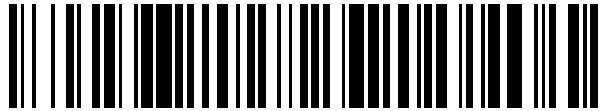


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 302**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A01K 67/033 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/866 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2012 PCT/EP2012/061088**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12168493**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2012 E 12753914 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2858490**

54 Título: **Elementos de ADN recombinante para la expresión de proteínas recombinantes en insectos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2017

73 Titular/es:

**ALTERNATIVE GENE EXPRESSION, S.L. (100.0%)
Campus de Montegancedo
28223 Pozuelo de Alarcon, Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**GOMEZ SEBASTIAN, SILVIA;
LÓPEZ VIDAL, JAVIER y
MARTINEZ ESCRIBANO, JOSÉ ANGEL**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 611 302 T3

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

DESCRIPCIÓN

Elementos de ADN recombinante para la expresión de proteínas recombinantes en insectos

5 **Campo de la invención**

La presente invención puede incluirse en el campo de la biotecnología y cubre insectos que comprenden secuencias de ácido nucleico que comprenden, por ejemplo, promotores, regiones homólogas (*hr*) como potenciadores y secuencias que codifican reguladores de la transcripción, por ejemplo, el ADNc de *Ac-*ie-01** de baculovirus, o cualquier combinación de los mismos, que pueden aumentar la eficacia de la expresión de proteínas recombinantes, por ejemplo, en larvas de insectos. Además, la presente invención también se refiere a métodos que usan los insectos anteriormente mencionados de la invención infectados, transformados, transducidos o transfectados con esas secuencias o vectores, y a métodos para producir proteínas usando los insectos anteriormente mencionados.

15 **Estado de la técnica**

El sistema de vector de expresión de baculovirus (BEVS) es un método bien establecido para la producción de proteínas recombinantes que van a usarse como vacunas, moléculas terapéuticas o reactivos de diagnóstico. Con su potencial para la sobreexpresión y rápida velocidad de desarrollo, BEVS es una de las opciones más atractivas para producir proteínas recombinantes para cualquier fin. El vector de baculovirus más empleado usado en la industria para la expresión de proteínas recombinantes se basa en el virus de la poliedrosis multinuclear de *Autographa californica* (AcMNPV) con células de insecto *Spodoptera frugiperda* 9 (*Sf9*) o 21 (*Sf21*) como huéspedes de expresión adecuados (1), así como larvas de insectos de *Trichoplusia ni* (*T. ni*) como biofábricas vivas (2). Desde que se desarrolló el BEVS en la década de 1980 (3), se han producido satisfactoriamente cientos de proteínas recombinantes, que van desde enzimas citosólicas hasta proteínas unidas a membrana, en células de insecto infectadas por baculovirus.

En todo el mundo se producen aproximadamente 70.000 toneladas de seda al año en un procedimiento que convierte un sustrato de poco valor, las hojas de la morera, en un producto basado en proteína de alto valor: seda. Los insectos son productores de proteína altamente eficaces debido a su metabolismo acelerado. Los lepidópteros, tales como *Bombyx mori* o *Trichoplusia ni*, son dos de los insectos más usados en biotecnología. Crecen en tamaño aproximadamente 5000 veces en menos de 2 semanas y producen más de un kilómetro de seda por insecto. Mientras que una célula de una glándula de la seda puede producir aproximadamente 80 µg de proteína/célula/día, los mejores sistemas de cultivo de células de mamífero sólo producen aproximadamente 50 pg de proteína/célula/día. Las preocupaciones que surgen de una posible contaminación por agentes casuales (tales como virus o priones) de proteínas recombinantes obtenidos a partir de células de mamífero en cultivo son sustancialmente menores, si no están totalmente ausentes, en el caso de productos derivados de insectos para uso en seres humanos o animales. Aunque se han generado gusanos de seda transgénicos para producir proteínas terapéuticas humanas (4), aún no se ha usado esta tecnología para producir antígenos de vacunas. Sin embargo, se han usado baculovirus genéticamente modificados (virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* y nucleopoliedrovirus de *Bombyx mori*) para generar vacunas derivadas de insectos (insectígenos). Básicamente, los mismos baculovirus usados para la expresión de antígenos en cultivos de células de insecto pueden usarse para infectar larvas de insectos. Tras la infección, el antígeno recombinante se acumula en tejidos de insecto y, tras 3-4 días de infección, las larvas pueden procesarse para obtener el antígeno recombinante en cantidades que pueden alcanzar entre varios cientos de µg hasta varios miligramos por larva infectada. Se han sometido a prueba vacunas experimentales frente a enfermedades infecciosas de animales con muy buenos resultados, incluso usando antígenos solubles no purificados obtenidos de larvas, sin ningún efecto secundario en animales tras protocolos de inmunización repetida (5, 6, 7, 8). También se han producido otras proteínas con diferentes aplicaciones en insectos como biofábricas vivas, tales como enzimas (9, 10), anticuerpos (11, 12), hormonas (13, 14), citocinas (15, 16) y proteínas de diagnóstico (17, 18, 19, 20). La mayoría de estas proteínas anteriormente mencionadas se procesaron correctamente tras la síntesis y sus actividades funcionales permanecieron intactas en extractos de proteínas de larva solubles. Los insectos como biofábricas vivas constituyen una alternativa prometedora a tecnologías de fermentación convencionales y también a proteínas derivadas de plantas debido a la versatilidad de producción, ajuste a escala, eficacia y velocidad de desarrollo.

La aceleración de la expresión de proteínas recombinantes, de modo que la expresión de proteínas tenga lugar antes de que la maquinaria celular de larvas de insectos se vea gravemente alterada por la infección por baculovirus, sería una mejora importante del BEVS. La expresión tardía, impulsada por los promotores de virus fuertes convencionales de genes de la polihedrina (*polh*) o *p10*, tiene graves desventajas en las modificaciones postraduccionales de proteínas foráneas. Se han caracterizado promotores de baculovirus que permiten una expresión más temprana que los promotores *polh* o *p10* usados convencionalmente y se han usado para la producción de proteínas heterólogas, pero mostraron una productividad reducida (21).

Otra posibilidad para mejorar el BEVS sería aumentar la conservación de la integridad celular en momentos tardíos tras la infección reduciendo la muerte celular inducida por virus. La reducción en la alteración grave de la maquinaria celular del insecto en momentos tardíos tras la infección provocada por BEVS no sólo deberá aumentar el intervalo

de tiempo para producir y acumular proteínas recombinantes (secretadas o no), sino también permitir más tiempo para el plegamiento de proteínas de complejo o cualquier modificación postraduccional de las proteínas producidas. Las larvas de insectos infectadas por baculovirus producen y acumulan proteínas recombinantes durante el transcurso de la infección y de una manera dependiente de la dosis de virus. Una supervivencia prolongada de las larvas infectadas junto con una determinada protección frente a altas dosis de infección, aumentará drásticamente la productividad de insectos que sirven como biofábricas vivas.

Se ha determinado que algunos elementos de ADN de baculovirus están implicados en la activación de genes de factor de expresión tardía, que son necesarios para la propagación del virus. Uno de ellos es la proteína inmediata temprana (ie) IE-1 y su variante de corte y empalme IE-0 de AcMNPV (virus de la poliedrosis multinuclear de *Autographa californica*). La traducción de los ARNm de AcMNPV codificados por ADNc de *Ac-ie-01* da como resultado la producción tanto de IE-0 como de IE-1 debido a la iniciación de la traducción interna. Se piensa que ambas son mediadores críticos de la expresión de genes de baculovirus debido a su potencia como reguladores de la transcripción (22). Sintetizada de manera muy temprana durante la infección, IE-1 de AcMNPV es una proteína de unión a ADN dimerica de 67 kDa que estimula la transcripción en ensayos de transfección de plásmido mediante la actividad de su dominio ácido N-terminal (23, 24). IE-1 se acumula dentro del núcleo, en el que se mantiene a lo largo de momentos tardíos (25). La transactivación por IE-1 se ve potenciada por su unión como homodímero a las secuencias de región homóloga (*hr*) de baculovirus, que funcionan como potenciadores de la transcripción y orígenes de replicación de ADN viral. La proteína inmediata temprana de AcMNPV, IE-0 (74 kDa), es idéntica a IE-1 excepto por 54 residuos de aminoácido adicionales en su extremo N-terminal. IE-0 de AcMNPV es una proteína de 636 aminoácidos, de 72,6 kDa, compuesta por 38 aminoácidos codificados por *orf141* (*exon0*), 16 aminoácidos codificados por la secuencia líder no traducida en el sentido de 5' de *ie1*, y la proteína IE-1 de 582 aminoácidos completa. El producto final es, por tanto, idéntico a IE-1 excepto por los 54 aminoácidos adicionales condensados al extremo N-terminal. Supuestamente, debido a sus secuencias comunes, IE-0 e IE-1 comparten actividades bioquímicas, incluyendo unión a potenciador de *hr* y regulación de la transcripción.

Dada la falta de promotores alternativos novedosos más fuertes que los usados comercialmente (*polh* y *p10*) y de cualquier alternativa a la implementación de expresión a largo plazo en el sistema de baculovirus reduciendo el daño a la célula inducido por virus, la presente invención se centra en resolver dichos problemas por medio de la incorporación de elementos de ADN recombinante en casetes de expresión de baculovirus. La presente invención muestra sorprendentemente que dichos casetes de expresión, que contienen reguladores de la transcripción de baculovirus, una secuencia de región homóloga (*hr*) de potenciador y un promotor o una combinación de promotores, pueden aumentar la producción de proteínas recombinantes hasta niveles sin precedentes en larvas de insectos. Adicionalmente, los casetes de expresión tal como se describen también aumentan la tasa de supervivencia de larvas de insectos infectadas por baculovirus en momentos tardíos tras la infección usando altas dosis de infección, minimizando, por tanto, el efecto de patogenicidad en insectos provocado por la infección por baculovirus. Por otro lado, una mejora en la integridad de las funciones celulares durante la infección por baculovirus también contribuye al correcto procesamiento postraduccional de proteínas recombinantes en larvas de insectos.

V.J. Valdes *et al.* divulgan el uso de ARN bicatenario para prevenir infecciones virales *in vitro* e *in vivo* mediante baculovirus recombinante (V. J. Valdes *et al.*, Journal of Biological Chemistry, vol. 278, n.º 21, 16 de mayo de 2003, páginas 19317 - 19234). El documento EP1 811 027 divulga polinucleótidos para la producción de proteínas recombinantes en gusanos de seda.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona productos y métodos para la expresión mejorada de proteínas recombinantes en larvas de insectos infectadas por baculovirus, tal como también se define en las reivindicaciones:

1. Insecto derivado del género *Lepidoptera*, que comprende elementos de ácido nucleico introducidos en el insecto mediante un baculovirus recombinante que contiene un gen *Ac-ie-01* endógeno, en el que dichos elementos de ácido nucleico comprenden

(a) una copia adicional de ADNc de *Ac-ie-01* de baculovirus como transgén bajo el control de un promotor adecuado que permite la expresión de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas que funcionan como reguladores de la transcripción por encima de niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus, en el que el ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en:

i. un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 1-5;

ii. una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 75 %, más preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 % y lo más preferiblemente al menos el 95 % con la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 1-5 y que codifica una proteína que puede funcionar como regulador de la transcripción en un baculovirus recombinante;

iii. una secuencia de ácido nucleico que codifica un aminoácido que contiene la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 6-9; y

5 iv. una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una similitud de secuencia de al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 75 %, más preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 % y lo más preferiblemente al menos el 95 % con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 6-9 y que puede funcionar como regulador de la transcripción en un baculovirus recombinante;

10 (b) en el que el insecto comprende además al menos una región homóloga (*hr*) recombinante como región de potenciador, operativamente unida a cualquier promotor que es adecuado para impulsar la expresión de una proteína recombinante,

15 (c) en el que el promotor que impulsa la expresión de dicha proteína recombinante se selecciona del grupo de ácidos nucleicos que comprende:

i. un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 10-16; y

20 ii. una secuencia de ácido nucleico que puede funcionar como promotor en un baculovirus recombinante y que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 75 %, más preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 % y lo más preferiblemente al menos el 95 % con la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 10-16.

25 2. Insecto según el punto 1, en el que la región homóloga (*hr*) recombinante es la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 27 (*hr1*).

30 3. Insecto según cualquiera de los puntos 1-2, en el que la secuencia de ácido nucleico que comprende combinaciones de promotores recombinantes, las secuencias que codifican reguladores de la transcripción y regiones de potenciador se seleccionan del grupo que comprende SEQ ID NO: 17-26.

35 4. Insecto según cualquiera de los puntos 1-3, en el que el insecto se selecciona del grupo que consiste en *Trichoplusia ni*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Ascalapha odorata*, *Bombyx mori*, *Rachiplusia ni* y *Estigmene acrea*.

5. Insecto según cualquiera de los puntos 1-4, en el que la(s) secuencia(s) de ácido nucleico se introduce(n) en el insecto mediante un baculovirus recombinante seleccionado de *AcMNPV* o *BmNPV*.

40 6. Insecto según cualquiera de los puntos 1-5, que comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante, en el que dicha secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de ácido nucleico de los puntos 1-3.

45 7. Método para producir una proteína recombinante que comprende el uso de un insecto del punto 6 y la extracción y purificación de la proteína recombinante mediante medios convencionales.

50 8. Método para producir una proteína recombinante según el punto 7, en el que la proteína recombinante se selecciona del grupo que comprende vacuna monomérica de subunidades, vacuna multimérica de subunidades, partícula de tipo virus, proteína terapéutica, anticuerpo, enzima, citocina, factor de coagulación de la sangre, anticoagulante, receptor, hormona o reactivo de proteína de diagnóstico.

Breve descripción de las figuras

55 Figura 1: Representación esquemática de los elementos de ADN recombinante de baculovirus de la invención, que comprenden cuatro elementos principales: una secuencia que codifica reguladores de la transcripción (A; por ejemplo, IE0 e IE1), cuya expresión se impulsa por un promotor (B; por ejemplo, *polh* o *pB2_g*); una secuencia de región homóloga (*hr*) de potenciador (C; por ejemplo, *hr1*), en el sentido de 5' de los promotores (D; por ejemplo, *p10*, *pB2_gp10* o *p6.9p10*) que impulsan la expresión del gen foráneo que codifica la proteína recombinante. El esquema muestra el mecanismo teórico de interacción entre los elementos de ADN recombinante de la presente invención que da como resultado la sobreexpresión sin precedentes de la proteína recombinante.

60 Figura 2: Diferentes estrategias que dan como resultado la generación de baculovirus recombinantes mediante el sistema de clonación "Bac-to-Bac" (invitrogen™).

65 Figura 3: Esquema general para la generación de vectores de clonación, donadores y de transferencia compatibles con otras tecnologías comerciales usadas para generar baculovirus recombinantes.

Figura 4: A) Producción de GFP recombinante 96 horas tras la infección en larvas de insectos *Trichoplusia ni* (quinta fase) inoculadas con 500 o 50.000 ufp de un baculovirus convencional que expresa la proteína bajo el control del promotor *polh* o mediante un baculovirus que contiene el casete de baculovirus de la invención *polh Ac-ie-01/hr1p6.9p10GFP*. B) Porcentaje de larvas que sobreviven 96 horas tras la infección con los mismos baculovirus que en el panel A y a dos dosis de infección diferentes, es decir, 500 y 50.000 ufp.

Figura 5: A) Porcentaje de larvas que sobreviven 96 horas tras la infección con el baculovirus que contiene el casete de expresión de la presente invención *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* con respecto a un baculovirus convencional (*polhGFP*) a dosis de infección diferentes. B) Biomasa de insectos en el momento de la infección con un baculovirus convencional (*polhGFP*) o con un baculovirus que contiene el casete de expresión de la presente invención (*polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*) y la biomasa recuperada 96 horas tras la infección. La dosis de infección fue de 5×10^4 ufp.

Figura 6: A) Porcentaje de larvas que sobreviven 96 horas tras la infección usando 5×10^4 ufp como dosis de infección del baculovirus que sobreexpresa el ADNc de *Ac-ie-01* bajo el promotor *polh* (*polhAc-ie-01*) o usando un baculovirus convencional que expresa GFP bajo el promotor *polh* (*polhGFP*). B) Biomasa de insectos en el momento de la infección con los mismos baculovirus que en el panel A y la biomasa recuperada a las 96 horas tras la infección. La dosis de infección fue de 5×10^4 ufp.

Figura 7: Comparación de la proteína GFP recombinante expresada por un baculovirus convencional bajo el control del promotor *polh* (2) o por un baculovirus que contiene el casete de expresión de la presente invención *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP* (1). Se obtuvieron extractos de larvas infectadas con 5×10^5 ufp de cada baculovirus 96 horas tras la infección. A) Tinción con azul de Coomassie de la proteína GFP recombinante. B) Integridad celular tras la infección por baculovirus determinada mediante detección de tubulina con un antisuero específico. C) Detección mediante inmunotransferencia de tipo Western de proteína GFP recombinante usando un suero anti-GFP específico.

Figura 8: Representación esquemática de los elementos preferidos contenidos en los casetes de expresión de baculovirus de la invención, que comprenden secuencias codificantes para reguladores de la transcripción, regiones homólogas (*hr*) que potencian la transcripción inducida mediante promotor(es) de un gen foráneo que codifica una proteína recombinante.

Descripción detallada de la invención

La presente invención mejora la expresión de proteínas recombinantes por medio de la introducción de elementos de ADN recombinante en insectos.

Estos elementos de ADN recombinante de la presente divulgación son secuencias que provocan la expresión de reguladores de la transcripción de baculovirus por encima de niveles endógenos y, opcionalmente, regiones homólogas (*hr*) de potenciador y promotores operativamente unidos a estos elementos anteriormente mencionados.

Además, los elementos de ADN recombinante pueden formar parte de un casete de expresión.

“Casete de expresión” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que contiene elementos de ADN recombinante que controlan (por ejemplo, el promotor) y/o se requieren (por ejemplo, el propio gen) para la expresión génica. El casete de expresión puede introducirse en un vector recombinante o baculovirus.

Los elementos de ADN recombinante pueden incorporarse en una única secuencia de ácido nucleico, vector de clonación, vector de transferencia, célula o baculovirus recombinante. Sin embargo, también pueden estar presentes en diferentes secuencias de ácido nucleico, vectores de clonación, vectores de transferencia o baculovirus recombinantes e introducirse en la misma célula.

La presente invención muestra sorprendentemente que la introducción en larvas de insectos de secuencias que provocan la expresión de reguladores de la transcripción de baculovirus por encima de niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus y la introducción de una secuencia de región homóloga (*hr*) de potenciador, un promotor o una combinación de promotores puede aumentar la producción de una proteína recombinante hasta niveles sin precedentes. Esto indica la utilidad de este sistema para la expresión de proteínas recombinantes *in vivo*.

Adicionalmente, la introducción de estos elementos de ADN recombinante en larvas de insectos con baculovirus aumenta la tasa de supervivencia de las larvas de manera tardía tras la infección, especialmente tras usar altas dosis de virus para la infección (maximiza la cantidad recuperada de biomasa, es decir, la productividad del sistema), en comparación con larvas infectadas con un baculovirus convencional. La biomasa de insectos recuperada al final del procedimiento de producción también aumenta significativamente.

Además, se mejoran la integridad de la maquinaria celular molecular y la morfología celular de dichas larvas infectadas por baculovirus en comparación con larvas infectadas con un baculovirus convencional. Una mejora en la integridad de funciones celulares durante la infección por baculovirus también contribuye al correcto procesamiento postraduccional de la proteína recombinante.

Por tanto, un aspecto de la invención se refiere a un insecto, tal como se define en las reivindicaciones, que contiene una secuencia de ácido nucleico que permite la expresión por encima de niveles endógenos de reguladores de la transcripción obtenidos durante la infección por baculovirus. Los reguladores de la transcripción son IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas.

“Regulador de la transcripción” se refiere a una proteína reguladora que tiene la capacidad de modular la transcripción de genes específicos, por ejemplo, uniéndose a regiones de potenciador o represor y/o reclutando proteínas adicionales que están implicadas en la transcripción.

IE-1 y su variante de corte y empalme IE-0 son reguladores de la transcripción que se expresan de manera endógena durante la infección por baculovirus. Según la presente invención, IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas se expresan de manera recombinante para aumentar el nivel total de estas proteínas por encima de niveles endógenos. Esto se logra mediante introducción de copias adicionales del gen endógeno. Pueden introducirse copias adicionales de los genes endógenos como transgenes bajo el control de un promotor adecuado tal como *polh* o *pB2g*.

El nivel de expresión de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas puede determinarse tanto a nivel de ARNm como de proteína con métodos convencionalmente conocidos por el experto en la técnica, tales como PCR cuantitativa y análisis por inmunotransferencia de tipo Western.

Según la invención, IE-1, IE-0 y fragmentos de las mismas se codifican por los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 (también denominado *Ac-ie-01*) a SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 1 es el ADNc de *Ac-ie-01* que codifica tanto para IE-1 como para IE-0, SEQ ID NO: 2 es la secuencia codificante (CDS) de IE-1 y SEQ ID NO: 3 es la CDS de IE-0. SEQ ID NO: 4 y 5 son las CDS de los dominios N-terminales de IE-1 e IE-0 respectivamente que conservan la actividad de regulador de la transcripción catalítico. Las proteínas que se codifican por SEQ ID NO: 2-5 se representan por SEQ ID NO: 6-9 respectivamente.

La presente divulgación divulga además variantes de SEQ ID NO: 1-9 que son o codifican aminoácidos que pueden funcionar como regulador de la transcripción. Estas variantes son ácidos nucleicos o aminoácidos cuya secuencia de nucleótidos o de aminoácidos difiere en una o más posiciones de estos ácidos nucleicos o aminoácidos originales, mediante lo cual las diferencias pueden ser adiciones, deleciones y/o sustituciones de nucleótidos o residuos de aminoácido.

Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la divulgación se distinguirán de otras secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos por su grado de identidad o similitud de secuencia respectivamente tal como se determina usando EMBOSS Needle con los parámetros por defecto (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). Los métodos para la generación de tales variantes incluyen mutagénesis al azar o dirigida al sitio, mutagénesis por saturación de sitio, ensamblaje de fragmentos basado en PCR, intercambio de ADN, recombinación homóloga *in vitro* o *in vivo* y métodos de síntesis de genes.

La secuencia de las variantes de SEQ ID NO: 1-5 es idéntica en al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 75 %, más preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 % y lo más preferiblemente al menos el 95 % a las secuencias de SEQ ID NO: 1-5.

La secuencia de las variantes de SEQ ID NO: 6-9 es similar en al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 75 %, más preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 % y lo más preferiblemente al menos el 95 % a las secuencias de SEQ ID NO: 6-9.

El insecto es un lepidóptero seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en *Trichoplusia ni*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Ascalapha odorata*, *Bombyx mori*, *Rachiplusia ni* y *Estigmene acrea*. En un modo de realización preferido, el insecto es una larva.

El insecto de la presente invención contiene adicionalmente, además de la secuencia de ácido nucleico que permite la expresión por encima de niveles endógenos de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas, una región homóloga (*hr*) recombinante que puede potenciar la expresión de una proteína recombinante al unirse operativamente al promotor respectivo.

Las regiones homólogas, *hr*, están compuestas por unidades de repetición de aproximadamente 70 pb con un palíndromo de 30 pb imperfecto cerca del centro. Las regiones homólogas se repiten en ocho ubicaciones en el genoma de AcMNPV con de 2 a 8 repeticiones a cada lado. Las regiones homólogas se han implicado tanto como potenciadores de la transcripción así como orígenes de replicación de ADN de baculovirus.

“Región de potenciador” se refiere a una secuencia de control cuya unión mediante reguladores de la transcripción aumenta el nivel de transcripción de genes asociados.

“Proteína recombinante” se refiere a una proteína que se origina a partir de ADN recombinante. Tales proteínas pueden usarse para el beneficio de seres humanos y animales y pueden tener aplicación industrial, comercial o terapéutica.

