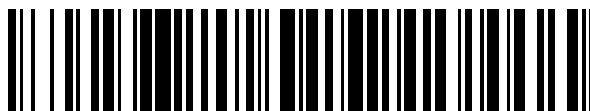


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 153**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)

**A01N 63/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2013 PCT/EP2013/069678**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015 WO15039704**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2013 E 13766513 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 3049516**

54 Título: **Producción de cuerpos de inclusión de virus que incluyen viriones que contienen genomas de diferentes especies de baculovirus que pueden usarse para combatir plagas de insectos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.12.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA (25.0%)  
Edificio del Rectorado Campus de Arrosadia s/n  
(OTRI)  
31006 Pamplona, Navarra, ES;  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (25.0%);  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A.C. (25.0%) y  
ASSOCIATION POUR LA RECHERCHE ET LE  
DÉVELOPPEMENT DES MÉTHODES ET  
PROCESSUS INDUSTRIELS (ARMINES) (25.0%)**

72 Inventor/es:

**CABALLERO MURILLO, PRIMITIVO;  
BEPERET ARIVE, INÉS;  
SIMÓN DE GOÑI, OIHANE;  
WILLIAMS, TREVOR y  
LOPEZ-FERBER, MIGUEL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 693 153 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

Producción de cuerpos de inclusión de virus que incluyen viriones que contienen genomas de diferentes especies de baculovirus que pueden usarse para combatir plagas de insectos

### 5 Campo de la invención

La invención concierne al campo de la producción y uso de insecticidas biológicos para controlar infestaciones de insectos plaga que son susceptibles a especies o cepas concretas de baculovirus. Más concretamente, la invención se refiere a un método para producir viriones derivados de cuerpos de inclusión (ODV) mixtos, de virus mezclados, que comprenden genomas de al menos dos especies de baculovirus diferentes co-incluidos en el mismo virión, y/o para producir cuerpos de inclusión (CIs) de virus en los que al menos uno de dichos viriones derivados de cuerpos de inclusión está incluido, así como a dichos ODVs y CIs, la composición que los comprende y su uso para combatir plagas de insectos.

### Antecedentes de la invención

Los baculovirus (familia Baculoviridae) son patógenos de insectos que representan un importante factor de mortalidad en las poblaciones silvestres de diversas especies de insectos, entre las cuales se encuentran plagas de gran importancia agrícola y médico-veterinario. Los baculovirus se clasifican en cuatro géneros: *Alphabaculovirus* (nucleopoliedrovirus [NPV] de lepidópteros), *Betabaculovirus* (granulovirus [GV] de lepidópteros), *Gammabaculovirus* (NPVs de dípteros) y *Deltabaculovirus* (NPVs de himenópteros). Algunos baculovirus reúnen interesantes características insecticidas, tales como su patogenicidad (medida mediante determinación de la dosis letal), virulencia (tiempo letal) y producción de cuerpos de inclusión (CI), lo que ha conducido a que hayan sido desarrollados como base de bioinsecticidas a escala industrial. Estos productos se están utilizando con éxito en el control de plagas causadas por insectos (Moscardi, 1999). Los ejemplos particularmente exitosos del uso de los *Alphabaculovirus* como insecticidas biológicos incluyen el control de *Anticarsia gemmatalis* en campos de soja (Moscardi, 1999) o de *Helicoverpa armigera* en cultivos de algodón (Sun y Peng, 2007).

Otra característica útil de los baculovirus es su alto nivel de bioseguridad y la muy elevada expresión de genes concretos en sistemas *in vitro* de cultivos celulares, lo que ha propiciado su utilización como vectores de expresión de transgenes en cultivos celulares (Summers y Smith, 1987; van Oers, 2011). La mayor parte de los sistemas de expresión en baculovirus están basados en el uso del MNPV de *Autographa californica* (Rohrmann, 2008). Actualmente, los baculovirus recombinantes (rBac) se utilizan para la producción de cientos de proteínas eucariotas en células de insectos, debido a la ventaja que muchas de ellas tienen de llevar a cabo las modificaciones postraduccionales de forma similar a como ocurre en los animales superiores incluido el hombre (Miller et al., 1997; Ahn et al., 2008). Las proteínas producidas en rBac son utilizadas para realizar estudios funcionales (van Oers, 2011), mejorar las propiedades insecticidas de estos virus (Jiang et al., 2008), en la preparación de vacunas humanas (Harper et al., 2009; Kantoff et al., 2010; Madhan et al., 2010), en el desarrollo de herramientas diagnósticas y más recientemente como potenciales vectores de terapia génica (Hitchman et al., 2011; Kaikkonen et al., 2011).

Los baculovirus son virus de ADN de doble cadena que se replican en el núcleo de las células de insectos. Su genoma circular puede oscilar entre 80 y 180 kpb, dependiendo de la especie de virus, y se encuentra superenrollado y condensado en una nucleocápsida proteica (Rohrmann, 2008). La nucleocápsida (NC) adquiere, durante el ensamblaje y la maduración, una membrana externa, dando lugar a la formación del virión, que es el principal elemento infeccioso de los baculovirus (Fig. 1). El ciclo biológico de los baculovirus lleva implícito dos tipos de viriones que difieren morfológica y funcionalmente: 1) los viriones brotados (BV, *budded virus*) que brotan de las membranas de las células infectadas hacia la cavidad hemocélica de los insectos y se dispersan la infección a otras células de tejidos y órganos susceptibles a la infección en el insecto infectado, y 2) los viriones derivados de cuerpos de inclusión (ODV: *occlusion derived virus*), los cuales quedan incluidos en matrices proteicas que forman el cuerpo de inclusión (CI) que protege a los ODVs en el medio ambiente y facilitan la transmisión de insecto a insecto. Los CIs de los alfabaculovirus comprenden la proteína poliedrina y generalmente llevan incluidos en ellos docenas de ODVs. Estos virus encajan dentro de uno de dos posibles tipos (Fig. 1): (i) nucleopoliedrovirus de nucleocápsida simple (SNPV), que comprenden una sola nucleocápsida en cada ODV, o (ii) nucleopoliedrovirus de múltiples nucleocápsidas (MNPV), que comprenden una o varias nucleocápsidas dentro de cada ODV.

Los baculovirus son capaces de realizar infección productiva solamente en huéspedes artrópodos, la mayoría de los cuales son insectos lepidópteros. No se han observado efectos patogénicos debidos a la ingestión o a la inyección de baculovirus en vertebrados, en moluscos o en plantas. Teniendo en cuenta estas características, los baculovirus son considerados extremadamente seguros para el desarrollo de agentes de control biológico, sin que su utilización implique riesgos importantes para la salud del hombre o de otros animales que no sean su insecto plaga huésped (Burges et al., 1980; Leuschner et al., 2010).

Uno de los problemas que se presentan para la comercialización de productos insecticidas basados en baculovirus es la alta especificidad de estos virus, que a menudo pueden infectar y matar a una sola o unas pocas especies de plagas filogenéticamente próximas (Gröner, 1986). Esto implica que para proteger un cultivo en el cual hay un

complejo de dos o más especies plaga, hace falta invariablemente aplicar CIs de dos o más baculovirus diferentes, simultáneamente o en aplicaciones separadas. La producción de agentes de control biológico para el control de múltiples especies de plagas implica casi invariablemente la producción de múltiples especies de baculovirus en colonias de diferentes especies de insectos, cada una de las cuales conlleva sus propios costes, de forma que el control biológico utilizando múltiples especies de virus no es competitivo con los costes del control cuando se compara con el uso de insecticidas sintéticos de amplio espectro.

Los CIs de baculovirus también se pueden obtener de cultivos de células de insectos susceptibles, tanto en cultivos en monocapa como en cultivos en suspensión. Los baculovirus se pueden usar como vectores de expresión de genes exógenos, obteniéndose así grandes cantidades de proteína recombinante, con relativa facilidad, particularmente a partir de cultivos de insectos, pero también de larvas de insectos (véase la presentación "Baculovirus expression system" ("Sistema de expresión de baculovirus") de Yadav et al., disponible en <http://www.pitt.edu/~super7/32011-33001/32731.ppt> o la revisión de Jarvis DL (2009)).

Hoy día es posible modificar las características insecticidas de los baculovirus mediante la inserción, eliminación o intercambio de genes de otros virus, del genoma del insecto huésped, o de genomas de otros organismos, o genes sintéticos (Inceoglu et al., 2006). El desarrollo de baculovirus con un espectro de huéspedes más amplio ha sido objeto de estudio y, en algunos casos, se ha empleado la modificación genética para influir sobre la capacidad de los virus para iniciar una infección productiva en especies de insectos que naturalmente no son huéspedes permisivos de un baculovirus concreto. En una primera etapa, se extendió el espectro de huéspedes del MNPV de *Autographa californica* mediante recombinación en la región del gen de la helicasa para que se pueda replicar en el gusano de seda *Bombyx mori* (Kondo y Maeda, 1991; Croizier et al., 1992; Kamita y Maeda, 1996; Argaud et al., 1998). Otros trabajos posteriores han aplicado estrategias similares para estudiar los factores genéticos que determinan el espectro de huéspedes de los baculovirus (Watanabe et al., 2010). En general, las conclusiones de estos trabajos indican que los genes implicados en el espectro de huésped no han sido identificados de forma efectiva y siguen sin estar claras las modificaciones necesarias para extender el espectro de huéspedes para que pueda resultar patogénico para un insecto plaga dado.

