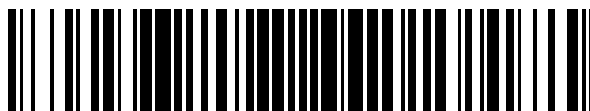


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 899**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2012 PCT/EP2012/074986**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13083847**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2012 E 12798308 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2788478**

54 Título: **Inmunoensayo de cribado múltiplex**

30 Prioridad:

09.12.2011 WO PCT/EP2011/072387
04.05.2012 US 201261642924 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.01.2018

73 Titular/es:

INSTITUT PASTEUR (100.0%)
25-28, rue du Docteur Roux
75015 Paris, FR

72 Inventor/es:

MANUGUERRA, JEAN-CLAUDE;
VANHOMWEGEN, JESSICA;
DESPRES, PHILIPPE y
PAULOUS, SYLVIE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 648 899 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

Inmunoensayo de cribado múltiple.

5 **Antecedentes de la invención**

Las enfermedades infecciosas y las fiebres hemorrágicas víricas (VHFs) plantean un problema de salud pública importante, debido a la gravedad de las enfermedades, a la elevada mortalidad, a la contagiosidad entre humanos de ciertos agentes, y a la falta de tratamiento eficaz para la mayoría de ellas.

10

Algunas de ellas son provocadas por virus de ARN muy infecciosos de varias familias, incluyendo los *Flaviviridae* (virus del dengue, de la fiebre amarilla, del Nilo Occidental, de la encefalitis japonesa, de la encefalitis portada por las garrapatas, de la hepatitis C), los *Togaviridae* (virus de Chikungunya, del Río Ross, de Mayaro, de la encefalitis equina occidental, de la encefalitis equina oriental, de la encefalitis equina venezolana), los *Bunyaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, de la fiebre del valle del Rift, de Schmallenberg), los *Caliciviridae* (virus de la hepatitis E), los *Arenaviridae* (Lassa) y los *Filoviridae* (Ébola, Marburgo). La transmisión se produce habitualmente por contacto con reservorios animales infectados o con vectores de artrópodos. Aunque la mayoría de esos virus tienen una mayor aparición en los trópicos y subtropicos, la expansión geográfica de sus reservorios y vectores naturales, y el incremento en los viajes internacionales han hecho muy probable la aparición de estos agentes en áreas no endémicas. El control de epidemias depende crucialmente de la detección rápida y de la identificación exacta del agente, a fin de definir e implementar una acción puntual y apropiada. En este contexto, es esencial producir y validar herramientas para la detección temprana de brotes, la identificación precisa del agente etiológico, y la vigilancia mejorada de la enfermedad.

15

20

25

A este respecto, la detección de anticuerpos en fluidos corporales constituye una parte importante del diagnóstico de enfermedades inducidas víricamente, enfermedades autoinmunes, y la detección de cáncer. De hecho, ciertos anticuerpos pueden servir como marcadores en el diagnóstico, y pueden conducir al pronóstico y tratamiento, ya que se sabe que su presencia se correlaciona con el brote de un patógeno. Este es particularmente el caso para los anticuerpos dirigidos exclusivamente contra antígenos víricos.

30

Los métodos actuales para detectar la presencia de anticuerpos incluyen diversas técnicas tales como microscopía de inmunofluorescencia, ensayo de quimioluminiscencia, transferencia Western, ensayo de radioinmunoprecipitación (RIP), y ELISA (véase Neuman de Vegvar et al, (2004)). Por ejemplo, el equipo de Kim H-J. et al. desarrolló recientemente un ELISA competitivo para la detección de anticuerpos contra el virus de la fiebre del Valle del Rift en cabras y ganado (The Journal of Veterinary Medical Science, 2011). Sin embargo, tales técnicas requieren medir cada anticuerpo por separado, y de este modo no son útiles para el análisis paralelo, rápido y de alto rendimiento de múltiples anticuerpos en una única muestra de fluido biológico. La detección paralela de varios anticuerpos simultáneamente puede ser particularmente útil minimizando los efectos de matriz que existen entre ensayos individuales, tales como en los ELISA, debido a que los calibradores y los anticuerpos se analizan en las mismas condiciones; por lo tanto, generará resultados comparables para la medida de múltiples anticuerpos presentes en la misma muestra.

35

40

45

Sin embargo, una complicación de la identificación directa de anticuerpos patogénicamente relevantes es que los sueros normales contienen grandes cantidades de anticuerpos naturales que se manifiestan ellos mismos en patrones de tinción complejos (Avrameas S. Immunol. Today 1991). La presencia de estos anticuerpos naturales puede complicar la diferenciación de anticuerpos asociados a la enfermedad a partir del fondo complejo de "ruido autoinmune", es decir, autoanticuerpos de origen natural. Esta es la razón por la que la mayoría de los estudios previos evaluaron uno o unos pocos anticuerpos específicos relacionados con una enfermedad, o que han identificado como antígenos por medio de ELISA o RIA solamente un número limitado de proteínas homólogas o heterólogas purificadas. Fue imposible de establecer un diagnóstico basado en estos anticuerpos. Por otro lado, la transferencia Western ha evolucionado como la herramienta más importante para detectar anticuerpos debido a que permite la identificación simultánea para un espectro amplio de antígenos diferentes. Una nueva técnica reciente, capaz de analizar simultáneamente estos patrones de tinción complejos de las transferencias Western, se basa en el análisis de imágenes digitales. Esta técnica se ha usado con éxito en estudios de miastenia grave, enfermedad de Grave, y uveítis experimental (Zimmerman CW, Electrophoresis 1995). Los anticuerpos también se pueden detectar y medir en una matriz de chip de proteínas usando técnicas de espectrometría de masas mediante desorción/ionización por láser potenciada en superficie (SELDI) o mediante desorción/ionización por láser asistida por matriz, preferentemente la técnica de espectrometría de masas de SELDI (documento US 2006/166268). Sin embargo, estas técnicas usan un gran equipo complicado que es complejo y caro de mantener, y requieren una cantidad elevada de las muestras biológicas para lograr la detección de anticuerpos que se encuentran en una cantidad pequeña.

50

55

60

65

A partir de lo expuesto anteriormente, existe la necesidad de sistemas y métodos abordables, que puedan proporcionar mejoras adicionales en rendimiento elevado, eficacia del coste y exactitud para el diagnóstico molecular de enfermedades que generan anticuerpos. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

Leyendas de las figuras

5 La figura 1 representa el acoplamiento orientado de proteínas quiméricas de AGT-antígeno a microesferas revestidas con el sustrato. La primera etapa del acoplamiento consiste en acoplar el sustrato de AGT BG-PEG-NH₂ a las microesferas activadas, mediante acoplamiento amínico. La segunda etapa consiste en poner en contacto las microesferas revestidas con el sustrato con proteínas de fusión que contienen AGT (por ejemplo, el mutante SNAP), estando destinada dicha enzima a unirse covalentemente a su sustrato BG-PEG-NH₂, esto es, a las microesferas.

10 La figura 2 representa la eficiencia del acoplamiento de proteínas quiméricas de SNAP-antígenos víricos (SNAP-DV1.EDIII, SNAP-DV2.EDIII, SNAP.DV3.EDIII, SNAP.DV4.EDIII, SNAP-WNV, SNAP-YF, SNAP-JE, SNAP-ZIKA), como se sigue mediante anticuerpo anti-SNAP.

15 La figura 3 compara la sensibilidad del experimento de inmunoensayo para la detección del anticuerpo monoclonal purificado anti-DV2 en proteína quimérica de SNAP-DV2.EDIII conjugada a microesferas vía el sustrato de la proteína hAGT (acoplamiento de la invención), o acoplada a través de un procedimiento de acoplamiento amínico estándar, por ejemplo Bio-Plex Amine Coupling Kit, BIORAD.

20 La figura 4 compara la sensibilidad del experimento de inmunoensayo para la detección del anticuerpo monoclonal purificado anti-DV1 en proteína quimérica de SNAP-DV1.EDIII conjugada a microesferas, ya sea en un formato singleplex o un múltiplex con otras proteínas quiméricas de SNAP-Ags víricos (SNAP-DV2.EDIII, SNAP.DV3.EDIII, SNAP.DV4.EDIII, SNAP-WNV, SNAP-YF, SNAP-JE, SNAP-TBE) acopladas a microesferas.

25 La figura 5 representa la reactividad y especificidad del experimento de inmunoensayo múltiplex para la detección de diluciones de anticuerpo monoclonal purificado anti-WNV en proteínas quiméricas de SNAP-Ags víricos (SNAP-DV1.EDIII, SNAP-DV2.EDIII, SNAP.DV3.EDIII, SNAP.DV4.EDIII, SNAP-WNV, SNAP-YF, SNAP-JE, SNAP-TBE) acopladas a microesferas.

30 La figura 6 representa la reactividad y especificidad de la detección de IgG anti-DV3 en suero policlonal de ratón frente a DV3 (A), y de la detección de IgG anti-YF en suero policlonal de ratón frente a YF (B) en inmunoensayos múltiplex en proteínas quiméricas de SNAP-Ags víricos (SNAP-DV1.EDIII, SNAP-DV2.EDIII, SNAP.DV3.EDIII, SNAP.DV4.EDIII, SNAP-WNV, SNAP-YF, SNAP-JE, SNAP-WSL, SNAP-ROCIO, SNAP-MVE, SNAP-SLE, SNAP-ZIKA) acopladas a microesferas.

35 La figura 7 representa la reactividad y especificidad de la detección de IgM anti-DV1 (A) y de la detección de IgG anti-DV1 (B) en suero infectado con DV1 de un paciente humano en ensayos múltiplex en proteínas quiméricas de SNAP-Ags víricos (SNAP-DV1.EDIII, SNAP-DV2.EDIII, SNAP.DV3.EDIII, SNAP.DV4.EDIII, SNAP-WNV, SNAP-YF, SNAP-JE, SNAP-WSL, SNAP-ROCIO, SNAP-MVE, SNAP-SLE, SNAP-ZIKA, SNAP-TBE) acopladas a microesferas.

La figura 8 describe la estructura del casete pDeSNAPuniv.

45 La figura 9 describe la estructura del casete pDeSNAPuniv/SBV.N.

50 La figura 10 representa (A) un ensayo de inmunotransferencia realizado sobre los sobrenadantes de células S2/SNAP-SBV.N inducidas durante 10 días con Cd²⁺ (+) o no inducidas (-). La proteína quimérica segregada SNAP-SBV.N (MW teórico 50 kDa) se detectó usando un anticuerpo anti-His_{etiqueta}, en comparación con cantidades definidas de proteína quimérica muy purificada SNAP-TOS.N (MW teórico 49 kDa). (B) Inmunotransferencia realizada sobre fracciones de columna de cromatografía de exclusión de tamaños (tinción con azul de Coomassie de PAGE-SDS) que corresponde a la etapa de purificación final de la proteína SNAP+SBV.N segregada a partir de células S2/SNAP+SBV.N inducidas, durante 10 días.

55 La figura 11 representa un ejemplo de un dispositivo que contiene las microesferas de la invención revestidas con antígeno.

Descripción detallada de la invención

60 La enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT, también conocida como ATasa o MGMT, y denominada en adelante como "AGT") se numera EC 2.1.1.63 en la nomenclatura de enzimas de la IUBMB. Es una enzima de reparación del ADN de 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa de 207 restos de aminoácidos cuya función en las células es reparar ADN alquilado. De forma más precisa, AGT actúa sobre guanina metilada en O⁶ en el ADN transfiriendo irreversiblemente el grupo metilo en una reacción S_N2 a un resto de cisteína reactivo (Cys 145).
65 Recientemente, se ha mostrado que un número de derivados de 06-bencilguanina reaccionan irreversiblemente con dicha enzima transfiriendo su grupo bencilo a la cisteína del sitio activo de la enzima AGT (véase

Damoiseaux et al., ChemBiochem., 2001, documentos WO 2004/031404 y WO 2005/085470).

Los presentes inventores han desarrollado y validado inmunoensayos que conducen a la detección rápida y simultánea de varios anticuerpos generados por un amplio abanico de enfermedades, en particular enfermedades arbovíricas y VHF, en fluidos biológicos.

Para lograr tanto una sensibilidad como una especificidad óptimas para la detección de una cantidad baja de anticuerpos, se ha desarrollado un procedimiento de acoplamiento orientado de antígenos. Este procedimiento de acoplamiento orientado de antígenos se basa en la interacción covalente entre las enzimas AGT y sus sustratos, los derivados O6-bencilguanínicos, que reaccionan de forma irreversible con enzimas AGT transfiriendo su grupo bencilo a la cisteína del sitio activo de la enzima. En consecuencia, se puede fusionar un gran número de antígenos diana a un resto enzimático de AGT, dando como resultado diferentes proteínas de fusión quiméricas (en lo sucesivo denominadas como proteínas de fusión [AGT-Antígeno]), que se pueden usar como reactivos de captura para los anticuerpos presentes en una muestra biológica. Los presentes inventores han mostrado que esta captura de anticuerpos está potenciada cuando estas proteínas de fusión se unen a soportes sólidos gracias a la interacción específica del sustrato con AGT. El revestimiento de los mencionados soportes sólidos con el sustrato de AGT es así una etapa esencial para el inmunoensayo de la invención.

De forma más precisa, en el contexto de la invención, el método para acoplar antígenos a soportes sólidos comprende las dos etapas siguientes: i) revestir superficies sólidas con un sustrato de AGT (por ejemplo, BG-PEG-amino), y ii) inmovilizar covalentemente proteínas de fusión quiméricas [AGT-Antígeno] usando el sustrato de AGT como un anclaje (véase la figura 1). Antes de revestirlas con dicho sustrato de AGT, las superficies sólidas se funcionalizan ventajosamente, preferentemente usando un procedimiento de carbodiimida de dos etapas optimizado (Kufer SK, Eur. Biophys. J. 2005), de manera que el sustrato de AGT se une covalentemente a las superficies sólidas. Una vez que se han llevado a cabo estas etapas, las superficies sólidas portan sustratos de AGT que se enlazan irreversiblemente a las proteínas de fusión quiméricas [AGT-antígeno]. Debido a la elevada especificidad de esta reacción, la proteína de fusión se acopla exclusivamente vía el dominio que contiene cisteína de la enzima AGT, dejando así al antígeno accesible para sus interacciones con anticuerpos.

Este procedimiento de acoplamiento es muy ventajoso ya que permite la unión del antígeno de una manera orientada en los soportes sólidos. También, este procedimiento de acoplamiento del antígeno permite obtener ventajosamente una organización antigénica multimérica sobre una superficie sólida, para potenciar la eficiencia de la captura de inmunoglobulina G, y potencialmente de inmunoglobulina M. En consecuencia, las microesferas acopladas al antígeno desarrolladas en la parte experimental de la solicitud han mostrado una captura mejorada de anticuerpos específicos en comparación con las microesferas acopladas a antígeno producidas mediante procedimientos de acoplamiento amínico no orientado estándar (véase la parte experimental a continuación y la figura 3). Finalmente, este procedimiento de acoplamiento del antígeno permite obtener una eficiencia elevada del acoplamiento y una estabilidad a largo plazo de las microesferas conjugadas al antígeno (>6 meses a 4°C).

De forma importante, los soportes sólidos usados en los inmunoensayos de la invención deberían ser intrínsecamente identificables, de manera que es posible determinar de forma precisa qué antígeno es portado por cuál soporte sólido. Los soportes sólidos acoplados al antígeno e identificables se usan entonces como agentes de captura para inmunoglobulinas humanas específicas, y por lo tanto se ponen en contacto con la muestra biológica del paciente.

La etapa final del método de la invención implica la detección de los soportes sólidos que están unidos efectivamente a inmunoglobulinas. La identificación del soporte o soportes sólidos revestidos con inmunoglobulinas permite diagnosticar qué patógeno infectaba al paciente (ya que cada soporte sólido se corresponde con un antígeno patogénico definido). Esta etapa de detección final se lleva a cabo por cualesquiera medios habituales, por ejemplo usando anticuerpos de detección marcados e identificando la naturaleza del soporte sólido.

Ventajosamente, el método de la invención implica solamente la detección de la presencia de anticuerpos en pacientes enfermos, pero no se requiere el conocimiento sobre la identidad de esos anticuerpos.

Como se muestra en la parte experimental de la solicitud, los inventores han usado el procedimiento de acoplamiento de antígeno de la invención para generar un número de diferentes microesferas fluorescentes revestidas con antígeno. En el presente, se han acoplado 16 conjuntos distintos de microesferas con 16 proteínas de fusión quiméricas [AGT-Antígeno] purificadas, permitiendo la titulación de 16 anticuerpos séricos específicos para diferentes proteínas del virus del dengue serotipos 1 a 4, del Nilo Occidental, de la fiebre amarilla, de la encefalitis japonesa, de la encefalitis portada por garrapatas, de la encefalitis de San Luis, de la encefalitis del Valle de Murray, de Wesselsbron, de Zika, de Rocio, de Usutu, de la fiebre del Valle del Rift, y de chikungunya. Estos 16 conjuntos distintos de microesferas se han mezclado en una única muestra sin afectar a la sensibilidad ni especificidad de la detección (véase la figura 5). La producción de este sistema es muy eficaz en cuanto al tiempo y al coste, ya que solamente se requiere una cantidad muy pequeña de antígeno recombinante (< 50 µg) para producir un conjunto de microesferas acopladas a antígeno (~1,25 x 10⁶

microesferas), siendo tal conjunto suficiente para llevar a cabo 500 ensayos individuales.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar por lo menos dos anticuerpos diana en una muestra biológica, que comprende:

- 5 (a) poner en contacto un primer soporte sólido que comprende un sustrato de AGT acoplado covalentemente a una primera proteína de fusión que comprende un polipéptido de AGT que tiene actividad de O6-alquilguanina-ADN alquiltransferasa y un primer epítipo que es reconocido por el primer anticuerpo diana con la muestra biológica;
- 10 (b) poner en contacto un segundo soporte sólido que comprende un sustrato de AGT acoplado covalentemente a una segunda proteína de fusión que comprende un polipéptido de AGT que tiene actividad de O6-alquilguanina-ADN alquiltransferasa y un segundo epítipo que es reconocido por un segundo anticuerpo diana, pero no por dicho primer anticuerpo diana, con la muestra biológica; y
- 15 (c) detectar la presencia o ausencia de los dos anticuerpos diana.

De forma más precisa, la presente invención se refiere a un método de ensayo *in vitro* para detectar por lo menos dos anticuerpos diana diferentes presentes en una muestra biológica procedente de un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 20 (a) proporcionar una primera proteína de fusión que comprende:
 - 25 - un polipéptido que comprende un primer epítipo que es reconocido por un primer anticuerpo diana, y
 - un polipéptido de AGT que tiene actividad de O6-alquilguanina-ADN alquiltransferasa
- 30 (b) poner en contacto dicha primera proteína de fusión con un primer soporte sólido, estando acoplado covalentemente dicho soporte con un sustrato de dicho polipéptido de AGT,
- (c) obtener un primer soporte sólido acoplado covalentemente con un primer epítipo que es reconocido por el primer anticuerpo diana,
- 35 (d) proporcionar una segunda proteína de fusión que comprende:
 - un polipéptido que comprende un segundo epítipo, siendo reconocido dicho segundo epítipo mediante un segundo anticuerpo diana pero no por dicho primer anticuerpo diana, y
 - 40 - un polipéptido de AGT que tiene actividad de O6-alquilguanina-ADN alquiltransferasa,
- (e) poner en contacto dicha segunda proteína de fusión con un segundo soporte sólido, estando acoplado covalentemente dicho soporte con un sustrato de dicho polipéptido de AGT,
- 45 (f) obtener un segundo soporte sólido acoplado covalentemente con un segundo epítipo que es reconocido por el segundo anticuerpo diana, pero no por dicho primer anticuerpo diana, en el que dichos soportes sólidos primero y segundo se pueden identificar específicamente entre sí,
- (g) poner en contacto dicha muestra biológica con los soportes sólidos primero y segundo obtenidos en las etapas (c) y (f),
- 50 (h) detectar la presencia de dichos por lo menos dos anticuerpos diana.

Como se usa en la presente memoria en adelante, las expresiones “un anticuerpo”, “una proteína de fusión”, “un epítipo”, “un antígeno”, “un polipéptido de AGT”, “un soporte sólido”, y similares, se han de entender obviamente como habituales en la técnica, esto es, de una manera amplia. En particular, engloban no solo moléculas individuales particulares, sino un número de dichas moléculas. Por ejemplo, la expresión “soporte sólido” engloba un subconjunto de numerosos soportes sólidos idénticos; el término “micropartícula” engloba un subconjunto de numerosas micropartículas idénticas; y la expresión “proteína de fusión” engloba un número de moléculas proteicas individuales idénticas. En el contexto de la presente invención, es digno de mención que un soporte sólido porta un número de proteínas de fusión idénticas, conteniendo dichas proteínas de fusión, aparte del polipéptido de AGT, antígeno idéntico, y por lo tanto epítipos idénticos, de manera que los anticuerpos que se detectarán en el soporte sólido se pueden identificar sin ambigüedad.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “proteína de fusión” significa un polipéptido que contiene una proteína o un polipéptido creado a través de la unión artificial de dos o más polipéptidos. En los inmunoensayos de la invención, dichas proteínas de fusión contienen un polipéptido de AGT y un antígeno, que contiene por lo

menos un epítipo. Las proteínas de fusión se pueden obtener a través de manipulación genética de un gen de fusión. Esto implica típicamente eliminar el codón de parada de una secuencia de ADNc que codifica la primera proteína, posteriormente anexar la secuencia de ADNc de la segunda proteína en marco a través de PCR mediada por ligación o PCR de extensión del solapamiento. Esa secuencia de ADN se expresará entonces mediante una célula como una única proteína. La proteína se puede manipular para incluir la secuencia completa de ambas proteínas originales, o solo una porción de cada. Si las dos entidades son proteínas, se pueden añadir péptidos enlazadores (o "espaciadores"), que hacen posible de forma más probable que las proteínas se plieguen independientemente y se comporten como se espera. En particular, las proteínas de fusión de la invención se pueden obtener proporcionando vectores que comprenden secuencias codificantes de AGT en marco con un epítipo o secuencias codificantes de antígeno, ya sea unidas al lado N-terminal o al lado C-terminal de la secuencia de ADN de AGT. Estos vectores se pueden introducir en hospedantes procariontes, incluyendo eubacterias tales como bacterias de *E. coli*, u hospedantes eucariotes, por ejemplo levadura, células de insectos o células de mamíferos, y las proteínas de fusión recombinantes se pueden producir en condiciones apropiadas. Las construcciones típicas se presentan en la parte experimental de esta solicitud.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, está destinado a incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y anticuerpos quiméricos. Preferentemente, los anticuerpos que se van a detectar mediante los inmunoensayos de la invención son anticuerpos policlonales, que están presentes en muestras biológicas de pacientes enfermos, y por lo tanto se han generado a partir de diferentes fuentes de células B. Como tales, reconocen diferentes epítopos exhibidos por un antígeno patógeno (por otro lado, los anticuerpos monoclonales derivan de una única estirpe celular y reconocen el mismo epítipo).

Un anticuerpo ("o inmunoglobulina") consiste en una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región (o dominio) variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como HCVR o VH), y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) o "regiones hipervariables", que son responsables principalmente de la unión de un epítipo de un antígeno, y que están intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el término amino al término carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedante, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

Los anticuerpos pueden ser de diferentes isotipos (a saber, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM). Tanto los anticuerpos de tipo IgG como IgM se pueden detectar mediante el presente método. Digno de mención, estos isotipos están compuestos de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, que están unidas mediante enlaces de disulfuro. De forma importante, los anticuerpos IgM forman polímeros en los que múltiples inmunoglobulinas están enlazadas covalentemente juntas con enlaces de disulfuro, mayoritariamente como un pentámero, pero también como un hexámero, de manera que tienen una masa molecular de aproximadamente 900 kDa (en su forma pentamérica). Debido a que cada monómero tiene dos sitios de unión al antígeno, un IgM pentamérico tiene 10 sitios de unión. Típicamente, sin embargo, los anticuerpos IgM no pueden unirse a 10 antígenos al mismo tiempo, debido a que el tamaño grande de la mayoría de los antígenos impide la unión a sitios cercanos. Debido a su naturaleza polimérica, IgM posee una elevada avidéz.

Los fragmentos de anticuerpos también se pueden detectar gracias al presente método. Esta expresión está destinada a incluir Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, y multímeros de los mismos, y fragmentos de anticuerpos biespecíficos.

Los anticuerpos monoclonales se pueden usar en los presentes inmunoensayos, por ejemplo para detectar las inmunoglobulinas que están unidas a los soportes sólidos. Como se usa en la presente memoria, "anticuerpo monoclonal" define un anticuerpo que surge de una población homogénea de anticuerpos. Más particularmente, los anticuerpos individuales de una población son idénticos excepto por unas pocas posibles mutaciones de origen natural que se pueden encontrar en proporciones mínimas. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal consiste en un anticuerpo homogéneo que surge del crecimiento de un único clon celular (por ejemplo, un hibridoma, una célula hospedante eucariota transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, una célula hospedante procarionte transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, etc.), y generalmente se caracteriza por cadenas pesadas de una y solamente una clase y subclase, y cadenas ligeras de solamente un tipo. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y están dirigidos contra un único antígeno. Además, en contraste con preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen típicamente diversos anticuerpos dirigidos contra diversos determinantes, o epítopos, cada anticuerpo

monoclonal está dirigido contra un único epítipo del antígeno.

El término “antígeno” significa en la presente memoria cualquier sustancia que provoca que el sistema inmune produzca anticuerpos frente a la mencionada sustancia. Un antígeno “inmunogénico” es un tipo específico de antígeno que es capaz de estimular una respuesta inmune adaptativa si se inyecta en sí mismo. A nivel molecular, un antígeno se caracteriza así por su capacidad para “unirse” al sitio de unión al antígeno de un anticuerpo.

En el contexto de la presente invención, se afirma que un anticuerpo se “une” a un antígeno (o epítipo) definido, o “reconoce” dicho antígeno (o epítipo), si dicho anticuerpo tiene una constante de afinidad K_a (que es la constante de disociación inversa, es decir, $1/K_d$) mayor que 10^5 M^{-1} , preferentemente mayor que 10^6 M^{-1} , más preferentemente mayor que 10^7 M^{-1} para dicho antígeno (o epítipo). Esta afinidad se puede medir, por ejemplo, mediante diálisis en el equilibrio o mediante extinción de la fluorescencia, siendo usadas habitualmente ambas tecnologías en la técnica.

En el contexto de la invención, los antígenos o epítipos incluyen: proteínas, lipoproteínas, polisacáridos, y glicoproteínas. Dichas proteínas incluyen proteínas víricas, bacterianas, parasitarias, de animales, y fúngicas, tales como albúminas, toxoide tetánico, toxoide diftérico, toxoide pertúsico, proteínas de la membrana exterior bacteriana (incluyendo proteína de la membrana exterior meningocócica), proteína de RSV-F, péptido derivado de la malaria, B-lactoglobulina B, aprotinina, ovoalbúmina, lisozima, péptidos lineales, oligopéptidos, etc. Dichos antígenos también pueden ser antígenos asociados a tumores, tales como antígeno carcinoembrionario (CEA), CA 15-3, CA 125, CA 19-9, antígeno específico de la próstata (PSA), complejos de TAA, SSX2 o NERCMSL. Dichos antígenos haptenos, y otros restos que comprenden moléculas de bajo peso molecular, tales como sacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, péptidos, mucinas, toxinas, y alérgenos (polen, clara de huevo). Las toxinas infecciosas son bien conocidas en la técnica. Se pueden citar, como ejemplos, las neurotoxinas botulínicas, la toxina épsilon de *Clostridium perfringens*, ricina, saxitoxina, shigatoxina, tetrodotoxina, enterotoxinas estafilocócicas, etc. Las mucinas también son bien conocidas en la técnica. Sus ejemplos son MUC5AC, MUC5B y MUC2. En particular, pueden ser polisacáridos de origen natural, tales como polisacáridos capsulares estreptocócicos y neumocócicos del Grupo B (incluyendo tipo III), mucoexopolisacárido de *Pseudomonas aeruginosa*, y polisacáridos capsulares (incluyendo tipo I de Fisher), y polisacáridos de *Haemophilus influenzae*.

En otra forma de realización preferida, dicho antígeno o epítipo es expresado por un virus que se selecciona del grupo que consiste en: el virus de la gripe, el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, el virus de la hepatitis E, el virus de la hepatitis G, el virus del VIH, el virus de la fiebre amarilla, el virus del dengue, el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la encefalitis portada por garrapatas, los virus de Usutu o del Nilo Occidental, los virus de la fiebre del Valle del Rift o de Toscana, el virus de chikungunya, el virus sincitial respiratorio, el virus de Rocio, el morbilivirus, el virus de la encefalitis de Murray, el virus de Wesselbron, el virus del Zika, el virus de la coriomeningitis linfocítica, el virus del Ébola, el virus de Marburgo, el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, el virus de Lassa, el virus de Junin, el virus de Machupo, el virus de Sabia, el virus de Guanarito, el virus de las paperas, el virus de la rabia, el virus de la rubéola, el virus de la varicela zóster, el herpes simple tipos 1 y 2, más generalmente un alfavirus, un adenovirus, un ecovirus, un rotavirus, un flavivirus, un rinovirus, un ortobunyavirus, un poliovirus, un parvovirus humano, un enterovirus, un coronavirus, un papilomavirus humano, el citomegalovirus humano, el virus de Epstein-Barr, los virus de parainfluenzae de los tipos 1, 2 y 3, o cualquier virus identificado.

En otra forma de realización preferida, dicho antígeno o epítipo es expresado por un virus que pertenece a una familia que se selecciona del grupo que consiste en: los *Flaviviridae* (virus del dengue, de la fiebre amarilla, del Nilo Occidental, de la encefalitis japonesa, de la encefalitis portada por las garrapatas, de la hepatitis C), los *Togaviridae* (virus de Chikungunya, del Río Ross, de Mayaro, de la encefalitis equina occidental, de la encefalitis equina oriental, de la encefalitis equina venezolana), los *Bunyaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, de la fiebre del valle del Rift, de Schmallenberg), los *Caliciviridae* (virus de la hepatitis E), los *Arenaviridae* (Lassa) y los *Filoviridae* (Ébola, Marburgo).

En otra forma de realización preferida, dicho antígeno o epítipo es expresado por un protozoo parasitario (tal como aquellos del género *Leishmania*, o *Toxoplasma Gondii*, *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium falciparum*, *Pneumocystis carinii*, o *Giardia lamblia*), helmintos (tales como nematodos, cestodos, o trematodos), o artrópodos (tales como crustáceos, insectos, arácnidos).

En otra forma de realización preferida, dicho antígeno o epítipo es expresado por una bacteria infecciosa, por ejemplo de los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycoplasma*, *Diphtheriae*, *Leptospiriosa*, *Rickettsia* o *Escherichia*. En una forma de realización preferida adicional, la mencionada bacteria pertenece a una de las especies seleccionada de *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *S. epidermidis*, *N. meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Coxiella burnetii*, *Leptospiriosa interrogans* y *E. coli*.

En otra forma de realización preferida, dicho antígeno o epítipo es expresado por un hongo o levadura (por ejemplo, de la especie *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis*, o *Stachybotrys*).

5 Los antígenos presentan habitualmente diversos rasgos superficiales que pueden actuar como puntos de interacción para anticuerpos específicos. Cualquiera de tales rasgos moleculares distintos constituye un epítipo. Como se usa en la presente memoria, el término "epítipo" designa por lo tanto un rasgo de la superficie molecular particular de un antígeno, por ejemplo un fragmento de un antígeno, que es capaz de ser unido por lo menos un anticuerpo. A nivel molecular, un epítipo corresponde por lo tanto a un rasgo de la superficie molecular particular de un antígeno (por ejemplo un fragmento de un antígeno) que es reconocido y unido por un anticuerpo específico. En el contexto de la presente invención, las "proteínas de fusión" contienen por lo menos un epítipo que es reconocido por un anticuerpo diana. Preferentemente, dichas proteínas de fusión contienen antígenos completos, que comprenden varios epítipos. Estos epítipos pueden ser epítipos lineales o conformacionales. Como se usa en la presente memoria, un epítipo lineal (o secuencial) es un epítipo que es reconocido por anticuerpos mediante su secuencia lineal de aminoácidos, o estructura primaria. Por el contrario, un epítipo conformacional es reconocido por su forma tridimensional específica. Preferentemente, las proteínas de fusión de la invención contienen epítipos conformacionales, puesto que la mayoría de los anticuerpos policlonales los reconocen.

20 Es importante sin embargo que tales antígenos no presenten epítipos reactivos de forma cruzada, es decir, epítipos que son reconocidos por anticuerpos no específicos que se unirán a ellos. Si éste fuera el caso, la especificidad del método de la invención disminuiría.

25 En una forma de realización más preferida, dicho epítipo está presente en una proteína vírica que se selecciona en el grupo que consiste en: la proteína EDIII del virus 1 del dengue codificada por SEC ID NO:3, la proteína EDIII del virus 2 del dengue codificada por SEC ID NO:4, la proteína EDIII del virus 3 del dengue codificada por SEC ID NO:5, la proteína EDIII del virus del 4 dengue codificada por SEC ID NO:6, la proteína EDIII del virus del Nilo Occidental codificada por SEC ID NO:7, la proteína EDIII del virus de la fiebre amarilla codificada por SEC ID NO:8, la proteína EDIII del virus de la encefalitis japonesa codificada por SEC ID NO:9, la proteína EDIII del virus del Zika codificada por SEC ID NO:10, la proteína EDIII del virus de Wesselbron codificada por SEC ID NO:11, la proteína EDIII del virus de Rocio codificada por SEC ID NO:12, la proteína EDIII del virus de la encefalitis de Murray codificada por SEC ID NO:13, la proteína EDIII del virus de la encefalitis de San Luis codificada por SEC ID NO:14, la proteína EDIII del virus de la encefalitis japonesa de genotipo 1 codificada por SEC ID NO:54, la proteína EDIII del virus de la encefalitis japonesa de genotipo 2 codificada por SEC ID NO:55, la proteína EDIII del virus de la encefalitis japonesa de genotipo 4 codificada por SEC ID NO:56, la proteína EDIII del virus de la encefalitis japonesa de genotipo 5 codificada por SEC ID NO:57, y la proteína EDIII del virus de Rabensburg codificada por SEC ID NO:58, y la proteína vírica de VIH1, de VIH2, del virus de la hepatitis B, del virus de la hepatitis C, del virus de la hepatitis E, del virus del Nilo Occidental y de cepas oncogénicas de HPV tales como HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68.

40 En una forma de realización preferida, los epítipos (o antígenos) primero y segundo que se fusionan con la enzima hAGT en las proteínas de fusión usadas en el método de la invención pertenecen al mismo nivel taxonómico, es decir, pertenecen a la misma familia (por ejemplo, la familia *Flaviviridae*, la familia *Bunyaviridae*, la familia *Arenaviridae*, o la familia *Filoviridae*) o género o especie, pero que tienen diferentes serotipos. En otras palabras, los mencionados epítipos primero y segundo se pueden expresar mediante virus estrechamente relacionados, por ejemplo pertenecen a la misma familia, género o especie, pero que tienen diferentes serotipos, tales como el virus 1, 2, 3, o 4 del dengue.

50 Alternativamente, en otra forma de realización preferida, dichos epítipos (o antígenos) primero y segundo pertenecen a familias o género o especie biológicas no relacionadas.

De forma importante, los inmunoensayos de la invención se basan en la detección de un gran número de anticuerpos, que son conocidos o desconocidos. Por "gran número", se entiende en la presente memoria por lo menos 5, más preferentemente por lo menos 15, más preferentemente por lo menos 50, e incluso más preferentemente por lo menos 100 anticuerpos. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, el método de ensayo de la invención se usa para detectar por lo menos 5, más preferentemente por lo menos 15, y más preferentemente por lo menos 50, e incluso más preferentemente por lo menos 100 anticuerpos diana en una muestra biológica de un sujeto. No es relevante para el método de la invención el hecho de que los anticuerpos particulares se caractericen apropiadamente, puesto que el procedimiento se basa solamente en la detección de la presencia de dichos anticuerpos, y no en su naturaleza.

60 En una forma de realización preferida de la invención, las mencionadas proteínas de fusión primera y segunda que se acoplan con los mencionados soportes sólidos primero y segundo se seleccionan en el grupo que consiste en:

- 65 - SEC ID NO:21 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-DEN1.EDIII])

- SEC ID NO:42 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-SBV.N])
- SEC ID NO:49 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-EV71.VP1])
- SEC ID NO:51 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-JE.sE])
- SEC ID NO:53 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-JE-1.EDIII])
- 5 - SEC ID NO:60 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-JE-2.EDIII])
- SEC ID NO:62 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-JE-4.EDIII])
- SEC ID NO:64 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-JE-5.EDIII])
- SEC ID NO:66 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-RabV.EDIII])
- SEC ID NO:68 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-flavivirus.EDIII])
- 10 - SEC ID NO:70 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-RR.sE2])
- SEC ID NO:72 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-MAY.sE2])
- SEC ID NO:74 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-WEE.sE2])
- SEC ID NO:76 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-EEE.sE2])
- SEC ID NO:78 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-VEE.sE2])
- 15 - SEC ID NO:80 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-AKA.N])
- SEC ID NO:82 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-AIN.N])
- SEC ID NO:84 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-SHA.N])
- SEC ID NO:86 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-huCOV.N])
- SEC ID NO:88 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-huCOV.S])
- 20 - SEC ID NO:90 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-HCV.C])
- SEC ID NO:92 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-MSP+AMA])
- SEC ID NO:94 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-HbpA1])
- SEC ID NO:96 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-MUB40])
- SEC ID NO:98 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-moCLEC5A])
- 25 - SEC ID NO:100 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-huCLEC5A])
- SEC ID NO:102 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-cxVAGO])
- SEC ID NO:104 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-aaVAGO])
- SEC ID NO:109 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-CCHF.N])
- SEC ID NO:111 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-EBO.N])
- 30 - SEC ID NO:113 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-MAR.N])
- SEC ID NO:115 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-LAS.N])
- SEC ID NO:117 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-JUN.N])
- SEC ID NO:119 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-MAC.N])
- SEC ID NO:121 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-GUA.N])
- 35 - SEC ID NO:123 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-SAB.N])
- SEC ID NO:125 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-OMSK.EDIII])
- SEC ID NO:127 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-KYA.EDIII])
- SEC ID NO:129 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-ALK.EDIII])
- SEC ID NO:131 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-LAS.ectoGP1])
- 40 - SEC ID NO:133 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-JUN.ectoGP1])
- SEC ID NO:135 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-MAC.ectoGP1])
- SEC ID NO:137 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-GUA.ectoGP1])
- SEC ID NO:139 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-SAB.ectoGP1])
- SEC ID NO:141 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-LAS.ectoGP2])
- 45 - SEC ID NO:143 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-JUN.ectoGP2])
- SEC ID NO:145 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-MAC.ectoGP2])
- SEC ID NO:147 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-GUA.ectoGP2])
- SEC ID NO:149 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-SAB.ectoGP2]), y
- SEC ID NO:151 (que corresponde a la proteína de fusión [SNAP-HEV.C]).

50 En consecuencia, el método *in vitro* de la invención permite detectar enfermedad o enfermedades diana que son infecciones víricas, bacterianas, de levaduras o mediadas por hongos. Preferentemente, dicha infección vírica está provocada por un papilomavirus o virus de ARN de las familias de los *Flaviviridae* (virus del dengue, de la fiebre amarilla, del Nilo Occidental, de la encefalitis japonesa, de la encefalitis portada por las garrapatas, de la hepatitis C), los *Togaviridae* (virus de Chikungunya, del Río Ross, de Mayaro, de la encefalitis equina occidental, de la encefalitis equina oriental, de la encefalitis equina venezolana), los *Bunyaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, de la fiebre del valle del Rift, de Schmallerberg), los *Caliciviridae* (virus de la hepatitis E), los *Arenaviridae* (Lassa) y los *Filoviridae* (Ébola, Marburgo). Preferentemente, dicha infección está provocada por *Leptospirisa interrogans*. Preferentemente, dicha infección está provocada por *Plasmodium falciparum*.

65 Como se usa en la presente memoria, la expresión "muestra biológica" se refiere a cualesquiera muestras que se han obtenido de un paciente y que pueden contener anticuerpos. Preferentemente, dicha muestra biológica es un fluido biológico, por ejemplo un fluido biológico no filtrado tal como orina, fluido cerebroespinal, fluido pleural, fluido sinovial, fluido peritoneal, fluido amniótico, fluido gástrico, sangre, suero, plasma, fluido linfático, fluido intersticial, saliva, secreciones fisiológicas, lágrimas, moco, sudor, leche, semen, fluido seminal, secreciones

vaginales, fluido procedente de úlceras y otras erupciones de la superficie, ampollas, y abscesos. También se refiere a un extracto de tejidos, incluyendo biopsias de tejidos normales, malignos y sospechosos, o cualesquiera otros constituyentes del cuerpo que pueden contener anticuerpos. La mencionada muestra biológica se puede pretratar antes del uso, tal como preparando plasma a partir de sangre, diluyendo fluidos viscosos, o similar; los métodos de tratamiento pueden implicar filtración, destilación, concentración, inactivación de compuestos que interfieren, y la adición de reactivos. En una forma de realización preferida, dicha muestra biológica se escoge de sangre completa, suero, plasma, orina, fluido seminal, fluido cerebroespinal y saliva.

En el método de la presente invención se puede usar cualquier polipéptido que tenga actividad de O⁶-alquilguanina-ADN alquiltransferasa. Para los fines de la invención, estos polipéptidos se denominarán como "polipéptidos de AGT". Algunos ejemplos de polipéptidos de AGT que se pueden usar para unir covalentemente proteínas de fusión a soportes sólidos se describen en Kindermann et al, 2003 y Engin et al, 2010.

AGT transfiere irreversiblemente el grupo alquilo desde su sustrato, O⁶-alquilguanina-ADN, a uno de sus restos de cisteína. Un análogo del sustrato que reacciona rápidamente con AGT es O⁶-bencilguanina, siendo la constante de velocidad de segundo orden aproximadamente $10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

En el contexto de la invención, se afirma que un polipéptido tiene "actividad de O⁶-alquilguanina-ADN alquiltransferasa" (o "actividad de AGT") si es capaz de transferir irreversiblemente un grupo alquilo desde una molécula que contiene O⁶-alquilguanina a uno de sus propios restos de cisteína. La "actividad de O⁶-alquilguanina-ADN alquiltransferasa" del mencionado polipéptido se puede demostrar, por ejemplo, poniendo en contacto derivados de O⁶-bencilguanina marcados conocidos y monitorizando la transferencia de dicho marcador sobre el polipéptido ensayado. Si el ensayo se lleva a cabo en una célula o en extractos celulares, la reacción de la AGT endógena de las células hospedantes se debería de controlar, de manera que la AGT endógena no interfiera con el mencionado polipéptido. Por lo tanto, preferentemente se usan estirpes celulares conocidas deficientes en AGT. A continuación se describirán bien los ensayos para identificar la actividad de AGT. Existen comercialmente disponibles varios derivados de O⁶-bencilguanina (la O⁶-bencilguanina es distribuida, por ejemplo, por Santa Cruz biotechnology, y los derivados de O⁶-bencilguanina marcados fluorescentemente se pueden obtener de New England Biolabs NEB). Algunos de estos ensayos se describen en los documentos WO 2005/085470 y WO 2004/031405.

En el contexto de la invención, el "dominio catalítico" del polipéptido de AGT corresponde al sitio activo de dicha enzima, o, en otras palabras, a la parte de la enzima en la que se produce la transferencia del grupo alquilo desde su sustrato, O⁶-alquilguanina-ADN, a un resto de cisteína reactivo. En la estructura de hAGT unida con O⁶-bencilguanina en su sitio activo, cuatro aminoácidos están en proximidad del anillo bencílico (Pro140, Ser159, Gly160), o podrían hacer contacto con el N9 de la nucleobase (Asn157). Se ha demostrado previamente que las mutaciones en la posición Pro140 y Gly160 afectan a la reacción de hAGT con O⁶-bencilguanina (Xu-Welliver et al., Biochemical Pharmacology 1999): se cree que una prolina en la posición 140 es esencial para su interacción con el anillo bencílico, y se ha mostrado que la mutación Gly160Trp incrementa la reactividad de hAGT frente a O⁶-bencilguanina.

En una forma de realización preferida, el polipéptido de AGT que tiene actividad de O⁶-alquilguanina-ADN alquiltransferasa es el polipéptido de AGT humano (citado como NP_002403.2) de secuencia SEC ID NO: 1, la AGT de ratón identificada como NP_032624.1 (SEC ID NO: 18), la MGMT de rata identificada como NP_036993.1 (SEC ID NO: 19) o una secuencia homóloga de la misma, teniendo dicha secuencia homóloga actividad de O⁶-alquilguanina-ADN alquiltransferasa.

Como se usa en la presente memoria, el término "homólogo" se refiere a secuencias que tienen similitud de secuencia. La expresión "similitud de secuencia", en todas sus formas gramaticales, se refiere al grado de identidad o correspondencia entre secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos. En el contexto de la invención, dos secuencias de aminoácidos son "homólogas" cuando por lo menos aproximadamente 80%, alternativamente por lo menos aproximadamente 81%, alternativamente por lo menos aproximadamente 82%, alternativamente por lo menos aproximadamente 83%, alternativamente por lo menos aproximadamente 84%, alternativamente por lo menos aproximadamente 85%, alternativamente por lo menos aproximadamente 86%, alternativamente por lo menos aproximadamente 87%, alternativamente por lo menos aproximadamente 88%, alternativamente por lo menos aproximadamente 89%, alternativamente por lo menos aproximadamente 90%, alternativamente por lo menos aproximadamente 91%, alternativamente por lo menos aproximadamente 92%, alternativamente por lo menos aproximadamente 93%, alternativamente por lo menos aproximadamente 94%, alternativamente por lo menos aproximadamente 95%, alternativamente por lo menos aproximadamente 96%, alternativamente por lo menos aproximadamente 97%, alternativamente por lo menos aproximadamente 98%, alternativamente por lo menos aproximadamente 99% de los aminoácidos son similares. Preferentemente, las secuencias polipeptídicas similares u homólogas se identifican usando el algoritmo de Needleman y Wunsch.

Preferentemente, la secuencia homóloga a la enzima AGT comparte por lo menos 64% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente por lo menos aproximadamente 65% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente 66% de identidad de secuencia de aminoácidos,

alternativamente por lo menos aproximadamente 67% de identidad de secuencia de aminoácidos,
 5 alternativamente por lo menos aproximadamente 68% de identidad de secuencia de aminoácidos,
 alternativamente por lo menos aproximadamente 69% de identidad de secuencia de aminoácidos,
 alternativamente por lo menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia de aminoácidos,
 alternativamente por lo menos aproximadamente 71% de identidad de secuencia de aminoácidos,
 alternativamente por lo menos aproximadamente 72% de identidad de secuencia de aminoácidos,
 alternativamente por lo menos aproximadamente 73% de identidad de secuencia de aminoácidos,
 10 alternativamente por lo menos aproximadamente 74% de identidad de secuencia de aminoácidos,
 alternativamente por lo menos aproximadamente 75% de identidad de secuencia de aminoácidos,
 alternativamente por lo menos aproximadamente 76% de identidad de secuencia de aminoácidos,
 alternativamente por lo menos aproximadamente 77% de identidad de secuencia de aminoácidos,
 alternativamente por lo menos aproximadamente 78% de identidad de secuencia de aminoácidos,
 alternativamente por lo menos aproximadamente 79% de identidad de secuencia de aminoácidos,
 15 alternativamente por lo menos 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 aproximadamente 81% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 aproximadamente 82% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 aproximadamente 83% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 aproximadamente 84% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 20 aproximadamente 85% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 aproximadamente 86% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 aproximadamente 87% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 aproximadamente 88% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 aproximadamente 89% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 25 aproximadamente 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 aproximadamente 91% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 aproximadamente 92% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 aproximadamente 93% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 aproximadamente 94% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 30 aproximadamente 95% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 aproximadamente 96% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 aproximadamente 97% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos
 aproximadamente 98% de identidad de secuencia de aminoácidos, y alternativamente por lo menos
 35 aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEC ID NO: 1. En una forma de
 realización preferida, una secuencia homóloga de SEC ID NO: 1 es por lo menos 64%, preferentemente 70%, y
 más preferentemente 80% idéntica a SEC ID NO: 1.

En una forma de realización preferida, el mencionado polipéptido homólogo es un fragmento o un mutante del
 40 polipéptido de hAGT de SEC ID NO: 1, teniendo dicho fragmento o mutante una actividad de O⁶-alquilguanina-
 ADN alquiltransferasa.

Dichos fragmentos pueden tener un tamaño de por lo menos 50, preferentemente 100, y más preferentemente
 150 aminoácidos, y contienen por lo menos el "dominio catalítico" del polipéptido de AGT como se define
 anteriormente, que es responsable de la actividad de O⁶-alquilguanina-ADN alquiltransferasa de la enzima AGT.
 45 Estos fragmentos se pueden obtener usando técnicas habituales que son conocidas por el experto en la materia.

Hasta ahora se han descrito diferentes enzimas mutantes derivadas de AGT nativa (Lim A. et al, 1996; Daniels
 D.S. et al, 2000; Juillerat A. et al, 2003, documentos WO 2005/085470, WO 2004/031405). En particular, se ha
 obtenido una proteína mutante de 20 kDa que contiene las mutaciones Cys62Ala, Lys125Ala, Ala127Thr,
 Arg128Ala, Gly131Lys, Gly132Thr, Met134Leu, Arg135Ser, Cys150Ser, Asn157Gly, Ser159Glu truncada en el
 50 aminoácido 182 (el denominado mutante "AGT26" en el documento WO 2005/085470, también denominado
 "SNAP 26" en el documento WO 2006/114409). Se ha mostrado que este mutante particular "SNAP26" tiene
 actividad marcadora potenciada.

En el contexto de la presente invención, la secuencia de un polipéptido de AGT más preferido contiene las
 55 mutaciones descritas en el documento WO 2005/085470, cuyas posiciones se pueden transponer a la vista de
 SEC ID NO: 1, correspondiendo el resto de metionina de partida de SNAP26 al resto de metionina en la posición
 32 de SEC ID NO: 1 (por lo tanto, se deberían añadir 31 aminoácidos a las posiciones descritas en el documento
 WO 2005/085470 para obtener las correspondientes en SEC ID NO: 1.

En una forma de realización preferida, la secuencia homóloga de AGT útil en la invención corresponde a la
 60 secuencia de AGT nativa de SEC ID NO: 1, en la que se sustituyen entre 1 y 30, preferentemente entre 6 y 25, y
 en particular 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23 aminoácidos por otros aminoácidos, y/o se eliminan 1 a 40,
 preferentemente 1 a 20, en particular 10 a 20 aminoácidos, más preferentemente 15 aminoácidos, en el término
 C.

En una forma de realización más preferida, la secuencia homóloga de AGT contiene las siguientes mutaciones

según se compara con SEC ID NO: 1:

- 5 (A) Lys31 sustituida por Arg, o Met32 sustituida por Ser, o Cys93 sustituida por Ala, o Lys156 sustituida por Ala, o Ala158 sustituida por Thr, o Arg159 sustituida por Ala, o Ugly162 sustituida por Lys, o Gly163 sustituida por Thr, o Met165 sustituida por Leu, o Arg166 sustituida por Ser, o Cys181 sustituida por Ser, o Asn188 sustituida por Gly, o Ser190 sustituida por Glu, o Gly214 sustituida por Pro, o Ser215 sustituida por Ala, o Ser216 sustituida por Gly, o Gly217 sustituida por Ile, o Leu218 sustituida por Gly, o Gly220 sustituida por Pro, o Ala221 sustituida por Gly, o Trp222 sustituida por Ser, o
- 10 (B) Lys31-Met32 sustituidas por Arg-Ser, o Ala158-Arg159 sustituidas por Thr-Ala, o Gly162-Gly163 sustituidas por Lys-Thr, o Met165-Arg166 sustituidas por Leu-Ser, o Gly162-Gly163/Met165-Arg166 sustituidas por Lys-Thr/Leu-Ser, o Asn188/Ser190 sustituidas por Gly/Glu, o Gly214-Ser215-Ser216-Gly217-Leu218 sustituidas por Pro-Ala-Gly-Ile-Gly, o Gly220-Ala221-Trp222 sustituidas por Pro-Gly-Ser, preferentemente en combinación con cualesquiera otras sustituciones de aminoácidos citadas en (A), o
- 15 (C) Truncamiento después de Leu223 (se suprimen los aminoácidos 224-238), preferentemente en combinación con cualquier otra sustitución de aminoácidos citada en (A) o (B).

20 Las secuencias homólogas de AGT preferidas son aquellas que están truncadas después de Leu223.

Las secuencias homólogas de AGT preferidas son aquellas en las que están presentes dos de las modificaciones (B), y opcionalmente están truncadas después de Leu223.

25 Las secuencias homólogas de AGT preferidas son aquellas en las que están presentes tres de las modificaciones (B), y opcionalmente están truncadas después de Leu223.

Las secuencias homólogas de AGT preferidas son aquellas en las que están presentes cuatro de las modificaciones (B), y opcionalmente están truncadas después de Leu223.

30 Las secuencias homólogas de AGT preferidas son aquellas en las que están presentes cinco de las modificaciones (B), y opcionalmente están truncadas después de Leu223.

35 Las secuencias homólogas de AGT preferidas son aquellas en las que están presentes seis de las modificaciones (B), y opcionalmente están truncadas después de Leu223.

Otras secuencias homólogas de AGT preferidas son aquellas que contienen una combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 mutaciones escogidas entre las mutaciones descritas en (A), y opcionalmente que están truncadas después de Leu223.

40 En una forma de realización mucho más preferida, el polipéptido de AGT de la invención es un mutante SNAP de SEC ID NO: 2, que es homólogo a la enzima hAGT y contiene las mutaciones Lys31Arg, Met32Ser, Cys93Ala, Lys156Ala, Ala158Thr, Arg159Ala, Gly162Lys, Gly163Thr, Met165Leu, Arg166Ser, Cys181Ser, Asn188Gly, Ser190Glu, Gly214Pro, Ser215Ala, Ser216Gly, Gly217Ile, Leu218Gly, Gly220Pro, Ala221Gly, Trp222Ser, y un truncamiento después de Leu223 en comparación con SEC ID NO: 1. El mutante SNAP de SEC ID NO: 2

45 comparte un 77% de homología con la secuencia de aminoácidos de 6-metilguanina-ADN-metiltransferasa humana (NP_002403.2, SEC ID NO: 1), y un 70% de homología con la secuencia de aminoácidos de 6-metilguanina-ADN-metiltransferasa de ratón (NP_032624.1, SEC ID NO: 18).

50 En una forma de realización incluso más preferida, la enzima AGT es la proteína mutante SNAP de SEC ID NO: 2 o un homólogo de la misma, que tiene actividad de O⁶-alquilguanina-ADN alquiltransferasa. Preferentemente, dicha secuencia homóloga a la proteína mutante SNAP es por lo menos idéntica en más de 80%, preferentemente 81%, más preferentemente 82%, más preferentemente 83%, más preferentemente 84%, más preferentemente 85%, preferentemente 86%, más preferentemente 87%, más preferentemente 88%, más preferentemente 89%, más preferentemente 90%, más preferentemente 91%, más preferentemente 92%, más

55 preferentemente 93%, más preferentemente 94%, más preferentemente 95%, más preferentemente 96%, e incluso más preferentemente 97% a la proteína mutante SNAP de SEC ID NO: 2, y tiene actividad de O⁶-alquilguanina-ADN alquiltransferasa como se define anteriormente.

60 Dichos polipéptidos homólogos que tienen actividad de O⁶-alquilguanina-ADN alquiltransferasa se pueden producir usando técnicas de ingeniería genética de proteínas conocidas por el experto en la materia, y/o usando evolución molecular para generar y seleccionar nuevas O⁶-alquilguanina-ADN alquiltransferasas. Tales técnicas son, por ejemplo, mutagénesis dirigida, métodos de presentación de fagos, mutagénesis por saturación, PCR propensa a error para introducir variaciones en cualquier lugar en la secuencia, barajado de ADN, usado tras la mutagénesis por saturación y/o la PCR propensa a error, o el barajado de familias, que usa genes de varias

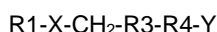
65 especies.

En la forma de realización más preferida, el polipéptido de AGT usado en el método de la invención es el mutante SNAP de SEC ID NO: 2.

5 La enzima AGT transfiere irreversiblemente el grupo alquilo desde su sustrato, O⁶-alquilguanina-ADN, a uno de sus restos de cisteína. Sin embargo, las sustituciones de O⁶-bencilguanina en el C4 del anillo bencílico no afectan significativamente la actividad de AGT frente a derivados de O⁶-bencilguanina. Esta propiedad se ha usado para transferir un marcador unido al C4 del anillo bencílico a AGT (véanse los documentos WO 2004/031404 y WO 2005/085470).

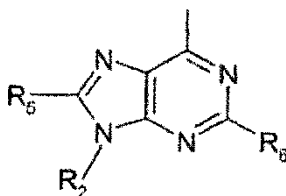
10 Se ha mostrado que un número de derivados de O⁶-bencilguanina reaccionan con la enzima AGT transfiriendo su grupo bencilo a la cisteína del sitio activo de la enzima AGT (véase Damoiseaux et al., ChemBiochem., 2001, documentos WO 2004/031404 y WO 2005/085470).

15 En una forma de realización preferida, los sustratos de AGT usados en el método de la invención son derivados de bencilguanina que tienen la fórmula I:



en la que:

20 - R1 es un grupo reconocido por dicho polipéptido de AGT como sustrato, tal como un grupo heteroaromático que contiene 1 a 5 átomos de nitrógeno, y preferentemente un radical purínico de la fórmula:



25 en la que R5 es hidrógeno, halógeno, por ejemplo cloro o bromo, trifluorometilo, o hidroxilo; R6 es hidrógeno, hidroxilo, o amino no sustituido o sustituido; y R2 es hidrógeno, un alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, o un resto de sacárido;

- 30 - X es un átomo de oxígeno o de azufre; preferentemente un átomo de oxígeno;
- R3 es un grupo aromático o heteroaromático, o un grupo alquilo, cicloalquilo o heterociclilo insaturado opcionalmente sustituido, con el doble enlace conectado a CH₂; preferentemente un fenilo, por ejemplo un fenilo sustituido mediante R4 en posición para o meta,
- 35 - R4 es un resto enlazador,
- Y es un grupo reactivo, preferentemente un grupo amino.

40 En una forma de realización preferida, dicho resto enlazador R₄ es un enlazador flexible. Las unidades enlazadoras se escogen en el contexto de la aplicación ideada, es decir, en la transferencia del sustrato a una proteína de fusión que contiene AGT. El enlazador no interfiere con la reacción con AGT ni con el anticuerpo diana.

45 Por ejemplo, puede ser un grupo alquilenno de cadena lineal o ramificada con 1 a 20 átomos de carbono, preferentemente 5 a 15 átomos de carbono, en el que:

- 50 (a) uno o más átomos de carbono están sustituidos por oxígeno, en particular en el que cada tercer átomo de carbono está sustituido por oxígeno, por ejemplo un grupo polietilenoxi con 1 a 5 unidades etilenoxi;
- (b) uno o más átomos de carbono están sustituidos por nitrógeno que porta un átomo de hidrógeno, y los átomos de carbono adyacentes están sustituidos por oxo, representando una función amida -NH-CO-;
- 55 (c) uno o más átomos de carbono están sustituidos por oxígeno, y los átomos de carbono adyacentes están sustituidos por oxo, representando una función éster -O-CO-;
- (d) el enlace entre dos átomos de carbono adyacentes es un doble o un triple enlace, representando una función -CH=CH- o -C≡C-;

60

(e) uno o más átomos de carbono están sustituidos por un fenileno, un cicloalquileo saturado o insaturado, un bicicloalquileo saturado o insaturado, un grupo heteroaromático que forma puente o un grupo heterocíclico saturado o insaturado que forma puente;

5 (f) dos átomos de carbono adyacentes están sustituidos por un enlace de disulfuro -S-S-; o una combinación de dos o más, especialmente dos o tres, grupos alquileo y/o alquileo modificado como se define en (a) a (f) en la presente memoria anteriormente, que contiene opcionalmente sustituyentes.

10 Los sustituyentes considerados son, por ejemplo, alquilo inferior, por ejemplo metilo, alcoxi inferior, por ejemplo metoxi, aciloxi inferior, por ejemplo acetoxi, o halogenilo, por ejemplo cloro.

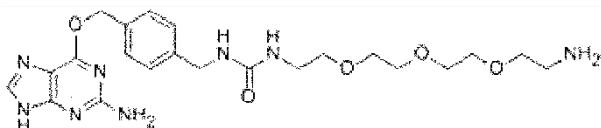
15 En una forma de realización preferida, R4 es un grupo polietileno con 1 a 8 unidades etileno, que comprende además uno a cuatro átomos de nitrógeno que portan un átomo de hidrógeno, cuyos átomos de carbono adyacentes están sustituidos por oxo, representando una función amida -NH-CO-.

En una forma de realización más preferida, R4 es $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-NH-}[\text{C}_2\text{H}_4\text{-O}]_n-$, en el que n está comprendido entre 1 y 8, preferentemente 2 y 6, y es muy preferentemente 3.

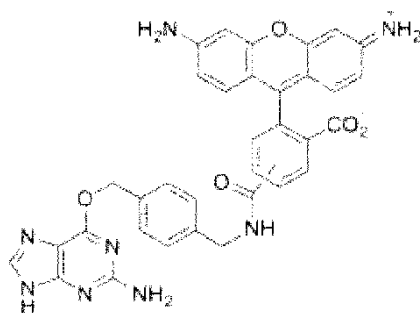
20 En una forma de realización preferida, dicho grupo reactivo es un grupo funcional que facilita la unión y el enlace del sustrato en el soporte sólido. Tales grupos funcionales son bien conocidos en la técnica. Incluyen amina, ésteres activados, acrilamidas, azidas de acilo, haluros de acilo, nitrilos de acilo, aldehídos, cetonas, haluros de alquilo, anhídridos, haluros de arilo, aziridinas, boronatos, ácidos carboxílicos activados, carbodiimidas, diazoalcanos, epóxidos, haloacetamidas, haloplatinato, halotriazinas, imidoésteres, isocianatos, isotiocianatos, maleimidas, fosforamiditos, haluros de sililo, ésteres de sulfonato y haluros de sulfonilo. preferentemente es el grupo amina -NH₂.

25 En el lado opuesto, el soporte sólido se debería funcionalizar mediante grupos complementarios que corresponden a tales grupos reactivos. Los grupos complementarios que corresponden a cada uno de estos grupos reactivos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se proporcionan en la tabla I del documento WO 2010/107433.

En una forma de realización preferida, el sustrato de AGT usado en el método de la invención es:



35 En otra forma de realización preferida, el sustrato de AGT usado en el método de la invención es el enlazador fluorescente denominado "SNAP-cell® 505", que tiene la siguiente fórmula:



40 Estos derivados de bencilguanina poseen un grupo bencilpurínico (guanina) para la interacción específica con el dominio SNAP, así como un grupo amina libre para el acoplamiento covalente a la superficie de las microesferas. Está comercializado por New England BioLabs, y se ha acoplado con éxito a la superficie de las micropartículas de la invención.

45 Los sustratos de la invención se preparan generalmente mediante métodos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, en la solicitud de patente WO 2005/085470 se explican métodos particulares.

50 Los métodos de la invención requieren que los sustratos de AGT se acoplen covalentemente a los soportes sólidos. En el contexto de la presente invención, un sustrato de AGT se "acopla covalentemente" a un soporte sólido si está unido permanentemente a dicho soporte sólido, y no se desorberá o lixiviará con el tiempo. Según la invención, un sustrato de AGT se une permanentemente al mencionado soporte sólido si permanece unido

durante un período prolongado de almacenamiento, por ejemplo, típicamente, por lo menos 6 meses de almacenamiento. Hasta ahora se ha descrito un número de procedimientos de acoplamiento. En el inmunoensayo de la invención se puede usar cualquiera de estos procedimientos de acoplamiento, con la condición de que el sustrato de AGT se una permanentemente al soporte sólido.