5 “Estar operativamente unido” se refiere a dos secuencias de ácido nucleico que están conectadas de una manera que una influye sobre la otra en cuanto, por ejemplo, a la regulación de la transcripción.

10 “Promotor” se refiere a una secuencia de ADN a la que puede unirse ARN polimerasa para iniciar la transcripción. La secuencia puede contener además sitios de unión para diversas proteínas que regulan la transcripción, tales como factores de transcripción. La secuencia de promotor puede estar compuesta por diferentes fragmentos de promotor (fragmentos o bien diferentes o bien iguales) que están ubicados próximos en la secuencia de ADN y pueden estar separados por grupos de unión o espaciadores. Tales promotores se denominan promotores quiméricos.

15 La secuencia de región homóloga *hr* de potenciador en el sentido de 5' del/de los promotor(es) es preferiblemente *hr1* (SEQ ID NO: 27). Los promotores que impulsan la expresión de la proteína recombinante se seleccionan del grupo que comprende SEQ ID NO: 10-16 o una secuencia que puede funcionar como promotor y tiene una identidad de al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 75 %, más preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 % y lo más preferiblemente al menos el 95 % con la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 10-16.

20 En un modo de realización preferido, la secuencia de ácido nucleico comprende combinaciones de promotores recombinantes, secuencias que codifican reguladores de la transcripción y regiones de potenciador seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO: 17-26.

25 Tal como se indicó anteriormente, no se necesita que los promotores recombinantes, secuencias que codifican reguladores de la transcripción y regiones de potenciador formen parte de una única molécula, en vez de eso, estas secuencias pueden formar parte de moléculas distintas siempre que estén operativamente unidas, es decir, contenidas dentro de las mismas células.

30 El insecto de la presente invención comprende preferiblemente una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante. Esta secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a la secuencia de ácido nucleico que permite la expresión por encima de niveles endógenos de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas y a una región homóloga (*hr*).

35 Los elementos de ADN recombinante descritos anteriormente se introducen en el insecto mediante un baculovirus recombinante. Preferiblemente, el baculovirus es AcMNPV o BmNPV y el insecto una larva de insecto. El baculovirus se administra a la larva mediante administración oral (por vía oral) o, más preferiblemente, mediante inyección. En un modo de realización adicional el insecto se infecta, transfecta, transduce o transforma con el baculovirus recombinante, vector de transferencia, vector de clonación o secuencia de ácido nucleico de la presente invención. Preferiblemente, las larvas de insectos se crían en un módulo de cría, tal como se describe en la solicitud de patente ES 2 232 308.

45 En un aspecto adicional, la invención divulga métodos para producir una proteína recombinante usando el insecto de la presente invención. Para ello, un insecto puede infectarse, transfectarse, transducirse o transformarse con el baculovirus recombinante, vector de transferencia, vector de clonación o secuencia de ácido nucleico. Tras la expresión de la proteína recombinante, la extracción y purificación de la proteína recombinante se realiza mediante medios convencionales.

50 En un aspecto preferido para la producción de proteínas, las larvas se infectan inyectando una alta dosis de virus (superior a 10^4 unidades formadoras de placas) del baculovirus recombinante 3-4 días tras la infección, se procesan las larvas infectadas y se obtiene el extracto de proteína soluble completa mediante el uso de tampones de extracción apropiados. Se centrifugan los extractos y se elimina la fracción lipídica. Después, se purifica la proteína recombinante mediante medios convencionales.

55 La proteína recombinante que se produce preferiblemente mediante los métodos de la presente invención es una proteína seleccionada del grupo que comprende vacuna monomérica de subunidades, vacuna multimérica de subunidades, partícula de tipo virus, proteína terapéutica, anticuerpo, enzima, citocina, factor de coagulación de la sangre, anticoagulante, receptor, hormona o reactivo de proteína de diagnóstico.

60 Un aspecto de la divulgación se refiere al uso del baculovirus recombinante, vector de transferencia, vector de clonación o secuencia de ácido nucleico de la invención en un medio de cría, alimentación o inyección para un insecto.

65 La presente divulgación se refiere a un baculovirus que puede usarse para producir el insecto de la presente invención y comprende dicha secuencia para la expresión por encima de niveles endógenos de las proteínas IE-0, IE-1 y/o fragmentos de las mismas.

“Baculovirus” se refiere a una familia de virus infecciosos para invertebrados, que infectan principalmente a insectos y artrópodos. Un “baculovirus recombinante” tiene ADN recombinante introducido adicional, por ejemplo, mediante transposición o recombinación homóloga. El baculovirus recombinante se origina preferiblemente de AcMNPV (virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica*) o BmNPV (nucleopoliedrovirus de *Bombyx mori*).

“ADN recombinante” se refiere a una forma de ADN artificial que se modifica por ingeniería mediante la combinación o inserción de una o más cadenas de ADN, combinando así ADN que normalmente no se produciría junto.

“Elemento de ADN recombinante” se refiere a un elemento funcional dentro de ADN recombinante, tal como un promotor, potenciador o un gen. Tal como se mencionó anteriormente, los elementos de ADN recombinante de la presente invención son secuencias que provocan la expresión de reguladores de la transcripción de baculovirus por encima de niveles endógenos, regiones homólogas (*hr*) de potenciador y promotores operativamente unidos a estos elementos anteriormente mencionados. Preferiblemente, los reguladores de la transcripción de baculovirus IE-1, IE-0 o fragmentos de las mismas se expresan por encima de niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus.

El baculovirus recombinante contiene además de (i) la secuencia para la expresión por encima de niveles endógenos de las proteínas IE-0, IE-1 y/o fragmentos de las mismas, (ii) una región homóloga (*hr*) recombinante unida a (iii) un promotor adecuado para impulsar la expresión de una proteína recombinante. Las combinaciones preferidas de estos elementos de ADN recombinante son tal como se describieron anteriormente para los insectos. Además, el baculovirus recombinante contiene preferiblemente una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante.

La presente divulgación se refiere además a un vector de transferencia que puede usarse para producir el insecto de la presente invención y/o un baculovirus recombinante y comprende dicha secuencia para la expresión por encima de niveles endógenos de las proteínas IE-0, IE-1 y/o fragmentos de las mismas, además de una secuencia adecuada para la integración o transposición en un baculovirus.

Los vectores de transferencia permiten generalmente la inserción de información genética en un baculovirus.

El vector de transferencia contiene preferiblemente además de (i) la secuencia para la expresión por encima de niveles endógenos de las proteínas IE-0, IE-1 y/o fragmentos de las mismas, (ii) una región homóloga (*hr*) recombinante unida a (iii) un promotor adecuado para impulsar la expresión de una proteína recombinante. Las combinaciones preferidas de estos elementos de ADN recombinante son tal como se describieron anteriormente para los insectos.

En un aspecto preferido, el vector de transferencia comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína recombinante, mientras que en otro modo de realización preferido, el vector de transferencia carece de tal secuencia.

En un modo de realización preferido, el vector de transferencia es un bÁcmido.

“BÁcmido” se refiere a un constructo de plÁsmido que contiene la secuencia de ADN suficiente para generar un baculovirus cuando se transfecta en una cÉlula.

En un aspecto preferido adicional, el vector de transferencia se deriva de cualquiera de los sistemas de expresión de baculovirus comercialmente disponibles “Bac-to-Bac[®]” (invitrogen[™]), “BacPAK[™]” (Clontech[™]), “FlashBAC[™]” (Oxford Expression Technologies[™]), “BacuVance[™]” (GenScript[™]), “Bac-N-Blue DNA[™]” (invitrogen[™]), “BaculoDirect[™]” (invitrogen[™]), “BacVector[®]” 1000, 2000, 3000 (Novagen[®]), “DiamondBac[™]” (Sigma-Aldrich[®]) o “BaculoGold[™]” (BD biosciences[™]).

La presente divulgación se refiere además a un vector de clonación que puede usarse para producir el insecto de la presente invención, un baculovirus recombinante y/o vector de transferencia y comprende dicha secuencia para la expresión por encima de niveles endógenos de las proteínas IE-0, IE-1 y/o fragmentos de las mismas, que es adecuado además para replicación bacteriana.

“Vector de clonación” se refiere a cualquier vector que es adecuado para la clonación, lo que generalmente implica la presencia de sitios de restricción, un origen de replicación para propagación bacteriana y un marcador seleccionable.

El vector de clonación contiene preferiblemente además de (i) la secuencia para la expresión por encima de niveles endógenos de las proteínas IE-0, IE-1 y/o fragmentos de las mismas, (ii) una región homóloga (*hr*) recombinante unida a (iii) un promotor adecuado para impulsar la expresión de una proteína recombinante. Las combinaciones preferidas de estos elementos de ADN recombinante son tal como se describieron anteriormente para los insectos.

En un aspecto preferido, el vector de clonación comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína recombinante (también denominada “vector donador”), mientras que en otro aspecto preferido, el vector de clonación carece de tal secuencia.

5 La presente divulgación también se refiere a una secuencia de ácido nucleico que puede usarse para producir el insecto, baculovirus recombinante, vector de transferencia y/o vector de clonación y comprende dicha secuencia para la expresión por encima de niveles endógenos de las proteínas IE-0, IE-1 y/o fragmentos de las mismas.

10 La secuencia de ácido nucleico contiene preferiblemente además de (i) la secuencia para la expresión por encima de niveles endógenos de las proteínas IE-0, IE-1 y/o fragmentos de las mismas, (ii) una región homóloga (*hr*) recombinante unida a (iii) un promotor adecuado para impulsar la expresión de una proteína recombinante. Las combinaciones preferidas de estos elementos de ADN recombinante son tal como se describieron anteriormente para los insectos.

15 En un aspecto preferido, la secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína recombinante, mientras que en otro modo de realización preferido, la secuencia de ácido nucleico carece de tal secuencia.

20 **Sumario de secuencias**

SEQ ID NO:	Nombre:
1	ADNc de <i>Ac-ie-01</i> completo
2	Secuencia codificante de proteína (CDS) de IE-1
3	CDS de IE-0
4	CDS del dominio N-terminal de IE-1
5	CDS del dominio N-terminal de IE-0
6	Proteína IE-1
7	Proteína IE-0
8	Proteína de dominio N-terminal de IE-1
9	Proteína de dominio N-terminal de IE-0
10	<i>polh</i> (promotor)
11	<i>p10</i> (promotor)
12	<i>pB2₉p10</i> (promotor)
13	<i>p6.9p10</i> (promotor)
14	<i>pB2₉</i> (promotor)
15	<i>pB2p10</i> (promotor)
16	<i>polhp10</i> (promotor)
17	<i>polhAc-ie-01/hr1p10</i>
18	<i>polhAc-ie-01/hr1pB2₉p10</i>
19	<i>polhAc-ie-01/hr1p6.9p10</i>
20	<i>pB2₉Ac-ie-01/hr1p10</i>
21	<i>pB2₉Ac-ie-01/hr1pB2₉p10</i>
22	<i>pB2₉Ac-ie-01/hr1p6.9p10</i>
23	<i>polhAc-ie-01/hr1polh</i>
24	<i>pB2₉Ac-ie-01/hr1polh</i>
25	<i>polhAc-ie-01/hr1polhp10</i>
26	<i>pB2₉Ac-ie-01/hr1polhp10</i>
27	Potenciador de región homóloga <i>hr1</i>
28	<i>polhAc-ie-01</i>
29	<i>polhGFP</i>

Depósito de microorganismos según el tratado de Budapest

25 Se depositaron plásmidos en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (www.cect.org); Universidad de Valencia, Parc Científic Universitat de València; Catedrático Agustín Escardino, 9; 46980 Paterna (Valencia), España, con el número de registro CECT 8031, a fecha del 4 de octubre de 2011.

Ejemplos

30 Ejemplo 1. La sobreexpresión de reguladores de la transcripción de baculovirus potencia la función de potenciador de una región homóloga *hr* funcionalmente unida a un promotor que aumenta la expresión de proteínas recombinantes en un sistema de expresión de vector de baculovirus (BEVS).

Las proteínas virales inmediatas tempranas codificadas por el ADNc de *Ac-ie-01*, es decir, IE-1 e IE-0, de *AcMNPV*

son potentes reguladores de la transcripción en baculovirus. La transactivación mediada por estas proteínas se potencia por su unión como homodímero a las secuencias de región homóloga (*hr*) de baculovirus, que actúan como potenciadores de la transcripción. IE-1/IE-0 de AcMNPV son proteínas de unión a ADN diméricas de 67-72 kDa que estimulan la transcripción en ensayos de transfección de plásmido mediante la actividad de su dominio ácido N-terminal (7, 8). Sintetizadas de manera muy temprana durante la infección, IE-1 e IE-0 se acumulan dentro del núcleo, en el que se mantienen a lo largo de momentos tardíos. Usando el plásmido doble pFastBac™ (invitrogen™), se clonó el ADNc de *Ac-ie-01* bajo el control del promotor *polh*. En el mismo plásmido, pero en otro locus, se clonó el gen que codifica GFP en el sentido de 3' del promotor quimérico *hr1p6.9p10* que se sintetizó previamente y contiene la región homóloga *hr1* fusionada a los promotores *p6.9* y *p10*. En la figura 1 se muestra una representación esquemática del casete de expresión de baculovirus resultante de la presente invención y la supuesta función de los elementos de ADN recombinante. Se usó el plásmido resultante para generar un baculovirus recombinante mediante el sistema "Bac-to-Bac®" (invitrogen™). En paralelo, se generó mediante el mismo sistema un baculovirus convencional que expresaba la proteína GFP bajo el control de promotor *polh*.

Se estudió la expresión de proteína GFP mediada por los diferente baculovirus mediante fluorimetría a las 96 horas tras la infección en larvas de *Trichoplusia ni* usando una dosis de infección baja o alta (5×10^2 o 5×10^4 respectivamente). El nivel de expresión de GFP se aumentó en extractos de larvas mediante el baculovirus que contenía el casete de expresión anterior en de aproximadamente el 13 a más del 40 % dependiendo de la dosis de virus usada (figura 4A). Se observaron resultados similares usando baculovirus en los que se expresaba el ADNc de *Ac-ie-01* bajo el control del promotor *pB2₉*, derivado de insecto o cuando se expresó la GFP bajo el control del promotor *hr1pB2₉p10* (datos no mostrados).

Ejemplo 2. Los casetes de expresión de baculovirus aumentan las tasas de supervivencia de larvas de insectos infectadas por baculovirus y la biomasa de insectos recuperada usando altas dosis de infección mediante los reguladores de la transcripción codificados por el ADNc de *Ac-ie-01*

En el ejemplo anterior se mostró una ventaja de baculovirus que expresan la proteína recombinante en el contexto del casete de baculovirus en cuanto a la productividad de proteína. Sin embargo, la diferencia principal observada era con respecto al porcentaje de larvas supervivientes a altas dosis de infección (productividad máxima). En tales condiciones de infección, el baculovirus que contenía el casete de expresión aumentó en aproximadamente el 70 % las tasas de supervivencia de larvas (figura 4B). Esto significa que usando un baculovirus convencional las condiciones de infección óptimas eran usando una dosis de infección de 5×10^2 ufp (tasa de supervivencia de larvas máxima). En cambio, usando un baculovirus que contenía el casete de expresión, podía usarse una dosis de 5×10^4 , recuperando el mismo número de larvas al final del procedimiento de producción (figura 4B). En tales condiciones de producción óptimas (infección con 5×10^4 ufp), el baculovirus que contiene el casete de expresión proporciona más del doble de la cantidad de proteína recombinante producida en larvas de insectos infectadas con la dosis óptima para el baculovirus convencional (5×10^2 ufp) (figura 4 A y B).

Estudios de infección de larvas usando diferentes dosis de infección de un baculovirus convencional (*polhGFP*) o un baculovirus que contenía el casete de expresión *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*, expresando ambos las proteínas GFP, revelaron tasas de supervivencia crecientes de larvas infectadas cuando se usó el baculovirus que contenía el casete de expresión (figura 5A). A la dosis de infección más alta (5×10^4), la tasa de supervivencia de larvas infectadas con el casete de expresión aumentó en más del 70 % en comparación con larvas infectadas con un baculovirus convencional. Este aumento en las tasas de supervivencia de larvas infectadas tuvo drásticas consecuencias directas en la biomasa de insectos recuperada al final del procedimiento de producción, con un aumento del 80 % cuando se usó el baculovirus que contenía el casete de expresión a la dosis de infección más alta (productividad máxima) (figura 5B).

Para determinar el/los elemento(s) genético(s) responsable(s) de tales propiedades interesantes relacionadas con el aumento de las tasas de supervivencia tras la infección con altas dosis del baculovirus, se generó un baculovirus recombinante que expresaba los reguladores de la transcripción codificados por el ADNc de *Ac-ie-01* bajo el control del promotor *polh*. Después se infectaron larvas de *T. ni* con una alta dosis de infección (5×10^4 ufp) de este baculovirus. Como control, se usó un baculovirus que expresaba la proteína GFP bajo el control del mismo promotor. De manera similar a las larvas infectadas con el casete de expresión *polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*, las larvas infectadas con el baculovirus que sobreexpresaba el ADNc de *Ac-ie-01* (*polhAc-ie-01*) también mostraron tasas de supervivencia aumentadas en comparación con larvas infectadas con un baculovirus convencional que expresaba la proteína indicadora GFP bajo el control del mismo promotor (*polhGPF*) (figura 6A). Esto sugiere fuertemente que la sobreexpresión de los reguladores de la transcripción usados en el casete de expresión de baculovirus protege a las larvas de insectos de la mortalidad inducida por baculovirus, permitiendo la expresión a largo plazo (más producción de proteínas recombinantes) y aumentando la recuperación de biomasa de insectos usando altas dosis de infección (productividad máxima) (figura 6B).

Ejemplo 3. La sobreexpresión en un sistema de expresión de baculovirus de reguladores de la transcripción codificados por el ADNc de *Ac-ie-01* facilita el procesamiento postraduccionnal de proteínas recombinantes en larvas de insectos infectadas usadas como biofábricas.

La integridad celular durante la infección por baculovirus tiene gran importancia para determinar el plegamiento correcto o cualquier otra modificación postraducciona de proteínas foráneas expresadas por este sistema. Los promotores fuertes de baculovirus comúnmente usados para investigación y producción, tales como *polh* y *p10*, sólo expresan los genes foráneos en momentos tardíos tras la infección cuando las células infectadas ya muestran graves efectos citopáticos y la viabilidad celular disminuye. Tal como se describió anteriormente, la sobreexpresión de los reguladores de la transcripción usados en el casete de expresión de baculovirus protege las células frente a efectos patogénicos de la infección por baculovirus, permitiendo un amplio intervalo temporal para la producción de proteínas recombinantes en células que permanecen totalmente viables.

Se estudió la relevancia de los elementos de ADN recombinante incorporados en el casete de expresión en relación con las modificaciones postraduccionales de proteínas recombinantes en larvas de insectos como biofábricas vivas. Con este fin, se usaron un baculovirus convencional que expresaba la proteína GFP indicadora bajo el control del promotor *polh* y un baculovirus que incorporaba el casete de baculovirus y también expresaba la proteína GFP (*polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP*) para infectar larvas de insectos a una dosis de 5×10^4 ufp.

Se analizaron extractos de larvas infectadas a las 96 horas tras la infección mediante geles de SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (figura 7A). De manera interesante, la proteína GFP expresada por un baculovirus convencional mostró una banda con un peso molecular reducido (inferior al predicho), lo que sugiere degradación o plegamiento erróneo de la proteína recombinante. En cambio, cuando la expresión de proteína GFP estaba mediada por el casete de expresión de baculovirus, la banda de GFP presentó el peso molecular previsto de esta proteína, es decir, aproximadamente 27 kDa.

También se analizaron los extractos de larvas infectadas mediante inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpo monoclonal anti-GFP (mab2515; Millipore™) (figura 7C). La proteína GFP se detectó en extractos de larvas infectadas por ambos baculovirus, pero mostró una diferencia en la movilidad electroforética de la proteína recombinante tal como se observó mediante tinción con azul de Coomassie.

En paralelo, se midió la integridad de la maquinaria celular en diferentes momentos tras la infección mediante análisis por inmunotransferencia de tipo Western de la proteína tubulina celular usando un antisuero específico (figura 7B). La infección con un baculovirus convencional afectó gravemente a la integridad celular a las 96 horas tras la infección ya que la banda de tubulina detectada disminuyó drásticamente tras este punto de tiempo (degradación como resultado de una pérdida completa de integridad celular). De manera compatible con la protección celular inducida por los elementos de ADN recombinante contenidos en el casete de expresión de baculovirus, la tubulina celular no se vio afectada del mismo modo en células infectadas por el baculovirus recombinante modificado por ingeniería con el casete de expresión.

Ejemplo 4. Cultivo celular y virus.

Se cultivaron las líneas celulares *Sf21* o *Sf9* de *Spodoptera frugiperda* en placas de cultivo tisular de 6 pocillos (1×10^6 células/pocillo) en medio de insectos de TNM-FH (Pan Biotech™, Alemania) que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (Pan Biotech™, Alemania) a 27°C. Se obtuvieron baculovirus recombinantes de AcMNPV mediante el sistema de expresión de “Bac-to-Bac” (invitrogen™, Estados Unidos). Se generaron diferentes vectores de transferencia que contenían los elementos de ADN recombinante de la invención usando el plásmido pFastBac™-DUAL (invitrogen™). Se sintetizaron los promotores y elementos reguladores incorporados en pFastBac™-DUAL (GenScript™, Estados Unidos) con las secuencias de restricción de flaqueo adecuadas para facilitar la clonación. Se usaron estos vectores de transferencia para transfectar células *Sf21* con Cellfectin® (invitrogen™, Estados Unidos). Después se sometieron los baculovirus recombinantes resultantes de la infección de células *Sf21* a pase dos veces en células y se tituló mediante el método de ensayo de placas de lisis. Los constructos génicos obtenidos de los casetes de expresión de baculovirus se muestran esquemáticamente en la figura 8, que muestra diferentes posibles combinaciones de promotores que impulsan la expresión del ADNc de *Ac-ie-01* o el gen foráneo (por ejemplo, GFP). Se usaron los diferentes casetes de expresión para generar los baculovirus recombinantes usados en los ejemplos mostrados en las figuras 4 a 7.

Ejemplo 5. Generación del vector de clonación

El vector de clonación es un pequeño fragmento de ADN que contiene el casete de expresión de baculovirus en el que puede insertarse un fragmento de ADN foráneo mediante el tratamiento del vehículo y el ADN foráneo con una enzima de restricción que crea la misma proyección, después ligando los fragmentos entre sí. Las características esenciales del vector de clonación deben incluir un sitio de clonación múltiple (MCS) sintético para facilitar la inserción de genes foráneos dirigidos en una orientación elegida, un marcador seleccionable, tal como una resistencia a antibiótico para permitir la selección de células transformadas de manera positiva y un origen de replicación (ORI) funcional para la propagación en bacterias.

Ejemplo 6. Generación del vector donador que contiene el casete de expresión de baculovirus

Un vector donador consiste en un vector de clonación, por ejemplo, un plásmido pUC57, que contiene el casete de

expresión de baculovirus, en el que se ha clonado un gen foráneo usando las enzimas de restricción apropiadas. Se sintetizó el casete de expresión de baculovirus ligando las siguientes secuencias de ADN: (i) la secuencia que codifica un regulador de la transcripción de baculovirus, *Ac-*ie-01**, en el sentido de 3' de una secuencia de promotor, tal como el promotor *polh* o *pB2₉*, y en el sentido de 5' de la señal de poliadenilación TK de HSV y (ii) en otro locus una secuencia de potenciador, por ejemplo, la región homóloga *hr1*, en el sentido de 5' de (iii) una secuencia de promotor, por ejemplo, *pB2₉p10*, *p10*, *p6.9p10* o *polh*, seguida por un sitio de clonación múltiple (MCS) para clonar el gen de interés y la señal de poliadenilación de SV40 en el sentido de 3' del MCS (figura 1). El casete de expresión de baculovirus está flanqueado por sitios de restricción específicos (por ejemplo, *Bgl*II y *Bst*Z17I en el extremo 5'-terminal y *Bgl* II y *Sgf* I en el extremo 3'-terminal) para facilitar la subclonación en un vector de transferencia de un sistema de generación de baculovirus comercial (basándose en la transposición, por ejemplo, el sistema "Bac-to-Bac[®]" (Invitrogen[™]), o basándose en la recombinación homóloga, por ejemplo, "flashBAC[™]" (Oxford Expression Technologies[™]), "Baculogold[™]" (BD Biosciences[™]), "BacPAK6[™]" (Clontech[™]), "Bac-N-Blue ADN[™]" (Invitrogen[™])) (figuras 2 y 3).

