, porción o entidad capaz de provocar una respuesta inmunitaria. Esto incluye respuestas inmunitarias celulares y/o humorales.

15 El porcentaje de identidad de secuencia tiene un significado reconocido en el estado de la técnica, y existen varios métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polipéptidos o polinucleótidos. Véanse, por ejemplo, Lesk, Ed., Computational Molecular Biology, Oxford University Press, Nueva York, (1988); Smith, Ed., Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Academic Press, Nueva York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., Computer Analysis Of Sequence Data, Part I, Humana Press, Nueva Jersey, (1994); von Heinje, Sequence Analysis In Molecular Biology, 20 Academic Press, (1987); y Gribskov & Devereux, Eds., Sequence Analysis Primer, M Stockton Press, Nueva York, (1991). Los métodos para alinear polinucleótidos o polipéptidos se codifican en programas informáticos, que incluyen el paquete de programas GCG (Devereux et al., Nuc. Acids Res. 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul et al., J. Molec. Biol. 215:403 (1990)) y el programa Bestfit (paquete de análisis de secuencias Wisconsin, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711) que usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. App. Math., 2:482-489 (1981)). Por ejemplo, se 25 puede usar el programa informático ALIGN que usa el algoritmo FASTA, con una búsqueda de espacios afines con una penalización por apertura de espacios de −12 y una penalización por extensión de espacios de −2. A los fines de la presente invención, las secuencias de nucleótidos se alinean usando el método Clustal W en el software MegAlign versión 11.1.0 (59), 419 de DNASTAR Inc. usando los parámetros de alineación múltiple por defecto establecidos en el programa (penalización por espacio =15,0, penalización por longitud del espacio =6,66, secuencia 30 divergente de retardo (%)= 30 %, peso de transición del ADN =0,50 y matriz de peso del ADN = IUB) y, respectivamente, las secuencias de proteínas/aminoácidos se alinean usando el método Clustal W en el software MegAlign versión 11.1.0 (59), 419 de DNASTAR Inc. usando los parámetros de alineación múltiple por defecto establecidos en el programa (matriz del peso de proteínas, serie Gonnet, con penalización por espacio =10.0. 35 penalización por longitud del espacio =0,2, y secuencia divergente de retardo (%)= 30 %).

Como se usa en la presente, se entiende en particular que la expresión "identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:X" es equivalente a la expresión "identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:X a lo largo de SEQ ID NO: X" o a la expresión "identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:X a lo largo de toda la SEQ ID NO: X", respectivamente. En este contexto, "X" es cualquier número entero seleccionado de 1 a 24, de modo que "SEQ ID NO: X" representa cualquiera de las SEQ ID NO mencionadas en la presente.

Una o más moléculas de ácidos nucleicos específicas de un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, como se menciona en la presente, que también se denominan "una o más moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente divulgación" en adelante, son, preferentemente, una molécula de ácido nucleico que codifica: una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 1; y/o una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7; y/o un ARN que tiene una secuencia que es complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:9; y/o una secuencia que es complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia de SEQ ID NO:15.

Preferentemente, el método de la presente invención comprende las etapas de: poner en contacto la muestra biológica con un reactivo de captura inmovilizado en un soporte sólido, en donde el reactivo de captura inmovilizado es capaz de fijar uno o más marcadores de la presente invención; y determinar la presencia o ausencia de uno o más marcadores unidos al reactivo de captura, en donde la presencia de uno o más marcadores unidos al reactivo de captura indica la presencia de uno o más marcadores en la muestra biológica.

Como se usa en la presente, la expresión "reactivo de captura" se refiere, en particular, a una molécula o a un complejo multimolecular que se puede fijar a un marcador. Con preferencia, el reactivo de captura es capaz de fijar el marcador de manera sustancialmente específica, preferentemente, con una afinidad o K_a > 10⁵ M⁻¹ o,

preferentemente, > 10⁶ M⁻¹. El reactivo de captura puede ser opcionalmente una biomolécula natural, recombinante o sintética. Las proteínas y los ligandos de ácidos nucleicos (aptámeros) son altamente adecuados como agentes de captura. Un virus completo o un fragmento de virus o un péptido sintético también pueden funcionar como reactivos de captura preferidos, ya que son capaces de fijar anticuerpos.

Como se usa en la presente, el término "inmovilizado" significa, en particular, que el reactivo de captura puede estar unido a una superficie (por ejemplo, el soporte sólido) de cualquier manera o en cualquier método; lo que incluye, por ejemplo, fijación reversible o no reversible, unión covalente o no covalente, y similares.

5

25

30

35

40

45

50

55

60

65

El reactivo de captura mencionado en la presente como inmovilizado en un soporte sólido y capaz de fijar uno o más marcadores de la presente divulgación, en donde el reactivo de captura también se denomina "reactivo de captura de acuerdo con la presente divulgación" en adelante, se selecciona preferentemente del grupo que consiste en: una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 6; una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8; un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, en donde el virus se inactivó opcionalmente; un oligonucleótido que es capaz de hibridación específica con secuencias características de la secuencia SEQ ID NO:9; y un oligonucleótido que es capaz de hibridación específica con secuencias características de la secuencia SEQ ID NO:15.

Como se describe en la presente, la expresión "hibridación específica" se refiere, en particular, a la hibridación en condiciones rigurosas. Las condiciones de hibridación se pueden establecer de acuerdo con protocolos convencionales descritos, por ejemplo, en Sambrook, "Molecular Cloning, A Laboratory Handbook", 2.ª edición (1989), CSH Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989); o Higgins and Hames (eds) "Nucleic acid hybridization, a practical approach" IRL Press Oxford, Washington DC (1985). Un ejemplo de las condiciones de hibridación específica es la hibridación en 4×SSC y 0,1 % de SDS a 65 °C. De manera alternativa, las condiciones de hibridación rigurosas son, por ejemplo, 50 % de formamida, 4×SSC a 42 °C.

Como se menciona en la presente, la expresión "soporte sólido" indica una sustancia no fluida e incluye chips, recipientes y partículas (que incluyen micropartículas y microesferas) a base de materiales, tales como polímero, metal (partículas paramagnéticas, ferromagnéticas), vidrio y cerámica; sustancias en gel, tales como sílice, alúmina y geles poliméricos; capilares, que pueden ser a base de polímero, metal, vidrio y/o cerámica; zeolitas y otras sustancias porosas; electrodos; placas de microtitulación; tiras sólidas; y cubetas, tubos u otros recipientes de muestras de espectrómetro. Un componente de soporte sólido de un ensayo se distingue de superficies sólidas inertes con las que el ensayo puede estar en contacto en que un "soporte sólido" contiene al menos una porción en su superficie, que debe interactuar con el reactivo de captura, ya sea de manera directa o indirecta. Un soporte sólido puede ser un componente fijo, tal como un tubo, una tira, una cubeta o una placa de microtitulación, o puede ser un componente no fijo, tal como microesferas y micropartículas. Las micropartículas también se pueden usar como un soporte sólido para formatos de ensayos homogéneos. Se puede usar una variedad de micropartículas que permiten la unión no covalente o covalente de proteínas y otras sustancias. Estas partículas incluyen partículas poliméricas, tales como poliestireno y poli(metilmetacrilato); partículas de oro, tales como nanopartículas de oro y coloides de oro; y partículas de cerámica, tales como partículas de sílice, vidrio y óxido metálico. Véase, por ejemplo, Martin, C.R., et al., Analytical Chemistry-News & Features 70 (1998) 322A-327A.

Un "chip" es un material sólido no poroso, tal como metal, vidrio o plásticos. El material puede estar opcionalmente recubierto en su totalidad o en determinadas áreas. En la superficie del material se presenta cualquier tipo de manchas, ya sean visibles o en coordenadas. En cada mancha, se puede inmovilizar un polipéptido definido, con o sin ligador o espaciador a la superficie del material.

Como se menciona en la presente, el virus de ARN capaz de infectar células de insecto, que también se denomina "el virus de ARN de acuerdo con la presente invención" en adelante, es preferentemente: un virus de (-)ARNmc y es, opcionalmente, un virus que pertenece a la familia Rhabdoviridiae; y/o un virus que comprende una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1; y/o una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1; y/o una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, preferentemente o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 90 %

ID NO:7; y/o un virus cuyo genoma comprende una molécula de ARN que tiene una secuencia que es complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:9; y/o una secuencia que es complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:15.

Todas las secuencias de nucleótidos del listado de secuencias se escriben en dirección 5' - '3. Las secuencias de SEQ ID NO 9 y 15 codifican ADNc que tienen una polaridad positiva (cadena +). La expresión "complementaria inversa" significa que la secuencia es antiparalela a la secuencia de referencia.

5

15

20

25

30

35

40

45

50

60

El virus de ARN de acuerdo con la presente invención es preferentemente capaz de replicarse durante al menos dos o, con mayor preferencia, al menos tres semanas en una línea celular de insecto.

Preferentemente, el método de la presente divulgación comprende determinar, en la muestra biológica, la presencia o ausencia de uno o más marcadores de la presente divulgación, en donde los marcadores son anticuerpos específicos para una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1; o anticuerpos específicos para una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7; y en donde el método comprende las etapas de:

- a. poner en contacto la muestra biológica con un reactivo de captura inmovilizado en un soporte sólido, en donde el reactivo de captura se selecciona del grupo que consiste en una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 6, o una secuencia que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8, un virus opcionalmente inactivado que comprende una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1: y/o una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7, un virus cuvo genoma comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1; y/o una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7, en donde el virus se inactivó opcionalmente, un virus cuyo genoma comprende una molécula de ARN que comprende una secuencia que es complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:9; y/o una secuencia que es complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:15, en donde el virus se inactivó opcionalmente.
- b. separar la muestra biológica del reactivo de captura inmovilizado;
- 55 c. poner en contacto el complejo anticuerpo-reactivo de captura inmovilizado con un agente detectable que se fija al anticuerpo del complejo anticuerpo-reactivo; y
 - d. medir el nivel de anticuerpo unido al reactivo de captura usando un medio de detección para el agente detectable, y en donde la etapa de medición (d) preferentemente también comprende una comparación con una curva estándar para determinar el nivel de anticuerpo unido al reactivo de captura.

Preferentemente, el agente detectable que se fija al anticuerpo del complejo anticuerpo-reactivo es un anticuerpo detectable, con mayor preferencia, un anticuerpo secundario etiquetado.

65 El reactivo de captura, como se describe en la presente, es preferentemente una proteína expresada por baculovirus, y esta proteína expresada por baculovirus es preferentemente expresada por el baculovirus de la

presente divulgación, que se describe en la presente más adelante.

5

10

20

25

30

40

65

De acuerdo con otro aspecto preferido de la divulgación, uno o más marcadores de la presente divulgación también pueden ser uno o más linfocitos T específicos para el virus de ARN de acuerdo con la divulgación y/o uno o más linfocitos B específicos para el virus de ARN de acuerdo con la divulgación y/o una o más células que presentan antígenos que tienen uno o más antígenos de acuerdo con la presente divulgación. La presencia o ausencia de uno o más linfocitos B y/o uno o más linfocitos T y/o una o más células que presentan antígenos se determina, preferentemente, por medio de un análisis de citometría de flujo, y en donde se usan, en particular, uno o más antígenos etiquetados por fluorescencia de acuerdo con la presente divulgación para etiquetar uno o más linfocitos B y/o uno o más linfocitos T, y/o en donde uno o más anticuerpos etiquetados por fluorescencia específicos contra el virus de ARN de acuerdo con la presente divulgación se usan para etiquetar una o más células que presentan antígenos.

La proteína recombinante producida mediante un sistema de expresión en células de insecto cultivadas, como se menciona en la presente, que también se denomina "proteína recombinante de la presente divulgación" en adelante, es preferentemente la proteína ORF2 de PCV2, y esta proteína ORF2 de PCV2 es, en particular, una proteína que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 91 %, con mayor preferencia, al menos 92 %, aun con mayor preferencia, al menos 93 % o, en particular, al menos 94 % o al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:23.

De acuerdo con otro aspecto preferido, la proteína recombinante de la presente divulgación es hemaglutinina de la gripe, en particular, hemaglutinina de la gripe aviar, en donde la hemaglutinina de la gripe aviar es, preferentemente, la proteína H5 del virus H5N1, y en donde la proteína H5 del virus H5N1 es, con mayor preferencia, una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:24.

El método de la presente divulgación también comprende preferentemente la etapa de determinar, en la muestra biológica, la presencia de uno o más analitos seleccionados del grupo que consiste en: anticuerpos específicos para la proteína recombinante de la presente divulgación, un polipéptido específico para la proteína recombinante de la presente divulgación, una secuencia de nucleótidos específica para la secuencia de ADN que codifica la proteína recombinante de la presente divulgación.

Dentro del contexto del método de la presente divulgación, la composición inmunógena es preferentemente la composición inmunógena como se describe más adelante.

La expresión "muestra biológica", como se usa en la presente, se refiere a cualquier muestra que se toma de un individuo (por ejemplo, de un cerdo o un ave) e incluye, entre otros, fluidos corporales que contienen células, sangre periférica, plasma o suero sanguíneos, saliva, homogeneizados tisulares, aspirados pulmonares y de otros órganos, y soluciones de lavado y enema, y cualquier otra fuente que se pueda obtener de un sujeto humano o animal. Para los animales, los ejemplos de una "muestra biológica" incluyen sangre, células, heces, diarrea, leche, mucosidad, flema, pus, saliva, semen, sudor, lágrimas, orina, fluidos oculares, secreciones vaginales y vómito, si se presentan en el animal.

- La muestra biológica, como se denomina en la presente, se aisló preferentemente de un mamífero o un ave, preferentemente de un cerdo o pollo (*Gallus gallus domesticus*), y/o se selecciona, en particular, del grupo que consiste en sangre, plasma sanguíneo, suero, orina y fluidos orales. En la presente, el término "suero" es equivalente a "suero sanguíneo".
- La expresión "fluidos orales", como se usa en la presente, se refiere en particular a uno o más fluidos encontrados en la cavidad oral de manera individual o en combinación. Estos incluyen, entre otros, saliva y trasudado mucoso. Se entiende, en particular, que los fluidos orales pueden comprender una combinación de fluidos de diversas fuentes (por ejemplo, glándulas parótidas, submandibulares, sublinguales y accesorias, mucosa gingival y mucosa bucal), y la expresión "fluidos orales" incluye los fluidos de cada una de estas fuentes de manera individual o en combinación. El término "saliva" se refiere a una combinación de fluidos orales, tales como los que se encuentran generalmente en la boca, en particular después de masticar. La expresión "transudado mucoso", como se usa en la presente, se refiere a un fluido producido por la difusión pasiva de componentes séricos de intersticios mucosos orales en la cavidad oral. Con frecuencia, el transudado mucoso forma un componente de saliva.
- 60 El reactivo de captura inmovilizado, como se describe en la presente, está preferentemente recubierto en una placa de microtitulación, en particular, en una placa de microtitulación capaz de ser leída por un lector ELISA.

De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un baculovirus recombinante, en donde el baculovirus comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la

secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 6; y/o una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8; y/o en donde el baculovirus comprende una secuencia de ADN que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 9 a 14; y/o una secuencia que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16.

10

15

20

45

50

55

60

65

La presente divulgación también proporciona un vector, en particular, un vector de transferencia, que contiene una secuencia de ADN que codifica una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 6; y/o una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8; y/o que contiene una secuencia de ADN que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de Cualquiera de SEQ ID NO: 9 a 14; y/o una secuencia de ADN que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con

El vector de transferencia dentro del contexto de la divulgación es, preferentemente, un "vector de transferencia de baculovirus".

La expresión "vector de transferencia" se conoce en el estado de la técnica y se refiere a una primera molécula de ácido nucleico a la que se unió un segundo ácido nucleico, e incluye, por ejemplo, plásmidos, cósmidos o fagos.

En algunos aspectos, un vector de transferencia puede ser un "vector de expresión", que se refiere a una construcción de ADN replicable utilizado para expresar el ADN que codifica la proteína deseada y que incluye una unidad de transcripción que comprende un ensamblaje de (i) elementos genéticos que tienen una función reguladora en la expresión génica, por ejemplo, promotores, operadores o mejoradores, ligados operativamente a (ii) una secuencia de ADN que codifica una proteína deseada que se transcribe en ARNm y se traduce en la proteína, y (iii) secuencias adecuadas de iniciación y terminación de la transcripción y la traducción. La elección del promotor y otros elementos reguladores generalmente varía según la célula hospedadora prevista. En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante suelen estar en forma de "plásmidos", que se refieren a los bucles de ADN bicatenario circular que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma. Se entiende que la divulgación incluye otras formas tales de vectores de expresión que cumplen funciones equivalentes y que posteriormente se dan a conocer en el estado de la técnica.

Algunos vectores de transferencia pueden contener elementos reguladores para controlar la transcripción o traducción, que pueden derivar, en general, de genes de mamíferos, microbios, virus o insectos. También se puede incorporar la capacidad de replicarse en un hospedador, en general conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes.

En algunos aspectos de la presente divulgación, se pueden usar los vectores de transferencia derivados de virus, que se pueden denominar "vectores virales". Algunos ejemplos incluyen baculovirus, retrovirus, adenovirus y similares. Los vectores virales, en particular, los vectores de baculovirus, por ejemplo, un vector de transferencia de baculovirus, se prefieren particularmente de acuerdo con la presente divulgación. Con respecto a los vectores de expresión, los vectores virales pueden incluir elementos reguladores.

El diseño de cualquier vector de transferencia puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se debe transformar y/o el tipo de proteína que se desea expresar. Asimismo, también se pueden considerar el número de copias del vector, la capacidad de controlar dicho número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores de antibióticos (por ejemplo, ampicilina).

Aun en otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición inmunógena, que también se denomina "la composición inmunógena de la presente divulgación" en adelante, en donde la composición comprende una proteína recombinante producida por un sistema de expresión de baculovirus en células de insecto cultivadas; y uno o más antígenos del virus de ARN de acuerdo con la presente divulgación, en donde el virus preferentemente se inactivó; y en donde la proteína recombinante se selecciona preferentemente del grupo que consiste en una proteína ORF2 de PCV2 que, preferentemente, comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90 %, preferentemente, al menos 91 %, con mayor preferencia, al menos 92 %, aun con mayor preferencia, al menos 93 % o, en particular, al menos 94 % o al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:23; y hemaglutinina de la gripe, en particular, hemaglutinina de la gripe aviar, preferentemente, la proteína H5 del virus

H5N1, con mayor preferencia, una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:24; y una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO:1 a 8.

El término "inactivado", como se usa en la presente, significa que el antígeno no provoca la enfermedad cuando se administra a un hospedador de mamífero o no se replica en una célula hospedadora.

10

15

20

5

En el estado de la técnica se conocen distintos métodos de inactivación físicos y químicos. El término "inactivado" se refiere a un virus previamente virulento o no virulento, que es irradiado (con radiación ultravioleta (UV), rayos X, haz de electrones o rayos gamma), calentado o tratado químicamente para ser inactivado, o suprimido, a la vez que mantiene su inmunogenicidad. En una forma de realización, el virus inactivado descrito en la presente se inactiva mediante el tratamiento con un agente de inactivación. Los agentes de inactivación adecuados incluyen beta-propiolactona, etilenimina binaria, o beta- o acetil-etilenimina, gluteraldehído, ozono y formalina (formaldehído).