En el inmunoensayo de la invención, el acoplamiento covalente se lleva a cabo preferentemente poniendo en contacto los sustratos de AGT (que contienen un grupo reactivo Y, como se menciona anteriormente) con soportes sólidos que se han funcionalizado previamente con un grupo complementario tal como los descritos en la tabla I del documento WO 2010/107433.

De este modo, en una forma de realización preferida, los métodos de la invención usan soportes sólidos que se han funcionalizado con un grupo que es complementario al grupo reactivo del sustrato de AGT, antes de ponerlos en contacto con el sustrato de AGT.

Un procedimiento convencional y preferido para acoplar covalentemente un sustrato de AGT a las superficies de soportes sólidos se basa en la reacción de carbodiimida, y usa carbodiimida soluble en agua. Según este procedimiento, los soportes sólidos tienen grupos carboxilo en la superficie disponibles para la unión del sustrato de AGT reactivo que contiene amina o sulfhidrilo. De este modo, en esta forma de realización preferida, los métodos de la invención usan soportes sólidos que se han funcionalizado con grupos carboxilo de la superficie antes de ponerlos en contacto con el sustrato de AGT.

En este caso, la primera etapa del método de la invención es activar los grupos carboxilo que revisten los soportes sólidos. Esta activación se lleva a cabo habitualmente añadiendo un denominado "amortiguador de activación", por ejemplo una disolución de EDAC 50 mg/ml o una disolución de S-NHS 50 mg/ml. Estas disoluciones están comercialmente disponibles. La activación de los soportes sólidos se lleva a cabo típicamente incubando dichos soportes con el amortiguador de activación a temperatura ambiente durante unos pocos minutos (por ejemplo, 5 minutos a 30 minutos), según las instrucciones del fabricante.

De forma importante, el acoplamiento covalente del sustrato de AGT al soporte sólido se ha de llevar a cabo en condiciones particulares, para preservar la solubilidad del sustrato de AGT y la integridad de la perla (fluorocromo interno). Los inventores han observado que los sustratos de AGT deberían de suspenderse en un amortiguador de "acoplamiento covalente" que contiene entre 0 y 20% de dimetilsulfóxido (DMSO). En particular, los inventores han observado que concentraciones de DMSO por encima de 20% pueden afectar a la etapa de detección de los métodos de la invención. Preferentemente, dicho amortiguador es un amortiguador de PBS que contiene entre 0 y 20% de DMSO, más preferentemente entre 10% y 20% de DMSO.

Ventajosamente, los sitios inespecíficos en los soportes sólidos que no se han unido covalentemente al sustrato de AGT se pueden bloquear adicionalmente por cualquier medio convencional, por ejemplo usando un amortiguador de bloqueo que contiene 1% de seroalbúmina bovina (BSA) o cualquier proteína saturante (por ejemplo caseína).

Una vez que los soportes sólidos de la invención se han acoplado covalentemente con el sustrato de AGT (preferentemente a través de un enlace covalente de carbodiimida), los soportes sólidos se ponen entonces en contacto con las proteínas de fusión de la invención, para acoplar los epítomos que son reconocidos específicamente por los anticuerpos diana a dichos soportes.

Nuevamente, esta etapa de acoplamiento se ha de llevar a cabo en condiciones particulares, de hecho, el sitio catalítico de la enzima AGT, y la estructura conformacional de los antígenos/epítomos que son portados por las proteínas de fusión, se han de conservar durante los procedimientos de acoplamiento. Los inventores identificaron que la proteína de fusión debería de suspenderse en un amortiguador que contiene ditioneitol (DTT), preferentemente un amortiguador de PBS/DTT, para que el acoplamiento sea eficiente. Ventajosamente, el mencionado amortiguador de acoplamiento contiene tween 20; de hecho, se ha observado por los presentes inventores que la adición de tween 20 al medio de acoplamiento ayuda a evitar la agregación de las perlas. Preferentemente, el amortiguador de acoplamiento contiene 0,02% de tween 20. Más preferentemente, el amortiguador de acoplamiento covalente de la invención es un amortiguador de PBS de pH 7,4, que contiene 0,2% de tween 20, y 1 mM de DTT.

Otras condiciones de acoplamiento son las habituales. Preferentemente, el acoplamiento covalente del sustrato de AGT y el acoplamiento de la proteína de fusión a los soportes sólidos se llevan a cabo a temperatura ambiente. Si los soportes sólidos están marcados fluorescentemente, dichos procedimientos se llevan a cabo más preferentemente en la oscuridad.

La presente solicitud describe un método para acoplar covalentemente un polipéptido de AGT, que tiene actividad de O⁶-alquilguanina-ADN alquiltransferasa, sobre un soporte sólido funcionalizado, que comprende las siguientes etapas:

- a) activar el mencionado soporte sólido funcionalizado,
- b) añadir un sustrato de dicho polipéptido de AGT, suspendiéndose dicho sustrato en un amortiguador que contiene entre 0 y 20% de DMSO, en condiciones apropiadas de manera que el sustrato se una covalentemente a dicho soporte,
- c) poner en contacto el mencionado polipéptido de AGT con el soporte revestido con sustrato de la etapa b) en un amortiguador de PBS/DTT,

en el que las moléculas no unidas se eliminan por lavado tras las etapas b) y c).

Los lavados se pueden llevar a cabo usando cualquier tipo de amortiguadores de lavado apropiados. Tales amortiguadores se usan normalmente por el experto en la materia, y no necesita detallarse adicionalmente en la presente memoria. Preferentemente, se usa un amortiguador de PBS.

Como se usa en la presente memoria, las "condiciones apropiadas" son las habituales. Preferentemente, el acoplamiento covalente del sustrato de AGT se lleva a cabo a temperatura ambiente y, si los soportes sólidos están marcados fluorescentemente, en la oscuridad.

La funcionalización del soporte sólido se puede llevar a cabo por cualquier medio convencional (como los recordados anteriormente). La activación de dicho soporte sólido funcionalizado se lleva a cabo consecuentemente. En una forma de realización preferida, los mencionados soportes sólidos se funcionalizan con grupos carboxilo superficiales, y se activan adicionalmente con un amortiguador de activación clásico, por ejemplo una disolución de EDAC 50 mg/ml o una disolución de S-NHS 50 mg/ml.

En una forma de realización preferida, DTT está a una concentración de 1 mM en el amortiguador de PBS/DTT.

La presente solicitud describe un soporte sólido que se ha obtenido mediante el mencionado método, y al uso de dicho soporte sólido en el inmunoensayo de la invención.

Los mencionados soportes sólidos se pueden almacenar entonces en amortiguadores de almacenamiento convencionales, por ejemplo que contienen 0,5 g/l de azida sódica, 0,1% de BSA, 0,02% de tween 20, y/o 1 mM de DTT.

Todas estas etapas de acoplamiento se llevan a cabo preferentemente *in vitro*, en amortiguadores que están desprovistos de células vivas, de manera que no es necesario tener en cuenta la reacción con enzimas AGT endógenas, y por lo tanto la reacción de la proteína de fusión de AGT (exógena) es muy específica.

Los soportes sólidos que se pueden usar en los métodos de la invención pueden ser de cualquier tipo, por ejemplo tubos de ensayo, pocillos de microtitulación, láminas, perlas, chips, y/o micropartículas, con la condición de que se puedan identificar específicamente entre sí. Tal identificación es posible, por ejemplo, cuando están situados espacialmente de forma separada (por ejemplo, los pocillos en una placa de microtitulación, o diferentes localizaciones en un chip), o cuando están marcados de forma diferente. Por lo tanto, un "soporte sólido" se ha de entender en un significado amplio, es decir, designando partes pequeñas discretas de un soporte sólido completo (en el caso de una placa o un biochip), o un gran número de micropartículas idénticas que comparten características detectables comunes (en adelante denominado en la presente memoria como "subconjunto") de micropartículas.

En una forma de realización preferida, los soportes sólidos usados en esta invención se pueden identificar específicamente por su localización específica, tamaño, diámetro, peso, granulometría, y/o marcaje. Tal marcaje es, por ejemplo, un fluorocromo, un fluoróforo, un cromóforo, un radioisótopo, una etiqueta másica, o cualquier tipo de etiqueta detectable que sea conocida en la técnica.

Los soportes sólidos usados en la invención pueden estar hechos de cualquier material, por ejemplo en poliestireno, celulosa, nitrocelulosa, vidrio, cerámica, resina, caucho, plástico, sílice, silicona, metal, y/o polímero. Los materiales poliméricos incluyen poliestireno bromado, poliácido acrílico, poliacrilonitrilo, poliamida, poliácilamida, poliácroleína, polibutadieno, policaprolactona, policarbonato, poliéster, polietileno, politereftalato de etileno, polidimetilsiloxano, poliisopreno, poliuretano, poliacetato de vinilo, policloruro de vinilo, polivinilpiridina, policloruro de vinilbenceno, poliviniltolueno, policloruro de vinilideno, polidivinilbenceno, polimetacrilato de metilo, polilactida, poliglicolida, poli(lactida-co-glicolida), polianhídrido, poliortoéster, polifosfaceno, polifosfozono, polisulfona, o combinaciones de los mismos, que son asimismo aceptables. La mayoría de estos soportes están comercialmente disponibles. Por ejemplo, las perlas de polímeros sintéticos tales como poliestireno, poliácilamida, poliácilato, o látex, están comercialmente disponibles de numerosas fuentes, tales como Bio-Rad Laboratories (Richmond, Calif.) y LKB Produkter (Estocolmo, Suecia). Las perlas formadas de macromoléculas naturales y partículas tales como agarosa, agarosa reticulada, globulina, ácido desoxirribonucleico, y liposomas, están comercialmente disponibles de fuentes tales como Bio-Rad Laboratories, Pharmacia (Piscataway, NJ), e

IBF (Francia). Las perlas formadas de copolímeros de poliacrilamida y agarosa están comercialmente disponibles de fuentes tales como IBF y Pharmacia.

5 Cuando se usan soportes poliméricos, se pueden añadir grupos carboxilo a la superficie del soporte sólido incorporando en los polímeros monómeros que contienen tales grupos (por ejemplo, ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido itacónico, y similares). Alternativamente, se pueden añadir al soporte mediante reacción química adicional de un polímero que tiene otros grupos reactivos precursores que se pueden convertir en grupos carboxilo (por ejemplo, mediante hidrólisis de anhídridos, tal como anhídrido maleico, o mediante oxidación de grupos terminales metilol o aldehído superficiales), como ya se ha descrito.

10 En una forma de realización preferida, los soportes sólidos usados en la invención son micropartículas. Dichas micropartículas tienen preferentemente un diámetro menor que 1 mm, preferentemente un diámetro que oscila de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1.000 micrómetros (μm). Incluso aunque las micropartículas pueden tener cualquier tamaño, el tamaño preferido es 1-100 μm , más preferentemente 2-50 μm , más preferentemente 3-25 μm , e incluso más preferentemente aproximadamente 6-12 μm . Las micropartículas están hechas de cualquier material conformado regularmente. La forma preferida es esférica; sin embargo, se pueden emplear partículas de cualquier otra forma, puesto que este parámetro es inmaterial para la naturaleza de la invención. La forma de la partícula puede servir como un parámetro de distinción adicional, que es discriminado por citometría de flujo, por ejemplo mediante un método de barrido por ranura de alta resolución.

20 Como se usa en la presente memoria en adelante, los términos "micropartículas", "microesferas", o "microperlas" se usan de forma intercambiable, y poseen significados equivalentes ya que se refieren a pequeñas partículas con un diámetro global que cae esencialmente en el intervalo micrométrico. Los términos "nanoesferas", "nanopartículas", o "nanoperlas" se refieren a partículas más pequeñas con un tamaño global que cae esencialmente en el intervalo nanométrico. Como se usa en la presente memoria en adelante, el término general partículas, esferas, o "perlas", se refiere tanto a micropartículas como a nanopartículas, que pueden servir eficazmente como soportes sólidos en los métodos de la invención.

30 En el contexto de la presente invención, un "subconjunto" de micropartículas corresponde a numerosas micropartículas idénticas que tienen las mismas características y que se han revestido con el mismo epítipo. De forma importante, cada subconjunto de micropartículas debe ser distinguible de otros subconjuntos de la población en por lo menos una característica (por ejemplo, localización, tamaño, diámetro, peso, granulometría, y/o marcaje).

35 En una forma de realización preferida, los diferentes subconjuntos de micropartículas se pueden distinguir ya que están marcados de forma diferente (por ejemplo, con un fluorocromo, un fluoróforo, un cromóforo, un radioisótopo, una etiqueta másica, o cualquier tipo de etiqueta detectable que sea conocida en la técnica).

40 En una forma de realización más preferida, los diferentes subconjuntos de micropartículas se pueden distinguir ya que están marcados fluorescentemente de forma diferente, como se propone en las patentes US nº 5.736.330, US nº 5.981.180, US nº 6.057.107, US nº 6.268.222, US nº 6.449.562, US nº 6.514.295, US nº 6.524.793 y US nº 6.528.165. De forma más precisa, estos diferentes subconjuntos se pueden colorear con diferentes colorantes fluorescentes, y/o con diferentes concentraciones de uno o más colorantes fluorescentes. Como tal, los diferentes subconjuntos pueden tener diferentes naturas fluorescentes (por ejemplo, diferente longitud o longitudes de onda fluorescente, diferentes intensidades fluorescentes, etc.), que se pueden medir y se pueden usar mediante un sistema de medida para determinar el subconjunto al que pertenecen las micropartículas individuales (es decir, para clasificar las micropartículas según el subconjunto).

50 En una forma de realización preferida, las micropartículas usadas en la invención están marcadas internamente con colorantes fluorescentes, como se propone en el documento EP 1204869.

55 Estas micropartículas pueden incorporar también un imán u óxidos metálicos magnéticamente sensibles seleccionados del grupo que consiste en óxido metálico superparamagnético, paramagnético, y ferromagnético. Las perlas magnéticas están disponibles comercialmente, por ejemplo, de fuentes tales como Dynal Inc. (Great Neck, NY), o se pueden preparar usando métodos conocidos en la técnica como se describen, por ejemplo, en las patentes US nº 4.358.388; US nº 4.654.267; US nº 4.774.265; US nº 5.320.944; y US nº 5.356.713. En una forma de realización preferida, los soportes sólidos usados en la invención son por lo tanto magnéticos.

60 En una forma de realización más preferida, los soportes sólidos usados en la invención son micropartículas marcadas internamente con colorantes fluorescentes con magnetita encapsulada en un revestimiento exterior polimérico funcional que contiene grupos carboxilo superficiales para el acoplamiento covalente de ligandos, tales como las comercializadas por Luminex Corp con el nombre comercial MagPlex.

65 También es posible usar microesferas MicroPlex (vendidas por Luminex) que son micropartículas de poliestireno carboxilado que se han codificado por colores en regiones espectralmente distintas. Estas regiones se pueden distinguir rápidamente mediante un instrumento xMAP, que permite interrogar hasta 100 analitos diferentes

simultáneamente a partir de un volumen de una sola muestra.

También es posible usar microesferas SeroMAP (vendidas por Luminex), que son una formulación especial de microesferas MicroPlex que se han optimizado para reducir la unión no específica en ensayos serológicos.

La última etapa del método de la invención consiste en detectar la presencia de los anticuerpos que se unen a los epítomos, y por lo tanto al soporte sólido detectable. Analizando a qué subconjunto de micropartículas se unen los anticuerpos, se inferirá fácilmente qué anticuerpos estaban presentes en la muestra biológica, y por lo tanto mediante cuál patógeno estaba infectado el sujeto ensayado.

Para detectar la presencia de los anticuerpos que se unen a los soportes sólidos, se puede usar cualquier tecnología conocida. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos secundarios marcados que reconocen específicamente la parte constante de las inmunoglobulinas del sujeto, como se muestra en la parte experimental a continuación. Es importante señalar que el marcaje de los anticuerpos detectores debería ser diferente del del soporte sólido, para distinguir entre los soportes sólidos que están acoplados a los anticuerpos, y aquellos que no lo están.

Alternativamente, las inmunoglobulinas presentes en sueros de animales o seres humanos infectados se pueden conjugar directamente a R-ficoeritrina (R-PE), usando un protocolo de marcaje de anticuerpos de una etapa (Kit de Conjugación de R-ficoeritrina Lightning-Link™ - Innova Biosciences). El tiempo invertido para todo el procedimiento es habitualmente 20-30 segundos, y permite el marcaje de pequeñas cantidades de inmunoglobulinas con una recuperación del 100%. Este procedimiento elimina la necesidad de reactivos secundarios, tales como anticuerpos conjugados anti-especies y estreptavidina-R-ficoeritrina, en experimentos de inmunoensayos múltiplex.

Cuando se usan micropartículas marcadas internamente con colorantes fluorescentes, el instrumento de detección fluorescente debería estar equipado con un primer láser para detectar el tipo de microesfera, y un segundo láser para asegurar la cuantificación del IgM o IgG capturado al excitar el fluoróforo que está conjugado con el anticuerpo de detección específico.

Con sus capacidades multiplexadoras amplias y un límite más bajo de detección, este enfoque ofrece ahorros sustanciales de coste y de muestra con respecto a las medidas de ELISA tradicionales.

Además, los conjuntos seleccionados de microesferas son adaptables a un sistema de detección fluorescente asequible, compacto, y robusto, tal como el MagPix (Luminex Corporation).

En esta forma de realización, el método de la invención hace posible analizar simultáneamente hasta 100 tipos de microesferas acopladas por pocillo usando una herramienta de análisis de flujo, y produce una sensibilidad enormemente mejorada, que se espera que esté del orden de varios órdenes de magnitud mayor que el de los sistemas y métodos usados actualmente.

De forma interesante, el método de la invención permite llevar a cabo un cribado serológico de alto rendimiento para diagnosticar múltiples infecciones en un individuo, ya sea un ser humano o un animal.

La presente solicitud describe un kit que es adecuado para uso en la detección de anticuerpos según el método de la invención.

El kit comprende por lo menos dos soportes sólidos como se define anteriormente, más precisamente:

- un primer soporte sólido como se obtiene en la etapa (c) del método de la invención, estando acoplado covalentemente dicho soporte con un primer epítomo que es reconocido por un primer anticuerpo diana, y
- un segundo soporte sólido como se obtiene en la etapa (f) del método de la invención, estando acoplado covalentemente dicho soporte con un segundo epítomo que es reconocido por un segundo anticuerpo diana, y no por dicho primer anticuerpo diana,

en el que los por lo menos dos soportes sólidos se pueden identificar específicamente entre sí y permitir detectar dos anticuerpos diana diferentes.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de un kit para la detección de por lo menos dos anticuerpos diana en una muestra biológica, comprendiendo dicho kit:

- (a) un primer soporte sólido que comprende un sustrato de AGT acoplado covalentemente a una primera proteína de fusión que comprende un polipéptido de AGT que tiene actividad de O6-alquilguanina-ADN alquiltransferasa y un primer epítomo que es reconocido por un primer anticuerpo diana; y

- b) un segundo soporte sólido que comprende un sustrato de AGT acoplado covalentemente a una segunda proteína de fusión que comprende un polipéptido de AGT que tiene actividad de O6-alquilguanina-ADN alquiltransferasa y un segundo epítipo que es reconocido por un segundo anticuerpo diana, pero no por dicho primer anticuerpo diana.

5

En una forma de realización preferida, dicho primer y/o segundo epítipo está presente en una proteína vírica escogida en el grupo que consiste en: la proteína EDIII del virus 1 del dengue codificada por SEC ID NO:3, la proteína EDIII del virus 2 del dengue codificada por SEC ID NO:4, la proteína EDIII del virus 3 del dengue codificada por SEC ID NO:5, la proteína EDIII del virus del 4 dengue codificada por SEC ID NO:6, la proteína EDIII del virus del Nilo Occidental codificada por SEC ID NO:7, la proteína EDIII del virus de la fiebre amarilla codificada por SEC ID NO:8, la proteína EDIII del virus de la encefalitis japonesa codificada por SEC ID NO:9, la proteína EDIII del virus del Zika codificada por SEC ID NO:10, la proteína EDIII del virus de Wesselbron codificada por SEC ID NO:11, la proteína EDIII del virus de Rocio codificada por SEC ID NO:12, la proteína EDIII del virus de la encefalitis de Murray codificada por SEC ID NO:13, la proteína EDIII del virus de la encefalitis de San Luis codificada por SEC ID NO:14, la proteína EDIII del virus de la encefalitis japonesa de genotipo 1 codificada por SEC ID NO:54, la proteína EDIII del virus de la encefalitis japonesa de genotipo 2 codificada por SEC ID NO:55, la proteína EDIII del virus de la encefalitis japonesa de genotipo 4 codificada por SEC ID NO:56, la proteína EDIII del virus de la encefalitis japonesa de genotipo 5 codificada por SEC ID NO:57, y la proteína EDIII del virus de Rabensburg codificada por SEC ID NO:58, y la proteína vírica de VIH1, de VIH2, del virus de la hepatitis B, del virus de la hepatitis C, del virus de la hepatitis E, del virus del Nilo Occidental y de cepas oncogénicas de HPV tales como HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68.

25

Preferentemente, este kit también contiene los medios para detectar los por lo menos dos anticuerpos diana que están unidos a los soportes sólidos. Tales medios son más preferentemente anticuerpos secundarios que reconocen la parte constante de los anticuerpos diana. Dichos anticuerpos secundarios se pueden marcar, con la condición de que el marcaje no sea el mismo que aquellos que están presentes en el soporte sólido. Sin embargo, es posible usar el mismo marcaje para todos los anticuerpos secundarios que se usan para detectar los anticuerpos unidos a un soporte o a soportes sólidos, puesto que la información referida al patógeno o patógenos infecciosos se da solamente mediante la identificación del soporte sólido que está unido a los anticuerpos.

30

El kit puede contener otros ingredientes que están aceptados como reactivos estándar, tales como un amortiguador de lavado, material de plástico necesario, y similares.

35

En una forma de realización preferida, el kit usado en la invención comprende por lo menos 10, preferentemente por lo menos 50, más preferentemente por lo menos 100 soportes sólidos acoplados diferentemente, siendo dichos soportes sólidos, por ejemplo, subconjuntos de micropartículas como se definen anteriormente.

40

En una forma de realización más preferida, los mencionados soportes sólidos son microesferas, por ejemplo aquellas que están marcadas internamente con un colorante fluorescente con magnetita encapsulada en un revestimiento exterior polimérico funcional que contiene grupos carboxilo superficiales.

45

En otra forma de realización preferida, en el kit usado en la invención, los mencionados soportes sólidos se mezclan juntos en por lo menos un único compartimiento.

50

Ventajosamente, este kit contiene soporte o soportes convencionales, por ejemplo placas de microtitulación, que contienen los diferentes subconjuntos de micropartículas revestidas con antígeno definidos anteriormente. En una forma de realización preferida, los mencionados subconjuntos de micropartículas se mezclan juntos en por lo menos un único compartimiento (por ejemplo, un pocillo o un tubo). Tal dispositivo se describe en la figura 11.

55

El kit también puede contener recipientes (por ejemplo, tubos) que contienen los mencionados subconjuntos de micropartículas revestidas con antígeno.

60

La presente invención se refiere al uso del kit para detectar por lo menos dos, preferentemente por lo menos 10, más preferentemente por lo menos 50, e incluso más preferentemente por lo menos 100 anticuerpos diana en una muestra biológica procedente de un sujeto.

65

En una forma de realización preferida, este kit se usa para detectar por lo menos dos, preferentemente por lo menos 10, y más preferentemente por lo menos 20 anticuerpos diana que se generan con la infección mediante virus o parásitos endémicos de la misma región geográfica. Por ejemplo, este kit podría contener micropartículas que están revestidas con antígenos de virus o parásitos que son específicos de regiones de África, tales como el virus del dengue tipo 1, tipo 2, tipo 3, tipo 4, el virus de la fiebre amarilla, el virus del Nilo Occidental, el virus de Usutu, el virus del Zika, el virus de Wesselsbron, el virus de Shamonda, el virus de la fiebre del Valle del Rift, el virus de Chikungunya, el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, el virus del Ébola, el virus de Marburgo, el virus de Lassa, el virus de la hepatitis C, el virus de la hepatitis E, en Enterovirus 71, *Plasmodium falciparum*, o *Leptospira interrogans*.

La Tabla 1 a continuación describe ejemplos de combinaciones de microesferas acopladas con antígeno que se pueden incluir en este kit dependiendo de la región geográfica para la que está destinado (Asia, Europa, America, Oceanía, o África).

5

Este kit puede contener alternativamente microesferas acopladas a antígeno que permiten el diagnóstico de virus o parásitos que incluyen síntomas específicos (similares a la gripe, encefalitis, o fiebre hemorrágica), o que infectan animales específicos, de manera que se puede adaptar a cada paciente/animal.

10

La Tabla 1 a continuación describe ejemplos de combinaciones de microesferas acopladas a antígeno que se pueden incluir en este kit, dependiendo de los síntomas del paciente o del animal.

Finalmente, los kits que contienen combinaciones de antígenos que se proponen mediante agencias de salud nacionales también están obviamente englobados en la presente invención.

15

En particular, el kit usado en la invención comprende por lo menos dos soportes sólidos revestidos con por lo menos dos proteínas de fusión que se seleccionan en el grupo que consiste en: SEC ID NO:21, SEC ID NO:42, SEC ID NO:49, SEC ID NO:51, SEC ID NO:53, SEC ID NO:60, SEC ID NO:62, SEC ID NO:64, SEC ID NO:66, SEC ID NO:68, SEC ID NO:70, SEC ID NO:72, SEC ID NO:74, SEC ID NO:76, SEC ID NO:78, SEC ID NO:80, SEC ID NO:82, SEC ID NO:84, SEC ID NO:86, SEC ID NO:88, SEC ID NO:90, SEC ID NO:92, SEC ID NO:94, SEC ID NO:96, SEC ID NO:98, SEC ID NO:100, SEC ID NO:102 SEC ID NO:104 SEC ID NO:109 SEC ID NO:111, SEC ID NO:113, SEC ID NO:115, SEC ID NO:117, SEC ID NO:119, SEC ID NO:121, SEC ID NO:123, SEC ID NO:125, SEC ID NO:127, SEC ID NO:129, SEC ID NO:131, SEC ID NO:133, SEC ID NO:135, SEC ID NO:137, SEC ID NO:139, SEC ID NO:141, SEC ID NO:143, SEC ID NO:145, SEC ID NO:147, SEC ID NO:149 y SEC ID NO:151.

20

25

En una forma de realización preferida, el kit usado en la invención contiene una combinación de por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco, por lo menos seis, por lo menos siete, por lo menos ocho, por lo menos nueve, por lo menos diez, por lo menos once, por lo menos doce, por lo menos trece, por lo menos catorce, por lo menos quince, por lo menos dieciséis, por lo menos diecisiete, por lo menos dieciocho, por lo menos diecinueve o por lo menos veinte soportes sólidos revestidos con dichas proteínas de fusión.

30

En una forma de realización más preferida, el kit usado en la invención contiene una combinación de por lo menos cinco soportes sólidos (por ejemplo, subconjuntos de microesferas) que están revestidos con por lo menos cinco proteínas de fusión diferentes que contienen antígenos como se recomienda por la Food and Drug Administration, a saber, antígenos de los virus HBV, HCV, VIH1, VIH2 y del Nilo Occidental.

35

Tabla 1: Combinaciones ventajosas de microesferas acopladas a antígeno a incluir en el kit de la invención

Género	Especie	Abreviatura	Descripción	Panales de microesferas										
				Geográfico				Sindrómico				Veterinario		
Agente				Microesferas acopladas al antígeno				Panales de microesferas						
				África	Asia	Europa	Américas	Oceanía	Similar a la gripe	Encefalitis	Fiebre hemorrágica	Enfermedad bovina	Enfermedad equina	
<i>Flavivirus</i>	Virus del dengue tipo 1	SNAP+ DEN1. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta	X	X	X	X	X	X		X			
	Virus del dengue tipo 2	SNAP+ DEN2. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta	X	X	X	X	X	X		X			
	Virus del dengue tipo 3	SNAP+ DEN3. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta	X	X	X	X	X	X		X			
	Virus del dengue tipo 4	SNAP+ DEN4. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta	X	X	X	X	X	X		X			
	Virus de la fiebre amarilla	SNAP+ YF. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta	X			X		X					
	Virus del Nilo Occidental	5SNAP+ WNV. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta	X	X	X	X	X	X	X			X	
			WNV.prM-sE+SNAP	Forma soluble segregada de la proteína E de cubierta	X	X	X	X	X	X				X
		Virus de Usutu	SNAP+ USU. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta	X		X			X				X
		Virus de la encefalitis japonesa genotipo 3	JE.prM-sE+SNAP	Forma soluble segregada de la proteína E de cubierta		X			X	X				
		Virus de la encefalitis japonesa genotipo 1	SNAP+JE-1. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta		X			X	X				
	Virus de la encefalitis japonesa genotipo 2	SNAP+JE-2. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta		X			X	X					
	Virus de la encefalitis japonesa genotipo 3	SNAP+JE-2. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta		X			X	X					
	Virus de la encefalitis japonesa genotipo 4	SNAP+JE-4. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta		X			X	X					
	Virus de la encefalitis japonesa genotipo 5	SNAP+JE-5. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta		X			X	X					
	Virus de la encefalitis del Valle de Murray	5SNAP+MVE. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta		X			X	X					
	Virus de la encefalitis de Saint-Louis	SNAP+SLE. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta				X		X				X	
	Virus del Zika	SNAP+ZIKV. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta	X				X	X					
	Virus de Wesselsbron	SNAP+WSL. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta	X					X			X		
	Virus de Rocio	SNAP+ROCV. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta				X		X					
	Virus de Rabensburg	SNAP+RabV. EDIII	Dominio III de la proteína E de cubierta			X								
	Flavivirus insectívoro (col. la Timone)	SNAP+Insectflavi. EDII	Dominio III de la proteína E de cubierta			X								

La presente solicitud describe un método para fabricar el kit como se define anteriormente, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 5 (a) proporcionar una primera proteína de fusión que comprende:
- un polipéptido que comprende un primer epítipo que es reconocido por un primer anticuerpo diana, y
 - un polipéptido de AGT que tiene actividad de O6-alquilguanina-ADN alquiltransferasa,
- 10 (b) poner en contacto dicha primera proteína de fusión con un primer soporte sólido, estando acoplado covalentemente dicho soporte con un sustrato de dicho polipéptido de AGT,
- (c) obtener un primer soporte sólido acoplado covalentemente con un primer epítipo que es reconocido por el primer anticuerpo diana,
- 15 (d) proporcionar por lo menos una segunda proteína de fusión que comprende:
- un polipéptido que comprende un segundo epítipo, siendo reconocido dicho segundo epítipo mediante un segundo anticuerpo diana pero no por dicho primer anticuerpo diana, y
 - un polipéptido de AGT que tiene actividad de O6-alquilguanina-ADN alquiltransferasa,
- (e) poner en contacto dicha segunda proteína de fusión con un segundo soporte sólido, estando acoplado covalentemente dicho soporte con un sustrato de dicho polipéptido de AGT,
- 25 (f) obtener un segundo soporte sólido acoplado covalentemente con un segundo epítipo que es reconocido por el segundo anticuerpo diana, pero no por dicho primer anticuerpo diana,

30 en el que por lo menos primer y por lo menos segundo soportes sólidos se pueden identificar específicamente entre sí,

comprendiendo el kit por lo menos dichos soportes primero y segundo.

35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de inmunoensayo de cribado múltiple que comprende por lo menos 2, 25, 50, 96 soportes sólidos como se definen anteriormente, y en el que cada uno de dichos soportes sólidos emite una longitud de onda diferente y distinguible tras la excitación.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de inmunoensayo de cribado múltiple que comprende:

- 40 a) poner en contacto una o varias muestras biológicas con por lo menos 2, 25, 50, 96 soportes sólidos como se definen anteriormente, y en el que cada uno de los soportes sólidos emite una longitud de onda diferente y distinguible tras la excitación, y
- 45 b) detectar la presencia o ausencia de anticuerpos diana.

En una forma de realización preferida, dichos anticuerpos diana son específicos contra antígenos de virus a detectar en un banco de sangre según las directrices de la OMS o de la FDA, tales como, por ejemplo, los virus seleccionados de HBV, HCV, VIH1, VIH2, y WNV.

50 En otra forma de realización preferida, dichos anticuerpos diana son específicos contra cepas oncogénicas de HPV, tales como HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68.

En otra forma de realización preferida, cada uno de dichos anticuerpos diana se marcan con un marcador detectable.

55 La presente solicitud describe un aparato para llevar a cabo el método para fabricar el kit como se define anteriormente, que comprende un dispositivo técnico para detectar las fuentes de luz emitidas desde los soportes sólidos y la fuente de luz emitida desde los anticuerpos diana o anticuerpos marcados que se unen a los anticuerpos diana, y un dispositivo de cálculo u ordenador para identificar qué soportes sólidos están unidos con anticuerpos diana, indicando de ese modo la presencia o ausencia de antígenos, bacterias, virus, o parásitos en la muestra analizada.

60

65 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar por lo menos una enfermedad diana en un sujeto, siendo conocido que dicha enfermedad diana induce la síntesis de por lo menos dos anticuerpos diana en dicho sujeto, que comprende llevar a cabo el método de inmunoensayo de la invención, en el que a dicho sujeto se le diagnostica que sufre de dicha por lo menos una enfermedad diana si la cantidad

de dichos por lo menos dos anticuerpos diana es mayor que un valor de control.

5 Preferentemente, este método de diagnóstico permite diagnosticar dos, preferentemente tres, y más preferentemente cuatro enfermedades diana en un sujeto que lo necesite. Sin embargo, este número no es limitante: de hecho es posible diagnosticar hasta 100 enfermedades diana en tanto que sea posible detectar hasta 100 anticuerpos diferentes con el método de detección de la invención.

10 En una forma de realización preferida, dicha por lo menos una enfermedad diana es una infección vírica, bacteriana, por levaduras o mediada por hongos, preferentemente una infección vírica causada por un virus del papiloma o un virus de ARN de la familia de los *Flaviviridae* (virus del dengue, de la fiebre amarilla, del Nilo Occidental, de la encefalitis japonesa, de la encefalitis portada por las garrapatas, de la hepatitis C), los *Togaviridae* (virus de Chikungunya, del Río Ross, de Mayaro, de la encefalitis equina occidental, de la encefalitis equina oriental, de la encefalitis equina venezolana), los *Bunyaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, de la fiebre del valle del Rift, de Schmallerberg), los *Caliciviridae* (virus de la hepatitis E), los *Arenaviridae* (Lassa) y los *Filoviridae* (Ébola, Marburgo), una infección bacteriana causada por *Leptospirisa Interrogans*, o una infección causada por *Plasmodium falciparum*.

20 En una forma de realización preferida, dicho método *in vitro* se usa para diagnosticar por lo menos 5, más preferentemente por lo menos 15, más preferentemente por lo menos 50, e incluso más preferentemente por lo menos 100 infecciones víricas y/o bacterianas y/o parasitarias en dicho sujeto.

25 En una forma de realización preferida, el valor de control usado en dicho método representa la cantidad de dicho anticuerpo diana en una muestra procedente de un sujeto que no sufre dicha enfermedad diana, preferentemente un sujeto sano.

Los métodos de la invención se pueden usar para diagnosticar infecciones en animales.

30 En particular, se pueden usar para el diagnóstico de enfermedades de animales, así como para un protocolo de DIVA (Diferenciación de Animales Infectados de Vacunados), para diferenciar animales infectados de forma natural de animales vacunados. El uso de una estrategia de DIVA que complementa nuevas vacunas permitiría la implementación de una vacunación como estrategia de control dirigida junto a estrategias convencionales (ensayo, sacrificio e inspección de la carne). Además, la mayor especificidad de los ensayos tendría un beneficio económico importante al reducir los números de animales falsamente positivos que se pueden sacrificar innecesariamente. Por último, una sensibilidad mejorada, particularmente cuando se usan ensayos de diagnóstico nuevos, tendría un beneficio adicional al reducir la carga económica del control de la enfermedad, incluso en ausencia de vacunación.

En una forma de realización preferida, los métodos de la invención se aplican a seres humanos.

40 Finalmente, la presente invención se refiere al uso del kit de la invención para diagnosticar por lo menos dos enfermedades diana en un sujeto, en el que dicha enfermedad diana es una enfermedad vírica causada por un virus del papiloma o un virus de ARN de la familia de los *Flaviviridae* (virus del dengue, de la fiebre amarilla, del Nilo Occidental, de la encefalitis japonesa, de la encefalitis portada por las garrapatas, de la hepatitis C), los *Togaviridae* (virus de Chikungunya, del Río Ross, de Mayaro, de la encefalitis equina occidental, de la encefalitis equina oriental, de la encefalitis equina venezolana), los *Bunyaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, de la fiebre del valle del Rift, de Schmallerberg), los *Caliciviridae* (virus de la hepatitis E), los *Arenaviridae* (Lassa) y los *Filoviridae* (Ébola, Marburgo), una infección bacteriana causada por *Leptospirisa Interrogans*, o una infección causada por *Plasmodium falciparum*.

50 Recientemente se ha secuenciado un nuevo arbovirus emergente, y afecta a ganado en Alemania, Benelux y Francia. Este virus se denomina virus de Schmallerberg (SBV), y está relacionado con el virus de Akabane que pertenece al serogrupo Simbu del género *Orthobunyavirus* de la familia *Bunyaviridae*. El genoma vírico del virus de Schmallerberg comprende tres segmentos de ARN monocatenario conocidos como S, L y M. El segmento S codifica la nucleoproteína N y la proteína no estructural NSs. La nucleoproteína N comparte determinantes antigénicos con diferentes Bunyavirus. Las tres secuencias víricas de ARN de la cepa BH80/11-4 del virus de Schmallerberg están disponibles con los números HE649913.1, HE649914.1, y HE649912.1.

60 Los presentes inventores observaron que la fusión, como una proteína quimérica, de la enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) con la proteína N de SBV mejora la producción de proteína N recombinante, en particular en células de invertebrados, tales como células S2.

65 Los presentes inventores proponen en la presente memoria por primera vez usar la enzima AGT (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma, un dominio catalítico de la misma, o subfragmentos de la misma, para potenciar la producción de la nucleoproteína N a partir de SBV en células hospedantes, en particular en células de animales no vertebrados. El efecto potenciador se observa cuando las células hospedantes expresan un polipéptido de fusión que comprende por lo menos i) un péptido señal de la secreción que es funcional en dichas células

hospedantes, ii) la enzima AGT, un mutante, un dominio catalítico o subfragmentos de la misma, y iii) la nucleoproteína N de SBV. Para que se produzca el efecto potenciador, la enzima AGT tiene que estar físicamente enlazada, directa o indirectamente (se pueden introducir espaciadores y otros aminoácidos), a la proteína de interés. Sin estar atados por la teoría, se contempla que las enzimas AGT actúan como una proteína chaperona, por ejemplo facilitando la secreción desde la célula hospedante y estabilizando el polipéptido de fusión sintetizado en el sobrenadante de las células hospedantes, o evitando que se metabolice durante y después de su síntesis y secreción a partir de las células hospedantes. Además, se ha observado que AGT tiene una estructura globular tridimensional que comprende una hélice α (Wibley J.E.A. et al, 2000), que es compatible con un papel de formación de armazón de AGT.

En el contexto de la presente invención, células "hospedantes" son cualesquiera células que se pueden usar para producir proteínas recombinantes, tales como células "de animales no vertebrados" (o de invertebrados), células de vertebrados, células vegetales, células de levadura, o células procariontas. Preferentemente son células de animales no vertebrados y de vertebrados.

Los animales no vertebrados (también conocidos como invertebrados) comprenden diferentes filos, siendo los más famosos los insectos, arácnidos, crustáceos, moluscos, anélidos, los cirrípedos, los radiados, los celenterados y los infusorios. Ahora se clasifican en aproximadamente 30 filos, desde organismos simples, tales como esponjas marinas y platelmintos, hasta animales complejos, tales como artrópodos y moluscos. En el contexto de la invención, las células de animales no vertebrados son preferentemente células de insectos, tales como células de *Drosophila* o de mosquito, más preferentemente células S2 de *Drosophila*.

Los ejemplos de células derivadas de organismos vertebrados que son útiles como estirpes de células hospedantes incluyen células madre embrionarias no humanas, o derivados de las mismas, por ejemplo células EBX aviares; la estirpe CVI de riñón de mono transformada mediante secuencias de SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); una estirpe de riñón embrionario humano (293); células de riñón de hámster neonato (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino (CHO); células de Sertoli de ratón [TM\$]; células de riñón de mono (CVI, ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células de hepatoma de rata [HTC, M1.5]; YB2/O (ATCC nº CRL1662); NIH3T3; HEK y células TRI. En el contexto de la invención, las células de vertebrados son preferentemente células EBX, CHO, YB2/O, COS, HEK, NIH3T3, o derivados de las mismas.

Las células vegetales que se pueden usar en el contexto de la invención son las variedades de cultivo del tabaco Bright Yellow 2 (BY2) y *Nicotiana tabaccum* 1 (NT-1).

Las células de levadura que se pueden usar en el contexto de la invención son: *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Hansenula pofymorpha*, así como levaduras metilotrópicas como *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*.

Las células procariontas que se pueden usar en el contexto de la invención son típicamente bacterias de *E. coli* o bacterias de *Bacillus subtilis*.

Los métodos descritos en la presente memoria permiten obtener por lo menos 40 mg/l, preferentemente por lo menos 50 mg/l, más preferentemente por lo menos 60 mg/l de la nucleoproteína N sustancialmente pura del virus Schmallerberg en el sobrenadante del cultivo celular recuperado.

La presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la nucleoproteína N del virus de Schmallerberg de SEC ID NO: 16.

En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente).

Este polipéptido de fusión comprende preferentemente además un marcador, como se define anteriormente. Este marcador es preferentemente un marcador de polihistidina, y está situado preferentemente en el extremo C terminal de la nucleoproteína N del virus de Schmallerberg.

El polipéptido de fusión de la invención es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 41 (que corresponde a la proteína de fusión BiPlike/SNAP/SBV.N/Histag) o SEC ID NO: 46 (que corresponde a la proteína de fusión ssBiP/SNAP/SBV.N/Histag) o SEC ID NO:42 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP/SBV.N).

Esta proteína quimérica SNAP-SBV.N puede ser útil como un agente de diagnóstico para la detección de la

infección vírica por el virus de Schmallenberg, o para la detección de anticuerpos específicos del mencionado virus en fluidos corporales, tales como sangre, suero, saliva, y similar.

5 De este modo, la presente solicitud describe el uso de la proteína de fusión [SNAP-SBV.N] obtenida anteriormente para identificar la presencia de dichos microorganismos patógenos o no patógenos en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

10 Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína VP1 del virus EV71. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 49 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/EV71.VP1/proTEV2/Histag).

15 La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-EV71.VP1] para identificar la presencia del enterovirus 71 en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

20 Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína E soluble (sE) del virus de la encefalitis japonesa (JEV.sE). En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 51 (que corresponde a la proteína de fusión JEV.sE/SNAP-like/Histag).

25 La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-JEV.sE] para identificar la presencia del virus de la encefalitis japonesa (JEV) en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

30 Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína EDIII del virus JE-1, JE-2, JE-4, o JE-5. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 53 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/JE-1.EDIII/Histag), SEC ID NO: 60 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/JE-2.EDIII/Histag), SEC ID NO: 62 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/JE-4.EDIII/Histag), o SEC ID NO: 64 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/JE-5.EDIII/Histag).

40 La presente solicitud describe el uso de cualquiera de estas proteínas de fusión [SNAP-JE-1.EDIII], [SNAP-JE-2.EDIII], [SNAP-JE-4.EDIII] o [SNAP-JE-5.EDIII] para identificar la presencia del virus de la encefalitis japonesa de genotipo 1, 2, 4 o 5, respectivamente, en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

45 Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína EDIII del virus de Rabensburg. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 66 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/RabV.EDIII/Histag).

50 La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-RabV.EDIII] para identificar la presencia del virus de Rabensburg en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

55 Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína sE2 del virus del Río Ross. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 70 (que corresponde a la proteína de fusión RR.sE2/SNAP-like/Histag).

60 La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-RR.sE2] para identificar la presencia del virus del Río Ross en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

65 Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína sE2 del virus de Mayaro (MAY.sE2). En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es

preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 72 (que corresponde a la proteína de fusión MAY.sE2/SNAP-like/Histag).

- 5 La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-MAY.sE2] para identificar la presencia del virus de Mayaro en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína sE2 del virus de WEE. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 74 (que corresponde a la proteína de fusión WEE.sE2/SNAP-like/Histag).

- 15 La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-WEE.sE2] para identificar la presencia del virus de la encefalitis equina occidental en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína sE2 del virus de EEE. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 76 (que corresponde a la proteína de fusión EEE.sE2/SNAP-like/Histag).

Además, la presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-EEE.sE2] para identificar la presencia del virus de la encefalitis equina oriental en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

- 30 La presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína sE2 del virus de VEE. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 78 (que corresponde a la proteína de fusión VEE.sE2/SNAP-like/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-VEE.sE2] para identificar la presencia del virus de la encefalitis equina venezolana en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la nucleoproteína N del virus de Akabane. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 80 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/AKA.N/pro-TEV2/Histag).

La presente invención describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-AKA.N] para identificar la presencia del virus de Akabane en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la nucleoproteína N del virus de Aino. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 82 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/AIN.N/pro-TEV2/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-AIN.N] para identificar la presencia del virus de Aino en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la nucleoproteína N del virus de Shamonda. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 84 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/SHA.N/pro-TEV2/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-SHA.N] para identificar la presencia del virus de Shamonda en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

5 Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la nucleoproteína N de betacoronavirus humano. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 86 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/huCOV.N/proTEV2/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-huCOV.N] para identificar la presencia del betacoronavirus humano en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

15 Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la forma soluble de la proteína spike S de betacoronavirus humano. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 88 (que corresponde a la proteína de fusión huCOV.S/SNAP-like/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-huCOV.S] para identificar la presencia del betacoronavirus humano en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

25 Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína C del virus de la hepatitis C (HCV.C). En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 90 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/HCV.C/proTEV2/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-HCV.C] para identificar la presencia del virus de la hepatitis C en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

40 Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína C del virus de la hepatitis E (HEV.C). En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 151 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/HEV.C/proTEV2/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-HEV.C] para identificar la presencia del virus de la hepatitis E en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

50 Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína MSP-1+AMA-1 de *Plasmodium falciparum*. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 92 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/MSP-1/proTEV2/AMA-1/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-MSP-1+AMA-1] para identificar la presencia del parásito *Plasmodium falciparum* en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

60 Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína HbpA de la bacteria *Leptospira interrogans*. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 94 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/HbpA/proTEV2/Histag).

65 La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-HbpA] para identificar la presencia de la bacteria *Leptospira* en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

- Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) el péptido MUB 40. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 96 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/MUB40/proTEV2/Histag).
- La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-MUB40] para identificar la presencia de un ligando en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.
- Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la forma soluble de ratón o humana de lectina de tipo C (CLEC5A). En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 98 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/mo-CLEC5A/proTEV2/Histag) o la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 100 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/hu-CLEC5A/proTEV2/Histag).
- La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-mo-CLEC5A] o [SNAP-hu-CLEC5A] para detectar la presencia de flavivirus en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.
- Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína VAGO del mosquito *Aedes albopictus*. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 104 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/aaVAGO/Histag).
- La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-aaVAGO] para identificar la presencia de un ligando en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.
- Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína VAGO del mosquito *Culex quinquefasciatus*. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 102 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/cxVAGO/Histag).
- La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-cxVAGO] para identificar la presencia de un ligando en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.
- Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la nucleoproteína N del virus de Crimea-Congo. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 109 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/CCHF.N/proTEV2/Histag).
- La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-CCHF.N] para identificar la presencia del virus de Crimea-Congo en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.
- Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la nucleoproteína N del virus del Ébola. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 111 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/EBO.N/proTEV2/Histag).
- La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-EBO.N] para identificar la presencia del virus del Ébola en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.
- Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la

nucleoproteína N del virus de Marburgo. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 113 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/MAR.N/proTEV2/Histag).

5

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-MAR.N] para identificar la presencia del virus de Marburgo en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

10

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la nucleoproteína N del virus de Lassa. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 115 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/LAS.N/proTEV2/Histag).

15

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-LAS.N] para identificar la presencia del virus de Lassa en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

20

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la nucleoproteína N del virus de Junin. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 117 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/JUN.N/proTEV2/Histag).

25

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-JUN.N] para identificar la presencia del virus de Junin en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

30

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la nucleoproteína N del virus de Machupo. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 119 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/MAC.N/proTEV2/Histag).

35

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-MAC.N] para identificar la presencia del virus de Machupo en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

40

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la nucleoproteína N del virus de Guanarito. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 121 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/GUA.N/proTEV2/Histag).

45

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-GUA.N] para identificar la presencia del virus de Guanarito en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

50

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la nucleoproteína N del virus de Sabia. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 123 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/proTEV1/SAB.N/proTEV2/Histag).

55

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-SAB.N] para identificar la presencia del virus de Sabia virus en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

60

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína EDIII del virus de Omsk. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 125 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/OMSK.EDIII/Histag).

65

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-OMSK.EDIII] para identificar la presencia

del virus de Omsk en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína EDIII del virus de la enfermedad del Bosque de Kyasanur. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 127 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/KYA.EDIII/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-KYA.EDIII] para identificar la presencia del virus de la enfermedad del Bosque de Kyasanur en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) la proteína EDIII del virus de Alkhurma. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 129 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/ALK.EDIII/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-ALK.EDIII] para identificar la presencia del virus de Alkhurma en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) el ectodominio de la glicoproteína GP1 del virus de Lassa. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 131 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/LAS.ectoGP1/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-LAS.ectoGP1] para identificar la presencia del virus de Lassa en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) el ectodominio de la glicoproteína GP1 del virus de Junin. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 133 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/JUN.ectoGP1/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-JUN.ectoGP1] para identificar la presencia del virus de Junin en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) el ectodominio de la glicoproteína GP1 del virus de Machupo. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 135 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/MAC.ectoGP1/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-MAC.ectoGP1] para identificar la presencia del virus de Machupo en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) el ectodominio de la glicoproteína GP1 del virus de Guanarito. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 137 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/GUA.ectoGP1/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-GUA.ectoGP1] para identificar la presencia del virus de Guanarito en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) el ectodominio de la glicoproteína GP1 del virus de Sabia. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 139 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/SAB.ectoGP1/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-SAB.ectoGP1] para identificar la presencia del virus de Sabia en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) el ectodominio de la glicoproteína GP2 del virus de Lassa. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 141 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/LAS.ectoGP2/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-LAS.ectoGP2] para identificar la presencia del virus de Lassa en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) el ectodominio de la glicoproteína GP2 del virus de Junin. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 143 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/JUN.ectoGP2/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-JUN.ectoGP2] para identificar la presencia del virus de Junin en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) el ectodominio de la glicoproteína GP2 del virus de Machupo. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 145 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/MAC.ectoGP2/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-MAC.ectoGP2] para identificar la presencia del virus de Machupo en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) el ectodominio de la glicoproteína GP2 del virus de Guanarito. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 147 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/GUA.ectoGP2/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-GUA.ectoGP2] para identificar la presencia del virus de Guanarito en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Además, la presente solicitud describe un polipéptido de fusión que comprende a) una enzima 6-alquilguanina-ADN-alquiltransferasa (AGT) (EC 2.1.1.63), un mutante de la misma o un dominio catalítico de la misma, y b) el ectodominio de la glicoproteína GP2 del virus de Sabia. En este polipéptido de fusión, dicha enzima AGT es preferentemente la proteína de SEC ID NO: 2, o un homólogo de la misma (siendo dicho homólogo como se define anteriormente). Este polipéptido de fusión es, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 149 (que corresponde a la proteína de fusión SNAP-like/SAB.ectoGP2/Histag).

La presente solicitud describe el uso de esta proteína de fusión [SNAP-SAB.ectoGP2] para identificar la presencia del virus de Sabia en una muestra biológica, por ejemplo gracias al inmunoensayo de la presente invención.

Ejemplos

5 En el contexto de la invención, se desarrolló un inmunoensayo a base de perlas múltiple para la detección rápida y simultánea de anticuerpos contra arbovirus en fluidos biológicos.

10 El sistema se basa en la tecnología xMAP (Luminex corporation), y usa una mezcla de microesferas revestidas con antígeno como reactivos de captura para inmunoglobulinas humanas específicas. Se acoplaron distintos conjuntos de microesferas (Magplex, Luminex corporation) con proteínas de fusión de AGT purificadas, a saber, las proteínas recombinantes víricas etiquetadas con SNAP: sSNAP-DV1.EDIII, sSNAP-DV2.EDIII, sSNAP-DV3.EDIII, sSNAP-DV4.EDIII, sSNAP-WN.EDIII, sSNAP-JE.EDIII, sSNAP-USU.EDIII, sSNAP-TBE.EDIII, sSNAP-YF.EDIII, sSNAP-MVE.EDIII, sSNAP-Rocio.EDIII, sSNAP-WSL.EDIII, sSNAP-ZIKA.EDIII, SNAP-DV1ectoM, sSNAP-N.RVF, sSNAP-N.TOS, y CHIK.sE2-SNAP. Los antígenos recombinantes se acoplaron covalentemente a la superficie carboxílica de la microesfera usando un sustrato de la proteína AGT como enlazador (BG-PEG-NH₂, New England Biolabs), potenciando de ese modo la eficiencia de la captura de anticuerpos en comparación con los procedimientos de acoplamiento amínico estándar.

20 La validación técnica usando anticuerpos anti-etiqueta de SNAP y anticuerpos monoclonales específicos de ratón confirmó la eficiencia del acoplamiento y demostró la estabilidad del antígeno a largo plazo (hasta seis meses). Esta solicitud no está limitada a antígenos víricos, ya que se puede usar cualquier péptido o polipéptido para el revestimiento de las perlas y la captura subsiguiente de anticuerpos.

1) Material y métodos

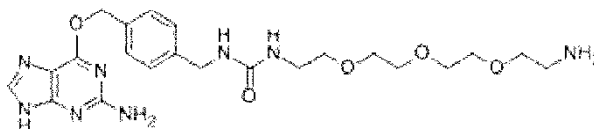
25 1. Se usaron los siguientes amortiguadores y disoluciones:

- a) amortiguador de PBS: 100 ml de 10X PBS, pH 7,4 en 1 l H₂O estéril
- 30 b) amortiguador de acoplamiento de SNAP (PBS-DTT): 100 ml de 10 X PBS, pH 7,4, 0,5 ml de 10% de tween 20, 1 ml de 1,0 M de DTT, en 1 l de H₂O estéril
- c) amortiguador de bloqueo/de ensayo (PBS-B): PBS, 1% de BSA, pH 7,4 en 1 l H₂O estéril
- 35 d) amortiguador de almacenamiento (PBS-TBN): 100 ml de 10X de PBS, 1 g de BSA, 2 ml de 10% de tween 20, 500 me de azida sódica, 1 ml de 1,0M de DTT, en 1 l de H₂O estéril
- e) disolución de sustrato (4 mg/ml): 2 mg de BG-PEG-NH₂, DMSO 500 µl.
- 40 f) disolución de activación (EDAC/SNHS): 50 mg/ml de disolución de EDAC, o 50 mg/ml de SNSHS en agua destilada

2. Se usaron los siguientes materiales:

45 2.1. microesferas de MagPlex Luminex: MC 100XX-ID (en el que XX es la región de fluorescencia), XX puede ser, por ejemplo, 26, 27, 28, 29, 34, 35, 36, 37, 45, 52, 53, 63, 64, como se menciona en la figura 7B

2.2. sustrato de hAGT: PEG-BG-NH₂ (NEB S9150S)



50

2.3. proteínas de fusión SNAP-EDIII vírica:

55 La generación de una proteína de fusión que comprende restos de AGT y de EDIII vírica es bien conocida por el experto en la materia. Para este fin, se puede usar cualquier procedimiento de síntesis conocido, con la condición de que la enzima AGT permanezca activa en la proteína de fusión.

En el presente caso, se ha usado el mutante SNAP de AGT de SEC ID NO: 2, y se han generado proteínas de fusión SNAP-EDIII vírica.

60

Se ha escogido el sistema de expresión inducible en Drosophila S2 (DES, Invitrogen), para la producción en masa de EDIII individual de flavivirus en células de animales no vertebrados, y se ha usado el plásmido

pMT/BiP/V5-HisA de Invitrogen.

Este plásmido contiene:

- 5 - el promotor de metalotioneína pMT,
- una secuencia de ssBiP de insecto de SEC ID NO: 22,
- 10 - sitios de restricción de *Bgl II* y *Age I*,
- el ADN de SEC ID NO: 28 que codifica una etiqueta de His₆ situada en dirección 3' del sitio de restricción de *AgeI*, y
- 15 - la secuencia espaciadora de ADN de SEC ID NO: 26 situada entre el sitio de restricción de *AgeI* y el ADN que codifica una etiqueta de His₆.

20 Los genes sintéticos que codifican el dominio III de longitud completa de las proteínas E de los flavivirus WN, USU, JE, TBE, DEN-1 a DEN-4, YF, Rocio, MVE, Zika, SLE, y WSL se dan en SEC ID NO: 3 a SEC ID NO: 14. Las secuencias de aminoácidos de ED III se fusionaron en el marco al término C de la proteína SNAP, estando ambos restos separados por un enlazador GGS (SEC ID NO: 25). Las secuencias de ADN que codifican SNAP-EDIII se insertaron en el plásmido pMT/BiP/V5-Histag (Invitrogen) para generar los plásmidos pMT/BiP/SNAP/EDIII/Histag.

25 Los plásmidos resultantes pMT/BiP/SNAP-EDIII-Histag, que pueden conducir la expresión de proteínas de fusión segregadas SNAP-EDIII-His₆, se co-transfectaron con el marcador de selección pCo-Blast en células S2 para generar la estirpe celular estable S2/sSNAP-ED III-Histag, que muestra resistencia a blasticidina.

30 Las estirpes celulares S2 estables que se hicieron crecer en una botella agitadora (1000 ml) se estimularon 10 días con metal pesado cadmio (Cd²⁺), y las proteínas del medio extracelular se concentraron y se purificaron.

Se observó acumulación de la proteína segregada SNAP-EDIII etiquetada en los sobrenadantes de células estables S2/sSNAP-EDIII-Histag, después de 10 días de inducción con el metal pesado cadmio.

35 En consecuencia, se han producido las proteínas SNAP-DEN1.EDIII de SEC ID NO: 21, SNAP-DEN2.EDIII de SEC ID NO:X, SNAP-DEN3.EDIII de SEC ID NO:X, SNAP-DEN4.EDIII de SEC ID NO:X, SNAP-WN.EDIII de SEC ID NO:X, SNAP-JE.EDIII de SEC ID NO:X, SNAP-YF.EDIII de SEC ID NO:X, SNAP-MVE.EDIII de SEC ID NO:X, SNAP-Rocio.EDIII de SEC ID NO:X, SNAP-WSL.EDIII de SEC ID NO:X, SNAP-ZIKA.EDIII de SEC ID NO:X, SNAP-SLE.EDIII de SEC ID NO:X.

40 3. Preparación de las perlas acopladas al antígeno

45 La producción de perlas acopladas al antígeno comprendió dos etapas: la funcionalización de las superficies de las microesferas con un derivado de O⁶-bencilguanina (BG-PEG-amino), y la inmovilización covalente de las proteínas quiméricas de SNAP-Ags víricos, usando el BG-PEG-amino como un anclaje (figura 1). Las superficies carboxílicas de las microesferas se revistieron covalentemente con el sustrato BG-PEG-amino usando un procedimiento de carbodiimida de dos etapas optimizado (Wong et al Journal of Clinical Microbiology 42(1): 65-72, 2004). Subsiguientemente, los compuestos de BG-PEG-amino acoplados se enlazaron irreversiblemente a las proteínas quiméricas de SNAP-Ags víricos mediante transferencia del grupo bencílico a la cisteína del sitio activo de la proteína SNAP. Debido a la elevada especificidad de esta reacción, la proteína de fusión se acopla exclusivamente vía el dominio de SNAP, dejando al antígeno vírico accesible para interacciones con anticuerpos.

55 3.1. En primer lugar, las perlas comerciales se activaron según las instrucciones del fabricante (usando las disoluciones de activación de SNHS y EDAC), y se lavaron en un amortiguador de PBS. Todas las etapas se llevaron a cabo en la oscuridad para evitar la extinción fluorescente de las perlas, según las instrucciones del fabricante.

Para cada procedimiento de acoplamiento se usaron aproximadamente 1,25 x 10⁶ perlas.

60 3.2. Entonces se añadió el sustrato de AGT PEG-BG-NH₂ en la disolución de DMSO durante 6 horas a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C, sobre las perlas activadas, y subsiguientemente se lavaron con amortiguador de PBS.

65 3.3. Los sitios carboxílicos no unidos se bloquearon entonces con el amortiguador de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente, y las perlas se lavaron subsiguientemente con el amortiguador de acoplamiento de SNAP.

3.4. Las proteínas SNAP-EDIII resuspendidas en el amortiguador de acoplamiento de SNAP (1 mg/ml) se incubaron con las perlas así obtenidas durante dos horas a temperatura ambiente, y entonces se lavaron una vez con el amortiguador de acoplamiento de SNAP, y tres veces con el amortiguador de almacenamiento (PBS-TBN).

4. Inmunoensayos fluorescentes de las microesferas

Los conjuntos de perlas, conjugados con diferentes SNAP-Ags víricos, se mezclaron mediante vórtice para asegurar la dispersión total de las perlas. Después de ajustar la densidad de las perlas a 100 perlas/ μ l, se transfirieron 25 μ l de cada uno de los conjuntos de perlas (que contienen 2500 microesferas) a una placa de microtitulación de 96 pocillos (placa de fondo plano Bio-Plex Pro, BioRad) en pocillos separados para ensayos singleplex, o se mezclaron en los mismos pocillos para ensayos múltiplex. Las microesferas se lavaron 3 veces con 100 μ l de amortiguador de lavado (Amortiguador de Lavado BioPlex, BioRad) usando una estación de lavado de microplacas para perlas magnéticas (Estación de Lavado BioPlex Pro, BioRad). Las muestras (anticuerpos o sueros) se diluyeron en amortiguador de ensayo (PBS-BSA), y se añadieron 50 μ l de las disoluciones resultantes a los pocillos de ensayo que contienen las perlas conjugadas. Tras la incubación en la oscuridad en un agitador de placas durante 30 min., la placa se lavó como antes. Subsiguientemente, se diluyó un anticuerpo secundario marcado con fluorocromo en amortiguador de ensayo (PBS-BSA) a 2 μ g/ml, y se añadieron 50 μ l de las disoluciones resultantes a los pocillos de ensayo que contienen las perlas conjugadas. Tras incubación en la oscuridad en un agitador de placas durante 30 min., la placa se lavó como antes. Finalmente, se diluyó estreptavidina-ficoeritrina (SAPE, Invitrogen Molecular Probes) en amortiguador de ensayo (PBS-BSA) a 2 μ g/ml, y se añadieron 50 μ l de la disolución resultante a los pocillos de la microplaca. La placa se incubó en la oscuridad en un agitador de placas durante 10 min. y se lavó como antes, antes de resuspender los contenidos de los pocillos en 125 μ l de amortiguador de ensayo. La intensidad media de la fluorescencia (MFI) del anticuerpo de detección unido a las microesferas individuales se evaluó a partir del análisis de flujo de 50 microesferas por pocillo usando un analizador de flujo de láser dual (instrumento BioPlex 200, BioRad). El instrumento de detección fluorescente está equipado con un primer láser para detectar el tipo de perla, y un segundo para asegurar la cuantificación del IgM o IgG capturado al excitar el fluoróforo (rojo de ficoeritrina) conjugado con el anticuerpo de detección específico.

4.1 Confirmación del acoplamiento del antígeno

El acoplamiento del antígeno se confirmó ensayando las microesferas acopladas al antígeno con diluciones de anticuerpo policlonal de conejo anti-etiqueta de SNAP (GenScript). Los inmunoensayos de fluorescencia se llevaron a cabo en formato singleplex, como se describe anteriormente. Se llevó a cabo en PBS-BSA una serie de diluciones de dos veces de anticuerpo anti-SNAP partiendo de 4000 ng/ml y terminando en 3,9 ng/ml, y los volúmenes de cada dilución se añadieron a los pocillos de ensayo que contienen las perlas. Para detectar anticuerpos anti-SNAP unidos, se usó IgG de cabra anti-conejo conjugado con biotina (2 μ g/ml en 50 μ l de PBS-BSA) como anticuerpo secundario.