Se clonó el gen codificante de la proteína de fluorescencia verde (GFP) en el MCS del vector de clonación usando los sitios de restricción *Nco* I y *Spe* I, generando el vector de plásmido donador (figura 2).

Ejemplo 7. Generación del vector de transferencia que contiene el casete de expresión de baculovirus

Se generó el vector de transferencia digiriendo un vector donador con *Bst*Z17 I dl sitio flanqueante en 5' y con *Xba* I y clonándolo en el vector de transferencia pFastBac[™]1 que también se digirió con las mismas enzimas. En este caso, como resultado de la subclonación, la señal de poliadenilación de SV40 del casete de expresión de baculovirus se intercambia por la señal de poliadenilación de SV40 del vector de transferencia. Aparte de esto, todos los elementos del casete de expresión se incluyen en el vector de transferencia de pFastBac, sustituyendo el promotor *polh* y MCS del vector de transferencia comercial original (figura 2).

Ejemplo 8. Generación del vector de expresión de baculovirus que contiene el casete de expresión de baculovirus usando el sistema "Bac-to-Bac[®]"

Se usaron el vector de transferencia modificado pFastBac[™]1 y el casete de expresión de baculovirus individual para generar un baculovirus recombinante usando el sistema de expresión de baculovirus "Bac-to-Bac[®]". Más específicamente, se usó el vector de transferencia modificado para transformar la cepa huésped de *E. coli* DH10Bac[™] que contenía un vector lanzadera de baculovirus (bácmido) y un plásmido cooperador, y permite la generación de un bácmido recombinante tras la transposición del casete de expresión. Después se usó el ADN del bácmido recombinante que contenía el casete de expresión de baculovirus y el gen codificante de GFP para transfectar células de insecto, por ejemplo, células Sf21, usando Cellfectin[®]. 72 horas tras la transfección, se recogieron las células y se obtuvo la primera generación de baculovirus recombinante (figura 2). Después pudo amplificarse adicionalmente y/o titularse este baculovirus recombinante siguiendo protocolos convencionales. Se usaron procedimientos similares para generar baculovirus recombinantes con otros vectores de transferencia proporcionados por BEVS comerciales (figura 3).

Ejemplo 9. Cría e infección de larvas de insectos.

Se criaron larvas de *Trichoplusia ni* (falso medidor) en condiciones de bioseguridad de nivel 2. Se colocaron huevos en jaulas de desarrollo de larvas especialmente diseñadas que contenían una dieta para insectos artificial y se mantuvieron en cámaras de crecimiento a 22°C en condiciones controladas de humedad (50 %) y periodo de luz (8 h/día).

Se usaron larvas de quinta fase (larvas en la última fase antes de pupación) para todos los experimentos de infección. El peso convencional de cada larva fue de aproximadamente 120-130 mg y a las larvas se les inyectaron, cerca de la falsa pata (parte delantera de la cavidad corporal), 5 µl de baculovirus recombinantes diluidos para alcanzar el número de unidades formadoras de placas (ufp) por dosis seleccionado. Se procesaron las larvas a las 96 hpi. Se congelaron inmediatamente las larvas recogidas para almacenarse a -20°C hasta que se procesaron para la cuantificación de proteínas recombinantes. Se obtuvieron proteínas solubles totales, no desnaturalizadas (TSNDP), de larvas de *T. ni* congeladas infectadas por los baculovirus mediante homogenización usando una mezcladora Bag Mixer[®] (Interscience[™], Francia) durante 2 min. El tampón de extracción estaba compuesto por PBS 1x, Triton X-100 al 0,01%, cóctel de inhibidores de proteasa completo (Roche[™], Alemania) y DTT 25 mM.

Ejemplo 10. Análisis fluorimétrico.

Se analizaron aproximadamente 20 µg de proteínas solubles totales derivadas de células infectadas, que contenían diferentes cantidades de proteína GFP recombinante, y se cuantificaron mediante un lector de placas de fluorescencia Tecan[™] GENios[™] (CA, Estados Unidos) (excitación [Ex], 485/emisión [Em], 535).

Ejemplo 11. Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western.

Se resolvieron fracciones de proteínas solubles totales (10 µg) de larvas infectadas con los baculovirus recombinantes en geles de SDS-PAGE al 15 %. Se tiñeron los geles mediante el método de tinción con azul de Coomassie o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se analizaron con sonda las inmunotransferencias de tipo Western con el anticuerpo monoclonal anti-GFP mab2515 (Millipore™, Estados Unidos) o antisuero frente a tubulina (T5168; Sigma-Aldrich™) a 1:1000 y se revelaron los inmunocomplejos con conjugado marcado con peroxidasa del rábano (HRP) anti-IgG de ratón (KPL™, R.U.), diluido a 1:2,000 como anticuerpo secundario. Se detectaron bandas de proteína usando un sistema de detección mediante inmunotransferencia de tipo Western ECL y se analizaron mediante el sistema de obtención de imágenes en gel ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad™, Estados Unidos).

Bibliografía

1. Nettleship, J.E., Assenberg, R., Diprose, J.M., Rahman-Huq, N., Owens, R.J. Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. *J. Struct Biol.* 2010, 172, 55-65.

2. Gomez-Casado E, Gomez-Sebastian S, Núñez MC, Lasa-Covarrubias R, Martínez-Pulgarín S, Escribano JM. Insect larvae biofactories as a platform for influenza vaccine production. *Protein Expr Purif* 79: 35-43. 2011.

3. Smith, G.E., M.D. Summers, and M.J. Fraser. 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165.

4. Tomita, M., Munetsuna, H., Sato, T., Adachi, T., Hino, R., Hayashi, M., Shimizu, K., Nakamura, N., Tamura, T., Yoshizato, K., 2003. Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat. Biotechnol.* 21 (1), 52-56.

5. Perez-Filgueira, D.M, Resino-Talavan, P., Cubillos, C., Angulo, I., Barderas, M.G., Barcena, J., Escribano, J.M., 2007. Development of a low-cost, insect larva-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. *Virology* 364 (2), 422-430.

6. Perez-Martin, E., Gomez-Sebastian, S., Argilaguuet, J.M., Sibila, M., Fort, M., Nofrarias, M., Kurtz, S., Escribano, J.M., Segales, J., Rodriguez, F., 2010. Immunity conferred by an experimental vaccine based on the recombinant PCV2 Cap protein expressed in *Trichoplusia ni*-larvae. *Vaccine* 28 (11), 2340-2349.

7. Fernández-San Millán A, Gómez-Sebastián S, Nunez MC, Veramendi J, Escribano JM. Human papillomavirus-like particles vaccine efficiently produced in a non-fermentative system based on insect larva. *Protein Expr. Purif.* 2010, 74: 1-8

8. Gomez-Casado E, Gomez-Sebastian S, Núñez MC, Lasa-Covarrubias R, Martínez-Pulgarín S, Escribano JM. Insect larvae biofactories as a platform for influenza vaccine production *Protein Expr. Purif.* 2011, 79: 35-43

9. J.A. Medin, L. Hunt, K. Gathy, R.K. Evans, M.S. Coleman, Efficient, low-cost protein factories: expression of human adenosine deaminase in baculovirus-infected insect larvae, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87 (1990) 2760-2764.

10. N.M. Tremblay, B.P. Kennedy, I.P. Street, W.J. Kaupp, F. Laliberte, P.K. Weech, Human group II phospholipase A2 expressed in *Trichoplusia ni* larvae -isolation and kinetic properties of the enzyme, *Protein Expr. Purif.* 4 (1993) 490-498.

11. U. Reis, B. Blum, B.U. von Specht, H. Domdey, J. Collins, Antibody production in silkworm cells and silkworm larvae infected with a dual recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, *Biotechnology (NY)* 10 (1992) 910-912.

12. F. Gil, M. Perez-Filgueira, M.G. -Barderas, C. Pastor-Vargas, C. Alonso, F. Vivanco, J.M. Escribano, Targeting antigens to an invariant epitope of the MHC Class II DR molecule potentiates the immune response to subunit vaccines, *Virus Res.* (2010).

13. S. Mathavan, V.T. Gautvik, E. Rokkones, O.K. Olstad, B.N. Kareem, S. Maeda, K.M. Gautvik, High-level production of human parathyroid hormone in *Bombyx mori* larvae and BmN cells using recombinant baculovirus, *Gene* 167 (1995) 33-39.

14. S. Sumathy, V.B. Palhan, K.P. Gopinathan, Expression of human growth hormone in silkworm larvae through recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, *Protein Expr. Purif.* 7 (1996) 262-268.

15. X. Shi, J. Qin, J. Zhu, D. Zhu, Expression of biologically active human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the silkworm (*Bombyx mori*), *Biotechnol. Appl. Biochem.* 24 (Pt 3) (1996) 245-249.

16. M.Q. Pham, S. Naggie, M. Wier, H.J. Cha, W.E. Bentley, Human interleukin-2 production in insect (*Trichoplusia*

ni) larvae: effects and partial control of proteolysis, *Biotechnol. Bioeng.* 62 (1999) 175-182.

17. J.B. Katz, A.L. Shafer, K.A. Eernisse, Construction and insect larval expression of recombinant vesicular stomatitis nucleocapsid protein and its use in competitive ELISA, *J. Virol. Methods* 54 (1995) 145-157.

18. D.M. Perez-Filgueira, F. Gonzalez-Camacho, C. Gallardo, P. Resino-Talavan, E. Blanco, E. Gomez-Casado, C. Alonso, J.M. Escribano, Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae, *J. Clin. Microbiol.* 44 (2006) 3114-3121.

19. S. Gomez-Sebastian, D.M. Perez-Filgueira, E. Gomez-Casado, M.C. Nunez, I. Sanchez-Ramos, E. Tabares, J.M. Escribano, DIVA diagnostic of Aujeszky's disease using an insect-derived virus glycoprotein E, *J. Virol. Methods* 153 (2008) 29-35.

20. F. Todoli, M. Perez-Filgueira, I. Galindo, S. Gomez-Sebastian, J.M. Escribano, A. Rodriguez-Cortes, J. Alberola, Seroreactivity against raw insect-derived recombinant KMPII, TRYP, and LACK *Leishmania infantum* proteins in infected dogs, *Vet. Parasitol.* 164 (2009) 154-161.

21. Hill-Perkins MS, Possee RD. A baculovirus expression vector derived from the basic protein promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol.* 1990, 71 (Pt 4):971-6.

22. Passarelli, A. L., and L. K. Miller. Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: ie-1, ie-n, and lef-2. *J. Virol.* 1993, 67:2149-2158

23. Rodems, S. M., S. S. Pullen, and P. D. Friesen. DNA-dependent transregulation by IE1 of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: IE1 domains required for transactivation and DNA binding. *J. Virol.* 1997, 71: 9270-9277.

24. Lin X, Chen Y, Yi Y, Zhang Z: Baculovirus immediately early 1, a mediator for homologous regions enhancer function in trans. *Virol J* 2010, 7:32.

25. Okano K, Mikhailov VS, Maeda S: Colocalization of baculovirus IE-1 and two DNA-binding proteins, DBP and LEF-3, to viral replication factories. *Journal of virology* 1999, 73(1):110-119.

Lista de secuencias

<110> ALTERNATIVE GENE EXPRESSION S.L.

<120> ELEMENTOS DE ADN RECOMBINANTE PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN INSECTOS

<130> 156 594

<150> Documento EP11169634.0

<151> 10-06-2011

<150> Documento PCT/EP2011/068381

<151> 20-10-2011

<150> Documento PCT/EP2011/072406

<151> 12-12-2011

<160> 29

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1911

<212> ADN

<213> Nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*

<400> 1

ES 2 611 302 T3

atgatccgta catccagcca cgtcctgaac gtccaagaaa acatcatgac ttccaactgt	60
gcttccagcc cctactcctg tgaggccact tcagcctgcg ctgaggccca gcaactgcag	120
gtggacacag gtggcgataa gatcgtgaac aaccaggtca ccatgactca aatcaacttc	180
aacgcttcct acacctctgc cagcactccc tctcgtgcta gcttcgacaa ctcatactcg	240
gagttctgcg acaagcaacc taacgattac ttgtcttact acaaccacc aaccccgac	300
ggagctgata ctgtcatctc cgactctgaa accgctgccg ctagcaactt cctcgcctca	360
gttaactcgc tcaactgacaa cgatttggtg gagtgtctgc tcaagaccac tgacaacctg	420
gaggaagctg tgtcctctgc ctactacagc gagtcactcg aacagccagt ggtcgaacaa	480
ccctctccta gctcagctta ccacgccgag tccttcgaac actctgctgg tgtcaaccag	540
ccgtcggcca caggcaccaa gaggaagttg gacgagtacc tggataactc ccagggagtt	600
gtgggtcaat tcaacaagat caagttgaga cctaagtaca agaagagcac catccagtca	660
tgcgctacac tggaacaaac catcaaccac aactaaca tctgtacagt ggottccacc	720
caggagatca ctcaactactt cacaacgac ttcgccccct acctgatgag gttcgcgat	780
aacgactaca actcgaacag attctccgat cacatgtctg aaaccggta ctacatgttc	840
gtcgttaaga agtccgaggt gaagccttc gaaatcatct tcgccaagta cgtctctaac	900
gtggtctacg agtacacaaa caactactac atggttgaca accgtgtggt cgttgtgacc	960
ttcgataaga tccgcttcat gatcagctac aacctggta aggagactgg catcgaaatc	1020
ccacactcac aggacgtctg caacgatgag accgccgctc aaaactgcaa gaagtgtcac	1080

ES 2 611 302 T3

ttcgtggacg tccaccacac attcaaggcc gctctgacct cctacttcaa cctcgatatg	1140
tactacgctc agacaacctt cgtgaccttg ctgcaatcac tcggcgagcg taagtgtgga	1200
ttcctcttgt cgaagttgta cgagatgtac caggacaaga acctettcac tttgcccac	1260
atgctgagcc gcaaggaatc aaacgagatc gaaaccgcct ctaacaactt ctctgtctcg	1320
ccatacgttt cccagatcct caagtactcg gagtccgtcc aattcccgga caaccctccc	1380
aacaagtacg tcgttgataa cctgaacctc atcgtgaaca agaagagcac tctgacatac	1440
aagtactcgt ccgtcgctaa cctgctcttc aacaactaca agtaccacga caacatcgct	1500
tctaacaaca acgccgagaa cctcaagaag gtcaagaagg aagacggaag catgcacatc	1560
gttgagcagt acttgactca aaacgtcgat aacgttaagg gtcacaactt catcgtgttg	1620
tccttcaaga acgaggaaag gctgaccatc gctaagaaga acaaggagtt ctactggatc	1680
tctggcgaaa tcaaggacgt tgatgtgagc caggtcatcc aaaagtaca cagattcaag	1740
caccacatgt tcgtgatcgg caaggtcaac cgtcgagcgt caactacact gcacaacaac	1800
ttgctgaagc tcttggcctt gatcctgcag ggactgggtgc cactctccga cgccatcaca	1860
ttcgccgagc aaaagctcaa ctgcaagtac aagaagttcg agttcaacta a	1911

<210> 2

5 <211> 1749

<212> ADN

10 <213> Nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*

<400> 2

ES 2 611 302 T3

atgactcaaa tcaacttcaa cgcttcctac acctctgcca gcactccctc tcgtgctagc 60
 ttcgacaact catactcgga gttctgcgac aagcaaccta acgattactt gtcttactac 120
 aaccacccaa ccccggaagg agctgatact gtcactctccg actctgaaac cgctgccgct 180
 agcaacttcc tcgcctcagt taactcgctc actgacaacg atttggtgga gtgtctgctc 240
 aagaccactg acaacctgga ggaagctgtg tcctctgcct actacagcga gtcactcgaa 300
 cagccagtgg tcgaacaacc ctctcctagc tcagettacc acgccgagtc cttcgaacac 360
 tctgctggtg tcaaccagcc gtcggccaca ggcaccaaga ggaagttgga cgagtacctg 420
 gataactccc agggagttgt gggtaattc aacaagatca agttgagacc taagtacaag 480
 aagagcacca tccagtcatg cgctacactg gaacaaacca tcaaccacaa cactaacatc 540
 tgtacagtgg ctccaccca ggagatcact cactacttca caaacgactt cgccccctac 600
 ctgatgaggt tcgacgataa cgactacaac tcgaacagat tctccgatca catgtctgaa 660
 accggttact acatgttcgt cgtaagaag tccgaggtga agcctttcga aatcatcttc 720
 gccaaagtacg tctctaactg ggtctacgag tacacaaaca actactacat ggttgacaac 780
 cgtgtgttcg ttgtgacctt cgataagatc cgcttcatga tcagctacaa cctggttaag 840

 gagactggca tcgaaatccc aactcacag gacgtctgca acgatgagac cgccgctcaa 900
 aactgcaaga agtgtcactt cgtggacgtc caccacacat tcaaggccgc tctgacctcc 960
 tacttcaacc tcgatatgta ctacgctcag acaaccttcg tgaccttgct gcaatcactc 1020
 ggcgagcgtg agtgtggatt cctcttgctg aagttgtacg agatgtacca ggacaagaac 1080
 ctcttcactt tgcccatcat gctgagccgc aaggaatcaa acgagatcga aaccgctctt 1140
 aacaacttct tcgtctcgcc atacgtttcc cagatcctca agtactcggg gtccgtccaa 1200
 ttcccggaca accctcccaa caagtacgtc gttgataacc tgaacctcat cgtgaacaag 1260
 aagagcactc tgacatacaa gtactcgctc gtcgctaacc tgctcttcaa caactacaag 1320
 taccacgaca acatcgctt taacaacaac gccgagaacc tcaagaaggt caagaaggaa 1380
 gagggaagca tgcacatcgt tgagcagtac ttgactcaaa acgtcgataa cgtaaggggt 1440
 cacaacttca tcgtgttgtc cttcaagaac gaggaaaggc tgaccatcgc taagaagaac 1500
 aaggagtctt actggatctc tggcgaaatc aaggacgttg atgtgagcca ggtcatccaa 1560
 aagtacaaca gattcaagca ccacatgttc gtgatcggca aggtcaaccg tcgcgagtca 1620
 actacactgc acaacaactt gctgaagctc ttggccttga tcctgcaggg actggtgcca 1680
 ctctccgagc ccatcacatt cgccgagcaa aagctcaact gcaagtacaa gaagttcgag 1740
 ttcaactaa 1749

ES 2 611 302 T3

<211> 1911

<212> ADN

5

<213> Nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*

<400> 3

atgatccgta catccagcca cgtcctgaac gtccaagaaa acatcatgac ttccaactgt	60
gcttccagcc cctactcctg tgaggccact tcagcctgcg ctgaggccca gcaactgcag	120
gtggacacag gtggcgataa gatcgtgaac aaccagggtca ccatgactca aatcaacttc	180
aacgcttctc acacctctgc cagcaactccc tctcgtgcta gcttcgacaa ctcatactcg	240
gagttctgcg acaagcaacc taacgattac ttgtcttact acaaccaccc aaccccgac	300
ggagctgata ctgtcatctc cgactctgaa accgctgccg ctagcaactt cctcgctca	360
gttaactcgc tcaactgacaa cgatttggtg gagtgtctgc tcaagaccac tgacaacctg	420
gaggaagctg tgtcctctgc ctactacagc gagtcactcg aacagccagt ggtcgaacaa	480
ccctctccta gctcagctta ccacgccgag tccttcgaac actctgctgg tgtcaaccag	540
ccgtcggcca caggcaccaa gaggaagttg gacgagtacc tggataactc ccagggagtt	600
gtgggtcaat tcaacaagat caagttgaga cctaagtaca agaagagcac catccagtca	660
tgcgctacac tggaacaaac catcaaccac aactaaca tctgtacagt ggcttcacc	720

10

ES 2 611 302 T3

caggagatca ctcactactt cacaaacgac ttcgccccct acctgatgag gttcgcacgat 780
aacgactaca actcgaacag attctccgat cacatgtctg aaaccgggta ctacatgttc 840
gtcgttaaga agtccgaggt gaagcctttc gaaatcatct tcgcccaagta cgtctcctaac 900
gtggtctacg agtacacaaa caactactac atgggtgaca accgtgtggt cgttgtgacc 960
ttcgataaga tccgcttcat gatcagctac aacctgggta aggagactgg catcggaaatc 1020
ccacactcac aggacgtctg caacgatgag accgccgctc aaaactgcaa gaagtgtcac 1080
ttcgtggacg tccaccacac attcaaggcc gctctgacct cctacttcaa cctcgatatg 1140
tactacgctc agacaacctt cgtgaccttg ctgcaatcac tcggcgagcg taagtgtgga 1200
ttcctcttgt cgaagttgta cgagatgtac caggacaaga acctcttcac tttgcccatc 1260
atgctgagcc gcaaggaatc aaacgagatc gaaaccgcct ctaacaactt cttcgtctcg 1320
ccatacgttt cccagatcct caagtactcg gagtccgtcc aattcccgga caaccctccc 1380
aacaagtacg tcgttgataa cctgaacctc atcgtgaaca agaagagcac tctgacatac 1440
aagtactcgt ccgtcgctaa cctgctcttc aacaactaca agtaccacga caacatcgct 1500
tctaacaaca acgccgagaa cctcaagaag gtcaagaagg aagacggaag catgcacatc 1560
gttgagcagt acttgactca aaacgtcgat aacgttaagg gtcacaactt catcgtgttg 1620
tccttcaaga acgaggaaag gctgaccatc gctaagaaga acaaggagtt ctactggatc 1680
tctggcgaaa tcaaggacgt tgatgtgagc caggatcatcc aaaagtacaa cagattcaag 1740
caccacatgt tcgtgatcgg caaggccaac cgtcgcgagt caactacact gcacaacaac 1800
ttgctgaagc tcttggcctt gatcctgcag ggactgggtc cactctccga cgccatcaca 1860
ttcgccgagc aaaagctcaa ctgcaagtac aagaagtctg agttcaacta a 1911

<210> 4

5 <211> 666

<212> ADN

<213> Nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*

10

<400> 4

ES 2 611 302 T3

atgactcaaa tcaacttcaa cgcttcctac acctctgcc a gactccctc tcgtgctagc 60
 ttcgacaact catactcgga gttctgcgac aagcaacct a acgattactt gtottactac 120
 aaccacccaa ccccgagcgg agctgatact gtcattctccg actctgaaac cgctgccgct 180
 agcaacttcc tcgcctcagt taactcgctc actgacaacg atttgggtgga gtgtctgctc 240
 aagaccactg acaacctgga ggaagetgtg tcctctgcct actacagcga gtcactcgaa 300
 cagccagtgg tcgaacaacc ctctcctagc tcagcttacc acgccgagtc cttogaacac 360
 tctgctggtg tcaaccagcc gtcggccaca ggcaccaaga ggaagttgga cgagtacctg 420
 gataactccc agggagttgt gggtaattc aacaagatca agttgagacc taagtacaag 480
 aagagcacca tccagtcag cgctacactg gaacaaacca tcaaccacaa cactaacatc 540
 tgtacagtgg cttccacca ggagatcact cactacttca caaacgactt cgtcccctac 600
 ctgatgaggt tcgacgataa cgactacaac tcgaacagat tctccgatca catgtctgaa 660
 accggt 666