Para la inactivación mediante formalina o formaldehído, generalmente se mezcla formaldehído con agua y alcohol de metilo para crear la formalina. La adición de alcohol de metilo evita la degradación o la reacción cruzada durante el proceso de activación.

Más en particular, el término "inactivado" significa que el virus es incapaz de replicarse *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, el término "inactivado" puede referirse a un virus que se ha propagado *in vitro*, y que después se ha desactivado mediante el uso de medios químicos o físicos para que ya no pueda replicarse.

25

Preferentemente, el virus de acuerdo con la presente divulgación que se ha inactivado es un virus inactivado con etilenimina binaria (BEI).

30

La presente divulgación también proporciona un método para producir la composición inmunógena de la presente divulgación, que comprende las etapas de introducir un baculovirus recombinante que codifica la proteína recombinante en una célula de insecto, en donde la célula de insecto está infectada con dicho virus de ARN capaz de infectar células de insecto, cultivar las células de insecto que albergan el baculovirus recombinante y el virus de ARN; y recuperar la proteína recombinante y el virus, preferentemente en el sobrenadante; y, preferentemente, también comprende la etapa inicial de insertar una secuencia de ADN que codifica la proteína recombinante en un vector de transferencia capaz de introducir la secuencia en el genoma del baculovirus, para así producir el baculovirus recombinante.

35

40

45

50

De acuerdo con aun otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit, en particular, un kit de prueba, para determinar si un individuo recibió una composición inmunógena que comprende una proteína recombinante producida por un sistema de expresión de baculovirus en células de insecto cultivadas, en donde el kit contiene uno o más reactivos de captura inmovilizados en un soporte sólido, en donde uno o más reactivos de captura inmovilizados son capaces de fijar uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en anticuerpos específicos para uno o más antígenos de acuerdo con la presente divulgación; uno o más antígenos de un virus de ARN de acuerdo con la presente divulgación; y una o más moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente divulgación; y en donde uno o más reactivos de captura se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 6; una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 %, aun con mayor preferencia, al menos 95 % o, en particular, 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8; un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, en donde el virus se inactivó opcionalmente, un oligonucleótido que es capaz de hibridación específica con secuencias características de la secuencia SEQ ID NO:9; y un oligonucleótido que es capaz de hibridación específica con secuencias características de la secuencia SEQ ID NO:15.

55

Además, la presente divulgación proporciona un cebador o un par de cebadores seleccionados respectivamente del grupo que consiste en las secuencias que tienen al menos 90 % o, preferentemente, al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 17 a 22.

60

De acuerdo con otro aspecto, el reactivo de captura de la presente divulgación comprende o consiste en partículas virales y/o partículas tipo virus de un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, en donde el virus de ARN capaz de infectar células de insecto es, preferentemente, el virus de ARN de acuerdo con la presente divulgación, y en donde el reactivo de captura se puede obtener mediante un método que comprende las etapas de

65

i) obtener un sobrenadante de un cultivo de células de insecto infectadas con un virus de ARN, preferentemente, con el virus de ARN de la presente divulgación, en donde el sobrenadante comprende

partículas virales y/o partículas tipo virus del virus de ARN, y en donde las células de insecto no se infectan preferentemente con un baculovirus y/o no se transfectan preferentemente con un plásmido,

- ii) separar los residuos celulares de las partículas virales y/o partículas tipo virus mediante una etapa de separación que incluye una microfiltración a través de al menos un filtro, preferentemente, dos filtros, en donde al menos un filtro que tiene, preferentemente, un tamaño de poro mayor que las partículas virales y/o partículas tipo virus, en particular, que tiene un tamaño de poro de alrededor de 0,1 μm a alrededor de 4 μm, preferentemente, de alrededor de 0,2 μm a alrededor de 2 μm, y recolectar el filtrado,
- iii) y, opcionalmente, someter el filtrado de ii) que contiene las partículas virales y/o partículas tipo virus a cromatografía de exclusión por tamaño, en donde la presencia de proteína en el eluyente se mide, preferentemente, midiendo la absorbancia de luz del eluyente a 260 nm o 280 nm (A₂₆₀ o A₂₈₀), y en donde se recolecta el eluyente que exhibe el primer pico A₂₆₀ o A₂₈₀.
- 15 Además, la divulgación proporciona una composición que comprende el reactivo de captura, en donde la composición se puede obtener mediante dicho método.
- En la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) descrita en la presente, las moléculas se separan por tamaño en un lecho empaquetado con un medio poroso inerte, en especial, un medio de gel inerte, que es preferentemente un compuesto de polisacáridos reticulados, por ejemplo, agarosa reticulada y dextrano en forma de microesferas. Las moléculas más grandes que los poros más grandes en las microesferas en gel expandidas no ingresan en las microesferas en gel y, por lo tanto, se mueven más rápido a lo largo del lecho cromatográfico. Las moléculas más pequeñas, que ingresan en las microesferas en gel en diversas medidas según su tamaño y forma, se retrasan en su paso a lo largo del lecho. Por lo tanto, las moléculas se eluyen generalmente en orden decreciente de tamaño molecular. Una columna SEC que comprende un medio adecuado para la cromatografía de exclusión por tamaño descrita en la presente es, preferentemente, la columna HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR (GE Healthcare Bio-Sciences).
- Se entiende en particular que el eluyente que exhibe el primer pico A₂₆₀ o A₂₈₀ es la fracción del filtrado de ii) que comprende las estructuras de proteínas más grandes incluidas en el filtrado de ii). Por ende, el eluyente que exhibe el primer pico A₂₆₀ o A₂₆₀ es el eluyente, o una porción de este, que contiene la mayoría de las partículas virales y/o partículas tipo virus incluidas en el filtrado de ii).

Ejemplos

35

40

50

55

60

65

5

Los siguientes ejemplos solo tienen como fin ilustrar la presente divulgación. En ningún caso, limitan el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1:

Infección de células Sf con un rhabdovirus, producción de rhabdovirus semipurificado y clonación y expresión de antígenos del rhabodovirus

A fin de confirmar la infección de células SF+ y Sf9 con un rhabdovirus, también denominado SfRV o SFRV (rhabdovirus de células Sf) en adelante, se diseñaron cebadores para amplificar los genes G y N de SFRV con el objetivo de insertar sitios de restricción 5' y 3' únicos. Además, el cebador del extremo 3' se diseñó para agregar un sitio de escisión de la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) y luego una etiqueta de histidina 6X. Esto tenía como fin permitir la purificación de la proteína expresada en una columna de níquel usando la etiqueta His y luego escindir la etiqueta His usando la proteasa de TEV para generar una proteína G o N nativa.

Las secuencias de los cebadores utilizados para las construcciones de gen G (que comprenden la secuencia de SEQ ID NO:1) son las secuencias indicadas en SEQ ID NO: 17 y 18, la secuencia del ácido nucleico para la construcción de gen G se proporciona en SEQ ID NO:12, y la secuencia de aminoácidos para la construcción de gen G es la secuencia de SEQ ID NO:4.

Las secuencias de los cebadores utilizados para las construcciones de gen N (que comprenden la secuencia de SEQ ID NO:7) son las secuencias indicadas en SEQ ID NO: 21 y 22, la secuencia del ácido nucleico para la construcción de gen N se proporciona en SEQ ID NO:16, y la secuencia de aminoácidos para la construcción de gen N es la secuencia de SEQ ID NO:8.

Además, los dominios transmembrana e intracelular de glucoproteína G de SFRV se previeron usando Tmpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) descrito en K. Hofmann y W. Stoffel (1993)TMbase - A database of membrane spanning proteins segments, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374,166, TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/ TMHMM/) que utiliza el modelo oculto de Márkov descrito en Möller S1, Croning MD, Apweiler R., Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions, Bioinformatics (2001) 17 (7): 646-653 y SOSUI (http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/. En función de los resultados de TMpred y TMHMM, la

secuencia G de SFRV se terminó en el aminoácido 550, y se agregaron el sitio de escisión de TEV, la etiqueta His 6X y los sitios Pst I. Las secuencias de los cebadores que se pueden usar para tales construcciones de gen G (que comprenden la secuencia de SEQ ID NO:2) son las secuencias indicadas en SEQ ID NO: 17 y 19, la secuencia del ácido nucleico para la construcción de gen G se proporciona en SEQ ID NO:13, y la secuencia de aminoácidos para la construcción de gen G es la secuencia de SEQ ID NO:5.

Además, la secuencia de señal de secreción de melitina de abeja melífera se fusionó con la secuencia de una secuencia G de SFRV truncada (Chouljenko *et al.* J Virol, 84:8596–8606 (2010); Tessier *et al.* Gene. 98:177-83 (1991)), en donde la secuencia de melitina se agregó a G de SFRV de longitud completa con escisión de TEV y his 6X mediante el reemplazo de su extremo N. Las secuencias de los cebadores que se pueden usar para tales construcciones de gen G (que comprenden la secuencia de SEQ ID NO:3) son las secuencias indicadas en SEQ ID NO: 20 y 18, la secuencia del ácido nucleico para la construcción de gen G se proporciona en SEQ ID NO:14, y la secuencia de aminoácidos para la construcción de gen G es la secuencia de SEQ ID NO:6.

10

35

60

- La secuencia de genoma completa del SFRV de acuerdo con MA *et al.* (J Virol. 88: 6576-6585 (2014)), depositada en GenBank (N.º de acceso KF947078) se usó como base para el diseño de cebadores. De manera similar, para el sitio de escisión de TEV, se usó la secuencia ENLYFQG en función de la información publicada disponible.
- El SFRV se purificó del medio vacío utilizado en el cultivo de Sf9 (células adherentes) y Sf+ (células de suspensión):

 El medio vacío se recolectó de células Sf9 y Sf+ infectadas con SFRV y propagadas de manera convencional, y se filtró a través de un filtro de 0,2 micrómetros para eliminar el residuo celular. El filtrado se cargó después en colchones de sacarosa al 30 % en amortiguador de NaCl-Tris HCl-EDTA (NTE) pH 7,4 y se sometió a ultracentrifugación a 32.000 rpm a 4 °C durante 3 horas. El sobrenadante se aspiró cuidadosamente, y el sedimento se volvió a hidratar y suspender en amortiguador de NTE. El contenido de proteína total se midió en una máquina de nanogotas, y a las alícuotas se les asignaron números de lote y se congelaron a ≤-70 °C hasta que se volvieron a usar. La preparación de antígenos contenía el virus semipurificado para recubrir las placas de ELISA, como se describe a continuación.
- El medio vacío SF9 se usó como fuente para la extracción de ARN viral de SFRV. El kit de extracción de ARN viral 30 QIAamp (Qiagen) se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
 - A fin de amplificar los genes G y N, el kit Superscript III de una etapa se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un RT-PCR de gradiente se usó en las siguientes condiciones: 1 ciclo a 60 °C durante 30 minutos (etapa de RT) y luego 1 ciclo a 94 °C durante 2 minutos. Esto se siguió de 40 ciclos a 94 °C durante 15 segundos, gradiente de apareamiento a 75 °C-50 °C durante 60 segundos, y luego extensión a 68 °C durante 2 minutos. Finalmente, la reacción se sometió a un solo ciclo a 68 °C durante 5 minutos y a un mantenimiento infinito a 4 °C.
- Los productos amplificados se procesaron en un gel para verificar el tamaño. Las bandas de gel del tamaño previsto se cortaron del gel y se purificaron usando el kit de extracción de gel Qiaquick de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Figura 1).
 - A continuación, solo se describe el trabajo adicional mediante el uso del gen G (que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1).
- El gen G amplificado (banda superior en la Figura 1) con el tamaño previsto de ~1,6Kb se cortó y se extrajo del gel, como se describió anteriormente. Luego se cortó con las enzimas de restricción Eco RI y Pst I. El producto recortado es el inserto. De manera similar, el plásmido vector de transferencia de baculovirus pVL1393 (Pharmingen) se cortó con las enzimas de restricción Eco RI y Pst I para generar el vector. El inserto y el vector recortados se procesaron en un gel (véase la Figura 2) para verificar la linealización del vector. Las bandas se cortaron y se extrajeron del gel, y el vector se desfosforiló. Se clonó el inserto (construcción G de SFRV cortado con Eco RI-Pstl) en el vector (pVL1393 cortado con Eco RI-Pstl, desfoforilado) y se ligó usando procedimientos estándares.
- El producto ligado se usó para transformar células de *E. coli* (células químicamente competentes DH5α One Shot Max efficiency de Invitrogen) y células sembradas en placas de agar LB con ampicilina. Las colonias se recolectaron el siguiente día y se cribaron para determinar la absorción del plásmido usando PCR de colonia, y se les asignaron números de clon.
 - Las condiciones de reacción para PCR de colonia fueron las siguientes: 1 ciclo a 98 °C durante 3 minutos y luego 34 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 30 segundos, hibridación a 58 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 2 minutos. Después de esta etapa, se realizó una etapa de extensión final a 72 °C durante 10 minutos y un mantenimiento final a 4 °C.
 - Los productos de PCR se procesaron en un gel de agarosa para identificar los clones que contenían el plásmido (véase la Figura 3).
 - Los clones positivos se cultivaron después en caldo LB-ampicilina, y el plásmido se purificó de los cultivos usando el

kit de purificación de plásmidos de minipreparación Qiaprep (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El vector de transferencia así generado contenía la construcción de gen G de SFRV y se dividió en alícuotas, y se le asignó un número de lote.

A fin de generar baculovirus recombinantes que expresen la construcción de gen G de SFRV, el plásmido de transferencia se cotransfectó junto con ADN de la estructura principal de baculovirus flashBAC ULTRA linealizado (Genway biotech) en células Sf9 usando el reactivo de transfección ESCORT (SAFC). Después de una semana, los sobrenadantes de la transfección (p0) se inocularon en células Sf9 nuevas para amplificar cualquier baculovirus recombinante que se pudiera haber generado.

El sedimento celular de la transfección se recolectó, se procesó en un gel de SDS y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para una transferencia Western. La proteína se sondeó con anticuerpo anti His (Invitrogen). El tamaño de proteína previsto fue ~71,5KDa. El gel mostró (Figura 4) dos bandas cercanas en el marcador 62KDa y por encima de este para los cinco clones evaluados (2, 5, 7, 10 y 11) pero no mostró bandas en el carril de control celular (cc).

Los clones 2 y 5 del virus recombinante se hicieron pasar nuevamente y se cultivaron en matraces de agitación para producir masivamente la proteína en cultivo de suspensión Sf+. Las fracciones de células sobrenadantes, solubles e insolubles se sondearon para la proteína. En ese momento, la proteína solo estaba presente en la porción insoluble (Figura 5). Como resultado, los truncamientos C terminales de glucoproteínas G de SFRV se generaron como una próxima etapa para usar en un ensayo ELISA.

Ejemplo 2:

15

20

30

35

40

45

50

55

60

25 Desarrollo de ELISA

Se desarrolló un ensayo ELISA para evaluar la presencia de una respuesta del anticuerpo contra SFRV en animales vacunados con PCV2 u otras vacunas subunitarias de baculovirus expresado en células Sf infectadas con SFRV. En síntesis, las placas de ELISA se recubrieron con 250 ng/pocillo de antígeno de SFRV semipurificado (como se describió anteriormente) de sobrenadante de células Sf9 o Sf+.

- El recubrimiento se realizó diluyendo el antígeno en amortiguador de carbonato-bicarbonato a pH 9,0 a fin de obtener una concentración final de 250 ng/pocillo. El recubrimiento se realizó a 4 °C durante la noche.
- Las placas se lavaron el siguiente día con PBS-Tween (PBST) y se bloquearon con 10 % de leche durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Las placas se sondearon después con suero diluido 1:100 (en amortiguador de bloqueo) de animales vacunados con antígeno subunitario de PCV2, baculovirus expresado en células Sf infectadas con SFRV o controles sin vacunar (véase la sección de datos).
- Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora y después se lavaron 5X veces con PBST para eliminar los anticuerpos no unidos.
- Las placas se sondearon después con anticuerpo secundario diluido 1:10.000 (conjugado anti-IgG de cerdo de cabra H+L-HRP – Bethyl laboratories), se incubaron a 37 °C durante 1 hora y después se lavaron 5X veces con PBST para eliminar los anticuerpos no unidos.
- Finalmente, se agregó el sustrato de TMB SureBlue (KPL), y las placas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se detuvieron con solución de detención de TMB (KPL).
- Las placas se leyeron después a 450 nm.

Configuración de las placas de ELISA:

- Fila a, los pocillos 1-10 se recubrieron con SFRV derivado de Sf9
- Fila b, los pocillos 1-10 se recubrieron con SFRV derivado de Sf+
- Los sueros porcinos se evaluaron en duplicados, y los animales vacunados con antígeno subunitario de PCV2
 (A, B) se muestran en negrita. Estos deberían mostrar una lectura positiva si los animales se habían puesto en contacto con SFRV mediante la vacunación y generaron anticuerpos contra SFRV.
- Los controles negativos se muestran en cursiva (C y D)
- Las columnas 9 y 10 son controles con amortiguador (sin anticuerpo primario)

Los resultados de ELISA se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1:

| | Α | | В | | С | | D | | | |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 2 3 | | 5 | 6 | 7 8 | | 9 10 | |
| Fila a | 0,774 | 0,626 | 0,217 | 0,215 | 0,058 | 0,098 | 0,095 | 0,091 | 0,044 | 0,039 |
| Fila b | 1,857 | 0,909 | 1,556 | 1,028 | 0,993 | 0,554 | 0,104 | 0,103 | 0,041 | 0,033 |

La Tabla 1 muestra los datos que evalúan el antígeno de SfRV derivado de células Sf9 (fila A) y células Sf+ (fila B). Se evaluaron cuatro muestras séricas en duplicados. Las columnas A y B contenían el suero del día 28 de animales vacunados con la vacuna experimental, mientras que las columnas C y D contenían el suero de animales de control negativo. Los resultados indicaron que tanto las células Sf9 como Sf+ contenían SfRV y se podrían usar como el antígeno del virus. Asimismo, el reconocimiento específico del antígeno en animales vacunados pero no de control apunta a la utilidad de SfRV como un marcador de cumplimiento inherente.

Interpretación de datos:

- En función de la lectura de ELISA, los animales vacunados con antígeno subunitario de PCV2 (grupos A y B)
 mostraron una buena respuesta contra SFRV semipurificado.
 - Los animales de control negativo (grupos C y D) no mostraron una reacción contra SFRV semipurificado.
 - Los resultados indicaron la utilidad de SFRV para la marca de cumplimiento inherente y para un enfoque DIVA.