Una célula de insecto individual puede ser infectada simultáneamente por más de un virus (Garzon y Kurstak, 1972; Arella et al., 1983; Kanthong et al., 2010). En el caso de los baculovirus, la coinfección de insectos con dos genotipos de una misma especie de virus, uno silvestre y el otro modificado genéticamente, puede favorecer la persistencia del genotipo modificado en el ambiente (Hamblin et al. 1990). En este último caso están implicados dos genotipos de la misma especie de virus. Los autores del estudio sugieren que tuvo lugar la co-inclusión de dos genotipos del mismo virus, pero en realidad, sólo demostraron una co-infección.

En la familia de la solicitud WO 88/02030 y la patente de EE.UU. 5071748 (Miller, 1991) se describió un abordaje similar. La invención descrita en dichos documentos se refiere a un cuerpo de inclusión poliédrico (PIB, que es un sinónimo de cuerpo de inclusión, CI) que contiene una mezcla de nucleocápsidas de al menos dos baculovirus genéticamente diferenciables. La composición mixta de PIBs (mPIB) contiene nucleocápsidas de al menos un baculovirus "recombinante", que es incapaz de dirigir la producción de poliedrina en las células de insecto infectadas. Aunque, en principio, la invención era compatible con el uso de genotipo de diferentes especies de baculovirus, el único ejemplo proporcionado describe la infección de células de insecto con dos genotipos de la misma especie, del virus de la poliedrosis nuclear que infecta a *Autographa californica*, AcMNPV (al que se hace referencia en los mencionados documentos de forma abreviada como AcNPV). Uno de los virus utilizados es un virus silvestre y el otro es un virus recombinante, la variante L-1 del AcMNPV, en la que el gen de la poliedrina ha sido reemplazado por un ADNc que codifica el activador del plasmínógeno de tipo tisular de seres humanos. De acuerdo con el Ejemplo 2 del documento WO 88/02030, la infección de orugas de *Heliothis virescens* con los mPIB obtenidos da lugar a una progenie de PIBs que contienen nucleocápsidas de ambos genotipos del AcMNPV. En este caso concreto, la proporción del virus silvestre se incrementó con relación a la proporción original, encontrándose un incremento gradual de la proporción de virus silvestre tras varios pases a través de orugas de la progenie de mPIBs posterior. Los ensayos descritos no mencionan explícitamente si los PIBs obtenidos contienen virions en los que estén co-incluidas nucleocápsidas de ambos genotipos o no; no se verificó la cuestión clave.

Así, en esencia, la información presentada por Hamblin et al. (1990) o Miller (WO 88/02030) indica que ambos genotipos utilizados estaban presentes y persistían en el inóculo experimental, pero no se llegaron a presentar evidencias de una asociación física entre los genotipos; específicamente, de que ambos genotipos estuvieran presentes en un solo CI (PIB) o de que ambos genotipos estuvieran presentes en un único ODV:

Otros autores (López-Ferber et al., 2003) han hallado, en un único virión, co-inclusión de diferentes genotipos de una misma especie pero, como en los casos anteriores, al menos uno de los genotipos era un genotipo defectivo que carecía de genes esenciales para la supervivencia. Por ello, el genotipo defectivo depende de la co-infección con genotipos completos de virus y del uso de productos de genes de estos últimos para su replicación y transmisión. Más recientemente se ha demostrado que diferentes genotipos de una especie de virus pueden presentar un ODV que posteriormente se incluye en un CI (Clavijo et al., 2009), es decir, nucleocápsidas, cada una de ellas conteniendo un genotipo diferenciable de los otros, que pueden ser envueltas de forma conjunta en una membrana para dar lugar a ODVs de genotipo mixto.

La co-infección del mismo insecto por dos especies diferentes de baculovirus ha sido descrita en experimentos que implican el MNPV de *Autographa californica* (AcMNPV) y el MNPV de *Spodoptera exigua* (SeMNPV) (Yanase et al., 1998). Este estudio concluyó que uno de los virus no se replicaba y no se observó la generación de recombinantes dentro del insecto infectado. De forma similar, en estudios con cultivos de células, se ha informado de co-infecciones por dos especies diferentes de baculovirus, principalmente en términos de las implicaciones patológicas para las células y para cada uno de los virus implicados (McClintock & Dougherty 1987; Salem et al., 2012).

Un trabajo posterior realizado por Simón *et al.* (2004) ha demostrado que, en ciertas condiciones, dos especies diferentes de nucleopoliedrovirus (el MNPV de *S. exigua* y el MNPV de *S. frugiperda*) pueden interactuar para facilitar la co-infección de larvas de *S. frugiperda* las cuales no son permisivas al MNPV de *S. exigua* cuando se inoculan solas. Sin embargo, en este estudio no se presentaron evidencias de que ambos virus se pudieran replicar simultáneamente en la misma célula o de que la co-infección mediante estos virus pudiera tener como resultados ODVs mixtos con virus mezclados u CIs mixtos con virus mezclados co-incluidos.

Por tanto, la técnica anterior, tal como el trabajo comunicado por Yanase y colaboradores (Yanase et al., 1998), indica que baculovirus pertenecientes a diferentes podrían co-infectar un mismo insecto, pero no se ha presentado ninguna evidencia de la producción de ODVs mixtos que contengan nucleocápsidas de ambas especies, que estén incluidos en un mismo CI. Sin embargo, sería útil preparar composiciones insecticidas basadas en baculovirus que contuvieran más de una especie diferente, que pudieran utilizarse en cultivos que son susceptibles de ser infestadas por más de una especie de insectos que muestran una susceptibilidad variable a diferentes genotipos del mismo baculovirus, con el fin de evitar aplicaciones por separado de insecticida y combatir las plagas de insectos, particularmente cuando más de una especie de insecto está presente. Es más, tales composiciones deberían producirse usando un método que permita que las composiciones sean competitivas con respecto a los costes asociados al uso de un insecticida sintético de amplio espectro. Preferiblemente, el método de producción debería evitar la producción de múltiples especies de baculovirus en colonias de insectos diferentes, cada una de las cuales conlleva su propio coste.

La presente invención proporciona una solución a este problema.

### **Compendio de la invención**

La presente invención se basa en las evidencias divulgadas en la presente solicitud, de que dos nucleopoliedrovirus múltiples filogenéticamente próximos (por ejemplo, SeMNPV y SfMNPV), así como dos nucleopoliedrovirus múltiples poco relacionados (como, por ejemplo, AcMNPV y SfMNPV), pueden co-infectar y producir cada uno de ellos una infección productiva en una célula concreta de insecto. Esto da como resultado ODVs mixtos con virus mezclados que están incluidos en CIs. Los CIs de virus mezclados tienen un fenotipo de espectro de huésped extendido y se pueden utilizar para combatir plagas diana utilizando un único inóculo de CIs.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir viriones derivados de cuerpos de inclusión de virus (ODV) mixtos que comprenden genomas de al menos dos especies de baculovirus diferentes co-envueltos en el mismo virión, y/o para producir cuerpos de inclusión de virus en los que está incluido al menos uno de dichos viriones derivados de cuerpos de inclusión de virus mixto, en el que todos los baculovirus que infectan son nucleopoliedrovirus múltiples. Preferiblemente, al menos dos de los diferentes genomas presentes en el mismo ODV son genomas que son cada uno de ellos capaces de dar lugar a una partícula infectiva de baculovirus, capaz de producir un ciclo viral completo en una célula, sin necesidad de co-infección con un segundo baculovirus que comprende un genoma diferente. Los cuerpos de inclusión de virus (CIs) se producen mediante las etapas de:

- a. co-infectar larvas o células en cultivo de una especie de insecto con los genomas de baculovirus que deben quedar co-envueltos en al menos uno de los viriones derivados de cuerpos de inclusión producidos, en donde cada genoma de baculovirus pertenece a una especie concreta que puede estar en el mismo o en un ODV diferente que la otra;
- b. criar las larvas infectadas o cultivar las células hasta que se produzca la muerte por poliedrosis;
- c. aislar los CIs producidos a partir de las larvas o de las células cultivadas hasta su muerte;

en donde las células o larvas son susceptibles de ser infectadas por uno cualquiera de los baculovirus cuyos genomas deben quedar co-envueltos en al menos uno de los viriones derivados de cuerpos de inclusión producidos.

Otro aspecto de la presente invención es un virión derivado de cuerpo de inclusión (ODV) mixto que comprende genomas de al menos dos especies de baculovirus diferentes co-envueltos en el mismo virión, en el que los genomas son genomas de nucleopoliedrovirus múltiples: un ODV de la presente invención.