La figura 2 muestra los resultados de la fluorescencia observados para la detección del anticuerpo anti-SNAP en 8 conjuntos diferentes de microesferas acopladas a proteínas quiméricas de SNAP-antígenos víricos (SNAP-DV1.EDIII, SNAP-DV2.EDIII, SNAP.DV3.EDIII, SNAP.DV4.EDIII, SNAP-WNV, SNAP-YF, SNAP-JE, SNAP-TBE).

4.2 Detección de anticuerpos específicos

La captura y detección de anticuerpos específicos mediante las microesferas conjugadas al antígeno se evaluó usando anticuerpos monoclonales purificados de ratón (anti-WNV, anti-DV1 y anti-DV2) y sueros policlonales de ratón (anti-DV3, anti-DV4, anti-YF y anti-JE) o sueros humanos (anti-DV1). Los inmunoensayos de fluorescencia se llevaron a cabo en un formato singleplex y múltiplex, como se describe anteriormente. Se llevó a cabo en PBS-BSA una serie de diluciones de cuatro veces de anticuerpos monoclonales purificados de ratón, partiendo de 400 ng/ml y terminando en 0,1 ng/ml, y sueros de ratón y humanos partiendo de 1:25 y terminando en 1:102400, y los volúmenes de cada dilución se añadieron a los pocillos de ensayo que contienen las perlas. Para detectar anticuerpos de ratón monoclonales y policlonales unidos, se usó como anticuerpo secundario un IgG de cabra anti-ratón conjugado con biotina (2 μ g/ml en 50 μ l de PBS-BSA). Para detectar anticuerpos IgM o IgG unidos en suero humano, se usaron respectivamente un IgM de cabra anti-humano conjugado a biotina (2 μ g/ml en 50 μ l de PBS-BSA) o un IgG de cabra anti-humano conjugado a biotina (2 μ g/ml en 50 μ l de PBS-BSA).

La figura 3 compara la sensibilidad del experimento de inmunoensayo para la detección del anticuerpo monoclonal purificado anti-DV2 en la proteína quimérica SNAP-DV2.EDIII conjugada a microesferas vía el sustrato de la proteína hAGT (acoplamiento de la invención) o acoplada a través del Kit de Acoplamiento de Amina Bio-Plex, BIORAD.

La figura 4 compara la sensibilidad del experimento de inmunoensayo para la detección del anticuerpo monoclonal purificado anti-DV1 en la proteína quimérica SNAP-DV1.EDIII conjugada a microesferas, ya sea en un formato singleplex o en un formato múltiplex con otras proteínas quiméricas de SNAP-Ags víricos (SNAP-DV2.EDIII, SNAP.DV3.EDIII, SNAP.DV4.EDIII, SNAP-WNV, SNAP-YF, SNAP-JE, SNAP-TBE) acopladas a microesferas.

La figura 5 muestra la reactividad y especificidad del experimento del inmunoensayo múltiplex para la detección de diluciones de anticuerpo monoclonal purificado anti-WNV en proteínas quiméricas de SNAP-Ags víricos (SNAP-DV1.EDIII, SNAP-DV2.EDIII, SNAP.DV3.EDIII, SNAP.DV4.EDIII, SNAP-WNV, SNAP-YF, SNAP-JE, SNAP-TBE) acopladas a microesferas.

La figura 6 muestra la reactividad y especificidad de la detección de IgG anti-DV3 en suero policlonal de ratón frente a DV3 (A), y la detección de IgG anti-YF en suero policlonal de ratón frente a YF (B), en inmunoensayos múltiplex en proteínas quiméricas de SNAP-Ags víricos (SNAP-DV1.EDIII, SNAP-DV2.EDIII, SNAP.DV3.EDIII, SNAP.DV4.EDIII, SNAP-WNV, SNAP-YF, SNAP-JE, SNAP-WSL, SNAP-ROCIO, SNAP-MVE, SNAP-SLE, SNAP-ZIKA) acopladas a microesferas.

La figura 7 muestra la reactividad y especificidad de la detección de IgM anti-DV1 (A) y de la detección de IgG anti-DV1 (B) en suero infectado con DV1 de un paciente humano en inmunoensayos múltiplex en proteínas quiméricas de SNAP-Ags víricos (SNAP-DV1.EDIII, SNAP-DV2.EDIII, SNAP.DV3.EDIII, SNAP.DV4.EDIII, SNAP-WNV, SNAP-YF, SNAP-JE, SNAP-WSL, SNAP-ROCIO, SNAP-MVE, SNAP-SLE, SNAP-ZIKA, SNAP-TBE) acopladas a microesferas.

II. Resultados

El sistema de la invención usa una mezcla de microesferas Magplex revestidas con antígeno (Luminex Corporation) como reactivos de captura para inmunoglobulinas humanas específicas. Cada conjunto de microesferas codificadas internamente con un color se ha acoplado a un antígeno recombinante específico y se ha mezclado con otros tipos de microesferas en un volumen pequeño de muestra. El poder de este sistema se basa en el hecho de que es posible analizar simultáneamente hasta 100 tipos de microesferas acopladas por pocillo usando una herramienta de análisis de flujo. El instrumento de detección fluorescente está equipado con un primer láser para detectar el tipo de perla, y un segundo para asegurar la cuantificación del IgM o IgG capturado al excitar el fluoróforo (ficoeritrina) conjugado al anticuerpo de detección específico. Con sus capacidades multiplexadoras amplias y el límite de detección más bajo, este enfoque ofrece ahorros sustanciales de coste y de muestras con respecto a las medidas de ELISA tradicionales.

Actualmente, se han acoplado 16 conjuntos distintos de microesferas con proteínas quiméricas purificadas de SNAP-Ags víricos, permitiendo la titulación de anticuerpos séricos específicos contra los serotipos 1 a 4 del virus del dengue, el virus del Nilo Occidental, el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la encefalitis portada por garrapatas, el virus de la encefalitis de San Luis, el virus de la encefalitis del Valle de Murray, el virus de Wesselsbron, de Zika, de Rocio, de Usutu, de la fiebre del Valle del Rift, y de Chikungunya. La producción del sistema es muy eficaz en cuanto al coste y al tiempo, ya que solamente se requiere una cantidad muy pequeña de antígeno recombinante (< 50 µg) para producir un conjunto de microesferas acopladas al antígeno (~1,25 x 10⁶ microesferas), suficiente para llevar a cabo 500 ensayos individuales. Además, los conjuntos seleccionados de microesferas son adaptables a un sistema de detección fluorescente económico, compacto y robusto, tal como el MagPix (Luminex Corporation).

La evaluación del acoplamiento del antígeno usando un anticuerpo anti-SNAP (figura 2) confirmó la eficiencia del acoplamiento, y demostró que las cantidades relativas de antígenos unidos son comparables entre los diferentes conjuntos de microesferas acopladas. La evaluación de la captura y detección de los anticuerpos usando anticuerpos de ratón purificados mostró una captura mejorada de los anticuerpos específicos por las microesferas producidas acopladas al antígeno, en comparación con microesferas acopladas al antígeno obtenidas mediante procedimientos de acoplamiento amínico estándar (figura 3). Además, demostró el límite bajo de detección del método, y confirmó que la multiplexación no afecta a la detección de los anticuerpos (figura 4). Adicionalmente, las microesferas conjugadas al antígeno exhibieron una estabilidad a largo plazo cuando se almacenaron a 4°C (> 6 meses). Finalmente, la especificidad de cada conjunto de microesferas acopladas en inmunoensayos múltiplex se demostró para anticuerpos monoclonales purificados de ratón (figura 5), para anticuerpos IgG en sueros policlonales de ratón (figura 6A-B), y para anticuerpos tanto IgM como IgG en sueros policlonales de seres humanos infectados (figura 7).

Con sus capacidades multiplexadoras amplias (hasta 100 tipos de microesferas acopladas por pocillo) y su límite de detección más bajo, este enfoque ofrece ahorros sustanciales de coste y de muestra con respecto a las medidas de ELISA tradicionales.

III. Generación de una proteína de fusión que comprende SNAP y la nucleoproteína N del virus de Schmallenberg

1. Construcción de los vectores que codifican la proteína de fusión SNAP-SBV.N

La proteína de fusión quimérica que comprende SNAP y la nucleoproteína N del virus de Schmallenberg se ha obtenido según lo siguiente:

En una primera etapa, la secuencia del marco de lectura abierto del segmento S que codifica la nucleoproteína N y la proteína NSs de la cepa BH80/11-4, se mutó insertando un sitio de restricción *EcoRV* en su término 5' y un sitio de restricción *XmaI* en su término 3'. Además, el sitio de restricción *EcoRV* interno se eliminó mutando el nucleótido 294T a 294A. Esta secuencia mutada se muestra en SEC ID NO: 17.

Esta secuencia mutada se insertó entonces en los sitios de restricción *EcoRV* y *XmaI* del casete pDeSNAP Univ de SEC ID NO: 34, generando el casete de ADN "pDeSNAP Univ/SBV.N" de SEC ID NO: 36.

El denominado casete de ADN "pDeSNAP Univ/SBV.N" comprende (véase la figura 9 y SEC ID NO: 36):

- la secuencia de BiP-like de insecto de SEC ID NO: 23,
- la secuencia de SNAP-like de SEC ID NO: 31,
- una primera secuencia de ADN, SEC ID NO: 26, que codifica la secuencia espaciadora GGGS (SEC ID NO: 25),
- una secuencia de ADN, SEC ID NO: 29, que codifica un sitio de escisión de pro-TEV1 de secuencia ENLYFQS (SEC ID NO: 32),
- la secuencia de ADN de SEC ID NO: 17 (que corresponde a la secuencia de SBV.N natural, en la que el sitio de *EcoRV* interno se ha suprimido, y se han añadido en los extremos dos sitios de *EcoRV* y *XmaI*,
- una secuencia de ADN, SEC ID NO: 30, que codifica un sitio de escisión de pro-TEV2 de secuencia ENLYFQG (SEC ID NO: 33),
- una secuencia de ADN, SEC ID NO: 28, que codifica una secuencia de HisTag.

Obsérvese que este casete comprende, además de un sitio de *NheI* en dirección 5' del ATG, un sitio de *BglII* entre la secuencia de BiP-like y la secuencia de SNAP-like, y un sitio de *AgeI* y un sitio de *HindIII* que están situados ambos en dirección 3' del codón de parada.

La secuencia comprendida entre los sitios de restricción de *BglII* y *AgeI* del casete pDeSNAPUniv/SBV.N (véase la figura 9) se cortó mediante digestión enzimática, después se clonó en el plásmido pMT/BiP/V5-A (Invitrogen) para generar el vector pMT/BiP/SNAP-SBV.N. Este vector se ha usado para generar células S2 estables que segregan la proteína de fusión SNAP-SBV.N.

La secuencia comprendida entre los sitios de restricción de *NheI* y *NotI* del casete pDeSNAPUniv/SBV.N se clonó entonces en el plásmido pcADN3 (Invitrogen) para generar el vector pcADN3/SNAP-SBV.N. Este vector se usó entonces para generar células de mamífero estables que segregan la proteína de fusión SNAP-SBV.N.

2. Producción de la proteína de fusión SNAP-SBV.N

Los plásmidos resultantes pMT/BiP/SNAP-SBV.N que permiten la producción de proteínas SBV.N etiquetadas con SNAP como proteínas de fusión segregadas se cotransfectaron con el marcador de selección pCo-Blast en células S2 para generar la estirpe celular estable S2/SNAP-SBV.N, que muestra resistencia a blasticidina.

Esta estirpe celular se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) del Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, con el número CNCM 1-4616.

Las estirpes celulares S2 estables que se hicieron crecer en una botella agitadora (1000 ml) se estimularon 10 días con el metal pesado cadmio (Cd^{2+}).

Se observó acumulación de la proteína segregada SNAP-SBV.N en los sobrenadantes de las células S2/SNAP-SBV.N después de 10 días de inducción con el metal pesado cadmio.

Se ensayaron 0,01 ml procedentes de 4 ml de sobrenadante de células S2/SNAP-SBV.N inducidas 10 días con Cd^{2+} mediante ensayo de inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-Histag (dilución 1:1.000) (véase la

figura 10).

La proteína quimérica SNAP-SBV.N se comparó con cantidades definidas de la proteína quimérica SNAP-TOS.N (que corresponde a la proteína de fusión que comprende SNAP y la nucleoproteína N del virus de la Toscana, que es un flebovirus).

La producción de SNAP-SBV.N purificada a partir de células S2/SNAP+SBV.N inducidas durante 10 días es 18 mg por litro de cultivo celular (Fig. 10B).

10 **Referencias bibliográficas**

Avrameas S. *Immunol. Today* 1991 May;12(5):154-9.
 Zimmerman CW, *Electrophoresis* 1995; Jun;16(6):941-7.
 Kim H-J. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2011
 15 Damoiseaux et al., *ChemBiochem.* 4:285-287, 2001
 Xu-Welliver et al., *Biochemical Pharmacology* 58: 1279-85, 1999
 Lim A. et al, *EMBO J.* 15: 4050-4060, 1996;
 Daniels D.S. et al, *EMBO J.* 19: 1719-1730, 2000;
 20 Juillerat A. et al, *Chemistry & Biology*, vol.10, 313-317, 2003
 Wong et al *Journal of Clinical Microbiology* 42, no. 1 (jan 2004): 65-72
 Wibley J.E.A. et al, 2000
 Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84:7413-7417, 1987
 Mackey et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:8027-8031, 1988
 Wu et al., *J. Biol. Chem.*, 267:963-967, 1992;
 25 Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 263:14621-14624, 1988;
 Williams et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88:2726-2730, 1991
 Kolpe A.B. et al, *Virus Research* 2012; 168:64-72
 Pan W. et al, *The Journal of Immunology*, 2004), 172:6167-6174
 Sivakolundu S. et al, *Journal of Medical Microbiology*, 2012
 30 Neuman de Vegvar et al, *Clinical Immunology* 111 (2004), 196-201
 Kufer SK, *Eur. Biophys.J.* (2005) 35:72-78
 Kindermann M. et al, *J. Am. Chem. Soc* (2003), 125, 7810-7811
 Engin S. et al, *Langmuir* 2010, 26(9), 6097-6101

35 **Listado de secuencias**

- <110> INSTITUT PASTEUR
- <120> INMUNOENSAYO DE CRIBADO MÚLTIPLEX
- 40 <130> 362007D30751
- <150> PCT EP2011/072387
- <151> 2011-12-09
- 45 <150> US 61/642,924
- <151> 2012-05-04
- <160> 153
- 50 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 238
- 55 <212> PRT
- <213> homo sapiens
- <400> 1

ES 2 648 899 T3

Met Leu Gly Gln Pro Ala Pro Leu Glu Arg Phe Ala Ser Arg Arg Pro
 1 5 10 15

Gln Val Leu Ala Val Arg Thr Val Cys Asp Leu Val Leu Gly Lys Met
 20 25 30

Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly
 35 40 45

Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu
 50 55 60

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

Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Cys Thr Ala Trp
 85 90 95

Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val
 100 105 110

Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln
 115 120 125

Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser
 130 135 140

Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Lys Ala Ala Arg Ala
 145 150 155 160

Val Gly Gly Ala Met Arg Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys
 165 170 175

His Arg Val Val Cys Ser Ser Gly Ala Val Gly Asn Tyr Ser Gly Gly
 180 185 190

Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly
 195 200 205

Lys Pro Gly Leu Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ala Gly Ala Trp Leu Lys
 210 215 220

Gly Ala Gly Ala Thr Ser Gly Ser Pro Pro Ala Gly Arg Asn
 225 230 235

5 <210> 2
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de SNAP

<400> 2

ES 2 648 899 T3

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
 1 5 10 15

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
 20 25 30

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
 35 40 45

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
 50 55 60

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
 65 70 75 80

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
 85 90 95

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
 100 105 110

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
 115 120 125

Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
 130 135 140

Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
 165 170 175

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser
 180 185 190

Leu

- 5 <210> 3
- <211> 404
- <212> ADN
- <213> Virus del dengue 1

- 10 <400> 3

taggcgcgcc agggctccctg gagggaggtg gcgggtctct gactttaaaa gggatgtcat	60
atgtgatgtg cacaggctca tttaagctag agaaggaagt ggctgagacc cagcatggaa	120
ctgtcctagt gcaggtaaaa tacgaaggaa cagatgcgcc atgcaagatc cccttttoga	180
cccaagatga gaaaggagtg acccagaatg ggagattgat aacagccaat cccatagtta	240
ctgacaaaga aaaaccaatc aacattgaga cagaaccacc ttttggtgag agctacatca	300
tagtaggggc aggtgaaaa gctttgaaac taagctggtt caagaaagga agcagcatag	360
ggaaaggagg tggccatcac catcaccatc actgatgacc gggt	404

- 15 <210> 4
- <211> 404

ES 2 648 899 T3

<212> ADN
<213> Virus del dengue 2

<400> 4

5 taggcgcgcc agggtcctcg gagggaggtg gcgggtctct acagctcaaa ggaatgtcat 60
 attctatgtg tacaggaaaag tttaaagttg tgaaggaat agcagaaaaca caacatggaa 120
 caatagtctc cagagtacaa tatgaagggg acggttctcc gtgcaagatc ccttttgaaa 180
 taatggattt ggaaaaaaga catgtcttag gtcgcttgat cacagtcaac ccaattgtta 240
 cagaaataga cagcccagtc aacatagaag cagaacctcc attcggagac agctacatca 300
 ttataggagt agaaccggga caactgaagc tcagctggtt taagaaagga agttccattg 360
 gccaaaggagg tggccatcac catcaccatc actgatgacc ggtt 404

<210> 5
<211> 401
<212> ADN
<213> Virus del dengue 3

<400> 5

10 taggcgcgcc agggtcctcg gagggaggtg gcgggtctga actcaagggg atgagctatg 60
 caatgtgctt gaataccttt gtgttgaaga aagaagtctc cgaaacgcag catgggacaa 120
 tactcattaa ggttgagtac aaaggggaag atgcacctg caagattcct ttctccacag 180
 aggatggaca agggaaagcc cacaatggta gactgatcac agccaacca gtggttacta 240
 agaaggagga gcctgtcaac attgaggctg aacctccttt tggggaaagc aacatagtga 300
 ttggagttgg agacaaagcc ttgaaaatta actggtacaa gaaggggaagc tcgattggga 360
 15 agggaggtgg ccatcaccat caccatcact gatgaccggt t 401

<210> 6
<211> 401
<212> ADN
<213> Virus del dengue 4

<400> 6

20 taggcgcgcc agggtcctcg gagggaggtg gcgggtctag aatcaagggg atgtcataca 60
 cgatgtgctc aggaaagttc tcaattgaca aagagatggc agaaacacag catgggacaa 120
 cagtggtgaa agtcaagtat gaaggtgctg gagctccgtg taaagtcccc atagagatac 180
 gagatgtaaa taaggaaaa gtggttgggc gtgtcatctc atccaccctc ctagctgaga 240
 ataccaacag tgtgaccaac atagaactgg aacccccctt tggggacagt tacatagtca 300
 taggtgttgg gaacagtgca ttgacactcc attggttcag gaaaggaagt tctattggca 360
 25 agggaggtgg ccatcaccat caccatcact gatgaccggt t 401

<210> 7
<211> 398
<212> ADN
<213> Virus del Nilo Occidental

<400> 7

30

ES 2 648 899 T3

taggcgcgcc aggaggtggc gggctctcagt tgaagggaac aacctatggc gtctgttcaa 60
 aggctttcaa gtttcttggg actcccgcag acacaggtca cggcactgtg gtgttggaat 120
 tgcagtacac tggcacggat ggaccttgca aagttcctat ctcgtcagtg gcttcattga 180
 acgacctaac gccagtgggc agattgggtca ctgtcaaccc ttttgtttca gtggccacgg 240
 ccaacgctaa ggtcctgatt gaattggaac cacccttgg agactcatac atagtgtgg 300
 gcagaggaga acaacagatc aatcaccatt ggcacaagtc tggaaagcagc attggcaaag 360
 gaggtggcca tcaccatcac catcactgat gaccgggt 398

<210> 8

<211> 410

5 <212> ADN

<213> Virus de la fiebre amarilla

<400> 8

taggcgcgcc aggggtccctg gagggaggtg gcgggctctc agctttgaca ctcaagggga 60
 catcctacaa aatgtgcact gacaaaatgt cttttgtcaa gaacccaact gacactggcc 120
 atggcactgt tgtgatgcag gtgaaagtgc caaaaggagc cccctgcaag attccagtga 180
 tagtagctga tgatcttaca gcggaatca ataaaggcat tttggttaca gttaaccca 240
 tcgcctcaac caatgatgat gaagtgtga ttgaggtgaa cccacctttt ggagacagct 300
 acattatcgt tgggacagga gattcacgtc tcacttacca gtggcacaaa gaggggaagct 360
 caataggaaa gggaggtggc catcaccatc accatcactg atgaccgggt 410

<210> 9

<211> 410

<212> ADN

15 <213> Virus de la encefalitis japonesa

<400> 9

taggcgcgcc aggggtccctg gagggaggtg gcgggctctgc tctgaaaggc acaacctatg 60
 gcatgtgtac agaaaaattc tcgttcgcga aaaatccggc ggacactggt cacggaacag 120
 ttgtcattga actctcttac tctgggagtg atggcccctg caaaattccg attgtctccg 180
 tcgcgagcct caatgacatg actcctgttg ggcggctggt gacagtgaac ccctttgtcg 240
 cggcttccag tgccaactca aagtgctgg tcgagatgga accccccttc ggagactcct 300
 atatcgtggt tgggaagggga gacaagcaga tcaaccacca ttggcacaga gctggaagca 360
 cgctgggcaa gggaggtggc catcaccatc accatcactg atgaccgggt 410

<210> 10

<211> 397

<212> ADN

25 <213> Virus del Zika

<400> 10

ES 2 648 899 T3

	gcgcgccagg aggtggcggg tctcttagat tgaagggcgt gtcatactcc ttgtgtaccg	60
	cagcgttcac attcaccaag atcccggctg aaacactgca cgggacagtc acagtggagg	120
	tacagtacgc agggacagat ggaccctgca aggttccagc tcagatggcg gtggacatgc	180
	aaactctgac cccagttggg aggtgataa ccgctaacc tgtaatcact gaaagcactg	240
	agaactctaa gatgatgctg gaacttgatc caccatttgg ggactcttac attgtcatag	300
	gagtcgggga gaagaagatc acccatcact ggcacaggag tggcagcacc attggaaaag	360
	gaggtggcca tcacatcac catcactgat gaccggt	397
	<210> 11	
	<211> 385	
5	<212> ADN	
	<213> Virus de Wesselbron	
	<400> 11	
	gcgcgccagg aggtggcggg ctcatcctga aaggttcaac ctactcaatg tgcaaaagag	60
	ggatgtcctt tgctaagcaa ccagttgaga cagaccatgg aacagcagtg atgcagataa	120
	aagttacaac tggagctccg tgcagaattc cagtgattgc agcagattcc atggcgggaa	180
	cagaaaaccg tgggaagctc atcacaacca atcctattgc tgcgtcaaac aatgatgaag	240
	tgttggtgga gatcagcca ccatttggag agagttacat catcgttggg aatggagatg	300
	ataaacttac ataccactgg caaagatcag gaagcaccat cgggaatgga ggtggccatc	360
10	accatcacca tcaactgatga ccggt	385
	<210> 12	
	<211> 397	
	<212> ADN	
15	<213> Virus de Rocio	
	<400> 12	
	gcgcgccagg aggtggcggg tctctcaaaa tcaaagggtc aacatactg atgtgcaagg	60
	acaaatttgc ttttgccaag aaccagttg acacaggaca cggcacaatc gtgacggagg	120
	tacagtacgc tggttctgat gggccatgca ggattccaat caccatgacc gagaacctac	180
	atgatctcac tcccatcgga cgattggtga cggatcaatcc atttgttccc tcatccgaga	240
	cggcacaaaa aattttgatt gaactcgagc cccccttgg gacatccttc atactggtgg	300
	gtacaggtcc caaccagtg aaataccagt ggcataagtc tggtagtgtg atcggaaaag	360
20	gaggtggcca tcacatcac catcactgat gaccggt	397
	<210> 13	
	<211> 397	
	<212> ADN	
25	<213> Virus de la encefalitis de Murray	
	<400> 13	

ES 2 648 899 T3

gcgcgccagg aggtggcggg tctttgaaac tgaaaggaac cacttatggg atgtgcacag 60
 aaaaatttac tttctcaaag aatccagccg acaccggaca tggcacggta gtactagaac 120
 tgcagtacac cgggagtgat ggaccatgca aaattccaat atcctctgta gcaagtctca 180
 atgacatgac gcctgtcggg agaatgggga cagctaatac atatgtagct tcatcaactg 240
 ccaatgctaa agttctgggt gagattgaac cacccttcgg agactcatac attgtggtag 300
 gcaggggaga caagcagatc aatcaccact ggcataagga gggtagttca attggcaaag 360
 gaggtggcca tcaccatcac catcactgat gaccggg 397

<210> 14
 <211> 397
 5 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis de Saint-Louis

<400> 14

gcgcgccagg aggtggcggg tctgttaaaa tcaaggggac gacatatggt atgtgtgact 60
 ctgctttcac cttcagcaag aaccctgctg acacagggca tgggacagtg atcgtggaac 120
 tgcagtacac tggaagcaac ggaccatgcc gggttcccat ttctgtgact gcaaacctca 180
 tggacttgac accagttgga agactgggca cgggcaatcc ctttattagc acagggggag 240
 cgaacaacaa ggtcatgatc gaagtgaac cacccttgg cgactcttac atcgtcgtcg 300
 gaagaggcac caccagatc aactaccact ggcacaaaga ggggaagcagc attggggaag 360
 10 gaggtggcca tcaccatcac catcactgat gaccggg 397

<210> 15
 <211> 579
 <212> ADN
 15 <213> artificial

<220>
 <223> ADN que codifica SNAP original (contenido de G/C normal)

<400> 15

agatctgaca aagactgcga aatgaagcgc accaccctgg atagccctct gggcaagctg 60
 gaactgtctg ggtgcgaaca gggcctgcac gagatcaagc tgctgggcaa aggaacatct 120
 gccgcccagc ccgtggaagt gcctgccccca gccgcccgtg tggcgggacc agagccactg 180
 atgcaggcca ccgcctggct caacgcctac tttcaccagc ctgaggccat cgaggagttc 240
 cctgtgccag ccctgcacca ccagtggtc cagcaggaga gctttaccgc ccaggtgctg 300
 tggaaactgc tgaaagtggg gaagttcgga gaggtcatca gctaccagca gctggccggc 360
 ctggcccggca atcccgccgc caccgccgcc gtgaaaaccg ccctgagcgg aaatcccgtg 420
 cccattctga tcccctgcca ccgggtgggt tctagctctg gcgccgtggg gggctacgag 480
 ggcgggctcg ccgtgaaaga gtggctgctg gccacgagg gccacagact gggcaagcct 540
 gggctgggtc ctgcaggtat aggcgcgcca ggggtcccta 579

<210> 16
 <211> 235
 <212> PRT
 25 <213> artificial

ES 2 648 899 T3

<220>

<223> Proteína N mutada del virus de Schmallerberg

<400> 16

5

```

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

```

10

<210> 17

<211> 707

<212> ADN

<213> artificial

15

<220>

<223> Secuencia de ADN mutada que codifica la proteína N del virus de Schmallerberg

ES 2 648 899 T3

<400> 17

```

gatatctcaa gccaatcat ttttgaagat gtaccacaac ggaatgcagc tacatttaac      60
ccggaggtcg ggtatgtggc atttattggc aagtatgggc aacaactcaa cttcggtggt      120
gctagagtct tcttcctcaa ccagaagaag gccaaagatgg tcctacataa gacggcacia      180
ccaagtgtcg atcttacttt tgggtggggc aaatttacag tggtaataa ccattttccc      240
caatatgtct caaatcctgt gccagacaat gccattacac ttcacaggat gtcaggttat      300
ctagcacggt ggattgtgta tacatgcaag gctagtgtcc tcaaactagc tgaagctagt      360
gctcagattg tcatgcccct tgctgagggt aagggatgca cctgggccga tggttataca      420
atgtatcttg gatttgcacc tggggccgaa atgttccttg atgcttttga cttctatcca      480
ctagttattg aaatgcatag ggtcctcaag gacaatatgg atgtaaattt tatgaaaaaa      540
gtcctccgcc aacgctatgg aacaatgact gctgaagaat ggatgactca gaaaataaca      600
gaaataaaag ctgcttttaa ttctgttggc cagcttgctt gggccaaatc tggattctct      660
cctgctgcta gaaccttctt gcagcaattc ggtatcaaca tcccggg      707
    
```

5 <210> 18
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> mus musculus

10 <400> 18

```

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

Gly Lys Met Glu Leu Ser Gly Cys Glu Arg Gly Leu His Gly Ile Arg
20          25          30

Leu Leu Ser Gly Lys Thr Pro Asn Thr Asp Pro Thr Glu Ala Pro Ala
35          40          45

Thr Pro Glu Val Leu Gly Gly Pro Glu Gly Val Pro Glu Pro Leu Val
50          55          60

Gln Cys Thr Ala Trp Leu Glu Ala Tyr Phe Arg Glu Pro Ala Ala Thr
65          70          75          80

Glu Gly Leu Pro Leu Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Asp
85          90          95

Ser Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe
100         105         110
    
```

ES 2 648 899 T3

Gly Glu Thr Val Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro
 115 120 125

Lys Ala Ala Arg Ala Val Gly Gly Ala Met Arg Ser Asn Pro Val Pro
 130 135 140

Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Arg Ser Asp Gly Ala Ile Gly
 145 150 155 160

His Tyr Ser Gly Gly Gly Gln Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His
 165 170 175

Glu Gly Ile Pro Thr Gly Gln Pro Ala Ser Lys Gly Leu Gly Leu Thr
 180 185 190

Gly Thr Trp Leu Lys Ser Ser Phe Glu Ser Thr Ser Ser Glu Pro Ser
 195 200 205

Gly Arg Asn
 210

<210> 19
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

5

<400> 19

Met Ala Glu Ile Cys Lys Met Lys Tyr Thr Val Leu Asp Ser Pro Leu
 1 5 10 15

Gly Lys Ile Glu Leu Ser Gly Cys Glu Arg Gly Leu His Gly Ile Arg
 20 25 30

Phe Leu Ser Gly Lys Thr Pro Asn Thr Asp Pro Thr Glu Ala Pro Ala
 35 40 45

Cys Pro Glu Val Leu Gly Gly Pro Glu Gly Val Pro Glu Pro Leu Val
 50 55 60

Gln Cys Thr Ala Trp Leu Glu Ala Tyr Phe His Glu Pro Ala Ala Thr
 65 70 75 80

Glu Gly Leu Pro Leu Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Asp
 85 90 95

Ser Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe
 100 105 110

10

ES 2 648 899 T3

Gly Glu Met Val Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro
 115 120 125

Lys Ala Ala Arg Ala Val Gly Gly Ala Met Arg Ser Asn Pro Val Pro
 130 135 140

Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val Ile Arg Ser Asp Gly Ala Ile Gly
 145 150 155 160

Asn Tyr Ser Gly Gly Gly Gln Thr Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His
 165 170 175

Glu Gly Ile Pro Thr Gly Gln Pro Ala Ser Lys Gly Leu Gly Leu Ile
 180 185 190

Gly Ser Trp Leu Lys Pro Ser Phe Glu Ser Ser Ser Pro Lys Pro Ser
 195 200 205

Gly

- <210> 20
- <211> 963
- <212> ADN
- <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica SNAP – enlazador - DEN1 EDIII – enlazador - Histag

<400> 20

```

agatctgaca aagactgcga aatgaagcgc accaccctgg atagccctct gggcaagctg      60
gaactgtctg ggtgcgaaca gggcctgcac gagatcaagc tgctgggcaa aggaacatct      120
gccgccgacg ccgtggaagt gcctgcccga gccgccgtgc tgggaggacc agagccactg      180
atgcaggcca ccgcctggct caacgcctac tttcaccagc ctgaggccat cgaggagtct      240
cctgtgccag cctgcacca cccagtgttc cagcaggaga gctttaccgg ccaggtgctg      300
tggaaactgc tgaaagtgtg gaagttcgga gaggtcatca gctaccagca gctggccgcc      360
ctggccggca atcccgccgc caccgccgcc gtgaaaaccg ccctgagcgg aaatcccgtg      420
cccattctga tcccctgccg ccgggtggtg tctagctctg gcgccgtggg gggctacgag      480
ggcgggctcg ccgtgaaaga gtggctgctg gccacgagg gccacagact gggcaagcct      540
gggctgggtc ctgcaggtat aggcgcgcca gggtcctctg agggagggtg cgggtctctg      600
actttaaag ggatgtcata tgtgatgtgc acaggctcat ttaagctaga gaaggaagtg      660
gctgagaccg agcatggaac tgtcctagtg caggttaaat acgaaggaac agatgcgcca      720
tgcaagatcc ccttttcgac ccaagatgag aaaggagtga ccagaatgg gagattgata      780
acagccaatc ccatagttac tgacaaagaa aaaccaatca acattgagac agaaccacct      840
tttggtgaga gctacatcat agtaggggca ggtgaaaaag ctttgaaact aagctggttc      900
aagaaaggaa gcagcatagg gaaaggaggt ggccatcacc atcaccatca ctgatgaccg      960
gtt                                                                 963
    
```

<210> 21

ES 2 648 899 T3

<211> 316
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> SNAP - enlazador - DEN1 EDIII - enlazador - Histag

<400> 21

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
 1 5 10 15

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
 20 25 30

Lys Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala
 35 40 45

Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr Ala
 50 55 60

Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro
 65 70 75 80

Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg
 85 90 95

Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile
 100 105 110

Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr Ala
 115 120 125

Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro
 130 135 140

Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu Gly
 145 150 155 160

10 Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu

ES 2 648 899 T3

	165		170		175										
Gly	Lys	Pro	Gly	Leu	Gly	Pro	Ala	Gly	Ile	Gly	Ala	Pro	Gly	Ser	Leu
			180					185					190		
Glu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu	Thr	Leu	Lys	Gly	Met	Ser	Tyr	Val	Met
		195					200					205			
Cys	Thr	Gly	Ser	Phe	Lys	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Glu	Thr	Gln	His
	210					215					220				
Gly	Thr	Val	Leu	Val	Gln	Val	Lys	Tyr	Glu	Gly	Thr	Asp	Ala	Pro	Cys
225					230					235					240
Lys	Ile	Pro	Phe	Ser	Thr	Gln	Asp	Glu	Lys	Gly	Val	Thr	Gln	Asn	Gly
				245					250					255	
Arg	Leu	Ile	Thr	Ala	Asn	Pro	Ile	Val	Thr	Asp	Lys	Glu	Lys	Pro	Ile
			260					265						270	
Asn	Ile	Glu	Thr	Glu	Pro	Pro	Phe	Gly	Glu	Ser	Tyr	Ile	Ile	Val	Gly
		275					280					285			
Ala	Gly	Glu	Lys	Ala	Leu	Lys	Leu	Ser	Trp	Phe	Lys	Lys	Gly	Ser	Ser
	290					295					300				
Ile	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His
305					310										

<210> 22
 <211> 54
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica la secuencia de ssBiP

10 <400> 22

54 atgaagttat gcatattact ggccgctcgtg gcctttgttg gcctctcgct cggg

15 <210> 23
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> ADN artificial que codifica la secuencia señal de BiP-like = péptido señal de ssBiP de insecto + señal de DEN1prM del sitio de escisión

25 <400> 23

atgaaactat gtattctact tgcagttggtt gcgcttcgtag gattgtcctt acctacagct 60
 ctggca 66

30 <210> 24
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>

ES 2 648 899 T3

<223> Secuencia señal de BiP-like = péptido señal de ssBiP de insecto + señal de DEN1prM del sitio de escisión

<400> 24

Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser
 1 5 10 15

5 Leu Pro Thr Ala Leu Ala
 20

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos del espaciador

15 <400> 25

Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 26

20 <211> 12

<212> ADN

<213> artificial

<220>

25 <223> Secuencia de ADN del espaciador

<400> 26

12 ggtggcggat ct

30

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

35

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de HIS TAG

<400> 27

40

His His His His His His
 1 5

<210> 28

<211> 18

45 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN que codifica His Tag

50

<400> 28

18 catcatcatc atcatcat

55

<210> 29

<211> 21

<212> ADN

<213> artificial

60

<220>

<223> ADN que codifica el sitio 1 de escisión de pro-TEV
 <400> 29

5 21 gaaaacctgt actccagag c
 <210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> artificial

<220>
 <223> ADN que codifica el sitio 2 de escisión de pro-TEV

15 <400> 30

21 gagaatctat atttcaagg g
 <210> 31
 <211> 530
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 25 <223> Secuencia de SNAP-like con contenido bajo de G/C

<400> 31

gacaaagact gcgaaatgaa aagaactaca ttggattcac cacttgggaa gttggaactg	60
agtggatgcg agcaaggatt gcatgaaatt aagctactgg gaaaaggaac ttctgctgct	120
gatgcagttg aagttccagc accagcagct gttcttggag gtcctgagcc cctcatgcaa	180
gccacagcct ggcttaacgc atatttccac cagcctgagg ccattgagga atttccagtc	240
cccgcccttc accatcctgt gtttcagcag gagagcttca cccgccaggt cctgtggaaa	300
ttgctgaagg tggtaagtt tggtaagtg atttcatatc agcaacttgc tgcattggcc	360
ggtaaccccg cagctacagc tgccgtgaaa actgctctca gcggaatcc tgtgcccatac	420
ctgatccctt gtcacagagt cgtttcatct tccggagctg taggtggcta tgaaggagga	480
ctggcagtta aggagtggct gctggctcat gaaggtcata gacttggaaa	530

30 <210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

35 <220>
 <223> Sitio 1 de escisión de pro-TEV

<400> 32

40 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser
 1 5

<210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Sitio 2 de escisión de pro-TEV

50 <400> 33

ES 2 648 899 T3

```

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gcctttgttg gcctctcgct cgggagatct 60
gacaaagact gcgaaatgaa aagaactaca ttggattcac cacttgggaa gttggaactg 120
agtggatgcg agcaaggatt gcatgaaatt aagctactgg gaaaaggaac ttctgctgct 180
gatgcagttg aagttccagc accagcagct gttcttggag gtccctgagcc cctcatgcaa 240
gccacagcct ggcttaacgc atatttccac cagcctgagg ccattgagga atttccagtc 300
cccgcccttc accatcctgt gtttcagcag gagagcttca cccgccaggt cctgtggaaa 360
ttgctgaagg tggtaagtt tggtaagtg atttcatatc agcaacttgc tgcattggcc 420
ggtaaccccg cagctacagc tgccgtgaaa actgctctca gcggaaatcc tgtgccatc 480
ctgatccctt gtcacagagt cgtttcatct tccggagctg taggtggcta tgaaggagga 540
ctggcagtta aggagtggct gctggctcat gaaggcata gacttggaaa gcctgggctg 600
ggtcctgctg gtataggcgc gccagggctc ctaggtggcg gatccgaaaa cctgtacttc 660
cagagcgata tctcaagcca attcattttt gaagatgtac cacaacggaa tgcagctaca 720
tttaacccgg aggtcgggta tgtggcattt attggaagt atgggcaaca actcaacttc 780
gggtgtgcta gagtcttctt cctcaaccag aagaaggcca agatggctcct acataagacg 840
gcacaaccaa gtgtcgcgat tacttttggg ggggtcaaat ttacagtggg taataaccat 900
tttcccaat atgtctcaaa tcctgtgcca gacaatgcca ttacacttca caggatgtca 960
ggttatctag cacgttggat tgctgatata tgcaaggcta gtgtcctcaa actagctgaa 1020
gctagtgtc agattgtcat gcccttgct gaggttaagg gatgcacctg ggcgatggt 1080
tatacaatgt atcttggatt tgcacctggg gccgaaatgt tccttgatgc ttttgacttc 1140
tatccactag ttattgaaat gcatagggtc ctcaaggaca atatggatgt aaattttatg 1200
aaaaaagtcc tccgccaacg ctatggaaca atgactgctg aagaatggat gactcagaaa 1260
ataacagaaa taaaagctgc ttttaattct gttggacagc ttgcctgggc caaatctgga 1320
ttctctcctg ctgctagaac cttcttgag caattcggta tcaacatccc gggagagaat 1380
ctatattttc aagggcccgg cggaggtagt caccatcatc accatcacta atgaccggt 1439

```

<210> 36
 <211> 1480
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Casete de ADN pDeSNAP Univ +SBV.N (BIPlike - SNAPlike-SBV.N -proTEV/Histag)

10

<400> 36

ES 2 648 899 T3

tcgcgagcta gcaccatgaa actatgtatt ctacttgcag ttgttgcgtt cgtaggattg 60
 tccttaccta cagctctggc aagatctgac aaagactgcg aatgaaaag aactacattg 120
 gattcaccac ttgggaagtt ggaactgagt ggatgcgagc aaggattgca tgaattaag 180
 ctactgggaa aaggaacttc tgctgctgat gcagttgaag ttccagcacc agcagctggt 240
 cttggaggtc ctgagcccct catgcaagcc acagcctggc ttaacgcata tttccaccag 300
 cctgaggcca ttgaggaatt tocagtcccc gcccttcacc atcctgtggt tcagcaggag 360
 agcttaccac gccaggctct gtggaaattg ctgaagggtg tcaagtttg tgaagtgatt 420
 tcatatcagc aacttgctgc attggccggt aaccccgag ctacagctgc cgtgaaaact 480
 gctctcagcg gaaatcctgt gcccatcctg atcccttgc acagagtctg ttcattctcc 540
 ggagctgtag gtggctatga aggaggactg gcagttaagg agtggctgct ggctcatgaa 600
 ggtcatagac ttggaaagcc tgggctgggt cctgctggta taggcgcgcc agggctcccta 660
 ggtggcggat cggaaaacct gtacttccag agcgatatct caagccaatt catttttgaa 720
 gatgtaccac aacggaatgc agctacattt aacccggagg tcgggtatgt ggcatttatt 780
 ggtaagtatg ggcaacaact caacttcggt gttgctagag tcttcttct caaccagaag 840
 aaggccaaga tggctctaca taagacggca caaccaagtg tcgatcttac ttttggtggg 900
 gtcaaattta cagtggtaa taaccatttt cccaatatg tctcaaatcc tgtgccagac 960
 aatgccatta cacttcacag gatgtcaggt tatctagcac gttggattgc tgatacatgc 1020
 aaggctagtg tcctcaaact agctgaagct agtgctcaga ttgtcatgcc ccttgctgag 1080
 gttaagggat gcacctgggc cgatggttat acaatgtatc ttggatttgc acctggggcc 1140
 gaaatgttcc ttgatgcttt tgacttctat ccactagtta ttgaaatgca tagggtcctc 1200
 aaggacaata tggatgtaaa ttttatgaaa aaagtcctcc gccaacgcta tggacaatg 1260
 actgctgaag aatggatgac tcagaaaata acagaaataa aagctgcttt taattctggt 1320
 ggacagcttg cctgggcca atctggattc tctcctgctg ctagaacctt cttgcagcaa 1380
 ttcggtatca acatcccggg agagaatcta tattttcaag ggcccggcgg aggtagtcaac 1440
 catcatcacc atcactaatg accggtgcgg ccgcaagctt 1480

<210> 37
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la secuencia de ssBiP

10

<400> 37

Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser
 1 5 10 15

Leu Gly

15

<210> 38
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Cepa IS-98-ST1 del virus del Nilo Occidental

ES 2 648 899 T3

<400> 38

Met Val Val Phe Val Val Leu Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser
1 5 10 15

Leu

5

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Virus del dengue

10

<400> 39

Pro Thr Ala Leu Ala

1 5

15

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

20

<220>

<223> Sitio de escisión de enterocinasa

<400> 40

Asp Asp Asp Asp Lys Asp

1 5

25

<210> 41

<211> 480

<212> PRT

<213> artificial

30

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de BiPlike+SNAPlike+proTEV+SBV.N+proTEV+Histag

35

<400> 41

ES 2 648 899 T3

Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Ala Leu Ala Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg
 20 25 30

Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu
 35 40 45

Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala
 50 55 60

Asp Ala Val Glu Val Pro Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu
 65 70 75 80

Pro Leu Met Gln Ala Thr Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro
 85 90 95

Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe
 100 105 110

Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val
 115 120 125

Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala
 130 135 140

Gly Asn Pro Ala Ala Thr Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn
 145 150 155 160

Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly
 165 170 175

Ala Val Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu
 180 185 190

Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly
 195 200 205

Ile Gly Ala Pro Gly Ser Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr Phe
 210 215 220

Gln Ser Asp Ile Ser Ser Gln Phe Ile Phe Glu Asp Val Pro Gln Arg
 225 230 235 240

ES 2 648 899 T3

Asn Ala Ala Thr Phe Asn Pro Glu Val Gly Tyr Val Ala Phe Ile Gly
 245 250 255

Lys Tyr Gly Gln Gln Leu Asn Phe Gly Val Ala Arg Val Phe Phe Leu
 260 265 270

Asn Gln Lys Lys Ala Lys Met Val Leu His Lys Thr Ala Gln Pro Ser
 275 280 285

Val Asp Leu Thr Phe Gly Gly Val Lys Phe Thr Val Val Asn Asn His
 290 295 300

Phe Pro Gln Tyr Val Ser Asn Pro Val Pro Asp Asn Ala Ile Thr Leu
 305 310 315 320

His Arg Met Ser Gly Tyr Leu Ala Arg Trp Ile Ala Asp Thr Cys Lys
 325 330 335

Ala Ser Val Leu Lys Leu Ala Glu Ala Ser Ala Gln Ile Val Met Pro
 340 345 350

Leu Ala Glu Val Lys Gly Cys Thr Trp Ala Asp Gly Tyr Thr Met Tyr
 355 360 365

Leu Gly Phe Ala Pro Gly Ala Glu Met Phe Leu Asp Ala Phe Asp Phe
 370 375 380

Tyr Pro Leu Val Ile Glu Met His Arg Val Leu Lys Asp Asn Met Asp
 385 390 395 400

Val Asn Phe Met Lys Lys Val Leu Arg Gln Arg Tyr Gly Thr Met Thr
 405 410 415

Ala Glu Glu Trp Met Thr Gln Lys Ile Thr Glu Ile Lys Ala Ala Phe
 420 425 430

Asn Ser Val Gly Gln Leu Ala Trp Ala Lys Ser Gly Phe Ser Pro Ala
 435 440 445

Ala Arg Thr Phe Leu Gln Gln Phe Gly Ile Asn Ile Pro Gly Glu Asn
 450 455 460

Leu Tyr Phe Gln Gly Pro Gly Gly Gly Ser His His His His His His
 465 470 475 480

<210> 42
 <211> 438
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión SNAP+SCHM.N (sin BiPlike + HisTag

10 <400> 42

ES 2 648 899 T3

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

ES 2 648 899 T3

Pro Glu Val Gly Tyr Val Ala Phe Ile Gly Lys Tyr Gly Gln Gln Leu
 225 230 235 240

Asn Phe Gly Val Ala Arg Val Phe Phe Leu Asn Gln Lys Lys Ala Lys
 245 250 255

Met Val Leu His Lys Thr Ala Gln Pro Ser Val Asp Leu Thr Phe Gly
 260 265 270

Gly Val Lys Phe Thr Val Val Asn Asn His Phe Pro Gln Tyr Val Ser
 275 280 285

Asn Pro Val Pro Asp Asn Ala Ile Thr Leu His Arg Met Ser Gly Tyr
 290 295 300

Leu Ala Arg Trp Ile Ala Asp Thr Cys Lys Ala Ser Val Leu Lys Leu
 305 310 315 320

Ala Glu Ala Ser Ala Gln Ile Val Met Pro Leu Ala Glu Val Lys Gly
 325 330 335

Cys Thr Trp Ala Asp Gly Tyr Thr Met Tyr Leu Gly Phe Ala Pro Gly
 340 345 350

Ala Glu Met Phe Leu Asp Ala Phe Asp Phe Tyr Pro Leu Val Ile Glu
 355 360 365

Met His Arg Val Leu Lys Asp Asn Met Asp Val Asn Phe Met Lys Lys
 370 375 380

Val Leu Arg Gln Arg Tyr Gly Thr Met Thr Ala Glu Glu Trp Met Thr
 385 390 395 400

Gln Lys Ile Thr Glu Ile Lys Ala Ala Phe Asn Ser Val Gly Gln Leu
 405 410 415

Ala Trp Ala Lys Ser Gly Phe Ser Pro Ala Ala Arg Thr Phe Leu Gln
 420 425 430

Gln Phe Gly Ile Asn Ile
 435

<210> 43
 <211> 4194
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> pMT/BiP/SNAP-Histag con casete DeSNAP Univ

<400> 43

ES 2 648 899 T3

tcgcgcgttt	cggtgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccc	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatattgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcagggccc	240
attcgccatt	caggctgcgc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcgggcc	tcttcgctat	300
tacgccagct	ggogaaggg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttgggta	acgccagggt	360
tttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgccag	tgaattttaa	cgttgcagga	420
caggatgtgg	tgcccgatgt	gactagctct	ttgctgcagg	ccgtcctatc	ctctggttcc	480
gataagagac	ccagaactcc	ggccccccac	cgccccaccg	cacccccata	catatgtggt	540
acgcaagtaa	gagtgcctgc	gcatgcccga	tgtgccccac	caagagtttt	gcatcccata	600
caagtcccca	aagtggagaa	ccgaaccaat	tcttcgoggg	cagaacaaaa	gcttctgcac	660
acgtctccac	tcgaatttgg	agccggccgg	cgtgtgcaaa	agaggtgaat	cgaacgaaag	720
acccgtgtgt	aaagccgctg	ttccaaaatg	tataaaaccg	agagcatctg	gccaatgtgc	780
atcagttgtg	gtcagcagca	aatcaagtg	aatcatctca	gtgcaactaa	aggggggatc	840
cgatctcaat	atgaagttat	gcatattact	ggccgtctgt	gcctttgttg	gcctctcgct	900
cgggagatct	gacaaagact	gcgaaatgaa	aagaactaca	ttggattcac	cacttgggaa	960
gttggaactg	agtggatgcg	agcaaggatt	gcatgaaatt	aagctactgg	gaaaaggaac	1020
ttctgctgct	gatgcagttg	aagttccagc	accagcagct	gttcttgag	gtcctgagcc	1080
cctcatgcaa	gccacagcct	ggcttaacgc	atatttcac	cagcctgag	ccattgagga	1140
atttccagtc	cccgccttc	accatcctgt	gtttcagcag	gagagcttca	cccgccaggt	1200
cctgtggaaa	ttgctgaagg	tggtcaagtt	tggtgaagtg	atttcatatc	agcaacttgc	1260
tgcatggcc	gtaaaccccg	cagctacagc	tgccgtgaaa	actgctctca	gcggaaatcc	1320
tgtgcccac	ctgatccctt	gtcacagagt	cgtttcatct	tccggagctg	taggtggcta	1380
tgaaggagga	ctggcagtta	aggagtggct	gctggctcat	gaaggtcata	gacttggaaa	1440
gcctgggctg	ggtcctgctg	gtataggcgc	gccagggtcc	ctaggtggcg	gatccgaaaa	1500
cctgtacttc	cagagcgata	tcggaggtgg	aggcccggga	gagaatctat	attttcaagg	1560
gccccgggga	ggtagtcacc	atcatcacca	tactaatga	ccggtcatca	tcaccatcac	1620
cattgagttt	aaacccgctg	atcagcctcg	actgtgcctt	ctaaggcctg	agctcgetga	1680
tcagcctoga	tcgaggatcc	agacatgata	agatacattg	atgagtttgg	acaaaccaca	1740
actagaatgc	agtgaaaaaa	atgctttatt	tgtgaaatth	gtgatgctat	tgctttatth	1800

ES 2 648 899 T3

gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca ttttatgttt 1860
 caggttcagg gggaggtgtg ggaggttttt taaagcaagt aaaacctcta caaatgtggt 1920
 atggctgatt atgatcagtc gacctgcagg catgcaagct tggcgtaatc atggctatag 1980
 ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc 2040
 ataaagtgta aagcctgggg tgcctaatga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgccg 2100
 tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa 2160
 cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg 2220
 ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatcgg 2280
 ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag 2340
 gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac 2400
 gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcga acccgacagg actataaaga 2460
 taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt 2520
 accggatacc tgtccgcctt tctcccttgg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc 2580
 tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacct 2640
 cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta 2700
 agacacgact tatcgcact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat 2760
 gtaggcgggt ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca 2820
 gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttgg gaaaaagagt tggtagctct 2880
 tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt 2940
 acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct 3000
 cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggctatga gattatcaaa aaggatcttc 3060
 acctagatcc ttttaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa 3120
 acttggctc acagttacca atgcttaatc agtgagcac ctatctcagc gatctgtcta 3180
 tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc 3240
 ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggtccagat 3300
 ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcga gaagtggccc tgcaacttta 3360
 tccgectcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt 3420
 aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg ctctctgttt 3480
 ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atccccatg 3540
 ttgtgcaaaa aagcggttag ctctctcggg cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc 3600
 gcagtgttat cactcatggg tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc 3660
 gtaagatgct tttctgtgac tgggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg 3720

ES 2 648 899 T3

cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca atacgggata ataccggcc acatagcaga	3780
actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta	3840
ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct	3900
tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaatgc cgcaaaaaag	3960
ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca atattattga	4020
agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat	4080
aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc	4140
attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgt	4194

<210> 44
 <211> 3458
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> pUC57 sin casete DeSNAP Univ

10

<400> 44

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
accatattgc gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc	240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat	300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt	360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaaat cgagctcggc acctcgcgaa	420
tgcatctaga tcgagctagc accatgaaac tatgtattct acttgcaatt gttgcgttcg	480
taggattgtc cttacctaca gctctggcaa gatctgacaa agactgcgaa atgaaaagaa	540
ctacattgga ttcaccactt gggaagttgg aactgagtgg atgcgagcaa ggattgcatg	600
aaattaagct actgggaaaa ggaacttctg ctgctgatgc agttgaagtt ccagcaccag	660
cagctgttct tggaggtcct gagcccctca tgcaagccac agcctggcct aacgcatatt	720
tccaccagcc tgaggccatt gaggaatttc cagtccccgc ccttcacat cctgtgtttc	780
agcaggagag cttcaccgca cagtcctgtg ggaaattgct gaagggtggtc aagtttgggtg	840
aagtgatttc atatcagcaa cttgctgcat tggccggtaa ccccgcagct acagctgccg	900
tgaaaactgc tctcagcggg aatcctgtgc ccatcctgat cccttgctac agagtcgttt	960
catcttccgg agctgtaggt ggctatgaag gaggactggc agttaaggag tggctgctgg	1020
ctcatgaagg tcatagactt ggaaagcctg ggctgggtcc tgctggtata ggccgcgccag	1080

ES 2 648 899 T3

ggtccctagg	tggcggatcc	gaaaacctgt	acttccagag	cgatatcgga	ggtggaggcc	1140
cgggagagaa	tctatatttt	caagggcccg	gcgagagtag	tcaccatcat	caccatcact	1200
aatgaccggt	gcgccgcaa	gcttggcgta	atcatggtca	tagctgtttc	ctgtgtgaaa	1260
ttgttatccg	ctcacaatte	cacacaacat	acgagccgga	agcataaagt	gtaaagcctg	1320
gggtgcctaa	tgagtgagct	aactcacatt	aattgcgttg	cgctcactgc	ccgctttcca	1380
gtcgggaaac	ctgtcgtgcc	agctgcatta	atgaatcggc	caacgcgcgg	ggagagcggg	1440
tttgcgtatt	gggcgctctt	ccgcttcctc	gctcactgac	tcgctgcgct	cggtcgttcg	1500
gctgcggcga	gcggtatcag	ctcactcaaa	ggcggtaata	cggttatcca	cagaatcagg	1560
ggataaacga	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	1620
ggccgcggtg	ctggcgtttt	tccataggct	ccgccccctc	gacgagcatic	acaaaaatcg	1680
acgctcaagt	cagagggtgc	gaaaccgcac	aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	1740
tggaagctcc	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	gaccctgccc	cttaccggat	acctgtccgc	1800
ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgctttc	tcatagctca	cgctgtaggt	atctcagttc	1860
ggtgtaggtc	gttcgctcca	agctgggctg	tgtgcacgaa	cccccgttc	agcccgaccg	1920
ctgcgcctta	tccgtaact	atcgtcttga	gtccaaccog	gtaagacacg	acttatcgcc	1980
actggcagca	gccactggta	acaggattag	cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	2040
gttcttgaag	tggtggccta	actacggcta	cactagaaga	acagtatttg	gtatctgcgc	2100
tctgctgaag	ccagttacct	tcggaaaaag	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaaac	2160
caccgctggt	agcgggtggt	tttttgtttg	caagcagcag	attaccgcca	gaaaaaaagg	2220
atctcaagaa	gatcctttga	tctttctac	ggggtctgac	gctcagtgga	acgaaaactc	2280
acgttaaggg	atthtggta	tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tccttttaaa	2340
ttaaaaatga	agttttaaat	caatctaaag	tatatatgag	taaacttggg	ctgacagtta	2400
ccaatgctta	atcagtgagg	cacctatctc	agcgatctgt	ctatttcggt	catccatagt	2460
tgctgactc	cccgtcgtgt	agataactac	gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	2520
tgctgcaatg	ataccgcgag	accacgcctc	accggctcca	gatttatcag	caataaacca	2580
gccagccgga	agggccgagc	gcagaagtgg	tcctgcaact	ttatccgcct	ccatccagtc	2640
tattaattgt	tgccgggaag	ctagagtaag	tagttcgcca	gttaatagtt	tgcgcaacgt	2700
tgttgccatt	gctacaggca	tcgtggtgtc	acgctcgtcg	tttggatggg	cttcattcag	2760
ctccggttcc	caacgatcaa	ggcgagttac	atgatcccc	atggtgtgca	aaaaagcggg	2820
tagctccttc	ggtcctccga	tcgttgcag	aagtaagttg	gccgcagtgt	tatcactcat	2880
ggttatggca	gcactgcata	attctcttac	tgctcatgcca	tcgtaagat	gcttttctgt	2940
gactggtgag	tactcaacca	agtcattctg	agaatagttg	atgcggcgac	cgagttgctc	3000

ES 2 648 899 T3

ttgcccgcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgctcat	3060
cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag	3120
ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt	3180
ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg	3240
gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta	3300
ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc	3360
gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt	3420
aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtc	3458

<210> 45
 <211> 6365
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> pcADN3 con casete DeSNAP Univ

10

<400> 45

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcaactc cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggctcgt gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcggc atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaataca ttacggggtc attagttcat agcccatata	300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgc tggctgaccg cccaacgacc	360
cccggccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggag tatttacggg aaactgccc cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca	600
tcgctattac catgggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttgccacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgctgta acaactcgc cccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcaactatg ggagacccaa gctggctagc	900
accatgaaac tatgtattct acttgcagtt gttgcgttcg taggattgtc cttacctaca	960
gctctggcaa gatctgacaa agactgcgaa atgaaaagaa ctacattgga ttcaccactt	1020
gggaagtgg aactgagtgg atgcgagcaa ggattgcatg aaattaagct actgggaaaa	1080

ES 2 648 899 T3

ggaacttctg ctgctgatgc agttgaagtt ccagcaccag cagctgttct tggaggtcct 1140
 gagccctca tgcaagccac agcctggctt aacgcatatt tccaccagcc tgaggccatt 1200
 gaggaatttc cagtccccgc ccttcaccat cctgtgtttc agcaggagag cttcaccocg 1260
 caggtcctgt ggaaattgct gaaggtggtc aagtttggg aagtgatttc atatcagcaa 1320
 cttgctgcat tggccggtaa ccccgagct acagctgccg tgaaaactgc tctcagcgga 1380
 aatcctgtgc ccatcctgat cccttgtcac agagtcgttt catcttccgg agctgtaggt 1440
 ggctatgaag gaggactggc agttaaggag tggctgctgg ctcatgaagg tcatagactt 1500
 ggaaagcctg ggctgggtcc tgctggtata ggcgcgccag ggtccctagg tggcggatcc 1560
 gaaaaacctg acttcagag cgatatcgga ggtggaggcc cgggagagaa tctatatttt 1620
 caaggccccg gcggaggtag tcaccatcat caccatcact aatgaccggt gcggccgcaa 1680
 gcttggtagc gagctcggat ccactagtc agtgtggtgg aattctgcag atatccagca 1740
 cagtggcggc cgctcgagtc tagagggccc gtttaaacc gctgatcagc ctcgactgtg 1800
 ccttctagtt gccagccatc tgttgtttgc cctcccccg tgccttcctt gacctggaa 1860
 ggtgccactc ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt 1920
 aggtgtcatt ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa 1980
 gacaatagca ggcagctggg ggatgcggtg ggctctatgg cttctgaggc ggaaagaacc 2040
 agctggggct ctagggggtg tccccacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt 2100
 gtgtgggta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgtcctttc 2160
 gctttcttc ctctctttct cgcacgcttc gcgggtttc ccctcaagc tctaaatcgg 2220
 gggctccct tagggttcg atttagtgt ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat 2280
 tagggtgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg 2340
 ttggagtcca cgttctttta tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaacct 2400
 atctcggctc attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa 2460
 aatgagctga ttttaaaaa atttaacgcg aattaattct gtggaatgtg tgtcagttag 2520
 ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 2580
 agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 2640
 tgcactcaaa ttagtcagca accatagtc cgcctctaac tccgccatc ccgccctaa 2700
 ctccgccag ttcgcccat tctccgcc ctaggctgact aatttttttt atttatgcag 2760
 aggccgaggc cgcctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag 2820
 gcctaggctt ttgcaaaaag ctccccggag cttgtatata cattttcggg tctgatcagc 2880
 acgtgatgaa aaagcctgaa ctcaccgca cgtctgtcga gaagtttctg atcgaaaagt 2940
 tcgacagcgt ctccgacctg atgcagctct cggagggcga agaattctct gctttcagct 3000

ES 2 648 899 T3

tcgatgtagg agggcgtgga tatgtcctgc gggtaaatag ctgcgccgat ggttttetaca 3060
 aagatcgtta tgtttatcgg cactttgcat cggccgcgct cccgattccg gaagtgcttg 3120
 acattgggga attcagcgag agcctgacct attgcatctc ccgccgtgca cagggtgtca 3180
 cgttgcaaga cctgcctgaa accgaactgc ccgctgttct gcagccggtc gcggaggcca 3240
 tggatgcat cgctgcggcc gatcttagcc agacgagcgg gttcggccca ttcggaccgc 3300
 aaggaatcgg tcaatacact acatggcgtg atttcatatg cgcgattgct gatccccatg 3360
 tgtatcactg gcaactgtg atggacgaca ccgtcagtgc gtccgtcggc caggctctcg 3420
 atgagctgat gctttgggcc gaggactgcc ccgaagtccg gcacctcgtg caccgggatt 3480
 tcggctccaa caatgtcctg acggacaatg gccgcataac agcggtcatt gactggagcg 3540
 aggcgatggt cggggattcc caatacagag tcgccaacat cttcttctgg aggcctggt 3600
 tggcttgtat ggagcagcag acgcgctact tcgagcggag gcatccggag cttgcaggat 3660
 cgcgcggct ccgggcgtat atgctccgca ttggtcttga ccaactctat cagagcttgg 3720
 ttgacggcaa tttcgatgat gcagcttggg cgcagggctg atgcgacgca atcgtccgat 3780
 ccggagccgg gactgtcggg cgtacacaaa tcgcccgag aagcgcggcc gtctggaccg 3840
 atggctgtgt agaagtactc gccgatagtg gaaaccgacg ccccgact cgtccgaggg 3900
 caaaggaata gcacgtgcta cgagatttcg attccaccgc cgccttctat gaaaggttg 3960
 gcttcggaat cgttttccgg gacgccggct ggatgatcct ccagcgggg gatctcatgc 4020
 tggagttctt cggccacccc aactgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 4080
 atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt 4140
 ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct gtataccgtc gacctctagc tagagcttgg 4200
 cgtaatcatg gtcatactg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca 4260
 acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag cctggggtgc ctaatgagtg agctaactca 4320
 cattaattgc gttgcgctca ctgcccgctt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc 4380
 attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggggcg tcttccgctt 4440
 cctcgtcac tgactcgtg cgctcggctg ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact 4500
 caaaggcggg aatacggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag 4560
 caaaaggcca gaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata 4620
 ggctccgcc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaacc 4680
 cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg 4740
 ttcgacctt gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc 4800
 tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg 4860