5 <210> 5

<211> 828

<212> ADN

10

<213> Nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*

<400> 5

atgatccgta catccagcca cgtcctgaac gtccaagaaa acatcatgac ttccaactgt 60
 gcttccagcc cctactcctg tgaggccact tcagcctgcg ctgaggcca gcaactgcag 120
 gtggacacag gtggcgataa gatcgtgaac aaccaggtca ccatgactca aatcaacttc 180
 aacgcttctt acacctctgc cagcaactccc tctcgtgcta gcttcgacaa ctcatactcg 240
 gagttctgcg acaagcaacc taacgattac ttgtcttact acaaccaccc aaccccgac 300
 ggagctgata ctgtcatctc cgactctgaa accgctgccg ctagcaactt cctcgctca 360
 gttaactcgc tcaactgacaa cgatttggtg gagtgtctgc tcaagaccac tgacaacctg 420
 gaggaagctg tgtcctctgc ctactacagc gagtcaactc aacagccagt ggtcgaacaa 480
 cctctccta gctcagetta ccacgccgag tccttcgaa actctgctgg tgtcaaccag 540
 ccgtcggcca caggcaccaa gaggaagttg gacgagtacc tggataactc ccagggagtt 600
 gtgggtcaat tcaacaagat caagttgaga cctaagtaca agaagagcac catccagtca 660
 tgcgctacac tggacaaac catcaaccac aacactaaca tctgtacagt ggcttcacc 720
 caggagatca ctcaactatt cacaaacgac ttcgccccct acctgatgag gttcgacgat 780
 aacgactaca actcgaacag attctccgat cacatgtctg aaaccggt 828

15

<210> 6

ES 2 611 302 T3

<211> 582

<212> PRT

5

<213> Nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*

<400> 6

Met Thr Gln Ile Asn Phe Asn Ala Ser Tyr Thr Ser Ala Ser Thr Pro
1 5 10 15

Ser Arg Ala Ser Phe Asp Asn Ser Tyr Ser Glu Phe Cys Asp Lys Gln
20 25 30

10

Pro Asn Asp Tyr Leu Ser Tyr Tyr Asn His Pro Thr Pro Asp Gly Ala
35 40 45

ES 2 611 302 T3

Asp Thr Val Ile Ser Asp Ser Glu Thr Ala Ala Ala Ser Asn Phe Leu
 50 55 60

Ala Ser Val Asn Ser Leu Thr Asp Asn Asp Leu Val Glu Cys Leu Leu
 65 70 75 80

Lys Thr Thr Asp Asn Leu Glu Glu Ala Val Ser Ser Ala Tyr Tyr Ser
 85 90 95

Glu Ser Leu Glu Gln Pro Val Val Glu Gln Pro Ser Pro Ser Ser Ala
 100 105 110

Tyr His Ala Glu Ser Phe Glu His Ser Ala Gly Val Asn Gln Pro Ser
 115 120 125

Ala Thr Gly Thr Lys Arg Lys Leu Asp Glu Tyr Leu Asp Asn Ser Gln
 130 135 140

Gly Val Val Gly Gln Phe Asn Lys Ile Lys Leu Arg Pro Lys Tyr Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Thr Ile Gln Ser Cys Ala Thr Leu Glu Gln Thr Ile Asn His
 165 170 175

Asn Thr Asn Ile Cys Thr Val Ala Ser Thr Gln Glu Ile Thr His Tyr
 180 185 190

Phe Thr Asn Asp Phe Ala Pro Tyr Leu Met Arg Phe Asp Asp Asn Asp
 195 200 205

Tyr Asn Ser Asn Arg Phe Ser Asp His Met Ser Glu Thr Gly Tyr Tyr
 210 215 220

Met Phe Val Val Lys Lys Ser Glu Val Lys Pro Phe Glu Ile Ile Phe
 225 230 235 240

Ala Lys Tyr Val Ser Asn Val Val Tyr Glu Tyr Thr Asn Asn Tyr Tyr
 245 250 255

Met Val Asp Asn Arg Val Phe Val Val Thr Phe Asp Lys Ile Arg Phe
 260 265 270

Met Ile Ser Tyr Asn Leu Val Lys Glu Thr Gly Ile Glu Ile Pro His
 275 280 285

Ser Gln Asp Val Cys Asn Asp Glu Thr Ala Ala Gln Asn Cys Lys Lys
 290 295 300

ES 2 611 302 T3

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

ES 2 611 302 T3

545

550

555

560

Leu Ser Asp Ala Ile Thr Phe Ala Glu Gln Lys Leu Asn Cys Lys Tyr
565 570 575

Lys Lys Phe Glu Phe Asn
580

<210> 7

5 <211> 636

<212> PRT

10 <213> Nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*

<400> 7

ES 2 611 302 T3

Met Ile Arg Thr Ser Ser His Val Leu Asn Val Gln Glu Asn Ile Met
1 5 10 15

Thr Ser Asn Cys Ala Ser Ser Pro Tyr Ser Cys Glu Ala Thr Ser Ala
20 25 30

Cys Ala Glu Ala Gln Gln Leu Gln Val Asp Thr Gly Gly Asp Lys Ile
35 40 45

Val Asn Asn Gln Val Thr Met Thr Gln Ile Asn Phe Asn Ala Ser Tyr
50 55 60

Thr Ser Ala Ser Thr Pro Ser Arg Ala Ser Phe Asp Asn Ser Tyr Ser
65 70 75 80

Glu Phe Cys Asp Lys Gln Pro Asn Asp Tyr Leu Ser Tyr Tyr Asn His
85 90 95

Pro Thr Pro Asp Gly Ala Asp Thr Val Ile Ser Asp Ser Glu Thr Ala
100 105 110

Ala Ala Ser Asn Phe Leu Ala Ser Val Asn Ser Leu Thr Asp Asn Asp
115 120 125

Leu Val Glu Cys Leu Leu Lys Thr Thr Asp Asn Leu Glu Glu Ala Val
130 135 140

Ser Ser Ala Tyr Tyr Ser Glu Ser Leu Glu Gln Pro Val Val Glu Gln
145 150 155 160

Pro Ser Pro Ser Ser Ala Tyr His Ala Glu Ser Phe Glu His Ser Ala
165 170 175

Gly Val Asn Gln Pro Ser Ala Thr Gly Thr Lys Arg Lys Leu Asp Glu

ES 2 611 302 T3

	180		185		190												
Tyr	Leu	Asp	Asn	Ser	Gln	Gly	Val	Val	Gly	Gln	Phe	Asn	Lys	Ile	Lys		
		195					200					205					
Leu	Arg	Pro	Lys	Tyr	Lys	Lys	Ser	Thr	Ile	Gln	Ser	Cys	Ala	Thr	Leu		
	210					215					220						
Glu	Gln	Thr	Ile	Asn	His	Asn	Thr	Asn	Ile	Cys	Thr	Val	Ala	Ser	Thr		
225					230					235					240		
Gln	Glu	Ile	Thr	His	Tyr	Phe	Thr	Asn	Asp	Phe	Ala	Pro	Tyr	Leu	Met		
				245					250					255			
Arg	Phe	Asp	Asp	Asn	Asp	Tyr	Asn	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Asp	His	Met		
			260					265					270				
Ser	Glu	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Met	Phe	Val	Val	Lys	Lys	Ser	Glu	Val	Lys		
		275					280						285				
Pro	Phe	Glu	Ile	Ile	Phe	Ala	Lys	Tyr	Val	Ser	Asn	Val	Val	Tyr	Glu		
	290					295					300						
Tyr	Thr	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Met	Val	Asp	Asn	Arg	Val	Phe	Val	Val	Thr		
305					310					315					320		
Phe	Asp	Lys	Ile	Arg	Phe	Met	Ile	Ser	Tyr	Asn	Leu	Val	Lys	Glu	Thr		
				325					330					335			
Gly	Ile	Glu	Ile	Pro	His	Ser	Gln	Asp	Val	Cys	Asn	Asp	Glu	Thr	Ala		
			340					345					350				
Ala	Gln	Asn	Cys	Lys	Lys	Cys	His	Phe	Val	Asp	Val	His	His	Thr	Phe		
		355					360					365					
Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Ser	Tyr	Phe	Asn	Leu	Asp	Met	Tyr	Tyr	Ala	Gln		
	370					375					380						
Thr	Thr	Phe	Val	Thr	Leu	Leu	Gln	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Lys	Cys	Gly		
385					390					395					400		
Phe	Leu	Leu	Ser	Lys	Leu	Tyr	Glu	Met	Tyr	Gln	Asp	Lys	Asn	Leu	Phe		
				405					410					415			
Thr	Leu	Pro	Ile	Met	Leu	Ser	Arg	Lys	Glu	Ser	Asn	Glu	Ile	Glu	Thr		
			420					425					430				

ES 2 611 302 T3

Ala Ser Asn Asn Phe Phe Val Ser Pro Tyr Val Ser Gln Ile Leu Lys
435 440 445

Tyr Ser Glu Ser Val Gln Phe Pro Asp Asn Pro Pro Asn Lys Tyr Val
450 455 460

Val Asp Asn Leu Asn Leu Ile Val Asn Lys Lys Ser Thr Leu Thr Tyr
465 470 475 480

Lys Tyr Ser Ser Val Ala Asn Leu Leu Phe Asn Asn Tyr Lys Tyr His
485 490 495

Asp Asn Ile Ala Ser Asn Asn Asn Ala Glu Asn Leu Lys Lys Val Lys
500 505 510

Lys Glu Asp Gly Ser Met His Ile Val Glu Gln Tyr Leu Thr Gln Asn
515 520 525

Val Asp Asn Val Lys Gly His Asn Phe Ile Val Leu Ser Phe Lys Asn
530 535 540

Glu Glu Arg Leu Thr Ile Ala Lys Lys Asn Lys Glu Phe Tyr Trp Ile
545 550 555 560

Ser Gly Glu Ile Lys Asp Val Asp Val Ser Gln Val Ile Gln Lys Tyr
565 570 575

Asn Arg Phe Lys His His Met Phe Val Ile Gly Lys Val Asn Arg Arg
580 585 590

Glu Ser Thr Thr Leu His Asn Asn Leu Leu Lys Leu Leu Ala Leu Ile
595 600 605

Leu Gln Gly Leu Val Pro Leu Ser Asp Ala Ile Thr Phe Ala Glu Gln
610 615 620

Lys Leu Asn Cys Lys Tyr Lys Lys Phe Glu Phe Asn
625 630 635

<210> 8

5 <211> 222

<212> PRT

<213> Nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*

10

<400> 8

ES 2 611 302 T3

Met Thr Gln Ile Asn Phe Asn Ala Ser Tyr Thr Ser Ala Ser Thr Pro
 1 5 10 15

Ser Arg Ala Ser Phe Asp Asn Ser Tyr Ser Glu Phe Cys Asp Lys Gln
 20 25 30

Pro Asn Asp Tyr Leu Ser Tyr Tyr Asn His Pro Thr Pro Asp Gly Ala
 35 40 45

Asp Thr Val Ile Ser Asp Ser Glu Thr Ala Ala Ala Ser Asn Phe Leu
 50 55 60

Ala Ser Val Asn Ser Leu Thr Asp Asn Asp Leu Val Glu Cys Leu Leu
 65 70 75 80

Lys Thr Thr Asp Asn Leu Glu Glu Ala Val Ser Ser Ala Tyr Tyr Ser
 85 90 95

Glu Ser Leu Glu Gln Pro Val Val Glu Gln Pro Ser Pro Ser Ser Ala
 100 105 110

Tyr His Ala Glu Ser Phe Glu His Ser Ala Gly Val Asn Gln Pro Ser
 115 120 125

Ala Thr Gly Thr Lys Arg Lys Leu Asp Glu Tyr Leu Asp Asn Ser Gln
 130 135 140

Gly Val Val Gly Gln Phe Asn Lys Ile Lys Leu Arg Pro Lys Tyr Lys
 145 150 155 160

Lys Ser Thr Ile Gln Ser Cys Ala Thr Leu Glu Gln Thr Ile Asn His
 165 170 175

Asn Thr Asn Ile Cys Thr Val Ala Ser Thr Gln Glu Ile Thr His Tyr
 180 185 190

Phe Thr Asn Asp Phe Ala Pro Tyr Leu Met Arg Phe Asp Asp Asn Asp
 195 200 205

Tyr Asn Ser Asn Arg Phe Ser Asp His Met Ser Glu Thr Gly
 210 215 220

5 <210> 9

<211> 276

<212> PRT

10

<213> Nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*

ES 2 611 302 T3

<400> 9

Met	Ile	Arg	Thr	Ser	Ser	His	Val	Leu	Asn	Val	Gln	Glu	Asn	Ile	Met
1				5					10					15	

ES 2 611 302 T3

Thr Ser Asn Cys Ala Ser Ser Pro Tyr Ser Cys Glu Ala Thr Ser Ala
 20 25 30

Cys Ala Glu Ala Gln Gln Leu Gln Val Asp Thr Gly Gly Asp Lys Ile
 35 40 45

Val Asn Asn Gln Val Thr Met Thr Gln Ile Asn Phe Asn Ala Ser Tyr
 50 55 60

Thr Ser Ala Ser Thr Pro Ser Arg Ala Ser Phe Asp Asn Ser Tyr Ser
 65 70 75 80

Glu Phe Cys Asp Lys Gln Pro Asn Asp Tyr Leu Ser Tyr Tyr Asn His
 85 90 95

Pro Thr Pro Asp Gly Ala Asp Thr Val Ile Ser Asp Ser Glu Thr Ala
 100 105 110

Ala Ala Ser Asn Phe Leu Ala Ser Val Asn Ser Leu Thr Asp Asn Asp
 115 120 125

Leu Val Glu Cys Leu Leu Lys Thr Thr Asp Asn Leu Glu Glu Ala Val
 130 135 140

Ser Ser Ala Tyr Tyr Ser Glu Ser Leu Glu Gln Pro Val Val Glu Gln
 145 150 155 160

Pro Ser Pro Ser Ser Ala Tyr His Ala Glu Ser Phe Glu His Ser Ala
 165 170 175

Gly Val Asn Gln Pro Ser Ala Thr Gly Thr Lys Arg Lys Leu Asp Glu
 180 185 190

Tyr Leu Asp Asn Ser Gln Gly Val Val Gly Gln Phe Asn Lys Ile Lys
 195 200 205

Leu Arg Pro Lys Tyr Lys Lys Ser Thr Ile Gln Ser Cys Ala Thr Leu
 210 215 220

Glu Gln Thr Ile Asn His Asn Thr Asn Ile Cys Thr Val Ala Ser Thr
 225 230 235 240

Gln Glu Ile Thr His Tyr Phe Thr Asn Asp Phe Ala Pro Tyr Leu Met
 245 250 255

Arg Phe Asp Asp Asn Asp Tyr Asn Ser Asn Arg Phe Ser Asp His Met
 260 265 270

Ser Glu Thr Gly
275

<210> 10

5 <211> 128

<212> ADN

<213> Nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*

10 <400> 10

atcatggaga taattaaat gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc 60

gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca 120

tcgggcgc 128

15 <210> 11

<211> 122

<212> ADN

20 <213> Nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*

<400> 11

atacggacct ttaattcaac ccaacacaat atattatagt taaataagaa ttattatcaa 60

atcatttgta tattaattaa aatactatac tgtaaattac atttattta caatcactcg 120

25 **ac 122**

<210> 12

<211> 571

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Promotor quimérico recombinante

40 <400> 12

ES 2 611 302 T3

aaaaacatcg attagggatga ctgaaggatga cattggggta ggttatggtt aatacgtaat 60
 ggtttaacac caaaacgata tcatggattt tatataaggt gtaataatat ttttaatgag 120
 tggacgcgctc gggatcaatgt cctgcctatt gacgtcataa catattaggt gattatatta 180
 aaaatagttt aaactcaaat attacttgca agtttaagtt tcatcataat ctgatcataa 240
 gtttcaccca aacagaaacc aaaagcataa ctatcgaata tcttttagctt cccatgaaga 300
 aagattaccg taaccatcac taggatttta tacgattgta gaaaataaag tattctcagt 360
 ctcttttcag agcgcataa aaaggggtgc attctcggta agagtacagt tgaactcaca 420
 tcgagttaac tccacgctgc agtctcgaga tacggacctt taattcaacc caacacaata 480
 tattatagtt aaataagaat tattatcaaa tcatttgtat attaattaa atactatact 540
 gtaaattaca ttttatttac aatcactcga c 571

<210> 13

5 <211> 465

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Promotor quimérico recombinante

15 <400> 13

ggtaccaaatt tccgttttgc gacgatgcag agtttttgaa caggctgctc aaacacatag 60
 atccgtaccc gctcagtcgg atgtattaca atgcagccaa taccatggtt tacacgacta 120
 tggaaaacta tgcgctgtcc aattgcaagt tcaacattga ggattacaat aacatattta 180
 aggtgatgga aatattagg aaacacagca acaaaaattc aaacgaccaa gacgagttaa 240
 acatatattt gggagttcag tcgtcgaatg caaagcgtaa aaaatattaa taaggtaaaa 300
 attacagcta cataaattac acaatttaa ctgcagctcg gagatcggga cttttaattc 360
 aaccaaacac aatatattat agttaataa gaattattat caaatcattt gtatattaat 420
 taaaatacta tactgtaaat tacattttat ttacaatcac tcgac 465

<210> 14

20

<211> 436

<212> ADN

25 <213> Nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*

<400> 14

ES 2 611 302 T3

aaaaacatcg attaggggtga ctgaagggtta cattggggta ggttatggtt aatacgtaat 60
 ggtttaacac caaaacgata tcatggattt tatataaggt gtaataatat ttttaatgag 120
 tggacgcgtc gggccaatgt cctgcctatt gacgtcataa catattaggt gattatatta 180
 aaaatagttt aaactcaaatt attacttgca agtttaagtt tcatcataat ctgatcataa 240
 gtttcaccca aacagaaacc aaaagcataa ctatcgaata tctttagctt cccatgaaga 300
 aagattaccg taaccatcac taggatttta taogattgta gaaaataaag tattctcagt 360
 ctcttttcag agcgtataa aaaggggtgc attctcggta agagtacagt tgaactcaca 420
 tcgagttaac tccacg 436

<210> 15

5 <211> 1176

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Promotor quimérico recombinante

15 <400> 15

cttgaatggt agtgaaaccc cctgcgacac aagtattaca ttccttagtg cttgaatcct 60
 ttaggaaaga aaagccaatt ttcaaaatct tagcacttgt taactcgcga aaaagaccaa 120
 cagatttccc atactacaat tcgacattag aatgtaaac ccattatcat tatttacgcc 180
 tcatttccat ccaataataa gttaagtac gttgagataa aactggctta cctagaactt 240

ES 2 611 302 T3

gacatggcga cctcttgac tctgtatctc aagtcaactt tctctatcca aatatttgat 300
aacatttgac atgatattga agtaagattg ttactaaggc ttacattgta atattactga 360
cgcaagttct ttatcaataa aatagctgaa aacaaaaaaaa aaaacatcga ttaggggtgac 420
tgaaggttac attggggtag gttatggtta atacgtaatg gtttaacacc aaaacgatat 480
catggattga ctttataaat tttatataag gtgtaataat atttttaatg agtggacgcg 540
tcgggtcaat gtcctgccta ttgacgtcat aacatattag gtgattatat taaaaatact 600
caaatattac ttgcaagttt aagtttcatc ataactctgat cataagtttc acccaaacag 660
aaacccaaaag cataactatc tgctatttga atatctttag cttcccatga agaaagatta 720
ccgtaacat cactaggatt ttatacgatt gtagaaaata aagtattctc agtctctttt 780
cagtttaaaa tctgctggca tttttacaag tcgctgtatc agtcaatggt tataacaatat 840
gtcaatgtac tttcgtatta atcagaaaaa aatattctac tagttttgat aagctatcac 900
ttttgttaca ttgtactgcc ctttacagtt catcaggtat ttatgaatga catattggag 960
aaacatcgta atcagtcag tataaaaagg ggtgcattct cggtaaagat acagttgaac 1020
tcacatcgag ttaactccac gctgcagtct cgagatacgg acctttaatt caacccaaca 1080
caatatatta tagttaaata agaattatta tcaaatcatt tgtatattaa ttaaaatact 1140
atactgtaaa ttacatttta tttacaatca ctcgac 1176

<210> 16

5 <211> 250

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Promotor quimérico recombinante

15 <400> 16

atcatggaga taattaaaat gataaccatc tcgcaataa ataagtattt tactgttttc 60
gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca 120
tcgggcgcat acggaccttt aattcaacc aacacaatat attatagtta aataagaatt 180
attatcaaat catttgtata ttaattaaa tactatactg taaattacat tttatttaca 240
atcactcgac 250

<210> 17

20

<211> 3163

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Casete de expresión recombinante

<400> 17

ES 2 611 302 T3

ttagttgaac tcgaacttct tgtacttgca gttgagcttt tgctcggcga atgtgatggc 60
 gtcggagagt ggcaccagtc cctgcaggat caaggccaag agcttcagca agttgtttgtg 120
 cagtgtagtt gactcgcgac ggttgacctt gccgatcacg aacatgtggg gcttgaatct 180
 gttgtacttt tggatgacct ggctcacatc aacgtccttg atttcgccag agatccagta 240
 gaactccttg ttcttcttag cgatggtcag cctttcctcg ttcttgaagg acaacaogat 300
 gaagttgtga cccttaacgt tatcgacgtt ttgagtcaag tactgctcaa cgatgtgeat 360
 gcttccgtct tccttcttga ccttcttgag gttctcggcg ttggtttag aagcgatggt 420
 gtcgtggtac ttgtagttgt tgaagagcag gttagcgacg gacgagtact tgtatgtcag 480
 agtgctcttc ttgttcacga tgaggttcag gttatcaacg acgtacttgt tgggagggtt 540
 gtcggggaat tggacggact ccgagtactt gaggatctgg gaaacgtatg gcgagacgaa 600
 gaagttgta gaggcggttt cgatctcgtt tgattccttg cggctcagca tgatgggcaa 660
 agtgaagagg ttcttgtcct ggtacatctc gtacaacttc gacaagagga atccacactt 720
 acgctcgcg agtgattgca gcaaggtcac gaaggttgtc tgagcgtagt acatatacgag 780
 gttgaagtag gaggtcagag cggccttgaa tgtgtggtgg acgtccacga agtgacactt 840
 cttgcagttt tgagcggcgg tctcatcgtt gcagacgtcc tgtgagtgtg ggatttcgat 900
 gccagtctcc ttaaccaggt tgtagctgat catgaagcgg atcttatoga aggtcacaac 960
 gaacacacgg ttgtcaacca tgtagtagtt gtttgtgtac tcgtagacca cgttagagac 1020
 gtacttggcg aagatgattt cgaaaggctt cacctcggac ttcttaacga cgaacatgta 1080
 gtaaccgggt tcagacatgt gatcggagaa tctgttcgag ttgtagtctt tatcgtcgaa 1140
 cctcatcagg tagggggcga agtcgtttgt gaagtagtga gtgatctcct ggggtggaagc 1200
 cactgtacag atgttagtgt tgtggttgat ggtttgttcc agtgtagcgc atgactggat 1260
 ggtgctcttc ttgtacttag gtctcaactt gatcttgttg aattgaccca caactccctg 1320
 ggagttatcc aggtactcgt ccaacttctt cttggtgcct gtggccgacg gctggttgac 1380
 accagcagag tgttcgaagg actcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac 1440
 cactggctgt tcgagtgact cgctgtagta ggcagaggac acagcttctt ccaggttgtc 1500
 agtggctctt agcagacact ccaccaaatc gttgtcagtg agcgagttaa ctgaggcgag 1560
 gaagttgcta gcggcagcgg tttcagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccggggt 1620
 tgggtggttg tagtaagaca agtaatcgtt aggttgcttg tcgcagaact ccgagtatga 1680
 gttgtogaag ctagcacgag agggagtgtt ggcagaggtg taggaagcgt tgaagttgat 1740
 ttgagtcagtg gtgacctggt tgttcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg 1800
 ctgggcctca gcgcaggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga 1860
 agtcatgatg ttttcttga cgttcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatt 1920