Análogamente, es también un aspecto de la presente invención un cuerpo de inclusión (CI) mixto, que tiene incluido al menos un ODV que comprende genomas de al menos dos especies de baculovirus diferentes co-envueltas en el mismo virión, en el que los genomas son genomas de nucleopoliedrovirus múltiples: un CI mixto de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención es una composición que comprende al menos un ODV de la presente invención y/o al menos un CI de la presente invención. Tal composición es una composición de la presente invención.

5 También es un aspecto de la presente invención el uso de los CIs de la presente invención y/o de una composición de la presente invención para combatir plagas de insectos.

**Breve descripción de las figuras**

La Fig. 1 muestra la estructura microscópica de nucleopoliedrovirus.

10 - El panel a (parte superior de la figura) muestra una fotografía tomada al microscopio de cuerpos de inclusión (CI), cuya representación esquemática individual se muestra en la parte derecha de la fotografía. En la parte derecha del panel se representan dos cuerpos de inclusión, mostrando su interior, en el que los círculos y los rectángulos representan ODVs (viriones derivados de cuerpos de inclusión).

15 - El panel b (parte inferior de la figura) representa dos tipos diferentes de ODVs. El de la izquierda, que corresponde a un nucleopoliedrovirus simple (SNPV) contiene una única nucleocápsida (NC), formada por el ADN genómico (representado como una hélice) y las proteínas asociadas. El de la derecha, que corresponde un nucleopoliedrovirus múltiple (MNPV) contiene una o más de una nucleocápsida (NC) (cada una de las cuales se muestra como un rectángulo con una hélice en su interior) por cada ODV.

Fig. 2. Perfiles de endonucleasas de restricción generados tras el tratamiento de ADN genómico de la variante SeUS2-A (carril 1) del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* y de la variante SfNIC-C (2) del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* con *Pst*I. El marcador molecular (M) es Hyperladder I (Bioline).

20 Fig. 3. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de ADN genómico viral tras el tratamiento con *Pst*I del ADN extraído de CIs y electroforesis. Carriles:

- M. marcador de peso molecular Hyperladder I (Bioline)
- Carril 1: Perfil de restricción de *Pst*I de ADN extraído de CIs de SeUS2-A.
- Carril 2: Perfil de restricción de *Pst*I de ADN extraído de CIs de SfNIC-C
- 25 - Carril 3: Perfil de restricción de *Pst*I de ADN extraído de CIs producidos tras la coinfección de larvas de *S. exigua* con ODVs de SeUS2-A y SfNIC-C. Sólo se aprecia el perfil de SeUS2-A, sin embargo mediante amplificación por PCR se confirmó la presencia de ADN de SfNIC-C (los datos mostrados son de la repetición #1).
- Carril 4: Perfil de restricción de *Pst*I de ADN extraído de CIs producidos tras la inoculación de larvas de segundo estadio de *S. frugiperda* utilizando CIs producidos durante la coinfección con ODVs de SeUS2-A y SfNIC-C.
- 30 - Carril 5: Igual que el carril 3, pero los datos mostrados son de la repetición #2.
- Carril 6: Igual que el carril 4, pero los datos mostrados son de la repetición #2.

35 Fig. 4: Detección mediante PCR de los ADNs de SeUS2-A y SfNIC-C extraídos de los CIs producidos en larvas de *Spodoptera exigua* o *S. frugiperda*, utilizando cebadores dirigidos a secuencias del gen *ie-0*.

- M. marcador de peso molecular Hyperladder I (Bioline)
- Carril 1: ADN extraído de CIs de SeUS2-A (sin ningún producto de amplificación específico).
- Carril 2: ADN extraído de CIs de SfNIC-C
- Carril 3: ADN extraído de CIs producidos tras la coinfección de larvas de *S. exigua* con ODVs de SeUS2-A y SfNIC-C. Resultados de la repetición #1.
- 40 - Carril 4: ADN extraído de CIs producidos tras la inoculación de larvas de segundo estadio de *S. frugiperda* utilizando CIs de larvas coinfectadas con ODVs de SeUS2-A y SfNIC-C. Resultados de la repetición #1.
- Carril 5: Igual que el carril 3, pero los resultados son de la repetición #2.
- Carril 6: Igual que el carril 4, pero los resultados son de la repetición #2.

45 Fig. 5. Co-inclusión de virus de SeUS2-A y SfNIC-C en CIs: Abundancia relativa del genoma de SfNIC-C, por cada 100 ng de genoma de SeUS2-A en diferentes mezclas de CIs. Bajo el eje de abscisas se indica el número de pase

(P0 a P6) en larvas de *Spodoptera exigua*, donde P0 corresponde a la coinfección utilizando ODVs liberados de mezclas de CIs de SeUS2-A y SfNIC-C en una proporción 1:1. Las barras de error indican la desviación estándar.

Fig. 6: Electroforesis de los productos de PCR amplificados a partir de AcC6 (AcMNPV), SfNIC-B (SfMNPV) y ADN extraído de CIs mixtos con virus co-incluidos (AcMNPV+SfMNPV). Hyperladder I indica un marcador de peso molecular con la longitud de fragmentos que se indica a la izquierda.

Fig. 7. Diagrama de ejemplo de ODVs mixtos incluidos en CIs mixtos producidos tras la coinfección de larvas de *S. frugiperda* con los virus SfNIC-C y AcC6. Los rectángulos y círculos representan ODVs en vista frontal (lateral) o desde arriba (extremo), respectivamente. Las líneas horizontales dentro de los rectángulos o los puntos dentro de los círculos representan nucleocápsidas, perteneciendo las más oscuras a una especie y las más claras a otra especie.

Fig. 8: Electroforesis de los productos de PCR amplificados a partir de ADN extraído de muestras de dilución hasta el punto final (3 repeticiones). Hyperladder I indica el marcador de peso molecular (Bioline). Los dos carriles finales indican controles positivos de ADN genómico de AcC6 (AcMNPV) y SfNIC-B (SfMNPV). Los carriles superiores indican amplificaciones utilizando cebadores específicos de SfNIC-B, mientras que los carriles inferiores indican amplificaciones utilizando cebadores específicos de AcC6.

Fig. 9: Mortalidad de larvas observada tras superinfección sencilla, simultánea o retrasada de larvas de *S. frugiperda*. Los tratamientos se indican mediante las iniciales del primer virus, el intervalo de horas entre la primera y la segunda inoculación y las iniciales del segundo virus inoculado, p.ej., Ac12Sf indica larvas inicialmente infectadas con CIs de AcC6 e inoculadas posteriormente, 12 horas más tarde, con CIs de SfNIC-B. Los valores sobre las columnas indican el porcentaje de mortalidad inducida por los virus. Los valores que van seguidos de letras idénticas no difirieron significativamente (ANOVA, Tukey,  $p>0,05$ ).

Fig. 10: Relación logarítmica entre el ADN genómico de AcC6 (AcMNPV) y el ADN genómico de SfNIC-B (SfMNPV) extraído de CIs producidos durante infecciones simples, infecciones simultáneas y superinfecciones retrasadas (12-72 h) utilizando inóculos de CIs de cada uno de estos virus. Las columnas en cuyos encabezamientos aparecen letras idénticas no difirieron significativamente (ANOVA, Tukey,  $p>0,05$ ).

Fig. 11: Composición de ODVs liberada a partir de CIs mixtos producidos en un experimento de coinfección simultánea y retrasada.

### Descripción detallada de la invención

Se presenta un método mediante el cual se pueden obtener viriones que comprenden genomas de diferentes especies de baculovirus, incluidos dentro del mismo cuerpo de inclusión (CI) viral, con las características estructurales y morfológicas que son características de los baculovirus. Los CIs con genomas mezclados obtenidos por el método de la presente invención contienen una mezcla de dos o más genomas diferentes de diferentes especies o cepas de nucleopoliedrovirus.

Contrariamente a los resultados encontrados en estudios previos, tales como el de Yanase y colaboradores (Yanase et al., 1998), los ensayos presentados en la presente solicitud demuestran que la coinfección de un único insecto mediante dos especies de baculovirus, específicamente dos especies de nucleopoliedrovirus múltiples, puede dar como resultado la replicación de ambos virus en las mismas células e, incluso, el empaquetamiento de nucleocápsidas que contienen genomas virales diferentes en el mismo virión derivado de cuerpo de inclusión (ODV).

Así, diferentes genomas pueden estar presentes simultáneamente en ODVs individuales, que se pueden producir mediante coinfección de una especie de insecto que sea susceptible a la infección por dos o más especies de baculovirus que difieren en sus características insecticidas, tales como patogenicidad, virulencia, producción de CIs y espectro de huésped. Puede estar incluidos en cuerpos de inclusión (CI) de virus con morfología y tamaño normales, y pueden infectar especies de insectos susceptibles de ser infectados por uno cualquiera de los baculovirus componentes.