15 Ejemplo 3:

5

ELISA que utiliza el antígeno de SFRV (en donde el antígeno es una proteína que comprende la secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 6, o en donde el antígeno es un virus purificado o semipurificado de acuerdo con la presente invención) descrito anteriormente

ALCANCE: Muestras séricas (o fluidos orales) de prueba para determinar la presencia de anticuerpos para antígenos de SFRV

MATERIALES Y MÉTODOS

25 A. Equipo

20

30

35

45

50

60

- Lavadora ELISA
- Lector ELISA
- WFI (agua para inyección) para cultivo celular, USP (Gibco, N.º de catálogo A12873-02)
 - Comprimidos con amortiguador de carbonato-bicarbonato (pH 9,6) (Sigma, N.º de catálogo C3041-100CAP)
 - Inmunoplacas de 96 pocillos (placas de fondo redondo o plano, Nunc Maxisorb)
 - Pipetas de 12 canales, diversas pipetas con un rango de 1 µl a 1 ml.
 - Puntas de pipeta
- Incubador a 37 °C
 - Refrigerador a 4 °C
 - Mezclador de vórtice
 - Tapas de placas (Thermo, N.º de catálogo AB-0752)
 - Bloques de dilución de 2 ml en bloque S (Phenix N.º de catálogo M-1810S, o equivalente)
- 40 Depósitos de reactivos
 - Temporizador

B. Reactivos

- Amortiguador de recubrimiento: Amortiguador de carbonato-bicarbonato
 - 100 ml de WFI
 - 1 cápsula de amortiguador de carbonato-bicarbonato
 - Se abrió la cápsula, se colocó el polvo en WFI, se mezcló hasta disolverse
 - Se esterilizó por filtrado la solución usando un filtro de 0,2 μm
 - Se almacenó a 4 °C
 - Vencimiento: 1 semana
 - Cantidad necesaria por ensayo (4 placas): 50 ml
- 55 2. 10X PBS:
 - 1 paquete de concentrado de PBS, Fisher BP665-1
 - q.s. hasta 1 I con H₂O GenPur (o equivalente)
 - Se almacenó a temperatura ambiente
 - Vencimiento: 1 año
 - 3. Solución amortiguadora de lavado: 0,05 % de Tween 20 en PBS de Dulbecco.
 - 0,5 ml de Tween 20, Fisher BP337, o equivalente
- 65 100 ml de 10X D-PBS, pH 7,2-7,4

- q.s. hasta 1 I con H₂O GenPur (o equivalente)
- pH a 7,2 ± 0,1
- Se almacenó a temperatura ambiente
- Vencimiento: 6 meses
- Cantidad necesaria por ensayo (4 placas): 2 litros

4. PBST:

5

10

20

30

35

45

55

60

- 500 ml de 1X PBS pH 7,4 (Gibco, N.º de catálogo 10010-023)
- 0,3 ml de Tween 20, Fisher BP337, o equivalente
- Se almacenó a temperatura ambiente
- Vencimiento: 6 meses
- Cantidad necesaria por ensayo (4 placas): 100 ml
- 15 5. Solución de bloqueo: 10 % de leche en polvo desnatada en solución de PBST
 - 20 g de bloqueador de grado de transferencia. Bio-Rad 170-6404, o equivalente
 - 200 ml de PBST
 - Se almacenó a 4 °C
 - Vencimiento: 0 días
 - Cantidad necesaria por ensayo (4 placas): 200 ml

6. Antígeno de SFRV:

■ El sobrenadante de cultivo de células SF o SF+ no infectadas se filtró a través de un filtro de 0,2 micrómetros (Thermo cat 456-0020). En este contexto, "sobrenadante de cultivo de células SF o SF+ no infectadas" significa sobrenadante de células SF o SF+ en el cultivo, en donde las células no están infectadas con el baculovirus, sino que están infectadas con SFRV.

Asimismo, en el contexto de las células descritas en la presente descripción, el término "SF" es equivalente al término "Sf", el término "SF9" es equivalente al término "Sf9", respectivamente.

- El filtrado se colocó en un colchón de sacarosa al 30 % y se centrifugó a 28.000-34.000 rpm a 4 °C durante 2-4 horas
- Después de la centrifugación, el sobrenadante se aspiró cuidadosamente, y el sedimento se suspendió en amortiquador de NaCl-Tris-EDTA a pH 7,4
- Este era el antígeno semipurificado.
- La concentración proteica se estimó de manera espectrofotométrica, y la proteína se dividió en alícuotas y se congeló a -70 °C hasta usarse
- 40 7. 2.° anticuerpo: Conjugado HRP de cabra anti-lgG de cerdo h+l Bethyl Labs Cat. N.° A100-105P, almacenado a 4 °C \pm 3,0 °C.
 - 8. Sustrato: Sustrato de peroxidasa de micropocillo TMB de 1 componente SureBlue Kirkgaard y Perry Laboratories, N.º de catálogo 52-00-01, o equivalente. El sustrato se almacenó a 4 °C ± 3,0 °C, se preincubó a 25 °C ± 2,0 °C y se usó a 25 °C ± 3,0 °C.
 - 9. Solución de detención: Solución de detención de TMB: Kirkgaard y Perry Laboratories, N.º de catálogo 50-85-04, o equivalente. Se almacenó a temperatura ambiente.

50 C. Procedimiento

- 1. Se preparó el amortiguador de recubrimiento usando la receta mencionada anteriormente en B1.
- 2. Se diluyó antígeno de SFRV en amortiguador de recubrimiento a 250 ng/pocillo. Se mezcló invirtiendo el antígeno 10 veces. Se recubrió con 250 ng/100 μl (es decir, 2,5 μg/ml = 250 ng/pocillo).
- 3. Se agregaron 100 µl de antígeno de SFRV diluido a todos los pocillos,
- Se sellaron las placas de prueba con tapas de placas y se incubaron durante la noche a 4 °C, se colocaron en la parte inferior del refrigerador para minimizar la alteración.
 Día siguiente
- 5. Se preparó suficiente solución de bloqueo para el ensayo actual únicamente. Se recomendaron 200 ml de bloqueo para 4 placas. Se almacenó a 4 °C hasta necesitarse.
- 6. Se lavaron las placas de prueba 5 veces con amortiguador de lavado usando la lavadora de placas de microtitulación Ultrawash plus o equivalente.
- 7. Se agregaron 100 μ l de solución de bloqueo a todos los pocillos de las placas de prueba. Las placas de prueba se cubrieron y se incubaron durante 1,0 hora a 37 °C \pm 2,0 °C.
- 8. Durante la incubación de bloqueo, las muestras séricas de prueba se diluyeron 1:100 en bloque en bloque
 - s. Para los fluidos orales, las muestras se diluyeron 1:2 en bloque. Cada muestra se evaluó individualmente.

Los controles positivo y negativo se diluyeron de la misma manera.

- 9. Las placas de prueba se lavaron 1X veces. Después del último lavado, las placas se golpetearon cuidadosamente en un papel absorbente.
- 10. Se agregaron 100 µl por pocillo de las muestras de prueba prediluidas a las respectivas placas. Se evitó que el pocillo entre en contacto con la punta de la pipeta. Las puntas se cambiaron entre cada muestra de prueba.
- Las placas de prueba se cubrieron y se incubaron durante 1,0 hora a 37 °C \pm 2,0 °C para las muestras séricas. Para las muestras de fluidos orales, se incubaron durante 16,0 horas a 4 °C \pm 2,0 °C.
- 11. Justo antes del lavado de las placas de prueba, el vial del anticuerpo secundario se retiró del refrigerador y se diluyó a 1:10.000 en bloque. Se recomendó realizar diluciones en serie para lograr una dilución 1:10.000 (4 diluciones). El anticuerpo diluido se mezcló mediante inversión 10 veces.
- 12. Las placas de prueba se lavaron 5 veces. .
- 13. Se agregaron 100 μ l de anticuerpo de detección diluido a todos los pocillos de las placas de prueba. Las placas de prueba se cubrieron y se incubaron durante 1,0 horas a 37 °C \pm 2,0 °C.
- 14. Se retiró inmediatamente el sustrato de peroxidasa de micropocillo TMB de 1 componente SureBlue del refrigerador (4°C ± 3°C), y el volumen adecuado se transfirió a un recipiente de polietileno de alta densidad (HDPE) marrón u opaco, y se incubó durante 1 hora ± 15 minutos a 25 °C ± 2,0 °C (sobre la mesa de trabajo).
 - 15. Las placas de prueba se lavaron 5 veces. Después del último lavado, las placas se golpetearon cuidadosamente en un papel absorbente. Se recomendó encender el lector de placas mientras las placas se lavaban.
 - 16. Se agregaron 100 µl de sustrato a todos los pocillos de las placas de prueba.
 - 17. Se incubaron a 25 °C + 3 °C durante 5 minutos.
 - 18. La reacción se detuvo con la adición de 100 µl de solución de detención a todos los pocillos.
 - 19. La absorbancia se midió a 450 nm.
 - D. Criterios de aceptación / Resultados
 - Control positivo: suero (o fluido oral, respectivamente) de cerdos hiperinmunizados con glucoproteína G de SFRV/SRFV
 - Sueros de cerdos sin tratamiento previo (o fluidos orales, respectivamente) o sueros (o fluidos orales, respectivamente) de cerdos sin vacunar que muestran una reacción insignificante a nula al antígeno de SFRV.
- 35 Ejemplo 4:

5

10

20

25

30

45

60

65

Producción de rhabdovirus semipurificado, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), PCR en tiempo real, microscopía de electrones de fracciones SEC y ELISA

40 Producción de rhabdovirus semipurificado:

Antes de cargarse a la columna, el rhabdovirus semipurificado se produjo en ese sobrenadante de cultivo celular (40 ml) de células de insecto Sf+ infectadas con SfRV que se concentró de 5 litros a 800 ml usando filtración de fibra hueca a través de un filtro de jeringa de 1,2 μ m. El filtrado resultante es el "rhabdovirus semipurificado" de acuerdo con este ejemplo.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC):

La cromatografía de exclusión por tamaño se ejecutó usando condiciones isocráticas en AKTA Explorer con una columna HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR (GE Healthcare Bio-Sciences) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La columna se equilibró con 1,5 volúmenes de columna de amortiguador (1X solución salina amortiguada con fosfato, pH 7,4, Gibco) y después se inyectó la muestra clarificada (aproximadamente 5 % de volumen de columna) del rhabdovirus semipurificado producido de acuerdo con (i). La separación se produjo a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min en 1,5 volúmenes de columna de amortiguador, y las fracciones (8 ml) se recolectaron desde el momento de la inyección y durante toda la etapa de separación. La elución de proteínas de la columna se monitorizó con absorción UV a 280 nm (Figura 6)

Las fracciones se analizaron en 4-12 % SDS-PAGE (Thermo Fisher), y después de concentrar las fracciones de pico usando precipitación con TCA/acetona. En síntesis, 1 ml de cada fracción se precipitó con TCA (200 µl) durante 1 h en hielo. Las muestras se centrifugaron durante 2 min a 20.000 xg, y el sobrenadante se retiró. Las fracciones se lavaron con 500 µl de acetona helada y se mezclaron en vórtex, y después se centrifugaron durante 2 min a 20.000 xg. Las etapas de centrifugación y acetona se repitieron para un total de 3 lavados de acetona. Los sedimentos se secaron durante 20 min, se suspendieron en 20 µl de amortiguador de carga en gel y se cargaron en el gel. Los geles se tiñeron durante 1 h usando la tinción de proteínas Imperial (Thermo Fisher) y se destiñeron durante al menos 3 h con agua desionizada. Después del análisis en gel, las concentraciones proteicas de las fracciones se determinaron mediante ensayo BCA (Thermo Fisher) usando albúmina de suero bovino como un estándar.

PCR en tiempo real

La presencia de ARN de SfRV en el rhabdovirus semipurificado (filtrado) de (i) y en las fracciones recolectadas mediante la SEC de (ii) se detectó/cuantificó usando los siguientes métodos y secuencias para PCR en tiempo real:

Control de cebadores/sondas/G-blocks:

| Nombre | Secuencia | Posición genómica* |
|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| Rhab_qPCR-F | SEQ ID NO:25 | 5584-5603 |
| Rhab_qPCR-R | SEQ ID NO:26 | 5654-5672 (RC) |
| Rhab_qPCR-PR (FAM) | SEQ ID NO:27 | 5624-5646 (RC) |
| Rhab_gBlock | SEQ ID NO:28 | 5565-5690 |
| * Posición genómica en función de la | cepa de referencia de GenBank: KF94 | 7078. Todas las secuencias se |

^{*} Posición genómica en función de la cepa de referencia de GenBank: KF947078. Todas las secuencias se dirigen a la región que codifica la glucoproteína de SfRV

Condiciones del ciclo:

10

5

1 ciclo a 50°C durante 10 min

1 ciclo a 95°C durante 3 min

15

40 ciclos a 95 °C durante 15 s

57 °C durante 15 s**Recolección de datos (FAM)

Breve descripción de las etapas realizadas:

20

25

30

La amplificación se realizó usando el kit de una etapa para sondas universales BioRad iTaq (N.º de catálogo 172-5141) de acuerdo con el protocolo sugerido del fabricante. Los cebadores se agregaron en una concentración final de 0,4 μM en una reacción de 25 μl, mientras que la sonda se agregó en una concentración final de 0,16 μΜ. En cada ejecución, una curva estándar estaba compuesta por una secuencia de g-blocks bicatenarios sintéticos (IDT) correspondiente al amplicón previsto. La reacción se llevó a cabo usando un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 (BioRad) en las siguientes condiciones: transcripción inversa inicial a 50 °C durante 10 min, luego desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, luego 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s, e hibridación y extensión a 57°C durante 15 s con recolección de datos en canal FAM. Los datos ópticos se analizaron usando el software CFX Manager (versión 2.1, BioRad). Las ejecuciones se consideraron válidas en función de: consistencia de la curva estándar, valores r² mayores de 0,99 y eficacias calculadas entre 80-120 %. Para cada determinación, las líneas de umbral se calcularon automáticamente usando la configuración de regresión para el modo de determinación de umbral de ciclo (Ct). La sustracción inicial se realizó automáticamente usando el modo de sustracción inicial.

35

Los resultados de la PCR en tiempo real se muestran en la Figura 7.

En la Figura 7:

45

40

La columna 1 indica los números de pocillo. La columna 2 muestra el fluoróforo 6-carboxifluoresceína (FAM) ligado a la sonda específica utilizada en esta PCR en tiempo real. La columna 3 indica las fracciones de antígeno de SfRV derivadas de la cromatografía de exclusión por tamaño (fracciones A11, A12, B1, B5, B12 y C6) o los estándares con cantidades conocidas de ácido nucleico específico de SfRV utilizado para generar la curva estándar (pocillos 7-14). El pocillo 15 sirvió como el control negativo (sin plantilla), y el pocillo 16 sirvió como el control positivo que contiene antígeno SfRV concentrado antes del fraccionamiento por tamaño (SEC).

El ciclo de cuantificación (Cq) es el ciclo en el cual se detecta la fluorescencia. Los valores Cq inferiores indican números de copia mayores de la diana específica en la muestra. Estos datos se muestran en la columna 4. Los números de copias genómicas extrapolados se muestran en la columna 5 como cuantificación de secuencia (SQ) y muestran el número de copias genómicas por ml.

50

55

Estos datos muestran que el material de inicio tenía 6 log de copias genómicas/ml específicas de SfRV (pocillo 16); de manera similar, las fracciones A11 y A12 tenían 6 log de copias genómicas/ml. Estas dos fracciones, junto con la fracción del extremo de la cola B1, deberían contener la mayoría de partículas virales/viriones de SfRV y partículas tipo virus (VLP). Las otras fracciones B5, B12 y C6 deberían contener las partículas subvirales en SEC y, por lo tanto, disminuir la cantidad de ARN viral, si lo hubiera.

Microscopía de electrones:

Las fracciones recolectadas mediante la SEC de (ii) se tiñeron con 2,5 % de ácido fosfotúngstico (PTA) durante 3 minutos (tinción negativa) para la microscopía de electrones. En las fracciones A11 y A12 (c.f. Figura 6), se observaron partículas de ~30-35 nm, que se consideraron partículas virales de SfRV.

5 ELISA:

10

15

25

30

35

50

60

ELISA se realizó como se describe en el Ejemplo 2, en donde se usaron los materiales y métodos descritos en el Ejemplo 3, con la diferencia de que, en lugar del "antígeno de SFRV" (en el punto B. 6. del Ejemplo 3), se usaron el rhabdovirus semipurificado (filtrado) de (i) y las fracciones A11, A12 y B1 recolectadas por la SEC de (ii), en donde cada uno se diluyó en amortiguador de recubrimiento en una concentración de 250 ng en 100 μl, y después 100 μl de cada uno de los antígenos se usaron para recubrir un pocillo.

Como muestras séricas de prueba, se usó suero sanguíneo de animales inmunizados con una vacuna experimental, en donde la vacuna comprendía proteína recombinante producida por un sistema de expresión de baculovirus en células de insecto infectadas con SfRV cultivadas. Los sueros se obtuvieron de la sangre extraída de los animales 28 días después de la administración de la vacuna experimental.

Como control negativo, se usó el suero sanguíneo de animales no inmunizados correspondientes, respectivamente.

20 Los resultados de ELISA se muestran en la Figura 8.

Las placas de ELISA se recubrieron con cuatro antígenos diferentes, que incluyen SfRV semipurificado (panel A), fracciones de exclusión por tamaño A11 (panel B), A12 (panel C) y B1 (panel D). Las placas se sondearon con sueros de animales de control negativo (triángulos invertidos) o sueros del Día 28 de animales a los que se administró una vacuna experimental que contenía SfRV (círculos).

Los resultados mostraron que los sueros de animales vacunados reaccionaron con los antígenos de recubrimiento, mientras que el suero del control negativo tuvo una reacción mínima. Asimismo, los animales vacunados reaccionaron fuertemente con los pocillos recubiertos con las fracciones A11, A12 y B1 (paneles B, C y D), tal como lo demuestra el aumento de los valores de DO, y las reacciones se agruparon más estrechamente con estas fracciones en comparación con el SfRV semipurificado (panel A). Esto indica un mayor reconocimiento y una respuesta más específica contra el antígeno recubierto (fracciones A11, A12 y B1).