ES 2 611 302 T3

gggtcatcta gattcgaaag cggccgcgac tagtgagctc gtcgacgtag gcctttgaat 1980
 tccgcgcgct tcggaccggg atccgcgccc gatgggtggga cggatgaat aatccggaat 2040
 atttataggt ttttttatta caaaactggt acgaaaacag taaaatactt atttatattgc 2100
 gagatggta tcattttaat tatctccatg atctattaat attccggagt atacatcgat 2160
 gttgacccca acaaaagatt tataattaat cataatcacg aacaacaaca agtcaatgaa 2220
 acaataaac aagttgtcga taaaacattc ataaatgaca cagcaacata caattcttgc 2280
 ataataaaaa tttaaatgac atcatatttg agaataacaa atgacattat cccctcgattg 2340
 tgttttacia gtagaattct acccgtaaag cgagtttagt tttgaaaaac aaatgacatc 2400
 atttgtataa tgacatcatc cccctgattgt gttttacaag tagaattcta tccgtaaagc 2460
 gagttcagtt ttgaaaacaa atgagtcata cctaaacacg ttaataatct totgatatca 2520
 gcttatgact caagttatga gccgtgtgca aaacatgaga taagtttatg acatcatcca 2580
 ctgatcgtgc gttacaagta gaattctact cgtaaagcca gttcggttat gagccgtgtg 2640
 caaaacatga catcagctta tgactcatac ttgattgtgt tttacgcgta gaattctact 2700
 cgtaaagcga gttcggttat gagccgtgtg caaaacatga catcagctta tgagtcataa 2760
 ttaatcgtgc gttacaagta gaattctact cgtaaagcga gttgaaggat catatttagt 2820
 tgcgtttatg agataagatt gaaagcacgt gtaaaatggt tcccgcgcgt tggcacaact 2880
 atttacaatg cggccaagtt ataaaagatt ctaatctgat atgttttaa acacctttgc 2940
 ggcccagatt gtttgcgtac gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag 3000
 taaaacaaaa ccctagtatt ggagcaataa tcgatgagct catacggacc ttttaattcaa 3060
 cccaacacaa tatattatag ttaaataaga attattatca aatcatttgt atattaatta 3120
 aaatactata ctgtaaatta cattttattt acaatcactc gac 3163

<210> 18

5 <211> 3656

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Casete de expresión recombinante

15

<400> 18

ES 2 611 302 T3

ttagttgaac tcgaacttct tgtacttgca gttgagcttt tgctcggcga atgtgatggc	60
gtcggagagt ggcaccagtc cctgcaggat caaggccaag agcttcagca agttgttgtg	120
cagtgtagtt gactcgcgac ggttgacctt gccgatcacg aacatgtggt gcttgaatct	180
gttgacttt tggatgacct ggctcacatc aacgtccttg atttcgccag agatccagta	240
gaactccttg ttcttcttag cgatggtcag cctttcctcg ttcttgaagg acaacacgat	300

ES 2 611 302 T3

gaagttgtga cccttaacgt tatcgacgtt ttgagtcaag tactgctcaa cgatgtgcat 360
 gcttccgtct tccttcttga ccttcttgag gttctcggcg ttgttggttag aagcgatggt 420
 gtcgtggtac ttgtagttgt tgaagagcag gttagcgcag gacgagtact tgtatgtcag 480
 agtgctcttc ttgttcacga tgaggttcag gttatcaacg acgtacttgt tgggaggggt 540
 gtcggggaat tggacggact ccgagtactt gaggatctgg gaaacgtatg gcgagacgaa 600
 gaagttgtta gagggcggtt cgatctcgtt tgattccttg cggctcagca tgatgggcaa 660
 agtgaagagg ttcttgtcct ggtacatctc gtacaacttc gacaagagga atccacactt 720
 acgctcgccg agtgattgca gcaaggtcac gaaggttgtc tgagcgtagt acatatacag 780
 gttgaagtag gaggtcagag cggccttgaa tgtgtggtgg acgtccacga agtgacactt 840
 cttgcagttt tgagcggcgg tctcatcgtt gcagacgtcc tgtgagtgtg ggatttcgat 900
 gccagtctcc ttaaccaggt tgtagctgat catgaagcgg atcttatcga aggtcacaac 960
 gaacacacgg ttgtcaacca tgtagtgtt gtttgtgtac tcgtagacca cgtagagac 1020
 gtacttggcg aagatgattt cgaaaggctt cacctcggac ttcttaacga cgaacatgta 1080
 gtaaccgggt tcagacatgt gatcggagaa tctgttcgag ttgtagtcgt tatcgtcgaa 1140
 cctcatcagg tagggggcga agtcgtttgt gaagtagtga gtgatctcct ggggtggaagc 1200
 cactgtacag atgttagtgt tgtggtgat ggtttgttcc agtgtagcgc atgactggat 1260
 ggtgctcttc ttgtacttag gtctcaactt gatcttgttg aattgaccca caactccctg 1320
 ggagttatcc aggtactcgt ccaacttcct cttggtgcct gtggccgacg gctggttgac 1380
 accagcagag tgttcgaagg actcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac 1440
 cactggctgt tcgagtgact cgctgtagta ggcagaggac acagcttcct ccaggttgtc 1500
 agtggctctg agcagacact ccaccaaatc gttgtcagtg agcgagttaa ctgagggcag 1560
 gaagttgcta gcggcagcgg tttcagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccggggt 1620
 tgggtggttg tagtaagaca agtaatcgtt aggttgcttg tcgcagaact ccgagtatga 1680
 gttgtcgaag ctagcacgag agggagtgtt ggcagaggtg taggaagcgt tgaagttgat 1740
 ttgagtcatg gtgacctggt tgttcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg 1800
 ctgggcctca gcgcaggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga 1860
 agtcatgatg ttttcttggg cgttcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatt 1920
 gggctatcta gattcgaaag cggccgcgac tagtgagctc gtcgacgtag gcctttgaat 1980
 tcgcgcgct tcggaccggg atccgcgcc gatggtgga cggtatgaat aatccggaat 2040
 atttataggt tttttatta caaaactgtt acgaaaacag taaaatactt atttatttgc 2100
 gagatggtta tcattttaat tatctccatg atctattaat attccggagt atacatgat 2160
 gttgaccca acaaaagatt tataattaat cataatcacg aacaacaaca agtcaatgaa 2220

ES 2 611 302 T3

acaaataaac aagttgtcga taaaacattc ataaatgaca cagcaacata caattccttgc 2280
 ataataaaaa tttaaagtac atcatatttg agaataacaa atgacattat ccctcgattg 2340
 tgttttacia gtagaattct acccgtaaag cgagtttagt tttgaaaaac aatgacatc 2400
 atttgtataa tgacatcatc ccctgattgt gttttacaag tagaattcta tccgtaaagc 2460
 gagttcagtt ttgaaaacaa atgagtcata cctaaacacg ttaataatct tctgatatca 2520
 gcttatgact caagttatga gccgtgtgca aaacatgaga taagtttatg acatcatcca 2580
 ctgatcgtgc gttacaagta gaattctact cgtaaagcca gttcggttat gagccgtgtg 2640
 caaaacatga catcagctta tgactcatac ttgattgtgt tttacgcgta gaattctact 2700
 cgtaaagcga gttcggttat gagccgtgtg caaaacatga catcagctta tgagtcataa 2760
 ttaatcgtgc gttacaagta gaattctact cgtaaagcga gttgaaggat catatttagt 2820
 tgcgtttatg agataagatt gaaagcacgt gtaaaatggt tcccgcgcgt tggcacaact 2880
 atttacaatg cggccaagtt ataaaagatt ctaatctgat atgttttaa acaccttgc 2940
 ggcccagatt gtttgcgtac gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag 3000
 taaaacaaaa ccctagtatt ggagcaataa tccgatgagct cgtcgacgta ggcctttgaa 3060
 ttccgcgcgc ttcggaccgg gatccaaaaa catcgattag ggtgactgaa ggttacattg 3120
 gggtaggtaa tggtaatac gtaatggttt aacaccaaaa cgatatcatg gattttatat 3180
 aagggtgtaat aatattttta atgagtggac gcgtcgggtc aatgtcctgc ctattgacgt 3240
 cataacatat taggtgatta tattaaaaat agtttaaact caaatattac ttgcaagttt 3300
 aagtttcatc ataactctgat cataagtttc acccaaacag aaaccaaag cataactatc 3360
 gaatatcttt agcttcccat gaagaaagat taccgtaacc atcactagga ttttatacga 3420
 ttgtagaaaa taaagtattc tcagtctctt ttcagagcgc tataaaaagg ggtgcattct 3480
 cggtaagagt acagttgaac tcacatcgag ttaactccac gctgcagtct cgagatacgg 3540
 acctttaatt caaccaca caatatatta tagttaaata agaattatta tcaaatcatt 3600
 tgtatattaa ttaaataact atactgtaaa ttacatttta tttacaatca ctcgac 3656

<210> 19

5 <211> 3541

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Casete de expresión recombinante

15 <400> 19

ES 2 611 302 T3

ttagttgaac tcgaacttct tgtacttgca gttgagcttt tgctcggcga atgtgatggc 60
gtcggagagt ggcaccagtc cctgcaggat caaggccaag agcttcagca agttgttgtg 120

ES 2 611 302 T3

cagtgtagtt gactcgcgac ggttgacctt gccgatcacg aacatgtggt gcttgaatct 180
 gttgtacttt tggatgacct ggctcacatc aacgtccttg atttcgccag agatccagta 240
 gaactccttg ttcttcttag cgatggtcag cctttcctcg ttcttgaagg acaacacgat 300
 gaagttgtga cccttaacgt tatcgacggt ttgagtcaag tactgctcaa cgatgtgcat 360
 gcttccgtct tccttcttga ccttcttgag gttctcggcg ttggtttag aagcgatggt 420
 gtcgtggtac ttgtagttgt tgaagagcag gttagcgacg gacgagtact tgtatgtcag 480
 agtgcctctc ttgttcacga tgaggttcag gttatcaacg acgtacttgt tgggagggtt 540
 gtccgggaat tggacggact ccgagtactt gaggatctgg gaaacgatg gcgagacgaa 600
 gaagttgta gaggcggttt cgatctcgtt tgattccttg cggctcagca tgatgggcaa 660
 agtgaagagg ttcttgtcct ggtacatctc gtacaacttc gacaagagga atccacactt 720
 acgctcgcgg agtgattgca gcaaggcac gaaggttgtc tgagcgtagt acatatcgag 780
 gttgaagtag gaggtcagag cggccttgaa tgtgtggtgg acgtccacga agtgacactt 840
 cttgcagttt tgagcggcgg tctcatcgtt gcagacgtcc tgtgagtgtg ggatttcgat 900
 gccagtctcc ttaaccaggt tgtagctgat catgaagcgg atcttatcga aggtcacaaac 960
 gaacacacgg ttgtcaacca tgtagtagtt gtttgtgtac tcgtagacca cgtagagac 1020
 gtacttggcg aagatgattt cgaaaggctt cacctcggac ttcttaacga cgaacatgta 1080
 gtaaccgggt tcagacatgt gatcggagaa tctgttcgag ttgtagtcgt tatcgtcgaa 1140
 cctcatcagg tagggggcga agtcgtttgt gaagtagtga gtgatctcct gggtggaagc 1200
 cactgtacag atgttagtgt tgtggttgat ggtttgttcc agtgtagcgc atgactggat 1260
 ggtgctcttc ttgtacttag gtctcaactt gatcttgttg aattgacca caactcctg 1320
 ggagttatcc aggtactcgt ccaacttctt cttggtgcct gtggccgacg gctggttgac 1380
 accagcagag tgttcgaagg actcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac 1440
 cactggctgt tcgagtgact cgctgtagta ggcagaggac acagcttctt ccaggttgtc 1500
 agtggctctg agcagacact ccaccaaac gttgtcagtg agcgagttaa ctgaggcgag 1560
 gaagttgcta gggcagcggg tttcagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccggggt 1620
 tgggtggttg tagtaagaca agtaatcgtt aggttgcttg tcgcagaact ccgagtatga 1680
 gttgtcgaag ctagcacgag agggagtgtt ggcagaggtg taggaagcgt tgaagttgat 1740
 ttgagtcatg gtgacctggt tgttcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg 1800
 ctgggcctca ggcagggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga 1860
 agtcatgatg ttttcttggc cgttcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatc 1920
 tagattcgaa agcggccgcg actagtgagc tcgtcagcgt aggccttga attccgcgcg 1980
 cttcggaccg ggatccgcgc ccgatggtgg gacggtatga ataaccgga atatttatag 2040

ES 2 611 302 T3

gtttttttat tacaaaactg ttaogaaaac agtaaaatac ttatttattt gcgagatggt 2100
 tatcatttta attatctcca tgatctatta atattccgga gtatacatcg atgttgaccc 2160
 caacaaaaga tttataatta atcataatca cgaacaacaa caagtcaatg aaacaaataa 2220
 acaagttgtc gataaaacat tcataaatga cacagcaaca tacaattctt gcataataaa 2280
 aatttaaag acatcatatt tgagaataac aatgacatt atccctcgat tgtgttttac 2340
 aagtagaatt ctaccgtaa agcgagttta gttttgaaaa acaaatgaca tcatttgtat 2400
 aatgacatca tcccctgatt gtgttttaca agtagaattc tatccgtaa gcgagttcag 2460
 ttttgaaaac aatgagtcac tacctaaaca cgtaataat cttctgatat cagcttatga 2520
 ctcaagttat gagccgtgtg caaaacatga gataagttta tgacatcatc cactgatcgt 2580
 gcgttacaag tagaattcta ctcgtaaagc cagttcggtt atgagccgtg tgcaaaacat 2640
 gacatcagct tatgactcat acttgattgt gttttacgcg tagaattcta ctcgtaaagc 2700
 gagttcggtt atgagccgtg tgcaaaacat gacatcagct tatgagtcac aattaatcgt 2760
 gcgttacaag tagaattcta ctcgtaaagc gagttgaagg atcatattta gttgcgttta 2820
 tgagataaga ttgaaagcac gtgtaaaatg tttcccgcgc gttggcacia ctatttacia 2880
 tgccggccaag ttataaaaga ttctaactctg atatgtttta aacaccttt gcggcccag 2940
 ttgtttgcgt acgtgactag cgaagaagat gtgtggaccg cagaacagat agtaaaacia 3000
 aaccctagta ttggagcaat aatcgatgag ctgctcgacg taggcctttg aattccgcgc 3060
 gcttcggacc gggatcggta ccaaattccg ttttgcgacg atgcagagtt tttgaacagg 3120
 ctgctcaaac acatagatcc gtaccgcgctc agtcggatgt attacaatgc agccaatacc 3180
 atgttttaca cgactatgga aaactatgcc gtgtccaatt gcaagttcaa cattgaggat 3240
 tacaataaca tatttaaggt gatggaaaat attaggaac acagcaacia aaattcaaac 3300
 gaccaagacg agttaaacat atatttggga gttcagtcgt cgaatgcaaa gcgtaaaaaa 3360
 tattaataag gtaaaaatta cagctacata aattacacia tttaaactgc agtctggaga 3420
 tacggacctt taattcaacc caacacaata tattatagtt aaataagaat tattatcaaa 3480
 tcatttgtat attaattaaa atactatact gtaaattaca ttttatttac aatcactcga 3540
 c 3541

<210> 20

5 <211> 3512

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Casete de expresión recombinante

<400> 20

ES 2 611 302 T3

ttagttgaac tcgaacttct tgtacttgca gttgagcttt tgctcggcga atgtgatggc 60
 gtoggagagt ggcaccagtc cctgcaggat caaggccaag agcttcagca agttgtttgtg 120
 cagtgtagtt gactcgcgac gggtgacctt gccgatcacg aacatgtggt gcttgaatct 180
 gttgtacttt tggatgacct ggctcacatc aacgtccttg atttcgccag agatccagta 240
 gaactccttg ttcttcttag cgatggtcag cctttcctcg ttcttgaagg acaacacgat 300
 gaagttgtga cccttaacgt tatcgacggt ttgagtcaag tactgctcaa cgatgtgcat 360
 gcttccgtct tccttcttga ccttcttgag gttctcggcg ttgttgttag aagcgatggt 420
 gtcgtggtac ttgtagttgt tgaagagcag gttagcgacg gacgagtact tgtatgtcag 480
 agtgctcttc ttgttcacga tgagggtcag gttatcaacg acgtacttgt tgggaggggt 540
 gtccgggaat tggacggact ccgagtactt gaggatctgg gaaacgtatg gcgagacgaa 600
 gaagttgta gaggcggttt cgatctcgtt tgattccttg cggctcagca tgatgggcaa 660
 agtgaagagg ttcttgtcct ggtacatctc gtacaacttc gacaagagga atccacactt 720
 acgctcgcg agtgattgca gcaaggtcac gaaggttgtc tgagcgtagt acatatacag 780
 gttgaagtag gaggtcagag cggccttgaa tgtgtggtgg acgtccacga agtgacactt 840
 cttgcagttt tgagcggcgg tctcatcgtt gcagacgtcc tgtgagtgtg ggatttcgat 900
 gccagtctcc ttaaccaggt ttagctgat catgaagcgg atcttatcga aggtcacaac 960
 gaacacacgg ttgtcaacca ttagtagtt gtttgtgtac tcgtagacca cgtagagac 1020
 gtacttggcg aagatgattt cgaaggtt cacctcggac ttcttaacga cgaacatgta 1080
 gtaaccggtt tcagacatgt gatcggagaa tctgttcgag ttgtagtcgt tatcgtcgaa 1140
 cctcatcagg tagggggcga agtcgtttgt gaagtagtga gtgatctcct ggggtggaagc 1200
 cactgtacag atgttagtgt tgtggttgat ggtttgttcc agtgtagcgc atgactggat 1260
 ggtgctcttc ttgtacttag gtctcaactt gatcttgttg aattgaccca caactccctg 1320
 ggagttatcc aggtactcgt ccaacttctt cttggtgcct gtggcgcagc gctggttgac 1380
 accagcagag tgttcgaagg actcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac 1440
 cactggctgt tcgagtgact cgctgtagta ggcagaggac acagcttctt ccaggttgtc 1500
 agtggctctg agcagacact ccaccaaatc gttgtcagtg agcgagttaa ctgagggcag 1560
 gaagttgcta gcggcagcgg tttcagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccggggt 1620
 tgggtggttg tagtaagaca agtaatcgtt aggttgcttg tcgcagaact ccgagtatga 1680
 gttgtcgaag ctagcacgag agggagtgtt ggcagaggtg taggaagcgt tgaagttgat 1740
 ttgagtcatg gtgacctggt tgttcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg 1800
 ctgggcctca gcgcaggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga 1860
 agtcatgatg ttttcttggc cgttcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatc 1920

ES 2 611 302 T3

tagatgcatt cgcgaggtag cgagctcgaa ttcactggcc gtcgttttac aacgctcgtga 1980
ctgggaaaac cctggcggtta cccaacttaa tgccttgca gcacatcccc ctttcgcccag 2040
ctgctagcac catggctcga gcgtggagtt aactcgatgt gagttcaact gtactcctac 2100
cgagaatgca ccccttttta tagcgctctg aaaagagact gagaatactt tattttctac 2160
aatcgtataa aatcctagtg atggttacgg taatctttct tcatgggaag ctaaagatat 2220
tcgatagtta tgcttttggg ttctgtttgg gtgaaactta tgatcagatt atgatgaaac 2280
ttaaacttgc aagtaatatt tgagtttaaa ctatttttaa tataatcacc taatatgtta 2340
tgacgtcaat aggcaggaca ttgacccgac gcgtccactc attaaaaata ttattacacc 2400
ttatataaaa tccatgatat cgttttgggtg ttaaaccatt acgtattaac cataacctac 2460
cccaatgtaa ccttcagtca ccctaactga tgtttttgta tacatcgatg ttgaccccaa 2520
caaaagattt ataattaatc ataatcacga acaacaacaa gtcaatgaaa caaataaaca 2580
agttgtcgat aaaacattca taaatgacac agcaacatac aattcttgca taataaaaat 2640
ttaaagaca tcatatttga gaataacaaa tgacattatc cctcgattgt gttttacaag 2700
tagaattcta cccgtaaagc gagtttagtt ttgaaaaaca aatgacatca tttgtataat 2760
gacatcatcc cctgattgtg ttttacaagt agaattctat ccgtaaagcg agttcagttt 2820
tgaaaaacaaa tgagtcatac ctaaaccacgt taataatctt ctgatatcag cttatgactc 2880
aagttatgag ccgtgtgcaa aacatgagat aagtttatga catcatccac tgatcgtgcg 2940
ttacaagtag aattctactc gtaaagccag ttcggttatg agccgtgtgc aaaacatgac 3000
atcagcttat gactcact t gattgtgtt ttacgcgtag aattctactc gtaaagccag 3060
ttcggttatg agccgtgtgc aaaacatgac atcagcttat gactcataat taatcgtgcg 3120
ttacaagtag aattctactc gtaaagccag ttgaaggatc atatttagtt gcgtttatga 3180
gataagattg aaagcacgtg taaaatgttt cccgcgcgtt ggcacaacta tttacaatgc 3240
ggccaagtta taaaagattc taatctgata tgttttaaaa cacctttgcg gcccgagttg 3300
tttgcgtacg tgactagcga agaagatgtg tggaccgcag aacagatagt aaaacaaaac 3360
cctagtattg gagcaataat cgatgagctc atacggacct ttaattcaac ccaacacaat 3420
atattatagt taaataagaa ttattatcaa atcatttgta tattaattaa aatactatac 3480
tgtaaattac attttattta caatcactcg ac 3512

<210> 21

5 <211> 4005

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Casete de expresión recombinante

5 <400> 21

ES 2 611 302 T3

ttagttgaac tcgaacttct tgtacttgca gttgagcttt tgctcggcga atgtgatggc	60
gtcggagagt ggcaccagtc cctgcaggat caaggccaag agcttcagca agttgttgtg	120
cagtgtagtt gactcgcgac ggttgacett gccgatcacg aacatgtggt gcttgaatct	180
gttgtacttt tggatgacct ggctcacatc aacgtccttg atttcgccag agatccagta	240
gaactccttg ttcttcttag cgatggtcag cctttcctcg ttcttgaagg acaacacgat	300
gaagttgtga cccttaacgt tatcgacggt ttgagtcaag tactgctcaa cgatgtgcat	360
gcttcctgtc tccttcttga ccttctttag gttctcggcg ttgttgtag aagcgatggt	420
gtcgtggtac ttgtagttgt tgaagagcag gttagcgacg gacgagtact tgtatgtcag	480
agtgtctctc ttgttcacga tgaggttcag gttatcaacg acgtacttgt tgggaggggt	540
gtccgggaat tggacggact ccgagtactt gaggatctgg gaaacgatg gcgagacgaa	600
gaagttgta gaggcggttt cgatctcgtt tgattccttg cggctcagca tgatgggcaa	660
agtgaagagg ttcttgtcct ggtacatctc gtacaacttc gacaagagga atccacactt	720
acgctcgcgc agtgattgca gcaaggcac gaaggttgtc tgagcgtagt acataticgag	780
gttgaagtag gaggtcagag cggccttgaa tgtgtggtgg acgtccacga agtgacactt	840
cttgcagttt tgagcggcgg tctcatcgtt gcagacgtcc tgtgagtgtg ggatttcgat	900
gccagtctcc ttaaccaggt tgtagctgat catgaagcgg atcttatcga aggtcacaac	960
gaacacacgg ttgtcaacca tgtagtagtt gtttgtgtac tcgtagacca cgttagagac	1020
gtacttggcg aagatgattt cgaaaggctt cacctcggac ttcttaacga cgaacatgta	1080
gtaaccgggt tcagacatgt gatcggagaa tctgttcgag ttgtagtcgt tatcgtcga	1140
cctcatcagg tagggggcga agtcgtttgt gaagtagtga gtgatctcct ggggtggaagc	1200
cactgtacag atgttagtgt tgtggttgat ggtttgttcc agtgtagcgc atgactggat	1260
ggtgtctctc ttgtacttag gtctcaactt gatcttgttg aattgacca caactccctg	1320
ggagttatcc aggtactcgt ccaacttcct cttggtgcct gtggccgacg gctggttgac	1380
accagcagag tgttcgaagg actcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac	1440
cactggctgt tcgagtgact cgctgtagta ggcagaggac acagcttcct ccaggttgtc	1500
agtggctctg agcagacact ccaccaaatc gttgtcagtg agcgagtaa ctgaggcag	1560
gaagttgcta ggggcagcgg tttcagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccgggggt	1620
tgggtggttg tagtaagaca agtaatcgtt aggttgcttg tcgcagaact ccgagtatga	1680
gttgtcgaag ctagcacgag agggagtgtc ggcagaggtg taggaagcgt tgaagttgat	1740
ttgagtcatg gtgacctggt tgttcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg	1800
ctgggcctca gcgcaggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga	1860