Los ODVs que comprende más de una nucleocápsida (y, por ello, más de un genoma de baculovirus) son característicos de los nucleopoliedrovirus múltiples, mientras que los nucleopoliedrovirus simples se caracterizan por la presencia de una única nucleocápsida en cada ODV. Por tanto, para llevar a cabo el método de la presente invención, todos los baculovirus utilizados debe ser nucleopoliedrovirus múltiples (MNPV).

Los ejemplos de la presente solicitud muestran que el método de la presente invención puede funcionar tanto con baculovirus estrechamente relacionados filogenéticamente (por ejemplo, SeMNPV y SfMNPV), como con baculovirus filogenéticamente distantes (como, por ejemplo, AcMNPV y SfMNPV). En ambos casos, los baculovirus pueden dar lugar a coinfección y pueden producir una infección productiva en una célula de insecto particular. De acuerdo con el conocimiento disponible sobre baculovirus, el método de la presente invención se puede llevar a cabo con cualquier combinación de baculovirus, siempre y cuando todos ellos sean nucleopoliedrovirus múltiples. Se prefiere que todos los baculovirus inoculados a una misma larva sean alfabaculovirus, como en los ejemplos de la presente solicitud. Los alfabaculovirus pueden pertenecer al mismo grupo filogenético (como en el Ejemplo 1, en el

que se utilizan dos alfabaculovirus que pertenecen al Grupo II) o a grupos diferentes (tal como en los Ejemplos 2 y 3, en los que se utiliza un alfabaculovirus del Grupo I y un alfabaculovirus del Grupo II).

En dichos Ejemplos pueden encontrarse ejemplos de posibles combinaciones: *Spodoptera frugiperda* es un lepidóptero plaga destructivo de muchos cultivos económicamente importantes. Como el nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) tiene un espectro de huésped muy estrecho (de hecho, puede producir infección letal en *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera litura* y *Spodoptera exigua*), es aconsejable utilizarlo en combinación con agentes insecticidas con un espectro más amplio para controlar más especies plaga con un único agente de control. Para tal propósito, el nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV), que puede infectar y matar larvas de al menos 32 especies de lepidópteros, incluida *S. frugiperda*, parece ser un compañero interesante. Sin embargo, no todas las especies huésped son altamente susceptibles de infección fatal mediante el AcMNPV. El Ejemplo 3 muestra que la infección simultánea del AcMNPV con el SfMNPV puede incrementar la mortalidad obtenida en insectos tratados con el AcMNPV; así, las composiciones que comprenden CIs que contienen ODVs mixtos con genomas de cada uno de dichos dos virus pueden mejorar los resultados obtenidos.

El método de la presente invención se puede llevar a cabo coinfectando larvas de insectos o cultivos de células de insectos con los genomas de baculovirus que han de quedar co-envueltos en al menos un virión derivado de cuerpo de inclusión (ODV).

En el método de la presente invención, los genomas de baculovirus se proporcionan (inoculan) a las larvas de insectos o las células de insecto en cultivo preferiblemente formando nucleocápsidas. Las nucleocápsidas inoculadas pueden estar asociadas en grupos envueltos por una cubierta formando ODVs, o pueden formar viriones brotados (BV), los cuales, como se explicó anteriormente, son las partículas de virus que se producen *in vivo* para la transmisión de la infección célula-a-célula dentro del insecto infectado o en el cultivo de células. A su vez, los ODVs inoculados pueden ser ODVs libres (no incluidos en cuerpos de inclusión) o pueden estar incluidos en una matriz proteica formando cuerpos de inclusión (CI), conteniendo cada CI varios ODVs.

Los insectos y los cultivos de células se pueden inocular utilizando BVs. Cuando se inoculan BVs, se pueden inocular varios juegos diferentes de BVs: cada juego de BVs contiene nucleocápsidas con el genoma de una especie de baculovirus concreta. El número de juegos de BV a inocular será igual al número de genomas diferentes de especies de baculovirus que hayan de quedar co-envueltas en el mismo ODV. Así, el uso de BVs como inóculo necesariamente implica que deberían inocularse BVs que contienen genomas (nucleocápsidas) de uno de los tipos de virus y BVs que contienen genomas (nucleocápsidas) del otro tipo (o de los otros tipos) de virus que han de quedar co-envueltas en un mismo ODV.

Como cada BV contiene una única nucleocápsida y cada nucleocápsida contiene una única copia de genoma, llevar a cabo el método de la presente invención inoculando nucleocápsidas de diferentes especies de baculovirus que están en forma de BVs de diferentes especies de baculovirus es similar a otra posible realización en la que nucleocápsidas que contienen copias individuales del genoma de una especie de virus en concreto están envueltas formando ODVs y se usan para inocular un insecto huésped (una larva de insecto) o un cultivo de células de insecto. En esta realización del método de la presente invención, los ODVs con el genoma del baculovirus que pertenece a una especie de virus en concreto se utilizan para inocular las larvas de insecto o los cultivos de células de insecto simultáneamente, o tras un intervalo de tiempo, con ODVs o BVs que comprenden nucleocápsidas que contienen el genoma de otra especie de virus que es diferente de la primera. Se preferirá tal realización, particularmente cuando el método de la invención se lleva a cabo por primera vez.

Pero esa última situación no es necesaria para llevar a cabo el método de la presente invención, como puede verse en el Ejemplo 3, en el que se utilizan ODVs, incluidos en CIs obtenidos mediante la aplicación de las etapas del método de la presente invención, para inocular larvas sanas para obtener nuevos ODVs y CIs y, como puede verse en el Ejemplo y las correspondientes Figuras, algunos de los ODVs utilizados para las rondas adicionales de inoculación y la producción de CI contienen más de un tipo de genoma, es decir, genomas pertenecientes a dos o más especies de baculovirus diferentes inoculados en la primera ronda están co-envueltos en algunos de los ODVs obtenidos a partir de una primera ronda de infección y pueden utilizarse para inocular larvas y llevar a cabo de nuevo el método de la presente invención.

Como se comentó previamente, los ODVs (y, con ello, las nucleocápsidas envueltas dentro de ODVs) se pueden usar para inocular larvas de insecto, bien incluidos en cuerpos de inclusión (CIs) o no estando incluidos en cuerpos de inclusión (en este último caso, a estos ODVs se hace referencia de aquí en adelante como ODVs libres). En el caso de los cultivos de células de insecto, se pueden utilizar ODVs para inoculación tras haber sido liberados de CIs. A los ODVs liberados de CIs se hace referencia a partir de ahora como ODVs libres.

Cuando se utilizan CIs para la inoculación, todos los ODVs incluidos en un mismo cuerpo de inclusión pueden pertenecer a una única especie, es decir, todos los ODVs contienen nucleocápsidas con el genoma de una única especie de virus, y todos los ODVs contienen nucleocápsidas con el genoma de la misma especie. Pero también es posible que los ODVs incluidos en un mismo cuerpo de inclusión tengan composiciones en lo que se refiere a los genomas que están dentro de sus nucleocápsidas, conteniendo algunos de ellos los genomas de una única especie,

conteniendo otros los genomas pertenecientes también a la misma especie, pero diferente de la primera especie, y otros más donde diferentes nucleocápsidas están envueltas conjuntamente formando ODVs, en los que al menos uno, o varios ODVs, incluye(n) un genoma que pertenece a una especie diferente de la especie del genoma de las otras nucleocápsidas del mismo ODV. Ambos tipos de CIs pueden inocularse para llevar a cabo el método de la presente invención. Por ello, una posible realización de la presente invención es aquella en la que las nucleocápsidas inoculadas están envueltas formando ODVs incluidos en cuerpos de inclusión y al menos un cuerpo de inclusión inoculado comprende al menos un ODV en el que están co-envueltas nucleocápsidas que comprenden genoma de más de una especie de baculovirus.

Otra posible realización es aquella en la que todos los ODVs incluidos en un mismo cuerpo de inclusión contienen nucleocápsidas con el genoma de la misma especie. En este último caso, deberían utilizarse varios juegos de CIs para inocular las larvas de insecto, comprendiendo cada juego nucleocápsidas que contienen genomas de un tipo o especie de virus concreto.

Tal como se explicó anteriormente, para los propósitos de la presente invención pueden utilizarse para inocular células de insecto BVs u ODVs libres. Esto depende del sistema utilizado para la replicación de los genomas inoculados y la producción de nuevas partículas de virus. Para la inoculación de células de insecto cultivadas *in vitro* con genomas de diferentes especies de baculovirus, puede usarse para infectar las células BVs u ODVs libres.

Cuando las células de insecto que han de ser coinfectadas con los diferentes genomas de baculovirus son parte de los tejidos de un insecto huésped (una larva de insecto), pueden utilizarse también para la inoculación BVs, u ODVs libres o CIs de diferentes especies de baculovirus o CIs que comprende mezclas de genomas de diferentes especies de baculovirus, pero se debe mantener en mente la ruta de inoculación para seleccionar el tipo de partícula a utilizar:

- Cuando las partículas de virus que contienen los genomas de baculovirus son inyectadas, pueden usarse BVs u ODVs libres. Se prefiere la inyección hemocélica.