ES 2 648 899 T3

gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc accgctgccc cttatccggt aactatcgtc 4920
 ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga 4980
 ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg 5040
 gctacactag aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagt accttcggaa 5100
 aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ttttttgttt 5160
 gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta 5220
 cggggctctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttgggc atgagattat 5280
 caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa 5340
 gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct 5400
 cagcgatctg tctatctcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta 5460
 cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgca gaccacgct 5520
 caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg 5580
 gtccctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa 5640
 gtagttcggc agttaatagt ttgcaaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt 5700
 cacgctcgtc gtttggtagt gcttcattca gctccgggtc ccaacgatca aggcgagtta 5760
 catgatcccc catgttgtgc aaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtca 5820
 gaagtaagtt ggcgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta 5880
 ctgtcatgcc atccgtaaga tgctttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct 5940
 gagaatagtg tatgcccga cagagttgct cttgccggc gtcaatacgg gataataccg 6000
 cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acggttcttcg gggcgaaaa 6060
 tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcagatga acccactcgt gcaccaact 6120
 gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa 6180
 atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg aatactcata ctcttcttt 6240
 ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat 6300
 gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg 6360
 acgtc 6365

<210> 46
 <211> 476
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de aminoácidos de ssBiP+SNAPlike+proTEV+SBV.N+proTEV+Histag (codificada por SEC ID NO:35)

<400> 46

ES 2 648 899 T3

Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser
 1 5 10 15

Leu Gly Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp
 20 25 30

Ser Pro Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His
 35 40 45

Glu Ile Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu
 50 55 60

Val Pro Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln
 65 70 75 80

Ala Thr Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu
 85 90 95

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

Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly
 115 120 125

Glu Val Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala
 130 135 140

Ala Thr Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile
 145 150 155 160

Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly
 165 170 175

Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly
 180 185 190

His Arg Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro
 195 200 205

Gly Ser Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Asp Ile
 210 215 220

Ser Ser Gln Phe Ile Phe Glu Asp Val Pro Gln Arg Asn Ala Ala Thr
 225 230 235 240

Phe Asn Pro Glu Val Gly Tyr Val Ala Phe Ile Gly Lys Tyr Gly Gln
 245 250 255

ES 2 648 899 T3

Gln Leu Asn Phe Gly Val Ala Arg Val Phe Phe Leu Asn Gln Lys Lys
 260 265 270

Ala Lys Met Val Leu His Lys Thr Ala Gln Pro Ser Val Asp Leu Thr
 275 280 285

Phe Gly Gly Val Lys Phe Thr Val Val Asn Asn His Phe Pro Gln Tyr
 290 295 300

Val Ser Asn Pro Val Pro Asp Asn Ala Ile Thr Leu His Arg Met Ser
 305 310 315 320

Gly Tyr Leu Ala Arg Trp Ile Ala Asp Thr Cys Lys Ala Ser Val Leu
 325 330 335

Lys Leu Ala Glu Ala Ser Ala Gln Ile Val Met Pro Leu Ala Glu Val
 340 345 350

Lys Gly Cys Thr Trp Ala Asp Gly Tyr Thr Met Tyr Leu Gly Phe Ala
 355 360 365

Pro Gly Ala Glu Met Phe Leu Asp Ala Phe Asp Phe Tyr Pro Leu Val
 370 375 380

Ile Glu Met His Arg Val Leu Lys Asp Asn Met Asp Val Asn Phe Met
 385 390 395 400

Lys Lys Val Leu Arg Gln Arg Tyr Gly Thr Met Thr Ala Glu Glu Trp
 405 410 415

Met Thr Gln Lys Ile Thr Glu Ile Lys Ala Ala Phe Asn Ser Val Gly
 420 425 430

Gln Leu Ala Trp Ala Lys Ser Gly Phe Ser Pro Ala Ala Arg Thr Phe
 435 440 445

Leu Gln Gln Phe Gly Ile Asn Ile Pro Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
 450 455 460

Gly Pro Gly Gly Gly Ser His His His His His His His
 465 470 475

<210> 47

<211> 891

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN modificada que codifica el enterovirus 71 VP1 (cepa JL-AFP-EV71-07-03)

10

<400> 47

ES 2 648 899 T3

ggagataggg tggcagacgt gattgaaagt tccaaaggaa atagtgtgag cagagccctc 60
actcaagctc taccagcacc cacaggtcag aacacacagg tgagcagtca tcgactggat 120
acaggcaagg ttccagcact ccaagctgct gaaattggag catcatcaaa tgctagtgat 180
gagagcatga tcgagacacg ctgtgttctt aactcgcata gcacagctga gaccactctt 240
gatagtttct tcagcagagc ggggttagtt ggagagattg atctccctct tgaaggcaca 300
actaacccaa atggttatgc caactgggac atagatataa caggttacgc gcaaatgcgt 360
agaaaggtagg agctattcac ctacatgcmc tttgatgcag agttcacttt tgttgctgcm 420
acaccaccgg ggaagtgtg cccacaattg ctccaataca tgtttgtgcm acctggagcm 480
cctaagccag attccagga atccctcgca tggcaactg ccaccaacc ctcagttttt 540
gtcaagctgt cagaccctcc agcacaagtt tcagtaccat tcatgtcacc tgcgagtgt 600
taccaatggt tttatgacgg ttatcccaca ttccggagaac acaaacagga gaaggatctc 660
gaatagggg catgtcctaa caacatgatg ggcacgttct cagtgcggac tgtagggacc 720
tccaagtcca agtacccttt agtggttagg atttacctga gaatgaagca cgtcagggcg 780
tggatacctc gcccgatgcm caacccaaac tacctattca aagccaacc aaattatgct 840
ggcaactcca ttaagccaac tggtagcagt cgcacagcm tcaactctc c 891

<210> 48
<211> 1643
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de ADN de DeSNAPuniv-EV71.VP1 quimérica (ssBiP - SNAPlike - sitio de escisión de proTEV - EV71-VP1 modificada - sitio de escisión de proTEV - Histag) para la expresión en células S2

<400> 48
atgaagttat gcatattact ggccgctcgtg gtggcctttg ttggcctctc gctcgggaga 60
tctagatctg acaaagactg cgaaatgaaa agaactacat tggattcacc acttgggaag 120
ttggaactga gtggatgcga gcaaggattg catgaaatta agctactggg aaaaggaact 180
tctgctgctg atgcagttga agttccagca ccagcagctg ttcttggag tctgagccc 240
ctcatgcaag ccacagcctg gcttaacgca tatttccacc agcctgaggc cattgaggaa 300
tttccagtcc ccgcccttca ccatcctgtg tttcagcagg agagcttcac ccgccaggtc 360
ctgtggaaat tgetgaaggt ggtcaagttt ggtgaagtga tttcatatca gcaactgct 420
gcattggccc gtaaccccgcm agctacagct gccgtgaaa ctgctctcag cggaaatcct 480

15

ES 2 648 899 T3

```

gtgccatcc tgatcccttg tcacagagtc gtttcatctt cggagctgt aggtggctat 540
gaaggaggac tggcagttaa ggagtggctg ctggctcatg aaggtcatag acttggaaag 600
cctgggctgg gtctgctggt tatagggcgc ccagggtccc taggtggcgg atccgaaaac 660
ctgtacttcc agagcgatat cggagatagg gtggcagacg tgattgaaag ttccaaagga 720
aatagtgtga gcagagccct cactcaagct ctaccagcac ccacaggtca gaacacacag 780
gtgagcagtc atcgactgga tacaggcaag gttccagcac tccaagctgc tgaaattgga 840
gcatcatcaa atgctagtga tgagagcatg atcgagacac gctgtgttct taactcgcat 900
agcacagctg agaccactct tgatagtttc ttcagcagag cggggttagt tggagagatt 960
gatctccctc ttgaaggcac aactaaccba aatggttatg ccaactggga catagatata 1020
acaggttacg cgaaaatgcg tagaaagggt gagctattca cctacatgcg ctttgatgca 1080
gagttcactt ttgttgctg caccaccacc ggggaagttg tcccacaatt gctccaatac 1140
atgtttgtgc cacctggagc ccctaagcca gattccaggg aatccctcgc atggcaaact 1200
gccaccaacc cctcagtttt tgtcaagctg tcagaccctc cagcacaagt ttcagtacca 1260
ttcatgtcac ctgcgagtgc ttaccaatgg ttttatgacg gttatccac attcggagaa 1320
cacaacacag agaaggatct cgaatatggg gcatgtccta acaacatgat gggcacgttc 1380
tcagtgcgga ctgtagggac ctccaagtcc aagtaccctt tagtgggttag gatttaccatg 1440
agaatgaagc acgtcagggc gtggatacct cgcccgatgc gcaacaaaa ctacctattc 1500
aaagccaacc caaattatgc tggcaactcc attaagccaa ctggtaccag tcgcacagcg 1560
atcactactc tcccgggaga gaatctatat tttcaagggc ccggcggagg tagtcaccat 1620
catcaccatc actaatgacc ggt 1643

```

<210> 49
 <211> 523
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike - proTEV - VP1 EV71 - proTEV- Histag]

10

<400> 49

```

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
1          5          10          15

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
          20          25          30

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
          35          40          45

```

ES 2 648 899 T3

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
50 55 60

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
65 70 75 80

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
85 90 95

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
100 105 110

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
115 120 125

Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
130 135 140

Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
145 150 155 160

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
165 170 175

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser
180 185 190

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

Arg Val Ala Asp Val Ile Glu Ser Ser Lys Gly Asn Ser Val Ser Arg
210 215 220

Ala Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ala Pro Thr Gly Gln Asn Thr Gln Val
225 230 235 240

Ser Ser His Arg Leu Asp Thr Gly Lys Val Pro Ala Leu Gln Ala Ala
245 250 255

Glu Ile Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser Asp Glu Ser Met Ile Glu Thr
260 265 270

Arg Cys Val Leu Asn Ser His Ser Thr Ala Glu Thr Thr Leu Asp Ser
275 280 285

Phe Phe Ser Arg Ala Gly Leu Val Gly Glu Ile Asp Leu Pro Leu Glu
290 295 300

ES 2 648 899 T3

Gly Thr Thr Asn Pro Asn Gly Tyr Ala Asn Trp Asp Ile Asp Ile Thr
 305 310 315 320

Gly Tyr Ala Gln Met Arg Arg Lys Val Glu Leu Phe Thr Tyr Met Arg
 325 330 335

Phe Asp Ala Glu Phe Thr Phe Val Ala Cys Thr Pro Thr Gly Glu Val
 340 345 350

Val Pro Gln Leu Leu Gln Tyr Met Phe Val Pro Pro Gly Ala Pro Lys
 355 360 365

Pro Asp Ser Arg Glu Ser Leu Ala Trp Gln Thr Ala Thr Asn Pro Ser
 370 375 380

Val Phe Val Lys Leu Ser Asp Pro Pro Ala Gln Val Ser Val Pro Phe
 385 390 395 400

Met Ser Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Trp Phe Tyr Asp Gly Tyr Pro Thr
 405 410 415

Phe Gly Glu His Lys Gln Glu Lys Asp Leu Glu Tyr Gly Ala Cys Pro
 420 425 430

Asn Asn Met Met Gly Thr Phe Ser Val Arg Thr Val Gly Thr Ser Lys
 435 440 445

Ser Lys Tyr Pro Leu Val Val Arg Ile Tyr Met Arg Met Lys His Val
 450 455 460

Arg Ala Trp Ile Pro Arg Pro Met Arg Asn Gln Asn Tyr Leu Phe Lys
 465 470 475 480

Ala Asn Pro Asn Tyr Ala Gly Asn Ser Ile Lys Pro Thr Gly Thr Ser
 485 490 495

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

Pro Gly Gly Gly Ser His His His His His His
 515 520

<210> 50
 <211> 2386
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica DeSNAPuniv-JE. -sE quimérica (ssBiP- sE de JEV cepa SA-14 -
 10 SNAPlike) para la expresión en células S2

<400> 50

ES 2 648 899 T3

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gcctttgttg gcctctcgct cgggagatct	60
atgaagttgt cgaatttcca ggggaagctt ttgatgacca tcaacaacac ggacattgca	120
gacgttatcg tgattccac ctcaaaagga gagaacagat gctgggtccg ggcaatcgac	180
gtcggctaca tgtgtgagga cactatcacg tacgaatgtc ctaagcttac catgggcaat	240
gatccagagg atgtggattg ctgggtgtgac aaccaagaag tctacgtcca atatggacgg	300
tgcacgcgga ccaggcattc caagcgaagc aggagatccg tgtcgggtcca aacacatggg	360
gagagttcac tagtgaataa aaaagaggct tggctggatt caacgaaagc cacacgatat	420
ctcatgaaaa ctgagaactg gatcataagg aatcctggct atgctttcct ggcggcggtg	480
cttggctgga tgcttggcag taacaacggt caacgcgtgg tatttaccat cctcctgctg	540
ttggtcgtc cggttacag ttttaattgt ctgggaatgg gcaatcgtga cttcatagaa	600
ggagccagtg gagccacttg ggtggacttg gtgctagaag gagatagctg cttgacaatc	660
atggcaaacg acaaaccaac attggacgtc cgcgatgatta acatcgaagc tagccaactt	720
gctgaggtea gaagttactg ctatcatgct tcagtcactg acatctcgac ggtggctcgg	780
tgccccacga ctggagaagc tcacaacgag aagcagctg atagtagcta tgtgtgcaaa	840
caaggcttca ctgaccgttg gtggggcaac ggatgtggac ttttcgggaa ggggaagcatt	900
gacacatgtg caaaattctc ctgcaccagt aaagcgattg ggagaacaat ccagccagaa	960
aacatcaaat acgaagttgg catttttgtg catggaacca ccaacttcgga aaaccatggg	1020
aattattcag cgcaagttgg ggcgtcccag gcggcaaggt ttacagtaac acccaatgct	1080
ccttcgataa ccctcaaact tggtgactac ggagaagtca cactggactg tgagccaagg	1140
agtggactga aactgaagc gttttacgtc atgaccgtgg ggtcaaagtc atttctggtc	1200
catagggagt ggtttcatga cctcgtctc ccctggacgt ccccttcgag cacagcgtgg	1260
agaaacagag aactcctcat ggaatttgaa ggggcgcacg ccacaaaaca gtccgttgtt	1320
gctcttgggt cacaggaag aggcctccat caggcgttgg caggagccat cgtggtggag	1380
tactcaagct cagtgaagtt aacatcaggc cacctgaaat gtaggctgaa aatggacaaa	1440
ctggctctga aaggcacaac ctatggcatg tgtacagaaa aattctcgtt cgcgaaaaat	1500
ccggcggaca ctggtcacgg aacagttgtc attgaaactc cctactctgg gagtgategg	1560
tcctgcaaaa ttccgattgt ttccgttgcg agcctcaatg acatgacccc cgttgggagg	1620
ctggtgacag tgaaccctt cgtcgcgact tccagtcca actcaaaggt gctggtcgag	1680
atggaacccc ccttcggaga ctctacatc gtagttggaa ggggagacaa gcagatcaac	1740

ES 2 648 899 T3

caccattggc acaaagctgg gcggccgcac ggaggagta gcaaagactg cgaaatgaag 1800
 cgcaccaccc tggatagccc tctgggcaag ctggaactgt ctgggtgcga acagggcctg 1860
 cacgagatca agctgctggg caaaggaaca tctgccgccc acgccgtgga agtgcctgcc 1920
 ccagccgccg tgctgggccc accagagcca ctgatgcagg ccaccgcctg gctcaacgcc 1980
 tactttcacc agcctgagge catcgaggag ttcctgtgac cagccctgca ccaccagtg 2040
 ttccagcagg agagctttac ccgccaggtg ctgtggaac tgctgaaagt ggtgaagttc 2100
 ggagaggtca tcagctacca gcagctggcc gccctggccc gcaatcccgc cggcaccgcc 2160
 gccgtgaaaa ccgccctgag cggaaatccc gtgccattc tgatcccctg ccaccgggtg 2220
 gtgtctagct ctggcgccgt ggggggctac gagggcgggc tcgccgtgaa agagtggctg 2280
 ctggcccacg agggccacag actgggcaag cctgggctgg gtccctgcagg tataggcgcg 2340
 ccagggtccc tggagcatca tcatcatcat cattgatgac gggccc 2386

<210> 51
 <211> 773
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [sE de JEV cepa SA-14 - SNAPlike - Histag]

10

<400> 51

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

ES 2 648 899 T3

	115						120								125
Trp	Ile	Ile	Arg	Asn	Pro	Gly	Tyr	Ala	Phe	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Gly
	130					135					140				
Trp	Met	Leu	Gly	Ser	Asn	Asn	Gly	Gln	Arg	Val	Val	Phe	Thr	Ile	Leu
145					150					155					160
Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Pro	Ala	Tyr	Ser	Phe	Asn	Cys	Leu	Gly	Met	Gly
				165					170					175	
Asn	Arg	Asp	Phe	Ile	Glu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ala	Thr	Trp	Val	Asp	Leu
			180					185					190		
Val	Leu	Glu	Gly	Asp	Ser	Cys	Leu	Thr	Ile	Met	Ala	Asn	Asp	Lys	Pro
		195					200						205		
Thr	Leu	Asp	Val	Arg	Met	Ile	Asn	Ile	Glu	Ala	Ser	Gln	Leu	Ala	Glu
	210					215					220				
Val	Arg	Ser	Tyr	Cys	Tyr	His	Ala	Ser	Val	Thr	Asp	Ile	Ser	Thr	Val
225					230					235					240
Ala	Arg	Cys	Pro	Thr	Thr	Gly	Glu	Ala	His	Asn	Glu	Lys	Arg	Ala	Asp
				245					250					255	
Ser	Ser	Tyr	Val	Cys	Lys	Gln	Gly	Phe	Thr	Asp	Arg	Gly	Trp	Gly	Asn
			260					265					270		
Gly	Cys	Gly	Leu	Phe	Gly	Lys	Gly	Ser	Ile	Asp	Thr	Cys	Ala	Lys	Phe
		275					280					285			
Ser	Cys	Thr	Ser	Lys	Ala	Ile	Gly	Arg	Thr	Ile	Gln	Pro	Glu	Asn	Ile
	290					295					300				
Lys	Tyr	Glu	Val	Gly	Ile	Phe	Val	His	Gly	Thr	Thr	Thr	Ser	Glu	Asn
305					310					315					320
His	Gly	Asn	Tyr	Ser	Ala	Gln	Val	Gly	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Lys	Phe
				325					330					335	
Thr	Val	Thr	Pro	Asn	Ala	Pro	Ser	Ile	Thr	Leu	Lys	Leu	Gly	Asp	Tyr
			340					345					350		
Gly	Glu	Val	Thr	Leu	Asp	Cys	Glu	Pro	Arg	Ser	Gly	Leu	Asn	Thr	Glu
		355					360					365			

ES 2 648 899 T3

Ala Phe Tyr Val Met Thr Val Gly Ser Lys Ser Phe Leu Val His Arg
 370 375 380

Glu Trp Phe His Asp Leu Ala Leu Pro Trp Thr Ser Pro Ser Ser Thr
 385 390 395 400

Ala Trp Arg Asn Arg Glu Leu Leu Met Glu Phe Glu Gly Ala His Ala
 405 410 415

Thr Lys Gln Ser Val Val Ala Leu Gly Ser Gln Glu Gly Gly Leu His
 420 425 430

Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Val Val Glu Tyr Ser Ser Ser Val Lys
 435 440 445

Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Ala
 450 455 460

Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Met Cys Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala
 465 470 475 480

Lys Asn Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Ile Glu Leu Ser
 485 490 495

Tyr Ser Gly Ser Asp Gly Ser Cys Lys Ile Pro Ile Val Ser Val Ala
 500 505 510

Ser Leu Asn Asp Met Thr Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro
 515 520 525

Phe Val Ala Thr Ser Ser Ala Asn Ser Lys Val Leu Val Glu Met Glu
 530 535 540

Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln
 545 550 555 560

Ile Asn His His Trp His Lys Ala Gly Arg Pro His Gly Gly Gly Ser
 565 570 575

Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly Lys
 580 585 590

Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu Leu
 595 600 605

Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala Pro Ala
 610 615 620

ES 2 648 899 T3

Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr Ala Trp Leu
625 630 635 640

Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val Pro
645 650 655

Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln Val
660 665 670

Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser Tyr
675 680 685

Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr Ala Ala Val
690 695 700

Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys His
705 710 715 720

Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu
725 730 735

Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly Lys
740 745 750

Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser Leu Glu His
755 760 765

His His His His His
770

<210> 52
<211> 1020
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión BiPlike-SNAPlike-EDIII del virus de la encefalitis japonesa genotipo del virus de la encefalitis japonesa genotipo I clonado en pMT/BiP/SNAP para la expresión en células S2

<400> 52

atgaaactat gtattctact tgcagttggt gcggtcgtag gattgtcctt aagatctgac	60
aaagactgcg aaatgaaaag aactacattg gattcaccac ttgggaagtt ggaactgagt	120
ggatgcgagc aaggattgca tgaattaag ctactgggaa aaggaacttc tgctgctgat	180
gcagttgaag ttccagcacc agcagctggt cttggaggtc ctgagcccct catgcaagcc	240
acagcctggc ttaacgcata tttccaccag cctgaggcca ttgaggaatt tccagtcccc	300
15 gcccttcacc atcctgtggt tcagcaggag agcttcaccc gccaggtcct gtggaaattg	360

ES 2 648 899 T3

```

ctgaagggtg tcaagtttgg tgaagtgatt tcatatcagc aacttgctgc attggccggt      420
aaccocgcag ctacagctgc cgtgaaaact gctctcagcg gaaatcctgt gcccatcctg      480
atcccttgtc acagagtcgt ttcacattcc ggagctgtag gtggctatga aggaggactg      540
gcagttaagg agtggctgct ggctcatgaa ggtcatagac ttggaaagcc tgggctgggt      600
cctgctggta taggcgcgcc agggtcctctg gagggaggtg gcgggtctgc tctgaagggc      660
acgacttacg gcattgttac agaaaaattc tcgttcgcga aaaatccagc ggacacaggc      720
catggaacag ttgtcattga gctcacatac tctggaagcg atggtcctctg taaaattccg      780
attgtctcag tcggcagttt aaacgacatg acccctgtgg ggaggctggt aacagtaaac      840
cccttcgctc gcacatctag ctccaactca aagggtgctgg ttgagatgga acctcccttc      900
ggagactcct acatcgtggt tgggaagagg gataagcaga ttaacatca ctggcacaaa      960
gctggaagca cgctgggtaa aggaggtggc catcaccatc accatcactg atgaccgggt     1020

```

<210> 53
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión SNAPlike-EDIII del virus de la encefalitis japonesa
 genotipo I - Histag

10

<400> 53

```

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
1          5          10          15

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
20          25          30

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
35          40          45

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
50          55          60

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
65          70          75          80

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
85          90          95

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
100         105         110

```

15

ES 2 648 899 T3

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
 115 120 125

Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
 130 135 140

Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
 165 170 175

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser
 180 185 190

Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Met
 195 200 205

Cys Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala Lys Asn Pro Ala Asp Thr Gly His
 210 215 220

Gly Thr Val Val Ile Glu Leu Thr Tyr Ser Gly Ser Asp Gly Pro Cys
 225 230 235 240

Lys Ile Pro Ile Val Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Met Thr Pro Val
 245 250 255

Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr Ser Ser Ser Asn
 260 265 270

Ser Lys Val Leu Val Glu Met Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile
 275 280 285

Val Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ala
 290 295 300

Gly Ser Thr Leu Gly Lys Gly Gly Gly His His His His His His
 305 310 315

<210> 54
 <211> 406
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de ADN que codifica el dominio III de la proteína E de cubierta del virus de la encefalitis
 japonesa de genotipo 1 (JE-1.EDIII)

<400> 54

gcgcgccagg gtccttgag ggaggtggcg ggtctgctct gaagggcacg acttacggca 60

15

ES 2 648 899 T3

	tgtgtacaga aaaattctcg ttcgcgaaaa atccagcggg cacaggccat ggaacagttg	120
	tcattgagct cacatactct ggaagcgatg gtccctgtaa aattccgatt gtctcagtcg	180
	cgagtttaaa cgacatgacc cctgtgggga ggctggtaac agtaaaccct ttcgtcgcga	240
	catctagctc caactcaaag gtgctggttg agatggaacc tcccttcgga gactcttaca	300
	tcgtggttg aagaggggat aagcagatta accatcactg gcacaaagct ggaagcacgc	360
	tgggtaaagg aggtggccat caccatcacc atcactgatg accggt	406
	<210> 55	
	<211> 406	
5	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
10	<223> Secuencia de ADN que codifica el dominio III de la proteína E de cubierta del virus de la encefalitis japonesa de genotipo 2 (JE-2.EDIII)	
	<400> 55	
	gcgcgccagg gtccctggag ggaggtggcg ggtctgctct gaaaggcaca acctatggta	60
	tgtgcacaga aaactcctcg ttccgaaaa atccagcggg cacaggccat ggaacagttg	120
	tcattgagct cacatactct gggagtgatg gtccctgtaa gattccaaat gtctccgttg	180
	cgagcctgaa tgacatgacc cctgtaggga ggctggtaac agtaaaccct tttgtcgcga	240
	catccagcgc caactcaaaa gtgctggttg aaatggaacc cccttttga gattcttaca	300
	tcgtggtcgg aagaggtgac aagcagatca atcatcactg gcacaaagct ggaagcacgc	360
	tgggcaaagg aggtggccat caccatcacc atcactgatg accggt	406
15	<210> 56	
	<211> 406	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia de ADN que codifica el dominio III de la proteína E de cubierta del virus de la encefalitis japonesa de genotipo 4 (JE-4.EDIII)	
25	<400> 56	
	gcgcgccagg gtccctggag ggaggtggcg ggtctgctct gaaaggcaca acctatggaa	60
	tgtgcacaga aaagttctcg tttgcaaaaga atccagcaga cactggtcat ggaacagttg	120
	tcattgaact cctgtattct ggaagtgacg gccctgtaa catccaatt gtctcagtgg	180
	tcagtctaaa cgacatgact ccagttggaa ggttggtgac agtgaaccct ttcggtgcca	240
	catccagttc caattcaaag gtcttagttg agatggaacc tccttttga gactcctaca	300
	ttgtggtcgg gagaggagaa aaacaaatca accaccactg gcacaaacct ggaagcacat	360
	tgggcaaagg aggtggccat caccatcacc atcactgatg accggt	406
	<210> 57	
30	<211> 406	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia de ADN que codifica el dominio III de la proteína E de cubierta del virus de la encefalitis	

ES 2 648 899 T3

```

aaagactgcg aaatgaaaag aactacattg gattcaccac ttggaagtt ggaactgagt      120
ggatgcgagc aaggattgca tgaattaag ctactgggaa aaggaacttc tgctgctgat      180
gcagttgaag ttccagcacc agcagctggt cttggaggtc ctgagcccct catgcaagcc      240
acagcctggc ttaacgcata tttccaccag cctgaggcca ttgaggaatt tccagtcccc      300
gcccttcacc atcctgtggt tcagcaggag agcttcaccc gccaggtcct gtggaaattg      360
ctgaagtggt tcaagtttgg tgaagtgatt tcatatcagc aacttgctgc attggccggt      420
aaccocgcag ctacagctgc cgtgaaaact gctctcagcg gaaatcctgt gcccatcctg      480
atcccttgct acagagctgt ttcacttcc ggagctgtag gtggctatga aggaggactg      540
gcagttaagg agtggctgct ggctcatgaa ggtcatagac ttgaaagcc tgggctgggt      600
cctgtcggtg taggcgcgcc aggtccctg gaggaggtg gcgggtctgc tctgaaagcc      660
acaacctatg gtatgtgcac agaaaactcc tcgttccgaa aaaatccagc ggacacagcc      720
catggaacag ttgtcattga gctcacatac tctgggagtg atggtccctg taagattcca      780
aatgtctccg ttgcgagcct gaatgacatg acccctgtag ggaggctggt aacagtaaac      840
ccctttgtcg cgacatccag cgccaactca aaagtgctgg ttgaaatgga accccctttt      900
ggagattcct acatcgtggt cggaagaggt gacaagcaga tcaatcatca ctggcacaaa      960
gctggaagca cgctgggcaa aggaggtggc catcaccatc accatcactg atgaccggtt     1020

```

<210> 60
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión SNAPlike-EDIII del virus de la encefalitis japonesa
 genotipo 2 - Histag

10

<400> 60

```

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
1           5           10           15

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
          20           25           30

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
          35           40           45

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
          50           55           60

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
65           70           75           80

```

15

ES 2 648 899 T3

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
85 90 95

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
100 105 110

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
115 120 125

Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
130 135 140

Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
145 150 155 160

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
165 170 175

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser
180 185 190

Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Met
195 200 205

Cys Thr Glu Asn Ser Ser Phe Arg Lys Asn Pro Ala Asp Thr Gly His
210 215 220

Gly Thr Val Val Ile Glu Leu Thr Tyr Ser Gly Ser Asp Gly Pro Cys
225 230 235 240

Lys Ile Pro Asn Val Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Met Thr Pro Val
245 250 255

Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr Ser Ser Ala Asn
260 265 270

Ser Lys Val Leu Val Glu Met Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile
275 280 285

Val Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ala
290 295 300

Gly Ser Thr Leu Gly Lys Gly Gly Gly His His His His His His
305 310 315

<210> 61
<211> 1020
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión BiPlike -SNAPlike-EDIII del virus de la encefalitis japonesa genotipo 4 clonado en pMT/BiP/SNAP para la expresión en células S2

<400> 61

ES 2 648 899 T3

```

atgaaactat gtattctact tgcagttggt gcgttcgtag gattgtcctt aagatctgac      60
aaagactgcg aaatgaaaag aactacattg gattcaccac ttgggaagtt ggaactgagt      120
ggatgcgagc aaggattgca tgaattaag ctactgggaa aaggaacttc tgctgctgat      180
gcagttgaag ttccagcacc agcagctggt cttggaggtc ctgagcccct catgcaagcc      240
acagcctggc ttaacgcata tttccaccag cctgaggcca ttgaggaatt tccagtcccc      300
gcccttcacc atcctgtggt tcagcaggag agcttcaccc gccaggctcct gtggaaattg      360
ctgaaggagg tcaagtttg tgaagtgatt tcatatcagc aacttgctgc attggccggt      420
aaccctcgag ctacagctgc cgtgaaaact gctctcagcg gaaatcctgt gcccatcctg      480
atccttgctc acagagctgt ttcattctcc ggagctgtag gtggctatga aggaggactg      540
gcagttaagg agtggctgct ggctcatgaa ggtcatagac ttggaaagcc tgggctgggt      600
cctgctggta taggcgcgcc agggcccttg gagggaggtg gcgggtctgc tctgaaaggc      660
acaacctatg gaatgtgcac agaaaagttc tcgtttgcaa agaateccagc agacactggt      720
catggaacag ttgtcattga actcctgtat tctggaagtg acggcccctg taacatccca      780
attgtctcag tggtcagtct aaacgacatg actccagttg gaaggttggt gacagtgaac      840
cccttcggtg ccacatccag ttccaattca aaggcttag ttgagatgga acctcctttt      900
ggagactcct acattgtggt cgggagagga gaaaaacaaa tcaaccacca ctggcacaaa      960
cctggaagca cattgggcaa aggaggtggc catcaccatc accatcactg atgaccgggt     1020

```

<210> 62
 <211> 319
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión SNAPlike-EDIII del virus de la encefalitis japonesa
 genotipo 4 - Histag

<400> 62

```

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
1           5           10           15

```

```

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
20           25           30

```

15

ES 2 648 899 T3

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
 35 40 45

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
 50 55 60

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
 65 70 75 80

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
 85 90 95

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
 100 105 110

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
 115 120 125

Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
 130 135 140

Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
 165 170 175

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser
 180 185 190

Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Met
 195 200 205

Cys Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala Lys Asn Pro Ala Asp Thr Gly His
 210 215 220

Gly Thr Val Val Ile Glu Leu Leu Tyr Ser Gly Ser Asp Gly Pro Cys
 225 230 235 240

Asn Ile Pro Ile Val Ser Val Val Ser Leu Asn Asp Met Thr Pro Val
 245 250 255

Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr Ser Ser Ser Asn
 260 265 270

Ser Lys Val Leu Val Glu Met Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile
 275 280 285

Val Val Gly Arg Gly Glu Lys Gln Ile Asn His His Trp His Lys Pro
 290 295 300

Gly Ser Thr Leu Gly Lys Gly Gly Gly His His His His His His
 305 310 315

- 5 <210> 63
- <211> 1020
- <212> ADN
- <213> artificial

ES 2 648 899 T3

<220>

<223> Secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión BiPlike -SNAPlike-EDIII del virus de la encefalitis japonesa genotipo 5 clonado en pMT/BiP/SNAP para la expresión en células S2

5

<400> 63

```

atgaaactat gtattctact tgcagttggt gcgttcgtag gattgtcctt aagatctgac      60
aaagactgcg aatgaaaag aactacattg gattcaccac ttgggaagtt ggaactgagt      120
ggatgcgagc aaggattgca tgaattaag ctactgggaa aaggaacttc tgctgctgat      180
gcagttgaag ttccagcacc agcagctggt cttggaggtc ctgagcccct catgcaagcc      240
acagcctggc ttaacgcata tttccaccag cctgaggcca ttgaggaatt tccagtcccc      300
gcccttcacc atcctgtggt tcagcaggag agcttcaccc gccaggtcct gtggaaattg      360
ctgaaggtgg tcaagtttgg tgaagtgatt tcatatcagc aacttgctgc attggccggt      420
aaccctcgag ctacagctgc cgtgaaaact gctctcagcg gaaatcctgt gccatcctg      480
atcccttgtc acagagtcgt ttcattctcc ggagctgtag gtggctatga aggaggactg      540
gcagttaagg agtggctgct ggctcatgaa ggtcatagac ttggaaagcc tgggctgggt      600
cctgtcggtg taggcgccc agggtcctcg gagggaggtg gcgggtctgc gttgaaaggg      660
accacctatg gtatgtgcac agagaagttc tctttttcca agaatccagc tgacactggt      720
catggtacgg ttgtcataga attgcagtac accggcactg acggaccttg caagataccc      780
atctcttcgg tggccagtct gaatgattta actccagttg gtagattggt gacagtcaat      840
ccttttggtg ccacatccac cgccaattcg aaggttttgg tagaattgga accaccattt      900
ggagattcat tcattgttgt cgggaagagga gataagcaga tcaatcacca ttggcacaag      960
gctggcagtt cactgggaaa gggaggtggc catcaccatc accatcactg atgaccgggt     1020

```

10

<210> 64

<211> 319

<212> PRT

<213> artificial

15

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión SNAPlike-EDIII del virus de la encefalitis japonesa genotipo 5 - Histag

20

<400> 64

ES 2 648 899 T3

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

ES 2 648 899 T3

Lys Ile Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val
 245 250 255

Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr Ser Thr Ala Asn
 260 265 270

Ser Lys Val Leu Val Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Phe Ile
 275 280 285

Val Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ala
 290 295 300

Gly Ser Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly His His His His His
 305 310 315

<210> 65
 <211> 1008
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión BiPlike -SNAPlike-EDIII del virus de Rabensburg clonado en pMT/BiP/SNAP para la expresión en células S2

10

<400> 65

```

atgaaactat gtattctact tgcagttggt gcgttcgtag gattgtcctt aagatctgac      60
aaagactgcg aatgaaaag aactacattg gattcaccac ttgggaagt ggaactgagt      120
ggatgcgagc aaggattgca tgaattaag ctactgggaa aaggaacttc tgctgctgat      180
gcagttgaag ttccagcacc agcagctggt cttggaggtc ctgagcccct catgcaagcc      240
acagcctggc ttaacgcata tttccaccag cctgaggcca ttgaggaatt tccagtcccc      300
gcccttcacc atcctgtggt tcagcaggag agcttcaccc gccaggtcct gtggaaattg      360
ctgaaggtgg tcaagtttgg tgaagtgatt tcatatcagc aacttgctgc attggccggt      420
aaccocgcag ctacagctgc cgtgaaaact gctctcagcg gaaatcctgt gcccatcctg      480
atcccttgtc acagagtcgt ttcattctcc ggagctgtag gtggctatga aggaggactg      540
gcagttaagg agtggctgct ggctcatgaa ggtcatagac ttgaaagcc tgggctgggt      600
cctgctggta taggcgcgcc aggaggtggc gggctctcagc tcaaaggaac gacctatgga      660
gtatgcgcaa aagccttcaa gttttctggg aatccagctg acacagggca tggcaccgtg      720
gtcttagagt tgcaatacac cggaaccgat ggtccttgta aggtgctgt ctcttccgtg      780
gcttcactca acgacctaac tcccgttggg agactgggta cagtgaatcc ctttgttgct      840
gcagctactg ctaattcaaa ggttctgata gaactggaac ctccattcgg tgactcatac      900
attgtggtag gtagaggaga acaccagata aaccaccatt gccacaagtc tggaagcagt      960
attgaaagg gaggtggcca tcaccatcac catcactgat gaccgggt      1008
    
```

15

<210> 66
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> artificial

20

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión SNAPlike-EDIII del virus de Rabensburg - Histag

ES 2 648 899 T3

<400> 66

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
 1 5 10 15

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
 20 25 30

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
 35 40 45

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
 50 55 60

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
 65 70 75 80

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
 85 90 95

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
 100 105 110

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
 115 120 125

Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
 130 135 140

Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
 165 170 175

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Gly
 180 185 190

5

ES 2 648 899 T3

Gly Gly Ser Gln Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Val Cys Ala Lys Ala
 195 200 205

Phe Lys Phe Ser Gly Asn Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val
 210 215 220

Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Val
 225 230 235 240

Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Val
 245 250 255

Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Ala Ala Thr Ala Asn Ser Lys Val Leu
 260 265 270

Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg
 275 280 285

Gly Glu His Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ser Gly Ser Ser Ile
 290 295 300

Gly Lys Gly Gly Gly His His His His His
 305 310

<210> 67
 <211> 977
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión ssBiP-SNAPlike-EDIII de un virus flavivirus de insecto clonado en pMT/BiP/SNAP para la expresión en células S2

<400> 67

atgaaactat gtattctact tgcagttggt gcggtcgtag gattgtcctt aagatctgac	60
aaagactgcg aaatgaaaag aactacattg gattcaccac ttgggaagt ggaactgagt	120
ggatgcgagc aaggattgca tgaattaag ctactgggaa aaggaacttc tgctgctgat	180
gcagttgaag ttccagcacc agcagctggt cttggaggtc ctgagcccct catgcaagcc	240
acagcctggc ttaacgcata tttccaccag cctgaggcca ttgaggaatt tccagtcccc	300
gcccttcacc atcctgtggt tcagcaggag agcttcaccc gccaggtcct gtggaaattg	360
ctgaaggtgg tcaagtttgg tgaagtgatt tcatatcagc aacttgctgc attggccggt	420
aaccccgag ctacagctgc cgtgaaaact gctctcagcg gaaatcctgt gccatcctg	480
atcccttgct acagagctgt ttcatcttcc ggagctgtag gtggctatga aggaggactg	540
gcagttaagg agtggctgct ggctcatgaa ggtcatagac ttggaaagcc tgggctgggt	600

15

ES 2 648 899 T3

cctgctggta taggcgcgcc aggaggtggc ggggaagcgc agacagtgtt ctctcaatcc 660
 ccttgggggt tcgaaggaat agcggagata aactaaaaag aggcccaaaa gagcatttgt 720
 tcactacctt tgtcttgtgt gggctgtagc ttgttctctt ccaaggtcgt tttccttgag 780
 acaacaacga aagctgccgt ccacgttga tgtgggaatg gaacttctgt tctaacagtt 840
 ggaactactc ctgtgagtat cgactgtgta gtaacgcccc tgtcgcaggt gtggaggtc 900
 gtgtcgcacg tcaccggaag atacacaaa cttgggtttg gaggtggcca tcaccatcac 960
 catcactgat gaccggt 977

<210> 68
 <211> 305
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión SNAPlike-EDIII de un flavivirus de insecto - Histag

10 <400> 68

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

ES 2 648 899 T3

gattccttga ggggtgtacac gtccgcagcg tgctccatac atgggacgat gggacacttc 360
atcgtcgcac actgtccacc aggcgactac ctcaaggttt cgttcgagga cgcagattcg 420
cacgtgaagg catgtaaggt ccaatacaag cacaatccat tgccgggtggg tagagagaag 480
ttcgtggtta gaccacactt tggcgtagag ctgccatgca cctcatacca gctgacaacg 540
gctcccaccg acgaggagat tgacatgcat acaccgccag atataccgga tcgcaccctg 600
ctatcacaga cggcgggcaa cgtcaaaata acagcaggcg gcaggactat caggtacaat 660
tgtacctgcg gccgtgacaa cgtaggcact accagtactg acaagaccat caacacatgc 720
aagattgacc aatgccatgc tgccgtcacc agccatgaca aatggcaatt tacctctcca 780
tttgttccca gggctgatca gacagctagg aaaggcaagg tacacgttcc gttccctctg 840
actaacgtca cctgccgagt gccgttgct cgagcgcgg atgtcaccta tggtaagaag 900
gagggtgacc tgagattaca cccagatcat ccgacactct tctcctatag gagttagga 960
gccgaaccgc acccgtacga ggaatgggtt gacaagttct ctgagcgcac catcccagtg 1020
acggaagaag ggattgaata ccagtggggc aacaaccgc cgggtccgcct gtgggcgcaa 1080
ctgacgaccg agggcaaacc ccatggatgg ccacatgaaa tcattcagta ctattatgga 1140
ctataccccg ccgccacgcg gccgcacggc ggaggtagca aagactgca aatgaagcgc 1200
accacctgg atagccctct gggcaagctg gaactgtctg ggtgcgaaca gggcctgcac 1260
gagatcaagc tgctgggcaa aggaacatct gccgccgacg ccgtggaagt gcctgcccc 1320
gccgccgtgc tggggggacc agagccactg atgcaggcca ccgcctggct caacgcctac 1380
tttcaccagc ctgaggccat cgaggagtcc cctgtgccag ccctgcacca cccagtgttc 1440
cagcaggaga gctttacccg ccaggtgctg tggaaactgc tgaaagtggg gaagttcgga 1500
gaggatcatca gctaccagca gctggccgcc ctggccggca atcccgcgc caccgccgcc 1560
gtgaaaaccg ccctgagcgg aaatcccgtg cccattctga tcccctgcca ccgggtgggtg 1620
tctagctctg gcgccgtggg gggctacgag ggcgggctcg ccgtgaaaga gtggctgctg 1680
gcccacgagg gccacagact gggcaagcct gggctgggtc ctgcaggat aggcgcgcca 1740
gggtccctgg agcatcatca tcatcatcat tgatgacggg ccc 1783

<210> 70
<211> 572
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión [sE2 de la cepa QML-1 del virus del Río Ross -
SNAPlike-Histag]

<400> 70

Arg Ser Ser Val Thr Glu His Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro

15

ES 2 648 899 T3

His Val Pro Phe Pro Leu Thr Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Leu Ala
 260 265 270

Arg Ala Pro Asp Val Thr Tyr Gly Lys Lys Glu Val Thr Leu Arg Leu
 275 280 285

His Pro Asp His Pro Thr Leu Phe Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Ala Glu
 290 295 300

Pro His Pro Tyr Glu Glu Trp Val Asp Lys Phe Ser Glu Arg Ile Ile
 305 310 315 320

Pro Val Thr Glu Glu Gly Ile Glu Tyr Gln Trp Gly Asn Asn Pro Pro
 325 330 335

Val Arg Leu Trp Ala Gln Leu Thr Thr Glu Gly Lys Pro His Gly Trp
 340 345 350

Pro His Glu Ile Ile Gln Tyr Tyr Tyr Gly Leu Tyr Pro Ala Ala Thr
 355 360 365

Arg Pro His Gly Gly Gly Ser Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr
 370 375 380

Leu Asp Ser Pro Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly
 385 390 395 400

Leu His Glu Ile Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala
 405 410 415

Val Glu Val Pro Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu
 420 425 430

Met Gln Ala Thr Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala
 435 440 445

Ile Glu Glu Phe Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln
 450 455 460

Glu Ser Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys
 465 470 475 480

Phe Gly Glu Val Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn
 485 490 495

Pro Ala Ala Thr Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val
 500 505 510

ES 2 648 899 T3

Pro Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val
 515 520 525

Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His
 530 535 540

Glu Gly His Arg Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly
 545 550 555 560

Ala Pro Gly Ser Leu Glu His His His His His His
 565 570

<210> 71
 <211> 1783
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP-sE2 de la cepa IQD2668 del virus de Mayaro -SNAPlike-Histag para la expresión en células S2

<400> 71

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gcctttgttg gcctctcgct cgggagatct	60
agtgtaacag agcacttcaa tgtgtataag gctactagac catacctagc acattgcgct	120
gattgcgggg acgggtactt ctgctatagc ccagttgcca tcgagaagat ccgagatgag	180
gcgtctgatg gcatgctcaa gatccaagtc tccgccaaa taggtctgga caaggcaggc	240
accacgccc acacgaagct ccgatatatg gctggtcacg atgttcagga atctaagaga	300
gattccttga ggggttacac gtccgcagcg tgctccatac atgggacgat gggacacttc	360
atcgtcgcac actgtccacc aggcgactac ctcaagttt cgttcgagga cgcagattcg	420
cacgtgaagg catgtaaggt ccaatacaag cacaatccat tgccgggtggg tagagagaag	480
ttcgtggtta gaccacactt tggcgtagag ctgccatgca cctcatacca gctgacaacg	540
gctcccaccg acgaggagat tgacatgcat acaccgccag atataccgga tcgcaccctg	600
ctatcacaga cggcgggcaa cgtcaaaaata acagcaggcg gcaggactat caggtacaat	660
tgtacctgcg gccgtgacaa cgtaggcact accagtactg acaagacat caacacatgc	720
aagattgacc aatgccatgc tgccgtcacc agccatgaca aatggcaatt tacctctcca	780
tttgttccca gggctgatca gacagctagg aaaggcaagg tacacgttcc gttccctctg	840
actaacgtca cctgccgagt gccgttgget cgagcgcgg atgtcaccta tggtagaag	900
gaggtgacct tgagattaca cccagatcat ccgacactct tctcctatag gagtttagga	960
gccgaaccgc acccgtacga ggaatgggtt gacaagttct ctgagcgcat catcccagtg	1020
acggaagaag ggattgaata ccagtggggc aacaaccgc cggtcgcct gtgggcgcaa	1080

15

ES 2 648 899 T3

```

ctgacgaccg agggcaaacc ccatggatgg ccacatgaaa tcattcagta ctattatgga 1140
ctataccccg ccgccacgcg gccgcacggc ggaggtagca aagactgcga aatgaagcgc 1200
accaccctgg atagccctct gggcaagctg gaactgtctg ggtgcgaaca gggcctgcac 1260
gagatcaagc tgctgggcaa aggaacatct gccgccgacg ccgtggaagt gcctgcccc 1320
gccgccgtgc tgggcgacc agagccactg atgcaggcca ccgcctggct caacgcctac 1380
tttcaccagc ctgaggccat cgaggagttc cctgtgccag cctgcacca ccagtgttc 1440
cagcaggaga gctttaccg ccaggtgctg tggaaactgc taaaagtggg gaagttcgga 1500
gaggtcatca gctaccagca gctggccgcc ctggccggca atcccgcgc caccgccgcc 1560
gtgaaaaccg ccctgagcgg aatcccgtg ccattctga tcccctgcc cgggtggg 1620
tctagctctg gcgccgtggg gggctacgag ggcgggctcg ccgtgaaaga gtggtgctg 1680
gcccacgagg gccacagact gggcaagcct gggctgggtc ctgcaggat aggcgcgcca 1740
gggtccctgg agcatcatca tcatcatcat tgatgacggg ccc 1783

```

5 <210> 72
 <211> 572
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión [sE2 de la cepa IQD2668 del virus de Mayaro - SNAPlike-Histag]

<400> 72

```

Arg Ser Ser Val Thr Glu His Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro
1          5          10          15

Tyr Leu Ala His Cys Ala Asp Cys Gly Asp Gly Tyr Phe Cys Tyr Ser
          20          25          30

Pro Val Ala Ile Glu Lys Ile Arg Asp Glu Ala Ser Asp Gly Met Leu
          35          40          45

Lys Ile Gln Val Ser Ala Gln Ile Gly Leu Asp Lys Ala Gly Thr His
          50          55          60

Ala His Thr Lys Leu Arg Tyr Met Ala Gly His Asp Val Gln Glu Ser
65          70          75          80

Lys Arg Asp Ser Leu Arg Val Tyr Thr Ser Ala Ala Cys Ser Ile His
          85          90          95

Gly Thr Met Gly His Phe Ile Val Ala His Cys Pro Pro Gly Asp Tyr
          100          105          110

```

15

ES 2 648 899 T3

Leu Lys Val Ser Phe Glu Asp Ala Asp Ser His Val Lys Ala Cys Lys
 115 120 125
 Val Gln Tyr Lys His Asn Pro Leu Pro Val Gly Arg Glu Lys Phe Val
 130 135 140
 Val Arg Pro His Phe Gly Val Glu Leu Pro Cys Thr Ser Tyr Gln Leu
 145 150 155 160
 Thr Thr Ala Pro Thr Asp Glu Glu Ile Asp Met His Thr Pro Pro Asp
 165 170 175
 Ile Pro Asp Arg Thr Leu Leu Ser Gln Thr Ala Gly Asn Val Lys Ile
 180 185 190
 Thr Ala Gly Gly Arg Thr Ile Arg Tyr Asn Cys Thr Cys Gly Arg Asp
 195 200 205
 Asn Val Gly Thr Thr Ser Thr Asp Lys Thr Ile Asn Thr Cys Lys Ile
 210 215 220
 Asp Gln Cys His Ala Ala Val Thr Ser His Asp Lys Trp Gln Phe Thr
 225 230 235 240
 Ser Pro Phe Val Pro Arg Ala Asp Gln Thr Ala Arg Lys Gly Lys Val
 245 250 255
 His Val Pro Phe Pro Leu Thr Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Leu Ala
 260 265 270
 Arg Ala Pro Asp Val Thr Tyr Gly Lys Lys Glu Val Thr Leu Arg Leu
 275 280 285
 His Pro Asp His Pro Thr Leu Phe Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Ala Glu
 290 295 300
 Pro His Pro Tyr Glu Glu Trp Val Asp Lys Phe Ser Glu Arg Ile Ile
 305 310 315 320
 Pro Val Thr Glu Glu Gly Ile Glu Tyr Gln Trp Gly Asn Asn Pro Pro
 325 330 335
 Val Arg Leu Trp Ala Gln Leu Thr Thr Glu Gly Lys Pro His Gly Trp
 340 345 350
 Pro His Glu Ile Ile Gln Tyr Tyr Tyr Gly Leu Tyr Pro Ala Ala Thr
 355 360 365

ES 2 648 899 T3

Arg Pro His Gly Gly Gly Ser Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr
370 375 380

Leu Asp Ser Pro Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly
385 390 395 400

Leu His Glu Ile Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala
405 410 415

Val Glu Val Pro Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu
420 425 430

Met Gln Ala Thr Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala
435 440 445

Ile Glu Glu Phe Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln
450 455 460

Glu Ser Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys
465 470 475 480

Phe Gly Glu Val Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn
485 490 495

Pro Ala Ala Thr Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val
500 505 510

Pro Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val
515 520 525

Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His
530 535 540

Glu Gly His Arg Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly
545 550 555 560

Ala Pro Gly Ser Leu Glu His His His His His His
565 570

<210> 73
<211> 1786
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP-sE2 del virus de la encefalitis equina occidental -SNAPlike-Histag para la expresión en células S2

<400> 73

ES 2 648 899 T3

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gcctttgttg gcctctcgct cgggagatct 60
 agcattaccg atgacttcac actgaccagt ccctacctgg ggttctgccc gtattgcaga 120
 cactcaacgc cgtgtttcag cccaataaaa attgagaacg tgtgggacga atctgatgat 180
 ggatcgatta gaatccaggt ctccggcaca ttcggctaca atcaggcagg cactgcggat 240
 gtcaccaa at tccgttacat gtctttcgac cagcaccatg acatcaagga agacagtatg 300
 gagaaaatag ctatcagcac atctggaccc tgccgtcgtc ttggccacaa agggtaacttc 360
 ctgtagctc aatgtcctcc aggtgacagt gtaaccgtca gtatcacgag cggagcatct 420
 gagaattcat gcaccgtgga gaaaaagatc aggaggaagt ttgtcggtag agaggagtac 480
 ttgttcccac ccgtccatgg aaagctggta aagtgccacg tttacgatca cttgaaggag 540
 acgtctgccg ggtacataac catgcacagg ccaggcccac acgcgtataa gtcctatctg 600
 gaggaagcgt caggcgaagt gtacattaaa ccaccttctg gcaagaacgt cacctacgaa 660
 tgtaagtgtg gcgactacag cacaggtatc gtgagcacgc gaacgaagat gaacggctgc 720
 actaaagcaa aacagtgcac tgccatacag agcgcacaaa cgaaatgggt cttcaactcg 780
 ccggatctta ttaggcacac agaccactca gtgcaaggta aattgcacat tccattccgc 840
 ttgacaccga cagtctgccc ggttccgta gctcacacgc ctacagtcac gaagtggttc 900
 aaaggcatca ccctccacct gactgcaatg cgaccaacat tgctgacaac gagaaaattg 960
 gggctgcgag cagacgcaac agcagaatgg attacagggt ctacatccag gaattttct 1020
 gtggggcgag aagggtgga gtacgtatgg ggtaaccatg aaccagtcag agtctgggcc 1080
 caggagtgg caccaggcga cccacatgga tggccgatg agatcatcat ccactattat 1140
 catcggcatc cagtctacac gggccgcac gggggaggta gcaaagactg cgaaatgaag 1200
 cgcaccacc tgatagccc tctgggcaag ctggaactgt ctgggtgcga acagggcctg 1260
 cacgagatca agctgctggg caaaggaaca tctgcccg acgccgtgga agtgcctgcc 1320
 ccagccgcc tgctgggcg accagagcca ctgatgcagg ccaccgcctg gctcaacgcc 1380
 tactttcacc agcctgaggc catcgaggag ttccctgtgc cagccctgca ccaccagtg 1440
 ttccagcagg agagctttac ccgccagggt ctgtggaac tgctgaaagt ggtgaagttc 1500
 ggagaggtca tcagctacca gcagctggcc gccctggccg gcaatcccgc cggcaccgcc 1560
 gccgtgaaaa ccgccctgag cggaaatccc gtgcccattc tgatcccctg ccaccgggtg 1620
 gtgtctagct ctggcgccgt ggggggctac gaggggggc tcgccgtgaa agagtggctg 1680
 ctggcccacg agggccacag actgggcaag cctgggctgg gtccctgcagg tataggcgg 1740
 ccagggtccc tggagcatca tcatcatcat cattgatgac gggccc 1786

<210> 74
 <211> 573
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión [sE2 de la encefalitis equina occidental -SNAPlike-Histag]

<400> 74

ES 2 648 899 T3

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

ES 2 648 899 T3

Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val
465 470 475 480

Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly
485 490 495

Asn Pro Ala Ala Thr Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro
500 505 510

Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala
515 520 525

Val Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala
530 535 540

His Glu Gly His Arg Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile
545 550 555 560

Gly Ala Pro Gly Ser Leu Glu His His His His His His
565 570

<210> 75
<211> 1786
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP-sE2 del virus de la encefalitis equina oriental -SNAPlike-Histag para la expresi3n en c3lulas S2

<400> 75

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gcctttggtg gcctctcgtc cgggagatct	60
gatttgaca ctcatctcac ccagataaag ttggcacgcc cgtatattgc tgattgcct	120
aactgtgggc atagtcggtg cgacagccct atagctatag aagaagtcag aggggatgcy	180
cacgcaggag tcatccgcat ccagacatca gctatgttcg gtctgaagac ggatggagtc	240
gatttggcct acatgagttt catgaacggc aaaacgcaga aatcaataaa gatcgacaac	300
ctgcatgtgc gcacctcagc cccttgttcc ctctgtctgc accacggcta ttacatcctg	360
gctcaatgcc caccagggga cacggttaca gttgggttc acgacgggcc taaccgcat	420
acgtgcacag ttgccataa ggtagaattc aggccagtgg gtagagagaa ataccgtcac	480
ccacctgaac atggagttga attaccgtgt aaccgttaca ctcaaacgc tgcagaccaa	540
ggacactatg ttgagatgca tcaaccggg ctagttgccg accactctct ccttagcatc	600
cacagtgcc aagtgaaaat tacggtaccg agcggcgccc aagtgaata ctactgcaag	660
tgcccagatg tacgagaggg aattaccagc agcgaccata caaccacctg cacggatgtc	720
aaacaatgca gggcttacct gattgacaac aaaaaatggg tgtacaactc tggaagactg	780

15

ES 2 648 899 T3

cctcgaggag agggcgacac ttttaagga aaacttcatg tgcctttgt gcctgttaag 840
 gccaaagtga tcgccacgct ggcaccggag cctctagtgt agcacaaca cgcaccctg 900
 attttacacc tgcacccgga ccatccgacc ttgctgacga ccaggtcact tggaagtgat 960
 gcaaatccaa ctogacaatg gattgagcga ccaacaactg tcaatttcac agtcaccgga 1020
 gaagggttg agtatacctg gggaaccat ccaccaaaaa gagtatgggc tcaagagtca 1080
 ggagaagga atccacatgg atggccgcac gaagtgtag tctattacta caacaggtac 1140
 ccgttaacca caattatcgg gcggccgcac ggccggagta gcaaagactg cgaaatgaag 1200
 cgcaccacc tcgatagccc tctgggcaag ctggaactgt ctgggtgcga acagggcctg 1260
 cacgagatca agctgctggg caaaggaaca tctgccgccg acgccgtgga agtgccctgcc 1320
 ccagccgcc tgctggcgga accagagcca ctgatgcagg ccaccgcctg gctcaacgcc 1380
 tactttcacc agcctgagc catcgaggag ttccctgtgc cagccctgca ccaccagtg 1440
 ttccagcagg agagctttac ccgccaggtg ctgtggaac tgctgaaagt ggtgaagtgc 1500
 ggagaggtca tcagctacca gcagctggcc gccctggccg gcaatcccgc cgcaccgcc 1560
 gccgtgaaaa ccgccctgag cggaatccc gtgccattc tgatcccctg ccaccgggtg 1620
 gtgtctagct ctggcgccgt ggggggctac gaggcgggc tcgccgtgaa agagtggctg 1680
 ctggcccacg agggccacag actgggcaag cctgggctgg gtccctgcagg tataggcgcg 1740
 ccagggctcc tgagatca tcatcatcat cattgatgac gggccc 1786

<210> 76
 <211> 573
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión [sE2 de la encefalitis equina oriental -SNAPlike-Histag]

<400> 76

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

ES 2 648 899 T3

Ala Tyr Met Ser Phe Met Asn Gly Lys Thr Gln Lys Ser Ile Lys Ile
65 70 75 80

Asp Asn Leu His Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Ser Leu Val Ser His
85 90 95

His Gly Tyr Tyr Ile Leu Ala Gln Cys Pro Pro Gly Asp Thr Val Thr
100 105 110

Val Gly Phe His Asp Gly Pro Asn Arg His Thr Cys Thr Val Ala His
115 120 125

Lys Val Glu Phe Arg Pro Val Gly Arg Glu Lys Tyr Arg His Pro Pro
130 135 140

Glu His Gly Val Glu Leu Pro Cys Asn Arg Tyr Thr His Lys Arg Ala
145 150 155 160

Asp Gln Gly His Tyr Val Glu Met His Gln Pro Gly Leu Val Ala Asp
165 170 175

His Ser Leu Leu Ser Ile His Ser Ala Lys Val Lys Ile Thr Val Pro
180 185 190

Ser Gly Ala Gln Val Lys Tyr Tyr Cys Lys Cys Pro Asp Val Arg Glu
195 200 205

Gly Ile Thr Ser Ser Asp His Thr Thr Thr Cys Thr Asp Val Lys Gln
210 215 220

Cys Arg Ala Tyr Leu Ile Asp Asn Lys Lys Trp Val Tyr Asn Ser Gly
225 230 235 240

Arg Leu Pro Arg Gly Glu Gly Asp Thr Phe Lys Gly Lys Leu His Val
245 250 255

Pro Phe Val Pro Val Lys Ala Lys Cys Ile Ala Thr Leu Ala Pro Glu
260 265 270

Pro Leu Val Glu His Lys His Arg Thr Leu Ile Leu His Leu His Pro
275 280 285

Asp His Pro Thr Leu Leu Thr Thr Arg Ser Leu Gly Ser Asp Ala Asn
290 295 300

Pro Thr Arg Gln Trp Ile Glu Arg Pro Thr Thr Val Asn Phe Thr Val
305 310 315 320

ES 2 648 899 T3

Thr Gly Glu Gly Leu Glu Tyr Thr Trp Gly Asn His Pro Pro Lys Arg
325 330 335

Val Trp Ala Gln Glu Ser Gly Glu Gly Asn Pro His Gly Trp Pro His
340 345 350

Glu Val Val Val Tyr Tyr Tyr Asn Arg Tyr Pro Leu Thr Thr Ile Ile
355 360 365

Gly Arg Pro His Gly Gly Gly Ser Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr
370 375 380

Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln
385 390 395 400

Gly Leu His Glu Ile Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp
405 410 415

Ala Val Glu Val Pro Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro
420 425 430

Leu Met Gln Ala Thr Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu
435 440 445

Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln
450 455 460

Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val
465 470 475 480

Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly
485 490 495

Asn Pro Ala Ala Thr Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro
500 505 510

Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala
515 520 525

Val Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala
530 535 540

His Glu Gly His Arg Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile
545 550 555 560

Gly Ala Pro Gly Ser Leu Glu His His His His His His
565 570

<210> 77
<211> 1792
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP-sE2 del virus de la encefalitis equina venezolana -SNAPlike-Histag para la expresión en células S2

<400> 77

ES 2 648 899 T3

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gcctttgttg gcctctcgct cgggagatct 60
 agatcttcta ccgaggagct gtttaaggag tataagctaa cgcgccctta catggccaga 120
 tgcatacagat gtgccgttgg gagctgccat agtccaatag caattgaggc agtgaagagc 180
 gacgggcacg acggctatgt tagacttcag acttcctcgc agtatggcct ggattcctct 240
 ggcaacttaa agggaaggac tatgcggtat gatatgcacg ggaccattga agagatacca 300
 ctacatcaag tgtcactcca cacatctcgc ccgtgcaca ttgtggatgg gcatggttat 360
 tttctgcttg ctaggtgccc ggcaggggac tccatcacca tggaaattaa gaaagttca 420
 gtcacacact cctgctcagt gccgtatgaa gtgaaattta atcctgtagg cagagaactc 480
 tacactcadc caccagaaca cggagcagag caagcgtgcc aagtctacgc gcacgatgca 540
 cagaacagag gagcttatgt cgagatgcac ctcccgggct cagaagtgga cagcagtttg 600
 atttccttga gcggcagttc agtcaccgtg acacctcctg tcgggactag cgccttggtg 660
 aatgcaagt gcggcggcac aaagatctcc gaaacctca acaaggcaa acagttcagc 720
 cagtgcacaa agaaggagca gtgcagagca tatcgactgc agaatgacaa gtgggtgtat 780
 aattctgaca aactgcccac agcagcggga gccaccctaa aaggaaaact acacgtcccg 840
 ttcttctgctg cagacggcaa atgcaccgtg cctctagcac cggaacctat gataaccttc 900
 ggtttccgat cagtgtcact gaaactgcac cctaagaatc ccacatatct gaccactcgc 960
 caacttgctg atgagcctca ttacacgcac gagctcatat ctgaaccagc tgttaggaat 1020
 tttaccgtca ctgaaaaggg gtgggagttt gtatggggaa accatccgcc gaaaaggttt 1080
 tgggcacagg aaacagcacc cggaaatcca catgggctgc cacatgaggt gataactcat 1140
 tattaccaca gataccctat gtccacgcgg ccgcacggcg gaggtagcaa agactgcgaa 1200
 atgaagcgca ccaccctgga tagccctctg ggcaagctgg aactgtcttg gtgcgaacag 1260
 ggcctgcacg agatcaagct gctgggcaaa ggaacatctg ccgccgacgc cgtggaagtg 1320
 cctgccccag ccgccgtgct gggcggacca gagccactga tgcaggccac cgcctggctc 1380
 aacgcctact ttaccagcc tgaggccatc gaggagttcc ctgtgccagc cctgcaccac 1440
 ccagtgttcc agcaggagag ctttaccgcg caggtgctgt ggaaactgct gaaagtggtg 1500
 aagttcggag aggtcatcag ctaccagcag ctggccgccc tggccggcaa tcccgcgccc 1560
 accgcccgcg tgaaaaccgc cctgagcggga aatcccgtgc ccattctgat ccctgccac 1620
 cgggtgggtg ctagctctgg cgcctggggg ggctacgagg gcgggctcgc cgtgaaagag 1680
 tggctgctgg cccacgaggg ccacagactg ggcaagcctg ggctgggtcc tgcaggtata 1740
 ggcgcgccag ggtccctgga gcatcatcat catcatcatt gatgacgggc cc 1792