En el listado de secuencias:

SEQ ID NO:1 corresponde a la secuencia de una proteína G de SFRV,

SEQ ID NO:2 corresponde a la secuencia de una proteína G de SFRV truncada,

40 SEQ ID NO:3 corresponde a la secuencia de una proteína G de SFRV truncada con secuencia de melitina N terminal,

SEQ ID NO:4 corresponde a SEQ ID NO:1 con modificaciones (que incluye etiqueta 6x His),

45 SEQ ID NO:5 corresponde a SEQ ID NO:2 con modificaciones (que incluye etiqueta 6x His),

SEQ ID NO:6 corresponde a SEQ ID NO:3 con modificaciones (que incluye etiqueta 6x His),

SEQ ID NO:7 corresponde a la secuencia de una proteína N de SFRV,

SEQ ID NO:8 corresponde a SEQ ID NO:7 con modificaciones (que incluye etiqueta 6x His),

SEQ ID NO:9 corresponde a una secuencia que codifica SEQ ID NO:1,

SEQ ID NO:10 corresponde a una secuencia que codifica SEQ ID NO:2,

SEQ ID NO:11 corresponde a una secuencia que codifica SEQ ID NO:3,

SEQ ID NO:12 corresponde a una secuencia que codifica SEQ ID NO:4,

SEQ ID NO:13 corresponde a una secuencia que codifica SEQ ID NO:5,

SEQ ID NO:14 corresponde a una secuencia que codifica SEQ ID NO:6,

65 SEQ ID NO:15 corresponde a una secuencia que codifica SEQ ID NO:7,

| | SEQ ID NO:16 corresponde a una secuencia que codifica SEQ ID NO:8, |
|----|---|
| | SEQ ID NO:17 corresponde a un cebador directo para construir SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13, |
| 5 | SEQ ID NO:18 corresponde a un cebador inverso para construir SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14, |
| | SEQ ID NO:19 corresponde a un cebador inverso para construir SEQ ID NO:13, |
| 10 | SEQ ID NO:20 corresponde a un cebador directo para construir SEQ ID NO:14, |
| 10 | SEQ ID NO:21 corresponde a un cebador directo para construir SEQ ID NO:16, |
| | SEQ ID NO:22 corresponde a un cebador inverso para construir SEQ ID NO:16, |
| 15 | SEQ ID NO:23 corresponde a una secuencia de una proteína PCV2 ORF2, |
| | SEQ ID NO:24 corresponde a una secuencia de una proteína hemaglutinina H5 (virus de la gripe). |
| 20 | LISTADO DE SECUENCIAS |
| 20 | <110> Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. |
| | <120> Sistema de marcadores, en particular para antígenos subunitarios expresados por baculovirus |
| 25 | <130> P10-0168 |
| | <160> 28 |
| 30 | <170> Patentin versión 3.5 |
| 50 | <210> 1 <211> 610 |
| | <212> PRT |
| 35 | <213> SFRV |
| | <400> 1 |

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

| Tar | s Val | Ara | Tle | Tle | Ara | Aen | Dro | Acn | Gl v | Sor | Tle | Tue | Thr | Dro | Ara |
|----------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| ту | s vai | ALG | 180 | 116 | Arg | ASII | FIO | 185 | GIY | ser | TTE | туу | 190 | PLO | ALG |
| Gl | y Ser | Trp 195 | | His | Glu | Leu | Asp 200 | Asn | Leu | Trp | Gly | Asp 205 | Gln | Met | Arg |
| ту | r Leu 210 | | Ile | Arg | Arg | Phe 215 | Gly | Gly | Glu | Ser | Ser 220 | Cys | Pro | Leu | Lys |
| 11 22 | e Tyr 5 | Asp | Val | Arg | Ala 230 | Gly | Val | Leu | Ser | Lys 235 | Ser | Arg | Ser | Asn | Phe 240 |
| Il | e Leu | Val | Ser | Leu 245 | Pro | Ser | Leu | Asn | Leu 250 | Gln | Phe | Ser | Val | Ser 255 | Leu |
| G1 | u Ser | Thr | Glu 260 | Thr | Lys | Суѕ | Ser | Phe 265 | Gly | Asp | Lys | Thr | Tyr 270 | Asp | Ile |
| Va | l Gln | Ser 275 | | Gly | Gly | Tyr | Leu 280 | Leu | Ser | Ile | Asp | Ile 285 | Gly | Asn | Ala |
| As | n Trp 290 | | Gly | Pro | Trp | Asp 295 | Pro | Thr | Pro | Gln | His 300 | Pro | Gly | Arg | Glu |
| Ar 30 | g Arg 5 | Ser | Ile | Met | Glu 310 | Phe | Pro | Asp | Gln | Thr 315 | Ser | Phe | Arg | Tyr | Asn 320 |
| Gl | n Phe | Ile | Asn | Tyr 325 | His | Ser | Ser | Pro | Arg 330 | His | Lys | Arg | His | Asp 335 | |
| Gl | u Phe | Glu | Phe 340 | Pro | Leu | Ser | Leu | Lys 345 | Ser | Ser | Tyr | Asp | Tyr 350 | Ala | Gln |
| Ph | e Arg | Tyr 355 | Glu | Gln | Asn | Phe | Ile 360 | Ile | Arg | Gln | Ile | Asn 365 | Lys | Asn | Phe |
| Gl | y Leu 370 | | Gln | Lys | Ser | Ile 375 | Cys | Asp | Ile | Gln | Phe 380 | Ser | Lys | Trp | Gln |
| As 38 | n Leu 5 | Ser | Pro | Pro | Asn 390 | Leu | Ala | Met | Lys | Ile 395 | Ala | His | Tyr | Val | Thr 400 |
| Gl | y Ser | Ile | His | Ser 405 | Ile | Gly | Gly | Val | His 410 | His | Gly | Ser | Tyr | Ser 415 | Ile |
| Gl | n Arg | Thr | Glu 420 | Lys | Ser | Ile | Thr | Lys 425 | Val | Asn | Leu | Val | Phe 430 | Pro | Ile |

| | Val | Ile | Val 435 | His | Gly | Met | Tyr | Lys 440 | Cys | Gln | Arg | Glu | Pro 445 | Ser | Lys | Glu |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Val | Val 450 | Trp | Ala | Glu | Pro | Val 455 | Thr | Gly | Ile | Leu | Phe 460 | Lys | Ser | Pro | Ile |
| | Pro 465 | Thr | His | Phe | Ser | Leu 470 | Ser | Ser | Ser | Trp | Leu 475 | Pro | Gly | Val | Asn | Gly 480 |
| | Ser | Ser | Ile | Val | Pro 485 | Leu | Thr | Gly | Gln | Ile 490 | Leu | Leu | Pro | Glu | Ile 495 | Thr |
| | Met | Asp | His | Leu 500 | Glu | Val | Val | Gln | Gln 505 | Val | Glu | Ala | Lys | Met 510 | Val | Lys |
| | Ser | Met | Tyr 515 | Thr | Asn | Val | Glu | Leu 520 | Phe | Gly | Ser | Thr | Glu 525 | Glu | Phe | Gln |
| | Arg | Tyr 530 | Gln | Thr | Gln | Gly | Ile 535 | Thr | Ser | Asp | Glu | Gln 540 | Ser | Asn | Thr | Val |
| | Asn 545 | Pro | Trp | Ile | Gly | Leu 550 | Leu | Ile | His | Gly | Gly 555 | Val | Ser | Ile | Ala | Thr 560 |
| | Gly | Ile | Leu | Val | Ala 565 | Leu | Leu | Ile | Pro | Ser 570 | Ile | Leu | Lys | Leu | Phe 575 | Arg |
| | His | Ile | Ile | Glu 580 | Lys | Gly | Glu | Ala | Ser 585 | Leu | Glu | Glu | Arg | Leu 590 | His | Leu |
| | Arg | Glu | Thr 595 | Ser | Arg | Lys | Glu | Phe 600 | Val | Lys | Val | Arg | Gly 605 | Lys | Pro | Trp |
| | Gly | Val 610 | | | | | | | | | | | | | | |
| <210><211><211><212><213> | 550 PRT | encia a | artificia | al | | | | | | | | | | | | |
| <220> <223> | secue | encia d | le una | prote | ína G | SFRV | trunca | ada | | | | | | | | |
| <400> | 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Met | Val | Phe | Leu | Ser | Leu | Ser | Thr | Ile | Ile | Phe | Ile | Leu | Ser | Leu 15 | Arg |

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

| Val | Gln | Ser 275 | Met | Gly | Gly | Tyr | Leu 280 | Leu | Ser | Ile | Asp | Ile 285 | Gly | Asn | Ala |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Asn | Trp 290 | Arg | Gly | Pro | Trp | Asp 295 | Pro | Thr | Pro | Gln | His 300 | Pro | Gly | Arg | Glu |
| Arg 305 | Arg | Ser | Ile | Met | Glu 310 | Phe | Pro | Asp | Gln | Thr 315 | Ser | Phe | Arg | Tyr | Asn 320 |
| Gln | Phe | Ile | Asn | Tyr 325 | His | Ser | Ser | Pro | Arg 330 | His | Lys | Arg | His | Asp 335 | Gln |
| Glu | Phe | Glu | Phe 340 | Pro | Leu | Ser | Leu | Lys 345 | Ser | Ser | Tyr | Asp | Tyr 350 | Ala | Gln |
| Phe | Arg | Tyr 355 | Glu | Gln | Asn | Phe | Ile 360 | Ile | Arg | Gln | Ile | Asn 365 | Lys | Asn | Phe |
| Gly | Leu 370 | Leu | Gln | Lys | Ser | Ile 375 | Суѕ | Asp | Ile | Gln | Phe 380 | Ser | Lys | Trp | Gln |
| Asn 385 | Leu | Ser | Pro | Pro | Asn 390 | Leu | Ala | Met | Lys | Ile 395 | Ala | His | Tyr | Val | Thr 400 |
| Gly | Ser | Ile | His | Ser 405 | Ile | Gly | Gly | Val | His 410 | His | Gly | Ser | Tyr | Ser 415 | Ile |
| Gln | Arg | Thr | Glu 420 | Lys | Ser | Ile | Thr | Lys 425 | Val | Asn | Leu | Val | Phe 430 | Pro | Ile |
| Val | Ile | Val 435 | His | Gly | Met | Tyr | Lys 440 | Cys | Gln | Arg | Glu | Pro 445 | Ser | Lys | Glu |
| Val | Val 450 | Trp | Ala | Glu | Pro | Val 455 | Thr | Gly | Ile | Leu | Phe 460 | Lys | Ser | Pro | Ile |
| Pro 465 | Thr | His | Phe | Ser | Leu 470 | Ser | Ser | Ser | Trp | Leu 475 | Pro | Gly | Val | Asn | Gly 480 |
| Ser | Ser | Ile | Val | Pro 485 | Leu | Thr | Gly | Gln | Ile 490 | Leu | Leu | Pro | Glu | Ile 495 | Thr |
| Met | Asp | His | Leu 500 | Glu | Val | Val | Gln | Gln 505 | Val | Glu | Ala | Lys | Met 510 | Val | Lys |
| | | | m1 | | | 91 | | D 1. | 61 | | m1 | 01 | 61 | -1 | ~1 |

| | | | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | |
|----|---------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|
| | | Arg | Tyr 530 | Gln | Thr | Gln | Gly | Ile 535 | | Ser | Asp | Glu | Gln 540 | Ser | Asn | Thr | Val |
| | | Asn 545 | Pro | Trp | Ile | Gly | Leu 550 | | | | | | | | | | |
| 5 | <210><211><211><212><213> | 618 PRT | encia a | ırtificia | ıl | | | | | | | | | | | | |
| | <220> <223> | secue | ncia d | e una | proteí | na G S | SFRV | trunca | ıda co | n secu | ıencia | de me | elitina | N-term | ninal | | |
| 10 | <400> | 3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | Met 1 | Lys | Phe | Leu | Val 5 | Asn | Val | Ala | Leu | Val 10 | Phe | Met | Val | Val | Tyr 15 | Ile |
| | | Ser | Tyr | Ile | Туг 20 | Ala | Asn | Pro | Leu | Ser 25 | Tyr | Pro | Asn | Gly | Asn 30 | Pro | Leu |
| | | Ser | Tyr | Pro 35 | Asn | Gly | Ile | Leu | Thr 40 | Asn | Asn | Ser | Thr | His 45 | Asn | His | Pro |
| | | Leu | Ser 50 | Asp | Phe | Tyr | Ile | Phe 55 | Tyr | Glu | Asn | Ser | Ser 60 | Leu | Thr | Tyr | Thr |
| | | Gln 65 | Phe | Pro | Val | Ala | Pro 70 | Asp | Cys | Ser | Ser | Ile 75 | Leu | Asp | Thr | Arg | Asp 80 |
| | | Glu | Gln | Tyr | Pro | Thr 85 | Thr | Val | Thr | Leu | Trp 90 | Lys | Val | Asp | Gln | Glu 95 | Ser |
| | | Gln | Ala | Glu | Trp 100 | Gly | Leu | Leu | Leu | Trp 105 | Gln | Glu | Arg | Ile | Asp 110 | Thr | Thr |
| | | Cys | Ser | Trp 115 | Asn | Phe | Trp | Gly | Asn 120 | Tyr | Lys | Gly | Ser | Ile 125 | Val | Ser | Lys |
| | | Ser | Ser 130 | Val | Pro | Leu | Lys | Asp 135 | Ile | Pro | Ser | Gly | Ser 140 | Ala | Arg | Asn | Gly |
| | | Tyr 145 | Trp | Ala | Leu | Ser | Asn 150 | Asp | Glu | Val | Gln | Glu 155 | Ile | Asp | His | | Pro 160 |
| | | Tyr | Asn | Leu | Arg | Tyr | Tyr | Cys | Tyr | Trp | Cys | Arg | Asn | Glu | Tyr | Pro | Gly |

| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Ser | Phe | Tyr | Met 180 | Arg | Tyr | Val | Lys | Lys 185 | Val | Arg | Ile | Ile | Arg 190 | Asn | Pro |
| Asp | Gly | Ser 195 | Ile | Lys | Thr | Pro | Arg 200 | Gly | Ser | Trp | Val | His 205 | Glu | Leu | Asp |
| Asn | Leu 210 | Trp | Gly | Asp | Gln | Met 215 | Arg | Tyr | Leu | Val | Ile 220 | Arg | Arg | Phe | Gly |
| Gly 225 | Glu | Ser | Ser | Cys | Pro 230 | Leu | Lys | Ile | Tyr | Asp 235 | Val | Arg | Ala | Gly | Val 240 |
| Leu | Ser | Lys | Ser | Arg 245 | Ser | Asn | Phe | Ile | Leu 250 | Val | Ser | Leu | Pro | Ser 255 | Leu |
| Asn | Leu | Gln | Phe 260 | Ser | Val | Ser | Leu | Glu 265 | Ser | Thr | Glu | Thr | Lys 270 | Cys | Ser |
| Phe | Gly | Asp 275 | Lys | Thr | Tyr | Asp | Ile 280 | Val | Gln | Ser | Met | Gly 285 | Gly | Tyr | Leu |
| Leu | Ser 290 | Ile | Asp | Ile | Gly | Asn 295 | Ala | Asn | Trp | Arg | Gly 300 | Pro | Trp | Asp | Pro |
| Thr 305 | Pro | Gln | His | Pro | Gly 310 | Arg | Glu | Arg | Arg | Ser 315 | Ile | Met | Glu | Phe | Pro 320 |
| Asp | Gln | Thr | Ser | Phe 325 | | | | | | | Asn | | His | Ser 335 | |
| Pro | Arg | His | Lys 340 | Arg | His | Asp | Gln | Glu 345 | Phe | Glu | Phe | Pro | Leu 350 | Ser | Leu |
| Lys | Ser | Ser 355 | Tyr | Asp | Tyr | Ala | Gln 360 | Phe | Arg | Tyr | Glu | Gln 365 | Asn | Phe | Ile |
| Ile | Arg 370 | Gln | Ile | Asn | Lys | Asn 375 | Phe | Gly | Leu | Leu | Gln 380 | Lys | Ser | Ile | Cys |
| Asp 385 | Ile | Gln | Phe | Ser | Lys 390 | Trp | Gln | Asn | Leu | Ser 395 | Pro | Pro | Asn | Leu | Ala 400 |
| Met | Lys | Ile | Ala | His | Tyr | Val | Thr | Gly | Ser | Ile | His | Ser | Ile | Gly | Gly |

| | Val | His | His | Gly 420 | Ser | Tyr | Ser | Ile | Gln 425 | Arg | Thr | Glu | Lys | Ser 430 | Ile | Thr |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Lys | Val | Asn 435 | Leu | Val | Phe | Pro | Ile 440 | Val | Ile | Val | His | Gly 445 | Met | Tyr | Lys |
| | Cys | Gln 450 | Arg | Glu | Pro | Ser | Lys 455 | Glu | Val | Val | Trp | Ala 460 | Glu | Pro | Val | Thr |
| | Gly 465 | Ile | Leu | Phe | Lys | Ser 470 | Pro | Ile | Pro | Thr | His 475 | Phe | Ser | Leu | Ser | Ser 480 |
| | Ser | Trp | Leu | Pro | Gly 485 | Val | Asn | Gly | Ser | Ser 490 | Ile | Val | Pro | Leu | Thr 495 | Gly |
| | Gln | Ile | Leu | Leu 500 | Pro | Glu | Ile | Thr | Met 505 | Asp | His | Leu | Glu | Val 510 | Val | Gln |
| | Gln | Val | Glu 515 | Ala | Lys | Met | Val | Lys 520 | Ser | Met | Tyr | Thr | Asn 525 | Val | Glu | Leu |
| | Phe | Gly 530 | Ser | Thr | Glu | Glu | Phe 535 | Gln | Arg | Tyr | Gln | Thr 540 | Gln | Gly | Ile | Thr |
| | Ser 545 | Asp | Glu | Gln | Ser | Asn 550 | Thr | Val | Asn | Pro | Trp 555 | Ile | Gly | Leu | Leu | Ile 560 |
| | His | Gly | Gly | Val | Ser 565 | Ile | Ala | Thr | Gly | Ile 570 | Leu | Val | Ala | Leu | Leu 575 | Ile |
| | Pro | Ser | Ile | Leu 580 | Lys | Leu | Phe | Arg | His 585 | Ile | Ile | Glu | Lys | Gly 590 | Glu | Ala |
| | Ser | Leu | Glu 595 | Glu | Arg | Leu | His | Leu 600 | Arg | Glu | Thr | Ser | Arg 605 | Lys | Glu | Phe |
| | Val | Lys 610 | Val | Arg | Gly | Lys | Pro 615 | Trp | Gly | Val | | | | | | |
| <210> 4 <211> 623 <212> PRT <213> Secuencia artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <220> <223> | SEQ I | D NO: | 1 con | modif | icacior | nes (in | cluye | marca | ıdor 6x | (His) | | | | | | |
| <400> | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |

Met Val Phe Leu Ser Leu Ser Thr Ile Ile Phe Ile Leu Ser Leu Arg

5

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

| Glu | Ser | Thr | Glu 260 | Thr | Lys | Cys | Ser | Phe 265 | Gly | Asp | Lys | Thr | Tyr 270 | Asp | Ile |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Val | Gln | Ser 275 | Met | Gly | Gly | Tyr | Leu 280 | Leu | Ser | Ile | Asp | Ile 285 | Gly | Asn | Ala |
| Asn | Trp 290 | Arg | Gly | Pro | Trp | Asp 295 | Pro | Thr | Pro | Gln | His 300 | Pro | Gly | Arg | Glu |
| Arg 305 | Arg | Ser | Ile | Met | Glu 310 | Phe | Pro | Asp | Gln | Thr 315 | Ser | Phe | Arg | Tyr | Asn 320 |
| Gln | Phe | Ile | Asn | Tyr 325 | His | Ser | Ser | Pro | Arg 330 | His | Lys | Arg | His | Asp 335 | Gln |
| Glu | Phe | Glu | Phe 340 | Pro | Leu | Ser | Leu | Lys 345 | Ser | Ser | Tyr | Asp | Tyr 350 | Ala | Gln |
| Phe | Arg | Tyr 355 | Glu | Gln | Asn | Phe | Ile 360 | Ile | Arg | Gln | Ile | Asn 365 | Lys | Asn | Phe |
| Gly | Leu 370 | Leu | Gln | Lys | Ser | Ile 375 | Cys | Asp | Ile | Gln | Phe 380 | Ser | Lys | Trp | Gln |
| Asn 385 | Leu | Ser | Pro | Pro | Asn 390 | Leu | Ala | Met | Lys | Ile 395 | Ala | His | Tyr | Val | Thr 400 |
| Gly | Ser | Ile | His | Ser 405 | Ile | Gly | Gly | Val | His 410 | His | Gly | Ser | Tyr | Ser 415 | Ile |
| Gln | Arg | | Glu 420 | | Ser | Ile | | Lys 425 | | Asn | Leu | | Phe 430 | | Ile |
| Val | Ile | Val 435 | His | Gly | Met | Tyr | Lys 440 | Cys | Gln | Arg | Glu | Pro 445 | Ser | Lys | Glu |
| Val | Val 450 | Trp | Ala | Glu | Pro | Val 455 | Thr | Gly | Ile | Leu | Phe 460 | Lys | Ser | Pro | Ile |
| Pro 465 | Thr | His | Phe | Ser | Leu 470 | Ser | Ser | Ser | Trp | Leu 475 | Pro | Gly | Val | Asn | Gly 480 |
| Ser | Ser | Ile | Val | Pro 485 | Leu | Thr | Gly | Gln | Ile 490 | Leu | Leu | Pro | Glu | Ile 495 | Thr |
| Met | Asp | His | Leu 500 | Glu | Val | Val | Gln | Gln 505 | Val | Glu | Ala | Lys | Met 510 | Val | Lys |

| | Ser | Met | Tyr 515 | Thr | Asn | Val | Glu | Leu 520 | Phe | Gly | Ser | Thr | Glu 525 | Glu | Phe | Glr |
|----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Arg | Tyr 530 | Gln | Thr | Gln | Gly | Ile 535 | Thr | Ser | Asp | Glu | Gln 540 | Ser | Asn | Thr | Val |
| | Asn 545 | Pro | Trp | Ile | Gly | Leu 550 | Leu | Ile | His | Gly | Gly 555 | Val | Ser | Ile | Ala | Thr 560 |
| | Gly | Ile | Leu | Val | Ala 565 | Leu | Leu | Ile | Pro | Ser 570 | Ile | Leu | Lys | Leu | Phe 575 | Arg |
| | His | Ile | Ile | Glu 580 | Lys | Gly | Glu | Ala | Ser 585 | Leu | Glu | Glu | Arg | Leu 590 | His | Leu |
| | Arg | Glu | Thr 595 | Ser | Arg | Lys | Glu | Phe 600 | Val | Lys | Val | Arg | Gly 605 | Lys | Pro | Trp |
| | Gly | Val 610 | Glu | Asn | Leu | Tyr | Phe 615 | Gln | Gly | His | His | His 620 | His | His | His | |
| <210> <211> <212> <213> | 563 PRT | encia a | artificia | al | | | | | | | | | | | | |
| <220> <223> | | ID NO | :2 con | modi | ficacio | nes (ir | ncluye | marca | ador 6 | x His) | | | | | | |
| <400> | 5 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Met 1 | Val | Phe | Leu | Ser 5 | Leu | Ser | Thr | Ile | Ile 10 | Phe | Ile | Leu | Ser | Leu 15 | Arg |
| | Ala | Val | Thr | Cys 20 | Ser | Asn | Pro | Leu | Ser 25 | Tyr | Pro | Asn | Gly | Ile 30 | Leu | Thr |
| | Asn | Asn | Ser 35 | Thr | His | Asn | His | Pro 40 | Leu | Ser | Asp | Phe | Tyr 45 | Ile | Phe | Tyr |
| | Glu | Asn 50 | Ser | Ser | Leu | Thr | Tyr 55 | Thr | Gln | Phe | Pro | Val 60 | Ala | Pro | Asp | Cys |
| | Ser 65 | Ser | Ile | Leu | Asp | Thr 70 | Arg | Asp | Glu | Gln | Tyr 75 | Pro | Thr | Thr | Val | Thr |
| | Leu | Trp | Lys | Val | Asp 85 | Gln | Glu | Ser | Gln | Ala 90 | Glu | Trp | Gly | Leu | Leu 95 | Leu |

| Trp | Gln | Glu | Arg 100 | Ile | Asp | Thr | Thr | Cys 105 | Ser | Trp | Asn | Phe | Trp 110 | Gly | Asn |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Tyr | Lys | Gly 115 | Ser | Ile | Val | Ser | Lys 120 | Ser | Ser | Val | Pro | Leu 125 | Lys | Asp | Ile |
| Pro | Ser 130 | Gly | Ser | Ala | Arg | Asn 135 | Gly | Tyr | Trp | Ala | Leu 140 | Ser | Asn | Asp | Glu |
| Val 145 | Gln | Glu | Ile | Asp | His 150 | Val | Pro | Tyr | Asn | Leu 155 | Arg | Tyr | Tyr | Cys | Tyr 160 |
| Trp | Cys | Arg | Asn | Glu 165 | Tyr | Pro | Gly | Ser | Phe 170 | Tyr | Met | Arg | Tyr | Val 175 | Lys |
| Lys | Val | Arg | Ile 180 | Ile | Arg | Asn | Pro | Asp 185 | Gly | Ser | Ile | Lys | Thr 190 | Pro | Arg |
| Gly | Ser | Trp 195 | Val | His | Glu | Leu | Asp 200 | Asn | Leu | Trp | Gly | Asp 205 | Gln | Met | Arg |
| Tyr | Leu 210 | Val | Ile | Arg | Arg | Phe 215 | Gly | Gly | Glu | Ser | Ser 220 | Cys | Pro | Leu | Lys |
| Ile 225 | Tyr | Asp | Val | Arg | Ala 230 | Gly | Val | Leu | Ser | Lys 235 | Ser | Arg | Ser | Asn | Phe 240 |
| Ile | Leu | Val | Ser | Leu 245 | Pro | Ser | Leu | Asn | Leu 250 | Gln | Phe | Ser | Val | Ser 255 | Leu |
| Glu | Ser | Thr | Glu 260 | Thr | Lys | Cys | Ser | Phe 265 | Gly | Asp | Lys | Thr | Tyr 270 | Asp | Ile |
| Val | Gln | Ser 275 | Met | Gly | Gly | Tyr | Leu 280 | Leu | Ser | Ile | Asp | Ile 285 | Gly | Asn | Ala |
| Asn | Trp 290 | Arg | Gly | Pro | Trp | Asp 295 | Pro | Thr | Pro | Gln | His 300 | Pro | Gly | Arg | Glu |
| Arg 305 | Arg | Ser | Ile | Met | Glu 310 | Phe | Pro | Asp | Gln | Thr 315 | Ser | Phe | Arg | Tyr | Asn 320 |
| Gln | Phe | Ile | Asn | Tyr 325 | His | Ser | Ser | Pro | Arg 330 | His | Lys | Arg | His | Asp 335 | Gln |
| Glu | Phe | Glu | Phe 340 | Pro | Leu | Ser | Leu | Lys 345 | Ser | Ser | Tyr | Asp | Tyr 350 | Ala | Gln |

| | Phe | Arg | Tyr 355 | Glu | Gln | Asn | Phe | Ile 360 | Ile | Arg | Gln | Ile | Asn 365 | Lys | Asn | Phe |
|----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Gly | Leu 370 | Leu | Gln | Lys | Ser | Ile 375 | Cys | Asp | Ile | Gln | Phe 380 | Ser | Lys | Trp | Gln |
| | Asn 385 | Leu | Ser | Pro | Pro | Asn 390 | Leu | Ala | Met | Lys | Ile 395 | Ala | His | Tyr | Val | Thr 400 |
| | Gly | Ser | Ile | His | Ser 405 | Ile | Gly | Gly | Val | His 410 | His | Gly | Ser | Tyr | Ser 415 | Ile |
| | Gln | Arg | Thr | Glu 420 | Lys | Ser | Ile | Thr | Lys 425 | Val | Asn | Leu | Val | Phe 430 | Pro | Ile |
| | Val | Ile | Val 435 | His | Gly | Met | Tyr | Lys 440 | Cys | Gln | Arg | Glu | Pro 445 | Ser | Lys | Glu |
| | Val | Val 450 | Trp | Ala | Glu | Pro | Val 455 | Thr | Gly | Ile | Leu | Phe 460 | Lys | Ser | Pro | Ile |
| | Pro 465 | Thr | His | Phe | Ser | Leu 470 | Ser | Ser | Ser | Trp | Leu 475 | Pro | Gly | Val | Asn | Gly 480 |
| | Ser | Ser | Ile | Val | Pro 485 | Leu | Thr | Gly | Gln | Ile 490 | Leu | Leu | Pro | Glu | Ile 495 | Thr |
| | Met | Asp | His | Leu 500 | Glu | Val | Val | Gln | Gln 505 | Val | Glu | Ala | Lys | Met 510 | Val | Lys |
| | Ser | Met | Tyr 515 | Thr | Asn | Val | Glu | Leu 520 | Phe | Gly | Ser | Thr | Glu 525 | Glu | Phe | Gln |
| | Arg | Tyr 530 | Gln | Thr | Gln | Gly | Ile 535 | Thr | Ser | Asp | Glu | Gln 540 | Ser | Asn | Thr | Val |
| | Asn 545 | Pro | Trp | Ile | Gly | Leu 550 | Glu | Asn | Leu | Tyr | Phe 555 | Gln | Gly | His | His | His 560 |
| | His | His | His | | | | | | | | | | | | | |
| <210> <211> <212> <213> | 631 PRT | encia a | ırtificia | I | | | | | | | | | | | | |

10

<220>

5

<223> SEQ ID NO:3 con modificaciones (incluye marcador 6x His)

<400> 6

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

| Leu | ser | тйг | ser | 245 | ser | Asn | Pne | iie | 250 | Val | ser | Leu | Pro | 255 | Leu |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Asn | Leu | Gln | Phe 260 | Ser | Val | Ser | Leu | Glu 265 | Ser | Thr | Glu | Thr | Lys 270 | Cys | Ser |
| Phe | Gly | Asp 275 | Lys | Thr | Tyr | Asp | Ile 280 | Val | Gln | Ser | Met | Gly 285 | Gly | Tyr | Leu |
| Leu | Ser 290 | Ile | Asp | Ile | Gly | Asn 295 | Ala | Asn | Trp | Arg | Gly 300 | Pro | Trp | Asp | Pro |
| Thr 305 | Pro | Gln | His | Pro | Gly 310 | Arg | Glu | Arg | Arg | Ser 315 | Ile | Met | Glu | Phe | Pro 320 |
| Asp | Gln | Thr | Ser | Phe 325 | Arg | Tyr | Asn | Gln | Phe 330 | Ile | Asn | Tyr | His | Ser 335 | Ser |
| Pro | Arg | His | Lys 340 | Arg | His | Asp | Gln | Glu 345 | Phe | Glu | Phe | Pro | Leu 350 | Ser | Leu |
| Lys | Ser | Ser 355 | Tyr | Asp | Tyr | Ala | Gln 360 | Phe | Arg | Tyr | Glu | Gln 365 | Asn | Phe | Ile |
| Ile | Arg 370 | Gln | Ile | Asn | Lys | Asn 375 | Phe | Gly | Leu | Leu | Gln 380 | Lys | Ser | Ile | Cys |
| Asp 385 | Ile | Gln | Phe | Ser | Lys 390 | Trp | Gln | Asn | Leu | Ser 395 | Pro | Pro | Asn | Leu | Ala 400 |
| Met | Lys | Ile | Ala | His 405 | Tyr | Val | Thr | Gly | Ser 410 | Ile | His | Ser | Ile | Gly 415 | Gly |
| Val | His | His | Gly 420 | Ser | Tyr | Ser | Ile | Gln 425 | Arg | Thr | Glu | Lys | Ser 430 | Ile | Thr |
| | | 435 | Leu | | | | 440 | | | | | 445 | | | |
| Cys | Gln 450 | Arg | Glu | Pro | Ser | Lys 455 | Glu | Val | Val | Trp | Ala 460 | Glu | Pro | Val | Thr |
| Gly 465 | Ile | Leu | Phe | Lys | Ser 470 | Pro | Ile | Pro | Thr | His 475 | Phe | Ser | Leu | Ser | Ser 480 |
| Ser | Trp | Leu | Pro | Gly 485 | Val | Asn | Gly | Ser | Ser 490 | Ile | Val | Pro | Leu | Thr 495 | Gly |

| | Gln | Ile | Leu | Leu 500 | Pro | Glu | Ile | Thr | Met 505 | Asp | His | Leu | Glu | Val 510 | Val | Glı |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| | Gln | Val | Glu 515 | Ala | Lys | Met | Val | Lys 520 | Ser | Met | Tyr | Thr | Asn 525 | Val | Glu | Let |
| | Phe | Gly 530 | Ser | Thr | Glu | Glu | Phe 535 | Gln | Arg | Tyr | Gln | Thr 540 | Gln | Gly | Ile | Thi |
| | Ser 545 | Asp | Glu | Gln | Ser | Asn 550 | Thr | Val | Asn | Pro | Trp 555 | Ile | Gly | Leu | Leu | I16 |
| | His | Gly | Gly | Val | Ser 565 | Ile | Ala | Thr | Gly | Ile 570 | Leu | Val | Ala | Leu | Leu 575 | Ile |
| | Pro | Ser | Ile | Leu 580 | Lys | Leu | Phe | Arg | His 585 | Ile | Ile | Glu | Lys | Gly 590 | Glu | Ala |
| | Ser | Leu | Glu 595 | Glu | Arg | Leu | His | Leu 600 | Arg | Glu | Thr | Ser | Arg 605 | Lys | Glu | Phe |
| | Val | Lys 610 | Val | Arg | Gly | Lys | Pro 615 | Trp | Gly | Val | Glu | Asn 620 | Leu | Tyr | Phe | Glı |
| | Gly 625 | His | His | His | His | His 630 | His | | | | | | | | | |
| <210><211><211><212><213> | 521 PRT | , | | | | | | | | | | | | | | |
| <400> | 7 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Met 1 | Thr | Gln | Gly | Thr 5 | Met | Lys | Pro | Val | Trp | Glu | Glu | Leu | Gly | Thr 15 | Gly |
| | Glu | Thr | Glu | Phe 20 | Gln | Gly | Thr | Val | Asp 25 | Ile | Pro | Gly | Arg | Ser 30 | Leu | Lys |
| | Pro | Glu | Lys 35 | Thr | Asp | Trp | Ser | Val 40 | Asp | Thr | Cys | Arg | Glu 45 | Ile | Ser | Leu |
| | Asn | Leu 50 | Lys | Leu | Pro | Gly | Glu 55 | Ile | Trp | Gln | Leu | Ala 60 | His | Gln | Glu | Thr |
| | Ile 65 | Phe | Asn | Arg | Phe | Leu 70 | Thr | Phe | Tyr | Ala | Thr 75 | Gly | Tyr | Val | Pro | Asr 80 |

| Thr | His | Thr | Ala | Thr 85 | Glu | Ile | Val | Leu | Ser 90 | Met | Ala | Ser | Leu | Ile 95 | Phe |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Lys | Asp | Lys | Ala 100 | Lys | Ala | Pro | Ile | Asp 105 | Leu | Ile | Trp | Asp | Asp 110 | Ser | Phe |
| Gln | Ala | Ser 115 | Pro | Ser | Glu | Glu | Cys 120 | Gly | Phe | Ser | Val | Val 125 | Gly | Glu | Thr |
| Pro | Leu 130 | Val | Ile | Gly | Gln | His 135 | Pro | Asp | Asp | Asp | Asp 140 | Tyr | Thr | Leu | Arg |
| Glu 145 | Asp | Glu | Glu | Ser | Ala 150 | Ala | Met | Asn | Glu | Glu 155 | Glu | Lys | Ile | Gln | Ala 160 |
| Ala | Leu | Lys | Thr | Leu 165 | Gly | Ile | Gln | Asp | Thr 170 | Pro | Val | Asp | Leu | Lys 175 | Asp |
| Ala | Ser | Gly | Ile 180 | Val | Phe | Glu | Thr | Lys 185 | Glu | Asp | Arg | Glu | Gln 190 | Arg | Ile |
| Lys | Asn | Glu 195 | Lys | Ala | Leu | His | Val 200 | Glu | Asp | Asp | Ile | Asn 205 | Ala | Leu | Thr |
| Gln | Ile 210 | Thr | Lys | Gln | Phe | Leu 215 | Phe | Glu | Tyr | Ser | Thr 220 | Gly | Ser | Leu | Gln |
| Lys 225 | Phe | Val | Ala | Lys | Ala 230 | Thr | Thr | Ile | Phe | Ile 235 | Asp | Asn | Asn | Ala | Thr 240 |
| Asn | Gly | Phe | Thr | Arg 245 | Leu | His | Leu | His | Ala 250 | Ile | Arg | Val | Met | Asn 255 | Phe |
| Ile | Ala | Leu | Thr 260 | Met | Leu | Arg | Lys | Val 265 | Thr | Lys | Ser | Asn | Ala 270 | Gln | Met |
| Ile | Asn | Ala 275 | Phe | Leu | Lys | Glu | Gln 280 | Tyr | Lys | Arg | Asn | Ile 285 | Ala | Ser | Leu |
| Ile | Pro 290 | Gly | Ala | Leu | Ser | Ser 295 | Asp | Phe | Ala | Pro | Pro 300 | Ser | Lys | Ser | Cys |
| Ile 305 | Asp | Lys | Leu | Thr | Ala 310 | Ile | Ser | Lys | Asn | Asp 315 | Pro | Ala | Val | Ser | Ser 320 |
| Phe | Phe | Ala | Lys | Val | Val | Met | Leu | Asn | Met | Glu | Glu | Glu | Arg | Arg | Asn |

| | | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
|----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Pro | Ser | Leu | Val 340 | Ala | Cys | Leu | Gly | Ala 345 | Ser | Leu | Leu | Thr | His 350 | Thr | Thr |
| | Trp | Asn | Gly 355 | Met | Gly | Ile | Leu | His 360 | Val | Ile | Phe | Glu | Val 365 | Cys | Leu | Phe |
| | His | Gln 370 | Ile | Ser | Trp | Lys | Arg 375 | Leu | Val | Thr | Glu | Ser 380 | Leu | Thr | Ser | Leu |
| | Thr 385 | Lys | Met | Ser | Trp | Gly 390 | Glu | Val | Ser | Gln | Phe 395 | Leu | Ile | Lys | Tyr | Gln 400 |
| | Ala | Lys | Gly | Asn | Pro 405 | Asp | Pro | Thr | Val | Ala 410 | Trp | Ala | Arg | Ile | Ile 415 | Asp |
| | Asp | Ser | Tyr | Phe 420 | Met | Arg | Leu | Thr | Ile 425 | Val | Asn | His | Pro | Thr 430 | Leu | Ala |
| | Ala | Leu | Leu 435 | Val | Glu | Ser | Leu | Ile 440 | Arg | Ser | Gln | Lys | Asp 445 | Asp | Gly | Ile |
| | Leu | Asn 450 | Ala | Asn | Trp | Ala | Ile 455 | Gln | His | Arg | Asp | Thr 460 | Ile | Asn | Tyr | Tyr |
| | Arg 465 | Asp | Ala | Ala | Lys | Leu 470 | Leu | Thr | Asp | Lys | Leu 475 | Thr | Gly | Gln | Thr | Ala 480 |
| | Thr | Val | Gln | Ala | Leu 485 | Thr | Asn | Glu | Ala | Ala 490 | Asp | Leu | Val | Arg | Thr 495 | Met |
| | Asn | Ala | Gly | Pro 500 | Ser | Arg | Tyr | His | Pro 505 | Arg | Pro | Ser | Thr | Leu 510 | Ile | Pro |
| | Met | Val | Asp 515 | Leu | Asn | Pro | Glu | Asp 520 | Leu | | | | | | | |
| <210> <211> <212> <213> | 534 PRT | ncia a | ırtificia | I | | | | | | | | | | | | |
| <220> <223> | SEQ I | D NO: | 7 con | modifi | cacior | nes (in | ıcluye | marca | ndor 6 | (His) | | | | | | |
| <400> | 8 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Met 1 | Thr | Gln | Gly | Thr 5 | Met | Lys | Pro | Val | Trp | Glu | Glu | Leu (| - 100 | Chr G | Sly |