- Cuando las nucleocápsidas se inoculan a larvas de insecto por vía oral, pueden usarse BVs, ODVs libres o CIs. Los BVs son las partículas menos efectivas para la infección por esta ruta. Se pueden usar ODVs libres, pero se prefiere que estos estén incluidos en cuerpos de inclusión, puesto que los cuerpos de inclusión son las partículas virales ingeridas por las larvas de insecto en la naturaleza y don las partículas infectivas naturales. Cuando se usa la inoculación oral, los cuerpos de inclusión se pueden administrar en una suspensión acuosa que se proporcione a los insectos, o pueden administrar en forma sólida o semi-sólida, mezclados con la dieta o con otras sustancias ingeridas por las larvas de insecto.

Una vez que las células de insecto de una larva o células de insecto en cultivo son infectadas, dan lugar a otras nucleocápsidas que posteriormente se incorporar dentro de ODVs y CIs. De acuerdo con la presente invención, cuando se co-infectan insectos o células de insecto con genomas de diferentes especies de baculovirus, una fracción de los ODVs producidos son ODVs mixtos, en los que al menos una de las nucleocápsidas contiene una copia de genoma que es diferente de las otras copias de genoma (de las otras nucleocápsidas) co-envueltas en el mismo ODV, esto es, genomas de diferentes especies de baculovirus están co-envueltos en el mismo ODV.

Como se explicó anteriormente, los ODVs mixtos o los CIs en los que están incluidos se pueden utilizar para infectar insectos susceptibles para producir grandes cantidades de CIs mixtos, con genomas mezclados, que pueden utilizarse como agente de control biológico para combatir insectos plaga. Eso permite un incremento del número de especies de insecto que se pueden gestionar utilizando un insecticida que contiene baculovirus, de forma que no es necesario aplicar dos insecticidas diferentes, comprendiendo cada uno de ellos una especie de baculovirus diferente, cuando están presentes (o hay que combatir) dos o más especies de insectos plaga en una misma planta, cultivo o explotación. Es importante que tales CIs mixtos se pueden obtener de una misma colonia de insectos, lo que evita multiplicar los costes actualmente asociados con la producción de múltiples especies de baculovirus en colonias de insectos diferentes, llevando implícito cada una sus propios costes. Esto reduce los costes de producción el tipo de insecticida descrito en la presente invención.

Como se muestra en el Ejemplo 3 de la presente solicitud, en algunos casos, tales como el de las infecciones simultáneas con dos baculovirus diferentes, la mortalidad obtenida en las larvas infectadas fue mayor que la que se obtuvo con sólo una especie de baculovirus concreta (p.ej. compárese la mortalidad obtenida con el genotipo AcC6 del AcMNPV con la mortalidad obtenida con la co-infección simultánea de AcC6 en mezclas con el genotipo SfNIC-B del SfMNPV). Por ello, el método de la presente invención y las composiciones con CIs mixtos de la invención obtenidos mediante dicho método pueden ser útiles también en ciertos casos donde sólo una especie de insecto plaga está infestando una planta o cultivo y hay dudas sobre la susceptibilidad del insecto a una especie de baculovirus en particular, porque dos especies de virus incrementarán la probabilidad de matar la plaga de insectos, o también con el fin de tratar de incrementar la prevalencia de mortalidad de la plaga y con ello la efectividad de la medida de control.

Es más, la co-infección del insecto huésped se puede llevar a cabo simultáneamente o tras un intervalo de tiempo concreto entre la primera inoculación y la inoculación con la segunda especie de baculovirus y/o inoculaciones posteriores. Este procedimiento da como resultado proporciones diferentes de los genomas de cada especie en los



ODVs y CIs producidos en los insectos coinfectados. Además, los ejemplos de la presente solicitud muestran también que el orden de inoculación de cada especie de baculovirus puede afectar a la proporción del genoma de cada especie en la composición final de CIs. Así, simplemente variando las condiciones en las cuales se lleva a cabo el método de la presente invención (tiempo entre inoculaciones y orden de inoculación de los diferentes baculovirus), es posible obtener composiciones de CIs con diferentes proporciones de cada baculovirus.

Otra variable que se puede cambiar en el método de la presente invención es la proporción de cada baculovirus que se usa para inocular los insectos. La proporción respecto al número de genomas inoculados de cada baculovirus puede ser 1:1 o una diferente, siempre y cuando se inoculen todos los baculovirus que deben tener una copia de su genoma presente en los ODVs mixtos o en los CIs mixtos a obtener.

Por ello, el método de la presente invención también permite la producción de composiciones de CIs con diferentes proporciones de cada genotipo de baculovirus, tal como se desee, variando el intervalo de tiempo entre la inoculación del primer baculovirus y la inoculación del segundo (o sucesivo) baculovirus, y/o el orden de inoculación del baculovirus diferente (cuando los virus se inoculan de forma separada en el tiempo) y/o las proporciones de copias de los genomas de cada baculovirus que se usan para inocular un insecto. Así, tanto la inoculación simultánea como la inoculación por separado, con un intervalo de tiempo entre la inoculación de un baculovirus y la inoculación del segundo (o sucesivo) baculovirus son realizaciones del método de la presente invención, así como la inoculación de la misma cantidad (proporción 1:1) de copias del genoma para cada especie de baculovirus o la inoculación de una proporción diferente a la 1:1.

Las nucleocápsidas que contienen el genoma de un baculovirus perteneciente a una especie concreta se pueden usar para inocular larvas de insecto o células de insecto separadamente en el tiempo con respecto a las nucleocápsidas que tienen incluido el genoma del otro baculovirus (o los otros genomas de baculovirus, cuando más de dos especies se inoculan y se espera que tengan al menos una copia de sus genomas en los ODVs mixtos producidos). Esa realización del método de la presente invención es posible cuando se inocula larvas de insecto o células en cultivo con BVs o con ODVs que contienen nucleocápsidas con el genoma de baculovirus perteneciente a una especie concreta que es diferente del de la otra especie inoculada. Cuando los insectos son coinfectados cuando so o más especies de baculovirus mediante inoculación secuencial de las nucleocápsidas pertenecientes a cada especie en particular, el retraso de tiempo entre la primera y la última inoculación debería ser inferior al tiempo necesario para la manifestación de los signos de la primera infección. Los signos habituales de infección previos a la muerte incluyen letargia, tasa de alimentación reducida, cambios en la coloración del tegumento y desplazamiento a las partes apicales de las plantas huéspedes en algunos virus; la presencia de tales signos puede considerarse una indicación de enfermedad evidente.

Así, de acuerdo con los resultados que se muestran en el Ejemplo 3, cuando los baculovirus diferentes se inoculan separadamente en el tiempo, es preferible que el tiempo en el que la segunda inoculación (o la inoculación final) tiene lugar sea inferior a 48 horas con respecto a la inoculación de las nucleocápsidas con el genoma de una especie de baculovirus diferente, y más preferiblemente de no más de 24 horas tras la inoculación de la primera especie de baculovirus, incluso más preferiblemente no mayor que 16 horas. Esto es así porque parece que, según se incrementa el tiempo tras la primera inoculación (infección), las células cesan de ser receptivas al segundo baculovirus. Por ello, cuando se han de obtener viriones y/o cuerpos de inclusión que contienen nucleocápsidas de más de una especie de baculovirus, se prefiere particularmente no retrasar la inoculación del segundo baculovirus más de 16-24 horas tras la infección del primer baculovirus.

Es también una realización del método de la presente invención aquella en la que las nucleocápsidas con el genoma de un baculovirus perteneciente a una especie concreta se usan para inocular células de insecto en cultivo o larvas de insecto simultáneamente con las nucleocápsidas que tienen el(los) otro(s) genoma(s) de baculovirus que deben quedar incluidos con el primero en al menos un virión derivado de cuerpo de inclusión. Esta realización es compatible con que las nucleocápsidas estén en forma de BVs, ODVs o CIs y, en este caso, tanto con los ODVs (libres o incluidos en CIs) que contiene sólo genotipos de la misma especie como con los ODVs mixtos (ODVs que contienen genomas de diferentes especies de baculovirus, en los que al menos uno de los genomas es diferente de los otros). Se pueden usar CIs mixtos, así como CIs en los todos los ODVs incluidos contienen genomas pertenecientes a sólo una especie, que es la misma especie para todos los ODVs co-incluidos.