ES 2 611 302 T3

agtcatgatg ttttcttggg cgttcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatc 1920
 tagatgcatt cgcgaggtac cgagctcgaa ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga 1980
 ctgggaaaac cctggcggtta cccaacttaa tgccttgcgca gcacatcccc ctttcgccag 2040
 ctgctagcac catggctcga gcgtggagtt aactcgatgt gagttcaact gtactcttac 2100
 cgagaatgca ccccttttta tagcgtctg aaaagagact gagaatactt tattttctac 2160
 aatcgtataa aatcctagtg atggttacgg taatctttct tcatgggaag ctaaagatat 2220
 tcgatagtta tgcttttggg ttctgtttgg gtgaaactta tgatcagatt atgatgaaac 2280
 ttaaacttgc aagtaatatt tgagtttaaa ctatttttaa tataatcacc taatatgtta 2340
 tgacgtcaat aggcaggaca ttgacccgac gcgtccactc attaaaaata ttattacacc 2400
 ttatataaaa tccatgatat cgttttgggt ttaaaccatt acgtattaac cataacctac 2460
 cccaatgtaa ccttcagtca ccctaacga tgtttttgta tacatcgatg ttgaccccaa 2520
 caaaagattt ataattaatc ataatcacga acaacaaca gtcaatgaaa caaataaaca 2580
 agttgtcgat aaaacattca taaatgacac agcaacatac aattcttgca taataaaaat 2640
 ttaaagaca tcatatttga gaataacaaa tgacattatc cctcgattgt gttttacaag 2700
 tagaattcta cccgtaaagc gagtttagtt ttgaaaaaca aatgacatca tttgtataat 2760
 gacatcatcc cctgattgtg ttttacaagt agaattctat ccgtaaagcg agttcagttt 2820
 tgaaaaacaaa tgagtcatac ctaaacacgt taataatctt ctgatatcag cttatgactc 2880
 aagttatgag ccgtgtgcaa aacatgagat aagtttatga catcatccac tgatcgtgcg 2940
 ttacaagtag aattctactc gtaaagccag ttcggttatg agccgtgtgc aaaacatgac 3000
 atcagcttat gactcactact tgattgtgtt ttacgcgtag aattctactc gtaaagcgag 3060
 ttcggttatg agccgtgtgc aaaacatgac atcagcttat gagtcataat taatcgtgcg 3120
 ttacaagtag aattctactc gtaaagcgag ttgaaggatc atatttagtt gcgtttatga 3180
 gataagattg aaagcacgtg taaaatgttt cccgcgcggt ggcacaacta tttacaatgc 3240
 ggccaagtta taaaagattc taatctgata tgttttaaaa cacctttgcg gcccgagttg 3300
 tttgcgtacg tgactagcga agaagatgtg tggaccgag aacagatagt aaaacaaaac 3360
 cctagtattg gagcaataat cgatgagctc gtcgacgtag gcctttgaat tccgcgcgct 3420
 tcggaccggg atccaaaaac atcgattagg gtgactgaag gttacattgg ggtaggttat 3480
 ggtaataacg taatggttta acacccaaaac gatatcatgg attttatata aggtgtaata 3540
 atatttttaa tgagtggacg cgtcgggtca atgtcctgcc tattgacgtc ataacatatt 3600
 aggtgattat attaaaaata gtttaaacctc aatattact tgcaagttta agtttcatca 3660
 taatctgatc ataagtttca cccaaacaga aaccaaaagc ataactatcg aatatcttta 3720

ES 2 611 302 T3

gcttcccatg aagaaagatt accgtaacca tcaactaggat tttatacgat tgtagaaaat. 3780
aaagtattct cagtctcttt tcagagcgct ataaaaaggg gtgcattctc ggtaagagta 3840
cagttgaact cacatcgagt taactccacg ctgcagtctc gagatacgga cctttaattc 3900
aaccaaacac aatatattat agttaaataa gaattattat caaatcattt gtatattaat 3960
taaaatacta tactgtaaat tacatthttat ttacaatcac tcgac 4005

<210> 22

5 <211> 3898

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Casete de expresión recombinante

15 <400> 22

ES 2 611 302 T3

ttagttgaac	tcgaacttct	tgtacttgca	gttgagcttt	tgctcggcga	atgtgatggc	60
gtcggagagt	ggcaccagtc	cctgcaggat	caaggccaag	agcttcagca	agttgtttgtg	120
cagtgtagtt	gactcgcgac	ggttgacctt	gccgatcacg	aacatgtggt	gcttgaatct	180
gttgtacttt	tggatgacct	ggctcacatc	aacgtccttg	atttcgccag	agatccagta	240
gaactccttg	ttcttcttag	cgatggtcag	cctttcctcg	ttcttgaagg	acaacacgat	300
gaagttgtga	cccttaacgt	tatcgacggt	ttgagtcaag	tactgctcaa	cgatgtgcat	360
gcttccgtct	tccttcttga	ccttcttgag	gttctcggcg	ttgttgtag	aagcgtggt	420
gtcgtggtac	ttgtagttgt	tgaagagcag	gtagcgcgac	gacgagtact	tgtatgtcag	480
agtgctcttc	ttgttcacga	tgaggttcag	gttatcaacg	acgtacttgt	tgggaggggt	540
gtccgggaat	tggacggact	ccgagtactt	gaggatctgg	gaaacgtatg	gcgagacgaa	600
gaagttgtta	gaggcggttt	cgatctcggt	tgattccttg	cggctcagca	tgatgggcaa	660
agtgaagagg	ttcttgtcct	ggtacatctc	gtacaacttc	gacaagagga	atccacactt	720
acgctcgcgg	agtgattgca	gcaaggtcac	gaaggttgtc	tgagcgtagt	acatatcgag	780
gttgaagtag	gaggtcagag	cggccttgaa	tgtgtggtgg	acgtccacga	agtgacactt	840
cttgacgttt	tgagcggcgg	tctcatcggt	gcagacgtcc	tgtgagtgtg	ggatttcgat	900
gccagtctcc	ttaaccaggt	tgtagctgat	catgaagcgg	atcttatcga	aggtcacaac	960
gaacacacgg	ttgtcaacca	tgtagtagtt	gtttgtgtac	tcgtagacca	cgtagagac	1020
gtacttggcg	aagatgattt	cgaaaggctt	cacctcggac	ttcttaacga	cgaacatgta	1080
gtaaccgggt	tcagacatgt	gatcggagaa	tctgttcgag	ttgtagtcgt	tatcgtcgaa	1140
cctcatcagg	tagggggcga	agtcgtttgt	gaagtagtga	gtgatctcct	gggtggaagc	1200
cactgtacag	atgtagtgt	tgtggttgat	ggtttgttcc	agtgtagcgc	atgactggat	1260
ggtgctcttc	ttgtacttag	gtctcaactt	gatcttgttg	aattgaccca	caactccttg	1320

ES 2 611 302 T3

ggagttatcc aggtactcgt ccaacttctt cttggtgcct gtggccgacg gctggttgac 1380
 accagcagag tgttcgaagg actcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac 1440
 cactggctgt tcgagtgact cgctgtagta ggcagaggac acagcttctt ccaggttgtc 1500
 agtggctctg agcagacact ccaccaaatac gttgtcagtg agcgagttaa ctgaggcgag 1560
 gaagttgcta gcggcagcgg tttcagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccggggt 1620
 tgggtggttg tagtaagaca agtaatcgtt aggttgcttg tgcgagaact ccgagtatga 1680
 gttgtcgaag ctagcacgag agggagtgtt ggcagaggtg taggaagcgt tgaagttgat 1740
 ttgagtcatg gtgacctggt tgttcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg 1800
 ctgggcctca gcgcaggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga 1860
 agtcatgatg ttttcttggc cgttcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatc 1920
 tagatgcatt cgcgaggtac cgagctcga ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga 1980
 ctgggaaaac cctggcgtta cccaacttaa tgccttgca gcacatcccc ctttcgccag 2040
 ctgctagcac catggctcga gcgtggagt aactcgatgt gagttcaact gtactcttac 2100
 cgagaatgca ccccttttta tagcgtctg aaaagagact gagaatactt tattttctac 2160
 aatcgtataa aatcctagtg atggttacgg taatctttct tcatgggaag ctaaagatat 2220
 tccgatagta tgcttttggg ttctgtttgg gtgaaactta tgatcagatt atgatgaaac 2280
 ttaaacttgc aagtaataat tgagtttaaa ctatttttaa tataatcacc taatatgta 2340
 tgacgtcaat aggcaggaca ttgacctgac gcgtccactc attaaaaata ttattacacc 2400
 ttatataaaa tccatgatat cgttttgggt ttaaaccatt acgtattaac cataacctac 2460
 cccaatgtaa ccttcagtca ccctaatacga tgtttttgta tacatcgatg ttgaccccaa 2520
 caaaagattt ataattaatc ataatcacga acaacaaca gtcaatgaaa caaataaaca 2580
 agttgtcgat aaaacattca taaatgacac agcaacatac aattcttgca taataaaaat 2640
 ttaaatagca tcatatttga gaataacaaa tgacattatc cctcgattgt gttttacaag 2700
 tagaattcta cccgtaaagc gagtttagtt ttgaaaaaca aatgacatca tttgtataat 2760
 gacatcatcc cctgattgtg ttttacaagt agaattctat ccgtaaagcg agttcagttt 2820
 tgaaaacaaa tgagtcatac ctaaacacgt taataatctt ctgatatcag cttatgactc 2880
 aagttatgag ccgtgtgcaa aacatgagat aagtttatga catcatccac tgatcgtgcg 2940
 ttacaagtag aattctactc gtaaagccag ttcggttatg agccgtgtgc aaaacatgac 3000
 atcagcttat gactcatact tgattgtggt ttacgcgtag aattctactc gtaaagcgag 3060
 ttcggttatg agccgtgtgc aaaacatgac atcagcttat gagtcataat taatcgtgcg 3120
 ttacaagtag aattctactc gtaaagcgag ttgaaggatc atatttagtt gcgtttatga 3180

ES 2 611 302 T3

gataagattg aaagcacgtg taaaatgttt cccgcgcgctt ggcacaacta tttacaatgc 3240
 ggccaagtta taaaagattc taatctgata tgttttaaaa cacctttgcg gcccgagttg 3300
 tttgcgtacg tgactagcga agaagatgtg tggaccgcag aacagatagt aaaacaaaac 3360
 cctagtattg gagcaataat cgatgagctc gtcgacgtag gcctttgaat tccgcgcgct 3420
 tccgaccggg atcggtagca aattccgttt tgcgacgatg cagagttttt gaacaggctg 3480
 ctcaaacaca tagatccgta cccgctcagt cggatgtatt acaatgcagc caataccatg 3540
 ttttacacga ctatggaaaa ctatgccgtg tccaattgca agttcaacat tgaggattac 3600
 aataacatat ttaaggtgat ggaaaatatt aggaaacaca gcaacaaaaa ttcaaacgac 3660
 caagacgagt taaacatata tttgggagtt cagtcgtcga atgcaaagcg taaaaaatat 3720
 taataaggta aaaattacag ctacataaat tacacaattt aaactgcagt ctggagatac 3780
 ggacctttaa ttcaacccaa cacaatatat tatagttaa taagaattat tatcaaatca 3840
 tttgtatatt aattaaaata ctatactgta aattacattt tatttacaat cactcgac 3898

<210> 23

5 <211> 3179

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Casete de expresión recombinante

15 <400> 23

ES 2 611 302 T3

ttagttgaac tcgaacttct tgtacttgca gttgagcttt tgctcggcga atgtgatggc	60
gtcggagagt ggcaccagtc cctgcaggat caaggccaag agcttcagca agttgttgtg	120
cagtgtagtt gactcgcgac ggttgacctt gccgatcacg aacatgtggt gcttgaatct	180
gttgtacttt tggatgacct ggctcacatc aacgtccttg atttcgccag agatccagta	240
gaactccttg ttcttcttag cgatggtcag cctttcctcg ttcttgaagg acaacacgat	300
gaagttgtga cccttaacgt tatcgacggt ttgagtcaag tactgctcaa cgatgtgcat	360
gcttccgtct tccttcttga ccttcttgag gttctcggcg ttgttgtag aagcgatggt	420
gtcgtggtac ttgtagttgt tgaagagcag gttagcgacg gacgagtact tgtatgtcag	480
agtgctcttc ttgttcacga tgaggttcag gttatcaacg acgtacttgt tgggaggggt	540
gtccgggaat tggacggact ccgagtactt gaggatctgg gaaacgtatg gcgagacgaa	600
gaagttgtta gaggcggttt cgatctcgtt tgattccttg cggctcagca tgatgggcaa	660
agtgaagagg ttcttgtcct ggtacatctc gtacaacttc gacaagagga atccacactt	720
acgctcgccg agtgattgca gcaaggcac gaaggttgtc tgagcgtagt acatatcgag	780
gttgaagtag gaggtcagag cggccttgaa tgtgtggtgg acgtccacga agtgacactt	840
cttgcagttt tgagcggcgg tctcatcgtt gcagacgtcc tgtgagtgtg ggatttcgat	900

ES 2 611 302 T3

gccagtctcc ttaaccaggt tgtagctgat catgaagcgg atcttatcga aggtcacaac 960
 gaacacacgg ttgtcaacca tgtagtagtt gtttgtgtac tcgtagacca cgtagagac 1020
 gtacttggcg aagatgattt cgaaaggctt cacctcggac ttcttaacga cgaacatgta 1080
 gtaaccgggt tcagacatgt gatcggagaa tctgttcgag ttgtagtcgt tatcgtcga 1140
 cctcatcagg tagggggcga agtcgtttgt gaagtagtga gtgatctcct ggggtggaagc 1200
 cactgtacag atgttagtgt tgtggttgat ggtttgttcc agttagcgc atgactggat 1260
 ggtgctcttc ttgtacttag gtctcaactt gatcttggtg aattgacca caactccctg 1320
 ggagttatcc aggtactcgt ccaacttcct cttggtgcct gtggccgacg gctggttgac 1380
 accagcagag tgttcgaagg actcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac 1440
 cactggctgt tcgagtgaact cgctgtagta ggcagaggac acagcttcct ccaggttgc 1500
 agtggctctg agcagacact ccaccaaact gttgtcagtg agcgagttaa ctgaggcag 1560
 gaagttgcta gcggcagcgg tttcagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccgggg 1620
 tgggtggttg tagtaagaca agtaatcgtt aggttgcttg tcgcagaact ccgagtatga 1680
 gttgtcgaag ctagcacgag agggagtgtt ggcagagggt taggaagcgt tgaagttgat 1740
 ttgagtcatg gtgacctggt tgttcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg 1800
 ctgggcctca gcgcaggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga 1860
 agtcatgatg ttttcttggc cgttcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatt 1920
 gggctcatct gattcgaag cggccgcgac tagtgagctc gtcgacgtag gcctttgaat 1980
 tccgcgcgct tcggaccggg atccgcgccc gatggtggga cggtatgaat aatccggaat 2040
 atttataggt tttttatta caaaactggt acgaaaacag taaaatactt atttatttgc 2100
 gagatggtta tcattttaat tatctccatg atctattaat attccggagt atacatcgat 2160
 gttgacccca acaaaagatt tataattaat cataatcacg aacaacaaca agtcaatgaa 2220
 acaataaac aagttgtcga taaaacattc ataatgaca cagcaacata caattcttgc 2280
 ataataaaa tttaatgac atcatatttg agaataacaa atgacattat ccctcgattg 2340
 tgttttaca gtagaattct acccgtaaag cgagtttagt tttgaaaaac aatgacatc 2400
 atttgtataa tgacatcatc ccctgattgt gttttacaag tagaattcta tccgtaaagc 2460
 gagttcagtt ttgaaaaca atgagtcata cctaaacacg ttaataatct tctgatatca 2520
 gcttatgact caagttatga gccgtgtgca aaacatgaga taagtttatg acatcatcca 2580
 ctgatcgtgc gttacaagta gaattctact cgtaaagcca gttcggttat gagccgtgtg 2640
 caaacatga catcagctta tgactcatac ttgattgtgt tttacgcgta gaattctact 2700
 cgtaaagcga gttcggttat gagccgtgtg caaacatga catcagctta tgagtcataa 2760

ES 2 611 302 T3

ttaatcgtgc gttacaagta gaattctact cgtaaagcga gttgaaggat catatntagt 2820
tgcgtttatg agataagatt gaaagcacgt gtaaaatggt tcccgcgcgt tggcacaact 2880
atttacaatg cggccaagtt ataaaagatt ctaatctgat atgttttaaa acacctttgc 2940
ggcccagatt gtttgcgtac gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag 3000
taaaacaaaa ccctagtatt ggagcaataa tcgattccgg aatattaata gatcatggag 3060
ataattaata tgataacat ctcgcaaata aataagtatt ttactgtttt cgtaacagtt 3120
ttgtaataaa aaaacctata aatattccgg attattcata ccgtcccacc atcgggcgc 3179

<210> 24

5 <211> 3528

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Casete de expresión recombinante

15 <400> 24

ES 2 611 302 T3

ttagttgaac	togaacttct	tgtacttgca	gttgagcttt	tgctcggcga	atgtgatggc	60
gtcggagagt	ggcaccagtc	cctgcaggat	caaggccaag	agcttcagca	agttgttgtg	120
cagtgtagtt	gactcgcgac	ggttgacctt	gccgatcacg	aacatgtggt	gcttgaatct	180
gttgtacttt	tggatgacct	ggctcacatc	aacgtccttg	atttcgccag	agatccagta	240
gaactccttg	ttcttcttag	cgatggtcag	cctttcctcg	ttcttgaagg	acaacacgat	300
gaagttgtga	cccttaacgt	tatcgacggt	ttgagtcaag	tactgctcaa	cgatgtgcat	360
gcttcctctt	tccttcttga	ccttcttgag	gttctcggcg	ttggtgtag	aagcgatggt	420
gtcgtggtac	ttgtagttgt	tgaagagcag	gtagcgcgac	gacgagtact	tgtatgtcag	480
agtgctcttc	ttgttcacga	tgaggttcag	gttatcaacg	acgtacttgt	tgggagggtt	540
gtccgggaat	tggacggact	ccgagtactt	gaggatctgg	gaaacgtatg	gcgagacgaa	600
gaagttgtta	gaggcgggtt	cgatctcggt	tgattccttg	cggtcagca	tgatgggcaa	660
agtgaagagg	ttcttgtcct	ggtacatctc	gtacaacttc	gacaagagga	atccacactt	720
acgctcgcg	agtgattgca	gcaaggtcac	gaaggttgtc	tgagcgtagt	acatatcgag	780
gttgaagtag	gaggtcagag	cggccttgaa	tgtgtggtgg	acgtccacga	agtgacactt	840
cttgacgttt	tgagcggcgg	tctcatcggt	gcagacgtcc	tgtgagtgtg	ggatttcgat	900
gccagtctcc	ttaaccaggt	tgtagctgat	catgaagcgg	atcttatcga	aggtcacaac	960
gaacacacgg	ttgtcaacca	tgtagtagtt	gtttgtgtac	tcgtagacca	cgtagagac	1020
gtacttggcg	aagatgattt	cgaaaggctt	cacctcggac	ttcttaacga	cgaacatgta	1080
gtaaccggtt	tcagacatgt	gatcggagaa	tctgttcgag	ttgtagtcgt	tatcgtcga	1140
cctcatcagg	tagggggcga	agtcgtttgt	gaagtagtga	gtgatctcct	gggtggaagc	1200

ES 2 611 302 T3

cactgtacag atgttagtgt tgtggttgat ggtttgttcc agtgtagcgc atgactggat 1260
 ggtgctcttc ttgtacttag gtctcaactt gatcttgttg aattgaccca caactccctg 1320
 ggagttatcc aggtactcgt ccaacttctt cttggtgcct gtggccgacg gctggttgac 1380
 accagcagag tgttcgaagg actcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac 1440
 cactggctgt tcgagtgact cgctgtagta ggcagaggac acagcttctt ccaggttgtc 1500
 agtggctctg agcagacact ccaccaaact gttgtcagtg agcgagttaa ctgaggcgag 1560
 gaagttgcta gcggcagcgg tttcagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccggggg 1620
 tgggtggttg tagtaagaca agtaatcgtt aggttgcttg tcgcagaact ccgagtatga 1680
 gttgtcgaag ctagcacgag agggagtgtt ggcagaggtg taggaagcgt tgaagttgat 1740
 ttgagtcatt gtgacctggt tgttcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg 1800
 ctgggcctca gcgcaggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga 1860
 agtcatgatg ttttcttgga cgttcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatc 1920
 tagatgcatt cgcgaggtag cgagctcga ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga 1980
 ctgggaaaac cctggcgtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag 2040
 ctgctagcac catggctcga gcgtggagtt aactcgatgt gagttcaact gtactcttac 2100
 cgagaatgca ccccttttta tagcgtctg aaaagagact gagaatactt tattttctac 2160
 aatcgtataa aatcctagtg atggttacg taatctttct tcatgggaag ctaaagatat 2220
 tcgatagtta tgcttttggt ttctgtttg gtgaaactta tgatcagatt atgatgaaac 2280
 ttaaacttgc aagtaataat tgagtttaaa ctatttttaa tataatcacc taatatgtta 2340
 tgacgtcaat aggcaggaca ttgacccgac gcgtccactc attaaaaata ttattacacc 2400
 ttatataaaa tccatgatat cgttttggtg ttaaaccatt acgtattaac cataacctac 2460
 ccaatgtaa ccttcagtca ccctaactga tgtttttgta tacatcgatg ttgaccccaa 2520
 caaaagattt ataattaatc ataatcacga acaacaaca gtcaatgaaa caaataaaca 2580
 agttgtcgat aaaacattca taaatgacac agcaacatac aattcttgca taataaaaat 2640
 ttaaatagca tcatatttga gaataacaaa tgacattatc cctcgattgt gttttacaag 2700
 tagaattcta cccgtaaagc gagtttagtt ttgaaaaaca aatgacatca tttgtataat 2760
 gacatcatcc cctgattgtg ttttacaagt agaattctat ccgtaaagcg agttcagttt 2820
 tgaaaacaaa tgagtcatac ctaaaccagt taataatctt ctgatatcag cttatgactc 2880
 aagttatgag ccgtgtgcaa aacatgagat aagtttatga catcatccac tgatcgtgag 2940
 ttacaagtag aattctactc gtaaagccag ttcggttatg agccgtgtgc aaaacatgac 3000
 atcagcttat gactcactat tgatttgttt ttacgcgtag aattctactc gtaaagcgag 3060

ES 2 611 302 T3

ttcggttatg agccgtgtgc aaaacatgac atcagcttat gagtcataat taatcgtgcg	3120
ttacaagtag aattctactc gtaaagcgag ttgaaggatc atatttagtt gcgtttatga	3180
gataagattg aaagcacgtg taaaatgttt cccgcgcggtt ggcacaacta tttacaatgc	3240
ggccaagtta taaaagattc taatctgata tgttttaaaa cacctttgcg gcccgagttg	3300
tttgcgtacg tgactagcga agaagatgtg tggaccgcag aacagatagt aaaacaaaac	3360
cctagtattg gagcaataat cgattccgga atattaatag atcatggaga taattaaaat	3420
gataaccatc tcgcaataa ataagtattt tactgttttc gtaacagttt tgtaataaaa	3480
aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca tcgggcgc	3528

<210> 25

5 <211> 3291

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Casete de expresión recombinante