5

<210> 78
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión [sE2 de la encefalitis equina venezolana -SNAPlike-Histag]

15

<400> 78

ES 2 648 899 T3

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

ES 2 648 899 T3

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

ES 2 648 899 T3

420	425	430																			
Glu	Pro	Leu	Met	Gln	Ala	Thr	Ala	Trp	Leu	Asn	Ala	Tyr	Phe	His	Gln						
	435						440					445									
Pro	Glu	Ala	Ile	Glu	Glu	Phe	Pro	Val	Pro	Ala	Leu	His	His	Pro	Val						
	450					455					460										
Phe	Gln	Gln	Glu	Ser	Phe	Thr	Arg	Gln	Val	Leu	Trp	Lys	Leu	Leu	Lys						
465					470					475					480						
Val	Val	Lys	Phe	Gly	Glu	Val	Ile	Ser	Tyr	Gln	Gln	Leu	Ala	Ala	Leu						
				485					490					495							
Ala	Gly	Asn	Pro	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Val	Lys	Thr	Ala	Leu	Ser	Gly						
			500					505					510								
Asn	Pro	Val	Pro	Ile	Leu	Ile	Pro	Cys	His	Arg	Val	Val	Ser	Ser	Ser						
		515					520					525									
Gly	Ala	Val	Gly	Gly	Tyr	Glu	Gly	Gly	Leu	Ala	Val	Lys	Glu	Trp	Leu						
	530					535					540										
Leu	Ala	His	Glu	Gly	His	Arg	Leu	Gly	Lys	Pro	Gly	Leu	Gly	Pro	Ala						
545					550					555					560						
Gly	Ile	Gly	Ala	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	His	His	His	His	His	His	His						
				565					570						575						

<210> 79

<211> 1442

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP- SNAPlike-proteína N de Akabane –sitio de escisión de proTEV -
Histag para la expresión en células S2

<400> 79

atgaagttat	gcatattact	ggccgtcgtg	gtggcctttg	ttggcctctc	gctcgggaga	60
tctgacaaag	actgcgaaat	gaaaagaact	acattggatt	caccacttgg	gaagttggaa	120
ctgagtgat	gcgagcaagg	attgcatgaa	attaagctac	tgggaaaagg	aacttctgct	180
gctgatgcag	ttgaagttcc	agcaccagca	gctgttcttg	gaggtcctga	gccctcatg	240
caagccacag	cctggcttaa	cgcatatttc	caccagcctg	aggccattga	ggaattcca	300
gtccccgccc	ttcaccatcc	tgtgtttcag	caggagagct	tcaccgcgca	ggctcctgtg	360
aaattgctga	aggtggtcaa	gtttggtgaa	gtgatttcat	atcagcaact	tgctgcattg	420

15

ES 2 648 899 T3

```

gccgtaacc cgcagctac agctgccgtg aaaactgctc tcagcggaaa tcctgtgcc 480
atcctgatcc cttgtcacag agtcgtttca tcttccggag ctgtaggtgg ctatgaagga 540
ggactggcag ttaaggagtg gctgctggct catgaaggtc atagacttgg aaagcctggg 600
ctgggtcctg ctggtatagg cgcgccaggg tccctagggtg gcggatccga aaacctgtac 660
ttccagagcg atatcgcaa tcaatattt ttcaacgatg ttccacaacg gaatgcagct 720
acatttaatc cggatgcagg gtatgtggca tttatcagta agtatgggca gcagctcaac 780
tttactgttg ctagagtctt cttcctcaac cagaagaagg ccaagatggt cttacataag 840
acgccacaac caagtgtcga tcttactttt gcaggggtca aatttacagt ggttaataac 900
cattttcccc agtatactgc aaatccggtg tcagacactg cctttacgct ccatcgcac 960
tcgggctact tagctcgatg ggttgctgag cagtgcgaagg ctaatcagat caaacttgca 1020
gaggcagctg ctacaatcgt aatgccgctg gctgaagtga agggctgcac ctggagtgat 1080
gggtacgcaa tgtacctagg ctttcccct ggtgctgaga tgtttctgga aaccttgag 1140
ttttacccat tggttattga catgcaccgt gtgataaagg atgggatgga tgtcaacttc 1200
atgaggaagg tcttacgcca gagatatggg cagctgactg cagaagaatg gatgacatct 1260
aagttggacg cagtcaaggc tgcatttagc tcagttgccc aaatattcctg ggccaaatct 1320
ggcttctcac ctgcagctag agctttcctg gctcaatttg gtattcagat cccgggagag 1380
aatctatatt ttcaagggcc cggcggaggt agtcaccatc atcaccatca ctaatgaccg 1440
gt 1442

```

<210> 80
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proteína N de Akabane -Histag]

10

<400> 80

```

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
1           5           10           15

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
20           25           30

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
35           40           45

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
50           55           60

```

ES 2 648 899 T3

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
65 70 75 80

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
85 90 95

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
100 105 110

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
115 120 125

Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
130 135 140

Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
145 150 155 160

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
165 170 175

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser
180 185 190

Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Asp Ile Ala Asn
195 200 205

Gln Phe Ile Phe Asn Asp Val Pro Gln Arg Asn Ala Ala Thr Phe Asn
210 215 220

Pro Asp Ala Gly Tyr Val Ala Phe Ile Ser Lys Tyr Gly Gln Gln Leu
225 230 235 240

Asn Phe Thr Val Ala Arg Val Phe Phe Leu Asn Gln Lys Lys Ala Lys
245 250 255

Met Val Leu His Lys Thr Pro Gln Pro Ser Val Asp Leu Thr Phe Ala
260 265 270

Gly Val Lys Phe Thr Val Val Asn Asn His Phe Pro Gln Tyr Thr Ala
275 280 285

Asn Pro Val Ser Asp Thr Ala Phe Thr Leu His Arg Ile Ser Gly Tyr
290 295 300

Leu Ala Arg Trp Val Ala Glu Gln Cys Lys Ala Asn Gln Ile Lys Leu
305 310 315 320

ES 2 648 899 T3

Ala Glu Ala Ala Ala Thr Ile Val Met Pro Leu Ala Glu Val Lys Gly
 325 330 335

Cys Thr Trp Ser Asp Gly Tyr Ala Met Tyr Leu Gly Phe Ala Pro Gly
 340 345 350

Ala Glu Met Phe Leu Glu Thr Phe Glu Phe Tyr Pro Leu Val Ile Asp
 355 360 365

Met His Arg Val Ile Lys Asp Gly Met Asp Val Asn Phe Met Arg Lys
 370 375 380

Val Leu Arg Gln Arg Tyr Gly Gln Leu Thr Ala Glu Glu Trp Met Thr
 385 390 395 400

Ser Lys Leu Asp Ala Val Lys Ala Ala Phe Ser Ser Val Ala Gln Ile
 405 410 415

Ser Trp Ala Lys Ser Gly Phe Ser Pro Ala Ala Arg Ala Phe Leu Ala
 420 425 430

Gln Phe Gly Ile Gln Ile Pro Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro
 435 440 445

Gly Gly Gly Ser His His His His His His
 450 455

<210> 81
 <211> 1451
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP- SNAPlike-proteína N de Aino –sitio de escisión de proTEV -Histag
 para la expresión en células S2

<400> 81

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gtggcctttg ttggcctctc gctcgggaga 60
 tctagatctg acaaagactg cgaaatgaaa agaactacat tggattcacc acttggaag 120
 ttggaactga gtggatgcga gcaaggattg catgaaatta agctactggg aaaaggaact 180
 tctgctgctg atgcagttga agttccagca ccagcagctg ttcttggagg tctgagccc 240
 ctcatgcaag ccacagcctg gcttaacgca tatttccacc agcctgaggg cattgaggaa 300
 tttccagtcc ccgcccttca ccatcctgtg tttcagcagg agagcttcac ccgccaggtc 360
 ctgtggaaaat tgctgaaggt ggtcaagttt ggtgaagtga tttcatatca gcaacttgct 420
 gcattggccg gtaaccccg agctacagct gccgtgaaaa ctgctctcag cggaaatcct 480

15

ES 2 648 899 T3

gtgccatcc tgatcccttg tcacagagtc gtttcatctt cggagctgt aggtggctat 540
 gaaggaggac tggcagttaa ggagtggctg ctggctcatg aaggtcatag acttggaaag 600
 cctgggctgg gtctgctgg tatagcgcg ccagggtccc taggtggcgg atccgaaaac 660
 ctgtacttcc agagcgatat cgcaaaccaa tttattttcc aagatgttcc tcaacggaat 720
 ctcgctacat ttaaccggga ggtcgggtat gtggcattta ttgctaaaca tgggtcccaa 780
 ctcaatttgc ataccgtag agtcttcttc ctcaatcaga agaaggccaa gatggtgctc 840
 agtaagacgg cacaaccaag tgttgatctt acatttggtg gcatcaaatt tacactgggt 900
 aataaccatt ttcccata cacagcaaat cctgtgccag aactgacct cactctccac 960
 cgtctctcag gttatctagc aaaatgggtt gcagaccaat gcaaaacaaa tcagattaaa 1020
 ctggctgagg ccatggaaaa aattgtcatg ccacttgcctg aagtgaagg ttgcacctgg 1080
 actgaaggac tgactatgta tctgggattt gcaccaggcg ctgaaatgtt tttagaaaca 1140
 tttgagttct accctttggt tattgacatg cacagagtgc tgaagatgg aatggatgct 1200
 aactttatga gaaaggctct tcgccagcgc tatggcacat tgactgcaga acagtggatg 1260
 actcaaaaaa tagatgctgt ccgtgcagcc ttcaatgctg ttgggcagct aagttgggct 1320
 aatcaggat tctcaccagc tgccagagcc ttccttgccc aattcggcat aaacatgatc 1380
 ccgggagaga atctatattt tcaagggcc ccgggaggta gtcacatca tcacatcac 1440
 taatgaccgg t 1451

<210> 82
 <211> 459
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proteína N de Aino -Histag]

<400> 82

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

ES 2 648 899 T3

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
65 70 75 80

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
85 90 95

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
100 105 110

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
115 120 125

Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
130 135 140

Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
145 150 155 160

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
165 170 175

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser
180 185 190

Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Asp Ile Ala Asn
195 200 205

Gln Phe Ile Phe Gln Asp Val Pro Gln Arg Asn Leu Ala Thr Phe Asn
210 215 220

Pro Glu Val Gly Tyr Val Ala Phe Ile Ala Lys His Gly Ser Gln Leu
225 230 235 240

Asn Phe Asp Thr Val Arg Val Phe Phe Leu Asn Gln Lys Lys Ala Lys
245 250 255

Met Val Leu Ser Lys Thr Ala Gln Pro Ser Val Asp Leu Thr Phe Gly
260 265 270

Gly Ile Lys Phe Thr Leu Val Asn Asn His Phe Pro Gln Tyr Thr Ala
275 280 285

Asn Pro Val Pro Asp Thr Ala Leu Thr Leu His Arg Leu Ser Gly Tyr
290 295 300

Leu Ala Lys Trp Val Ala Asp Gln Cys Lys Thr Asn Gln Ile Lys Leu
305 310 315 320

ES 2 648 899 T3

Ala Glu Ala Met Glu Lys Ile Val Met Pro Leu Ala Glu Val Lys Gly
 325 330 335

Cys Thr Trp Thr Glu Gly Leu Thr Met Tyr Leu Gly Phe Ala Pro Gly
 340 345 350

Ala Glu Met Phe Leu Glu Thr Phe Glu Phe Tyr Pro Leu Val Ile Asp
 355 360 365

Met His Arg Val Leu Lys Asp Gly Met Asp Val Asn Phe Met Arg Lys
 370 375 380

Val Leu Arg Gln Arg Tyr Gly Thr Leu Thr Ala Glu Gln Trp Met Thr
 385 390 395 400

Gln Lys Ile Asp Ala Val Arg Ala Ala Phe Asn Ala Val Gly Gln Leu
 405 410 415

Ser Trp Ala Lys Ser Gly Phe Ser Pro Ala Ala Arg Ala Phe Leu Ala
 420 425 430

Gln Phe Gly Ile Asn Met Ile Pro Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
 435 440 445

Pro Gly Gly Gly Ser His His His His His His
 450 455

- <210> 83
- <211> 1448
- 5 <212> ADN
- <213> artificial

- <220>
- 10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP - SNAPlike-proteína N de Shamonda –sitio de escisión de proTEV - Histag para la expresión en células S2

<400> 83

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gtggcctttg ttggcctctc gctcgggaga	60
tctagatctg acaaagactg cgaaatgaaa agaactacat tggattcacc acttgggaag	120
ttggaactga gtggatgcga gcaaggattg catgaaatta agctactggg aaaaggaact	180
tctgctgctg atgcagttga agttccagca ccagcagctg ttcttggagg tctgagccc	240
ctcatgcaag ccacagcctg gcttaacgca tatttccacc agcctgaggc cattgaggaa	300
tttccagtcc ccgcccttca ccatcctgtg tttcagcagg agagcttcac ccgccaggtc	360
ctgtggaaaat tgctgaaggt ggtcaagttt ggtgaagtga tttcatatca gcaacttgct	420
gcattggccg gtaaccccg agctacagct gccgtgaaaa ctgctctcag cggaaatcct	480

15

ES 2 648 899 T3

```

gtgccatcc tgatcccttg tcacagagtc gtttcatctt cggagctgt aggtggctat 540
gaaggaggac tggcagttaa ggagtggctg ctggctcatg aaggtcatag acttggaag 600
cctgggctgg gtctgtctgg tatagggcgc ccagggtccc taggtggcgg atccgaaaac 660
ctgtacttcc agagcgatat ctcaagccaa ttcatttttg aagatgtacc acaacggaat 720
gcagctacat ttaacccgga aggtgggtat gtggcattta ttgtaagta tgggcaacaa 780
ctcaatttgc gggttgctaa agtcttcttc ctcaaccaga agaaggccaa aatggccta 840
cataagacgg gacaaccaag tgtcgatctt acttttggtg gggcaaat cacagtggtt 900
aataaccatt ttcccataa tgtctcaaat cctgtgccag acaatgcat tacactcac 960
aggatgtcag gttatctagc acgctggatt gctgatacat gcaaggctag tgcctcaaa 1020
ctagtgaag ctagtgtca aattgtcatg ccccttctg aggttaagg atgtacctg 1080
gctgatggtt atacaatga tcttggattt gcacctgggg ccgaaatgtt ccttgatgct 1140
tttgattttt atccgctagt tatcgaaatg catagggtcc ttaaggacaa tatggatgta 1200
aattttatga aaaaagtcct ccgccaacgc tatggaacaa tgactgctga agaatggatg 1260
actcagaaaa taccagaaat aaaggctgct ttcaattctg ttggacaact tgcctgggct 1320
aatctggat tctctcctgc tgctagaact ttcttgacgc aatttggat caacatcccg 1380
ggagagaatc tatattttca agggcccggc ggaggtagtc accatcatca ccatcactaa 1440
tgaccggt 1448

```

5 <210> 84
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proteína N de Shamonda -Histag]

<400> 84

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
 1 5 10 15

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
 20 25 30

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
 35 40 45

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
 50 55 60

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe

ES 2 648 899 T3

Ala Glu Ala Ser Ala Gln Ile Val Met Pro Leu Ala Glu Val Lys Gly
 325 330 335

Cys Thr Trp Ala Asp Gly Tyr Thr Met Tyr Leu Gly Phe Ala Pro Gly
 340 345 350

Ala Glu Met Phe Leu Asp Ala Phe Asp Phe Tyr Pro Leu Val Ile Glu
 355 360 365

Met His Arg Val Leu Lys Asp Asn Met Asp Val Asn Phe Met Lys Lys
 370 375 380

Val Leu Arg Gln Arg Tyr Gly Thr Met Thr Ala Glu Glu Trp Met Thr
 385 390 395 400

Gln Lys Ile Pro Glu Ile Lys Ala Ala Phe Asn Ser Val Gly Gln Leu
 405 410 415

Ala Trp Ala Lys Ser Gly Phe Ser Pro Ala Ala Arg Thr Phe Leu Gln
 420 425 430

Gln Phe Gly Ile Asn Ile Pro Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro
 435 440 445

Gly Gly Gly Ser His His His His His His
 450 455

- <210> 85
- <211> 1991
- 5 <212> ADN
- <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP -SNAPlike-sitio de escisión de proTEV -proteína N de la cepa 2cEMC/2012 de betacoronavirus humano- Histag para la expresión en células S2

<400> 85

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gtggcctttg ttggcctctc gctcgggaga	60
tctagatctg acaaagactg cgaaatgaaa agaactacat tggattcacc acttggaag	120
ttggaactga gtggatgcga gcaaggattg catgaaatta agctactggg aaaaggaact	180
tctgctgctg atgcagttga agttccagca ccagcagctg ttcttggagg tctgagccc	240
ctcatgcaag ccacagcctg gcttaacgca tatttccacc agcctgaggc cattgaggaa	300
tttccagtcc ccgcccttca ccatcctgtg tttcagcagg agagcttcac ccgccaggtc	360
ctgtggaaaat tgctgaaggt ggtcaagttt ggtgaagtga tttcatatca gcaacttgct	420
gcattggccg gtaaccccg agctacagct gccgtgaaaa ctgctctcag cggaaatcct	480

15

ES 2 648 899 T3

gtgccatcc tgatcccttg tcacagagtc gtttcatctt ccggagctgt aggtggctat 540
 gaaggaggac tggcagttaa ggagtggctg ctggctcatg aaggtcatag acttggaag 600
 cctgggctgg gtctgctgg tataggcgcc ccagggtccc taggtggcgg atccgaaaac 660
 ctgtacttcc agagcgatat cgcacccct gctgcaacctc gtgctgtttc ctttgccgat 720
 aacaatgata taacaaatac aaacctatct cgaggtagag gacgtaatcc aaaaccacga 780
 gctgcaccaa ataactgt ctcttggtac actgggctta cccaacacgg gaaagtccct 840
 cttaccttc cacctgggca ggggtgtacct cttaatgcc attctacccc tggcggaaaat 900
 gctgggtatt ggcggagaca ggacagaaaa attaataccg ggaatggaat taagcaactg 960
 gctcccagggt ggtacttcta ctacactgga actggaccgg aagcagcact cccattccgg 1020
 gctgttaagg atggcatcgt ttgggtccat gaagatggcg ccaactgatgc tccttcaact 1080
 tttgggacgc ggaaccctaa caatgattca gctattgtta cacaattcgc gcccggtact 1140
 aaacttccta aaaacttcca cattgagggg actggaggca atagtcaatc atcttcaaga 1200
 gcctctagct taagcagaaa ctcttccagg tctagttcac aaggttcaag atcaggaaaac 1260
 tctaccgcg gcacttctcc aggtccatct ggaatcggag cagtaggag tgatctactt 1320
 taccttgatc ttctgaacag actacaagcc cttagtctg gcaaagtaaa gcaatcgcag 1380
 ccaaaagtaa tcaactaaga agatgctgct gctgctaaaa ataagatgcg ccacaagcgc 1440
 acttccacca aaagtttcaa catgggtcag gcttttggtc ttgcggacc aggagacctc 1500
 cagggaaact ttggtgatct tcaattgaat aaactcggca ctgaggacc acgttggccc 1560
 caaattgctg agcttgctcc tacagccagt gcttttatgg gtatgtcgca atttaaactt 1620
 acccatcaga acaatgatga tcatggcaac cctgtgtact tccttcggta cagtggagcc 1680
 attaaacttg acccaaagaa tccaactac aataagtggg tggagcttct tgagcaaaat 1740
 attgatgcct acaaaacctt ccctaagaag gaaaagaaac aaaaggcacc aaaagaagaa 1800
 tcaacagacc aaatgtctga acctccaag ggcagcgtg tgcaaggtag catcactcag 1860
 cgcactcgca ccggtccaag tgttcagcct ggtccaatga ttgatgttaa cactgatggc 1920
 ccgggagaga atctatattt tcaagggccc ggcggaggta gtcacatca tcacatcac 1980
 taatgaccgg t 1991

<210> 86
 <211> 639
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proTEV-proteína N de COV -Histag]

10

<400> 86

ES 2 648 899 T3

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

ES 2 648 899 T3

Lys Val Pro Leu Thr Phe Pro Pro Gly Gln Gly Val Pro Leu Asn Ala
 260 265 270

Asn Ser Thr Pro Ala Gln Asn Ala Gly Tyr Trp Arg Arg Gln Asp Arg
 275 280 285

Lys Ile Asn Thr Gly Asn Gly Ile Lys Gln Leu Ala Pro Arg Trp Tyr
 290 295 300

Phe Tyr Tyr Thr Gly Thr Gly Pro Glu Ala Ala Leu Pro Phe Arg Ala
 305 310 315 320

Val Lys Asp Gly Ile Val Trp Val His Glu Asp Gly Ala Thr Asp Ala
 325 330 335

Pro Ser Thr Phe Gly Thr Arg Asn Pro Asn Asn Asp Ser Ala Ile Val
 340 345 350

Thr Gln Phe Ala Pro Gly Thr Lys Leu Pro Lys Asn Phe His Ile Glu
 355 360 365

Gly Thr Gly Gly Asn Ser Gln Ser Ser Ser Arg Ala Ser Ser Leu Ser
 370 375 380

Arg Asn Ser Ser Arg Ser Ser Ser Gln Gly Ser Arg Ser Gly Asn Ser
 385 390 395 400

Thr Arg Gly Thr Ser Pro Gly Pro Ser Gly Ile Gly Ala Val Gly Gly
 405 410 415

Asp Leu Leu Tyr Leu Asp Leu Leu Asn Arg Leu Gln Ala Leu Glu Ser
 420 425 430

Gly Lys Val Lys Gln Ser Gln Pro Lys Val Ile Thr Lys Lys Asp Ala
 435 440 445

Ala Ala Ala Lys Asn Lys Met Arg His Lys Arg Thr Ser Thr Lys Ser
 450 455 460

Phe Asn Met Val Gln Ala Phe Gly Leu Arg Gly Pro Gly Asp Leu Gln
 465 470 475 480

Gly Asn Phe Gly Asp Leu Gln Leu Asn Lys Leu Gly Thr Glu Asp Pro
 485 490 495

Arg Trp Pro Gln Ile Ala Glu Leu Ala Pro Thr Ala Ser Ala Phe Met

ES 2 648 899 T3

500	505	510
Gly Met Ser Gln Phe Lys Leu Thr His Gln Asn Asn Asp Asp His Gly		
515	520	525
Asn Pro Val Tyr Phe Leu Arg Tyr Ser Gly Ala Ile Lys Leu Asp Pro		
530	535	540
Lys Asn Pro Asn Tyr Asn Lys Trp Leu Glu Leu Leu Glu Gln Asn Ile		
545	550	555
Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Lys Lys Glu Lys Lys Gln Lys Ala Pro		
565	570	575
Lys Glu Glu Ser Thr Asp Gln Met Ser Glu Pro Pro Lys Glu Gln Arg		
580	585	590
Val Gln Gly Ser Ile Thr Gln Arg Thr Arg Thr Arg Pro Ser Val Gln		
595	600	605
Pro Gly Pro Met Ile Asp Val Asn Thr Asp Gly Pro Gly Glu Asn Leu		
610	615	620
Tyr Phe Gln Gly Pro Gly Gly Gly Ser His His His His His His		
625	630	635

<210> 87
 <211> 4465
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP- proteína S de la cepa 2cEMC/2012 de betacoronavirus humano-SNAPlike - Histag para la expresión en células S2

<400> 87

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gtggcctttg ttggcctctc gctcgggaga	60
tctagatctg tagggccaga ttctgttaag tctgcttgta ttgaggttga tatacaacag	120
actttccttg ataaaacttg gcctaggcca attgatgttt ctaaggctga cggtattata	180
taccctcaag gccgtacata ttctaacata actatcactt atcaaggtct ttttcctat	240
caggagacc atggtgatat gtatgtttac tctgcaggac atgctacagg cacaactcca	300
caaaagttgt ttgtagctaa ctattctcag gacgtcaaac agtttgctaa tgggtttgtc	360
gtccgtatag gacgagctgc caattccact ggcactgtta ttattagccc atctaccagc	420
gctactatac gaaaaattta ccctgctttt atgctggggt cttcagttgg taatttctca	480
gatggtaaaa tgggcccgtt cttcaatcat actctagttc ttttgcccga tggatgtggc	540

15

ES 2 648 899 T3

actttactta gagcttttta ttgtattcta gagcctcgct ctggaaatca ttgtcctgct 600
ggcaattcct atacttcttt tgccacttat cacactcctg caacagattg ttctgatggc 660
aattacaatc gtaatgccag tctgaactct ttttaaggagt attttaattt acgtaactgc 720
acctttatgt acacttataa cattaccgaa gatgagattt tagagtgggt tggcattaca 780
caaaactgctc aagggtttca cctctctca tctcggtagt ttgatttga cggcggcaat 840
atgtttcaat ttgccacctt gcctgtttat gatactatta agtattatc tatcattcct 900
cacagtattc gttctatcca aagtgataga aaggcttggg ctgccttcta cgtatataaa 960
cttcaaccgt taactttcct gttggatfff tctgttgatg gttatatacg cagagctata 1020
gactgtgggt ttaatgattt gtcacaaact cactgctcat atgaatcctt cgatgttgaa 1080
tctggagttt attcagtttc gtctttcgaa gcaaaacctt ctggctcagt tgtggaacag 1140
gctgaagggt ttgaatgtga tttttacctt cttctgtctg gcacacctcc tcaggtttat 1200
aatttcaagc gtttggtttt taccaattgc aattataatc ttaccaaatt gctttcactt 1260
ttttctgtga atgattttac ttgtagtcaa atatctccag cagcaattgc aagcaactgt 1320
tattcttcac tgattttgga ttacttttca taccactta gtatgaaatc cgatctcagt 1380
gttagtctctg ctggccaat atcccagttt aattataaac agtccttttc taatcccaca 1440
tgtttgattt tagcgaactgt tcctcataac cttactacta ttactaagcc tcttaagtac 1500
agctatatta acaagtgtc tcgtcttctt tctgatgatc gtactgaagt acctcagta 1560
gtgaacgcta atcaatactc accctgtgta tcattgtcc catccactgt gtgggaagac 1620
gggtattatt atagaaaca actatctoca cttgaagggt gtggctggct tgttgctagt 1680
ggctcaactg ttgccatgac tgagcaatta cagatgggct ttgggtattac agttcaatat 1740
ggtagagaca ccaatagtgt ttgccccag ctggaatttg ctaatgacac aaaaattgcc 1800
tctcaattag gcaattgctt ggaatattcc ctctatggtg tttcgggccc tgggtgtttt 1860
cagaattgca cagctgtagg tgttcgacag cagecctttg tttatgatgc gtaccagaat 1920
ttagtggct attattctga tgatggcaac tactactgtt tgcgtgcttg tgttagtggt 1980
cctgtttctg tcatctatga taaagaaact aaaaccacg ctactctatt tggtagtggt 2040
gcatgtgaac acatttcttc taccatgtct caatactccc gttctacgcy atcaatgctt 2100
aaacggcgag attctacata tggccccctt cagacacctg ttggttgtgt cctaggactt 2160
gttaattcct ctttgttctg agaggactgc aagttgcctc ttggtaatc tctctgtgct 2220
cttctgaca cacctagtac tctcacacct cgcagtgctc gctctgttcc aggtgaaatg 2280
cgcttggcat ccattgcttt taatcatcct attcaggtg atcaacttaa tagtagttat 2340
tttaaattaa gtatacccac taatttttcc tttgggtgta ctcaggagta cattcagaca 2400
accattcaga aagttactgt tgattgtaaa cagtacgttt gcaatggttt ccagaagtgt 2460

ES 2 648 899 T3

gagcaattac tgcgagta tggccagttt tgttccaaaa taaaccaggc tctccatggt 2520
gccaatttac gccaggatga ttctgtacgt aatttgtttg cgagcgtgaa aagctctcaa 2580
tcatctccta tcataccagg ttttgagggt gactttaatt tgacacttct agaacctggt 2640
tctatatcta ctggcagtcg tagtgcacgt agtgctattg aggatttgct atttgacaaa 2700
gtcactatag ctgatcctgg ttatatgcaa ggttacgatg attgcatgca gcaaggcca 2760
gcatcagctc gtgatcctat ttgtgctcaa tatgtggctg gttacaaagt attacctcct 2820
cttatggatg ttaatatgga agccgcgtat acttcatctt tgcttggcag catagcagggt 2880
gttggtgga ctgctggctt atcctccttt gctgctatc catttgcaca gagtatcttt 2940
tataggtaa acggtgttg cattactcaa caggttcttt cagagaacca aaagctcatt 3000
gccaataagt ttaatcaggc tctgggagct atgcaaacag gcttactac aactaatgaa 3060
gcctttcaga aggttcagga tgctgtgaac aacaatgac aggctctatc caaattagcg 3120
agcgagctat ctaatacttt tgggtctatt tccgcctcta ttggagacat catacaacgt 3180
cttgatgttc tcgaacagga cgcccaaata gacagactta ttaatggccg ttgacaaca 3240
ctaaatgctt ttgttgaca gcagcttgtt cgttccgaat cagctgctct tccgctcaa 3300
ttggctaaag ataaagtcaa tgagtgtgtc aaggcacaat ccaagcgttc tggattttgc 3360
ggtcaaggca cacatatagt gtcctttggt gtaaagtccc ctaatggcct ttacttcatg 3420
catgttggtt attaccctag caaccacatt gaggttggtt ctgcttatgg tctttgcat 3480
gcagctaacc ctactaattg tatagcccct gttaatggct actttattaa aactaataac 3540
actaggattg ttgatgagtg gtcatatact ggctcgtcct tctatgcacc tgagcccatt 3600
acctccctta atactaagta tgttgacca caggtgacat accaaaacat ttctactaac 3660
ctcctcctc ctcttctcgg caattccacc gggattgact tccaagatga gttggatgag 3720
tttttcaaaa atgtagcac cagtatacct aattttggtt ccctaacaca gattaatact 3780
acattactcg atcttaccta cgagatgttg tctcttcaac aagttgtaa agcccttaag 3840
cggccgcacg gcggaggtag caaagactgc gaaatgaagc gcaccaccct ggatagccct 3900
ctgggcaagc tggaactgtc tgggtgcgaa cagggcctgc acgagatcaa gctgctgggc 3960
aaagaaacat ctgccgccga cgccgtgga gtgcctgcc cagccgccgt gctgggcgga 4020
ccagagccac tgatgcaggc caccgctgg ctcaacgcct actttacca gcctgaggcc 4080
atcgaggagt tcctgtgcc agccctgcac caccagtg tccagcagga gagctttacc 4140
cgccagggtc tgtggaaact gctgaaagt gtgaagtctg gagaggctcat cagctaccag 4200
cagctggccg ccctggccgg caatcccgcc gccaccgcc cgtgaaaac cgccctgagc 4260
ggaaatccc tgccattct gatcccctgc caccgggtgg tgtctagctc tggcgcctg 4320
gggggctacg agggcgggct cgccgtgaaa gagtggctgc tggcccacga gggccacaga 4380
ctgggcaagc ctgggctggg tcctgcaggt ataggcgcg cagggtcct ggagcatcat 4440
catcatcatc attgatgacg ggccc 4465

5 <210> 88
<211> 1463
<212> PRT
<213> artificial

ES 2 648 899 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [proteína huCOV.S-SNAPlike-Histag]

5 <400> 88

Arg Ser Val Gly Pro Asp Ser Val Lys Ser Ala Cys Ile Glu Val Asp
1 5 10 15

Ile Gln Gln Thr Phe Phe Asp Lys Thr Trp Pro Arg Pro Ile Asp Val
20 25 30

Ser Lys Ala Asp Gly Ile Ile Tyr Pro Gln Gly Arg Thr Tyr Ser Asn
35 40 45

Ile Thr Ile Thr Tyr Gln Gly Leu Phe Pro Tyr Gln Gly Asp His Gly
50 55 60

Asp Met Tyr Val Tyr Ser Ala Gly His Ala Thr Gly Thr Thr Pro Gln
65 70 75 80

Lys Leu Phe Val Ala Asn Tyr Ser Gln Asp Val Lys Gln Phe Ala Asn
85 90 95

Gly Phe Val Val Arg Ile Gly Ala Ala Ala Asn Ser Thr Gly Thr Val
100 105 110

Ile Ile Ser Pro Ser Thr Ser Ala Thr Ile Arg Lys Ile Tyr Pro Ala
115 120 125

Phe Met Leu Gly Ser Ser Val Gly Asn Phe Ser Asp Gly Lys Met Gly
130 135 140

Arg Phe Phe Asn His Thr Leu Val Leu Leu Pro Asp Gly Cys Gly Thr
145 150 155 160

Leu Leu Arg Ala Phe Tyr Cys Ile Leu Glu Pro Arg Ser Gly Asn His
165 170 175

Cys Pro Ala Gly Asn Ser Tyr Thr Ser Phe Ala Thr Tyr His Thr Pro

ES 2 648 899 T3

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

ES 2 648 899 T3

Ser Met Lys Ser Asp Leu Ser Val Ser Ser Ala Gly Pro Ile Ser Gln
 435 440 445

Phe Asn Tyr Lys Gln Ser Phe Ser Asn Pro Thr Cys Leu Ile Leu Ala
 450 455 460

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

Tyr Ile Asn Lys Cys Ser Arg Leu Leu Ser Asp Asp Arg Thr Glu Val
 485 490 495

Pro Gln Leu Val Asn Ala Asn Gln Tyr Ser Pro Cys Val Ser Ile Val
 500 505 510

Pro Ser Thr Val Trp Glu Asp Gly Asp Tyr Tyr Arg Lys Gln Leu Ser
 515 520 525

Pro Leu Glu Gly Gly Gly Trp Leu Val Ala Ser Gly Ser Thr Val Ala
 530 535 540

Met Thr Glu Gln Leu Gln Met Gly Phe Gly Ile Thr Val Gln Tyr Gly
 545 550 555 560

Thr Asp Thr Asn Ser Val Cys Pro Lys Leu Glu Phe Ala Asn Asp Thr
 565 570 575

Lys Ile Ala Ser Gln Leu Gly Asn Cys Val Glu Tyr Ser Leu Tyr Gly
 580 585 590

Val Ser Gly Arg Gly Val Phe Gln Asn Cys Thr Ala Val Gly Val Arg
 595 600 605

Gln Gln Arg Phe Val Tyr Asp Ala Tyr Gln Asn Leu Val Gly Tyr Tyr
 610 615 620

Ser Asp Asp Gly Asn Tyr Tyr Cys Leu Arg Ala Cys Val Ser Val Pro
 625 630 635 640

Val Ser Val Ile Tyr Asp Lys Glu Thr Lys Thr His Ala Thr Leu Phe
 645 650 655

Gly Ser Val Ala Cys Glu His Ile Ser Ser Thr Met Ser Gln Tyr Ser
 660 665 670

Arg Ser Thr Arg Ser Met Leu Lys Arg Arg Asp Ser Thr Tyr Gly Pro
 675 680 685

ES 2 648 899 T3

Leu Gln Thr Pro Val Gly Cys Val Leu Gly Leu Val Asn Ser Ser Leu
 690 695 700

Phe Val Glu Asp Cys Lys Leu Pro Leu Gly Gln Ser Leu Cys Ala Leu
 705 710 715 720

Pro Asp Thr Pro Ser Thr Leu Thr Pro Arg Ser Val Arg Ser Val Pro
 725 730 735

Gly Glu Met Arg Leu Ala Ser Ile Ala Phe Asn His Pro Ile Gln Val
 740 745 750

Asp Gln Leu Asn Ser Ser Tyr Phe Lys Leu Ser Ile Pro Thr Asn Phe
 755 760 765

Ser Phe Gly Val Thr Gln Glu Tyr Ile Gln Thr Thr Ile Gln Lys Val
 770 775 780

Thr Val Asp Cys Lys Gln Tyr Val Cys Asn Gly Phe Gln Lys Cys Glu
 785 790 795 800

Gln Leu Leu Arg Glu Tyr Gly Gln Phe Cys Ser Lys Ile Asn Gln Ala
 805 810 815

Leu His Gly Ala Asn Leu Arg Gln Asp Asp Ser Val Arg Asn Leu Phe
 820 825 830

Ala Ser Val Lys Ser Ser Gln Ser Ser Pro Ile Ile Pro Gly Phe Gly
 835 840 845

Gly Asp Phe Asn Leu Thr Leu Leu Glu Pro Val Ser Ile Ser Thr Gly
 850 855 860

Ser Arg Ser Ala Arg Ser Ala Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asp Lys Val
 865 870 875 880

Thr Ile Ala Asp Pro Gly Tyr Met Gln Gly Tyr Asp Asp Cys Met Gln
 885 890 895

Gln Gly Pro Ala Ser Ala Arg Asp Leu Ile Cys Ala Gln Tyr Val Ala
 900 905 910

Gly Tyr Lys Val Leu Pro Pro Leu Met Asp Val Asn Met Glu Ala Ala
 915 920 925

Tyr Thr Ser Ser Leu Leu Gly Ser Ile Ala Gly Val Gly Trp Thr Ala
 930 935 940

ES 2 648 899 T3

Gly Leu Ser Ser Phe Ala Ala Ile Pro Phe Ala Gln Ser Ile Phe Tyr
945 950 955 960

Arg Leu Asn Gly Val Gly Ile Thr Gln Gln Val Leu Ser Glu Asn Gln
965 970 975

Lys Leu Ile Ala Asn Lys Phe Asn Gln Ala Leu Gly Ala Met Gln Thr
980 985 990

Gly Phe Thr Thr Thr Asn Glu Ala Phe Gln Lys Val Gln Asp Ala Val
995 1000 1005

Asn Asn Asn Ala Gln Ala Leu Ser Lys Leu Ala Ser Glu Leu Ser
1010 1015 1020

Asn Thr Phe Gly Ala Ile Ser Ala Ser Ile Gly Asp Ile Ile Gln
1025 1030 1035

Arg Leu Asp Val Leu Glu Gln Asp Ala Gln Ile Asp Arg Leu Ile
1040 1045 1050

Asn Gly Arg Leu Thr Thr Leu Asn Ala Phe Val Ala Gln Gln Leu
1055 1060 1065

Val Arg Ser Glu Ser Ala Ala Leu Ser Ala Gln Leu Ala Lys Asp
1070 1075 1080

Lys Val Asn Glu Cys Val Lys Ala Gln Ser Lys Arg Ser Gly Phe
1085 1090 1095

Cys Gly Gln Gly Thr His Ile Val Ser Phe Val Val Asn Ala Pro
1100 1105 1110

Asn Gly Leu Tyr Phe Met His Val Gly Tyr Tyr Pro Ser Asn His
1115 1120 1125

Ile Glu Val Val Ser Ala Tyr Gly Leu Cys Asp Ala Ala Asn Pro
1130 1135 1140

Thr Asn Cys Ile Ala Pro Val Asn Gly Tyr Phe Ile Lys Thr Asn
1145 1150 1155

Asn Thr Arg Ile Val Asp Glu Trp Ser Tyr Thr Gly Ser Ser Phe
1160 1165 1170

Tyr Ala Pro Glu Pro Ile Thr Ser Leu Asn Thr Lys Tyr Val Ala

ES 2 648 899 T3

1175						1180									1185
Pro	Gln	Val	Thr	Tyr	Gln	Asn	Ile	Ser	Thr	Asn	Leu	Pro	Pro	Pro	
1190						1195					1200				
Leu	Leu	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Gln	Asp	Glu	Leu	Asp	
1205						1210					1215				
Glu	Phe	Phe	Lys	Asn	Val	Ser	Thr	Ser	Ile	Pro	Asn	Phe	Gly	Ser	
1220						1225					1230				
Leu	Thr	Gln	Ile	Asn	Thr	Thr	Leu	Leu	Asp	Leu	Thr	Tyr	Glu	Met	
1235						1240					1245				
Leu	Ser	Leu	Gln	Gln	Val	Val	Lys	Ala	Leu	Lys	Arg	Pro	His	Gly	
1250						1255					1260				
Gly	Gly	Ser	Lys	Asp	Cys	Glu	Met	Lys	Arg	Thr	Thr	Leu	Asp	Ser	
1265						1270					1275				
Pro	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Leu	Ser	Gly	Cys	Glu	Gln	Gly	Leu	His	
1280						1285					1290				
Glu	Ile	Lys	Leu	Leu	Gly	Lys	Gly	Thr	Ser	Ala	Ala	Asp	Ala	Val	
1295						1300					1305				
Glu	Val	Pro	Ala	Pro	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Gly	Pro	Glu	Pro	Leu	
1310						1315					1320				
Met	Gln	Ala	Thr	Ala	Trp	Leu	Asn	Ala	Tyr	Phe	His	Gln	Pro	Glu	
1325						1330					1335				
Ala	Ile	Glu	Glu	Phe	Pro	Val	Pro	Ala	Leu	His	His	Pro	Val	Phe	
1340						1345					1350				
Gln	Gln	Glu	Ser	Phe	Thr	Arg	Gln	Val	Leu	Trp	Lys	Leu	Leu	Lys	
1355						1360					1365				
Val	Val	Lys	Phe	Gly	Glu	Val	Ile	Ser	Tyr	Gln	Gln	Leu	Ala	Ala	
1370						1375					1380				
Leu	Ala	Gly	Asn	Pro	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Val	Lys	Thr	Ala	Leu	
1385						1390					1395				
Ser	Gly	Asn	Pro	Val	Pro	Ile	Leu	Ile	Pro	Cys	His	Arg	Val	Val	
1400						1405					1410				

ES 2 648 899 T3

Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val
 1415 1420 1425

Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly Lys Pro
 1430 1435 1440

Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser Leu Glu His
 1445 1450 1455

His His His His His
 1460

5 <210> 89
 <211> 1325
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP - SNAPlike -proTEV- proteína C de la cepa TCHM-R2/03 del virus de la hepatitis C de genotipo 1b - -proTEV - Histag para la expresión en células S2

<400> 89

atgaagttat	gcatattact	ggccgtcgtg	gtggcctttg	ttggcctctc	gctcgggaga	60
tctagatctg	acaaagactg	cgaaatgaaa	agaactacat	tggattcacc	acttgggaag	120
ttggaactga	gtggatgcga	gcaaggattg	catgaaatta	agctactggg	aaaaggaact	180
tctgctgctg	atgcagttga	agttccagca	ccagcagctg	ttcttggagg	tcctgagccc	240
ctcatgcaag	ccacagcctg	gcttaacgca	tatttccacc	agcctgaggc	cattgaggaa	300
tttccagtcc	ccgcccttca	ccatcctgtg	tttcagcagg	agagcttcac	ccgccaggtc	360
ctgtggaaat	tgctgaaggt	ggtcaagttt	ggtgaagtga	tttcatatca	gcaacttgct	420
gcattggccg	gtaaccccg	agctacagct	gccgtgaaaa	ctgctctcag	cggaaatcct	480
gtgcccatcc	tgatcccttg	tcacagagtc	gtttcatctt	ccggagctgt	aggtggctat	540
gaaggaggac	tggcagttaa	ggagtggctg	ctggctcatg	aaggtcatag	acttggaaag	600
cctgggctgg	gtcctgctgg	tatagggcgg	ccagggtccc	taggtggcgg	atccgaaaac	660
ctgtacttcc	agagcgatat	cagtacaaat	cctaaacctc	aaagaaaaac	taaacgaaat	720
actaatcgtc	gtccacaaga	tgtaagttt	ccgggaggag	gacaaattgt	tggtggagtt	780
tacctattgc	cgcaagagg	tcctcgttta	ggtgttcgag	caactagaaa	aacttctgaa	840
cgatcacaac	ctcgtggaag	acgacaacct	attcctaagg	ctcgtcagcc	tgaagtaga	900
gcttgggctc	agcctggtta	tccttggcct	ctatatggta	atgaaggaat	gggttgggca	960
ggatggctac	tatcacctcg	tggttctcga	cctagttggg	gtgcaaatga	ccctcgacga	1020
agatcacgta	atthaggtaa	ggtaattgat	acacttacat	gtggttttgc	tgatcttatg	1080
ggatatattc	cactagtagg	tgctccacta	ggtggagctg	caagagttct	tgacacatggt	1140
gtacgagttc	ttgaagatgg	agtgaactat	gcaacaggta	atcttcctgg	atgttcattt	1200
tctatttttc	tattagcttt	gctatcatgt	ctgactattc	cagcttcagc	tggccccgga	1260
gagaatctat	attttcaagg	gccccggcga	ggtagtcacc	atcatcacca	tcactaatga	1320
ccggt						1325

ES 2 648 899 T3

<210> 90
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proTEV-proteína C de HCV-proTEV-Histag]

<400> 90

10

```

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
1          5          10          15

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
20          25          30

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
35          40          45

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
50          55          60

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
65          70          75          80

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
85          90          95

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
100         105         110

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
115         120         125

Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
130         135         140

Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
145         150         155         160

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
    
```


ES 2 648 899 T3

proTEV – antígeno AMA-1(III) de Plasmodium falciparum - Histag para la expresión en células S2

<400> 91

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gtggcctttg ttggcctctc gctcgggaga	60
tctagatctg acaaagactg cgaaatgaaa agaactacat tggattcacc acttggaag	120
ttggaactga gtggatgca gcaaggattg catgaaatta agctactggg aaaaggaact	180
tctgtctctg atgcagttga agttccagca ccagcagctg ttcttgagag tcctgagccc	240
ctcatgcaag ccacagcctg gcttaacgca ttttccacc agcctgaggc cattgaggaa	300
tttccagtcc ccgcccttca ccatcctgtg tttcagcagg agagcttcac ccgccaggtc	360
ctgtggaagt tgetgaaggt ggtcaagttt ggtgaagtga tttcatatca gcaacttgct	420
gcattggccg gtaaccccg agctacagct gccgtgaaaa ctgctctcag cggaaatcct	480
gtgcccatcc tgatccctg tcacagagtc gtttcatctt ccggagctgt aggtggctat	540
gaaggaggac tggcagttaa ggagtggctg ctggctcatg aaggtcatag acttggaag	600
cctgggctgg gtctgtctgg tataggcgcg ccagggtccc taggtggcgg atccgaaaac	660
ctgtaactcc agagcgatat caaacaatgt ccacaaaatt ctggatgttt cagacattta	720
gatgaaagag aagaatgtaa atgtttatta aattacaac aagaaggtga taaatgtgtt	780
gaaaatccaa atcttacttg taacgaaaat aatggtgat gtgatgcaga tgccaaatgt	840
accgaagaag attcaggcag caacggaaag aaaatcacat gtgaatgtac taaacctgat	900
tcttatccac ttttcgatgg tattttcgga ggtggctctg agaatctata ttttcaaggg	960
cccgtggag gcgaagttga aaacaatfff ccatgttcat tatataaaga tgaaataatg	1020
aaagaaatcg aaagagaatc aaaacgaatt aaattaaatg ataatgatga tgaagggaat	1080
aaaaaaatta tagctccaag aatffffatt tcagatgata aagacagttt aaaatgcca	1140
tgtgaccctg aaatggtaag taatagtaca tgtcgtttct ttgtatgtaa atgtgtagaa	1200
agaagggcag aagtaacatc aaataatgaa gttgtagtta aagaagaata taaagatgaa	1260
tatgcagata ttcoctgaaca taaaccaact tatgataaaa tgctcccggg agagaatcta	1320
5 tattttcaag ggcccggcgg aggtagtac catcatcacc atcactaatg accggt	1376

<210> 92

<211> 434

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-MSP1-proTEV-AMA1-Histag]

15 <400> 92

ES 2 648 899 T3

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

ES 2 648 899 T3

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

His His

<210> 93
 <211> 2195
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP- SNAPlike -proTEV- forma corta modificada de HbpA de Leptospira interrogans serovar Lai str.56601 - proTEV- Histag para la expresión en células S2

10

<400> 93

ES 2 648 899 T3

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gtggcctttg ttggcctctc gctcgggaga	60
tctagatctg acaaagactg cgaaatgaaa agaactacat tggattcacc acttgggaag	120
ttggaactga gtggatgcga gcaaggattg catgaaatta agctactggg aaaaggaact	180
tctgctgctg atgcagttga agttccagca ccagcagctg ttcttgaggg tcctgagccc	240
ctcatgcaag ccacagcctg gcttaacgca tatttccacc agcctgagge cattgaggaa	300
tttccagtcc ccgcccttca ccatcctgtg tttcagcagg agagcttcac ccgccaggtc	360
ctgtggaat tgctgaaggt ggtcaagttt ggtgaagtga tttcatatca gcaacttgct	420
gcattggccg gtaaccccg agctacagct gccgtgaaaa ctgctctcag cggaaatcct	480
gtgccatcc tgatoccttg tcacagagtc gtttcatctt ccggagctgt aggtggctat	540
gaaggaggac tggcagttaa ggagtggctg ctggctcatg aaggctatag acttgaaaag	600
cctgggctgg gtccctgctgg tataggcgcg ccagggtccc taggtggcgg atccgaaaac	660
ctgtacttcc agagcgatat cttcaacacc acggccaaca tgggcttcag gaacgagtac	720
gtgagcggcg cgggtgccg aggttacaat aagaaccccg gctacagggt ggtcccaaac	780
tctcaggcga ctactgggaa cgcctatcag gacttgaaca cgggcatcaa cctgaccttc	840
aacccggacg gcaagttcaa ggggaagacg aggattctct accagcacag ggaccagaac	900
ggggtggacg tgaccagtc caaggccgtc ttcgaccgga acaacaagac gcacgacttc	960
ttggcgacgg ggtcgttgga gtacgggta gggaaagga acttgatctc cttcaggggg	1020
aacatctcca agtgggagaa caagtactac aacaaccaga gggggtcgga cgagttggac	1080
gtgaagcagt tgaactcggg gttgacgtcg caggggaccg tgcagttgga catggaggcc	1140
tctgagaagc acttcatcac tgtaggtcgc gagtcttcg cgaacgagtt ggagtcggac	1200
cgcttcgaga gcaggtacgt gtacaggacg aggaaggcgg tgttcttcca ggacgagtgg	1260
accgtgtccc ggtcgccgag gattcgggtg gtgccaggag tgaggtacga cgacgactcg	1320
cagttcggga accagacgac gccgaagctg gcggcccggc acgacatatt gcagaacttg	1380
gtgtggaggg cgagctacgg gaggggatta cggccgccga gcttgcagga gttgtacctg	1440
cggttcgaga acccggccgt gggttacgtg gtggagggta acccgaactt gaagccggag	1500
cggtcgatca cgatcaactc ggacttggag tacagcccgt tcagcttctt gacgttctcc	1560
ttgagcgtgt accggaacga catcatcaac ctgatccagt acaagttcga ctcgaacaag	1620
gggagggagt tcgcggagtt ccagctgcag aacatcgca aggcgtacac gagaggagga	1680

ES 2 648 899 T3

gagttcgcg tgcagtacag gttcttgaag tacttcacgc tggagttggg gtacaaccac 1740
 acggcacaga gggacctgag ctccggacag cggttggagg gcagggcgct gcaccaggcg 1800
 tcggcgaact tcatctacaa ctccgcccga ggattccaat tcaacctgag gggcaagcac 1860
 ttggacaaga ggccttcta cagctcgacc aacaacctgt cggcggccgg acaggactac 1920
 atccccagcg aggtgaagtt gaacgagaac ccgcccgtga tctacgggaa gccgttcacg 1980
 atcttgaacg tgaggatcga gcagaagttc ttcaacaagc acttcgcgct gttcttgggc 2040
 gtggacaact tgctcaacca gtacgagctg gcgtacaacc ccacgcgcc gaggttctac 2100
 tacggcgct tctcggccca gttcccggga gagaatctat attttcaagg gcccgcgga 2160
 ggtagtcacc atcatcacca tcactaatga ccggt 2195

<210> 94
 <211> 707
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proTEV-HbPA1-proTEV-Histag]

<400> 94

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

ES 2 648 899 T3

Tyr Val Tyr Arg Thr Arg Lys Ala Val Phe Phe Gln Asp Glu Trp Thr
 385 390 395 400
 Val Ser Arg Ser Pro Arg Ile Arg Val Val Pro Gly Val Arg Tyr Asp
 405 410 415
 Asp Asp Ser Gln Phe Gly Asn Gln Thr Thr Pro Lys Leu Ala Ala Arg
 420 425 430
 Tyr Asp Ile Leu Gln Asn Leu Val Trp Arg Ala Ser Tyr Gly Arg Gly
 435 440 445
 Leu Arg Pro Pro Ser Leu Gln Glu Leu Tyr Leu Arg Phe Glu Asn Pro
 450 455 460
 Ala Val Gly Tyr Val Val Glu Gly Asn Pro Asn Leu Lys Pro Glu Arg
 465 470 475 480
 Ser Ile Thr Ile Asn Ser Asp Leu Glu Tyr Ser Pro Phe Ser Phe Leu
 485 490 495
 Thr Phe Ser Leu Ser Val Tyr Arg Asn Asp Ile Ile Asn Leu Ile Gln
 500 505 510
 Tyr Lys Phe Asp Ser Asn Lys Gly Arg Glu Phe Ala Glu Phe Gln Leu
 515 520 525
 Gln Asn Ile Ala Lys Ala Tyr Thr Arg Gly Gly Glu Phe Gly Val Gln
 530 535 540
 Tyr Arg Phe Leu Lys Tyr Phe Thr Leu Glu Leu Gly Tyr Asn His Thr
 545 550 555 560
 Asp Thr Arg Asp Leu Ser Ser Asp Arg Pro Leu Glu Gly Arg Ala Leu
 565 570 575
 His Gln Ala Ser Ala Asn Phe Ile Tyr Asn Ser Pro Gly Gly Phe Gln
 580 585 590
 Phe Asn Leu Arg Gly Lys His Leu Asp Lys Arg Pro Phe Tyr Ser Ser
 595 600 605
 Thr Asn Asn Leu Ser Ala Ala Gly Gln Asp Tyr Ile Pro Ser Glu Val
 610 615 620
 Lys Leu Asn Glu Asn Pro Pro Val Ile Tyr Gly Lys Pro Phe Thr Ile
 625 630 635 640

ES 2 648 899 T3

Leu Asn Val Arg Ile Glu Gln Lys Phe Phe Asn Lys His Phe Ala Leu
 645 650 655

Phe Leu Gly Val Asp Asn Leu Leu Asn Gln Tyr Glu Leu Ala Tyr Asn
 660 665 670

Pro Thr Arg Pro Arg Phe Tyr Tyr Gly Gly Phe Ser Ala Gln Phe Pro
 675 680 685

Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro Gly Gly Gly Ser His His His
 690 695 700

His His His
 705

<210> 95
 <211> 968
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP- SNAPlike -proTEV- MUB40 - proTEV-Histag para la expresión en células S2

10

<400> 95

atgaagttat gcatattact ggccgctcgtg gtggcctttg ttggcctctc gctcgggaga	60
tcttcgcgag ctagcaccat gaaactatgt attctacttg cagttgttgc gttcgttagga	120
ttgtccttac ctacagctct ggcaagatct gacaaagact gcgaaatgaa aagaactaca	180
ttggattcac cacttgggaa gttggaactg agtggatgcg agcaaggatt gcatgaaatt	240
aagctaactgg gaaaaggaac ttctgctgct gatgcagttg aagttccagc accagcagct	300
gttcttggag gtccctgagcc cctcatgcaa gccacagcct ggcttaacgc atatttccac	360
cagcctgagg ccattgagga atttccagtc cccgcccttc accatcctgt gtttcagcag	420
gagagcttca cccgccaggt cctgtggaaa ttgctgaagg tggtaagtt tggggaagtg	480
atttcatatc agcaacttgc tgcatggcc ggtaaccccg cagctacagc tgccgtgaaa	540
actgctctca gcggaaatcc tgtgcccac ctagatccctt gtcacagagt cgtttcatct	600
tccggagctg taggtggcta tgaaggagga ctggcagtta aggagtggct gctggctcat	660
gaaggtcata gacttgaaa gcctgggctg ggtcctgctg gtataggcgc gccagggtcc	720
ctaggtggcg gatccgaaaa cctgtacttc cagagcgata tcacggctga aggcacaaag	780
aagtttgaag gcgacggtta tgaactgttc aaggacaact tcccagctgg tgagaagttc	840
gataacgatg acaccaacga tcaattctac acggtaatct tcaagcacca tcgtggcccg	900
ggagagaatc tatattttca agggcccggc ggaggtagtc accatcatca ccatcactaa	960
tgaccggt	968

15

<210> 96
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> artificial

20

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proTEV-MUB40-proTEV-Histag]

ES 2 648 899 T3

<400> 96

Ser Arg Ala Ser Thr Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala
 1 5 10 15

Phe Val Gly Leu Ser Leu Pro Thr Ala Leu Ala Arg Ser Asp Lys Asp
 20 25 30

Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly Lys Leu Glu
 35 40 45

Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu Leu Gly Lys
 50 55 60

Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala Pro Ala Ala Val
 65 70 75 80

Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr Ala Trp Leu Asn Ala
 85 90 95

Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val Pro Ala Leu
 100 105 110

His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp
 115 120 125

Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser Tyr Gln Gln
 130 135 140

Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr Ala Ala Val Lys Thr
 145 150 155 160

Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val
 165 170 175

Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val
 180 185 190

Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly Lys Pro Gly

5

ES 2 648 899 T3

195	200	205																		
Leu	Gly	Pro	Ala	Gly	Ile	Gly	Ala	Pro	Gly	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly	Ser					
210						215					220									
Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Glu	Gly	Ile	Lys	Lys					
225					230					235					240					
Phe	Glu	Gly	Asp	Gly	Tyr	Glu	Leu	Phe	Lys	Asp	Asn	Phe	Pro	Ala	Gly					
				245					250					255						
Glu	Lys	Phe	Asp	Asn	Asp	Asp	Thr	Asn	Asp	Gln	Phe	Tyr	Thr	Val	Ile					
			260					265					270							
Phe	Lys	His	His	Arg	Gly	Pro	Gly	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly	Pro					
		275					280					285								
Gly	Gly	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His											
	290					295														

<210> 97
 <211> 1238
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP- SNAPlike -proTEV- forma soluble de lectina similar a tipo C de ratón (CLEC5A) - proTEV- Histag para la expresión en células S2

<400> 97

atgaagttat gcatattact ggccgctcgtg gtggcctttg ttggcctctc gctcgggaga	60
tctagatctg acaagactg cgaaatgaaa agaactacat tggattcacc acttggaag	120
ttggaactga gtggatgcga gcaaggattg catgaaatta agctactggg aaaaggaact	180
tctgctgctg atgcagttga agttccagca ccagcagctg ttcttgagg tctgagccc	240
ctcatgcaag ccacagcctg gcttaacgca tatttccacc agcctgaggc cattgaggaa	300
tttccagtcc ccgcccttca ccatcctgtg tttcagcagg agagcttcac ccgccaggtc	360
ctgtggaaat tgctgaaggt ggtcaagttt ggtgaagtga tttcatatca gcaacttgct	420
gcattggccg gtaaccccg agctacagct gccgtgaaaa ctgctctcag cggaaatcct	480
gtgccatcc tgatcccttg tcacagagtc gtttcatctt ccggagctgt aggtggctat	540
gaaggaggac tggcagttaa ggagtggctg ctggctcatg aaggtcatag acttgaaag	600
cctgggctgg gtctgctgg tataggcgcg ccagggtccc taggtggcgg atccgaaac	660
ctgtacttcc agagcgatat cgtttttggc aaaagtaatg atggcttctg cccacggag	720
agctacggaa ccactagtgt gcagaatgtc tcacaaatct ttgggagaaa tgacgaaagt	780

15

ES 2 648 899 T3

```

accatgccta caaggagcta tggaacagtc tgtcccagaa actgggattt tcaccaagga      840
aaatgctttt tcttctcctt ctccgaatca ccttggaag acagcatgga ttatttgca      900
acacaagggg ccacactggc aattgtcaac actccagaga aactgaagta tcttcaggac      960
atagctggta ttgagaatta ctttattggt ttggtacgtc agcctggaga gaaaaagtgg     1020
cgctggatca acaactctgt gttcaatggc aatgttacca atcaggacca gaacttcgac     1080
tgtgtcacta taggtctgac gaagacatat gatgctgcat catgtgaagt cagctatcgc     1140
tggatctgcg aaatgaatgc caaaggcccg ggagagaatc tatattttca agggcccggc     1200
ggaggtagtc accatcatca ccatcactaa tgaccggt                               1238

```

<210> 98

<211> 388

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proTEV-moCLEC5A-proTEV-Histag]

<400> 98

```

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

```

ES 2 648 899 T3

Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
 165 170 175

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser
 180 185 190

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

Gly Lys Ser Asn Asp Gly Phe Val Pro Thr Glu Ser Tyr Gly Thr Thr
 210 215 220

Ser Val Gln Asn Val Ser Gln Ile Phe Gly Arg Asn Asp Glu Ser Thr
 225 230 235 240

Met Pro Thr Arg Ser Tyr Gly Thr Val Cys Pro Arg Asn Trp Asp Phe
 245 250 255

His Gln Gly Lys Cys Phe Phe Phe Ser Phe Ser Glu Ser Pro Trp Lys
 260 265 270

Asp Ser Met Asp Tyr Cys Ala Thr Gln Gly Ser Thr Leu Ala Ile Val
 275 280 285

Asn Thr Pro Glu Lys Leu Lys Tyr Leu Gln Asp Ile Ala Gly Ile Glu
 290 295 300

Asn Tyr Phe Ile Gly Leu Val Arg Gln Pro Gly Glu Lys Lys Trp Arg
 305 310 315 320

Trp Ile Asn Asn Ser Val Phe Asn Gly Asn Val Thr Asn Gln Asp Gln
 325 330 335

Asn Phe Asp Cys Val Thr Ile Gly Leu Thr Lys Thr Tyr Asp Ala Ala
 340 345 350

Ser Cys Glu Val Ser Tyr Arg Trp Ile Cys Glu Met Asn Ala Lys Gly
 355 360 365

Pro Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro Gly Gly Gly Ser His His
 370 375 380

His His His His
 385

5 <210> 99
 <211> 1229
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP- SNAPlike -proTEV- forma soluble de lectina similar a tipo C de