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

| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Ile | Asn | Ala 275 | Phe | Leu | Lys | Glu | Gln 280 | Tyr | Lys | Arg | Asn | Ile 285 | Ala | Ser | Leu |
| Ile | Pro 290 | Gly | Ala | Leu | Ser | Ser 295 | Asp | Phe | Ala | Pro | Pro 300 | Ser | Lys | Ser | Cys |
| Ile 305 | Asp | Lys | Leu | Thr | Ala 310 | Ile | Ser | Lys | Asn | Asp 315 | Pro | Ala | Val | Ser | Ser 320 |
| Phe | Phe | Ala | Lys | Val 325 | Val | Met | Leu | Asn | Met 330 | Glu | Glu | Glu | Arg | Arg 335 | Asn |
| Pro | Ser | Leu | Val 340 | Ala | Cys | Leu | Gly | Ala 345 | Ser | Leu | Leu | Thr | His 350 | Thr | Thr |
| Trp | Asn | Gly 355 | Met | Gly | Ile | Leu | His 360 | Val | Ile | Phe | Glu | Val 365 | Суз | Leu | Phe |
| His | Gln 370 | Ile | Ser | Trp | Lys | Arg 375 | Leu | Val | Thr | Glu | Ser 380 | Leu | Thr | Ser | Leu |
| Thr 385 | Lys | Met | Ser | Trp | Gly 390 | Glu | Val | Ser | Gln | Phe 395 | Leu | Ile | Lys | Tyr | Glr 400 |
| Ala | Lys | Gly | Asn | Pro 405 | Asp | Pro | Thr | Val | Ala 410 | Trp | Ala | Arg | Ile | Ile 415 | Asp |
| Asp | Ser | | Phe 420 | | Arg | Leu | | Ile 425 | | Asn | His | | Thr 430 | | Ala |
| Ala | Leu | Leu 435 | Val | Glu | Ser | Leu | Ile 440 | Arg | Ser | Gln | Lys | Asp 445 | Asp | Gly | Ile |
| Leu | Asn 450 | Ala | Asn | Trp | Ala | Ile 455 | Gln | His | Arg | Asp | Thr 460 | Ile | Asn | Tyr | Tyr |
| Arg 465 | Asp | Ala | Ala | Lys | Leu 470 | Leu | Thr | Asp | Lys | Leu 475 | Thr | Gly | Gln | Thr | Ala 480 |
| Thr | Val | Gln | Ala | Leu 485 | Thr | Asn | Glu | Ala | Ala 490 | Asp | Leu | Val | Arg | Thr 495 | Met |
| Asn | Ala | Gly | Pro | Ser | Arg | Tyr | His | Pro | Arg | Pro | Ser | Thr | Leu | Ile | Pro |

Met Val Asp Leu Asn Pro Glu Asp Leu Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly 515 520 525

His His His His His 530

<210> 9 <211> 1830 5 <212> ADN <213> SFRV

<400> 9

| atggttttct taagtttatc | aacgatcata | tttatcctaa | gcctccgggc | tgtaacctgc | 60 |
|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------|
| tccaatcctc tctcctatcc | taatggcatt | ttgactaaca | actctactca | caatcatccc | 120 |
| ctatcggact tttatatttt | ttatgagaac | agttccctta | cctatactca | attccctgtg | 180 |
| gccccagact gctctagtat | tctagatact | agagatgagc | agtatcccac | cactgttact | 240 |
| ttgtggaagg ttgatcaaga | atctcaagct | gagtggggac | tccttttatg | gcaagagaga | 300 |
| attgacacca cttgctcctg | gaacttctgg | ggcaattaca | aaggatccat | tgtatctaaa | 360 |
| tcctcagtac ctctaaagga | tatcccatcg | ggtagtgccc | ggaatggata | ttgggctttg | 420 |
| agcaatgatg aagttcaaga | gattgatcat | gtcccttaca | acttgagata | ttattgttac | 480 |
| tggtgcagaa atgaatatcc | tgggagcttt | tatatgagat | atgtaaagaa | agttcggatc | 540 |
| ataagaaatc ctgatgggtc | tataaagact | cctagaggat | cctgggttca | tgagttggac | 600 |
| aacttgtggg gagatcagat | gaggtatcta | gttattcgaa | gatttggggg | agaatctagc | 660 |
| tgccctctta agatatatga | tgtgagagca | ggggttctgt | caaaatctcg | gtcaaacttc | 720 |
| atcttagtgt cccttccctc | cttgaatttg | cagttctctg | tatcacttga | atccactgag | 780 |
| acgaaatgct catttggaga | taagacatat | gatattgtgc | agagcatggg | aggctatctc | 840 |
| ctctccatcg acataggtaa | tgcgaactgg | cgaggccctt | gggatcctac | ccctcagcat | 900 |
| ccgggtcgtg aaagaagatc | aattatggag | tttccggatc | aaacatcttt | cagatataac | 960 |
| caatttataa attatcactc | atccccaaga | cacaagagac | atgatcaaga | atttgagttc | 1020 |
| cctctcagtc taaaatccag | ttatgattat | gctcaattta | gatatgagca | gaatttcatc | 1080 |
| atccgacaga tcaataagaa | ttttggatta | ttacagaaga | gcatttgtga | tattcagttt | 1140 |
| tctaagtggc agaatctcag | tccacccaat | cttgctatga | aaattgccca | ttatgtcacc | 1200 |
| ggctctatcc actctatagg | tggtgttcat | catggatctt | attcaattca | aagaacggaa | 1260 |
| aaatccatta ctaaggtcaa | tctggtgttt | cccattgtta | ttgttcatgg | aatgtataag | 1320 |
| tgccaaaggg aaccatccaa | ggaggtggtt | tgggcagaac | ccgtcacagg | gatcttattc | 1380 |
| aagtctccta ttccgactca | tttctcacta | agttcctctt | ggctacctgg | ggtaaatggt | 1440 |
| tcttctattg tccctctgac | aggtcaaatt | cttctccctg | aaatcacaat | ggatcacttg | 1500 |
| gaggttgtac aacaggttga | agcaaagatg | gtcaaaagta | tgtacacgaa | tgtagagttg | 1560 |
| tttggatcaa cagaggaatt | tcaaagatac | caaactcagg | gaattacctc | tgatgaacaa | 1620 |
| tcaaatacag taaatccttg | gattgggctt | ttgatacatg | gtggagtgtc | catagctact | 1680 |
| ggaatattag tagcactttt | gatcccctca | atcttaaaat | tgttcagaca | tataattgag | 1740 |
| aaaggggagg catcgttaga | ggagaggttg | catctgaggg | aaacctcaag | aaaagaattt | 1800 |
| gtcaaggtta gggggaaacc | atggggtgtc | | | | 1830 |

<210> 10 <211> 1650 <212> ADN <213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> secuencia que codifica SEQ ID NO:2

<400> 10

10

atggttttct taagtttatc aacgatcata tttatcctaa gcctccgggc tgtaacctgc 60 120 tccaatcctc tctcctatcc taatggcatt ttgactaaca actctactca caatcatccc ctatcggact tttatatttt ttatgagaac agttccctta cctatactca attccctgtg 180 240 gccccagact gctctagtat tctagatact agagatgagc agtatcccac cactgttact ttgtggaagg ttgatcaaga atctcaagct gagtggggac tccttttatg gcaagagaga 300 attgacacca cttgctcctg gaacttctgg ggcaattaca aaggatccat tgtatctaaa 360 420 tcctcagtac ctctaaagga tatcccatcg ggtagtgccc ggaatggata ttgggctttg 480 agcaatgatg aagttcaaga gattgatcat gtcccttaca acttgagata ttattgttac tggtgcagaa atgaatatcc tgggagcttt tatatgagat atgtaaagaa agttcggatc 540 ataagaaatc ctgatgggtc tataaagact cctagaggat cctgggttca tgagttggac 600 aacttgtggg gagatcagat gaggtatcta gttattcgaa gatttggggg agaatctagc 660 tgccctctta agatatatga tgtgagagca ggggttctgt caaaatctcg gtcaaacttc 720 atcttagtgt cccttccctc cttgaatttg cagttctctg tatcacttga atccactgag 780 acgaaatgct catttggaga taagacatat gatattgtgc agagcatggg aggctatctc 840 ctctccatcg acataggtaa tgcgaactgg cgaggccctt gggatcctac ccctcagcat 900 ccgggtcgtg aaagaagatc aattatggag tttccggatc aaacatcttt cagatataac 960 caatttataa attatcactc atccccaaga cacaagagac atgatcaaga atttgagttc 1020 cctctcagtc taaaatccag ttatgattat gctcaattta gatatgagca gaatttcatc 1080 atccgacaga tcaataagaa ttttggatta ttacagaaga gcatttgtga tattcagttt 1140 tctaagtggc agaatctcag tccacccaat cttgctatga aaattgccca ttatgtcacc 1200

| ggctctatcc | actctatagg | tggtgttcat | catggatctt | attcaattca | aagaacggaa | 1260 |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| aaatccatta | ctaaggtcaa | tctggtgttt | cccattgtta | ttgttcatgg | aatgtataag | 1320 |
| tgccaaaggg | aaccatccaa | ggaggtggtt | tgggcagaac | ccgtcacagg | gatcttattc | 1380 |
| aagtctccta | ttccgactca | tttctcacta | agttcctctt | ggctacctgg | ggtaaatggt | 1440 |
| tcttctattg | tccctctgac | aggtcaaatt | cttctccctg | aaatcacaat | ggatcacttg | 1500 |
| gaggttgtac | aacaggttga | agcaaagatg | gtcaaaagta | tgtacacgaa | tgtagagttg | 1560 |
| tttggatcaa | cagaggaatt | tcaaagatac | caaactcagg | gaattacctc | tgatgaacaa | 1620 |
| tcaaatacag | taaatccttg | gattgggctt | | | | 1650 |

<210> 11 <211> 1854 <212> ADN

5

<213> Secuencia artificial

<223> secuencia que codifica SEQ ID NO:3

10 <400> 11

| atgaaattct | tagtcaacgt | tgcccttgtt | tttatggtcg | tatacatttc | ttacatctat | 60 |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| gccaatcctc | tctcctatcc | taatggcaat | cctctctcct | atcctaatgg | cattttgact | 120 |
| aacaactcta | ctcacaatca | tcccctatcg | gacttttata | ttttttatga | gaacagttcc | 180 |
| cttacctata | ctcaattccc | tgtggcccca | gactgctcta | gtattctaga | tactagagat | 240 |
| gagcagtatc | ccaccactgt | tactttgtgg | aaggttgatc | aagaatctca | agctgagtgg | 300 |
| ggactccttt | tatggcaaga | gagaattgac | accacttgct | cctggaactt | ctggggcaat | 360 |
| tacaaaggat | ccattgtatc | taaatcctca | gtacctctaa | aggatatccc | atcgggtagt | 420 |
| gcccggaatg | gatattgggc | tttgagcaat | gatgaagttc | aagagattga | tcatgtccct | 480 |
| tacaacttga | gatattattg | ttactggtgc | agaaatgaat | atcctgggag | cttttatatg | 540 |
| agatatgtaa | agaaagttcg | gatcataaga | aatcctgatg | ggtctataaa | gactcctaga | 600 |
| ggatcctggg | ttcatgagtt | ggacaacttg | tggggagatc | agatgaggta | tctagttatt | 660 |
| cgaagatttg | ggggagaatc | tagctgccct | cttaagatat | atgatgtgag | agcaggggtt | 720 |
| ctgtcaaaat | ctcggtcaaa | cttcatctta | gtgtcccttc | cctccttgaa | tttgcagttc | 780 |
| tctgtatcac | ttgaatccac | tgagacgaaa | tgctcatttg | gagataagac | atatgatatt | 840 |
| gtgcagagca | tgggaggcta | tctcctctcc | atcgacatag | gtaatgcgaa | ctggcgaggc | 900 |
| ccttgggatc | ctacccctca | gcatccgggt | cgtgaaagaa | gatcaattat | ggagtttccg | 960 |
| gatcaaacat | ctttcagata | taaccaattt | ataaattatc | actcatcccc | aagacacaag | 1020 |
| agacatgatc | aagaatttga | gttccctctc | agtctaaaat | ccagttatga | ttatgctcaa | 1080 |
| tttagatatg | agcagaattt | catcatccga | cagatcaata | agaattttgg | attattacag | 1140 |
| aagagcattt | gtgatattca | gttttctaag | tggcagaatc | tcagtccacc | caatcttgct | 1200 |
| atgaaaattg | cccattatgt | caccggctct | atccactcta | taggtggtgt | tcatcatgga | 1260 |
| tcttattcaa | ttcaaagaac | ggaaaaatcc | attactaagg | tcaatctggt | gtttcccatt | 1320 |
| gttattgttc | atggaatgta | taagtgccaa | agggaaccat | ccaaggaggt | ggtttgggca | 1380 |
| gaacccgtca | cagggatctt | attcaagtct | cctattccga | ctcatttctc | actaagttcc | 1440 |
| tcttggctac | ctggggtaaa | tggttcttct | attgtccctc | tgacaggtca | aattcttctc | 1500 |
| cctgaaatca | caatggatca | cttggaggtt | gtacaacagg | ttgaagcaaa | gatggtcaaa | 1560 |
| agtatgtaca | cgaatgtaga | gttgtttgga | tcaacagagg | aatttcaaag | ataccaaact | 1620 |
| cagggaatta | cctctgatga | acaatcaaat | acagtaaatc | cttggattgg | gcttttgata | 1680 |
| catggtggag | tgtccatagc | tactggaata | ttagtagcac | ttttgatccc | ctcaatctta | 1740 |
| aaattgttca | gacatataat | tgagaaaggg | gaggcatcgt | tagaggagag | gttgcatctg | 1800 |
| agggaaacct | caaqaaaaqa | atttqtcaaq | gttaggggga | aaccatgggg | tata | 1854 |

<210> 12 <211> 1884 <212> ADN <213> Secuencia artificial 5 <220> <223> secuencia que codifica SEQ ID NO:4 <400> 12

10

gaattcatgg ttttcttaag tttatcaacg atcatattta tcctaagcct ccgggctgta 60 acctgeteca atectetete etateetaat ggeattttga etaacaacte tacteacaat 120 180 catcccctat cggactttta tattttttat gagaacagtt cccttaccta tactcaattc cctgtggccc cagactgctc tagtattcta gatactagag atgagcagta tcccaccact 240 300 gttactttgt ggaaggttga tcaagaatct caagctgagt ggggactcct tttatggcaa gagagaattg acaccacttg ctcctggaac ttctggggca attacaaagg atccattgta 360 420 tctaaatcct cagtacctct aaaggatatc ccatcgggta gtgcccggaa tggatattgg gctttgagca atgatgaagt tcaagagatt gatcatgtcc cttacaactt gagatattat 480 540 tgttactggt gcagaaatga atatcctggg agcttttata tgagatatgt aaagaaagtt cggatcataa gaaatcctga tgggtctata aagactccta gaggatcctg ggttcatgag 600 ttggacaact tgtggggaga tcagatgagg tatctagtta ttcgaagatt tgggggagaa 660 tctagctgcc ctcttaagat atatgatgtg agagcagggg ttctgtcaaa atctcggtca 720 aacttcatct tagtgtccct tccctccttg aatttgcagt tctctgtatc acttgaatcc 780 actgagacga aatgctcatt tggagataag acatatgata ttgtgcagag catgggaggc 840

| tatctcctct | ccatcgacat | aggtaatgcg | aactggcgag | gcccttggga | tcctacccct | 900 |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| cagcatccgg | gtcgtgaaag | aagatcaatt | atggagtttc | cggatcaaac | atctttcaga | 960 |
| tataaccaat | ttataaatta | tcactcatcc | ccaagacaca | agagacatga | tcaagaattt | 1020 |
| gagttccctc | tcagtctaaa | atccagttat | gattatgctc | aatttagata | tgagcagaat | 1080 |
| ttcatcatcc | gacagatcaa | taagaatttt | ggattattac | agaagagcat | ttgtgatatt | 1140 |
| cagttttcta | agtggcagaa | tctcagtcca | cccaatcttg | ctatgaaaat | tgcccattat | 1200 |
| gtcaccggct | ctatccactc | tataggtggt | gttcatcatg | gatcttattc | aattcaaaga | 1260 |
| acggaaaaat | ccattactaa | ggtcaatctg | gtgtttccca | ttgttattgt | tcatggaatg | 1320 |
| tataagtgcc | aaagggaacc | atccaaggag | gtggtttggg | cagaacccgt | cacagggatc | 1380 |
| ttattcaagt | ctcctattcc | gactcatttc | tcactaagtt | cctcttggct | acctggggta | 1440 |
| aatggttctt | ctattgtccc | tctgacaggt | caaattcttc | tccctgaaat | cacaatggat | 1500 |
| cacttggagg | ttgtacaaca | ggttgaagca | aagatggtca | aaagtatgta | cacgaatgta | 1560 |
| gagttgtttg | gatcaacaga | ggaatttcaa | agataccaaa | ctcagggaat | tacctctgat | 1620 |
| gaacaatcaa | atacagtaaa | tccttggatt | gggcttttga | tacatggtgg | agtgtccata | 1680 |
| gctactggaa | tattagtagc | acttttgatc | ccctcaatct | taaaattgtt | cagacatata | 1740 |
| attgagaaag | gggaggcatc | gttagaggag | aggttgcatc | tgagggaaac | ctcaagaaaa | 1800 |
| gaatttgtca | aggttagggg | gaaaccatgg | ggtgtcgaaa | acctgtattt | tcagggccac | 1860 |
| catcaccatc | accattaact | gcag | | | | 1884 |