Cuando el método de la presente invención se lleva a cabo con cultivos de células de insecto, puede usarse cualquier línea de células de insecto siempre y cuando sea susceptible de ser infectadas por ambos (o las más de dos) especies de baculovirus cuyos genomas deben estar presentes en los ODVs o CIs a producir. Una lista de líneas celulares de insecto y de virus a los cuales son susceptibles está disponible en Lynn (2007). Aunque las líneas celulares Sf9 y Sf21 de *S. frugiperda* y High5 de *Trichoplusia ni* son las que se usan más habitualmente, puede utilizarse cualquier otra línea de células de insecto para obtener ODVs mixtos y CIs mixtos. Infectar una línea celular con ODVs o BVs de una especie concreta de baculovirus y ODVs o BVs de una especie diferente de baculovirus, ambas infectivas para esa línea celular, conducirá a la producción de ODVs mixtos y CIs mixtos. Cuando es posible ver poliedros dentro de la mayor parte de las células infectadas (5-7 días post-infección dependiendo de la línea celular y de los virus utilizados), tanto las células como el medio tienen que recogerse. Entonces se recogerán CIs mixtos mediante centrifugación a baja velocidad (King et al., 1992).

5 Cuando un insecto huésped se utiliza para producir CIs, la especie de insecto utilizadas en el método de la presente invención puede ser la de cualquier insecto susceptible a las dos (o las más de dos) especies de baculovirus cuyos genomas deben estar presentes en los CIs que han de obtenerse. Los insectos deberían estar en el estadio de larva, que es el estadio en el que habitualmente los insectos son susceptibles a la infección por baculovirus. Los insectos normalmente mudan varias veces antes de alcanzar el estadio de pupa: cada período (o sub-período) entre dos mudas sucesivas se conoce como estadio de desarrollo (*instar* en inglés), denominación que también se utiliza para hacer referencia a las larvas individuales en un estadio específico. El número de estadios de desarrollo por los que atraviesa un insecto depende de la especie de las condiciones medioambientales. Para producir CIs, se prefieren normalmente larvas en el último estadio de desarrollo posible (de ser posible, al menos en el cuarto estadio), porque su mayor tamaño permite la producción de mayores cantidades de CIs.

10 Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término "inoculación" hace referencia a la administración de virus (los "patógenos" del método de la presente invención) a los insectos. Tal administración puede ser mediante inyección directa (lo cual se prefiere cuando los virus están en forma de viriones libres, no incluidos en cuerpos de inclusión) o puede ocurrir mediante ingestión, como sucede en la naturaleza, en donde las larvas ingieren CIs de baculovirus que están presentes en las hojas y son ingeridos con el tejido foliar contaminado: esto es "inoculación oral" o "inoculación *per os*". Para este segundo tipo de inoculación puede utilizarse o bien se administra a las larvas por vía oral una suspensión líquida (preferiblemente acuosa) que contiene CIs, por ejemplo mediante el método de alimentación de la gota de Hughes and Wood, 1986, como en los Ejemplos 2 y 3 de la presente solicitud, o bien se utilizan los CIs para contaminar un sustrato que es consumido por las larvas del insecto, de forma que se administran, por ejemplo, en forma sólida o semi-sólida, mezclados con la dieta proporcionada a las larvas.

Entonces, el método de la presente invención, en una posible realización, se puede definir también como un método para producir CIs mixtos que comprende las etapas de:

25 a) coinfectar larvas de insectos con dos especies de baculovirus diferentes, mediante inoculación simultánea, o inoculación secuencial con un retraso de tiempo inferior al tiempo necesario para la manifestación de los signos de la primera infección, y

b) criar las larvas inoculadas en las condiciones necesarias hasta que se aprecia enfermedad evidente o muerte por poliedrosis.

30 Los CIs producidos por las larvas muertas se pueden aislar purificándolos a partir de las larvas muertas mediante cualquier metodología conocida en la técnica, tales como las que incluyen triturar las larvas muertas en agua, filtrar la suspensión resultante, permite o provocar (precipitar) que los CIs se separen de la suspensión y se depositen por sedimentación, centrifugación o una técnica preferida (preferiblemente, acelerando la separación de los CIs y el líquido remanente mediante centrifugación) y separar el sedimento de CIs del sobrenadante. Los CIs aislados se pueden resuspender en una solución acuosa, dando lugar a una suspensión acuosa de CIs que se puede almacenar a temperatura ambiente o bajo refrigeración (0° a 6° C) o en condiciones de congelación (-80° a 0°) previamente a su formulación. Se prefieren condiciones de congelación cuando está previsto almacenar los CIs durante largo tiempo. Alternativamente, la suspensión acuosa de CIs se puede liofilizar y almacenar a temperatura ambiente o en refrigeración.

Si se han de obtener ODVs libres (no incluidos), se pueden liberar de los CIs producidos sometiéndolos a lisis alcalina, por ejemplo utilizando una solución alcalina, como en el Ejemplo 2.

40 Tal como se mencionó previamente, esta invención proporciona, por primera vez, un método para producir cuerpos de inclusión (CIs) de baculovirus que incluyen viriones que comprenden genomas de diferentes especies de baculovirus. Tales CIs se pueden usar para el control biológico de plagas de insectos, como una solución alternativa en comparación con los CIs que comprenden genomas de sólo una especie de virus que se comercializan actualmente como insecticidas biológicos. Por ello, tales CIs en los que al menos uno de los ODVs comprende genomas de diferentes especies de baculovirus, en el que los genomas son genomas de nucleopoliedrovirus múltiples, son también un aspecto de la presente invención. También las composiciones que comprenden tales CIs son otro aspecto de la presente invención. El uso de tales CIs, y también de las composiciones que los comprenden, para el control biológico de plagas de insectos es otro aspecto de la presente invención, particularmente cuando el ingrediente activo de la formulación que está previsto ser usada para combatir plagas de insecto son CIs de la presente invención.

45 Una vez llevado a cabo el método de la presente invención, tal como se puede ver en el Ejemplo 2, no todos los ODVs incluidos en un CI mixto tienen necesariamente una mezcla de genotipos: algunos de ellos contendrán sólo nucleocápsidas con el genoma de una de las especies, otros ODVs contendrán nucleocápsidas en las cuales todos los genomas pertenecen a una segunda especie de baculovirus, y un tercer tipo serán ODVs mixtos, en los que estarán presentes en el mismo virión genomas de al menos dos especies diferentes. Un CI con tal mezcla de ODVs se ha representado en la Fig. 7, como un ejemplo de un CI de la presente invención. También los CIs en los que cada ODV incluido contiene genomas de sólo una única especie, pero en los están co-incluidos ODVs que contienen los genomas de al menos dos especies diferentes son CIs de la presente invención.

De forma análoga, las composiciones de la presente invención son aquellas que comprenden al menos un CI en el que esté incluido al menos un ODV que comprende genomas de dos o más especies diferentes de nucleopoliedrovirus múltiples que están co-envueltos, y también las composiciones que comprenden al menos un CI en el que están co-incluidos ODVs que contienen nucleocápsidas con los genomas de una única especie pero en los que cada ODV pertenece a una especie diferente. No es necesario que todos los CIs tengan co-incluidos baculovirus de diferentes especies para que la composición quede cubierta dentro del alcance de la presente invención. En realidad, con puede verse en los Ejemplos 2 y 3, llevar a cabo el método de la presente invención da como resultado una progenie de CIs en los que al menos una fracción de ellos puede contener el genoma de una especie de virus de un único tipo, es decir, algunos de los CIs pueden contener genomas de sólo una de las especies de baculovirus inoculadas y algunos CIs pueden contener ODVs en los que cada ODV contiene genomas de sólo un de los genotipos pero los genotipos de diferentes ODVs incluidos en un mismo CI pueden ser diferentes. Adicionalmente, las composiciones que comprenden ODVs mixtos de la presente invención son también composiciones de la presente invención y están incluidas dentro del alcance de la presente invención.

Como los cuerpos de inclusión obtenidos por el método de la presente invención tienen rasgos característicos que son características de los CIs de baculovirus, se pueden extraer y/o purificar de las larvas infectadas en las que han sido producido mediante cualquier metodología conocida en la técnica, tal como la técnica de filtración y centrifugación diferencial utilizada en los ejemplos de la presente solicitud. Se pueden formular como formulaciones sólidas o líquidas (por ejemplo, en una formulación acuosa, en polvo o granular), dando lugar a diferentes composiciones, según se desee, que son adecuadas para ser utilizadas para combatir infestaciones de insectos plaga.

Las composiciones de la presente invención tienen la característica del número de especies de insecto que pueden infectar y matar utilizando un único tipo de inóculo de CIs en comparación con cualquiera de los virus componentes sólo. Esto se consigue utilizando ODVs y CIs que comprenden mezclas de diferentes especies de virus que tienen un espectro de huésped que difiere del de cualquiera de las especies de virus componentes sola. Así, los CIs de la presente invención y/o las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para combatir plagas de insectos. En particular, se pueden usar para combatir dos o más especies de insectos plaga utilizando una única aplicación de CIs mixtos u ODVs mixtos. El sustrato que requiere protección frente a control o control de las infestaciones de plagas podría ser una planta, un cultivo, un campo de cultivo, o un producto almacenado o similares, u otro sustrato que es una fuente de alimento para un insecto plaga. Habitualmente, si se utilizan los CIs de la presente invención y/o una composición de la presente invención para combatir un insecto plaga, ellos serán el ingrediente activo (o uno de los ingredientes activos) de la formulación insecticida.