ES 2 648 899 T3

ratón (CLEC5A) - proTEV- Histag para la expresión en células S2

<400> 99

atgaagttat gcatattact ggccgctcgtg gtggcctttg ttggcctctc gctcgggaga	60
tctagatctg acaaagactg cgaaatgaaa agaactacat tggattcacc acttggaag	120
ttggaactga gtggatgcga gcaaggattg catgaaatta agctactggg aaaaggaact	180
tctgctgctg atgcagttga agttccagca ccagcagctg ttcttgagag tcctgagccc	240
ctcatgcaag ccacagcctg gcttaacgca tatttccacc agcctgaggc cattgaggaa	300
tttccagtcc ccgcccttca ccatcctgtg tttcagcagg agagcttcac ccgccaggtc	360
ctgtggaat tgcctgaagt ggtcaagttt ggtgaagtga tttcatatca gcaacttgct	420
gcattggccg gtaaccccg agctacagct gccgtgaaaa ctgctctcag cggaaatcct	480
gtgccatcc tgatccctg tcacagagtc gtttcatctt ccggagctgt aggtggctat	540
gaaggaggac tggcagttaa ggagtggctg ctggctcatg aaggtcatag acttggaag	600
cctgggctgg gtccctgctgg tataggcgcg ccagggtccc taggtggcgg atccgaaaac	660
ctgtacttcc agagcgatat cttaacaaa agtaacgatg gtttaccac caccaggagc	720
tatggaacag tctcacagat ttttgggagc agttcccaa gtcccaacgg cttcattacc	780
acaaggagct atggaacagt ctgccccaaa gactgggaat tttatcaagc aagatgtttt	840
ttcttatcca cttctgaatc atcttggaaat gaaagcaggg acttttgcaa aggaaaaggc	900
tccacattgg caattgtcaa cacgccagag aaactgaagt ttcttcagga cataactgat	960
gctgagaagt attttattgg cttaatttac catcgtgaag agaaaagggt gcggttgatc	1020
aacaactctg tgttcaatgg caatgttacc aatcagaatc agaatttcaa ctgtgcgacc	1080
attggcctaa caaagacatt tgatgctgca tcatgtgaca tcagctaccg caggatctgt	1140
gagaagaatg ccaaaggccc gggagagaat ctatattttc aagggcccg cggaggtagt	1200
5 caccatcatc accatcacta atgaccggt	1229

<210> 100

<211> 385

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proTEV-huCLEC5A-proTEV-Histag]

15 <400> 100

ES 2 648 899 T3

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

ES 2 648 899 T3

Arg Ser Tyr Gly Thr Val Cys Pro Lys Asp Trp Glu Phe Tyr Gln Ala
245 250 255

Arg Cys Phe Phe Leu Ser Thr Ser Glu Ser Ser Trp Asn Glu Ser Arg
260 265 270

Asp Phe Cys Lys Gly Lys Gly Ser Thr Leu Ala Ile Val Asn Thr Pro
275 280 285

Glu Lys Leu Lys Phe Leu Gln Asp Ile Thr Asp Ala Glu Lys Tyr Phe
290 295 300

Ile Gly Leu Ile Tyr His Arg Glu Glu Lys Arg Trp Arg Trp Ile Asn
305 310 315 320

Asn Ser Val Phe Asn Gly Asn Val Thr Asn Gln Asn Gln Asn Phe Asn
325 330 335

Cys Ala Thr Ile Gly Leu Thr Lys Thr Phe Asp Ala Ala Ser Cys Asp
340 345 350

Ile Ser Tyr Arg Arg Ile Cys Glu Lys Asn Ala Lys Gly Pro Gly Glu
355 360 365

Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro Gly Gly Gly Ser His His His His His
370 375 380

His
385

<210> 101
<211> 962
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de ADN que codifica BiPlike- SNAPlike- proteína cxVAGO de Culex quinquefasciatus - Histag
para la expresión en células S2

<400> 101

atgaaactat gtattctact tgcagttggt gcgttcgtag gattgtcctt aagatctgac	60
aaagactgcg aaatgaaaag aactacattg gattcaccac ttgggaagtt ggaactgagt	120
ggatgcgagc aaggattgca tgaattaag ctactgggaa aaggaacttc tgctgctgat	180
gcagttgaag ttccagcacc agcagctggt cttggaggtc ctgagcccct catgcaagcc	240
acagcctggc ttaacgcata tttccaccag cctgaggcca ttgaggaatt tccagtcccc	300
gcccttcacc atcctgtggt tcagcaggag agcttcaccc gccaggtcct gtggaaattg	360

15

ES 2 648 899 T3

ctgaagggtg tcaagtttgg tgaagtgatt tcatatcagc aacttgctgc attggccggt 420
aaccocgcag ctacagctgc cgtgaaaact gctctcagcg gaaatcctgt gcccatcctg 480
atcccttgtc acagagtcgt ttcattctcc ggagctgtag gtggctatga aggaggactg 540
gcagttaagg agtggctgct ggctcatgaa ggtcatagac ttggaaagcc tgggctgggt 600
cctgctggta taggcgcgcc agggccctg gagggagggtg gcgggtctga agccgttcta 660
caaaatgccg agcatccaga ttaccctgga aagtgttacg acgaaggtag gcagaccggt 720
gtagctcccc tagaaagtgc gaagctacca aaatcgtgta caaaggtatt ctgctcgact 780
aacctttcac tgacctatac tacgtgtggg tcagtacttg tcaatgacct gcactgcgag 840
aagatcgaac aagacctgac taaagacttc ccagagtgtc gtcacaagta taaatgtgaa 900
ctggaggagg tagtcacgta ccacggagggt ggccatcacc atcaccatca ctgatgaccg 960
gt 962

<210> 102
<211> 300
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-cxVAGO-Histag]

<400> 102

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

ES 2 648 899 T3

```

gcagttgaag ttccagcacc agcagctggt cttggaggtc ctgagcccct catgcaagcc 240
acagcctggc ttaacgcata tttccaccag cctgaggcca ttgaggaatt tccagtcccc 300
gcccttcacc atcctgtggt tcagcaggag agcttcaccc gccaggctct gtggaaattg 360
ctgaaggtgg tcaagtttgg tgaagtgatt tcatatcagc aacttgctgc attggccggt 420
aaccocgcag ctacagctgc cgtgaaaact gctctcagcg gaaatcctgt gcccatcctg 480
atcccttgtc acagagctgt ttcattctcc ggagctgtag gtggctatga aggaggactg 540
gcagttaagg agtggctgct ggctcatgaa ggtcatagac ttggaaagcc tgggctgggt 600
cctgctggta taggcgcgcc agggctccctg gaggagggtg gcgggtctac ggctatcttc 660
ccaaattcgg agaacaaaga tttcccaggc gaatgctatg acacggagac taagattcat 720
ttcaagccag gggaaaatcg tcaacgacct ggcaactgtg aagagatgtc atgcggaact 780
gacttctoga ttcacttttt cggatgcgga ctagctatac tagacgatga cccggattgc 840
gagatccag ttcaggattt cacaaggac acgcagtgtt gccataagta caagtgtgtg 900
cgtaacggtg aagtcaatta cattggaggt ggccatcacc atcacatca ctgatgaccg 960
gt 962

```

5 <210> 104
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-aaVAGO-Histag]

<400> 104

```

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

```

ES 2 648 899 T3

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
 100 105 110

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
 115 120 125

Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
 130 135 140

Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
 165 170 175

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser
 180 185 190

Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ala Ile Phe Pro Asn Ser Glu Asn
 195 200 205

Lys Asp Phe Pro Gly Glu Cys Tyr Asp Thr Glu Thr Lys Ile His Phe
 210 215 220

Lys Pro Gly Glu Asn Arg Gln Arg Pro Gly Asn Cys Glu Glu Met Ser
 225 230 235 240

Cys Gly Thr Asp Phe Ser Ile His Phe Phe Gly Cys Gly Leu Ala Ile
 245 250 255

Leu Asp Asp Asp Pro Asp Cys Glu Ile Pro Val Gln Asp Phe Thr Lys
 260 265 270

Asp Thr Gln Cys Cys His Lys Tyr Lys Cys Val Arg Asn Gly Glu Val
 275 280 285

Asn Tyr Ile Gly Gly Gly His His His His His His
 290 295 300

<210> 105
 <211> 4108
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ADN de OpIE2SP-SNAP clonado en pUC57 para la expresión constitutiva de la proteína
 química segregada SNAP-target en células de invertebrados

<400> 105

ES 2 648 899 T3

tcgcgcggttt	cggtgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccg	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcacacaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatattgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgcc	240
attcgccatt	caggctgctc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcgggcc	tcttcgctat	300
tacgccagct	ggcgaagggg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttgggta	acgccagggt	360
tttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtggaat	tctcatgatg	ataaacaatg	420
tatggtgcta	atgttgcttc	aacaacaatt	ctggtgaact	gtgttttcat	gtttgccaac	480
aagcaccttt	atactcggtg	gcctcccac	caccaacttt	tttgactgc	aaaaaacac	540
gcttttgac	gcgggcccac	acatagtaca	aactctacgt	ttcgtagact	attttacata	600
aatagtctac	accgttgtat	acgctccaaa	tacactacca	cacattgaac	ctttttgcag	660
tgcaaaaaag	tacgtgtcgg	cagtcacgta	ggccggcctt	atcgggtcgc	gtcctgtcac	720
gtacgaatca	cattatcgga	cgggacgagt	gttgtcttat	cgtgacagga	cgccagcttc	780
ctgtgttgct	aaccgcagcc	ggacgcaact	ccttatcgga	acaggacgcg	cctccatata	840
agccgcgcgt	tatctcatgc	gcgtgaccgg	acacgaggcg	cccgtcccgc	ttatcgcgcc	900
tataaataca	gcccgaacg	atctggtaaa	cacagttgaa	cagcatctgt	tcgaaggatc	960
cttcatcgag	ctagcatgaa	actatgtatt	ctacttgcag	ttgttgcgtt	cgtaggattg	1020
tccttaagat	ctgacaaaga	ctgcgaaatg	aaaagaacta	cattggattc	accacttggg	1080
aagttggaac	tgagtggatg	cgagcaagga	ttgcatgaaa	ttaagctact	gggaaaagga	1140
acttctgctg	ctgatgcagt	tgaagttcca	gcaccagcag	ctgttcttgg	aggtcctgag	1200
cccctcatgc	aagccacagc	ctggcttaac	gcataatttc	accagcctga	ggccattgag	1260
gaatttcocag	tcccgcacct	tcaccatcct	gtgtttcagc	aggagagctt	caccgcagcag	1320
gtcctgtgga	aattgctgaa	ggtggtcaag	tttgggtgag	tgatttcata	tcagcaactt	1380
gctgcattgg	ccggtaaccc	cgcagctaca	gctgcctgta	aaactgctct	cagcggaaat	1440
cctgtgccca	tctgatccc	ttgtcacaga	gtcgtttcat	cttccggagc	tgtagggtggc	1500
tatgaaggag	gactggcagt	taaggagtgg	ctgctggctc	atgaaggcca	tagacttggg	1560
aagcctgggc	tgggtcctgc	tggtataggg	gcgccagggt	ccctaggtgg	cggatccgaa	1620
aacctgtact	tccagagcga	tatcggagggt	ggaggcccgg	gaggtggcgg	aagtgactat	1680
aaagatgacg	acgataagtg	ataagcggcc	gcaaaaccgg	ttgagtttat	ctgactaaat	1740
cttagtttgt	attgtcatgt	tttaatacaa	tatgttatgt	ttaaataatgt	ttttaataaaa	1800
ttttataaaa	taatttcaac	ttttattgta	acaacattgt	ccatttacac	actcctttca	1860
agcgcgtgaa	gcttggcgta	atcatggtca	tagctgtttc	ctgtgtgaaa	ttgttatccg	1920

ES 2 648 899 T3

ctcacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa 1980
 tgagtgagct aactcacatt aattgcgctt cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac 2040
 ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagagggcg tttgcgtatt 2100
 ggggcgtcct ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttcg gctgcggcga 2160
 gcggtatcag ctccactcaa ggcggaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 2220
 ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagca aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgctg 2280
 ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt 2340
 cagaggtggc gaaaccggac aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaagctcc 2400
 ctctgctgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct 2460
 tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc 2520
 gttcgtccca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctc agcccgaccg ctgctcctta 2580
 tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 2640
 gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcctgaag 2700
 tgggtgccta actacggcta cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag 2760
 ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaac caccgctggt 2820
 agcgttggtt tttttgctt caagcagcag attacgcgca gaaaaaag atctcaagaa 2880
 gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtga acgaaaactc acgttaaggg 2940
 attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaa ttaaaaatga 3000
 agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta ccaatgctta 3060
 atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgct catccatagt tgctgactc 3120
 cccgctgctg agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg 3180
 ataccgcgag acccagctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga 3240
 agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt 3300
 tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt 3360
 gctacaggca tcgtgggtgc acgctcgtcg tttggatgg cttcattcag ctccggttcc 3420
 caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttggtgca aaaaagcggc tagctccttc 3480
 ggtcctccga tcgttgctcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca 3540
 gcactgcata attctcttac tgtcatgcca tcogtaagat gcttttctgt gactggtgag 3600
 tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcccgcac cgagttgctc ttgcccggcg 3660
 tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa 3720
 cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa 3780
 cccactcgtg caccacaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga 3840
 gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa ggcgcacacg gaaatgttga 3900
 atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg 3960
 agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt 4020
 ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa 4080
 aataggcgta tcacgaggcc ctttctgc 4108

<210> 106
 <211> 24
 <212> ADN
 5 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia de ADN de etiqueta del péptido de término C de OpIE2SP-SNAP
 10 <400> 106

 24 gactataaag atgacgacga taag

 <210> 107
 15 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 20 <223> Secuencia de aminoácidos de etiqueta del péptido de término C de OpIE2SP-SNAP

 <400> 107

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5
 25
 <210> 108
 <211> 2200
 <212> ADN
 <213> artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP-SNAPlike-proTEV1- nucleoproteína N del virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo -proTEV2-Histag para la expresión en células S2
 35 <400> 108

 atgaagttat gcatattact ggccgctcgtg gcctttgttg gcctctcgct cgggagatct 60
 gacaaagact gcgaaatgaa aagaactaca ttggattcac cacttgggaa gttggaactg 120
 agtggatgcg agcaaggatt gcatgaaatt aagctactgg gaaaaggaac ttctgctgct 180
 gatgcagttg aagttccagc accagcagct gttcttgag gtcctgagcc cctcatgcaa 240
 gccacagcct ggcttaacgc atatttcac cagcctgagg ccattgagga atttccagtc 300
 cccgcccttc accatcctgt gtttcagcag gagagcttca cccgccaggt cctgtggaaa 360
 ttgctgaagg tgggtcaagtt tgggtgaagtg atttcatatc agcaacttgc tgcattggcc 420

ES 2 648 899 T3

ggtaaccccg cagctacagc tgccgtgaaa actgctctca gcggaaatcc tgtgcccac 480
 ctgatccctt gtcacagagt cgtttcatct tccggagctg taggtggcta tgaaggagga 540
 ctggcagtta aggagtggct gctggctcat gaaggtcata gacttgaaa gcctgggctg 600
 ggtcctgctg gtataggcgc gccagggtcc ctagggtggcg gatccgaaa cctgtacttc 660
 cagagcgata tcgaaaacaa gatcgaggtg aataacaaag atgagatgaa cagggtggtt 720
 gaagagtca aaaaggaaa tggacttggtg gacacctca caaactccta ttccttttgc 780
 gagagtgttc ccaatttga caggtttgtg tttcagatgg ccagtgccac cgatgatgca 840
 cagaaggact ccactacgc atctgctctg gtggaggcaa caaagttttg tgcacctata 900
 tatgagtgcg catgggttag ctccactggc attgtaaaaa agggacttga atggttcgag 960
 aaaaatgcag gaaccattaa gtcctgggat gaaagtata ctgagctaaa ggtcgacgtc 1020
 ccgaaaatag agcagcttac gggttaccaa caagctgcct tgaagtggag aaaagacata 1080
 ggtttccgtg tcaatgcaa cacagcagct ctgagcaaca aagtcctcgc agaatacaaa 1140
 gtcctggtg agattgtgat gtctgtcaa gagatgctgt cagacatgat taggagaagg 1200
 aacctgatc taaacagggg tggatgatgag aaccacgtg gccagtgag ccatgagcat 1260
 gtagactggt gcagggagt tgtcaaaggc aaatacatca tggccttcaa cccaccatgg 1320
 ggggacatca acaagtcagg ccgttcagga atagcacttg ttgcaacagg ccttgctaag 1380
 cttgcagaga ctgaaggaaa gggaatattt gatgaagcca aaaagactgt ggaggccctc 1440
 aacgggtatc tggacaagca taaggacgaa gttgatagag caagcgccga cagcatgata 1500
 acaaaccttc ttaagcatat tgccaaggca caggagctct ataaaaattc atctgcactt 1560
 cgtgcacaaa gcgcacagat tgacactgct ttcagctcat actattggct ttacaaggct 1620
 ggcgtgactc ctgaaacctt cccgacggtg tcacagttcc tctttgagct agggaaacag 1680
 ccaagaggta ccaagaaaat gaagaaggct cttctgagca cccaatgaa gtgggggaa 1740
 aagctttatg agctctttgc cgatgattct ttccagcaga acaggattta catgcatcct 1800
 gccgtgctta cagctggtag aatcagtgaa atgggagtct gctttgggac aatccctgtg 1860
 gccaatcctg atgatgctgc ccaaggatct ggacacacta agtctattct caacctccgt 1920
 accaactctg agaccaataa tccgtgtgcc aaaaccatcg tcaagctatt tgaagttcaa 1980
 aaaacaggg tcaacattca ggacatggac atagtggcct ctgagcactt gctacaccaa 2040
 tccctgttg gcaagcaatc ccattccag aacgcctaca acgtcaagg caatgccacc 2100
 agtgctaaca tcatcccggg agagaatcta tattttcaag ggcccggcgg aggtagtcaac 2160
 catcatcacc atcactaatg accggtgcgg ccgcaagctt 2200

<210> 109
 <211> 707
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proTEV1-CCHF.N-proTEV2-Histag]

10

<400> 109

ES 2 648 899 T3

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

ES 2 648 899 T3

210						215										220
Phe	Lys	Lys	Gly	Asn	Gly	Leu	Val	Asp	Thr	Phe	Thr	Asn	Ser	Tyr	Ser	
225					230					235					240	
Phe	Cys	Glu	Ser	Val	Pro	Asn	Leu	Asp	Arg	Phe	Val	Phe	Gln	Met	Ala	
				245					250					255		
Ser	Ala	Thr	Asp	Asp	Ala	Gln	Lys	Asp	Ser	Ile	Tyr	Ala	Ser	Ala	Leu	
			260					265					270			
Val	Glu	Ala	Thr	Lys	Phe	Cys	Ala	Pro	Ile	Tyr	Glu	Cys	Ala	Trp	Val	
		275					280					285				
Ser	Ser	Thr	Gly	Ile	Val	Lys	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Phe	Glu	Lys	Asn	
	290					295					300					
Ala	Gly	Thr	Ile	Lys	Ser	Trp	Asp	Glu	Ser	Tyr	Thr	Glu	Leu	Lys	Val	
305					310						315				320	
Asp	Val	Pro	Lys	Ile	Glu	Gln	Leu	Thr	Gly	Tyr	Gln	Gln	Ala	Ala	Leu	
				325					330						335	
Lys	Trp	Arg	Lys	Asp	Ile	Gly	Phe	Arg	Val	Asn	Ala	Asn	Thr	Ala	Ala	
			340					345					350			
Leu	Ser	Asn	Lys	Val	Leu	Ala	Glu	Tyr	Lys	Val	Pro	Gly	Glu	Ile	Val	
		355					360					365				
Met	Ser	Val	Lys	Glu	Met	Leu	Ser	Asp	Met	Ile	Arg	Arg	Arg	Asn	Leu	
	370					375					380					
Ile	Leu	Asn	Arg	Gly	Gly	Asp	Glu	Asn	Pro	Arg	Gly	Pro	Val	Ser	His	
385					390					395					400	
Glu	His	Val	Asp	Trp	Cys	Arg	Glu	Phe	Val	Lys	Gly	Lys	Tyr	Ile	Met	
				405					410					415		
Ala	Phe	Asn	Pro	Pro	Trp	Gly	Asp	Ile	Asn	Lys	Ser	Gly	Arg	Ser	Gly	
			420					425					430			
Ile	Ala	Leu	Val	Ala	Thr	Gly	Leu	Ala	Lys	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Gly	
		435					440					445				
Lys	Gly	Ile	Phe	Asp	Glu	Ala	Lys	Lys	Thr	Val	Glu	Ala	Leu	Asn	Gly	
	450					455					460					

ES 2 648 899 T3

Tyr Leu Asp Lys His Lys Asp Glu Val Asp Arg Ala Ser Ala Asp Ser
465 470 475 480

Met Ile Thr Asn Leu Leu Lys His Ile Ala Lys Ala Gln Glu Leu Tyr
485 490 495

Lys Asn Ser Ser Ala Leu Arg Ala Gln Ser Ala Gln Ile Asp Thr Ala
500 505 510

Phe Ser Ser Tyr Tyr Trp Leu Tyr Lys Ala Gly Val Thr Pro Glu Thr
515 520 525

Phe Pro Thr Val Ser Gln Phe Leu Phe Glu Leu Gly Lys Gln Pro Arg
530 535 540

Gly Thr Lys Lys Met Lys Lys Ala Leu Leu Ser Thr Pro Met Lys Trp
545 550 555 560

Gly Lys Lys Leu Tyr Glu Leu Phe Ala Asp Asp Ser Phe Gln Gln Asn
565 570 575

Arg Ile Tyr Met His Pro Ala Val Leu Thr Ala Gly Arg Ile Ser Glu
580 585 590

Met Gly Val Cys Phe Gly Thr Ile Pro Val Ala Asn Pro Asp Asp Ala
595 600 605

Ala Gln Gly Ser Gly His Thr Lys Ser Ile Leu Asn Leu Arg Thr Asn
610 615 620

Thr Glu Thr Asn Asn Pro Cys Ala Lys Thr Ile Val Lys Leu Phe Glu
625 630 635 640

Val Gln Lys Thr Gly Phe Asn Ile Gln Asp Met Asp Ile Val Ala Ser
645 650 655

Glu His Leu Leu His Gln Ser Leu Val Gly Lys Gln Ser Pro Phe Gln
660 665 670

Asn Ala Tyr Asn Val Lys Gly Asn Ala Thr Ser Ala Asn Ile Ile Pro
675 680 685

Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro Gly Gly Gly Ser His His His
690 695 700

His His His
705

<210> 110
<211> 2974
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP-SNAPlike-proTEV1-nucleoproteína N del virus del Ébola -proTEV2-
Histag para la expresión en células S2

<400> 110

ES 2 648 899 T3

atgaagttat gcatattact ggcgctcgtg gcctttgttg gcctctcgtc cgggagatct	60
gacaaagact gcgaaatgaa aagaactaca ttggattcac cacttgggaa gttggaactg	120
agtggatgcg agcaaggatt gcatgaaatt aagctactgg gaaaaggaac ttctgctgct	180
gatgcagttg aagttccagc accagcagct gttcttgagg gtccctgagcc cctcatgcaa	240
gccacagcct ggcttaacgc atatttccac cagcctgagg ccattgagga atttccagtc	300
cccgcccttc accatcctgt gtttcagcag gagagcttca cccgccaggt cctgtggaaa	360
ttgctgaagg tggtaagtt tgggtaagt atttcatatc agcaacttgc tgcattggcc	420
ggtaaccccg cagctacagc tgccgtgaaa actgctctca gcggaaatcc tgtgcccatc	480
ctgatccctt gtcacagagt cgtttcatct tccggagctg taggtggcta tgaaggagga	540
ctggcagtta aggagtggct gctggctcat gaaggtcata gacttggaaa gcctgggctg	600
ggtcctgctg gtataggcgc gccagggtcc ctagggtggcg gatccgaaaa cctgtacttc	660
cagagcgata tcgattctcg tccctcagaaa atctggatgg cgcagagtct cactgaatct	720
gacatggatt accacaaaat cttgacagca ggtctgtccg ttcaacaggg gattgttcgg	780
caaagagtca tcccagtgta tcaagtaaac aatcttgaag aaatttgcca acttatcata	840
caggcctttg aagcaggtgt tgattttcaa gagagtgcgg acagtttctt tctcatgctt	900
tgtcttcata atgcgtacca gggagattac aaacttttct tggaaagtgg cgcagtcaag	960
tatttgaag ggcacgggtt ccgttttgaa gtcaagaagc gtgatggagt gaagcgcctt	1020
gaggaattgc tgccagcagt atctagtgga aaaaacatta agagaacact tgctgccatg	1080
ccggaagagg agacaactga agctaagcc ggtcagtttc tctcctttgc aagtctattc	1140
cttccgaaat tggtagtagg agaaaaggct tgccctgaga aggttcaaag gcaaattcaa	1200
gtacatgcag agcaaggact gatacaatat ccaacagctt ggcaatcagt aggacacatg	1260
atggtgattt tccgtttgat gcgaacaaaat tttctgatca aatttctcct aatacaccaa	1320
gggatgcaca tggttgccgg gcatgatgcc aacgatgctg tgatttcaa ttcagtggct	1380
caagctcgtt tttcaggctt attgattgtc aaaacagtac ttgatcatat cctacaaaag	1440
acagaacgag gagttcgtct ccatcctctt gcaaggaccg ccaaggtaaa aatgaggtg	1500
aactccttta aggctgcact cagctccctg gccaaagcatg gagagtatgc tcctttcggc	1560

ES 2 648 899 T3

cgacttttga acctttctgg agtaaataat cttgagcatg gtcttttccc tcaactatcg 1620
gcaattgcac tcggagtcgc cacagcacac gggagtaccc tcgcaggagt aaatgttga 1680
gaacagtatc aacaactcag agaggctgcc actgaggctg agaagcaact ccaacaatat 1740
gcagagtctc gcgaacttga ccatcttga cttgatgatc aggaaaagaa aattcttatg 1800
aacttccatc agaaaaagaa cgaaatcagc ttccagcaaa caaacgctat ggtaactcta 1860
agaaaagagc gcctggccaa gctgacagaa gctatcactg ctgcgtcact gcccaaaaca 1920
agtggacatt acgatgatga tgacgacatt ccctttccag gacctatcaa tgatgacgac 1980
aatcctggcc atcaagatga tgatccgact gactcacagg atacgacat tcccgatgtg 2040
gtggttgatc ccgatgatgg aagctacggc gaataccaga gttactcgga aaacggcatg 2100
aatgcaccag atgacttggc cctattogat ctggacgagg acgacgagga cactaagcca 2160
gtgcctaata gatcgaccaa ggggtggaca cagaagaaca gtcaaaaggc ccagcatata 2220
gagggcagac agacacaatc caggccaatt caaaatgtcc caggccctca cagaacaatc 2280
caccacgcca gtgcgccact cacggacaat gacagaagaa atgaaccctc cggctcaacc 2340
agccctcgca tgctgacacc aattaacgaa gaggcagacc cactggacga tgccgacgac 2400
gagacgtcta gccttccgcc cttggagtca gatgatgaag agcaggacag ggacggaact 2460
tccaaccgca caccactgt cgcaccaccg gctcccgtat acagagatca ctctgaaaag 2520
aaagaactcc gcgaagacga gcaacaagat caggaccaca ctcaagaggc caggaaccag 2580
gacagtgaca acaccagtc agaacactct tttgaggaga tgtatcgcca cattctaaga 2640
tcacaggggc catttgatgc tgttttgtat tatcatatga tgaaggatga gcctgtagtt 2700
ttcagtacca gtgatggcaa agagtacacg tatccagact cccttgaaga ggaatatcca 2760
ccatggctca ctgaaaaaga ggctatgaat gaagagaata gatttgttac attggatggt 2820
caacaatfff attggccggt gatgaatcac aagaataaat tcatggcaat cctgcaacat 2880
catcagggcc cgggagagaa tctatatttt caagggcccg gcggaggtag tcaccatcat 2940
caccatcact aatgaccggt gcggccgcaa gctt 2974

<210> 111
<211> 965
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proTEV1-EBO.N-proTEV2-Histag]

<400> 111

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
1 5 10 15

ES 2 648 899 T3

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
 20 25 30
 Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
 35 40 45
 Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
 50 55 60
 Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
 65 70 75 80
 Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
 85 90 95
 Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
 100 105 110
 Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
 115 120 125
 Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
 130 135 140
 Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
 165 170 175
 Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser
 180 185 190
 Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Asp Ile Asp Ser
 195 200 205
 Arg Pro Gln Lys Ile Trp Met Ala Pro Ser Leu Thr Glu Ser Asp Met
 210 215 220
 Asp Tyr His Lys Ile Leu Thr Ala Gly Leu Ser Val Gln Gln Gly Ile
 225 230 235 240
 Val Arg Gln Arg Val Ile Pro Val Tyr Gln Val Asn Asn Leu Glu Glu
 245 250 255
 Ile Cys Gln Leu Ile Ile Gln Ala Phe Glu Ala Gly Val Asp Phe Gln
 260 265 270

ES 2 648 899 T3

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

ES 2 648 899 T3

515					520					525					
Ala	Thr	Ala	His	Gly	Ser	Thr	Leu	Ala	Gly	Val	Asn	Val	Gly	Glu	Gln
530						535					540				
Tyr	Gln	Gln	Leu	Arg	Glu	Ala	Ala	Thr	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Leu	Gln
545					550					555					560
Gln	Tyr	Ala	Glu	Ser	Arg	Glu	Leu	Asp	His	Leu	Gly	Leu	Asp	Asp	Gln
				565					570					575	
Glu	Lys	Lys	Ile	Leu	Met	Asn	Phe	His	Gln	Lys	Lys	Asn	Glu	Ile	Ser
			580					585					590		
Phe	Gln	Gln	Thr	Asn	Ala	Met	Val	Thr	Leu	Arg	Lys	Glu	Arg	Leu	Ala
			595				600						605		
Lys	Leu	Thr	Glu	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Pro	Lys	Thr	Ser	Gly
	610					615					620				
His	Tyr	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Ile	Pro	Phe	Pro	Gly	Pro	Ile	Asn	Asp
625					630					635					640
Asp	Asp	Asn	Pro	Gly	His	Gln	Asp	Asp	Asp	Pro	Thr	Asp	Ser	Gln	Asp
				645					650					655	
Thr	Thr	Ile	Pro	Asp	Val	Val	Val	Asp	Pro	Asp	Asp	Gly	Ser	Tyr	Gly
			660					665					670		
Glu	Tyr	Gln	Ser	Tyr	Ser	Glu	Asn	Gly	Met	Asn	Ala	Pro	Asp	Asp	Leu
		675					680						685		
Val	Leu	Phe	Asp	Leu	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Thr	Lys	Pro	Val	Pro
	690					695					700				
Asn	Arg	Ser	Thr	Lys	Gly	Gly	Gln	Gln	Lys	Asn	Ser	Gln	Lys	Gly	Gln
705					710					715					720
His	Ile	Glu	Gly	Arg	Gln	Thr	Gln	Ser	Arg	Pro	Ile	Gln	Asn	Val	Pro
				725					730					735	
Gly	Pro	His	Arg	Thr	Ile	His	His	Ala	Ser	Ala	Pro	Leu	Thr	Asp	Asn
			740					745					750		
Asp	Arg	Arg	Asn	Glu	Pro	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Pro	Arg	Met	Leu	Thr
		755					760					765			

ES 2 648 899 T3

Pro Ile Asn Glu Glu Ala Asp Pro Leu Asp Asp Ala Asp Asp Glu Thr
770 775 780

Ser Ser Leu Pro Pro Leu Glu Ser Asp Asp Glu Glu Gln Asp Arg Asp
785 790 795 800

Gly Thr Ser Asn Arg Thr Pro Thr Val Ala Pro Pro Ala Pro Val Tyr
805 810 815

Arg Asp His Ser Glu Lys Lys Glu Leu Pro Gln Asp Glu Gln Gln Asp
820 825 830

Gln Asp His Thr Gln Glu Ala Arg Asn Gln Asp Ser Asp Asn Thr Gln
835 840 845

Ser Glu His Ser Phe Glu Glu Met Tyr Arg His Ile Leu Arg Ser Gln
850 855 860

Gly Pro Phe Asp Ala Val Leu Tyr Tyr His Met Met Lys Asp Glu Pro
865 870 875 880

Val Val Phe Ser Thr Ser Asp Gly Lys Glu Tyr Thr Tyr Pro Asp Ser
885 890 895

Leu Glu Glu Glu Tyr Pro Pro Trp Leu Thr Glu Lys Glu Ala Met Asn
900 905 910

Glu Glu Asn Arg Phe Val Thr Leu Asp Gly Gln Gln Phe Tyr Trp Pro
915 920 925

Val Met Asn His Lys Asn Lys Phe Met Ala Ile Leu Gln His His Gln
930 935 940

Gly Pro Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro Gly Gly Gly Ser His
945 950 955 960

His His His His His
965

<210> 112
<211> 2842
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP-SNAPlike-proTEV1-nucleoproteína N del virus de Marburgo -
proTEV2-Histag para la expresión en células S2

<400> 112

atgaagttat gcatattact ggccgctcgtg gcctttgttg gcctctcgcct cgggagatct 60

15

ES 2 648 899 T3

gacaaagact gcgaaatgaa aagaactaca ttggattcac cacttgggaa gttggaactg 120
agtggatgcg agcaaggatt gcatgaaatt aagctactgg gaaaaggaac ttctgctgct 180
gatgcagttg aagttccagc accagcagct gttcttggag gtcctgagcc cctcatgcaa 240
gccacagcct ggcttaacgc atatttccac cagcctgagg ccattgagga atttccagtc 300
cccgcccttc accatcctgt gtttcagcag gagagcttca cccgccaggt cctgtggaaa 360
ttgctgaagg tggtaagtt tggtaagtg atttcatatc agcaacttgc tgcattggcc 420
ggtaaccccg cagctacagc tgccgtgaaa actgctctca gcggaaatcc tgtgccatc 480
ctgatccctt gtcacagagt cgtttcatct tccggagctg taggtggcta tgaaggagga 540
ctggcagtta aggagtggct gctggctcat gaaggcata gacttggaaa gcctgggctg 600
ggctcctgctg gtataggcgc gccagggctc ctaggtggcg gatccgaaaa cctgtacttc 660
cagagcgata tcgatttaca cagtttgttg gagttgggta caaaaccac tgcccctcat 720
gttcgtaata agaaagtgat attatttgac acaaatcatc aggttagtat ctgtaatcag 780
ataatagatg caataaactc agggattgat cttggatgac tcctagaagg gggtttgctg 840
acgttgtgtg ttgagcatta ctataattct gataaggata aattcaacac aagtcctatc 900
gcgaagtact tacgtgatgc gggctatgaa tttgatgtca tcaagaatgc agatgcaacc 960
cgctttctgg atgtgattcc taatgaacct cattacagcc ctttaattct agcccttaag 1020
acattggaaa gtactgaatc tcagaggggg agaattgggc tctttttatc attttgcagt 1080
cttttcctcc caaaacttgt cgtcggagac cgagctagta tcgaaaaggc ttttaagacia 1140
gtaacagtgc atcaagaaca ggggatcgtc acatacccta atcattggct taccacaggc 1200
cacatgaaag taattttcgg gatthtgagg tccagcttca ttttaaagtt tgtgttgatt 1260
catcaaggag taaatthtgg gacaggtcat gatgcctatg acagtatcat tagtaattca 1320
gtaggtcaaa ctagattctc aggacttctt atcgtgaaaa cagttctgga gttcatcttg 1380
caaaaaactg attcaggggt gacactacat cttttgtgac ggacctcaa agtaaaaaat 1440
gaagttgcta gtttcaagca ggcgttgagc aacctagccc gacatgggga atacgcacca 1500
tttgacggg ttctgaatth atcagggatt aacaacctcg aacatggact ctatcctcag 1560
ctttcagcaa ttgcgctggg tgtggcaaca gcacacggca gtacattggc tgggtgcaat 1620
gttggcgaac aatatcaaca actacgagag gcggcacatg atgcggaagt aaaactacia 1680
aggcgacatg aacatcagga aattcaagct attgccgagg atgacgagga aaggaagata 1740
ttagaacaat tccaccttca gaaaactgaa atcacacaca gtcagacact agccgtcctc 1800
agccagaaac gagaaaaatt agctcgtctc gctgcagaaa ttgaaaacia tattgtggaa 1860
gatcagggat ttaagcaatc acagaatcgg gtgtcacagt cgtttttgaa tgaccctaca 1920

ES 2 648 899 T3

```

cctgtggaag taacggttca agccaggccc atgaatcgac caactgctct gcctccccc 1980
gttgacgaca agattgagca tgaatctaca gaagatagct cttcttcaag tagctttggt 2040
gacttgaatg atccatttgc actgctgaat gaggacgagg atactcttga tgacagtgtc 2100
atgatccccg gcacaacatc gagagaatth caagggattc ctgaaccgcc aagacaatcc 2160
caagacctca ataacagcca aggaaagcag gaagatgaat ccacaaatcc gattaagaaa 2220
cagtttctga gataccaaga attgcctcct gttcaagagg atgatgaatc ggaatacaca 2280
actgactctc aagaaagcat cgaccaacca ggttccgaca atgaacaagg agttgatctt 2340
ccacctcctc cgttgtacgc tcaggaaaaa agacaggacc caatacagca cccagcagca 2400
aacctcaag atcccttcgg cagtattggt gatgtaaag gtgacatctt agaacctata 2460
agatcacctt cttcaccatc tgctcctcag gaagacacaa ggatgaggga agcctatgaa 2520
ttgtcgcctg atttcacaaa tgatgaggat aatcagcaga attggccaca aagagtggg 2580
acaaagaagg gtagaacttt cctttatcct aatgatcttc tgcaaaaaa tcctccagag 2640
tcactataa cagccctcgt tgaggaatac caaatcctg tctcagctaa ggagcttcaa 2700
gcagattggc ccgacatgc atttgatgaa aggagacatg ttgcgatgaa cttgggccc 2760
ggagagaatc tatattttca agggccggc ggaggtagtc accatcatca ccatcactaa 2820
tgaccggtgc ggccgcaagc tt 2842

```

5 <210> 113
 <211> 921
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proTEV1-EBO.N-proTEV2-Histag]

<400> 113

```

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

```

ES 2 648 899 T3

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
 85 90 95
 Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
 100 105 110
 Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
 115 120 125
 Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
 130 135 140
 Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
 165 170 175
 Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser
 180 185 190
 Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Asp Ile Asp Leu
 195 200 205
 His Ser Leu Leu Glu Leu Gly Thr Lys Pro Thr Ala Pro His Val Arg
 210 215 220
 Asn Lys Lys Val Ile Leu Phe Asp Thr Asn His Gln Val Ser Ile Cys
 225 230 235 240
 Asn Gln Ile Ile Asp Ala Ile Asn Ser Gly Ile Asp Leu Gly Asp Leu
 245 250 255
 Leu Glu Gly Gly Leu Leu Thr Leu Cys Val Glu His Tyr Tyr Asn Ser
 260 265 270
 Asp Lys Asp Lys Phe Asn Thr Ser Pro Ile Ala Lys Tyr Leu Arg Asp
 275 280 285
 Ala Gly Tyr Glu Phe Asp Val Ile Lys Asn Ala Asp Ala Thr Arg Phe
 290 295 300
 Leu Asp Val Ile Pro Asn Glu Pro His Tyr Ser Pro Leu Ile Leu Ala
 305 310 315 320
 Leu Lys Thr Leu Glu Ser Thr Glu Ser Gln Arg Gly Arg Ile Gly Leu
 325 330 335

ES 2 648 899 T3

Phe Leu Ser Phe Cys Ser Leu Phe Leu Pro Lys Leu Val Val Gly Asp
 340 345 350
 Arg Ala Ser Ile Glu Lys Ala Leu Arg Gln Val Thr Val His Gln Glu
 355 360 365
 Gln Gly Ile Val Thr Tyr Pro Asn His Trp Leu Thr Thr Gly His Met
 370 375 380
 Lys Val Ile Phe Gly Ile Leu Arg Ser Ser Phe Ile Leu Lys Phe Val
 385 390 395 400
 Leu Ile His Gln Gly Val Asn Leu Val Thr Gly His Asp Ala Tyr Asp
 405 410 415
 Ser Ile Ile Ser Asn Ser Val Gly Gln Thr Arg Phe Ser Gly Leu Leu
 420 425 430
 Ile Val Lys Thr Val Leu Glu Phe Ile Leu Gln Lys Thr Asp Ser Gly
 435 440 445
 Val Thr Leu His Pro Leu Val Arg Thr Ser Lys Val Lys Asn Glu Val
 450 455 460
 Ala Ser Phe Lys Gln Ala Leu Ser Asn Leu Ala Arg His Gly Glu Tyr
 465 470 475 480
 Ala Pro Phe Ala Arg Val Leu Asn Leu Ser Gly Ile Asn Asn Leu Glu
 485 490 495
 His Gly Leu Tyr Pro Gln Leu Ser Ala Ile Ala Leu Gly Val Ala Thr
 500 505 510
 Ala His Gly Ser Thr Leu Ala Gly Val Asn Val Gly Glu Gln Tyr Gln
 515 520 525
 Gln Leu Arg Glu Ala Ala His Asp Ala Glu Val Lys Leu Gln Arg Arg
 530 535 540
 His Glu His Gln Glu Ile Gln Ala Ile Ala Glu Asp Asp Glu Glu Arg
 545 550 555 560
 Lys Ile Leu Glu Gln Phe His Leu Gln Lys Thr Glu Ile Thr His Ser
 565 570 575
 Gln Thr Leu Ala Val Leu Ser Gln Lys Arg Glu Lys Leu Ala Arg Leu

ES 2 648 899 T3

580					585					590					
Ala	Ala	Glu	Ile	Glu	Asn	Asn	Ile	Val	Glu	Asp	Gln	Gly	Phe	Lys	Gln
	595						600					605			
Ser	Gln	Asn	Arg	Val	Ser	Gln	Ser	Phe	Leu	Asn	Asp	Pro	Thr	Pro	Val
	610					615					620				
Glu	Val	Thr	Val	Gln	Ala	Arg	Pro	Met	Asn	Arg	Pro	Thr	Ala	Leu	Pro
625					630					635					640
Pro	Pro	Val	Asp	Asp	Lys	Ile	Glu	His	Glu	Ser	Thr	Glu	Asp	Ser	Ser
				645					650					655	
Ser	Ser	Ser	Ser	Phe	Val	Asp	Leu	Asn	Asp	Pro	Phe	Ala	Leu	Leu	Asn
				660					665					670	
Glu	Asp	Glu	Asp	Thr	Leu	Asp	Asp	Ser	Val	Met	Ile	Pro	Gly	Thr	Thr
		675					680						685		
Ser	Arg	Glu	Phe	Gln	Gly	Ile	Pro	Glu	Pro	Pro	Arg	Gln	Ser	Gln	Asp
	690					695					700				
Leu	Asn	Asn	Ser	Gln	Gly	Lys	Gln	Glu	Asp	Glu	Ser	Thr	Asn	Pro	Ile
705					710					715					720
Lys	Lys	Gln	Phe	Leu	Arg	Tyr	Gln	Glu	Leu	Pro	Pro	Val	Gln	Glu	Asp
				725					730					735	
Asp	Glu	Ser	Glu	Tyr	Thr	Thr	Asp	Ser	Gln	Glu	Ser	Ile	Asp	Gln	Pro
			740					745					750		
Gly	Ser	Asp	Asn	Glu	Gln	Gly	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Tyr
		755					760						765		
Ala	Gln	Glu	Lys	Arg	Gln	Asp	Pro	Ile	Gln	His	Pro	Ala	Ala	Asn	Pro
	770					775					780				
Gln	Asp	Pro	Phe	Gly	Ser	Ile	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	Asp	Ile	Leu	Glu
785					790					795					800
Pro	Ile	Arg	Ser	Pro	Ser	Ser	Pro	Ser	Ala	Pro	Gln	Glu	Asp	Thr	Arg
				805					810					815	
Met	Arg	Glu	Ala	Tyr	Glu	Leu	Ser	Pro	Asp	Phe	Thr	Asn	Asp	Glu	Asp
			820						825					830	

ES 2 648 899 T3

Asn Gln Gln Asn Trp Pro Gln Arg Val Val Thr Lys Lys Gly Arg Thr
835 840 845

Phe Leu Tyr Pro Asn Asp Leu Leu Gln Thr Asn Pro Pro Glu Ser Leu
850 855 860

Ile Thr Ala Leu Val Glu Glu Tyr Gln Asn Pro Val Ser Ala Lys Glu
865 870 875 880

Leu Gln Ala Asp Trp Pro Asp Met Ser Phe Asp Glu Arg Arg His Val
885 890 895

Ala Met Asn Leu Gly Pro Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro Gly
900 905 910

Gly Gly Ser His His His His His His
915 920

<210> 114
<211> 2461
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP-SNAPlike-proTEV1-nucleoproteína N del virus de Lassa -proTEV2-Histag para la expresión en células S2

<400> 114

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gcctttgttg gcctctcgct cgggagatct	60
gacaaagact gcgaaatgaa aagaactaca ttggattcac cacttgggaa gttggaactg	120
agtggatgcg agcaaggatt gcatgaaatt aagctactgg gaaaaggaac ttctgctgct	180
gatgcagttg aagttccagc accagcagct gttcttgagg gtcctgagcc cctcatgcaa	240
gccacagcct ggcttaacgc atatttcac cagcctgagg ccattgagga atttccagtc	300
cccgcccttc accatcctgt gtttcagcag gagagcttca cccgccaggt cctgtggaaa	360
ttgctgaagg tggtaagtt tggtaagtg atttcatatc agcaacttgc tgcattggcc	420
ggtaaccccg cagctacagc tgccgtgaaa actgctctca gcggaaatcc tgtgccatc	480
ctgatccctt gtcacagagt cgtttcatct tccggagctg taggtggcta tgaaggagga	540
ctggcagtta aggagtggct gctggctcat gaaggtcata gacttggaaa gcctgggctg	600
ggtcctgctg gtataggcgc gccaggtcc ctagggtggcg gatccgaaaa cctgtacttc	660
cagagcgata tcagtgcctc aaaggaaata aaatcctttt tgtggacaca atctttgagg	720
agggaattat ctggttactg ctccaacatc aaactacagg tggtaaga tgcccaggct	780
cttttacatg gacttgactt ctccgaagtc agtaatgttc aacggttgat gcgcaaggag	840
agaagggatg acaatgattt gaaacggttg agggacctaa atcaagcggg caacaatctt	900

15

ES 2 648 899 T3

```

gttgaattaa aatcaactca acaaaagagt atactgagag ttgggactct aacctcagat 960
gacttattaa tcttagccgc tgacctagag aagttaaagt caaaggatgat cagaacagaa 1020
aggccattaa gtgcagggtg ctatatgggc aacctaagct cacagcaact tgaccaaaaga 1080
agagctctcc tgaatatgat aggaatgagt ggtggaatc aaggggctcg ggctgggaga 1140
gatggagtgg tgagagtttg ggatgtgaaa aatgcagagt tgctcaataa tcagtccggg 1200
accatgccaa gtctgacact ggcattgtctg acaaaacagg ggcaggttga cttgaatgat 1260
gcagtacaag cattgacaga tttgggtttg atctacacag caaagtatcc caaaccttca 1320
gacttagaca ggctgactca aagtcatccc atcctaaata tgattgacac caagaaaagc 1380
tctttgaata tctcagggtta taattttagc ttgggtgcag ctgtgaaggc aggagcttgc 1440
atgctggatg gtggcaatat gttggagaca atcaagggtg cacctcagac aatggatggt 1500
atcctcaaat ccattttaaa ggtcaagaag gctcttggaa tgttcatttc agacaccct 1560
ggtgaaagga atccttatga aaacatactc tacaagattt gtttgtcagg agatggatgg 1620
ccatatattg catcaagaac ctcaataaca ggaaggcct gggaaaacac tgtcgttgat 1680
ctggaatcag atgggaagcc acagaaagct gacagcaaca attccagtaa atccctgcag 1740
tcggcagggg ttaccgctgg gcttacctat tctcagctga tgaccctcaa ggatgcaatg 1800
ctgcaacttg acccaaatgc taagacctgg atggacattg aaggaagacc tgaagatcca 1860
gtgaaattg ccctctatca accaagttca ggctgttaca tacacttctt ccgtgaacct 1920
actgatttaa agcagttcaa gcaggatgct aagtactcac atgggattga tgtcacagac 1980
ctcttcgcta cacaaccggg cttgaccagt gctgtcattg atgcactccc ccggaatatg 2040
gtcattacct gtcaggggtc cgatgacata aggaaactcc ttgaatcaca aggaagaaa 2100
gacattaaac taattgatat tgccctcagc aaaactgatt ccaggaagta tgaaaatgca 2160
gtctgggacc agtataaaga cttatgccac atgcacacag gtgtcgttgt tgaaaagaag 2220
aaaagaggcg gtaaagagga aataaccct cactgtgcac taatggactg catcatgttt 2280
gatgcagcag tgtcaggagg actgaacaca tcggttttga gagcagtgt gcccagagat 2340
atggtgttca gaacatcgac acctagagtc gttctcccgg gagagaatct atattttcaa 2400
gggcccggcg gaggtagtca ccatcatcac catcactaat gaccgggtcg gccgcaagct 2460
t 2461

```

<210> 115
 <211> 794
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proTEV1-LAS.N-proTEV2-Histag]

10 <400> 115

ES 2 648 899 T3

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

ES 2 648 899 T3

Gln Ala Leu Leu His Gly Leu Asp Phe Ser Glu Val Ser Asn Val Gln
 245 250 255

Arg Leu Met Arg Lys Glu Arg Arg Asp Asp Asn Asp Leu Lys Arg Leu
 260 265 270

Arg Asp Leu Asn Gln Ala Val Asn Asn Leu Val Glu Leu Lys Ser Thr
 275 280 285

Gln Gln Lys Ser Ile Leu Arg Val Gly Thr Leu Thr Ser Asp Asp Leu
 290 295 300

Leu Ile Leu Ala Ala Asp Leu Glu Lys Leu Lys Ser Lys Val Ile Arg
 305 310 315 320

Thr Glu Arg Pro Leu Ser Ala Gly Val Tyr Met Gly Asn Leu Ser Ser
 325 330 335

Gln Gln Leu Asp Gln Arg Arg Ala Leu Leu Asn Met Ile Gly Met Ser
 340 345 350

Gly Gly Asn Gln Gly Ala Arg Ala Gly Arg Asp Gly Val Val Arg Val
 355 360 365

Trp Asp Val Lys Asn Ala Glu Leu Leu Asn Asn Gln Phe Gly Thr Met
 370 375 380

Pro Ser Leu Thr Leu Ala Cys Leu Thr Lys Gln Gly Gln Val Asp Leu
 385 390 395 400

Asn Asp Ala Val Gln Ala Leu Thr Asp Leu Gly Leu Ile Tyr Thr Ala
 405 410 415

Lys Tyr Pro Asn Thr Ser Asp Leu Asp Arg Leu Thr Gln Ser His Pro
 420 425 430

Ile Leu Asn Met Ile Asp Thr Lys Lys Ser Ser Leu Asn Ile Ser Gly
 435 440 445

Tyr Asn Phe Ser Leu Gly Ala Ala Val Lys Ala Gly Ala Cys Met Leu
 450 455 460

Asp Gly Gly Asn Met Leu Glu Thr Ile Lys Val Ser Pro Gln Thr Met
 465 470 475 480

Asp Gly Ile Leu Lys Ser Ile Leu Lys Val Lys Lys Ala Leu Gly Met
 485 490 495

ES 2 648 899 T3

Phe Ile Ser Asp Thr Pro Gly Glu Arg Asn Pro Tyr Glu Asn Ile Leu
 500 505 510
 Tyr Lys Ile Cys Leu Ser Gly Asp Gly Trp Pro Tyr Ile Ala Ser Arg
 515 520 525
 Thr Ser Ile Thr Gly Arg Ala Trp Glu Asn Thr Val Val Asp Leu Glu
 530 535 540
 Ser Asp Gly Lys Pro Gln Lys Ala Asp Ser Asn Asn Ser Ser Lys Ser
 545 550 555 560
 Leu Gln Ser Ala Gly Phe Thr Ala Gly Leu Thr Tyr Ser Gln Leu Met
 565 570 575
 Thr Leu Lys Asp Ala Met Leu Gln Leu Asp Pro Asn Ala Lys Thr Trp
 580 585 590
 Met Asp Ile Glu Gly Arg Pro Glu Asp Pro Val Glu Ile Ala Leu Tyr
 595 600 605
 Gln Pro Ser Ser Gly Cys Tyr Ile His Phe Phe Arg Glu Pro Thr Asp
 610 615 620
 Leu Lys Gln Phe Lys Gln Asp Ala Lys Tyr Ser His Gly Ile Asp Val
 625 630 635 640
 Thr Asp Leu Phe Ala Thr Gln Pro Gly Leu Thr Ser Ala Val Ile Asp
 645 650 655
 Ala Leu Pro Arg Asn Met Val Ile Thr Cys Gln Gly Ser Asp Asp Ile
 660 665 670
 Arg Lys Leu Leu Glu Ser Gln Gly Arg Lys Asp Ile Lys Leu Ile Asp
 675 680 685
 Ile Ala Leu Ser Lys Thr Asp Ser Arg Lys Tyr Glu Asn Ala Val Trp
 690 695 700
 Asp Gln Tyr Lys Asp Leu Cys His Met His Thr Gly Val Val Val Glu
 705 710 715 720
 Lys Lys Lys Arg Gly Gly Lys Glu Glu Ile Thr Pro His Cys Ala Leu
 725 730 735
 Met Asp Cys Ile Met Phe Asp Ala Ala Val Ser Gly Gly Leu Asn Thr

ES 2 648 899 T3

	740						745								750	
	Ser	Val	Leu	Arg	Ala	Val	Leu	Pro	Arg	Asp	Met	Val	Phe	Arg	Thr	Ser
			755					760					765			
	Thr	Pro	Arg	Val	Val	Leu	Pro	Gly	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly	Pro
		770					775					780				
	Gly	Gly	Gly	Ser	His	His	His	His	His							
	785				790											

<210> 116
 <211> 2446
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP-SNAPlike-proTEV1-nucleoproteína N del virus de Junin -proTEV2-Histag para la expresión en células S2

10

<400> 116

atgaagttat	gcatattact	ggccgtcgtg	gcctttgttg	gcctctcgct	cgggagatct	60
gacaaagact	gcgaaatgaa	aagaactaca	ttggattcac	cacttgggaa	gttggaactg	120
agtggatgcg	agcaaggatt	gcatgaaatt	aagctactgg	gaaaaggaac	ttctgctgct	180
gatgcagttg	aagttccagc	accagcagct	gttcttgagg	gtcctgagcc	cctcatgcaa	240
gccacagcct	ggcttaacgc	atatttcac	cagcctgagg	ccattgagga	atttccagtc	300
cccgcccttc	accatcctgt	gtttcagcag	gagagcttca	cccgccaggt	cctgtgaaa	360
ttgctgaagg	tggtcaagtt	tggtgaagtg	atttcatatc	agcaacttgc	tgcatggcc	420
ggtaaccccg	cagctacagc	tgccgtgaaa	actgctctca	gcggaaatcc	tgtgccatc	480
ctgatccctt	gtcacagagt	cgtttcatct	tccggagctg	taggtggcta	tgaaggagga	540
ctggcagtta	aggagtggct	gctggctcat	gaaggtcata	gacttggaaa	gcctgggctg	600
ggtcctgctg	gtataggcgc	gccagggtcc	ctaggtggcg	gatccgaaaa	cctgtacttc	660
cagagcgata	tcgcacactc	caaggagggt	cctagcttta	gatggactca	gtccttaagg	720
agaggtttga	gccaatcac	tcagactgtc	aagtcagatg	ttttgaagga	cgccaagcta	780
attgctgaca	gcatcgactt	caaccaagtg	gcacaggtgc	agcgggact	cagaaagact	840
aaaaaggggg	aagaagacct	caataagttg	agggacctga	ataaagaggt	tgacagactc	900
atgtccatga	ggagtgttca	acgaaacaca	gttttcaagg	tgggtgatct	ggggagggat	960
gaactgatgg	agttggcgtc	tgaccttgag	aaattaataa	acaagataag	aagagcagag	1020
acaggctctc	agggggttta	catgggtaac	ttgtcccagt	cacaacttgc	taaaagatca	1080
gagatattga	gaacactggg	atttcaacag	caagggactg	ggggaaatgg	tgtggtgagg	1140

15

ES 2 648 899 T3

```

atatgggatg ttaaagaccc ttcaaagcta aacaatcagt ttggctctgt tcctgcattg 1200
acaattgcat gcatgactgt tcaaggaggt gagacaatga acagtgtcat acaggcttta 1260
acctcacttg ggcttctata cactgtgaag tatccaaact taagtgcact tgacagactg 1320
actcaggaac atgactgcct tcagattgtg actaaagatg aaagctccat caatatttct 1380
ggttacaact tcagtcttct agctgcagta aaggctggag catctattct tgatggtgga 1440
aacatgttgg aaacaatcag agtcacccca gaaaacttct cttccctcat aaaatcaacc 1500
attcaggtta aacgaagaga aggcattgtt attgatgaga aaccaggcaa tagaaatcct 1560
tatgaaaacc ttttgtacaa actttgtctt tctggcgatg gttggcctta tattggttca 1620
agatcacaaa tcacaggcag gtcatgggac aacacaagta ttgatctgac aaggaaacca 1680
gttgctggtc ctagacagcc ggaaaaaac ggtcagaatt tgagattggc taacttgaca 1740
gagatacaag aagctgtcat cagagaggca gtggggaac tcgacccac caacaccctt 1800
tggctcgaca ttgaaggacc agccactgac cctgttgaga tggcattatt ccaacctgca 1860
ggtaagcagt acattcactg cttcagaaaa ccacatgatg agaaagggtt taaaaatggt 1920
agcagacact ctcacggcat cttaatgaag gacatagaag atgcaatgcc aggagtctt 1980
agttacgtga tcggcttgct gcctccagac atggtttga ctactcaagg ttccgatgac 2040
atcaggaagt tgtttgacct ccatggaaga agggatctta aactggttga tgtaagctc 2100
acatctgaac aagccaggca gtttgatcaa caggtctggg agaaatattg tcacttatgc 2160
aaatatcaca atggagtggg tgtcaataag aaaaagaggg aaaaggatac tcccttcaag 2220
ttggcctcca gtgaaccaca ctgtgctctg ctagactgca taatgtttca gtcagtgcta 2280
gatgggaagc tctatgagga ggaacctaca cctctattac caccgagctt gctgttcctc 2340
ccgaaggcag cctatgcact cccgggagag aatctatatt ttcaagggcc cggcggaggt 2400
agtcaccatc atcaccatca ctaatgaccg gtgcggccgc aagctt 2446

```

5 <210> 117
 <211> 789
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aa de proteína de fusión [SNAPlike-proTEV1-JUN.N-proTEV2-Histag]

<400> 117

```

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
1          5          10          15
Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
          20          25          30

```

ES 2 648 899 T3

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
 35 40 45
 Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
 50 55 60
 Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
 65 70 75 80
 Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
 85 90 95
 Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
 100 105 110
 Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
 115 120 125
 Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
 130 135 140
 Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
 165 170 175
 Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser
 180 185 190
 Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Asp Ile Ala His
 195 200 205
 Ser Lys Glu Val Pro Ser Phe Arg Trp Thr Gln Ser Leu Arg Arg Gly
 210 215 220
 Leu Ser Gln Phe Thr Gln Thr Val Lys Ser Asp Val Leu Lys Asp Ala
 225 230 235 240
 Lys Leu Ile Ala Asp Ser Ile Asp Phe Asn Gln Val Ala Gln Val Gln
 245 250 255
 Arg Ala Leu Arg Lys Thr Lys Lys Gly Glu Glu Asp Leu Asn Lys Leu
 260 265 270
 Arg Asp Leu Asn Lys Glu Val Asp Arg Leu Met Ser Met Arg Ser Val
 275 280 285

ES 2 648 899 T3

Gln Arg Asn Thr Val Phe Lys Val Gly Asp Leu Gly Arg Asp Glu Leu
 290 295 300

Met Glu Leu Ala Ser Asp Leu Glu Lys Leu Lys Asn Lys Ile Arg Arg
 305 310 315 320

Ala Glu Thr Gly Ser Gln Gly Val Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln Ser
 325 330 335

Gln Leu Ala Lys Arg Ser Glu Ile Leu Arg Thr Leu Gly Phe Gln Gln
 340 345 350

Gln Gly Thr Gly Gly Asn Gly Val Val Arg Ile Trp Asp Val Lys Asp
 355 360 365

Pro Ser Lys Leu Asn Asn Gln Phe Gly Ser Val Pro Ala Leu Thr Ile
 370 375 380

Ala Cys Met Thr Val Gln Gly Gly Glu Thr Met Asn Ser Val Ile Gln
 385 390 395 400

Ala Leu Thr Ser Leu Gly Leu Leu Tyr Thr Val Lys Tyr Pro Asn Leu
 405 410 415

Ser Asp Leu Asp Arg Leu Thr Gln Glu His Asp Cys Leu Gln Ile Val
 420 425 430

Thr Lys Asp Glu Ser Ser Ile Asn Ile Ser Gly Tyr Asn Phe Ser Leu
 435 440 445

Ser Ala Ala Val Lys Ala Gly Ala Ser Ile Leu Asp Gly Gly Asn Met
 450 455 460

Leu Glu Thr Ile Arg Val Thr Pro Glu Asn Phe Ser Ser Leu Ile Lys
 465 470 475 480

Ser Thr Ile Gln Val Lys Arg Arg Glu Gly Met Phe Ile Asp Glu Lys
 485 490 495

Pro Gly Asn Arg Asn Pro Tyr Glu Asn Leu Leu Tyr Lys Leu Cys Leu
 500 505 510

Ser Gly Asp Gly Trp Pro Tyr Ile Gly Ser Arg Ser Gln Ile Thr Gly
 515 520 525

Arg Ser Trp Asp Asn Thr Ser Ile Asp Leu Thr Arg Lys Pro Val Ala

ES 2 648 899 T3

proTEV2-Histag para la expresión en células S2

<400> 118

atgaagttat	gcatattact	ggccgtcgtg	gcctttgttg	gcctctcgtc	ggggagatct	60
gacaaagact	gcgaaatgaa	aagaactaca	ttggattcac	cacttgggaa	gttggaaactg	120
agtggatgcg	agcaaggatt	gcatgaaatt	aagctactgg	gaaaaggaac	ttctgctgct	180
gatgcagttg	aagttccagc	accagcagct	gttcttgag	gtcctgagcc	cctcatgcaa	240
gccacagcct	ggcttaacgc	atatttccac	cagcctgagg	ccattgagga	atttccagtc	300
cccgcccttc	accatcctgt	gtttcagcag	gagagcttca	cccgccaggt	cctgtggaaa	360
ttgctgaagg	tggtcaagtt	tggtgaaatg	atttcatatc	agcaacttgc	tgcataggcc	420
ggtaaccccg	cagctacagc	tgccgtgaaa	actgctctca	gcggaaatcc	tgtgcccatc	480
ctgatccctt	gtcacagagt	cgtttcatct	tccggagctg	taggtggcta	tgaaggagga	540
ctggcagtta	aggagtggct	gctggctcat	gaaggtcata	gacttggaaa	gcctgggctg	600
ggtcctgctg	gtataggcgc	gccagggtcc	ctaggtggcg	gatccgaaaa	cctgtacttc	660
cagagcgata	tcgctcactc	caaggaaatt	cccagctttc	ggtggactca	gtcactgaga	720
agaggcctga	gtcagttcac	ccacactgtg	aaaacagatg	tgttgaaaga	tgccaagctc	780
atagctgaca	gcatcgactt	caaccaggtt	tcacaagtgc	agagggctct	cagaaagaac	840
aaaaggggtg	aagaggatct	gaacaagctg	agggatttaa	acaaagaagt	ggataggctc	900
atgtctatga	aaagcatcca	gaaaaacacc	atattcaaga	ttggtgatct	ggggagagat	960
gaattgatgg	agcttgcac	agacttggaa	aaactgaaga	acaagataaa	gaggactgag	1020
tcaggtcccc	aagggctgta	catgggtaat	ttgtcacagc	tgcaactgac	aaagaggtca	1080
gaaatcttga	agaccctggg	attccaacag	cagagaggtg	ctggaaatgg	tgtggttaga	1140
atctgggatg	tctcagatcc	atcaaaactg	aataatcagt	ttggttccat	gccagctctc	1200
acaatcgctt	gtatgactgt	ccagggtgga	gaaacgatga	atagtgtggt	ccaagcgttg	1260
acatctctgg	gcctgttata	cactgttaaa	tatccgaatt	taaatgacct	tgacaagcta	1320
acactagagc	acgaatgctt	gcagatcgta	actaaggacg	agagctccat	caacatctct	1380
ggctataact	tcagtctgtc	agctgctgtg	aaagctggcg	cctcaatact	tgacggtggg	1440
5 aacatgctgg	aaacaattag	ggtcactcct	gataatttct	ccagcttgat	taaatcaact	1500