<210> 13 <211> 1704 <212> ADN <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia que codifica SEQ ID NO:5

10 <400> 13

| gaattcatgg | ttttcttaag | tttatcaacg | atcatattta | tcctaagcct | ccgggctgta | 60 |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| acctgctcca | atcctctctc | ctatcctaat | ggcattttga | ctaacaactc | tactcacaat | 120 |
| catcccctat | cggactttta | tatttttat | gagaacagtt | cccttaccta | tactcaattc | 180 |
| cctgtggccc | cagactgctc | tagtattcta | gatactagag | atgagcagta | tcccaccact | 240 |
| gttactttgt | ggaaggttga | tcaagaatct | caagctgagt | ggggactcct | tttatggcaa | 300 |
| gagagaattg | acaccacttg | ctcctggaac | ttctggggca | attacaaagg | atccattgta | 360 |
| tctaaatcct | cagtacctct | aaaggatatc | ccatcgggta | gtgcccggaa | tggatattgg | 420 |
| gctttgagca | atgatgaagt | tcaagagatt | gatcatgtcc | cttacaactt | gagatattat | 480 |
| tgttactggt | gcagaaatga | atatcctggg | agcttttata | tgagatatgt | aaagaaagtt | 540 |
| cggatcataa | gaaatcctga | tgggtctata | aagactccta | gaggatcctg | ggttcatgag | 600 |
| ttggacaact | tgtggggaga | tcagatgagg | tatctagtta | ttcgaagatt | tgggggagaa | 660 |
| tctagctgcc | ctcttaagat | atatgatgtg | agagcagggg | ttctgtcaaa | atctcggtca | 720 |
| aacttcatct | tagtgtccct | tccctccttg | aatttgcagt | tctctgtatc | acttgaatcc | 780 |
| actgagacga | aatgctcatt | tggagataag | acatatgata | ttgtgcagag | catgggaggc | 840 |
| tatctcctct | ccatcgacat | aggtaatgcg | aactggcgag | gcccttggga | tcctacccct | 900 |
| cagcatccgg | gtcgtgaaag | aagatcaatt | atggagtttc | cggatcaaac | atctttcaga | 960 |
| tataaccaat | ttataaatta | tcactcatcc | ccaagacaca | agagacatga | tcaagaattt | 1020 |
| gagttccctc | tcagtctaaa | atccagttat | gattatgctc | aatttagata | tgagcagaat | 1080 |
| ttcatcatcc | gacagatcaa | taagaatttt | ggattattac | agaagagcat | ttgtgatatt | 1140 |
| cagttttcta | agtggcagaa | tctcagtcca | cccaatcttg | ctatgaaaat | tgcccattat | 1200 |
| gtcaccggct | ctatccactc | tataggtggt | gttcatcatg | gatcttattc | aattcaaaga | 1260 |
| acggaaaaat | ccattactaa | ggtcaatctg | gtgtttccca | ttgttattgt | tcatggaatg | 1320 |
| tataagtgcc | aaagggaacc | atccaaggag | gtggtttggg | cagaacccgt | cacagggatc | 1380 |
| ttattcaagt | ctcctattcc | gactcatttc | tcactaagtt | cctcttggct | acctggggta | 1440 |
| aatggttctt | ctattgtccc | tctgacaggt | caaattcttc | tccctgaaat | cacaatggat | 1500 |
| cacttggagg | ttgtacaaca | ggttgaagca | aagatggtca | aaagtatgta | cacgaatgta | 1560 |
| gagttgtttg | gatcaacaga | ggaatttcaa | agataccaaa | ctcagggaat | tacctctgat | 1620 |
| gaacaatcaa | atacagtaaa | tccttggatt | gggcttgaaa | acctgtattt | tcagggccac | 1680 |
| catcaccatc | accattaact | gcag | | | | 1704 |

⁵

<210> 14 <211> 1908

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

| | <223> secuenc | ia que codifica S | SEQ ID NO:6 | | | | |
|---|---------------|-------------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| 5 | <400> 14 | | | | | | |
| | gaattcatga | aattcttagt | caacgttgcc | cttgttttta | tggtcgtata | catttcttac | 60 |
| | atctatgcca | atcctctctc | ctatcctaat | ggcaatcctc | tctcctatcc | taatggcatt | 120 |
| | ttgactaaca | actctactca | caatcatccc | ctatcggact | tttatatttt | ttatgagaac | 180 |
| | agttccctta | cctatactca | attccctgtg | gccccagact | gctctagtat | tctagatact | 240 |
| | agagatgagc | agtatcccac | cactgttact | ttgtggaagg | ttgatcaaga | atctcaagct | 300 |
| | gagt.ggggac | teettttate | дсаададада | attgacacca | cttactccta | gaacttctgg | 360 |

<220>

| ggcaattaca | aaggatccat | tgtatctaaa | tcctcagtac | ctctaaagga | tatcccatcg | 420 |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| ggtagtgccc | ggaatggata | ttgggctttg | agcaatgatg | aagttcaaga | gattgatcat | 480 |
| gtcccttaca | acttgagata | ttattgttac | tggtgcagaa | atgaatatcc | tgggagcttt | 540 |
| tatatgagat | atgtaaagaa | agttcggatc | ataagaaatc | ctgatgggtc | tataaagact | 600 |
| cctagaggat | cctgggttca | tgagttggac | aacttgtggg | gagatcagat | gaggtatcta | 660 |
| gttattcgaa | gatttggggg | agaatctagc | tgccctctta | agatatatga | tgtgagagca | 720 |
| ggggttctgt | caaaatctcg | gtcaaacttc | atcttagtgt | cccttccctc | cttgaatttg | 780 |
| cagttctctg | tatcacttga | atccactgag | acgaaatgct | catttggaga | taagacatat | 840 |
| gatattgtgc | agagcatggg | aggctatctc | ctctccatcg | acataggtaa | tgcgaactgg | 900 |
| cgaggccctt | gggatcctac | ccctcagcat | ccgggtcgtg | aaagaagatc | aattatggag | 960 |
| tttccggatc | aaacatcttt | cagatataac | caatttataa | attatcactc | atccccaaga | 1020 |
| cacaagagac | atgatcaaga | atttgagttc | cctctcagtc | taaaatccag | ttatgattat | 1080 |
| gctcaattta | gatatgagca | gaatttcatc | atccgacaga | tcaataagaa | ttttggatta | 1140 |
| ttacagaaga | gcatttgtga | tattcagttt | tctaagtggc | agaatctcag | tccacccaat | 1200 |
| cttgctatga | aaattgccca | ttatgtcacc | ggctctatcc | actctatagg | tggtgttcat | 1260 |
| catggatctt | attcaattca | aagaacggaa | aaatccatta | ctaaggtcaa | tctggtgttt | 1320 |
| cccattgtta | ttgttcatgg | aatgtataag | tgccaaaggg | aaccatccaa | ggaggtggtt | 1380 |
| tgggcagaac | ccgtcacagg | gatcttattc | aagtctccta | ttccgactca | tttctcacta | 1440 |
| agttcctctt | ggctacctgg | ggtaaatggt | tcttctattg | tccctctgac | aggtcaaatt | 1500 |
| cttctccctg | aaatcacaat | ggatcacttg | gaggttgtac | aacaggttga | agcaaagatg | 1560 |
| gtcaaaagta | tgtacacgaa | tgtagagttg | tttggatcaa | cagaggaatt | tcaaagatac | 1620 |
| caaactcagg | gaattacctc | tgatgaacaa | tcaaatacag | taaatccttg | gattgggctt | 1680 |
| ttgatacatg | gtggagtgtc | catagctact | ggaatattag | tagcactttt | gatcccctca | 1740 |
| atcttaaaat | tgttcagaca | tataattgag | aaaggggagg | catcgttaga | ggagaggttg | 1800 |
| catctgaggg | aaacctcaag | aaaagaattt | gtcaaggtta | gggggaaacc | atggggtgtc | 1860 |
| gaaaacctgt | attttcaggg | ccaccatcac | catcaccatt | aactgcag | | 1908 |
| <210> 15 <211> 1563 <212> ADN <213> SFRV | | | | | | |
| <400> 15 | | | | | | |

atgacacagg gaaccatgaa gccagtatgg gaagaattgg ggacaggaga aacagagttc

caagggaccg tggacattcc agggagatct ctcaagccag aaaaaacaga ttggagtgtt

| gatacatgtc | gggagatcag | tttaaatctg | aagttacctg | gtgaaatatg | gcaactggcc | 180 |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| catcaagaaa | ccatcttcaa | cagatttctt | acattttacg | ctactgggta | tgttccaaat | 240 |
| acacacacag | ccacagaaat | tgtactctcc | atggcatcac | taatcttcaa | ggacaaggcc | 300 |
| aaagcaccta | ttgatttgat | ttgggatgac | tcatttcaag | ctagtccctc | tgaggagtgt | 360 |
| gggttctccg | ttgttggaga | aactccattg | gttatcggac | aacacccgga | tgatgatgac | 420 |
| tacacattga | gagaagatga | agaatcagcc | gctatgaatg | aggaagaaaa | aatacaagca | 480 |
| gctctaaaaa | ctttgggaat | tcaagatact | ccagtagacc | tgaaggatgc | atctggaatt | 540 |
| gtctttgaga | caaaggagga | cagagaacaa | aggatcaaga | atgagaaagc | tctacatgta | 600 |
| gaggatgata | tcaacgctct | aactcagatt | acaaaacaat | tcttgtttga | gtattccaca | 660 |
| ggctccctac | agaaatttgt | tgcaaaggct | actactattt | tcatagataa | taatgctact | 720 |
| aacggcttca | cccgtttgca | tctccatgcc | atcagagtca | tgaacttcat | tgctctaaca | 780 |
| atgcttagaa | aggtaaccaa | gtcaaatgcc | cagatgatca | atgcctttct | gaaggagcaa | 840 |
| tacaagagaa | atattgcctc | cctaatcccc | ggcgccctct | cctctgattt | tgctcctccc | 900 |
| agtaagagct | gcattgataa | actgacagct | atttctaaga | atgacccggc | agtcagttca | 960 |
| ttctttgcaa | aggttgtgat | gctcaacatg | gaggaggaac | ggagaaaccc | ttctctggtt | 1020 |
| gcttgtcttg | gggcttccct | tctcacccac | accacttgga | atggaatggg | gattttacat | 1080 |
| gttatttttg | aagtttgtct | attccatcag | attagctgga | agaggttggt | cacagagtcc | 1140 |
| ctgacctcac | taacaaagat | gtcatggggt | gaagtcagtc | aattcctcat | caagtatcaa | 1200 |
| gcaaagggaa | atcctgaccc | aacggttgcc | tgggccagaa | tcattgatga | ttcttacttt | 1260 |
| atgagattaa | ccatagtaaa | tcatcccaca | cttgctgcat | tattagtgga | atccctcata | 1320 |
| agatctcaga | aagatgatgg | aatcctgaat | gccaactggg | ccatccaaca | cagggacacc | 1380 |
| atcaattatt | atagggacgc | tgccaagctt | ctcactgata | agctcacagg | acagactgct | 1440 |
| acagtccaag | cccttaccaa | tgaagccgct | gatctagtta | gaacaatgaa | tgcaggaccc | 1500 |
| tctagatacc | acccaaggcc | tagtaccctt | atccccatgg | tagatctaaa | cccggaagac | 1560 |
| tta | | | | | | 1563 |

<210> 16 5

10

<211> 1617

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia que codifica SEQ ID NO:8

<400> 16

| 60 | aggagaaaca | aattggggac | gtatgggaag | catgaagcca | cacagggaac | ggatccatga |
|------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 120 | aacagattgg | agccagaaaa | agatetetea | cattccaggg | ggaccgtgga | gagttccaag |
| 180 | aatatggcaa | tacctggtga | aatctgaagt | gatcagttta | catgtcggga | agtgttgata |
| 240 | tgggtatgtt | tttacgctac | tttcttacat | cttcaacaga | aagaaaccat | ctggcccatc |
| 300 | cttcaaggac | catcactaat | ctctccatgg | agaaattgta | acacagccac | ccaaatacac |
| 360 | tccctctgag | ttcaagctag | gatgactcat | tttgatttgg | cacctattga | aaggccaaag |
| 420 | cccggatgat | tcggacaaca | ccattggtta | tggagaaact | tctccgttgt | gagtgtgggt |
| 480 | agaaaaaata | tgaatgagga | tcagccgcta | agatgaagaa | cattgagaga | gatgactaca |
| 540 | ggatgcatct | tagacctgaa | gatactccag | gggaattcaa | taaaaacttt | caagcagctc |
| 600 | gaaagctcta | tcaagaatga | gaacaaagga | ggaggacaga | ttgagacaaa | ggaattgtct |
| 660 | gtttgagtat | aacaattctt | cagattacaa | cgctctaact | atgatatcaa | catgtagagg |
| 720 | agataataat | ctattttcat | aaggctacta | atttgttgca | ccctacagaa | tccacaggct |
| 780 | cttcattgct | gagtcatgaa | catgccatca | tttgcatctc | gcttcacccg | gctactaacg |
| 840 | ctttctgaag | tgatcaatgc | aatgcccaga | aaccaagtca | ttagaaaggt | ctaacaatgc |
| 900 | tgattttgct | ccctctcctc | atccccggcg | tgcctcccta | agagaaatat | gagcaataca |
| 960 | cccggcagtc | ctaagaatga | acagctattt | tgataaactg | agagctgcat | cctcccagta |
| 1020 | aaacccttct | aggaacggag | aacatggagg | tgtgatgctc | ttgcaaaggt | agttcattct |
| 1080 | aatggggatt | cttggaatgg | acccacacca | ttcccttctc | gtcttggggc | ctggttgctt |
| 1140 | gttggtcaca | gctggaagag | catcagatta | ttgtctattc | tttttgaagt | ttacatgtta |
| 1200 | cctcatcaag | tcagtcaatt | tggggtgaag | aaagatgtca | cctcactaac | gagtccctga |
| 1260 | tgatgattct | ccagaatcat | gttgcctggg | tgacccaacg | agggaaatcc | tatcaagcaa |
| 1320 | agtggaatcc | ctgcattatt | cccacacttg | agtaaatcat | gattaaccat | tactttatga |
| 1380 | ccaacacagg | actgggccat | ctgaatgcca | tgatggaatc | ctcagaaaga | ctcataagat |
| 1440 | cacaggacag | ctgataagct | aagcttctca | ggacgctgcc | attattatag | gacaccatca |
| 1500 | aatgaatgca | tagttagaac | gccgctgatc | taccaatgaa | tccaagccct | actgctacag |
| 1560 | tctaaacccg | ccatggtaga | accettatee | aaggcctagt | gataccaccc | ggaccctcta |
| 1617 | actgcag | atcaccatta | caccatcacc | ttttcagggc | aaaacctgta | gaagacttag |

⁵ <210> 17

<211> 26 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

¹⁰

<223> cebador directo para la construcción SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13

| | <400> 17 aaaaaagaat tcatggtttt cttaag 26 | |
|----|--|----|
| 5 | <210> 18 <211> 66 <212> ADN | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| 10 | <220> <223> cebador inverso para la construcción SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14 | |
| | <400> 18 | |
| | tttttctgca gttaatggtg atggtgatgg tggccctgaa aatacaggtt ttcgacaccc | 60 |
| 15 | catggt | 66 |
| | <210> 19 <211> 68 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 20 | <220> | |
| | <223> cebador inverso para la construcción SEQ ID NO:13 | |
| 25 | <400> 19 | |
| | ttttttctgc agttaatggt gatggtgatg gtggccctga aaatacaggt tttcaagccc | 60 |
| | aatccaag | 68 |
| 30 | <210> 20 <211> 99 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 05 | <220> <223> cebador directo para la construcción SEQ ID NO:14 | |
| 35 | <400> 20 | |
| | tatatagaat tcatgaaatt cttagtcaac gttgcccttg tttttatggt cgtatacatt | 60 |
| | tcttacatct atgccaatcc tctctcctat cctaatggc | 99 |
| 40 | <210> 21 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> <223> cebador directo para la construcción SEQ ID NO:16 | |
| 50 | <400> 21 aaaaaaggat ccatgacaca gg 22 | |
| | <210> 22 <211> 66 <212> ADN | |
| 55 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> <223> cebador inverso para la construcción SEQ ID NO:16 | |

| | <400> 22 | |
|----|---|----|
| | tttttctgca gttaatggtg atggtgatgg tggccctgaa aatacaggtt ttctaagtct | 60 |
| | tccggg | 66 |
| 5 | <210> 23 <211> 233 <212> PRT <213> Circovirus porcino | |
| 10 | <400> 23 | |

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

<210> 24 <211> 552 <212> PRT

| <213> | Virus | de | la | aripe | aviar |
|-------|--------|----|----|-------|-------|
| -210 | VIIIGO | au | ıu | 91190 | aviai |

<400> 24

| Asp | Gln | Ile | Cys | Ile | Gly | Tyr | His | Ala | Asn | Asn | Ser | Thr | Glu | Gln | Val |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