Por ejemplo, cuando las composiciones de CIs están en forma de suspensiones acuosas, se pueden aplicar en forma de aerosol (spray) a las plantas. Las composiciones de CIs a ser utilizadas como insecticidas biológicos se pueden aplicar mediante otros métodos, tales como aplicación en forma de aerosol aérea, aplicación en forma al suelo, aplicación en forma de polvo, aplicación en el agua de irrigación, mediante una niebla de finas gotas de agua, en forma de neblinas, o mediante inoculación de insectos muertos por acción de virus o partes de ellos.

En las composiciones de CIs de la presente invención, pueden estar presentes otros componentes, tales como excipientes agrícolamente adecuados y/o adyuvantes, en particular aquellos compuestos que se pueden considerar adyuvantes porque facilitan la preparación de la composición a ser aplicada en forma apropiada según el método de aplicación deseado. Las composiciones pueden incluir también, por ejemplo, un fertilizante u otro pesticida o un compuesto que se sabe que potencia la infectividad de los CIs.

Tal como se explicó anteriormente, los ODVs libres pueden dar lugar también a una infección cuando se inoculan por vía oral. Por ello, las composiciones que comprenden ODVs mixtos de la presente invención se pueden utilizar también como insecticidas biológicos, así como las composiciones que comprenden CIs mixtos y ODVs mixtos. Los detalles aportados anteriormente sobre el uso de composiciones de CIs de la presente invención para combatir plagas de insectos también son aplicables a otras composiciones de la presente invención, tales como las composiciones que comprenden ODVs mixtos libres y las composiciones que comprenden CIs mixtos y ODVs mixtos libres: métodos de aplicación, sustratos a proteger de o en los que combatir las infestaciones de plagas, otros compuestos que pueden estar presentes en la misma composición.

Como se puede ver en los Ejemplos de la presente solicitud, los viriones que contienen genomas de diferentes especies pueden ser útiles para llevar a cabo el método de la presente invención, pues se pueden utilizar para inocular con ellos insectos (preferiblemente mediante inyección) para producir CIs de la presente invención. También se pueden usar para ensayos de coinfección o pueden ser el resultado de ensayos que pueden proporcionar información útil para decidir la proporción de cada especie de virus para lograr una composición de CIs mixtos dependiendo de las condiciones deseadas de aplicación y del orden de administración de cada baculovirus o el retraso entre la administración de los dos baculovirus que es apropiado para obtener los CIs mixtos con la proporción deseada de cada baculovirus en la composición de CIs obtenida. Así, los viriones derivados de cuerpos de inclusión (ODVs) que comprenden los genomas de dos o más especies de nucleopoliedrovirus múltiples son también un aspecto de la presente invención.

La invención se explicará ahora con más detalle con los siguientes Ejemplos y Figuras.

**Ejemplos**

- PCR

Se llevaron a cabo ensayos de PCR utilizando los cebadores mostrados en la Tabla 1 a continuación:

**Tabla 1**

Cebadores	Secuencias	Localización del fragmento a amplificar (nucleótidos en el genoma)	Propósito de amplificación
Seie0.1 (Directo)	5'-CTATAGCTCGACGCTCGGTG-3' (SEQ ID NO:1)	Gen ie0 def SeUS2-A (nt 131937-131959)	Cuantificación de ADN de SeUS2-A
Seie0.2 (Inverso)	5'-ATCGTCTTCGATACCGCGAG-3' (SEQ ID NO:2)	Gen ie0 de SeUS2-A (nt 132447-132428)	Cuantificación de ADN de SeUS2-A
Sfie0.1 (Directo)	5'-ATGAGTATTAATCATGATTC-3' (SEQ ID NO:3)	Gen ie0 de SfNIC-B (nt 130128-130147)	Cuantificación de ADN de SfNIC-C.
Sfie0.2 (Inverso)	5'-TCTTGGCAAATGTTACTG-3' (SEQ ID NO:4)	Gen ie0 def SfNIC-B (nt 129612-129631)	Cuantificación de ADN de SfNIC-C.
qSe5.F (Directo)	5'-AGCAGCGAGCCAATGCAGTA-3' (SEQ ID NO:5)	Gen se5 de SeUS2-A (nt 6274-6293)	Cuantificación de ADN de SeUS2-A (qPCR).
qSe5.R (Inverso)	5'-CTTCTTGCAACCGCTCGTTC-3' (SEQ ID NO:6)	Gen se5 de SeUS2-A (nt 6354-6373)	Cuantificación de ADN de SeUS2-A (qPCR)
qSfCcath.2F (Directo)	5'-ACGCCGCGTTTAGTAACAGC-3' (SEQ ID NO:7)	Proximidad de la región delecionada de SfNIC-C (nt 18717-18736)	Cuantificación de ADN de SfNIC-C (qPCR).
qSfCsf36.2 R (Inverso)	5'-TAAACTATTTCTTGCAATC-3' (SEQ ID NO:8)	Proximidad de la región delecionada de SfNIC-C (nt 35150-35169)	Cuantificación de ADN de SfNIC-C (qPCR).
Ac.1 (Directo)	5'-GATTTGTTGGCCGAATAACG-3' (SEQ ID NO:9)	Gen único ac97 de AcC6 (nt 84850-84869)	Cuantificación de ADN de AcC6 (qPCR).
Ac.2 (Inverso)	5'-TGA CTCTTTCACCCATTGCAG-3' (SEQ ID NO:10)	Gen único ac97 de AcC6 (nt 84958-84938)	Cuantificación de ADN de AcC6 (qPCR).
Sf.1 (Directo)	5'-ACGCCGTTCAAAGACACGAG-3' (SEQ ID NO:11)	Gen único sf43 de SfNIC-B (nt 42832-42851)	Cuantificación de ADN de SfNIC-B (qPCR).
Sf.2 (Inverso)	5'-CCGCTTTGCCTTCGACATAG-3' (SEQ ID NO:12)	Gen único sf43 de SfNIC-B (nt 42976-42957)	Cuantificación de ADN de SfNIC-B (qPCR)
AcDNApol.1 (Directo)	5'-CAAATGTAGAATCTGTGTCG-3' (SEQ ID NO:13)	Gen de la ADN polimerasa de AcC6 (nt 53264-53283)	Detección de ADN de AcC6 en placas de cultivo de células.
AcDNApol.2 (Inverso)	5'-CAGCCATCACAAACACGCGC-3' (SEQ ID NO:14)	Gen de la ADN polimerasa de AcC6 (nt 53968-53949)	Detección de ADN de AcC6 en placas de cultivo de células
SfDNApol.3 (Directo)	5'-CAACGACATCAATAGAGTGC-3' (SEQ ID NO:15)	Gen de la ADN polimerasa de SfNIC-B (nt 88358-88377)	Detección de ADN de SfNIC-B en placas de cultivo de células
SfDNApol.4 (Inverso)	5'-AAATATTGCTAAGCACATCG-3' (SEQ ID NO:16)	Gen de la ADN polimerasa de SfNIC-B (nt 89322-89303)	Detección de ADN de SfNIC-B en placas de cultivo de células

5

- Extracción, digestión y análisis de ADN

Se liberaron viriones de CIs mezclando 100 µl de una suspensión de CIs que contenía 10<sup>9</sup> CIs/ml con 100 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 50 µl dodecilsulfato sódico al 10% (p/v) en un volumen final de 500 µl e incubando durante 10 min a 60°C. Se retiraron los CIs no disueltos y otros restos mediante centrifugación a baja velocidad (3800 x g, 5 min). El sobrenadante que contenía los viriones se trató con 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml) durante 1 hora a 50°C. El ADN

10

viral se extrajo dos veces con fenol saturado y una vez cloroformo y se aisló a partir de la fase acuosa mediante precipitación con alcohol. El sedimento se resuspendió en 50 a 100 µl de tampón TE 0,1x (Tris-EDTA, pH 8) durante 10 min a 60°C. La concentración de ADN se estimó leyendo la absorción óptica a 260 nm.

5 Para el análisis con endonucleasas de restricción, se mezclaron 2 µg de ADN viral con 10 U de la enzima *Pst*I (Takara) y se incubaron durante 12 h a 37°C. Las reacciones se pararon mediante adición de 4 µl de tampón de carga (0,25% p/v de azul de bromofenol, 40% p/v de sacarosa). La electroforesis se llevó a cabo usando geles horizontales de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M, pH 8,0) a 20 V durante 10 a 24 h. Los fragmentos de ADN se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de UV (Chemidoc, BioRad, California, EE.UU.).

10 - Ejemplo 1: Compatibilidad entre genes *pif* del MNPV de *S. exigua* (SeMNPV) y el MNPV de *S. frugiperda* (SfMNPV).