ES 2 648 899 T3

```

ctgcaagtca agcgaaaaga ggggatgttt atagacgaga aacctgggaa tcgaaatcct 1560
tatgagaacc ttctgtataa attgtgtctc tcaggtgacg ggtggcctta cattggttcc 1620
agatcacaaa ttcttgggag gtcttgggac aacacaagtg ttgatctaac aaagaaacct 1680
caagttggac cgagacaacc cgagaaaaac ggtcagaatc taagactagc aaacctgact 1740
gaaatgcaag aagcagtgat taaagaggct gtaaagaagt tagacccac taatacactg 1800
tggcttgaca ttgaagggcc tccaacagac cctgtggaat tggcactata tcagccagcc 1860
aacaagcatt atattcattg ttttagaaag ccacatgatg agaagggctt caaaaatggc 1920
agcagacatt cacatggcat cttgatgcaa gacatcgagg atgcaatgcc aggagtatta 1980
agttatgtaa taggtttact accacaagat atggtgatta caactcaagg ttctgacgac 2040
ataaggaac ttttagacat tcatggacgg aaggatttaa agctggtaga tgtgaaactc 2100
acatctgac aagcaagact ctatgatcag caaatttggg agaagtttgg acatctttgc 2160
aaacatcata atggagttgt tgtcaacaag aaaaagagag aaaaagactc tccattcaaa 2220
ttgagttctg gtgaacctca ctgtgctctg ttggattgta tcatgtatca atcagtgatg 2280
gatggcaaaa tggtagatga agaaccagtg gcacttttac ctctcagcct tctatttcta 2340
cccaaggcag cctttgcact cccgggagag aatctatatt ttcaagggcc cggcggaggt 2400
agtcaccatc atcaccatca ctaatgaccg gtgcggccgc aagctt 2446

```

<210> 119
 <211> 789
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proTEV1-MAC.N-proTEV2-Histag]

10

<400> 119

```

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
1           5           10           15

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
20           25           30

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
35           40           45

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
50           55           60

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
65           70           75           80

```

ES 2 648 899 T3

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

ES 2 648 899 T3

Asp Pro Thr Asn Thr Leu Trp Leu Asp Ile Glu Gly Pro Pro Thr Asp
580 585 590

Pro Val Glu Leu Ala Leu Tyr Gln Pro Ala Asn Lys His Tyr Ile His
595 600 605

Cys Phe Arg Lys Pro His Asp Glu Lys Gly Phe Lys Asn Gly Ser Arg
610 615 620

His Ser His Gly Ile Leu Met Gln Asp Ile Glu Asp Ala Met Pro Gly
625 630 635 640

Val Leu Ser Tyr Val Ile Gly Leu Leu Pro Gln Asp Met Val Ile Thr
645 650 655

Thr Gln Gly Ser Asp Asp Ile Arg Lys Leu Leu Asp Ile His Gly Arg
660 665 670

Lys Asp Leu Lys Leu Val Asp Val Lys Leu Thr Ser Asp Gln Ala Arg
675 680 685

Leu Tyr Asp Gln Gln Ile Trp Glu Lys Phe Gly His Leu Cys Lys His
690 695 700

His Asn Gly Val Val Val Asn Lys Lys Lys Arg Glu Lys Asp Ser Pro
705 710 715 720

Phe Lys Leu Ser Ser Gly Glu Pro His Cys Ala Leu Leu Asp Cys Ile
725 730 735

Met Tyr Gln Ser Val Met Asp Gly Lys Met Val Asp Glu Glu Pro Val
740 745 750

Ala Leu Leu Pro Leu Ser Leu Leu Phe Leu Pro Lys Ala Ala Phe Ala
755 760 765

Leu Pro Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro Gly Gly Gly Ser His
770 775 780

His His His His His
785

<210> 120
<211> 2434
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP-SNAPlike-proTEV1-nucleoproteína N del virus de Guanarito -
proTEV2-Histag para la expresión en células S2

<400> 120

ES 2 648 899 T3

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gcctttgttg gcctctcgct cgggagatct	60
gacaaagact gcgaaatgaa aagaactaca ttggattcac cacttgggaa gttggaactg	120
agtggatgcg agcaaggatt gcatgaaatt aagctactgg gaaaaggaac ttctgctgct	180
gatgcagttg aagttccagc accagcagct gttcttgagg gtcttgagcc cctcatgcaa	240
gccacagcct ggcttaacgc atatttccac cagcctgagg ccattgagga atttccagtc	300
cccgcccttc accatcctgt gtttcagcag gagagcttca cccgccaggt cctgtggaaa	360
ttgctgaagg tggtaagtt tgggtgaagt atttcatatc agcaacttgc tgcattggcc	420
ggtaaccccg cagctacagc tgccgtgaaa actgctctca gcggaaatcc tgtgcccatc	480
ctgatccctt gtcacagagt cgtttcatct tccggagctg taggtggcta tgaaggagga	540
ctggcagtta aggagtggct gctggctcat gaaggtcata gacttggaaa gcctgggctg	600
ggtcctgctg gtatagggcg gccagggtcc ctaggtggcg gatccgaaaa cctgtacttc	660
cagagcgata tcgctcactc caaagaaatc cccagcttcc gctggactca atctctaagg	720
agagaactag ggatgttcac agaaccaacc aatcaagtg ttcttaatga tgcaaagctc	780
attgcagact cccttgattt cacacaagtt tctcaagttc aaagactcct acgtaagtcc	840
aaacgaggag aactgatct tgataaactt agggacttaa ataaagaagt tgatagactg	900
atgagcatga aaagtgttca gaacaacaca gttctgaaag ttggtgattt gggcaaagat	960
gaattaatgg acttggcctc tgacctagaa aaactaaaga agaagattgg agatagggaa	1020
agcaatagtc caaggatgta catgggaaac ttgacgcagt cacaattgga aaaaagagca	1080
gggattctta gaaccctggg attccaacaa caaagggggg ctgcagggtg ggttgtcagg	1140
ttgtgggatg tatctgatcc ctccaaactg aataaccaat ttggttcaat gccagctctt	1200
accattgcct gcatgacagt tcagggagga gaaacaatga acaatgttgt gcaggcacta	1260
acatcacttg gtcttctcta cactgtcaaa tatcccaatc ttgatgacct ggaaaaacta	1320
actttaaac acgactgcct acagattata acaaaggatg agagtgcact caacatatct	1380
ggttataact tcagtctttc agctgctgta aaagctggtg catcacttat agatggtggc	1440
aacatgctgg agacaataaa agtcacaccc aacaacttct cttctattgt caaggccgca	1500
ttgaacgtca aaagaagaga aggcattgtc atagatgaga gaccgggcaa tagaaacct	1560
tatgagaacc ttctctacaa gctgtgtttg tctggggagg gttggccata tattggatca	1620
aggtcacaaa tactcgggag gtcttgggac aacacaagtg tcgatttaaa tgcaagacct	1680
gtaacaggtc cccgagctcc tgaaaagaat ggacaaaata tcagactatc aatctttct	1740
gaaatgcaag aagcgatcgt aaaggaagca atgaggaaat tagattcatc agacacaatc	1800

ES 2 648 899 T3

```

tggatggaca ttgaaggccc gccaaactgat cctgtggagt tggcagtttt ccaaccttct 1860
tcaggaaact atgtacactg tttcagaaaa cctcatgatg agaaaggttt taaaaatgga 1920
agtaggcact cacacggcat actattaaag gaccttgaag atgctcaacc tggctctattg 1980
agttacgtca ttggcttatt gccacagggt tcagttatca ctgttcaagg ggcagatgac 2040
atcaaaaagc tattcgacat acatggaag aaagatttaa aacttgttga tgtcagactg 2100
actggggaac agtccagaat ttttgaacag gaagtttggg aaaaatttgg ccacctctgc 2160
agagcacaca atggtgtcat tgttcctaag aagaaaaaca aggaggctaa ctccacgaag 2220
gagccacact gtgctcttct cgattgcac c atgtttcagt ctgttcttga tggctcatctt 2280
cccgacacca ttcccattca actgctacca aacacattag tgttccaagc caagagcgca 2340
tttgtgatcc cgggagagaa tctatatttt caagggcccg gcggaggtag tcaccatcat 2400
caccatcact aatgaccggt gcggccgcaa gctt 2434

```

5 <210> 121
 <211> 785
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proTEV1-GUA.N-proTEV2-Histag]

<400> 121

```

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
1           5           10           15

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
          20           25           30

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
          35           40           45

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
          50           55           60

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
65           70           75           80

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
          85           90           95

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
          100          105          110

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr

```

ES 2 648 899 T3

115					120					125					
Ala	Ala	Val	Lys	Thr	Ala	Leu	Ser	Gly	Asn	Pro	Val	Pro	Ile	Leu	Ile
	130					135					140				
Pro	Cys	His	Arg	Val	Val	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Val	Gly	Gly	Tyr	Glu
145						150					155				160
Gly	Gly	Leu	Ala	Val	Lys	Glu	Trp	Leu	Leu	Ala	His	Glu	Gly	His	Arg
				165					170					175	
Leu	Gly	Lys	Pro	Gly	Leu	Gly	Pro	Ala	Gly	Ile	Gly	Ala	Pro	Gly	Ser
			180						185					190	
Leu	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Ser	Asp	Ile	Ala	His
		195					200					205			
Ser	Lys	Glu	Ile	Pro	Ser	Phe	Arg	Trp	Thr	Gln	Ser	Leu	Arg	Arg	Glu
	210						215					220			
Leu	Gly	Met	Phe	Thr	Glu	Pro	Thr	Lys	Ser	Ser	Val	Leu	Asn	Asp	Ala
225						230					235				240
Lys	Leu	Ile	Ala	Asp	Ser	Leu	Asp	Phe	Thr	Gln	Val	Ser	Gln	Val	Gln
				245					250					255	
Arg	Leu	Leu	Arg	Lys	Ser	Lys	Arg	Gly	Asp	Thr	Asp	Leu	Asp	Lys	Leu
			260						265					270	
Arg	Asp	Leu	Asn	Lys	Glu	Val	Asp	Arg	Leu	Met	Ser	Met	Lys	Ser	Val
		275					280						285		
Gln	Asn	Asn	Thr	Val	Leu	Lys	Val	Gly	Asp	Leu	Gly	Lys	Asp	Glu	Leu
	290					295					300				
Met	Asp	Leu	Ala	Ser	Asp	Leu	Glu	Lys	Leu	Lys	Lys	Lys	Ile	Gly	Asp
305						310					315				320
Arg	Glu	Ser	Asn	Ser	Pro	Arg	Met	Tyr	Met	Gly	Asn	Leu	Thr	Gln	Ser
				325					330					335	
Gln	Leu	Glu	Lys	Arg	Ala	Gly	Ile	Leu	Arg	Thr	Leu	Gly	Phe	Gln	Gln
			340					345					350		
Gln	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Val	Arg	Leu	Trp	Asp	Val	Ser	Asp
		355					360					365			

ES 2 648 899 T3

Pro Ser Lys Leu Asn Asn Gln Phe Gly Ser Met Pro Ala Leu Thr Ile
 370 375 380

Ala Cys Met Thr Val Gln Gly Gly Glu Thr Met Asn Asn Val Val Gln
 385 390 395 400

Ala Leu Thr Ser Leu Gly Leu Leu Tyr Thr Val Lys Tyr Pro Asn Leu
 405 410 415

Asp Asp Leu Glu Lys Leu Thr Leu Glu His Asp Cys Leu Gln Ile Ile
 420 425 430

Thr Lys Asp Glu Ser Ala Leu Asn Ile Ser Gly Tyr Asn Phe Ser Leu
 435 440 445

Ser Ala Ala Val Lys Ala Gly Ala Ser Leu Ile Asp Gly Gly Asn Met
 450 455 460

Leu Glu Thr Ile Lys Val Thr Pro Asn Asn Phe Ser Ser Ile Val Lys
 465 470 475 480

Ala Ala Leu Asn Val Lys Arg Arg Glu Gly Met Phe Ile Asp Glu Arg
 485 490 495

Pro Gly Asn Arg Asn Pro Tyr Glu Asn Leu Leu Tyr Lys Leu Cys Leu
 500 505 510

Ser Gly Glu Gly Trp Pro Tyr Ile Gly Ser Arg Ser Gln Ile Leu Gly
 515 520 525

Arg Ser Trp Asp Asn Thr Ser Val Asp Leu Asn Ala Arg Pro Val Thr
 530 535 540

Gly Pro Arg Ala Pro Glu Lys Asn Gly Gln Asn Ile Arg Leu Ser Asn
 545 550 555 560

Leu Ser Glu Met Gln Glu Ala Ile Val Lys Glu Ala Met Arg Lys Leu
 565 570 575

Asp Ser Ser Asp Thr Ile Trp Met Asp Ile Glu Gly Pro Pro Thr Asp
 580 585 590

Pro Val Glu Leu Ala Val Phe Gln Pro Ser Ser Gly Asn Tyr Val His
 595 600 605

Cys Phe Arg Lys Pro His Asp Glu Lys Gly Phe Lys Asn Gly Ser Arg
 610 615 620

ES 2 648 899 T3

His Ser His Gly Ile Leu Leu Lys Asp Leu Glu Asp Ala Gln Pro Gly
 625 630 635 640

Leu Leu Ser Tyr Val Ile Gly Leu Leu Pro Gln Gly Ser Val Ile Thr
 645 650 655

Val Gln Gly Ala Asp Asp Ile Lys Lys Leu Phe Asp Ile His Gly Arg
 660 665 670

Lys Asp Leu Lys Leu Val Asp Val Arg Leu Thr Gly Glu Gln Ser Arg
 675 680 685

Ile Phe Glu Gln Glu Val Trp Glu Lys Phe Gly His Leu Cys Arg Ala
 690 695 700

His Asn Gly Val Ile Val Pro Lys Lys Lys Asn Lys Glu Ala Asn Ser
 705 710 715 720

Thr Lys Glu Pro His Cys Ala Leu Leu Asp Cys Ile Met Phe Gln Ser
 725 730 735

Val Leu Asp Gly His Leu Pro Asp Thr Ile Pro Ile Gln Leu Leu Pro
 740 745 750

Asn Thr Leu Val Phe Gln Ala Lys Ser Ala Phe Val Ile Pro Gly Glu
 755 760 765

Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro Gly Gly Gly Ser His His His His His
 770 775 780

His
 785

<210> 122
 <211> 2440
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP-SNAPlike-proTEV1-nucleoproteína N del virus de Sabia-proTEV2-Histag para la expresión en células S2

<400> 122

atgaagttat gcatattact ggccgctcgtg gcctttgttg gcctctcgct cgggagatct	60
gacaaagact gcgaaatgaa aagaactaca ttggattcac cacttgggaa gttggaactg	120
agtggatgcg agcaaggatt gcatgaaatt aagctactgg gaaaaggaac ttctgctgct	180
gatgcagttg aagttccagc accagcagct gttcttgag gtcctgagcc cctcatgcaa	240

15

ES 2 648 899 T3

gccacagcct ggcttaacgc atatttccac cagcctgagg ccattgagga atttccagtc	300
cccgcccttc accatcctgt gtttcagcag gagagcttca cccgccaggt cctgtggaaa	360
ttgctgaagg tgggtcaagtt tgggtgaagtg atttcatatc agcaacttgc tgcattggcc	420
ggtaaccccc cagctacagc tgccgtgaaa actgctctca gcggaaatcc tgtgcccac	480
ctgatccctt gtcacagagt cgtttcatct tccggagctg taggtggcta tgaaggagga	540
ctggcagtta aggagtggct gctggctcat gaaggtcata gacttggaaa gcctgggctg	600
ggtcctgctg gtatagggcg gccagggctc ctagggtggcg gatccgaaaa cctgtacttc	660
cagagcgata tcagcaactc aaaggaaatc cccagcttca gatggactca atccctgaga	720
agagggtcga gtgagttcac aacaccctg aagaccgatg ttctgagggg tgccaaaatg	780
atacttgatg gtcttgattt caatcaagtc tctcttgctt aaagaatcct tagaaaagtct	840
aaaaggaatg atggtgatct tgataaactg agagacctaa ataaagaagt ggacaacctg	900
atgagcatga agagttccca aagagacaca atcttaaac ttggtgatct caacaaatct	960
gaactgatgg atcttgcac agacctggag aaactgaaaa gaaaagttgg acaaacagaa	1020
agatcagcct caggaggtgt gtacctggga aacctttccc aatcacagct caccaaaaag	1080
tctgatcttt taaggaaact tggttttcaa cagcagcaag tgaggtctcc aggggttcta	1140
aggatttggg acgtagctga tccgaacagg ctgaataatc aatttgatc tgtccctgca	1200
ctgacaatcg cttgtatgac taaacaaagt gacaatacca tgggggatgt tgttcaggca	1260
ctaacatctt tgggacttct ttatacagtt aagttcccca acctgattga cctagaaaaa	1320
cttacagcag aacatgactg tottcaata gtgactaaag atgagagcgg cttgaacatc	1380
tcaggatata actatagtct ttctgcagct gttaaagctg gtgcaacgct tctggatggt	1440
ggtaaacatg tggaaacat aaggatcact cctgacaact tttctcagat cataaagaca	1500
accctatcca taaagaaaaa ggaaggcatg tttgtagatg agaaacctgg aaatagaaac	1560
ccttatgaaa acctctgta caaaatctgc ctttcaggag aagggttgcc ttacattggc	1620
tccagatccc agatcaaggg taggtcatgg gaaaacacca ctggtgattt aagcacaag	1680
cccacaacag ggccgagaac accagaaaag gcaggtcaga acattagact ctcccactg	1740
actgagttgc aagagtcagt tgtgagagag gcaatgggta agattgacc aactctgaca	1800
acatggattg acattgaggg taccagtaat gatccggtt aattagcatt gtaccaacca	1860
gacacaggta attatatacct ctggtatagg aaaccacatg atgagaaggg gttcaaaaat	1920
ggtagcaggg attcacatgg gatgttgcta aaggacctag aatctgcaca gccaggcttg	1980
ctcagctatg ttatagggct ccttctcaa aacatggtcc tcaccacca aggttcagat	2040
gatataaggc gcttagtaga tacacacggg cgcaaagact taaagattgt cgacattaaa	2100
ttggcatctg aacaggcgag aaagtttgag gagccaatct ggtcagattt tggtcacctc	2160
tgtaagaaac acaatggagt tattgtgcca aagaaaaaga aagacaaaga catcccacag	2220
tcctcagagc cacactgtgc cctacttgat tgtctaattg ttcagtcagc catagcagggc	2280
caaccacctc aaaccaaact ggaaggttta ttgcctgatg cattgctctt cacactggag	2340
gcagattca ccatccccgg agagaatcta tattttcaag ggccccggcg aggtagtcac	2400
catcatcacc atcactaatg accggtgctg ccgcaagctt	2440

<211> 787
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-proTEV1-SAB.N-proTEV2-Histag]

<400> 123

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
 1 5 10 15

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
 20 25 30

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
 35 40 45

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
 50 55 60

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
 65 70 75 80

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
 85 90 95

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
 100 105 110

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
 115 120 125

Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
 130 135 140

10 Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
 145 150 155 160

ES 2 648 899 T3

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
 165 170 175

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser
 180 185 190

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

Ser Lys Glu Ile Pro Ser Phe Arg Trp Thr Gln Ser Leu Arg Arg Gly
 210 215 220

Leu Ser Glu Phe Thr Thr Pro Val Lys Thr Asp Val Leu Arg Asp Ala
 225 230 235 240

Lys Met Ile Leu Asp Gly Leu Asp Phe Asn Gln Val Ser Leu Val Gln
 245 250 255

Arg Ile Leu Arg Lys Ser Lys Arg Asn Asp Gly Asp Leu Asp Lys Leu
 260 265 270

Arg Asp Leu Asn Lys Glu Val Asp Asn Leu Met Ser Met Lys Ser Ser
 275 280 285

Gln Arg Asp Thr Ile Leu Lys Leu Gly Asp Leu Asn Lys Ser Glu Leu
 290 295 300

Met Asp Leu Ala Ser Asp Leu Glu Lys Leu Lys Arg Lys Val Gly Gln
 305 310 315 320

Thr Glu Arg Ser Ala Ser Gly Gly Val Tyr Leu Gly Asn Leu Ser Gln
 325 330 335

Ser Gln Leu Thr Lys Arg Ser Asp Leu Leu Arg Lys Leu Gly Phe Gln
 340 345 350

Gln Gln Gln Val Arg Ser Pro Gly Val Val Arg Ile Trp Asp Val Ala
 355 360 365

Asp Pro Asn Arg Leu Asn Asn Gln Phe Gly Ser Val Pro Ala Leu Thr
 370 375 380

Ile Ala Cys Met Thr Lys Gln Ser Asp Asn Thr Met Gly Asp Val Val
 385 390 395 400

Gln Ala Leu Thr Ser Leu Gly Leu Leu Tyr Thr Val Lys Phe Pro Asn
 405 410 415

ES 2 648 899 T3

Leu Ile Asp Leu Glu Lys Leu Thr Ala Glu His Asp Cys Leu Gln Ile
 420 425 430

Val Thr Lys Asp Glu Ser Gly Leu Asn Ile Ser Gly Tyr Asn Tyr Ser
 435 440 445

Leu Ser Ala Ala Val Lys Ala Gly Ala Thr Leu Leu Asp Gly Gly Asn
 450 455 460

Met Leu Glu Thr Ile Arg Ile Thr Pro Asp Asn Phe Ser Gln Ile Ile
 465 470 475 480

Lys Thr Thr Leu Ser Ile Lys Lys Lys Glu Gly Met Phe Val Asp Glu
 485 490 495

Lys Pro Gly Asn Arg Asn Pro Tyr Glu Asn Leu Leu Tyr Lys Ile Cys
 500 505 510

Leu Ser Gly Glu Gly Trp Pro Tyr Ile Gly Ser Arg Ser Gln Ile Lys
 515 520 525

Gly Arg Ser Trp Glu Asn Thr Thr Val Asp Leu Ser Thr Lys Pro Gln
 530 535 540

Gln Gly Pro Arg Thr Pro Glu Lys Ala Gly Gln Asn Ile Arg Leu Ser
 545 550 555 560

His Leu Thr Glu Leu Gln Glu Ser Val Val Arg Glu Ala Met Gly Lys
 565 570 575

Ile Asp Pro Thr Leu Thr Thr Trp Ile Asp Ile Glu Gly Thr Ser Asn
 580 585 590

Asp Pro Val Glu Leu Ala Leu Tyr Gln Pro Asp Thr Gly Asn Tyr Ile
 595 600 605

Leu Cys Tyr Arg Lys Pro His Asp Glu Lys Gly Phe Lys Asn Gly Ser
 610 615 620

Arg His Ser His Gly Met Leu Leu Lys Asp Leu Glu Ser Ala Gln Pro
 625 630 635 640

Gly Leu Leu Ser Tyr Val Ile Gly Leu Leu Pro Gln Asn Met Val Leu
 645 650 655

Thr Thr Gln Gly Ser Asp Asp Ile Arg Arg Leu Val Asp Thr His Gly
 660 665 670

ES 2 648 899 T3

Arg Lys Asp Leu Lys Ile Val Asp Ile Lys Leu Ala Ser Glu Gln Ala
675 680 685

Arg Lys Phe Glu Glu Pro Ile Trp Ser Asp Phe Gly His Leu Cys Lys
690 695 700

Lys His Asn Gly Val Ile Val Pro Lys Lys Lys Lys Asp Lys Asp Ile
705 710 715 720

Pro Gln Ser Ser Glu Pro His Cys Ala Leu Leu Asp Cys Leu Met Phe
725 730 735

Gln Ser Ala Ile Ala Gly Gln Pro Pro Gln Thr Lys Leu Glu Gly Leu
740 745 750

Leu Pro Asp Ala Leu Leu Phe Thr Leu Glu Ala Ala Phe Thr Ile Pro
755 760 765

Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro Gly Gly Gly Ser His His His
770 775 780

His His His
785

<210> 124
<211> 992
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de ADN que codifica BiPlike-SNAPlike- proteína EDIII del virus de Omsk -Histag para la expresión en células S2

<400> 124

atgaaactat gtattctact tgcagttggt gcggtcgtag gattgtcctt aagatctgac	60
aaagactgcg aaatgaaaag aactacattg gattcaccac ttgggaagt ggaactgagt	120
ggatgcgagc aaggattgca tgaaattaag ctactgggaa aaggaacttc tgctgctgat	180
gcagttgaag ttccagcacc agcagctggt cttggaggtc ctgagcccct catgcaagcc	240
acagcctggc ttaacgcata tttccaccag cctgaggcca ttgaggaatt tccagtcccc	300
gcccttcacc atoctgtggt tcagcaggag agcttcaccc gccaggtcct gtggaaattg	360
ctgaaggtgg tcaagtttgg tgaagtgatt tcatatcagc aacttgctgc attggccggt	420
aaccccgag ctacagctgc cgtgaaaact gctctcagcg gaaatcctgt gccatcctg	480
atcccttgtc acagagctgt ttcattctcc ggagctgtag gtggctatga aggaggactg	540
gcagttaagg agtggctgct ggctcatgaa ggtcatagac ttggaaagcc tgggctgggt	600

15

ES 2 648 899 T3

```

cctgctgcta taggcgcgcc aggaggtggc gggctggaaa aactcaagat gaaggtctt 660
acctatacaa tgtgcgacaa ggcaaagttc acgtggaaaa gagctcccac agacagtggg 720
cacgacacag ttgtcatgga agtcgctttc tctggaacaa agccttgagc aataccgctc 780
agggctgtgg cacatggttc cccagatgtg gatgtggcca tgctcataac gccaaatcca 840
acaatcgaaa acaatggagg tggctttata gagatgcagc tccccccagg agacaacatc 900
atctatgttg ggaactaaa acaccagtgg ttccagaagg ggagtagcat tggcggaggt 960
ggccatcacc atcaccatca ctgatgaccg gt 992

```

5 <210> 125
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-OMSK.EDIII-Histag]

<400> 125

```

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
1          5          10          15

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
20          25          30

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
35          40          45

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
50          55          60

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
65          70          75          80

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
85          90          95

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
100         105         110

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
115         120         125

Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
130         135         140

```


ES 2 648 899 T3

Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
 165 170 175

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Gly
 180 185 190

Gly Gly Leu Glu Lys Leu Lys Met Lys Gly Leu Thr Tyr Thr Met Cys
 195 200 205

Asp Lys Ala Lys Phe Thr Trp Lys Arg Ala Pro Thr Asp Ser Gly His
 210 215 220

Asp Thr Val Val Met Glu Val Ala Phe Ser Gly Thr Lys Pro Cys Arg
 225 230 235 240

Ile Pro Val Arg Ala Val Ala His Gly Ser Pro Asp Val Asp Val Ala
 245 250 255

Met Leu Ile Thr Pro Asn Pro Thr Ile Glu Asn Asn Gly Gly Gly Phe
 260 265 270

Ile Glu Met Gln Leu Pro Pro Gly Asp Asn Ile Ile Tyr Val Gly Glu
 275 280 285

Leu Lys His Gln Trp Phe Gln Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gly Gly Gly
 290 295 300

His His His His His His
 305 310

<210> 126
 <211> 992
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica BiPlike-SNAPlike- proteína EDIII del virus de la enfermedad del bosque de Kyasanur -Histag para la expresión en células S2

10

<400> 126

atgaaactat gtattctact tgcagttggt gcgttcgtag gattgtcctt aagatctgac	60
aaagactgcg aatgaaaag aactacattg gattcaccac ttgggaagtt ggaactgagt	120
ggatgcgagc aaggattgca tgaattaag ctactgggaa aaggaacttc tgctgctgat	180
gcagttgaag ttccagcacc agcagctggt cttggaggtc ctgagcccct catgcaagcc	240
acagcctggc ttaacgcata tttccaccag cctgaggcca ttgaggaatt tccagtcccc	300

15

ES 2 648 899 T3

```

gcccttcacc atcctgtgtt tcagcaggag agcttcaccc gccaggtcct gtggaaattg      360
ctgaaggtgg tcaagtttgg tgaagtgatt tcatatcagc aacttgctgc attggccggt      420
aaccocgcag ctacagctgc cgtgaaaact gctctcagcg gaaatcctgt gcccatcctg      480
atcccttgtc acagagtcgt ttcattctcc ggagctgtag gtggctatga aggagactg      540
gcagtaagg agtggctgct ggctcatgaa ggtcatagac ttggaaagcc tgggctgggt      600
cctgctggta taggcgcgcc aggaggtggc gggcttgaaa aacttaagat gaaagggatg      660
acatacacgg tttgtgaggg atcaaaattt gcttgaaaaa ggccgccaac cgacagtgga      720
catgataccg tagtcatgga ggtgacttac accgggagca agccatgcag aataccagtg      780
agagccgtgg cccatggaga acccaatggt aacgtggcaa gtctaataac cccaaacca      840
tccatggaaa caactggagg aggttcggt gagctacagc taccaccagg agacaacatc      900
atctatggtg gtgagctgag ccaccagtgg tttcagaagg gcagcacaat tggcggaggt      960
ggccatcacc atcaccatca ctgatgaccg gt      992

```

5 <210> 127
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-KYA.EDIII-Histag]

```

Arg Ser Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro
1          5          10          15

Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile
20          25          30

Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro
35          40          45

Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr
50          55          60

Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe
65          70          75          80

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
85          90          95

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
100         105         110

```

ES 2 648 899 T3

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
 115 120 125

Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
 130 135 140

Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
 165 170 175

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Gly
 180 185 190

Gly Gly Leu Glu Lys Leu Lys Met Lys Gly Met Thr Tyr Thr Val Cys
 195 200 205

Glu Gly Ser Lys Phe Ala Trp Lys Arg Pro Pro Thr Asp Ser Gly His
 210 215 220

Asp Thr Val Val Met Glu Val Thr Tyr Thr Gly Ser Lys Pro Cys Arg
 225 230 235 240

Ile Pro Val Arg Ala Val Ala His Gly Glu Pro Asn Val Asn Val Ala
 245 250 255

Ser Leu Ile Thr Pro Asn Pro Ser Met Glu Thr Thr Gly Gly Gly Phe
 260 265 270

Val Glu Leu Gln Leu Pro Pro Gly Asp Asn Ile Ile Tyr Val Gly Glu
 275 280 285

Leu Ser His Gln Trp Phe Gln Lys Gly Ser Thr Ile Gly Gly Gly Gly
 290 295 300

His His His His His His
 305 310

<210> 128
 <211> 992
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica BiPlike-SNAPlike- proteína EDIII del virus de Alkhumra-Histag para la
 10 expresión en células S2

<400> 128

ES 2 648 899 T3

```

atgaaactat gtattctact tgcagttggt gcgttcgtag gattgtcctt aagatctgac      60
aaagactgcg aaatgaaaag aactacattg gattcaccac ttgggaagtt ggaactgagt      120
ggatgcgagc aaggattgca tgaattaag ctactgggaa aaggaacttc tgctgctgat      180
gcagttgaag ttccagcacc agcagctggt cttggaggtc ctgagcccct catgcaagcc      240
acagcctggc ttaacgcata tttccaccag cctgaggcca ttgaggaatt tccagtcccc      300
gcccttcacc atcctgtggt tcagcaggag agcttcaccc gccaggtcct gtggaaattg      360
ctgaaggtgg tcaagtttgg tgaagtgatt tcatatcagc aacttgctgc attggccggt      420
aaccctcgag ctacagctgc cgtgaaaact gctctcagcg gaaatcctgt gcccatcctg      480
atcccttgtc acagagctgt ttcattctcc ggagctgtag gtggctatga aggaggactg      540
gcagttaagg agtggctgct ggctcatgaa ggtcatagac ttggaaagcc tgggctgggt      600
cctgctggta taggcgcgcc aggaggtggc gggcttgaaa aactcaagat gaaaggaatg      660
acatacacgg tctgtgaggg atcaaagttt gcttgaaga gcccgccaac cgacagtggg      720
catgacactg tggatcatga agtgacttac actgggagca agccatgcag aataccagtg      780
agagccgtgg cccatggaga acctaatgtc aatgtagcta gcctgataac tccaaatcca      840
tccatggaga caactggagg aggtttcgtt gaactgcagc tgccaccagg agacaacatc      900
atctatgttg gtgagctgag tcaccagtgg tttcagaagg gtagtacaat aggcggaggt      960
ggccatcacc atcaccatca ctgatgaccg gt      992

```

<210> 129
 <211> 310
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SNAPlike-ALK.EDIII-Histag]

<400> 129

```

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

```

ES 2 648 899 T3

Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr
85 90 95

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
100 105 110

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
115 120 125

Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
130 135 140

Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
145 150 155 160

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
165 170 175

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Gly
180 185 190

Gly Gly Leu Glu Lys Leu Lys Met Lys Gly Met Thr Tyr Thr Val Cys
195 200 205

Glu Gly Ser Lys Phe Ala Trp Lys Arg Pro Pro Thr Asp Ser Gly His
210 215 220

Asp Thr Val Val Met Glu Val Thr Tyr Thr Gly Ser Lys Pro Cys Arg
225 230 235 240

Ile Pro Val Arg Ala Val Ala His Gly Glu Pro Asn Val Asn Val Ala
245 250 255

Ser Leu Ile Thr Pro Asn Pro Ser Met Glu Thr Thr Gly Gly Gly Phe
260 265 270

Val Glu Leu Gln Leu Pro Pro Gly Asp Asn Ile Ile Tyr Val Gly Glu
275 280 285

Leu Ser His Gln Trp Phe Gln Lys Gly Ser Thr Ile Gly Gly Gly Gly
290 295 300

His His His His His His
305 310

<210> 130
<211> 1288
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>

10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP- glicoproteína GP1 del virus de Lassa-SNAPlike-Histag para la expresión en células S2

<400> 130

ES 2 648 899 T3

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gcctttgttg gcctctcgct cgggagatct	60
accagtctgt acaagggggt gtacgagctt cagactctgg aactgaacat ggagacactc	120
aacatgacca tgcctctctc ctgcacaaag aacaacagtc atcattacat aatggtgggc	180
aatgagacag gactggaact gaccttgacc aacacgagca tcatcaatca caagttctgc	240
aacctgtctg atgcccacaa gaagaacctc tacgaccacg ctctgatgag cataatctca	300
actttccact tgtccatccc caacttcaac cagtacgagg caatgagctg cgatttcaat	360
gggggcaaga tcagtgtgca gtacaacctg agtcacagct acgctgggga tgcagccaac	420
cattgtggca ctgtggcaaa cgggtgtgtg cagactttca tgaggatggc ttggggcggg	480
agctacatcg ctcttgactc aggccgtggc aactgggact gtatcatgac tagttaccaa	540
tacctgataa tccagaacac aacctgggaa gatcactgcc aattctccag accatctccc	600
atcggtacc tcgggctcct ctcaaaagg actagagata ttacatcag tagaagattg	660
ctgcgccgc acggcgggag tagcaaagac tgcgaaatga agcgcaccac cctggatagc	720
cctctgggca agctggaact gtctgggtgc gaacagggcc tgcacgagat caagctgctg	780
ggcaaaggaa catctgccgc cgacccgtg gaagtgcctg ccccagccgc cgtgctgggc	840
ggaccagagc cactgatgca ggccaccgcc tggctcaacg cctactttca ccagcctgag	900
gccatcgagg agttccctgt gccagccctg caccaccag tgttccagca ggagagcttt	960
acccgccagg tgctgtggaa actgctgaaa gtggtgaagt tcggagaggt catcagctac	1020
cagcagctgg ccgccctggc cggcaatccc gccgccaccg ccgccgtgaa aaccgccctg	1080
agcggaaatc ccgtgcccat tctgatcccc tgcaccggg tgggtcttag ctctggcgcc	1140
gtggggggct acgagggcgg gctcgcctg aaagagtggc tgctggcca cgagggccac	1200
agactgggca agcctgggct gggtcctgca ggtataggcg cgcagggtc cctggagcat	1260
catcatcatc atcattgatg acgggccc	1288

<210> 131
 <211> 407
 5 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [LAS.ectoGP1-SNAPlike-Histag]

10 <400> 131

ES 2 648 899 T3

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

ES 2 648 899 T3

	245		250		255										
Pro	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Gly	Pro	Glu	Pro	Leu	Met	Gln	Ala	Thr	Ala
	260						265					270			
Trp	Leu	Asn	Ala	Tyr	Phe	His	Gln	Pro	Glu	Ala	Ile	Glu	Glu	Phe	Pro
	275						280					285			
Val	Pro	Ala	Leu	His	His	Pro	Val	Phe	Gln	Gln	Glu	Ser	Phe	Thr	Arg
	290					295					300				
Gln	Val	Leu	Trp	Lys	Leu	Leu	Lys	Val	Val	Lys	Phe	Gly	Glu	Val	Ile
305					310					315					320
Ser	Tyr	Gln	Gln	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly	Asn	Pro	Ala	Ala	Thr	Ala
				325					330					335	
Ala	Val	Lys	Thr	Ala	Leu	Ser	Gly	Asn	Pro	Val	Pro	Ile	Leu	Ile	Pro
			340					345					350		
Cys	His	Arg	Val	Val	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Val	Gly	Gly	Tyr	Glu	Gly
		355					360					365			
Gly	Leu	Ala	Val	Lys	Glu	Trp	Leu	Leu	Ala	His	Glu	Gly	His	Arg	Leu
	370					375					380				
Gly	Lys	Pro	Gly	Leu	Gly	Pro	Ala	Gly	Ile	Gly	Ala	Pro	Gly	Ser	Leu
385					390					395					400
Glu	His	His	His	His	His	His	His								
				405											

<210> 132
 <211> 1264
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP- Glicoproteína GP1 del virus de Junin-SNAPlike-Histag para la expresión en células S2

<400> 132

atgaagttat	gcatattact	ggccgtcgtg	gcctttgttg	gcctctcgct	cgggagatct	60
gaggaggctt	tcaagatcgg	cctgcacacc	gagttccaga	cggtgtcctt	ctcgatggtg	120
ggcctcttct	ccaacaaccc	acacgacctg	cctttgttgt	gtaccttgaa	caagagccat	180
ctgtacatta	aggggggcaa	cgcttcattc	cagatcagct	tcgacgacat	cgcggtgttg	240
ttgccacagt	acgacgttat	catccagcac	ccagcagaca	tgagctggtg	ctccaagagt	300

15

ES 2 648 899 T3

gatgatcaga tttggttgtc tcagtggttc atgaatgctg tgggacatga ttggcaccta 360
gacccacat tctgtgtag gaaccgtaca aagacagaag gcttcatctt ccaagtcaac 420
acctccaaga ctggtgtaa tgaaaattat gctaagaagt tcaagactgg catgcaccac 480
ttgtatagag agtaccctga ctctgcccg aacggcaagc tgtgcttaat gaaggcacia 540
cctaccagtt ggctctcca atgtccactc gaccacgtca acacattaca cttccttaca 600
agaggcaaga acattcagct tccaaggagg tccttgaagc gggcgacgg cggaggtagc 660
aaagactgcg aatgaagcg caccaccctg gatagccctc tgggcaagct ggaactgtct 720
gggtgcgaac agggcctgca cgagatcaag ctgctgggca aaggaacatc tgccgcccac 780
gccgtggaag tgctgcccc agccgcccgtg ctgggcccac cagagccact gatgcaggcc 840
accgctggc tcaacgccta ctttcaccag cctgaggcca tcgaggagtt ccctgtgcca 900
gccctgcacc acccagtggt ccagcaggag agctttacc gccagggtgct gtggaaactg 960
ctgaaagtgg tgaagttcgg agaggtcatc agctaccagc agctggccc cctggccggc 1020
aatcccggc ccaccgccc cgtgaaaacc gccctgagcg gaaatcccgt gccattctg 1080
atcccctgcc accgggtggt gtctagctct ggcgcccgtg ggggctacga gggcgggctc 1140
gccgtgaaag agtggctgct ggcccacgag ggccacagac tgggcaagcc tgggctgggt 1200
cctgcaggta taggcgccc agggtcctg gagcatcatc atcatcatca ttgatgacgg 1260
gcc 1264

<210> 133
<211> 399
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [JUN.ectoGP1-SNAPlike-Histag]

<400> 133

Arg Ser Glu Glu Ala Phe Lys Ile Gly Leu His Thr Glu Phe Gln Thr
1 5 10 15

Val Ser Phe Ser Met Val Gly Leu Phe Ser Asn Asn Pro His Asp Leu
20 25 30

Pro Leu Leu Cys Thr Leu Asn Lys Ser His Leu Tyr Ile Lys Gly Gly
35 40 45

Asn Ala Ser Phe Gln Ile Ser Phe Asp Asp Ile Ala Val Leu Leu Pro
50 55 60

Gln Tyr Asp Val Ile Ile Gln His Pro Ala Asp Met Ser Trp Cys Ser

ES 2 648 899 T3

Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly
 325 330 335

Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser
 340 345 350

Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu
 355 360 365

Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala
 370 375 380

Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser Leu Glu His His His His His His
 385 390 395

<210> 134
 <211> 1297
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP- Gliproteína GP1 del virus de Machupo-SNAPlike-Histag para la expresión en células S2

<400> 134

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gcctttgttg gcctctcgct cgggagatct	60
gacggcacat tcaagatcgg cctgcacacg gagttccagt cagtcaccct caccatgcag	120
agacttttgg ctaaccattc aaacgagctc ccgtctctct gcatgctgaa caacagtttc	180
tattatatga ggggaggtgt gaacaccttc ctgatccgtg tttctgatat ttcagtctc	240
atgaaggagt acgatgtatc aatctacgag ccagaggacc tcggaaactg tctgaacaag	300
tctgactcaa gctgggctat ccattggttc tcaaacgctt tgggacatga ctggctgatg	360
gaccctccaa tgctctgtag aaacaagaca aagaaggagg gatctaacat ccaattcaac	420
atcagcaagg ctgatgatgc cagagtgtat ggaaagaaga tcagaaacgg tatgagcat	480
ctcttcaggg gcttccatga cccgtgtgag gaagggaagg tgtgctacct gaccatcaac	540
cagtgtggtg accccagttc cttcgactac tgtggcgtga accatctgtc caagtgtcag	600
ttcgaccatg tgaacaccct gcatttctct gtgagaagta agacacatct caacttcgag	660
aggtctttga agcggccgca cggcggaggt agcaaagact gcgaaatgaa gcgcaccacc	720
ctggatagcc ctctgggcaa gctggaactg tctgggtgcg aacagggcct gcacgagatc	780
aagctgctgg gcaaaggaac atctgccgcc gacgccgtgg aagtgcctgc cccagccgcc	840
gtgctgggcg gaccagagcc actgatgcag gccaccgcct ggctcaacgc ctactttcac	900
cagcctgagg ccatcgagga gttccctgtg ccagccctgc accaccaggt gttccagcag	960
gagagcttta cccgccaggt gctgtggaaa ctgctgaaag tggatgaagt cggagaggtc	1020

15

ES 2 648 899 T3

atcagctacc agcagctggc cgcctggcc ggcaatcccg cgcaccgc cgccgtgaaa 1080
accgacctga gcggaaatcc cgtgcccatt ctgatccoct gccaccgggt ggtgtctagc 1140
tctggcgccg tggggggcta cgagggcggg ctgcccgtga aagagtggct gctggcccac 1200
gagggccaca gactgggcaa gcctgggctg ggtcctgcag gtatagggcg gccagggtcc 1260
ctggagcatc atcatcatca tcattgatga cggggccc 1297

<210> 135
<211> 410
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [MAC.ectoGP1-SNAPlike-Histag]
<400> 135

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

ES 2 648 899 T3

Ile Asn Gln Cys Gly Asp Pro Ser Ser Phe Asp Tyr Cys Gly Val Asn
165 170 175

His Leu Ser Lys Cys Gln Phe Asp His Val Asn Thr Leu His Phe Leu
180 185 190

Val Arg Ser Lys Thr His Leu Asn Phe Glu Arg Ser Leu Lys Arg Pro
195 200 205

His Gly Gly Gly Ser Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp
210 215 220

Ser Pro Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His
225 230 235 240

Glu Ile Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu
245 250 255

Val Pro Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln
260 265 270

Ala Thr Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu
275 280 285

Glu Phe Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser
290 295 300

Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly
305 310 315 320

Glu Val Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala
325 330 335

Ala Thr Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile
340 345 350

Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly
355 360 365

Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly
370 375 380

His Arg Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro
385 390 395 400

Gly Ser Leu Glu His His His His His His
405 410

<210> 136
<211> 1246
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP- Glioproteína GP1 del virus de Guanarito- SNAPlike-Histag para la expresión en células S2

<400> 136

ES 2 648 899 T3

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gcctttgttg gcctctcgtc cgggagatct 60
 ttcaaggttg gtcacatac gaacttcgag tcgttcacgg ttaagctggg aggtgtcttc 120
 catgaattgc ctctcgtgtg tagggtcaac aactcctaca gtctgatcag gctctcccat 180
 aacagtaacc aggcattgtc ggttgagtac gtggatgtgc accctgtcct ctgttcgtcc 240
 agtccaacca tcctcgacaa ctacacgcaa tgtatcaagg gctcgcaga gttcgattgg 300
 attctcgggt ggacgatcaa gggattggga catgacttct tgagagatcc aagaatctgc 360
 tgtgagccta agaagacgac taacgtgag ttcacgttcc aattgaactt gacggatagt 420
 cctgagaccc atcactacag gagcaagatt gaggtaggca tccgacactt gttcgggaac 480
 tacatcacca acgatagcta ctogaagatg tccgtggtta tgaggaacac cacctgggaa 540
 ggtcaatgct cgaacagtca tgtgaacacg ctgagattcc tcgttaagaa cgcaggttac 600
 ctctgttgaa ggaagccact gcggccgcac ggccggagta gcaaagactg cgaaatgaag 660
 cgcaccaccc tggatagccc tctgggcaag ctggaactgt ctgggtgcga acagggcctg 720
 cacgagatca agctgctggg caaaggaaca tctgccgccg acgccgtgga agtgcctgcc 780
 ccagccgccg tgctgggcgg accagagcca ctgatgcagg ccaccgcctg gctcaacgcc 840
 tactttcacc agcctgaggc catcgaggag ttccctgtgc cagccctgca ccaccagtg 900
 ttccagcagg agagctttac ccgccaggtg ctgtgaaac tgctgaaagt ggtgaagtcc 960
 ggagaggtca tcagctacca gcagctggcc gccctggccg gcaatcccgc cgcaccgcc 1020
 gccgtgaaaa ccgccctgag cggaaatccc gtgccattc tgatcccctg ccaccgggtg 1080
 gtgtctagct ctggcgccgt ggggggctac gagggcgggc tcgccgtgaa agagtggctg 1140
 ctggcccacg agggccacag actgggcaag cctgggctgg gtccctgcagg tataggcgcg 1200
 ccagggtocc tggagcatca tcatcatcat cattgatgac gggccc 1246

<210> 137
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [GUA.ectoGP1-SNAPlike-Histag]

10

<400> 137

ES 2 648 899 T3

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

ES 2 648 899 T3

	245		250		255										
Thr	Ala	Trp	Leu	Asn	Ala	Tyr	Phe	His	Gln	Pro	Glu	Ala	Ile	Glu	Glu
			260					265					270		
Phe	Pro	Val	Pro	Ala	Leu	His	His	Pro	Val	Phe	Gln	Gln	Glu	Ser	Phe
		275					280					285			
Thr	Arg	Gln	Val	Leu	Trp	Lys	Leu	Leu	Lys	Val	Val	Lys	Phe	Gly	Glu
	290					295					300				
Val	Ile	Ser	Tyr	Gln	Gln	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly	Asn	Pro	Ala	Ala
305					310					315					320
Thr	Ala	Ala	Val	Lys	Thr	Ala	Leu	Ser	Gly	Asn	Pro	Val	Pro	Ile	Leu
				325					330					335	
Ile	Pro	Cys	His	Arg	Val	Val	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Val	Gly	Gly	Tyr
			340					345					350		
Glu	Gly	Gly	Leu	Ala	Val	Lys	Glu	Trp	Leu	Leu	Ala	His	Glu	Gly	His
		355					360					365			
Arg	Leu	Gly	Lys	Pro	Gly	Leu	Gly	Pro	Ala	Gly	Ile	Gly	Ala	Pro	Gly
	370					375					380				
Ser	Leu	Glu	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His
385						390									

<210> 138
 <211> 1273
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP- Gliproteína GP1 del virus de Sabia-SNAPlike-Histag para la expresión en células S2

<400> 138

atgaagttat gcatattact ggccgtcgtg gcctttgttg gcctctcgct cgggagatct	60
ttcagaatcg gaaggagcac agaattgcag aacatcacgt tcgatatggt gaaggtgttc	120
gaggaccacc ccacatcctg catggtgaac cattccacct actacgtcca tgagaacaag	180
aacgccactt ggtgtctgga ggtgtccgtg actgatgta cctgtctcat ggctgaacat	240
gatcgtcaag tcctcaaaa cctgtcgaac tgtgtgcacc ctgcagtcga gcacagaagc	300
aggatggttg gcttgctgga gtggatcttc agagccctga agtacgactt caacatgat	360
ccaacaccgt tgtgtcagaa gcagacttcg acagtgaacg agacacgtgt gcagatcaac	420

15

ES 2 648 899 T3

atcactgagg ggttcgggtc ccacgggttc gaagatacca tcctccagag actcggggtt 480
ctgttcggtt cgagaattgc attctcgaac atccaggact tgggtaagaa gaggttcttg 540
ttgatcagga actcgacttg gaagaaccaa tgcgagatga accatgtgaa ctccatgcac 600
ttgatgttgg cgaacgctgg tgcctcgtcc ggttcgagaa gacctactgc gccgcacggc 660
ggaggtagca aagactgcga aatgaagcgc accaccctgg atagccctct gggcaagctg 720
gaactgtctg ggtgcgaaca gggcctgcac gagatcaagc tgctgggcaa aggaacatct 780
gccgccgacg ccgtggaagt gcctgcccc a gccgccgtgc tgggcccacc agagccactg 840
atgcaggcca ccgctggct caacgcctac tttcaccagc ctgaggccat cgaggagttc 900
cctgtgccag ccctgcacca cccagtgttc cagcaggaga gctttaccgg ccagggtgctg 960
tggaaactgc tgaaagtggg gaagttogga gaggtcatca gctaccagca gctggcccgc 1020
ctggccggca atcccggcg caccggcggc gtgaaaaccg ccctgagcgg aaatcccgtg 1080
cccattctga tcccctgcca ccgggtgggtg tctagctctg gcgccgtggg gggctacgag 1140
ggcgggctcg ccgtgaaaga gtggctgctg gccacagagg gccacagact gggcaagcct 1200
gggctgggtc ctgcaggtat aggcgcgcca gggccctgg agcatcatca tcatcatcat 1260
tgatgacggg ccc 1273

<210> 139

<211> 396

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SAB.ectoGP1-SNAPlike-Histag]

<400> 139

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

ES 2 648 899 T3

Pro Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val
 340 345 350

Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His
 355 360 365

Glu Gly His Arg Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly
 370 375 380

Ala Pro Gly Ser Leu Glu His His His His His His
 385 390 395

5 <210> 140
 <211> 1189
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP- Gliproteína GP1 del virus de Lassa-SNAPlike-Histag para la expresión en células S2

<400> 140

atgaagttat	gcatattact	ggccgtcgtg	gcctttgttg	gcctctcgct	cgggagatct	60
ggcacattca	catggacact	gtcggattct	gaaggttaagg	acacaccagg	gggatactgt	120
ctgaccagg	ggatgctgat	cgaggctgaa	ctgaagtgct	tcgggaacac	agctgtggcg	180
aagtgtaacg	agaagcatga	tgaggagttc	tgtgacatgc	tgaggctggt	cgacttcaac	240
aagcaagcca	tccagaggtt	gaaggctgaa	gcacagatga	gcatccagtt	gatcaacaag	300
gcagtgaatg	ccttgatcaa	cgaccaactg	atcatgaaga	accatctgcg	ggacatcatg	360
ggtatcccat	actgtaacta	cagcaagtac	tggtagctca	accacacaac	tactgggaga	420
acatcgctgc	ccaagtgttg	gctggtgtcg	aacggttcgt	acttgaacga	gacccacttc	480
tccgatgaca	tcgaacaaca	agctgacaac	atgatcactg	agatgttgca	gaaggagtac	540
atggagaggg	aggggaagac	accgcggccg	cacggcggag	gtagcaaaga	ctgcgaaatg	600
aagcgacca	ccctggatag	ccctctgggc	aagctggaac	tgtctgggtg	cgaacagggc	660
ctgcacgaga	tcaagctgct	gggcaaagga	acatctgccg	ccgacgccgt	ggaagtgcct	720
gccccagccg	ccgtgctggg	cggaccagag	ccactgatgc	aggccaccgc	ctggctcaac	780
gcctactttc	accagcctga	ggccatcgag	gagttccctg	tgccagccct	gcaccacca	840
gtgttccagc	aggagagctt	taccgccag	gtgctgtgga	aactgctgaa	agtgggtgaag	900
ttcgagaggg	tcatcagcta	ccagcagctg	gccgccctgg	ccggcaatcc	cgccgccacc	960
gccgccgtga	aaaccgccct	gagcggaaat	cccgtgccca	ttctgatccc	ctgccaccgg	1020
gtggtgtcta	gctctggcgc	cgtggggggc	tacgagggcg	ggctcgccgt	gaaagagtgg	1080
ctgctggccc	acgagggcca	cagactgggc	aagcctgggc	tgggtcctgc	aggtataggg	1140
gcgccaggg	ccctggagca	tcatcatcat	catcattgat	gacgggcc		1189

20 <210> 141
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> artificial

ES 2 648 899 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [LAS.ectoGP2-SNAPlike-Histag]

<400> 141

5

```

Arg Ser Gly Thr Phe Thr Trp Thr Leu Ser Asp Ser Glu Gly Lys Asp
1          5          10          15

Thr Pro Gly Gly Tyr Cys Leu Thr Arg Trp Met Leu Ile Glu Ala Glu
20          25          30

Leu Lys Cys Phe Gly Asn Thr Ala Val Ala Lys Cys Asn Glu Lys His
35          40          45

Asp Glu Glu Phe Cys Asp Met Leu Arg Leu Phe Asp Phe Asn Lys Gln
50          55          60

Ala Ile Gln Arg Leu Lys Ala Glu Ala Gln Met Ser Ile Gln Leu Ile
65          70          75          80

Asn Lys Ala Val Asn Ala Leu Ile Asn Asp Gln Leu Ile Met Lys Asn
85          90          95

His Leu Arg Asp Ile Met Gly Ile Pro Tyr Cys Asn Tyr Ser Lys Tyr
100         105         110

Trp Tyr Leu Asn His Thr Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Pro Lys Cys
115         120         125

Trp Leu Val Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Glu Thr His Phe Ser Asp
130         135         140

Asp Ile Glu Gln Gln Ala Asp Asn Met Ile Thr Glu Met Leu Gln Lys
145         150         155         160

Glu Tyr Met Glu Arg Gln Gly Lys Thr Pro Arg Pro His Gly Gly Gly
165         170         175

Ser Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly
180         185         190
    
```

ES 2 648 899 T3

Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu
 195 200 205

Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala Pro
 210 215 220

Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr Ala Trp
 225 230 235 240

Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val
 245 250 255

Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln
 260 265 270

Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser
 275 280 285

Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr Ala Ala
 290 295 300

Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys
 305 310 315 320

His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu Gly Gly
 325 330 335

Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly
 340 345 350

Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser Leu Glu
 355 360 365

His His His His His His
 370

<210> 142
 <211> 1189
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP- Gliproteína GP1 del virus de Junin-SNAPlike-Histag para la
 expresión en células S2

<400> 142
 atgaagttat gcatattact ggccgctcgtg gcctttgttg gcctctcgct cgggagatct 60
 gcattcttct cctggctcgtt gacagactca tccggcaagg ataccctcgg aggctactgc 120
 ctggaagagt ggatgctcgt ggcagccaag atgaagtgct tccgcaaac tgctgtggcc 180

15

ES 2 648 899 T3

aagtgcaact tgaacatga ctcgagttc tgtgacatgt tgaggctgtt cgattacaac 240
aagaacgcta tcaagaccct gaacgatgag actaagaagc aagtgaacct gatggggcag 300
acaatcaacg ccctgatctc ggacaacttg ttgatgaaga acaagatcag ggaactgatg 360
agtgtccctt actgcaacta cacgaagttc tggtagtca accacacact ctccggacaa 420
cactcgttgc caaggtgctg gttgatcaag aacaacagct acttgaacat ctccgacttc 480
cgtaacgact ggatcttggg gagtgacttc ttgatctccg agatgctgag caaggagtac 540
tcggacagggc agggtaagac tccgcggccg cacggcggag gtagcaaaga ctgcgaaatg 600
aagcgcacca ccctggatag ccctctgggc aagctggaac tgtctgggtg cgaacagggc 660
ctgcacgaga tcaagctgct gggcaaagga acatctgccg ccgacgccgt ggaagtgcct 720
gccccagccg ccgtgctggg cggaccagag ccactgatgc aggccaccgc ctggctcaac 780
gcctactttc accagcctga ggccatcgag gagttccctg tgccagccct gcaccacca 840
gtgttccagc aggagagctt taccgccag gtgctgtgga aactgctgaa agtgggtgaag 900
ttcggagagg tcatcagcta ccagcagctg gccgccctgg ccggcaatcc cgcgccacc 960
gccgccgtga aaaccgccct gagcggaaat cccgtgcca ttctgatccc ctgccaccgg 1020
gtggtgtcta gctctggcgc cgtggggggc tacgagggcg ggctcgccgt gaaagagtgg 1080
ctgctggccc acgagggcca cagactgggc aagcctgggc tgggtcctgc aggtataggc 1140
gcgccagggc ccctggagca tcatcatcat catcattgat gacggggccc 1189

<210> 143
<211> 374
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [JUN.ectoGP2-SNAPlike-Histag]

<400> 143

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

ES 2 648 899 T3

Ala Ile Gln Arg Leu Lys Ala Glu Ala Gln Met Ser Ile Gln Leu Ile
65 70 75 80

Asn Lys Ala Val Asn Ala Leu Ile Asn Asp Gln Leu Ile Met Lys Asn
85 90 95

His Leu Arg Asp Ile Met Gly Ile Pro Tyr Cys Asn Tyr Ser Lys Tyr
100 105 110

Trp Tyr Leu Asn His Thr Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Pro Lys Cys
115 120 125

Trp Leu Val Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Glu Thr His Phe Ser Asp
130 135 140

Asp Ile Glu Gln Gln Ala Asp Asn Met Ile Thr Glu Met Leu Gln Lys
145 150 155 160

Glu Tyr Met Glu Arg Gln Gly Lys Thr Pro Arg Pro His Gly Gly Gly
165 170 175

Ser Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly
180 185 190

Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu
195 200 205

Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala Pro
210 215 220

Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr Ala Trp
225 230 235 240

Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val
245 250 255

Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln
260 265 270

Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser
275 280 285

Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr Ala Ala
290 295 300

Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys
305 310 315 320

ES 2 648 899 T3

His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu Gly Gly
 325 330 335

Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly
 340 345 350

Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser Leu Glu
 355 360 365

His His His His His His
 370

5 <210> 144
 <211> 1189
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP-Gliproteína GP1 del virus de Machupo-SNAPlike-Histag para la expresión en células S2

<400> 144

atgaagttat	gcatattact	ggccgtcgtg	gcctttgttg	gcctctcgct	cgggagatct	60
gcattcttct	catggtcgct	gaccgactcc	tccggcaagg	acatgccagg	aggttactgt	120
ctggaggaat	ggatgttgat	cgcagccaag	atgaagtgct	tcggcaacac	cgctgtcgct	180
aagtgaacc	agaacatga	ctcagagttc	tgtgatatgc	tgaggctatt	cgactacaac	240
aagaacgcaa	tcaagaccct	caacgatgaa	tcgaagaagg	agatcaacct	gctaagccag	300
accgtgaacg	ccttgatctc	ggataaacttg	ttaatgaaga	acaagatcaa	ggagctaatag	360
agcatccctt	actgtaatta	cacgaagttc	tggtacgtca	accataccct	gacagggcag	420
cacacgctgc	caaggtgttg	gttgatcagg	aacggaagtt	acctcaacac	ctcggagttc	480
aggaacgact	ggatcttga	gagtgatcac	ctcatctcgg	agatgttgag	taaggaatac	540
gctgagaggg	aaggcaagac	cccgcggccg	cacggcggag	gtagcaaaga	ctgcgaaatg	600
aagcgcacca	ccctggatag	ccctctgggc	aagctggaac	tgtctgggtg	cgaacagggc	660
ctgcacgaga	tcaagctgct	gggcaaagga	acatctgccg	ccgacgccgt	ggaagtgcct	720
gccccagccg	ccgtgctggg	cggaccagag	ccactgatgc	aggccaccgc	ctggctcaac	780
gcctactttc	accagcctga	ggccatcgag	gagttccctg	tgccagccct	gcaccacca	840
gtgttccagc	aggagagctt	taccgccag	gtgctgtgga	aactgctgaa	agtggatgaag	900
ttcggagagg	tcatcagcta	ccagcagctg	gccgccctgg	ccggcaatcc	cgccgccacc	960
gccgcctgta	aaaccgccct	gagcggaaat	cccgtgccca	ttctgatccc	ctgccaccgg	1020
gtggtgtcta	gctctggcgc	cgtggggggc	tacgagggcg	ggctcgccgt	gaaagagtgg	1080
ctgctggccc	acgagggcca	cagactgggc	aagcctgggc	tgggtcctgc	aggtataggg	1140
gcgccagggg	ccctggagca	tcatcatcat	catcattgat	gacggggccc		1189

20 <210> 145
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> artificial

ES 2 648 899 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [MAC.ectoGP2-SNAPlike-Histag]

<400> 145

5

```

Arg Ser Ala Phe Phe Ser Trp Ser Leu Thr Asp Ser Ser Gly Lys Asp
1          5          10          15

Met Pro Gly Gly Tyr Cys Leu Glu Glu Trp Met Leu Ile Ala Ala Lys
20          25          30

Met Lys Cys Phe Gly Asn Thr Ala Val Ala Lys Cys Asn Gln Asn His
35          40          45

Asp Ser Glu Phe Cys Asp Met Leu Arg Leu Phe Asp Tyr Asn Lys Asn
50          55          60

Ala Ile Lys Thr Leu Asn Asp Glu Ser Lys Lys Glu Ile Asn Leu Leu
65          70          75          80

Ser Gln Thr Val Asn Ala Leu Ile Ser Asp Asn Leu Leu Met Lys Asn
85          90          95

Lys Ile Lys Glu Leu Met Ser Ile Pro Tyr Cys Asn Tyr Thr Lys Phe
100         105         110

Trp Tyr Val Asn His Thr Leu Thr Gly Gln His Thr Leu Pro Arg Cys
115         120         125

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

Asp Trp Ile Leu Glu Ser Asp His Leu Ile Ser Glu Met Leu Ser Lys
145         150         155         160

Glu Tyr Ala Glu Arg Gln Gly Lys Thr Pro Arg Pro His Gly Gly Gly
165         170         175

Ser Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly
180         185         190

```

ES 2 648 899 T3

Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu
 195 200 205

Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala Pro
 210 215 220

Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr Ala Trp
 225 230 235 240

Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val
 245 250 255

Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln
 260 265 270

Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser
 275 280 285

Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr Ala Ala
 290 295 300

Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys
 305 310 315 320

His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu Gly Gly
 325 330 335

Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly
 340 345 350

Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser Leu Glu
 355 360 365

His His His His His His
 370

<210> 146
 <211> 1189
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP-Gliproteína GP1 del virus de Guanarito- SNAPliike-Histag para la
 expresión en células S2