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

| Asn | Pro | Thr 195 | Thr | Tyr | Ile | Ser | Val 200 | Gly | Thr | Ser | Thr | Leu 205 | Asn | Gln | Arg |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Leu | Val 210 | Pro | Lys | Ile | Ala | Thr 215 | Arg | Ser | Lys | Val | Asn 220 | Gly | Gln | Asn | Gly |
| Arg 225 | Met | Asp | Phe | Phe | Trp 230 | Thr | Ile | Leu | Lys | Pro 235 | Asn | Asp | Ala | Ile | Asn 240 |
| Phe | Glu | Ser | Asn | Gly 245 | Asn | Phe | Ile | Ala | Pro 250 | Glu | Tyr | Ala | Tyr | Lys 255 | Ile |
| Val | Lys | Lys | Gly 260 | Asp | Ser | Ala | Ile | Met 265 | Lys | Ser | Glu | Val | Glu 270 | Tyr | Gly |
| Asn | Суѕ | Asn 275 | Thr | Lys | Cys | Gln | Thr 280 | Pro | Met | Gly | Ala | Ile 285 | Asn | Ser | Ser |
| Met | Pro 290 | Phe | His | Asn | Ile | His 295 | Pro | Leu | Thr | Ile | Gly 300 | Glu | Cys | Pro | Lys |
| Tyr 305 | Val | Lys | Ser | Asn | Lys 310 | Leu | Val | Leu | Ala | Thr 315 | Gly | Leu | Arg | Asn | Ser 320 |
| Pro | Gln | Arg | Glu | Arg 325 | Arg | Arg | Lys | Lys | Arg 330 | Gly | Leu | Phe | Gly | Ala 335 | Ile |
| Ala | Gly | Phe | 11e 340 | Glu | Gly | Gly | Trp | Gln 345 | Gly | Met | Val | Asp | Gly 350 | Trp | Tyr |
| Gly | | His 355 | His | Ser | Asn | | Gln 360 | Gly | Ser | Gly | Tyr | Ala 365 | Ala | Asp | Lys |
| Glu | Ser 370 | Thr | Gln | Lys | Ala | Ile 375 | Asp | Gly | Val | Thr | Asn 380 | Lys | Val | Asn | Ser |
| Ile 385 | Ile | Asp | Lys | Met | Asn 390 | Thr | Gln | Phe | Glu | Ala 395 | Val | Gly | Arg | Glu | Phe 400 |
| Asn | Asn | Leu | Glu | Arg 405 | Arg | Ile | Glu | Asn | Leu 410 | Asn | Lys | Lys | Met | Glu 415 | Asp |
| Gly | Phe | Leu | Asp 420 | Val | Trp | Thr | Tyr | Asn 425 | Ala | Glu | Leu | Leu | Val 430 | Leu | Met |
| Glas | Aen | Glu | Arc | Thr | Len | Aen | Dhe | Wie | Aen | Sor | Aen | 17a 1 | Luc | Aen | Len |

| | | 435 | | | | 440 | | | | 445 | | | | | | | |
|----|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | Tyr | Asp 450 | Lys | Val | Arg | Leu | Gln 455 | Leu | Arg | Asp | Asn | Ala 460 | Lys | Glu | Leu | Gly |
| | | Asn 465 | Gly | Cys | Phe | Glu | Phe 470 | Tyr | His | Lys | Cys | Asp 475 | Asn | Glu | Cys | Met | Glu 480 |
| | | Ser | Val | Arg | Asn | Gly 485 | Thr | Tyr | Asp | Tyr | Pro 490 | Gln | Tyr | Ser | Glu | Glu 495 | Ala |
| | | Arg | Leu | Lys | Arg 500 | Glu | Glu | Ile | Ser | Gly 505 | Val | Lys | Leu | Glu | Ser 510 | Ile | Gly |
| | | Thr | Tyr | Gln 515 | Ile | Leu | Ser | Ile | Tyr 520 | Ser | Thr | Val | Ala | Ser 525 | Ser | Leu | Ala |
| | | Leu | Ala 530 | Ile | Met | Val | Ala | Gly 535 | Leu | Ser | Leu | Trp | Met 540 | Cys | Ser | Asn | Gly |
| | | Ser 545 | Leu | Gln | Cys | Arg | Ile 550 | Cys | Ile | | | | | | | | |
| 5 | <210> : <211> <212> : <213> : | 18 ADN | encia a | ırtificia | I | | | | | | | | | | | | |
| | <220> <223> Secuencia artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | <400> 25 ctattgtccc tctgacag | | | | | 18 | | | | | | | | | | | |
| 15 | <210> 26 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | <220> <223> Secuencia artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> 26 gaccatcttt gcttcaacc | | | | | 19 | | | | | | | | | | | |
| 25 | <210> 27 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | <220> <223> Secuencia artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | <400> 27 caacctccaa gtgatccatt gtg | | | | | | | | 23 | | | | | | | | |
| | <210> 28 | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | <211> 126 <212> ADN <213> Secuencia artificial | | | | | | | | | |
|----|--|------------|------------|------------|------------|-----|--|--|--|--|
| 5 | <220> <223> Secuencia artificial | | | | | | | | | |
| | <400> 28 | | | | | | | | | |
| | cctggggtaa atggttcttc | tattgtccct | ctgacaggtc | aaattcttct | ccctgaaatc | 60 | | | | |
| | acaatggatc acttggaggt | tgtacaacag | gttgaagcaa | agatggtcaa | aagtatgtac | 120 | | | | |
| 10 | acgaat | | | | | 126 | | | | |

REIVINDICACIONES

- 1. Un método para determinar si un individuo recibió una composición inmunógena que comprende una proteína recombinante producida mediante un sistema de expresión de baculovirus en células cultivadas de *Spodoptera frugiperda* (Sf) o células cultivadas de una línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda*.
- en donde el método comprende determinar en una muestra biológica obtenida de dicho individuo la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para uno o más antígenos de un virus de ARN capaz de infectar células de *Spodoptera frugiperda* (Sf) o células de una línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda*, en donde dicho virus de ARN es un virus que pertenece a la familia *Rhabdoviridiae*,
- y en donde la presencia de dichos anticuerpos en la muestra biológica indica que el individuo recibió la composición inmunógena.
 - 2. El método de la reivindicación 1, en donde uno o más antígenos de un virus de ARN capaz de infectar células de insecto es una proteína que comprende o consiste en
- 15 una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1.
 - 3. El método de la reivindicación 1 o 2 que comprende las etapas de:

5

20

40

45

50

- a. poner en contacto la muestra biológica con un reactivo de captura inmovilizado en un soporte sólido, en donde el reactivo de captura inmovilizado es capaz de fijar dichos anticuerpos; y
 - b. determinar la presencia o ausencia de dichos anticuerpos unidos al reactivo de captura, en donde la presencia de dichos anticuerpos unidos al reactivo de captura indica la presencia de dichos anticuerpos en la muestra biológica.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en donde el reactivo de captura se selecciona del grupo que consiste en:
 - a. una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 6:
- b. un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, en donde dicho virus de ARN es un virus que pertenece a la familia *Rhabdoviridiae* y en donde el virus se inactivó opcionalmente y/o en donde el virus es opcionalmente un virus completo semipurificado.
 - 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde
- 35 el virus de ARN capaz de infectar células de insecto es un virus que comprende:
 - i. una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1; y/o
 - ii. una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7; y/o
 - iii. el virus de ARN capaz de infectar células de insecto es un virus cuyo genoma comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1; y/o
 - iv. una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:7; y/o
 - v. dicho virus de ARN capaz de infectar células de insecto es un virus cuyo genoma comprende una molécula de ARN que tiene una secuencia que es inversamente complementaria con una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:9;
 - vi. y/o una secuencia que es inversamente complementaria con una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:15.
 - 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el método comprende:
- determinar en la muestra biológica la presencia o ausencia de uno o más marcadores, en donde los marcadores son anticuerpos específicos para una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1; y en donde el método comprende las etapas de:
- a. poner en contacto la muestra biológica con un reactivo de captura inmovilizado en un soporte sólido, en
 donde el reactivo de captura se selecciona del grupo que consiste en:
 - i. una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 6,
 - ii. un virus opcionalmente inactivado que comprende una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1; y/o

iii. un virus cuyo genoma comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1; y/o

una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7, en donde el virus se inactivó opcionalmente.

iv. un virus cuyo genoma comprende una molécula de ARN que comprende una secuencia que es complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:9; y/o una secuencia que es complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos que tiene 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:15. en donde el virus se inactivó opcionalmente; y/o

v. un péptido sintético que tiene una secuencia seleccionada de las secuencias que consisten 5 a 11 residuos amino consecutivos de SEQ ID NO:1; y

b. separar la muestra biológica del reactivo de captura inmovilizado;

5

10

15

35

40

45

55

60

- c. poner en contacto el complejo reactivo de captura inmovilizado-anticuerpo con un agente detectable que se une al anticuerpo del complejo reactivo-anticuerpo; y
- d. medir el nivel de anticuerpo unido al reactivo de captura usando un medio de detección para el agente detectable.
- 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la etapa de medición (d) también comprende una comparación con una curva estándar para determinar el nivel de anticuerpo unido al reactivo de captura y/o en donde el agente detectable que se fija al anticuerpo del complejo anticuerpo-reactivo es un anticuerpo detectable, preferentemente, un anticuerpo secundario etiquetado.
- 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en donde el reactivo de captura es una proteína expresada por baculovirus, y en donde la proteína expresada por baculovirus es expresada preferentemente por un baculovirus recombinante, en donde dicho baculovirus comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína que comprende o que consiste en
- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 6;
 - en donde dicho baculovirus comprende una secuencia de ADN que comprende o que consiste en:
 - una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:9 a 14.
 - 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que también comprende la etapa de determinar, en la muestra biológica, la presencia de uno o más analitos seleccionados del grupo que consiste en anticuerpos específicos para la proteína recombinante, un polipéptido específico para la proteína recombinante, una secuencia de nucleótidos específica para la secuencia de ADN que codifica la proteína recombinante.
 - 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la proteína recombinante se selecciona del grupo que consiste en la proteína ORF2 de PCV2, en donde la proteína ORF2 de PCV2 es preferentemente una proteína que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:23, y hemaglutinina de la gripe, preferentemente, hemaglutinina de la gripe aviar, en particular, la proteína H5 del virus H5N1, en donde la hemaglutinina de la gripe aviar o la proteína H5 del virus H5N1 es preferentemente una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:24.
- 50 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha composición inmunógena
 - una composición inmunógena que comprende una proteína recombinante producida mediante un sistema de expresión de baculovirus en células de insecto cultivadas, y uno o más antígenos de un virus que es un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, o
 - una composición inmunógena que comprende una proteína recombinante producida por un sistema de expresión de baculovirus en células de insecto cultivadas, y uno o más antígenos de un virus que es un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, en donde se inactivó el virus de ARN capaz de infectar células de insecto

y/o en donde la proteína recombinante se selecciona del grupo que consiste en:

- a. una proteína ORF2 de PCV2 que, preferentemente, comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:23,
- b. hemaglutinina de la gripe, preferentemente, hemaglutinina de la gripe aviar, en particular, la proteína H5 del virus H5N1, en donde la hemaglutinina de la gripe aviar o la proteína del virus H5 es preferentemente una

proteína que comprende o consiste en

una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:24; y

- c. una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 8, y/o el virus de ARN capaz de infectar células de insecto es un virus que comprende una proteína que comprende o consiste en:
 - i. una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1; y/o
 - ii. una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7; y/o
- un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, y cuyo genoma comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende o consiste en:
 - i. una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO:1: v/o
 - ii. una proteína que comprende o que consiste en una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7; y/o
 - c. un virus de ARN capaz de infectar células de insecto cuyo genoma comprende:
 - i. una molécula de ARN que tiene una secuencia que es complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:9; y/o
 - ii. una secuencia que es complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:15:

y/o

5

10

15

20

25

45

65

- en donde la muestra biológica se ha aislado de un mamífero o un ave, preferentemente de un cerdo o un pollo, y/o en donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, plasma sanguíneo, suero, orina y fluidos orales, y/o en donde el reactivo de captura inmovilizado se usa para recubrir una placa de microtítulo.
- 12. Un kit para determinar si un individuo recibió una composición inmunógena que comprende una proteína recombinante producida por un sistema de expresión de baculovirus en células cultivadas de *Spodoptera frugiperda* (Sf) o células de una línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda*, en donde el kit contiene uno o más reactivos de captura inmovilizados en un soporte sólido, en donde uno o más reactivos de captura inmovilizados son capaces de fijar anticuerpos específicos para uno o más antígenos de un virus de ARN capaz de infectar células de *Spodoptera frugiperda* (Sf) o células de una línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda*, en donde dicho virus

y en donde uno o más reactivos de captura se seleccionan del grupo que consiste en:

de ARN es un virus que pertenece a la familia Rhabdoviridae,

- a. una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 6;
 b. un virus de ARN capaz de infectar células de *Spodoptera frugiperda* (Sf) o células de una línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda*, en donde dicho virus de ARN es un virus que pertenece a la familia *Rhabdoviridiae*, y en donde el virus se inactivó.
- 50 13. El kit de la reivindicación 12, en donde dicho virus de ARN comprende o consiste en:
 - a. un virus de ARN capaz de infectar células de insecto que comprende o consiste en:
- i. una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1; y/o
 - ii.una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7; y/o
- b. un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, cuyo genoma comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende o consiste en:
 - i. una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1; y/o ii. una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7; y/o
 - c. un virus de ARN capaz de infectar células de insecto cuyo genoma comprende:

i. una molécula de ARN que tiene una secuencia que es complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:9; y/o ii. una secuencia que es complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:15.

14. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, en donde dichos uno o más antígenos de un virus de ARN capaz de infectar células de insecto es una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1.

5

10

40

50

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o el kit de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 en donde dichas células de *Spodoptera frugiperda* (Sf) o células de una línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda* se seleccionan del grupo que consiste en células Sf9 y células Sf+.

- 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11 o 15, o el kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en donde el reactivo de captura comprende o consiste en partículas virales y/o partículas tipo virus de un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, y en donde la composición o el reactivo de captura se pueden obtener mediante un método que comprende las etapas de
- i) obtener un sobrenadante de un cultivo de células de insecto infectadas con un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, en donde el sobrenadante comprende partículas virales y/o partículas tipo virus del virus de ARN, y en donde las células de insecto infectadas con un virus de ARN capaz de infectar células de insecto no se infectan preferentemente con un baculovirus y/o no se transfectan preferentemente con un plásmido,
- ii) separar los residuos celulares de las partículas virales y/o partículas tipo virus mediante una etapa de separación que incluye una microfiltración a través de al menos un filtro, preferentemente, dos filtros, en donde al menos un filtro que tiene, preferentemente, un tamaño de poro mayor que las partículas virales y/o partículas tipo virus, en particular, que tiene un tamaño de poro de alrededor de 0,1 μm a alrededor de 4 μm, preferentemente, de alrededor de 0,2 μm a alrededor de 2 μm,
- 30 iii) y, opcionalmente, someter el filtrado de ii) que contiene las partículas virales y/o partículas tipo virus a cromatografía de exclusión por tamaño, en donde la presencia de proteína en el eluyente se determina midiendo la absorbancia de luz a 260 nm o 280 nm (A₂₆₀ o A₂₈₀), y en donde, preferentemente, se recolecta el eluyente que exhibe el primer pico A₂₆₀ o A₂₈₀.
- 35 17. El kit o el método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el virus de ARN comprende o consiste en:
 - a. un virus de ARN capaz de infectar células de insecto que comprende o consiste en:
 - i. una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1; y/o
 - ii. una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7; y/o
- b. un virus de ARN capaz de infectar células de insecto, cuyo genoma comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que comprende o consiste en:
 - i. una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:1; y/o
 - ii. una proteína que comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:7; y/o
 - c. un virus de ARN capaz de infectar células de insecto cuyo genoma comprende:
 - i. una molécula de ARN que tiene una secuencia que es complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:9; y/o
- 55 ii. una secuencia que es complementaria inversa de una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO:15.

FIG. 1

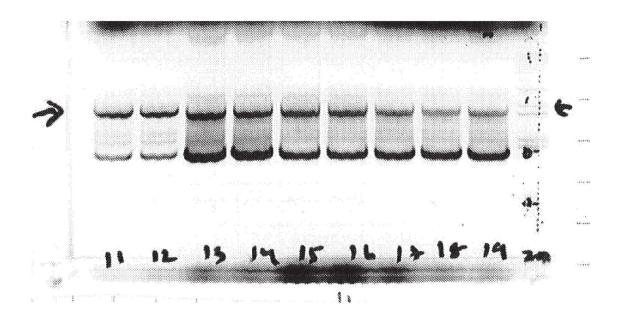


FIG. 2

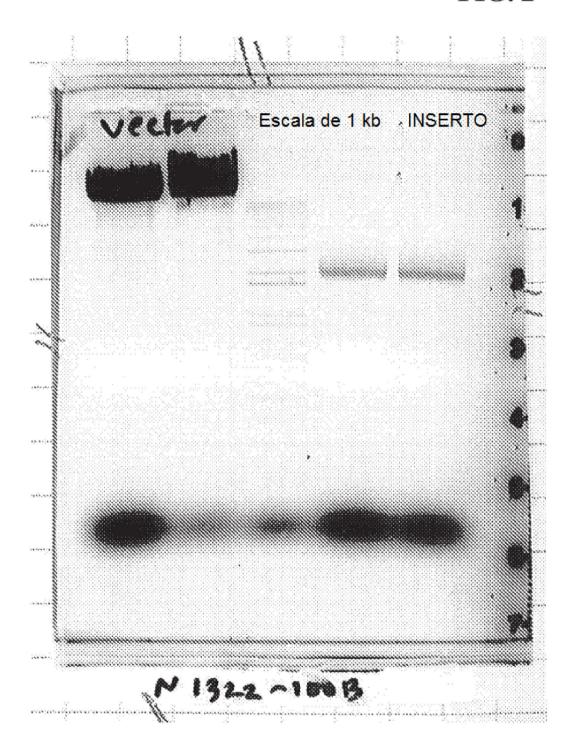
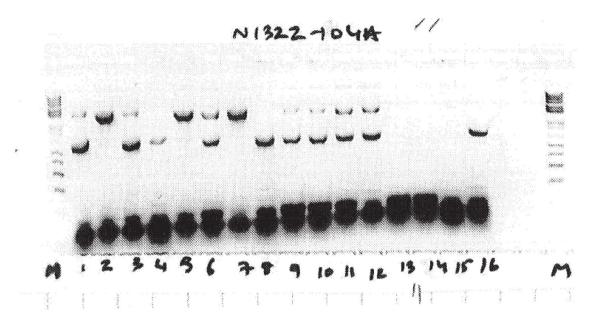
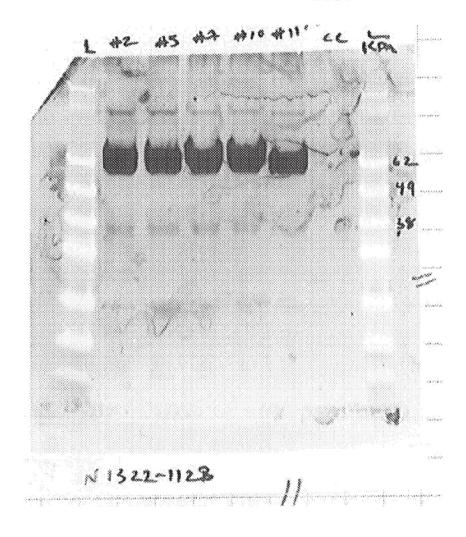


FIG. 3







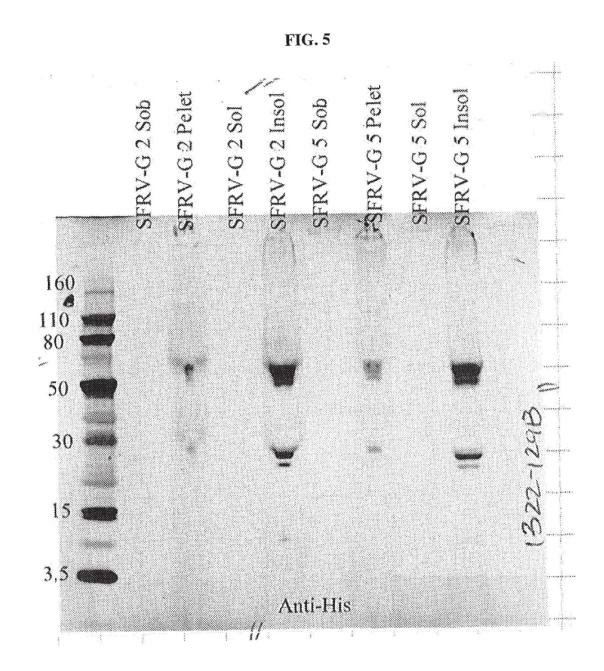


FIG. 6