15 <400> 25

ES 2 611 302 T3

ttagttgaac	tcgaacttct	tgtacttgca	gttgagcttt	tgctcggcga	atgtgatggc	60
gtcggagagt	ggcaccagtc	cctgcaggat	caaggccaag	agcttcagca	agttgttgtg	120
cagtgtagtt	gactcgcgac	ggttgacctt	gccgatcacg	aacatgtggt	gcttgaatct	180
gttgtacttt	tggatgacct	ggctcacatc	aacgtccttg	atcttcgccag	agatccagta	240
gaactccttg	ttcttcttag	cgatggtcag	cctttcctcg	ttcttgaagg	acaacacgat	300
gaagttgtga	cccttaacgt	tatcgacggt	ttgagtcaag	tactgctcaa	cgatgtgcat	360
gcttccgtct	tccttcttga	ccttcttgag	gttctcggcg	ttgttgtag	aagcgatggt	420
gtcgtggtac	ttgtagttgt	tgaagagcag	gtagcgacg	gacgagtact	tgtatgtcag	480
agtgctcttc	ttgttcacga	tgaggttcag	gttatcaacg	acgtacttgt	tgaggagggt	540
gtccgggaat	tggacggact	ccgagtactt	gaggatctgg	gaaacgtatg	gcgagacgaa	600
gaagttgtta	gaggcggttt	cgatctcggt	tgattccttg	cggctcagca	tgatgggcaa	660
agtgaagagg	ttcttgtcct	ggtacatctc	gtacaacttc	gacaagagga	atccacactt	720
acgctcgccg	agtgattgca	gcaaggtcac	gaaggttgtc	tgagcgtagt	acatatcgag	780
gttgaagtag	gaggtcagag	cggccttgaa	tgtgtggtgg	acgtccacga	agtgacactt	840
cttgcagttt	tgagcggcgg	tctcatcggt	gcagacgtcc	tgtgagtgtg	ggatttcgat	900
gccagtctcc	ttaaccaggt	tgtagctgat	catgaagcgg	atcttatcga	aggtcacaac	960
gaacacacgg	ttgtcaacca	tgtagtagtt	gtttgtgtac	tcgtagacca	cgtagagac	1020
gtacttggcg	aagatgattt	cgaaaggctt	cacctcggac	ttcttaacga	cgaacatgta	1080
gtaaccgggt	tcagacatgt	gatcggagaa	tctgttcgag	ttgtagtctg	tatcgtcgaa	1140

ES 2 611 302 T3

cctcatcagg tagggggcga agtcgtttgt gaagtagtga gtgatctcct gggtggaagc 1200
cactgtacag atgttagtgt tgtggttgat ggtttgttcc agtgtagcgc atgactggat 1260
ggtgctcttc ttgtacttag gtctcaactt gatcttgttg aattgaccca caactcctg 1320
ggagttatcc aggtactcgt ccaacttcct cttggtgcct gtggccgacg gctggttgac 1380
accagcagag tgttcgaag agtcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac 1440
cactggctgt tcgagtgact cgctgtagta ggagaggac acagcttcct ccaggttgac 1500
agtggctctg agcagacact ccaccaaatc gttgtcagtg agcgagtaa ctgagggcag 1560
gaagttgcta gcggcagcgg tttcagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccggggt 1620
tgggtggttg tagtaagaca agtaatcgtt aggttgcttg tcgcagaact ccgagtatga 1680
gttgtcgaag ctagcacgag agggagtgtt ggagagggtg taggaagcgt tgaagttgat 1740
ttgagtcatg gtgacctggt tgttcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg 1800
ctgggcctca gcgcaggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga 1860
agtcatgatg ttttcttggg cgttcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatt 1920
gggtcatcta gattcgaaag cggccgcgac tagtgagctc gtcgacgtag gcctttgaat 1980
tccgcgcgct tcggaccggg atccgcgccc gatggtggga cggatgaat aatccggaat 2040
atztataggt tttttatta caaaactggt acgaaaacag taaaatactt atttatttgc 2100
gagatgggta tcattttaat tatctccatg atctattaat attccggagt atacatgat 2160
gttgacccca acaaaagatt tataattaat cataatcacg aacaacaaca agtcaatgaa 2220
acaaataaac aagttgtcga taaaacattc ataatgaca cagcaacata caattcttgc 2280
ataataaaaa tttaaatgac atcatatttg agaataacaa atgacattat ccctcgattg 2340
tgttttacia gtagaattct acccgtaaag cgagtttagt tttgaaaaac aatgacatc 2400
atgtgtataa tgacatcatc ccctgattgt gttttacaag tagaattcta tccgtaaagc 2460
gagttcagtt ttgaaaaca atgagtcata cctaaacacg ttaataatct tctgatatca 2520
gcttatgact caagttatga gccgtgtgca aacatgaga taagtttatg acatcatcca 2580
ctgatcgtgc gttacaagta gaattctact cgtaaagcca gttcggttat gagccgtgtg 2640
caaaacatga catcagctta tgactcatic ttgattgtgt tttacgcgta gaattctact 2700
cgtaaagcga gttcggttat gagccgtgtg caaaacatga catcagctta tgagtataa 2760
ttaatcgtgc gttacaagta gaattctact cgtaaagcga gttgaaggat catathtagt 2820
tgcgtttatg agataagatt gaaagcacgt gtaaaatggt tcccgcgctg tggcacaact 2880
atttacaatg cggccaagtt ataaaagatt ctaatctgat atgttttaaa acacctttgc 2940
ggccccagtt gtttgcgtac gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag 3000

ES 2 611 302 T3

taaaacaaaa ccctagtatt ggagcaataa tcgatgagct catcatggag ataattaata 3060
tgataaccat ctgcacaata aataagtatt ttactgtttt cgtaacagtt ttgtaataata 3120
aaaacctata aatattccgg attattcata cgtcccacc atcgggacga tacggacctt 3180
taattcaacc caacacaata tattatagtt aaataagaat tattatcaaa tcatttgtat 3240
attaattaata atactatact gtaaattaca ttttatttac aatcactcga c 3291

<210> 26

5 <211> 3640

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Casete de expresión recombinante

15 <400> 26

ES 2 611 302 T3

ttagttgaac	tcgaacttct	tgtacttgca	gttgagcttt	tgctcggcga	atgtgatggc	60
gtcggagagt	ggcaccagtc	cctgcaggat	caaggccaag	agcttcagca	agttgttgtg	120
cagtgtagtt	gactcgcgac	ggttgacctt	gccgatcacg	aacatgtggt	gcttgaatct	180
gttgtacttt	tggatgacct	ggctcacatc	aacgtccttg	atttcgccag	agatccagta	240
gaactccttg	ttcttcttag	cgatggtcag	cctttcctcg	ttcttgaagg	acaacacgat	300
gaagttgtga	cccttaacgt	tatcgacggt	ttgagtcaag	tactgctcaa	cgatgtgcat	360
gcttcctgtc	tccttcttga	ccttcttgag	gttctcggcg	ttgttgtag	aagcgatggt	420
gtcgtggtac	ttgtagttgt	tgaagagcag	gtagcgcagc	gacgagtact	tgtatgtcag	480
agtgtcttcc	ttggtcacga	tgaggttcag	gttatcaacg	acgtacttgt	tgggaggggt	540
gtccgggaat	tggacggact	ccgagtactt	gaggatctgg	gaaacgatg	gcgagacgaa	600
gaagttgta	gaggcggttt	cgatctcggt	tgattccttg	cggtcagca	tgatgggcaa	660
agtgaagagg	ttcttgtcct	ggtacatctc	gtacaacttc	gacaagagga	atccacactt	720
acgctcgcgc	agtgattgca	gcaaggtcac	gaaggttgtc	tgagcgtagt	acatatcgag	780
gttgaagtag	gaggtcagag	cggccttgaa	tgtgtggtgg	acgtccacga	agtgacactt	840
cttgacgttt	tgagcggcgg	tctcatcggt	gcagacgtcc	tgtgagtgtg	ggatttcgat	900
gccagtctcc	ttaaccaggt	tgtagctgat	catgaagcgg	atcttatcga	aggtcacaac	960
gaacacacgg	ttgtcaacca	tgtagtagtt	gtttgtgtac	tcgtagacca	cgtagagac	1020
gtacttggcg	aagatgattt	cgaaaggctt	cacctcggac	ttcttaacga	cgaacatgta	1080
gtaaccgggt	tcagacatgt	gatcggagaa	tctgttcgag	ttgtagtcgt	tatcgtcga	1140
cctcatcagg	tagggggcga	agtcgtttgt	gaagtagtga	gtgatctcct	gggtggaagc	1200
cactgtacag	atgttagtgt	tgtggttgat	ggtttgttcc	agtgtagcgc	atgactggat	1260
ggtgtcttcc	ttgtacttag	gtctcaactt	gatottggtg	aattgacca	caactcctg	1320

ES 2 611 302 T3

ggagttatcc aggtactcgt ccaacttcct cttggtgcct gtggccgacg gctggttgac 1380
 accagcagag tgttcgaagg actcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac 1440
 cactggctgt tcgagtgact cgctgtagta ggcagaggac acagcttcct ccaggttgtc 1500
 agtggctctg agcagacact ccaccaaatac gttgtcagtg agcgagtaa ctgaggcgag 1560
 gaagttgcta gcggcagcgg tttcagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccggggt 1620
 tgggtggttg tagtaagaca agtaatcgtt aggttgcttg tcgcagaact ccgagtatga 1680
 gttgtcgaag ctagcacgag agggagtgtt ggcagaggtg taggaagcgt tgaagttgat 1740
 ttgagtcatg gtgacctggt tgttcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg 1800
 ctgggcctca gcgcaggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga 1860
 agtcatgatg ttttcttgga cgttcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatc 1920
 tagatgcatt cgcgaggtac cgagctcgaa ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga 1980
 ctgggaaaac cctggcgtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag 2040
 ctgctagcac catggctcga gcgtggagtt aactcgatgt gagttcaact gtactcttac 2100
 cgagaatgca ccccttttta tagcgcctctg aaaagagact gagaatactt tattttctac 2160
 aatcgtataa aatcctagtg atggttaagg taatctttct tcatgggaag ctaaagatat 2220
 tcgatagtta tgcttttggt ttctgtttg gtgaaactta tgatcagatt atgatgaac 2280
 ttaaacttgc aagtaatatt tgagtttaa ctatttttaa tataatcacc taatatgta 2340
 tgacgtcaat aggcaggaca ttgacccgac gcgtccactc attaaaaata ttattacacc 2400
 ttatataaaa tccatgatat cgttttggtg ttaaaccatt acgtattaac cataacctac 2460
 cccaatgtaa ccttcagtca ccctaataga tgtttttgta tacatcgatg ttgaccccaa 2520
 caaaagattt ataattaatc ataatcacga acaacaaca gtcaatgaaa caaataaaca 2580
 agttgtogat aaaacattca taaatgacac agcaacatac aattcttgca taataaaaat 2640
 ttaaatagaca tcatatattga gaataacaaa tgacattatc cctcgattgt gttttacaag 2700
 tagaattcta cccgtaaagc gagtttagtt ttgaaaaaca aatgacatca tttgtataat 2760
 gacatcatcc cctgattgtg ttttacaagt agaattctat ccgtaaagcg agttcagttt 2820
 tgaaaacaaa tgagtcatac ctaaaccacgt taataatctt ctgatcag cttatgactc 2880
 aagttatgag ccgtgtgcaa aacatgagat aagtttatga catcatccac tgatcgtgag 2940
 ttacaagtag aattctactc gtaaagccag ttcggttatg agccgtgtgc aaaacatgac 3000
 atcagcttat gactcatact tgattgtgtt ttacgcgtag aattctactc gtaaagcgag 3060
 ttcggttatg agccgtgtgc aaaacatgac atcagcttat gagtcataat taatcgtgag 3120
 ttacaagtag aattctactc gtaaagcgag ttgaaggatc atatttagtt gcgtttatga 3180

ES 2 611 302 T3

gataagattg aaagcacgtg taaaatgttt cccgcgcggtt ggcacaacta tttacaatgc 3240
 ggccaagtta taaaagattc taatctgata tgttttaaaa cacctttgcg gcccgagttg 3300
 tttgcgtacg tgactagcga agaagatgtg tggaccgcag aacagatagt aaaacaaaac 3360
 cctagtattg gagcaataat cgatgagctc atcatggaga taattaaaat gataaccatc 3420
 tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa 3480
 atattccgga ttattcatac cgtcccacca tcgggcgcat acggacctt aattcaacct 3540
 aacacaatat attatagtta aataagaatt attatcaaat catttgtata ttaattaaaa 3600
 tactatactg taaattacat tttatttaca atcactcgac 3640

<210> 27

5 <211> 881

<212> ADN

<213> Nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*

10

<400> 27

atcgatggtg accccaacia aagatttata attaatacata atcacgaaca acaacaagtc 60
 aatgaaacia ataaacaagt tgtcgataaa acattcataa atgacacagc aacatacaat 120
 tcttgcataa taaaaattta aatgacatca tatttgagaa taacaaatga cattatccct 180
 cgattgtggt ttacaagtag aattctaccg gtaaagcgag tttagttttg aaaaaciaat 240
 gacatcattt gtataatgac atcatcccct gattgtggtt tacaagtaga attctatccg 300
 taaagcgagt tcagttttga aaaciaaatga gtcataccta aacacgttaa taatcttctg 360
 atatcagctt atgactcaag ttatgagccg tgtgcaaac atgagataag tttatgacat 420
 catccactga tcgtgcgta caagtagaat tctactcgta aagccagttc ggttatgagc 480
 cgtgtgcaaa acatgacatc agcttatgac tcatacttga ttgtgtttta cgcgtagaat 540
 tctactcgta aagcgagttc ggttatgagc cgtgtgcaaa acatgacatc agcttatgag 600
 tcataattaa tcgtgcgta caagtagaat tctactcgta aagcgagttg aaggatcata 660
 tttagttgcg tttatgagat aagattgaaa gcacgtgtaa aatgtttccc gcgcggtggc 720
 acaactatth acaatgcggc caagttataa aagattctaa tctgatatgt tttaaaacac 780
 ctttgcggcc cgagttggtt gcgtacgtga ctagcgaaga agatgtgtgg accgcagaac 840
 agatagtaaa acaaaaccct agtattggag caataatcga t 881

15 <210> 28

<211> 2124

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Constructo de ADN recombinante que fusiona el ADNc de *Ac-ie-01* con el promotor *polh*

<400> 28

ES 2 611 302 T3

atcatggaga taattaaat gataaccatc tgcgaaataa ataagtattt tactgttttc	60
gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca	120
tggggcgcg atcccgggtcc gaagcgcgcg gaattcaaag gcctacgtcg acgagctcac	180
tagtcgcggc cgctttcgaa tctagataga tctatgatcc gtacatccag ccacgtcctg	240
aacgtccaag aaaacatcat gacttccaac tgtgcttcca gccctactc ctgtgaggcc	300
acttcagcct gcgctgaggc ccagcaactg caggtggaca caggtggcga taagatcgtg	360
aacaaccagg tcaccatgac tcaaatcaac ttcaacgctt cctacacctc tgccagcact	420
ccctctcgtg ctagcttcga caactcatac tgggagttct gcgacaagca acctaacgat	480
tacttgtctt actacaacca cccaaccccg gacggagctg atactgtcat ctccgactct	540
gaaaccgctg ccgctagcaa cttcctcgcc tcagttaact cgctcactga caacgatttg	600
gtggagtgtc tgctcaagac cactgacaac ctggaggaag ctgtgtcctc tgctactac	660
agcgagtcaac tcgaacagcc agtggtcgaa caaccctctc ctagctcagc ttaccacgcc	720
gagtccttcg aacactctgc tgggtgcaac cagccgtcgg ccacaggcac caagaggaag	780
ttggacgagt acctggataa ctcccagga gttgtgggtc aattcaacaa gatcaagttg	840
agacctaatg acaagaagag caccatccag tcatgcgcta cactggaaca aacctcaac	900
cacaacacta acatctgtac agtggcttcc acccaggaga tcaactacta cttcaciaaac	960
gacttcgccc cctacctgat gaggttcgac gataacgact acaactcgaa cagattctcc	1020
gatcacatgt ctgaaaccgg ttactacatg ttcgtcgta agaagtcoga ggtgaagcct	1080
ttcgaaatca tcttcgcaa gtacgtctct aacgtggtct acgagtacac aaacaactac	1140
tacatggttg acaaccgtgt gttcgttggt accttcgata agatccgctt catgatcagc	1200
tacaacctgg ttaaggagac tggcatcgaa atcccacact cacaggacgt ctgcaacgat	1260
gagaccgccc ctcaaaactg caagaagtg cacttcgtgg acgtccacca cacattcaag	1320
gccgctctga cctcctactt caacctcgat atgtactacg ctcagacaac cttegtgacc	1380
ttgctgcaat cactcggcga gcgtaagtgt ggattcctct tgtcgaagtt gtacgagatg	1440
taccaggaca agaacctctt cactttgcc atcatgctga gccgcaagga atcaaacgag	1500
atcgaaaccg cctctaacaa cttcttcgtc tcgccatagc tttcccagat cctcaagtac	1560
tggagtcgg tccaattccc ggacaacct cccaacaagt acgtcgttga taacctgaac	1620
ctcatcgtga acaagaagag cactctgaca tacaagtact cgtccgtcgc taacctgctc	1680
ttcaacaact acaagtacca cgacaacatc gcttctaaca acaacgcga gaacctcaag	1740
aaggtcaaga aggaagacgg aagcatgcac atcgttgagc agtacttgac tcaaaacgtc	1800
gataacgtta agggtcacaa cttcatcgtg ttgtccttca agaacgagga aaggctgacc	1860

ES 2 611 302 T3

atcgctaaga agaacaagga gttctactgg atctctggcg aatcaagga cgttgatgtg 1920
 agccagggtca tccaaaagta caacagattc aagcaccaca tgttcgtgat cggcaaggtc 1980
 aaccgctcgcg agtcaactac actgcacaac aacttgctga agctcttggc ottgatcctg 2040
 cagggactgg tgccactctc cgacgccatc acattcgcgg agcaaaagct caactgcaag 2100
 tacaagaagt tcgagttcaa ctaa 2124

<210> 29

5 <211> 911

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Constructo de ADN recombinante que fusiona el ADNc de GFP con el promotor *polh*

15

<400> 29

atcatggaga taattaaat gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc 60
 gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccogga ttattcatac cgtcccacca 120
 tcgggcgcgg atccaaggcc actagtgcgg ccgctctgca gtctcgagca tgcggtacca 180
 agcttgaatt catggtgagc aagggcgagg agctgttcac cggggtggtg cccatcctgg 240
 tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt gtccggcgag ggcgagggcg 300
 atgccaccta cggcaagctg accctgaagt tcatctgcac caccggcaag ctgcccgctgc 360
 cctggcccccac cctcgtgacc accctgacct acggcgtgca gtgcttcagc cgctaccccg 420
 accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccatgcc cgaaggctac gtccaggagc 480
 gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagaccgg cggcgaggtg aagttcgagg 540
 gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga cttcaaggag gacggcaaca 600
 tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa cgtctatatac atggccgaca 660
 agcagaagaa cggcatcatg gtgaacttca agatccgcca caacatcgag gacggcagcg 720
 tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgg cgacggcccc gtgctgctgc 780
 ccgacaacca ctacctgagc acccagtccg ccctgagcaa agaccccaac gagaagcgcg 840
 atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgcccggat cactctcggc atggacgagc 900
 tgtacaagta a 911

REIVINDICACIONES

1. Insecto derivado del género *Lepidoptera*, que comprende elementos de ácido nucleico introducidos en el insecto mediante un baculovirus recombinante que contiene un gen *Ac-ie-01* endógeno, en el que dichos elementos de ácido nucleico comprenden
- [1] una copia adicional de ADNc de *Ac-ie-01* de baculovirus como transgén bajo el control de un promotor adecuado que permite la expresión de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas que funcionan como reguladores de la transcripción por encima de niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus, en el que el ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 1-5;
- (b) una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75 %, preferiblemente al menos el 75 %, más preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 % y lo más preferiblemente al menos el 95 % con la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 1-5 y que codifica una proteína que puede funcionar como regulador de la transcripción en un baculovirus recombinante;
- (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica un aminoácido que contiene la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 6-9; y
- (d) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una similitud de secuencia de al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 75 %, más preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 % y lo más preferiblemente al menos el 95 % con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 6-9 y que puede funcionar como regulador de la transcripción en un baculovirus recombinante;
- [2] en el que el insecto comprende además al menos una región homóloga (hr) recombinante como región de potenciador, unida operativamente a cualquier promotor que es adecuado para impulsar la expresión de una proteína recombinante,
- [3] en el que el promotor que impulsa la expresión de dicha proteína recombinante se selecciona del grupo de ácidos nucleicos que comprende:
- i. un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 10-16; y
- ii. una secuencia de ácido nucleico que puede funcionar como promotor en un baculovirus recombinante y que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 75 %, más preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 % y lo más preferiblemente al menos el 95 % con la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 10-16.
2. Insecto según la reivindicación 1, en el que la región homóloga (hr) recombinante es la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 27 (*hr1*).
3. Insecto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la secuencia de ácido nucleico que comprende combinaciones de promotores recombinantes, secuencias que codifican reguladores de la transcripción y regiones de potenciador se seleccionan del grupo que comprende SEQ ID NO: 17-26.
4. Insecto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el insecto se selecciona del grupo que consiste en *Trichoplusia ni*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Ascalapha odorata*, *Bombyx mori*, *Rachiplusia ni* y *Estigmene acrea*.
5. Insecto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la(s) secuencia(s) de ácido nucleico se introduce(n) en el insecto mediante un baculovirus recombinante seleccionado de AcMNPV o BmNPV.
6. Insecto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante, en el que dicha secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de ácido nucleico de las reivindicaciones 1-3.
7. Método para producir una proteína recombinante que comprende el uso de un insecto según la reivindicación 6 y la extracción y purificación de la proteína recombinante mediante medios convencionales.