<400> 146

atgaagttat gcatattact ggccgctcgtg gcctttgttg gcctctcgcct cgggagatct 60

gcattcttca gttggctcgcct gtctgacctg aagggtaatg acatgccagg tggttactgt 120

15

ES 2 648 899 T3

ctggagaggt ggatgttggt cgctggggac ttgaagtgct tcggcaacac agctgtcgcc 180
aagtgtaaact tgaacatga ttccgagttc tgtgacatgt tgaggctggt cgacttcaac 240
aagaacgccca tcgagaagct gaacaaccag actaagactg ctgtcaacat gttgactcac 300
tcgatcaaca gtctgatctc cgataaacttg ttgatgagga acaagctgaa ggagattttg 360
aaggtcccat actgcaacta cacaagattc tggtagatca accacacgaa gtccgctgag 420
cactcgtctc ctoggtgttg gctggtcagt aacggttcct acttgaacga gactgacttc 480
aggaacgagt ggatcttggg gagtgatcac ctgatcgag agatggtgag caaggaatac 540
caagataggg aggggaagac tccgctggcg cacggcggag gtagcaaaga ctgcaaatg 600
aagcgcacca ccctggatag ccctctgggc aagctggaac tgtctgggtg cgaacagggc 660
ctgcacgaga tcaagctgct gggcaaagga acatctgccg ccgacgccgt ggaagtgcct 720
gccccagccg ccgtgctggg cggaccagag cactgatgc aggccaccgc ctggctcaac 780
gcctactttc accagcctga ggccatcgag gagttccctg tgccagccct gcaccacca 840
gtgttccagc aggagagctt taccgccag gtgctgtgga aactgctgaa agtggggaag 900
ttcgagagg tcatcagcta ccagcagctg gccgccctgg ccggcaatcc cgccgccacc 960
gccgccgtga aaaccgccct gagcggaaat cccgtgcca ttctgatccc ctgccaccgg 1020
gtggtgtcta gctctggcgc cgtggggggc tacgagggcg ggctcgccgt gaaagagtgg 1080
ctgctggccc acgagggcca cagactgggc aagcctgggc tgggtcctgc aggtataggc 1140
gcgccagggc ccctggagca tcatcatcat catcattgat gacggggccc 1189

<210> 147
<211> 374
5 <212> PRT
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [GUA.ectoGP2-SNAPlike-Histag]

<400> 147

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

ES 2 648 899 T3

Ala Ile Glu Lys Leu Asn Asn Gln Thr Lys Thr Ala Val Asn Met Leu
65 70 75 80

Thr His Ser Ile Asn Ser Leu Ile Ser Asp Asn Leu Leu Met Arg Asn
85 90 95

Lys Leu Lys Glu Ile Leu Lys Val Pro Tyr Cys Asn Tyr Thr Arg Phe
100 105 110

Trp Tyr Ile Asn His Thr Lys Ser Gly Glu His Ser Leu Pro Arg Cys
115 120 125

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

Glu Trp Ile Leu Glu Ser Asp His Leu Ile Ala Glu Met Leu Ser Lys
145 150 155 160

Glu Tyr Gln Asp Arg Gln Gly Lys Thr Pro Arg Pro His Gly Gly Gly
165 170 175

Ser Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly
180 185 190

Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu
195 200 205

Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala Pro
210 215 220

Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr Ala Trp
225 230 235 240

Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val
245 250 255

Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln
260 265 270

Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser
275 280 285

Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr Ala Ala
290 295 300

Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys
305 310 315 320

ES 2 648 899 T3

His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu Gly Gly
 325 330 335

Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly
 340 345 350

Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser Leu Glu
 355 360 365

His His His His His His
 370

5 <210> 148
 <211> 1189
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica ssBiP-Gliproteína GP1 del virus de Sabia-SNAPlike-Histag para la expresión en células S2

<400> 148

atgaagttat	gcatattact	ggccgtcgtg	gcctttgttg	gcctctcgct	cgggagatct	60
ggcatcttct	cctggacgat	cacggatgca	gtgggcaacg	acatgcctgg	tggttactgt	120
ctggagagat	ggatgctggt	gacgtcggat	cttaagtgct	tcggcaacac	ggcactggcg	180
aagttaaac	tcgaccacga	ttcggagttc	tgtgacatgt	tgaagttggt	cgagttcaac	240
aagaaggcga	tcgagacatt	gaacgacaac	acgaagaaca	aggtgaactt	gctgaccac	300
tcgatcaacg	cattgatctc	cgacaacttg	ctgatgaaga	accgactcaa	ggaattgttg	360
aacacgcctt	actgtaacta	caccaagttc	tggtatgtca	accacacggc	atccggggag	420
cactcattgc	cacggtgctg	gctggttagg	aacaatagct	acttgaacga	gagtgagttc	480
aggaatgatt	ggatcatcga	gagtgatcac	ttgttgtccg	agatgctcaa	caaggaatac	540
atcgatagac	agggcaagac	gccgcggccg	cacggcggag	gtagcaaaga	ctgcgaaatg	600
aagcgcacca	ccctggatag	ccctctgggc	aagctggaac	tgtctgggtg	cgaacagggc	660
ctgcacgaga	tcaagctgct	gggcaaagga	acatctgccg	ccgacgccgt	ggaagtgcct	720
gccccagccg	ccgtgctggg	cggaccagag	ccactgatgc	aggccaccgc	ctggctcaac	780
gcctactttc	accagcctga	ggccatcgag	gagttccctg	tgccagccct	gcaccacca	840
gtgttccagc	aggagagctt	taccgccag	gtgctgtgga	aactgctgaa	agtggatgaag	900
ttcggagagg	tcatcagcta	ccagcagctg	gccgcctgg	ccggcaatcc	cgccgccacc	960
gccgcctgta	aaaccgcctt	gagcggaaat	cccgtgccca	ttctgatccc	ctgccaccgg	1020
gtggtgtcta	gctctggcgc	cgtggggggc	tacgagggcg	ggctcgccgt	gaaagagtgg	1080
ctgctggccc	acgagggcca	cagactgggc	aagcctgggc	tgggtcctgc	aggtataggc	1140
gcgccagggg	ccctggagca	tcatcatcat	catcattgat	gacggggccc		1189

20 <210> 149
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> artificial

ES 2 648 899 T3

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión [SAB.ectoGP2-SNAPlike-Histag]

<400> 149

5

```

Arg Ser Gly Ile Phe Ser Trp Thr Ile Thr Asp Ala Val Gly Asn Asp
1          5          10          15

Met Pro Gly Gly Tyr Cys Leu Glu Arg Trp Met Leu Val Thr Ser Asp
20          25          30

Leu Lys Cys Phe Gly Asn Thr Ala Leu Ala Lys Cys Asn Leu Asp His
35          40          45

Asp Ser Glu Phe Cys Asp Met Leu Lys Leu Phe Glu Phe Asn Lys Lys
50          55          60

Ala Ile Glu Thr Leu Asn Asp Asn Thr Lys Asn Lys Val Asn Leu Leu
65          70          75          80

Thr His Ser Ile Asn Ala Leu Ile Ser Asp Asn Leu Leu Met Lys Asn
85          90          95

Arg Leu Lys Glu Leu Leu Asn Thr Pro Tyr Cys Asn Tyr Thr Lys Phe
100         105         110

Trp Tyr Val Asn His Thr Ala Ser Gly Glu His Ser Leu Pro Arg Cys
115         120         125

Trp Leu Val Arg Asn Asn Ser Tyr Leu Asn Glu Ser Glu Phe Arg Asn
130         135         140

Asp Trp Ile Ile Glu Ser Asp His Leu Leu Ser Glu Met Leu Asn Lys
145         150         155         160

Glu Tyr Ile Asp Arg Gln Gly Lys Thr Pro Arg Pro His Gly Gly Gly
165         170         175

Ser Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly
180         185         190
    
```

ES 2 648 899 T3

Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu
 195 200 205

Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala Pro
 210 215 220

Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr Ala Trp
 225 230 235 240

Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val
 245 250 255

Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln
 260 265 270

Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser
 275 280 285

Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr Ala Ala
 290 295 300

Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys
 305 310 315 320

His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu Gly Gly
 325 330 335

Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly
 340 345 350

Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser Leu Glu
 355 360 365

His His His His His His
 370

<210> 150
 <211> 2774
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de ADN que codifica BiPlike- SNAPlike-proTEV1-proteína C del virus de la hepatitis E-
 proTEV2-Histag para la expresión en células S2

<400> 150

atgaaactat gtattctact tgcagttggt gcgttcgtag gattgtcctt acctacagct 60

ctggcaagat ctgacaaaga ctgcgaaatg aaaagaacta cattggattc accacttggg 120

15

ES 2 648 899 T3

aagttggaac tgagtggatg cgagcaagga ttgcatgaaa ttaagctact gggaaaagga 180
acttctgctg ctgatgcagt tgaagttcca gcaccagcag ctgttcttgg aggtcctgag 240
cccctcatgc aagccacagc ctggcttaac gcatatttcc accagcctga ggccattgag 300
gaatttocag tccccgcctc tcaccatcct gtgtttcagc aggagagctt caccgcagcag 360
gtcctgtgga aattgctgaa ggtggtcaag tttggtgaag tgatttcata tcagcaactt 420
gctgcattgg ccggaaccc cgcagctaca gctgccgtga aaactgctct cagcggaaat 480
cctgtgocca tctgatccc ttgtcacaga gtcgtttcat ctccggagc tgtaggtggc 540
tatgaaggag gactggcagt taaggagtgg ctgctggctc atgaaggcca tagacttggg 600
aagcctgggc tgggtcctgc tggatataggc gcgccagggc ccctaggtgg cggatccgaa 660
aacctgtact tccagagcga tatcaataac atgttctttt gctctgtgca tggagatgcc 720
accatgcgct ctccggcttt tctgtttttg ttctctgtgt ttctgcctat gctgcccgcg 780
ccaccggccg gtcagccgtc tggccgccgc cgcggggcgc gcagcggcgg tgccggcggg 840
ggtttctggg gtgaccggat tgattctcag cccttcgccc tcccctatat tcatccaacc 900
aacccttcg cacctgacat tccagccgca gccggggctg gagctcgcgc tcggcagcca 960
gccccccac tcggctccgc ttggcgtgac caatcccagc gccccccac ttccgcccgt 1020
cgtcgatctg cccagctgg ggcttcgccc ctgactgctg tggccccgc ccccgatact 1080
gttctctgtc ccgatgtcga ttctcgcggc gctatattac gccgccagta taatttatca 1140
acatccccgc taacatctac tattgccact ggtactaacc ttgttctata tgctgctccg 1200
ctgagccctt tgcttccgct ccaagatgga actaacctc acattatggc cactgaagca 1260
tcaaattatg cccagtagcg tgttgtccgc gctaccatcc ggtaccgtcc gcttgtgccc 1320
aacgtgtcg gcggatagc tatactctac tctttctggc ctgagacaac tactaccccg 1380
acatctgtgg acatgaactc tatcacctcc acggatgtcc gaatccttgt ccagcctggt 1440
attgcttcag aacttgtgat cccagtgag cgctgcatt atcgtaacca aggctggcgc 1500
tctgttgaga cctctggtgt tgcggaggag gaggcgacct ccggccttgt catgctttgc 1560
atccacggat cacctgtaa ttcttacacc aatacgctt atactggtgc ccttggcttg 1620
cttgatttcg cactcgagct cgagttccgc aatttgacac ctggtaacac gaacacacgt 1680
gttcccgct actcgagtag tgccgccac aagctacgcc gagggcctga tggcactgct 1740
gagttaacta cgactgctgc tacacgcttt atgaaggacc ttcattttac agggactaat 1800
ggagtgggtg aagtcggctg tggatatagc ctaactctgt tcaaccttgc tgatacgctt 1860
ctcggcgggc tcccgacaga attgatttcg tcggctggtg gtcagctatt ttattctcgc 1920
cccgtcgtct cagccaatgg cgagccgacg gtgaagctct acacttcagt cgagaacgct 1980

ES 2 648 899 T3

cagcaggata agggatatagc tatcccacat gatattgac ttggtgagtc ccgtggtgtc 2040
 attcaggatt atgataacca acatgagcag gatcgtccca ccccttctcc tgctccctct 2100
 cggccttttt ctgtccttcg tgctaatagat gtgctatggc tttcacttac agcagctgag 2160
 tatgatcaga ctacctatgg ctctctact aatcccatgt atgtctctga taccgtgaca 2220
 tttgtcaatg ttgctactgg tgcccagggg gtatctcgtc ctctggactg gtctaaagtc 2280
 acccttgatg ggcgccact tatgactatc cagcagtatt ctaagacttt ctttgttctg 2340
 cccctcogtg gcaagctctc cttctgggag gccggtagca ctaaggccgg ctacccttat 2400
 aattataata ctactgccag tgaccagatt ttaattgaga atgcagctgg tcaccgtgta 2460
 tgcactctca cctacactac taatcttggg tctggccctg tttctatttc tgctgtcggc 2520
 gtcctcgcac ctactctgc gttggccgct ttagaggaca ctgttgacta tcctgctcgt 2580
 gctcacactt ttgatgatt ctgccctgag tgccgtacac tcggccttca gggttgtgct 2640
 ttccaatcaa ctggttctga gctacagcgt cttaaaatga aggtgggtaa aactcgggag 2700
 taccggggag agaatctata tttcaaggg cccggcggag gtagtcacca tcatcaccat 2760
 cactaatgac cggt 2774

<210> 151
 <211> 899
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aa de proteína de fusión [SNAPlike-proTEV1-HEV.C-proTEV2-Histag]

10

<400> 151

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

ES 2 648 899 T3

Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val
 100 105 110

Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr
 115 120 125

Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile
 130 135 140

Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu
 145 150 155 160

Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg
 165 170 175

Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Pro Ala Gly Ile Gly Ala Pro Gly Ser
 180 185 190

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

Met Phe Phe Cys Ser Val His Gly Asp Ala Thr Met Arg Ser Arg Ala
 210 215 220

Phe Leu Phe Leu Phe Leu Val Phe Leu Pro Met Leu Pro Ala Pro Pro
 225 230 235 240

Ala Gly Gln Pro Ser Gly Arg Arg Arg Gly Arg Arg Ser Gly Gly Ala
 245 250 255

Gly Gly Gly Phe Trp Gly Asp Arg Ile Asp Ser Gln Pro Phe Ala Leu
 260 265 270

Pro Tyr Ile His Pro Thr Asn Pro Phe Ala Pro Asp Ile Pro Ala Ala
 275 280 285

Ala Gly Ala Gly Ala Arg Pro Arg Gln Pro Ala Arg Pro Leu Gly Ser
 290 295 300

Ala Trp Arg Asp Gln Ser Gln Arg Pro Ala Thr Ser Ala Arg Arg Arg
 305 310 315 320

Ser Ala Pro Ala Gly Ala Ser Pro Leu Thr Ala Val Ala Pro Ala Pro
 325 330 335

Asp Thr Val Pro Val Pro Asp Val Asp Ser Arg Gly Ala Ile Leu Arg
 340 345 350

ES 2 648 899 T3

Arg Gln Tyr Asn Leu Ser Thr Ser Pro Leu Thr Ser Thr Ile Ala Thr
 355 360 365
 Gly Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala Ala Pro Leu Ser Pro Leu Leu Pro
 370 375 380
 Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His Ile Met Ala Thr Glu Ala Ser Asn
 385 390 395 400
 Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Val Arg Ala Thr Ile Arg Tyr Arg Pro Leu
 405 410 415
 Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr Ala Ile Ser Ile Ser Phe Trp Pro
 420 425 430
 Gln Thr Thr Thr Thr Pro Thr Ser Val Asp Met Asn Ser Ile Thr Ser
 435 440 445
 Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro Gly Ile Ala Ser Glu Leu Val
 450 455 460
 Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr Arg Asn Gln Gly Trp Arg Ser Val
 465 470 475 480
 Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Glu Ala Thr Ser Gly Leu Val Met
 485 490 495
 Leu Cys Ile His Gly Ser Pro Val Asn Ser Tyr Thr Asn Thr Pro Tyr
 500 505 510
 Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp Phe Ala Leu Glu Leu Glu Phe Arg
 515 520 525
 Asn Leu Thr Pro Gly Asn Thr Asn Thr Arg Val Ser Arg Tyr Ser Ser
 530 535 540
 Ser Ala Arg His Lys Leu Arg Arg Gly Pro Asp Gly Thr Ala Glu Leu
 545 550 555 560
 Thr Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe Met Lys Asp Leu His Phe Thr Gly
 565 570 575
 Thr Asn Gly Val Gly Glu Val Gly Arg Gly Ile Ala Leu Thr Leu Phe
 580 585 590
 Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly Leu Pro Thr Glu Leu Ile Ser

ES 2 648 899 T3

595					600					605					
Ser	Ala	Gly	Gly	Gln	Leu	Phe	Tyr	Ser	Arg	Pro	Val	Val	Ser	Ala	Asn
610						615					620				
Gly	Glu	Pro	Thr	Val	Lys	Leu	Tyr	Thr	Ser	Val	Glu	Asn	Ala	Gln	Gln
625					630					635					640
Asp	Lys	Gly	Ile	Ala	Ile	Pro	His	Asp	Ile	Asp	Leu	Gly	Glu	Ser	Arg
				645					650					655	
Val	Val	Ile	Gln	Asp	Tyr	Asp	Asn	Gln	His	Glu	Gln	Asp	Arg	Pro	Thr
			660					665					670		
Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Ser	Arg	Pro	Phe	Ser	Val	Leu	Arg	Ala	Asn	Asp
		675					680					685			
Val	Leu	Trp	Leu	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Glu	Tyr	Asp	Gln	Thr	Thr	Tyr
	690					695					700				
Gly	Ser	Ser	Thr	Asn	Pro	Met	Tyr	Val	Ser	Asp	Thr	Val	Thr	Phe	Val
705					710					715					720
Asn	Val	Ala	Thr	Gly	Ala	Gln	Gly	Val	Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Trp	Ser
				725					730					735	
Lys	Val	Thr	Leu	Asp	Gly	Arg	Pro	Leu	Met	Thr	Ile	Gln	Gln	Tyr	Ser
			740					745					750		
Lys	Thr	Phe	Phe	Val	Leu	Pro	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Ser	Phe	Trp	Glu
		755					760					765			
Ala	Gly	Thr	Thr	Lys	Ala	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Thr	Thr	Ala
	770					775					780				
Ser	Asp	Gln	Ile	Leu	Ile	Glu	Asn	Ala	Ala	Gly	His	Arg	Val	Cys	Ile
785					790					795					800
Ser	Thr	Tyr	Thr	Thr	Asn	Leu	Gly	Ser	Gly	Pro	Val	Ser	Ile	Ser	Ala
				805					810					815	
Val	Gly	Val	Leu	Ala	Pro	His	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Leu	Glu	Asp	Thr
			820					825					830		
Val	Asp	Tyr	Pro	Ala	Arg	Ala	His	Thr	Phe	Asp	Asp	Phe	Cys	Pro	Glu
	835						840					845			

ES 2 648 899 T3

Cys Arg Thr Leu Gly Leu Gln Gly Cys Ala Phe Gln Ser Thr Val Ala
 850 855 860

Glu Leu Gln Arg Leu Lys Met Lys Val Gly Lys Thr Arg Glu Tyr Pro
 865 870 875 880

Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro Gly Gly Gly Ser His His His
 885 890 895

His His His

5 <210> 152
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> ADN que codifica la secuencia BiPlike
 <400> 152

51 atgaaactat gtattctact tgcagttgtt gcgttcgtag gattgcctt a

15 <210> 153
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Aminoácidos de la secuencia de BiPlike
 <400> 153

Met Lys Leu Cys Ile Leu Leu Ala Val Val Ala Phe Val Gly Leu Ser
 1 5 10 15

25 Leu

REIVINDICACIONES

1. Método de ensayo *in vitro* para detectar por lo menos dos anticuerpos diana en una muestra biológica que comprende:

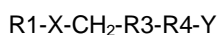
(a) poner en contacto un primer soporte sólido que comprende un sustrato de AGT acoplado covalentemente a una primera proteína de fusión que comprende un polipéptido de AGT que presenta una actividad de O6-alkilguanina-ADN alquiltransferasa y un primer epítipo que es reconocido por un primer anticuerpo diana con la muestra biológica, en el que dicho sustrato de AGT está acoplado covalentemente además a dicho primer soporte sólido;

(b) poner en contacto un segundo soporte sólido que comprende un sustrato de AGT acoplado covalentemente a una segunda proteína de fusión que comprende un polipéptido de AGT que presenta una actividad de O6-alkilguanina-ADN alquiltransferasa y un segundo epítipo que es reconocido por un segundo anticuerpo diana, pero no por dicho primer anticuerpo diana con la muestra biológica, en el que dicho sustrato de AGT está acoplado covalentemente además a dicho segundo soporte sólido y

(c) detectar la presencia o ausencia de los dos anticuerpos diana.

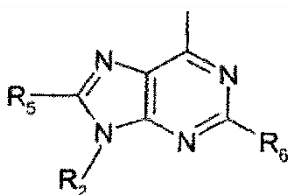
2. Método de ensayo según la reivindicación 1, en el que dicho método se utiliza para detectar por lo menos 5, más preferentemente por lo menos 15 y todavía más preferentemente por lo menos 50 anticuerpos diana en una muestra biológica de un sujeto.

3. Método de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho sustrato de dicho polipéptido de AGT es un derivado de O6-bencilguanina que presenta la fórmula I:



en la que:

- R1 es un grupo heteroaromático que contiene 1 a 5 átomos de nitrógeno, preferentemente un radical purínico de la fórmula:



en la que R5 es hidrógeno, halógeno, por ejemplo cloro o bromo, trifluorometilo, o hidroxilo; R6 es hidrógeno, hidroxilo, o amino no sustituido o sustituido; y R2 es hidrógeno, un alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, o un resto de sacárido;

- X es un átomo de oxígeno o de azufre; preferentemente un átomo de oxígeno;

- R3 es un grupo aromático o heteroaromático, o un grupo alquilo, cicloalquilo o heterociclilo insaturado opcionalmente sustituido, con el doble enlace conectado a CH₂; preferentemente un fenilo, por ejemplo un fenilo sustituido mediante R4 en posición para o meta,

- R4 es un resto enlazador, preferentemente -CH₂-NH-CO-NH-[C₂H₄-O]_n-, en el que n está comprendido entre 1 y 8, preferentemente 2 a 6;

- Y es un grupo reactivo.

4. Método de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichos soportes sólidos se pueden identificar específicamente por su ubicación, tamaño, diámetro, peso, granulometría, y/o marcado específicos.

5. Método de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos soportes sólidos están marcados con un fluorocromo, un cromóforo, un radioisótopo, y/o una etiqueta másica.

6. Método de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dichos soportes sólidos son micropartículas, preferentemente micropartículas magnéticas o micropartículas marcadas internamente con colorantes fluorescentes.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los primer y segundo soportes sólidos se obtienen acoplado covalentemente el polipéptido de AGT comprendido en la proteína de fusión como se define en la reivindicación 1 a unos primer y segundo soportes sólidos funcionalizados, llevando a cabo un método que comprende las etapas de:

- i) activar cada uno de dichos soportes sólidos funcionalizados,
- ii) añadir un sustrato de dicho polipéptido de AGT, suspendiéndose dicho sustrato en un amortiguador que contiene entre 0 y 20% de DMSO, en unas condiciones apropiadas de manera que el sustrato se une covalentemente a dicho soporte, y
- iii) poner en contacto dicho polipéptido de AGT con cada uno de los soportes revestidos con sustrato de la etapa b) en un amortiguador de PBS/DTT, estando el DTT preferentemente a una concentración de 1 mM en el amortiguador de PBS/DTT, en el que las moléculas no unidas se eliminan por lavado tras las etapas ii) y iii).

8. Utilización de un kit que comprende:

- (a) un primer soporte sólido que comprende un sustrato de AGT acoplado covalentemente a una primera proteína de fusión que comprende un polipéptido de AGT que presenta una actividad de O6-alquilguanina-ADN alquiltransferasa y un primer epítipo que es reconocido por un primer anticuerpo diana, en la que dicho sustrato de AGT está acoplado covalentemente además a dicho primer soporte sólido; y
- (b) un segundo soporte sólido que comprende un sustrato de AGT acoplado covalentemente a una segunda proteína de fusión que comprende un polipéptido de AGT que presenta una actividad de O6-alquilguanina-ADN alquiltransferasa y un segundo epítipo que es reconocido por un segundo anticuerpo diana, pero no por dicho primer anticuerpo diana, en la que dicho sustrato de AGT está acoplado covalentemente además a dicho primer soporte sólido,

para detectar por lo menos dos anticuerpos diana en una muestra biológica de un sujeto, preferentemente para diagnosticar por lo menos dos enfermedades diana en un sujeto, en la que dicha enfermedad diana es una infección vírica causada por un virus del papiloma o un virus de ARN de la familia de los *Flaviviridae* (virus del dengue, de la fiebre amarilla, del Nilo Occidental, de la encefalitis japonesa, de la encefalitis transmitida por las garrapatas, de la hepatitis C), los *Togaviridae* (virus de Chikungunya, del río Ross, de Mayaro, de la encefalitis equina occidental, de la encefalitis equina oriental, de la encefalitis equina venezolana), los *Bunyaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, de la fiebre del valle del Rift, de Schmallenberg), los *Caliciviridae* (virus de la hepatitis E), los *Arenaviridae* (Lassa) o los *Filoviridae* (Ébola, Marburgo), una infección bacteriana causada por *Leptospira interrogans*, o una infección causada por *Plasmodium falciparum*.

9. Método *in vitro* para diagnosticar por lo menos una enfermedad diana en un sujeto, conociéndose que dicha enfermedad diana induce la síntesis de por lo menos dos anticuerpos diana en dicho sujeto, que comprende llevar a cabo el método de ensayo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho sujeto se diagnostica que sufre dicha por lo menos una enfermedad diana si la cantidad de dichos por lo menos dos anticuerpos diana es superior a los valores de control.

10. Método de diagnóstico *in vitro* según la reivindicación 9, en el que dicho método se utiliza para diagnosticar por lo menos 5, más preferentemente por lo menos 15 y todavía más preferentemente por lo menos 50 infecciones víricas en dicho sujeto.

11. Método de inmunoensayo de cribado múltiple que utiliza por lo menos 2, 25, 50, 96 soportes sólidos como se define en la reivindicación 1, en el que cada uno de dichos soportes sólidos emite una longitud de onda diferente y distinguible tras la excitación.

12. Método de inmunoensayo de cribado múltiple según la reivindicación 11, que comprende:

- a) poner en contacto una o varias muestras biológicas con por lo menos 2, 25, 50, 96 soportes sólidos como se definen en la reivindicación 1, en el que cada uno de los soportes sólidos emite una longitud de onda diferente y distinguible tras la excitación, y
- b) detectar la presencia o ausencia de anticuerpos diana, estando dichos anticuerpos diana marcados preferentemente con un marcador detectable.

Figura 1

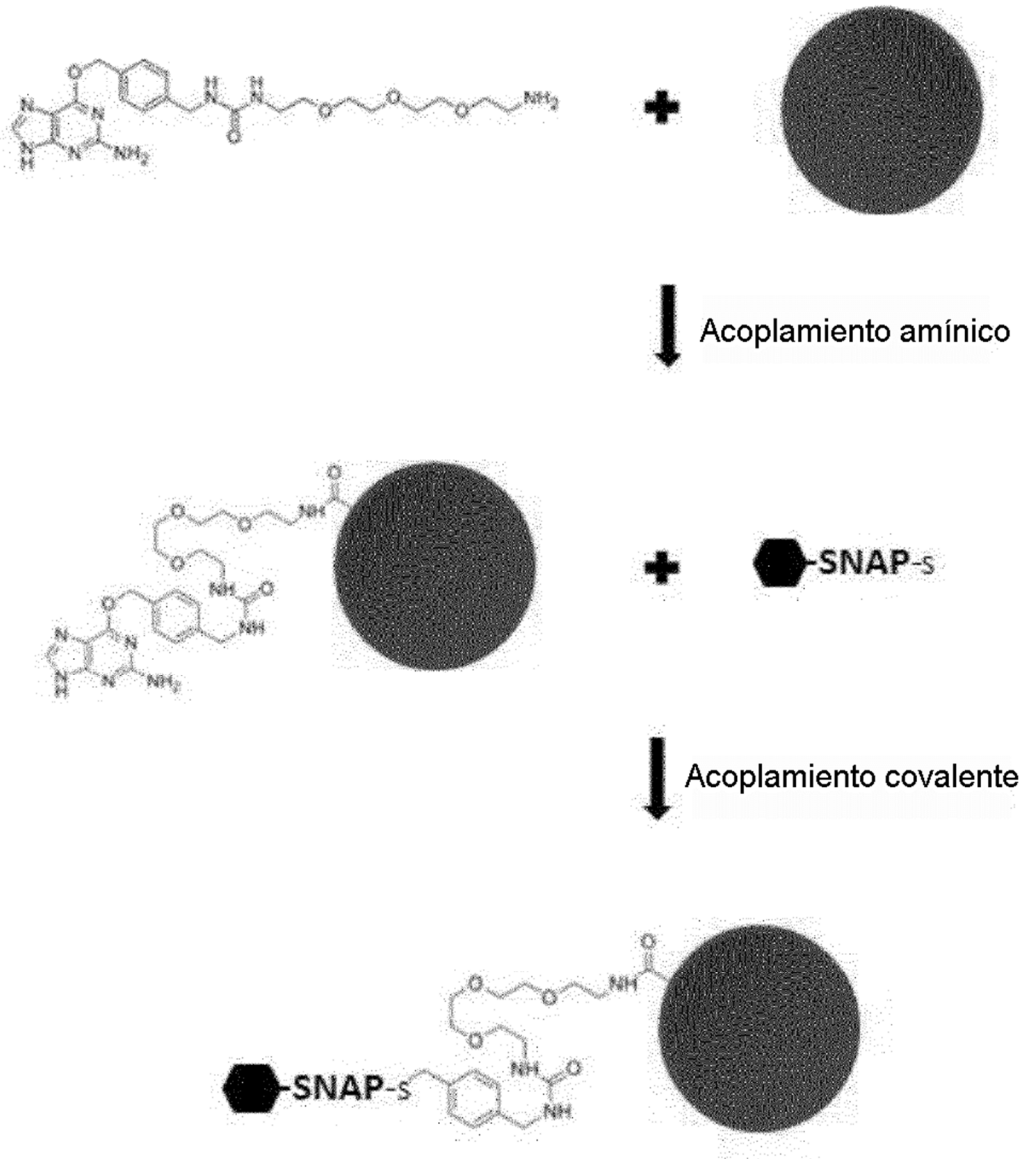


Figura 2

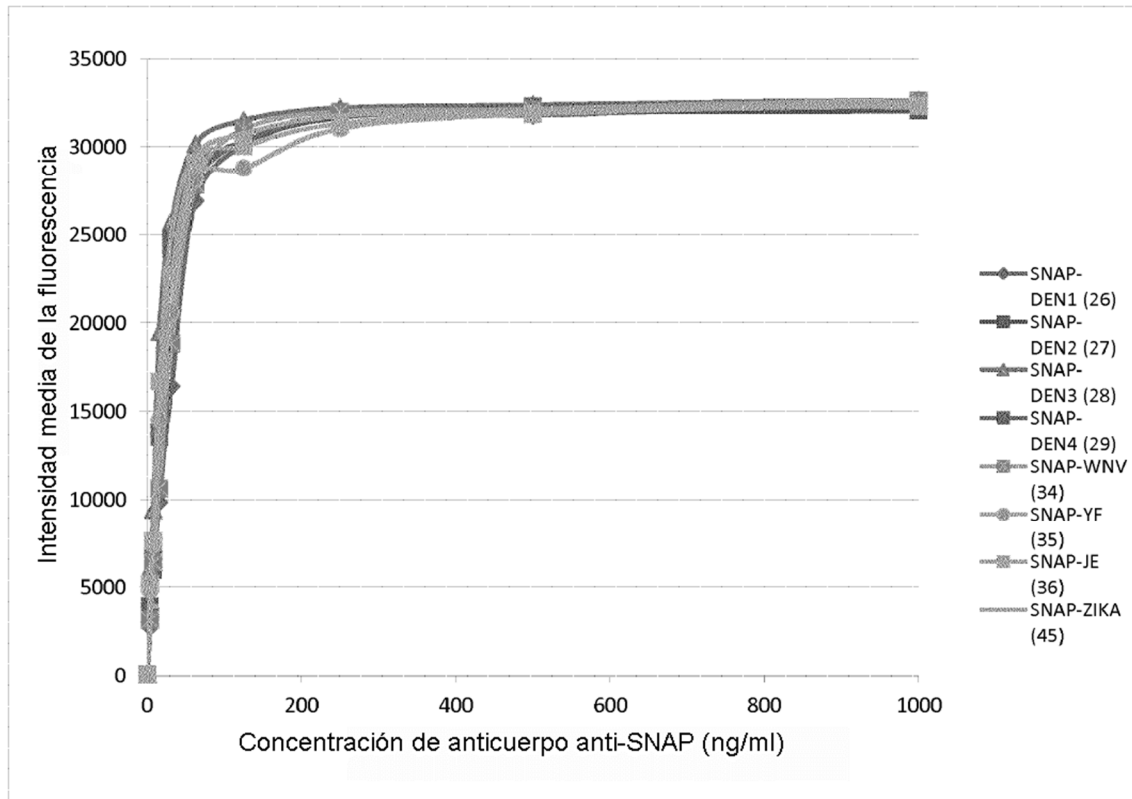


Figura 3

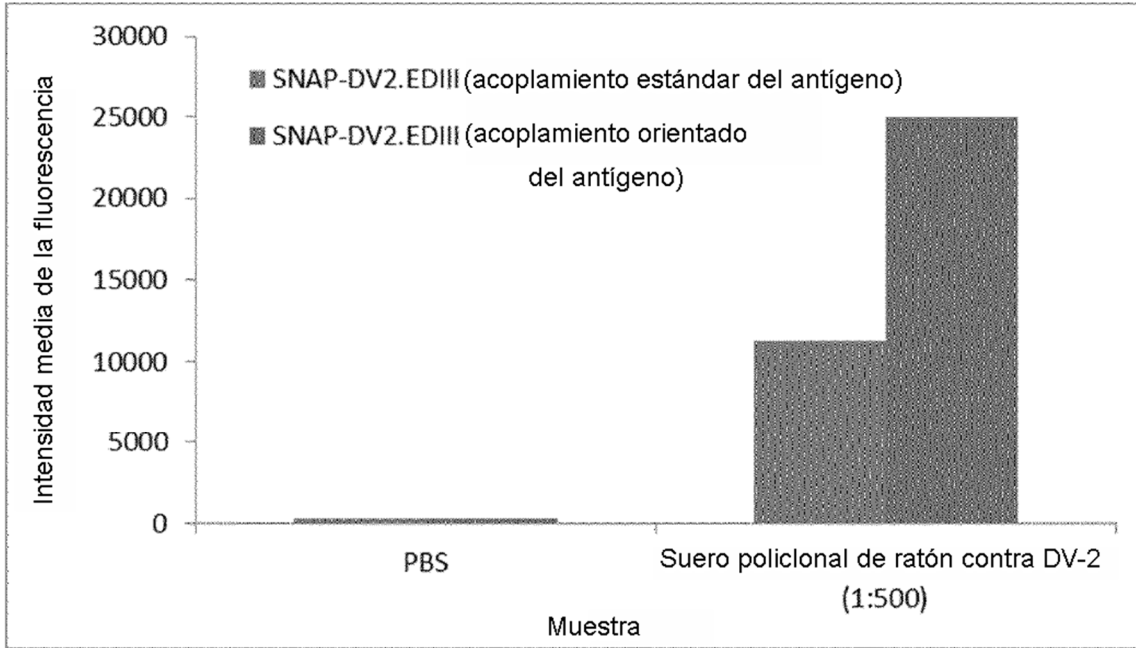


Figura 4

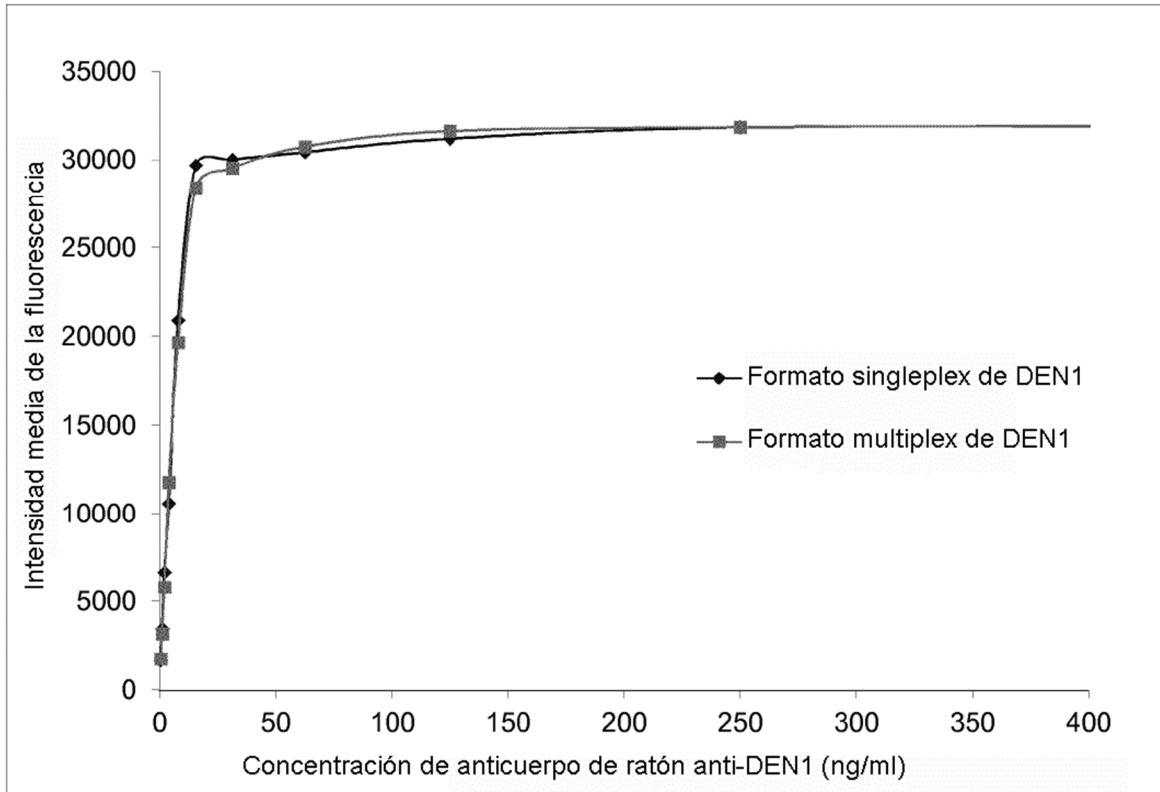


Figura 5

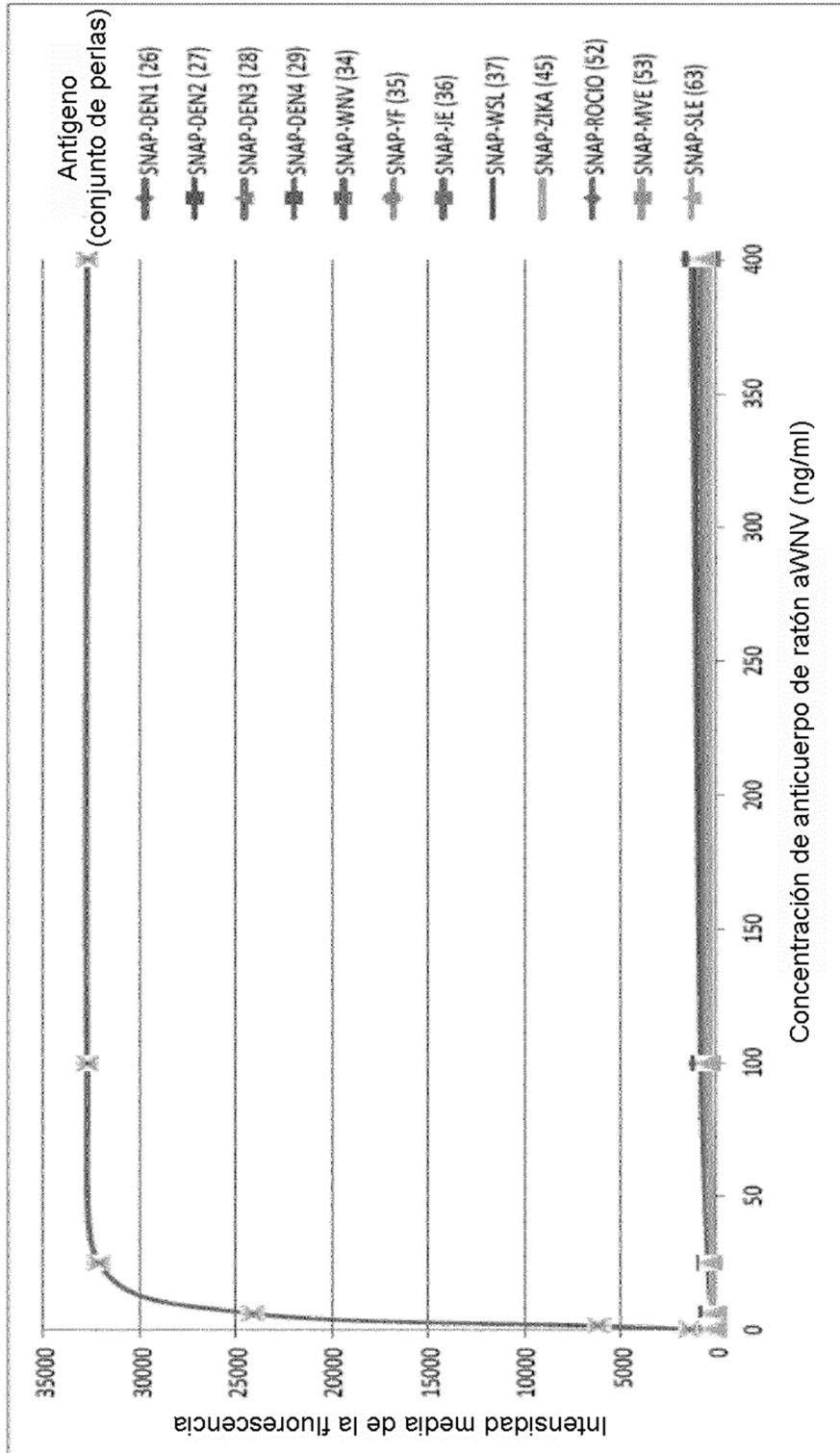
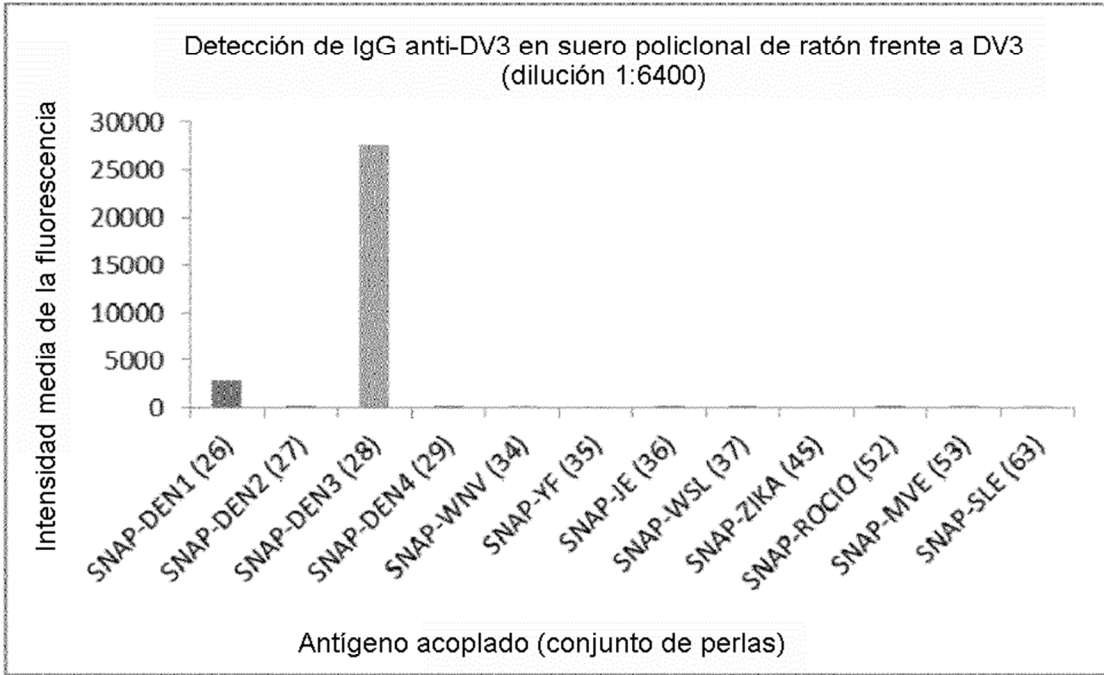


Figura 6

A



B

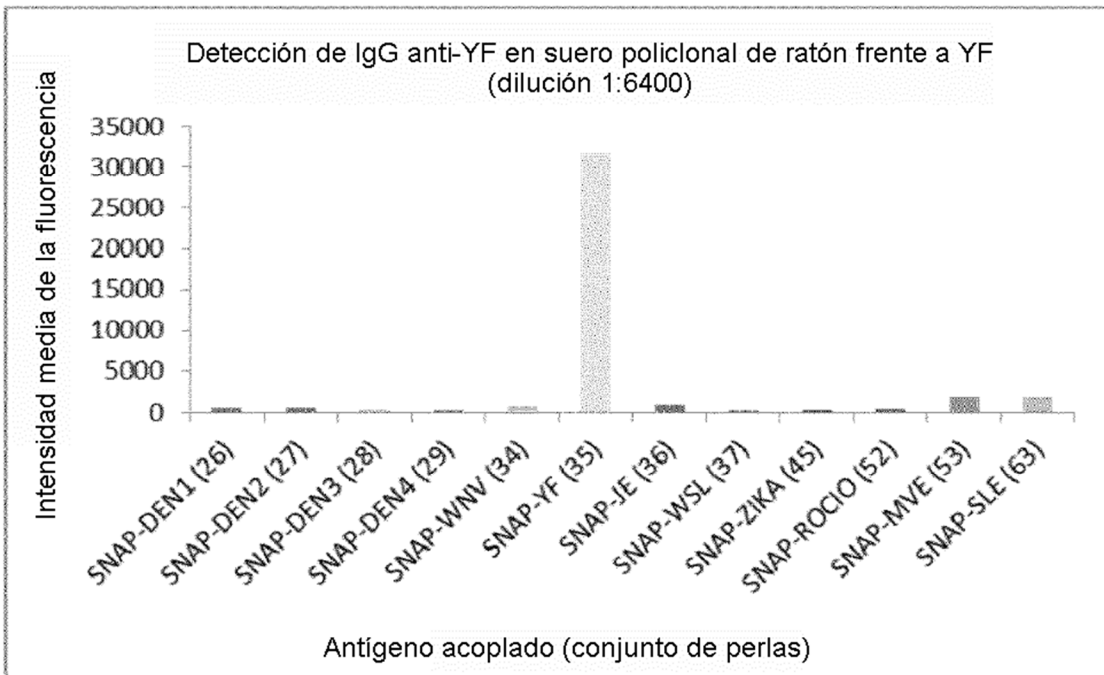
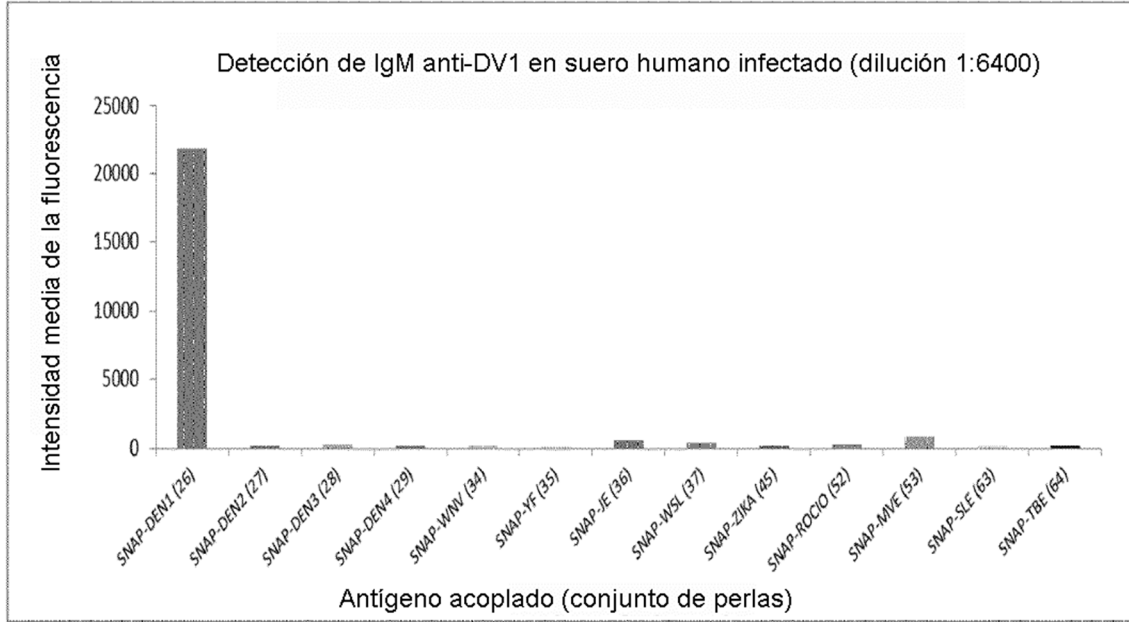


Figura 7

A



B

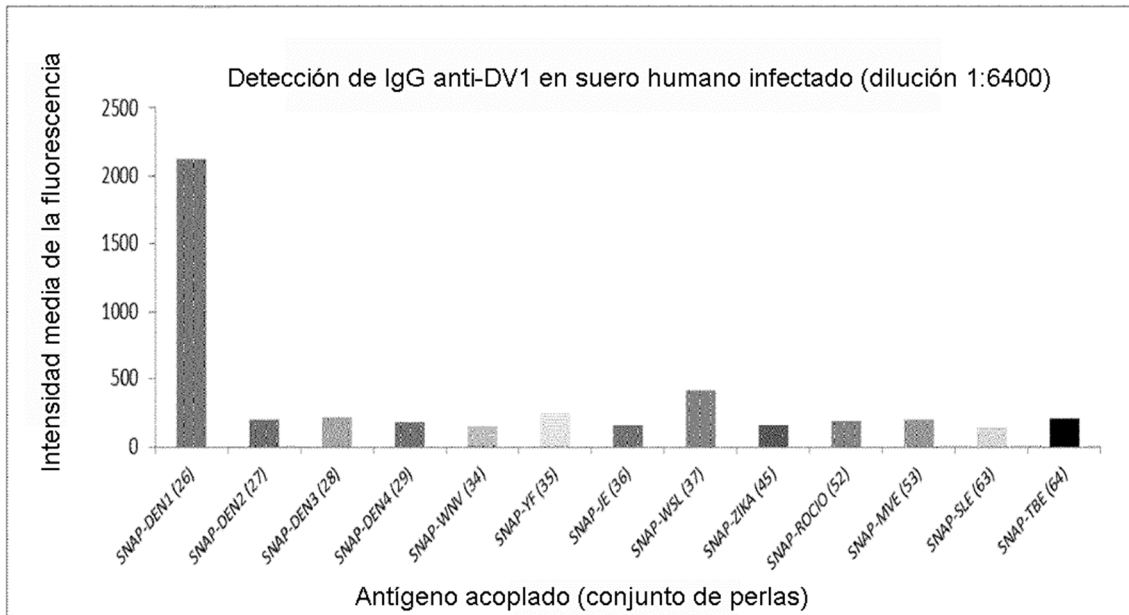


Figura 8

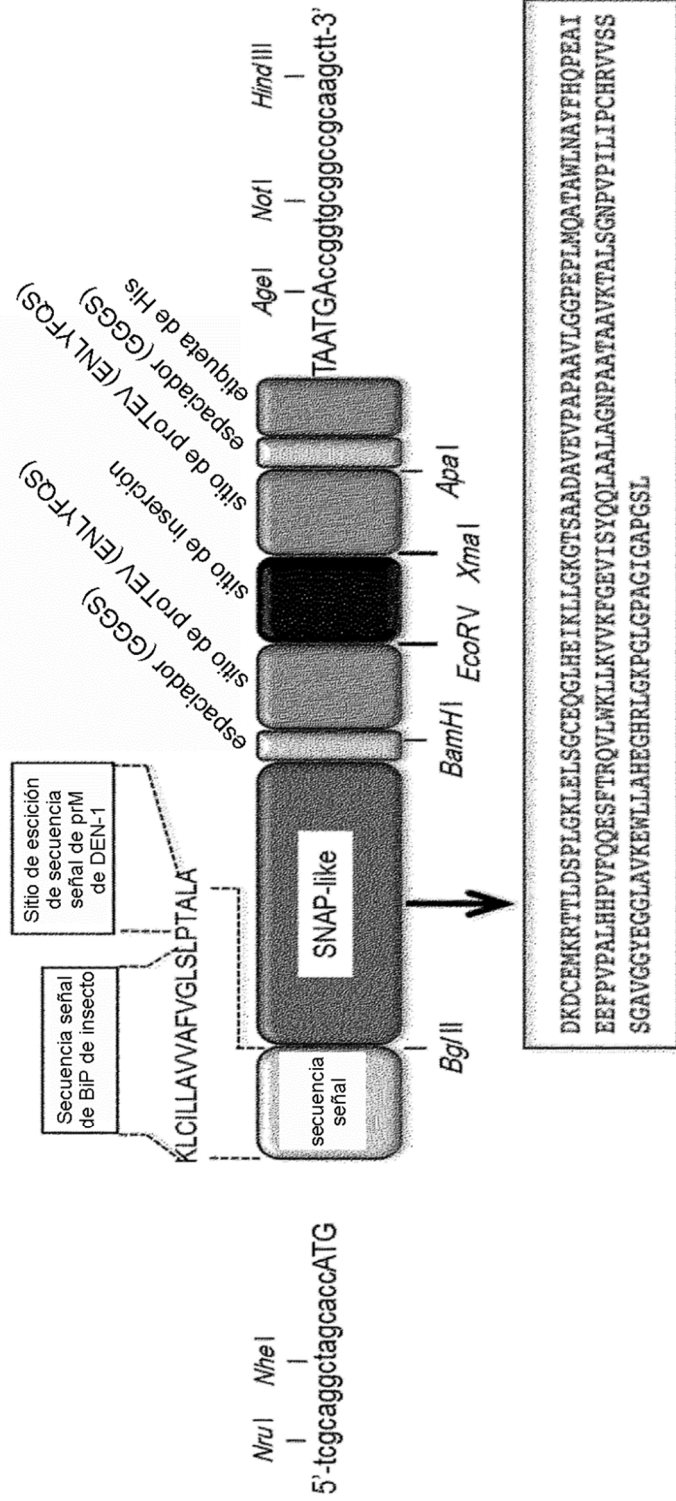


Figura 9

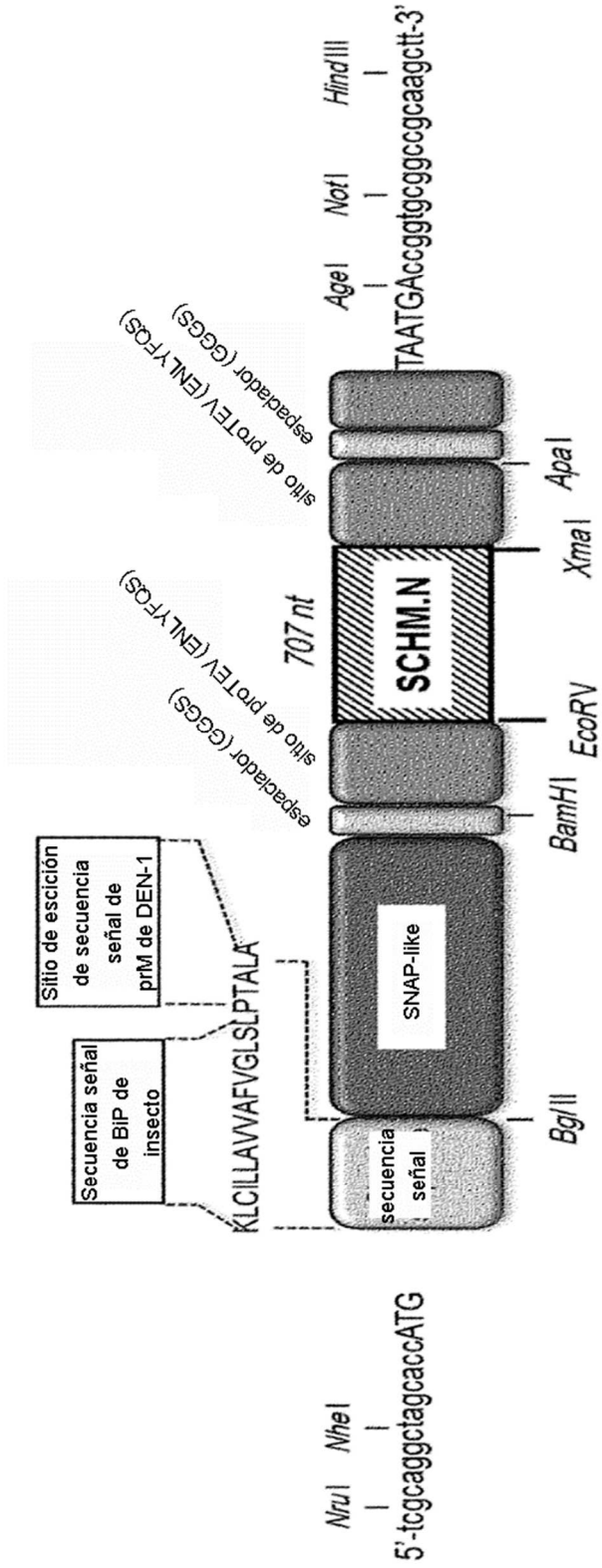


Figura 10A

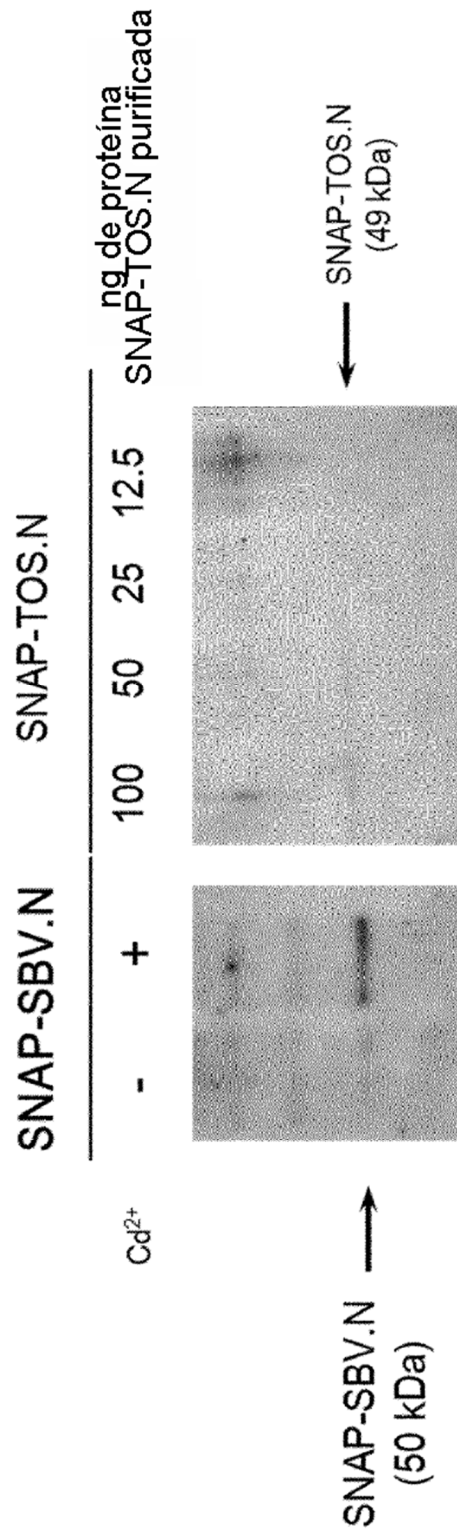
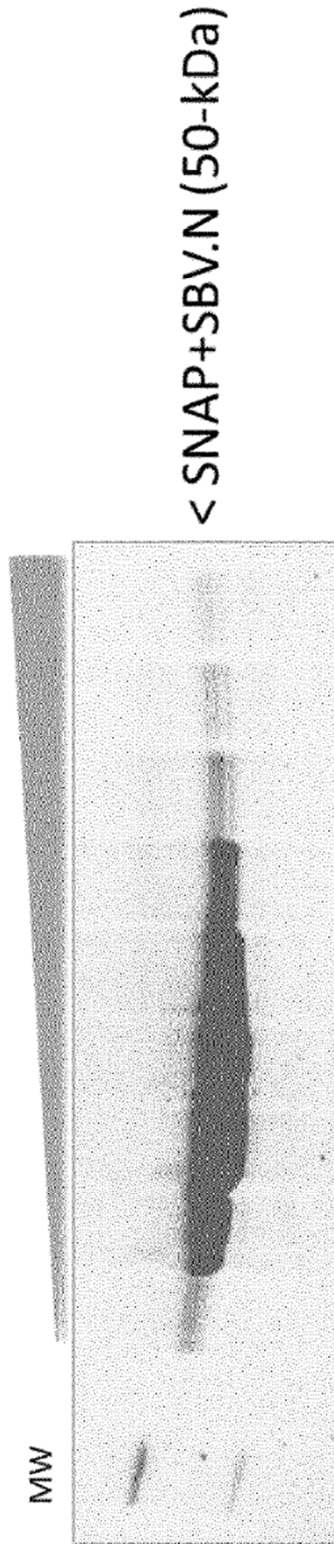
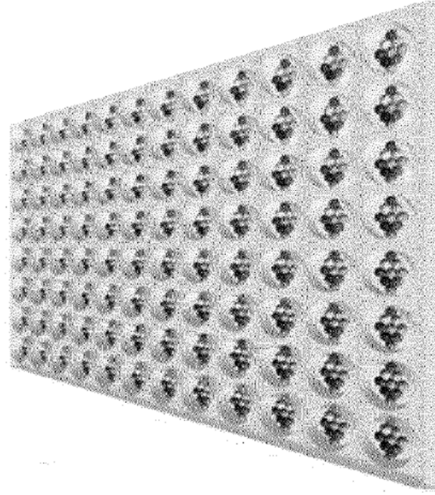
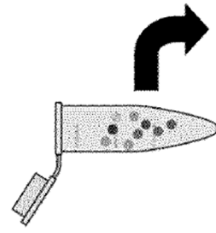
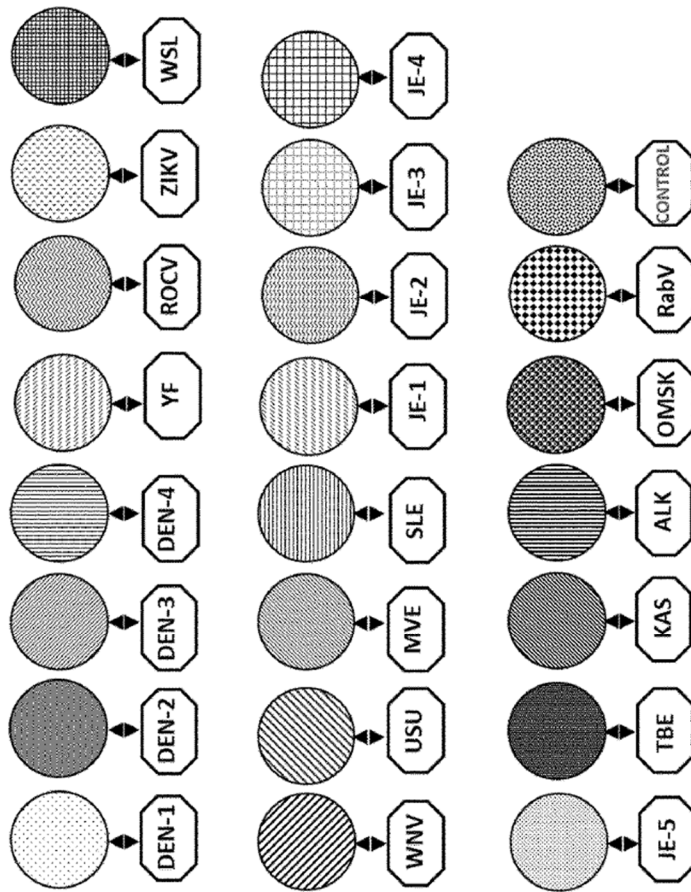


Figura 10B



Ejemplo de panel de microsferas: microsferas acopladas a rEDIII (23-plex)



23 x 1250 perlas / pocillo

Figura 11