8. Método para producir una proteína recombinante según la reivindicación 7, en el que la proteína recombinante se selecciona del grupo que comprende vacuna monomérica de subunidades, vacuna multimérica de subunidades, partícula de tipo virus, proteína terapéutica, anticuerpo, enzima, citocina, factor de coagulación de la sangre, anticoagulante, receptor, hormona o reactivo de proteína de diagnóstico.
- 5

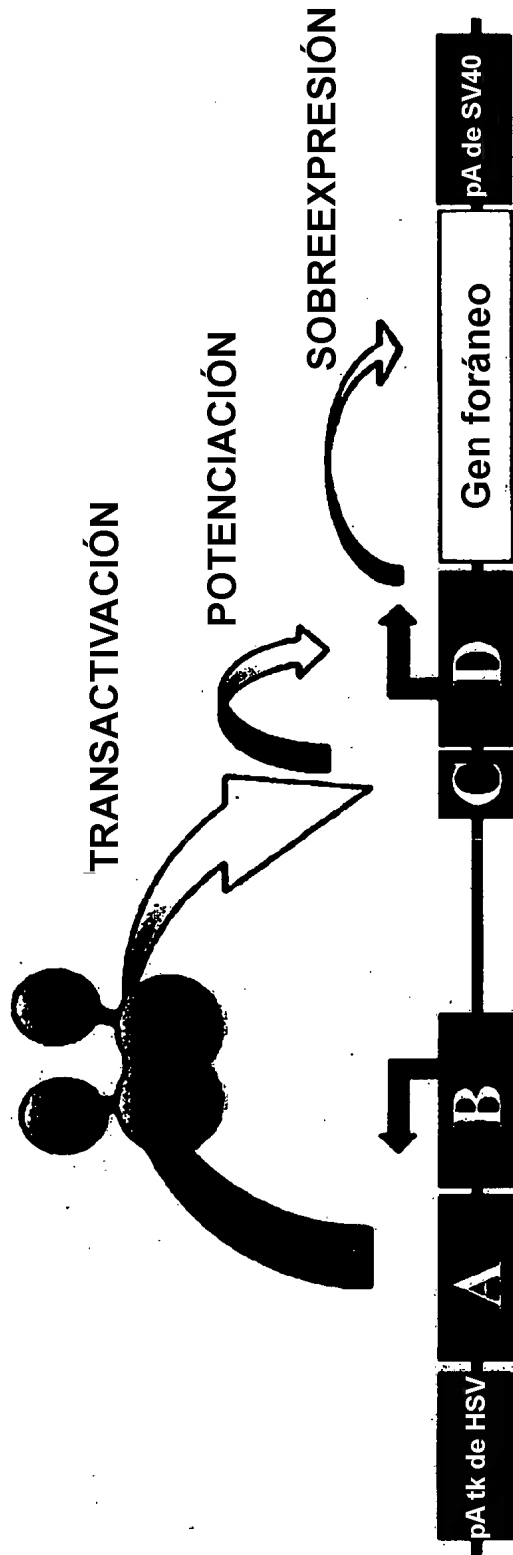


Figura 1

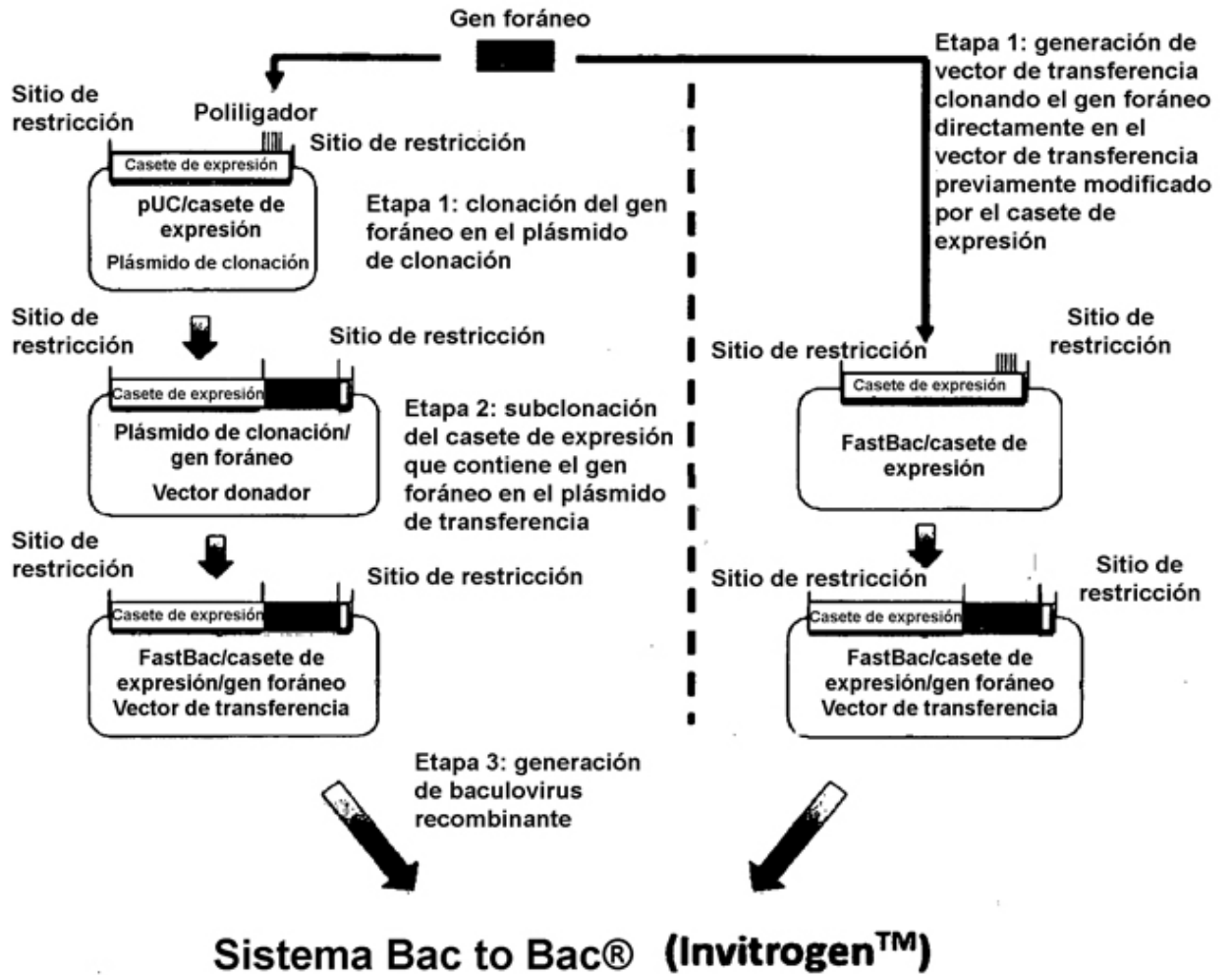


Figura 2

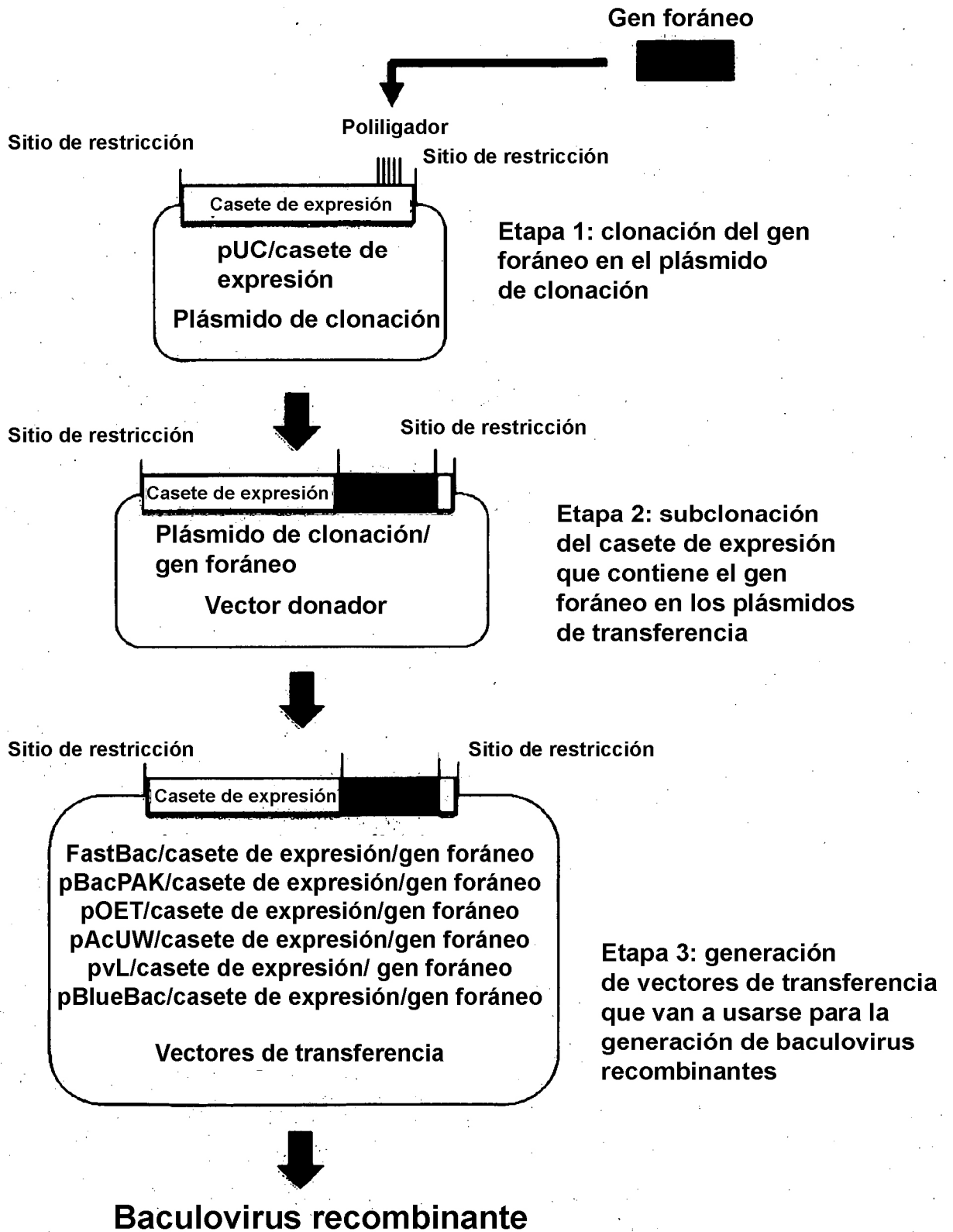


Figura 3

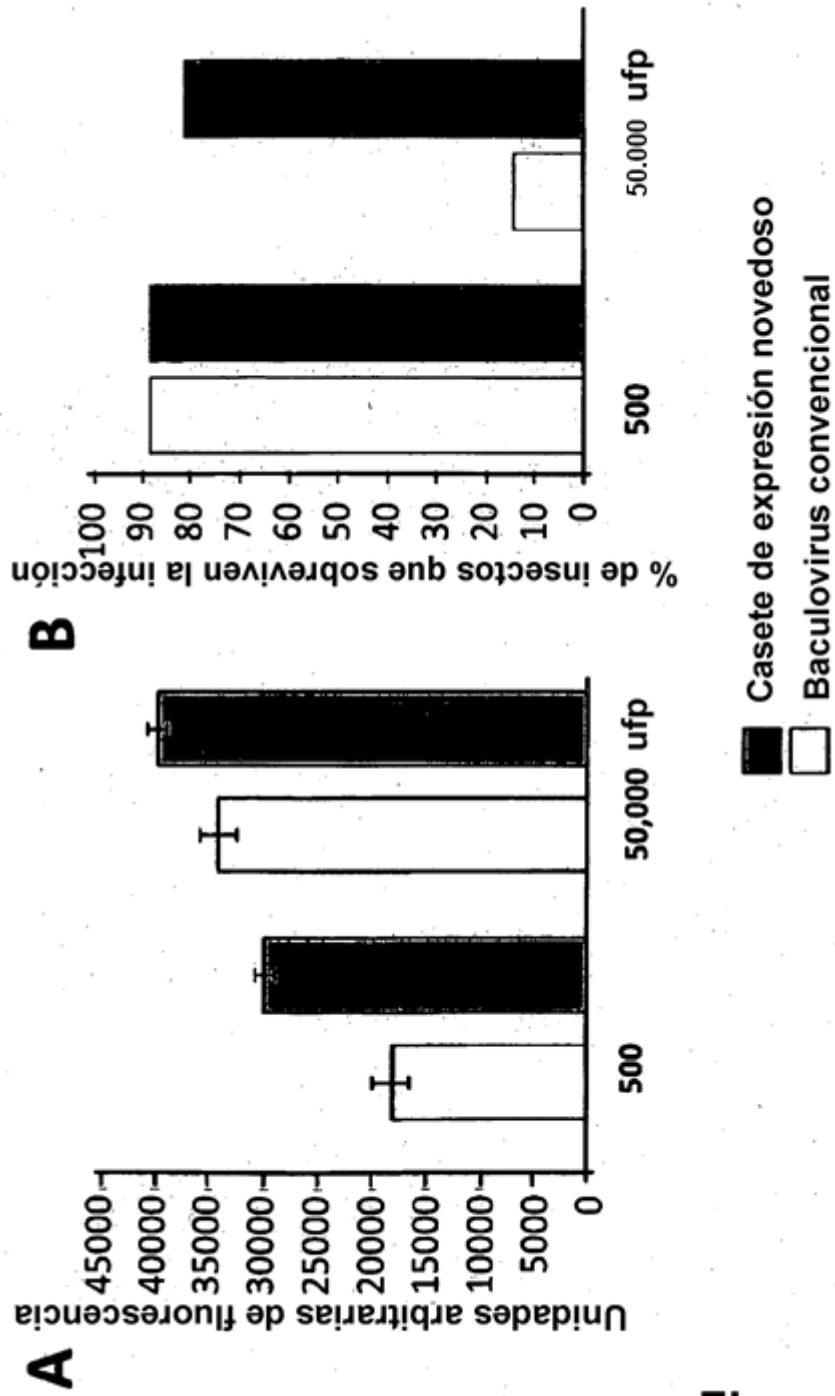


Figura 4

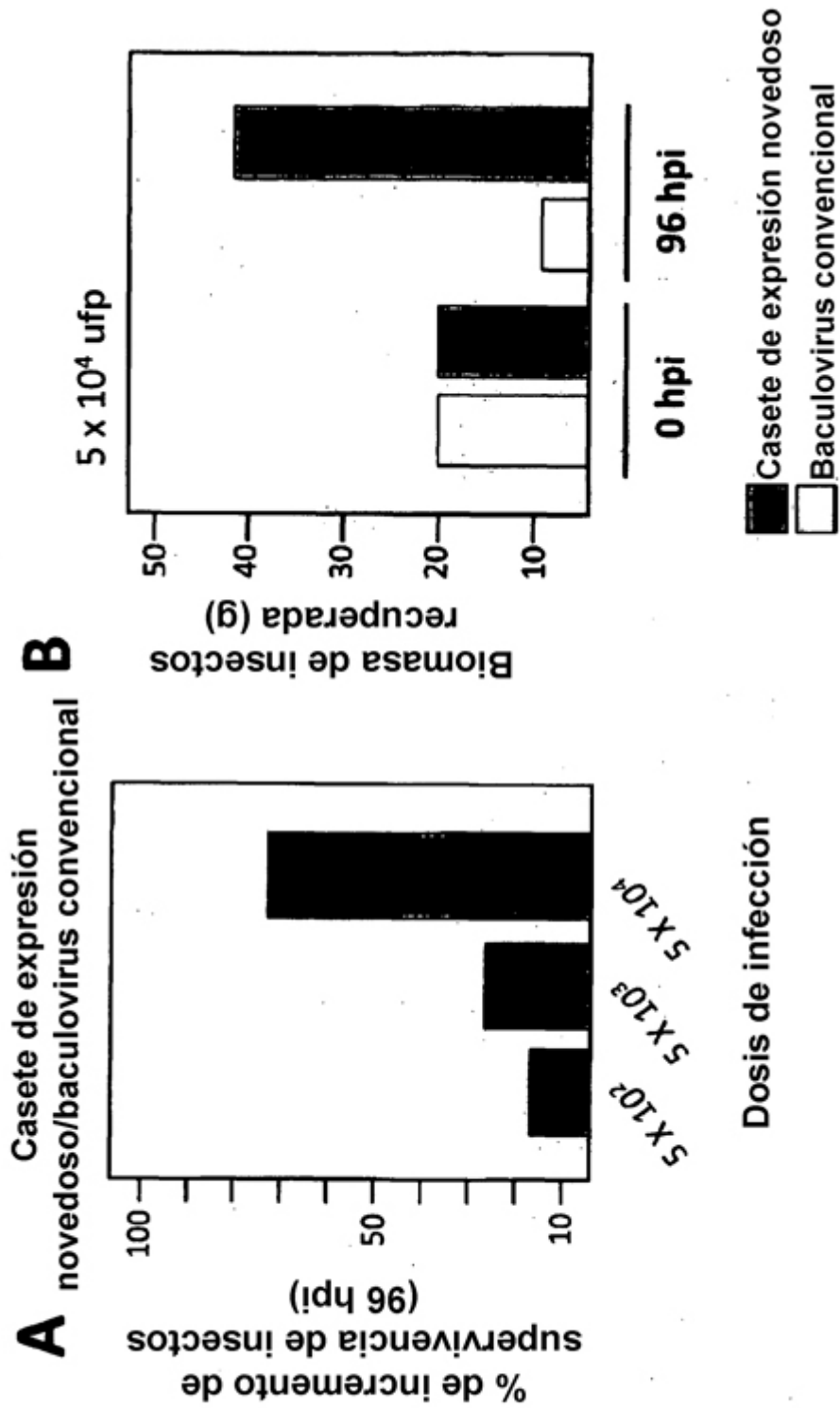


Figura 5

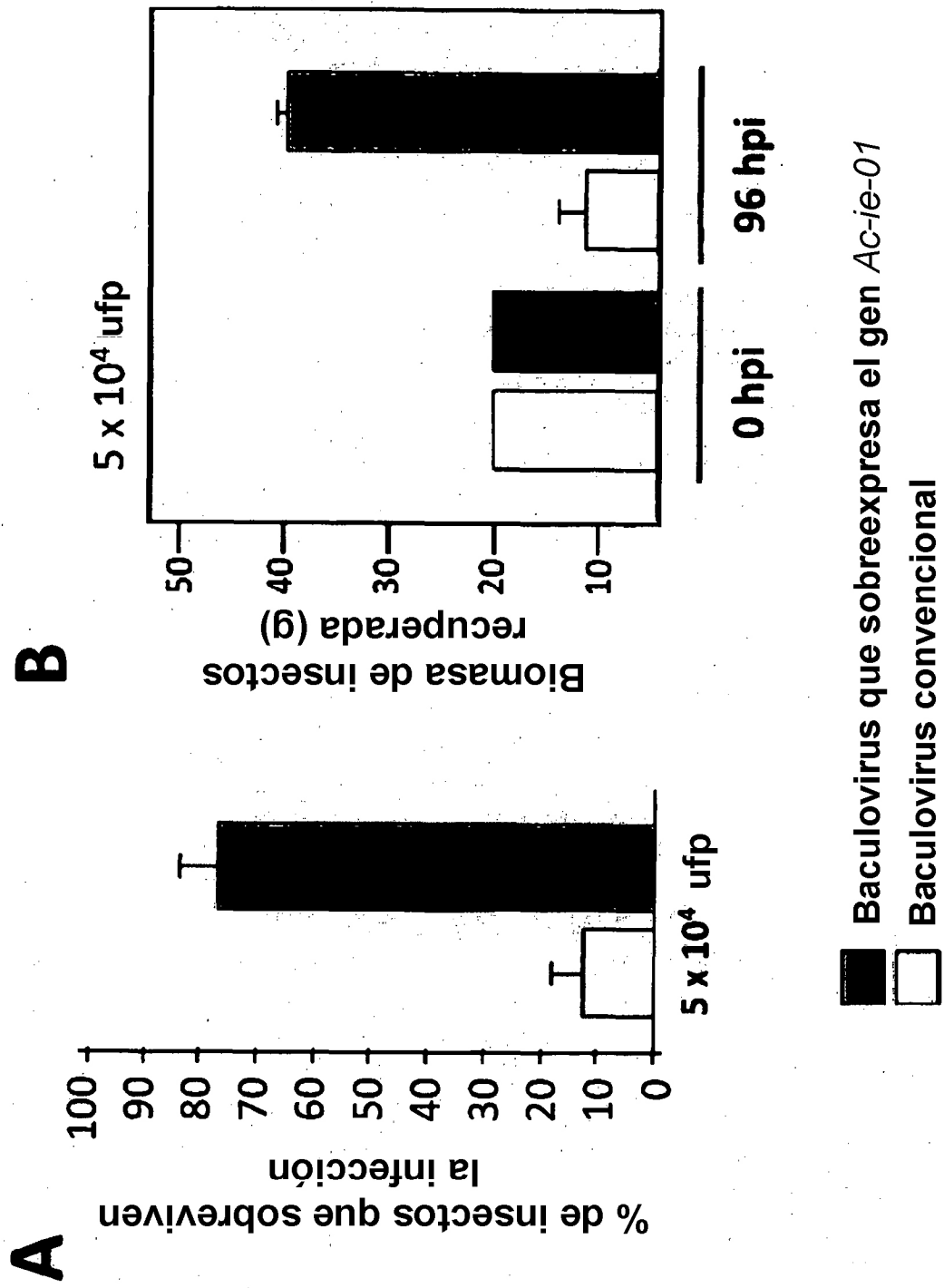


Figura 6

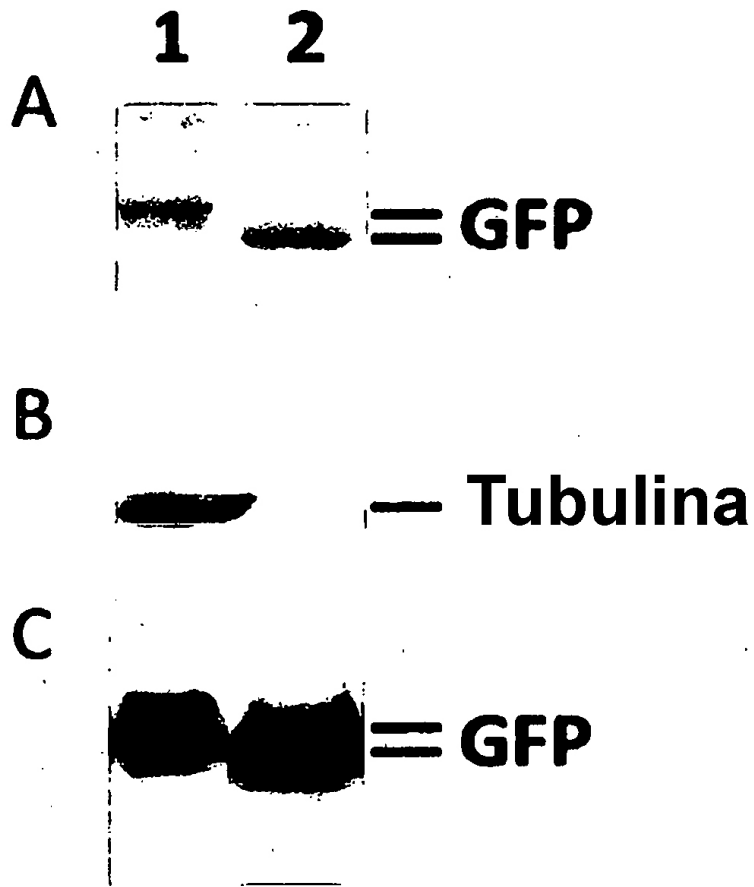


Figura 7

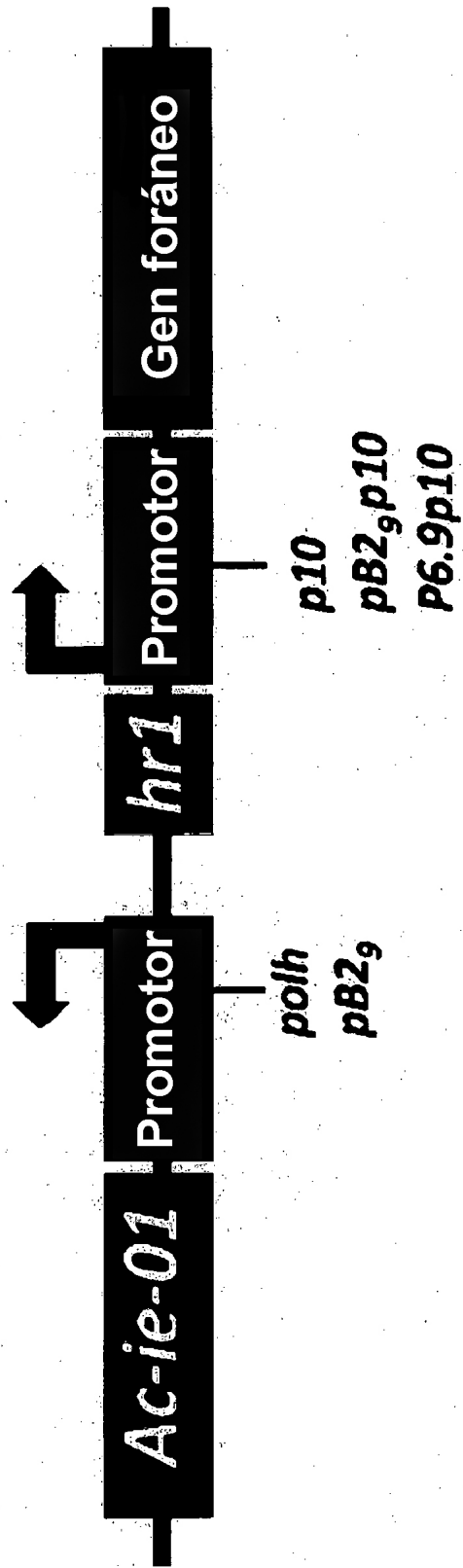


Figura 8