En este ejemplo se presentan evidencias de que dos especies de baculovirus pueden replicarse en la misma célula y que pueden compartir dos proteínas (PIF1 y PIF2) que se localizan en el ODV y son esenciales para la transmisión de los baculovirus por transmisión oral.

15 A) Los dos virus utilizados en los ensayos del presente ejemplo fueron los siguientes:

- El MNPV de *Spodoptera exigua* (SeMNPV), variante SeUS2-A. La variante SeUS2-A del SeMNPV procede del aislado de Florida SeUS-2, que es la base del bioinsecticida comercial Spod-X® (Certis USA, LLC), que comprende una mezcla heterogénea de al menos cuatro variantes genotípicas (Muñoz et al., 1999) del nucleopoliedrovirus SeMNPV, que infecta y mata larvas de *Spodoptera exigua*, el gusano soldado, rosquilla verde u oruga de la esparraguera. El SeUS2-A se obtuvo por clonación *in vivo*, infectando larvas de *S. exigua* mediante la ingestión de CIs a dosis baja (DL<sub>10</sub>) que mataban aproximadamente el 10% de las larvas tratadas. La variante SeUS2-A es la más abundante presente en el aislado silvestre SeUS2 y sólo es infectiva para larvas de *S. exigua*. La variante se puede replicar también *in vitro* en la línea celular Se301.

25 - El MNPV de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV), variante SfNIC-C. La variante SfNIC-C procede de un aislado del SfMNPV originario de Nicaragua, que comprende una mezcla heterogénea de al menos nueve variantes genotípicas (Simón et al., 2004b), que han sido caracterizadas tanto molecular como fenotípicamente (Simón et al., 2005a,b; 2011; 2012). El genotipo SfNIC-C se obtuvo por clonación *in vitro* utilizando células Sf9 (Simón et al., 2004b). Esta variante presenta en su genoma una delección de ~16 kb que elimina los genes *pif1* y *pif2*, por lo cual esta variante no es infectiva por ingestión, aunque sí puede producir una infección productiva tras la inyección de un inóculo en insectos huésped susceptibles. Esta variante se puede replicar también en las líneas celulares Sf21 y Sf9.

35 Ambos virus SeMNPV y SfMNPV pertenecen a un grupo filogenéticamente relacionado de alfabaculovirus (Grupo II; Herniou et al., 2004), pero difieren en las especies de huéspedes que pueden infectar. El SeMNPV es específico para las larvas de *S. exigua*, mientras que el SfMNPV normalmente infecta larvas de *S. frugiperda* pero puede infectar larvas de *S. exigua*. La infección letal de *S. exigua* por SfMNPV da lugar a la producción de pocos CIs y el tegumento de los insectos no se desintegra tras la muerte (Simón et al., 2004a).

B) Diferenciación de SeUS2-A y SfNIC-C mediante análisis con endonucleasas de restricción del ADN genómico.

40 SeUS2-A y SfNIC-C pueden ser diferenciados mediante el tratamiento de ADN genómico con la endonucleasa de restricción *Pst*I (Takara), seguido electroforesis en un gel de agarosa. Los perfiles de restricción obtenidos de cada ADN genómico son claramente distintos y permiten la diferenciación de la presencia de uno (o ambos) de dichos genomas en una muestra (véase la Fig. 2).

C) Ensayos de complementación de *pif1/pif2* de SeUS2-A y el genotipo de delección SfNIC-C.

45 Se inocularon larvas del cuarto estadio de *S. exigua* por inyección intrahemocélica con una mezcla de ODVs de SeUS2-A y SfNIC-C (resultante de mezclar un número igual de CIs de cada virus). Las larvas inyectadas fueron criadas individualmente en dieta semisintética basada en germen de trigo, levadura y soja como ha sido descrito por Greene et al. (1976) hasta la muerte y los CIs resultantes se recogieron por el método previamente descrito (Caballero et al., 1992). En breve, fueron extraídos de las larvas muertas tras la homogeneización de los cadáveres en agua estéril y purificación de la suspensión resultante mediante filtración y centrifugación diferencial.

50 El análisis del ADN extraído de estos CIs fue consistente con la presencia de la variante SeUS2-A, pero no se observaron indicios de la presencia del genotipo SfNIC-C en el perfil de restricción (Fig. 3, carriles 3 y 5 correspondientes a la primera y segunda repetición del mismo ensayo). Sin embargo, la amplificación mediante PCR utilizando cebadores específicos de la variante (Tabla 1: Sfie0.1 y Sfie0.2, es decir, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4) reveló la presencia de pequeñas cantidades de ADN genómico del genotipo SfNIC-C en el ADN extraído de los CIs producidos en larvas de *S. exigua* inyectadas (Fig. 4, carriles 3 y 5).

Estos CIs se utilizaron para alimentar larvas de segundo estadio de *S. frugiperda*, con concentraciones de  $10^7$  y  $10^9$  CIs/ml. Cuando las larvas inoculadas se criaron individualmente con dieta, se observaron mortalidades del 30 y 50%, respectivamente, causadas por poliedrosis. El análisis por PCR y *PstI* del ADN genómico obtenido a partir de estos CIs recogidos de larvas de *S. frugiperda* muertas por el virus fue consistente con la presencia del genotipo SfNIC-C sólo; no se observó ninguna evidencia indicativa de la presencia de ADN del SeUS2-A. Estos resultados fueron confirmados mediante una técnica de PCR cuantitativa (qPCR) (en tiempo real) altamente sensible con cebadores específicos del genotipo (Seie0.1 y Seie0.2, respectivamente, SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2): no se detectó amplificación de fragmentos del genoma de SeUS2-A (véase la Fig. 4, carriles 10 y 12).

Estos resultados demuestran que SeUS2-A no fue capaz de replicar en las larvas de *S. frugiperda*, lo que dio lugar a la eliminación de la variante SeUS2-A de la población experimental de virus mezclados. Estos resultados también demuestran que el genotipo SfNIC-C fue capaz de aprovechar las proteínas PIF1 y PIF2 producidas por SeUS2-A para originar una infección primaria en las células del intestino medio de las larvas de *S. frugiperda* inoculadas por vía oral, lo cual no sería posible en ausencia de estas proteínas. Así, la única manera de que los ODVs que contienen el genotipo SfNIC-C pudieran haber adquirido las proteínas PIF1 y PIF2 sería que ambos genotipos SeUS2-A y SfNIC-C se replicaran simultáneamente dentro de una misma célula de *S. exigua*. Se desechó una hipótesis alternativa que implicaba la recombinación de la región pif-1/pif-2 entre los genomas de cada uno de estos virus porque la segunda generación de CIs producidos en larvas de *S. frugiperda* (que comprendía el genotipo SfNIC-C solamente) no fue infectiva *per os* en larvas de *S. frugiperda*, lo que indica que no habían sido producido proteínas PIF1 y PIF2 por el genotipo SfNIC-C tras la inoculación de los CIs producidos en larvas de *S. exigua* coinfectadas.

De esta manera los presentes inventores han demostrado que la coinfección de células de *S. exigua* por dos especies de baculovirus próximas filogenéticamente, SeMNPV y SfMNPV.

A la vista de estos resultados se puede concluir:

(a) Una misma célula de *S. exigua* puede ser infectada simultáneamente por dos especies virales y las dos especies virales pueden replicarse.

(b) Las proteínas PIF1 y PIF2 pueden rescatar la infectividad *per os* de SfNIC-C (que carece de estos genes *pif*) en larvas de *S. frugiperda*.

D) Persistencia de los genotipos SeUS2-A y SfNIC-C co-incluidos en CI mixtos tras pases sucesivos en larvas de *Spodoptera exigua*.

Los CIs mixtos producidos en larvas de *S. exigua*, tratadas por inyección con una mezcla de ODVs de SeUS2-A y SfNIC-C (véase la Sección C), fueron utilizados como inóculo (pase 0, P<sub>0</sub>: obtenidos mediante coinfección de larvas de *S. exigua* utilizando ODVs liberados de mezclas 1:1 de CIs de SeUS2-A y CIs de SfNIC-C) en un experimento que implicó seis pases sucesivos (P<sub>0</sub> a P<sub>6</sub>) en larvas de *S. exigua per os*.

Para determinar cambios en la abundancia relativa de cada uno de estos virus en los CIs recogidos en los distintos pases (P<sub>0</sub>-P<sub>6</sub>) se extrajo ADN de las muestras de CIs y se sometió a qPCR utilizando el reactivo SYBR Green (Takara) en un termociclador ABI PRISM 7900HT. El ADN se extrajo de muestras de CIs de cada pase y se sometió a cuantificación por qPCR; los resultados se muestran como nanogramos de ADN genómico de SfNIC-C por cada 100 nanogramos de ADN genómico de SeUS2-A.

Los cebadores específicos utilizados para amplificar el ADN de SeUS2-A (qSe5.F y qSe5.R, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, respectivamente) amplifican en la zona del gen *se5*, que es un gen único de SeMNPV. La amplificación del ADN de SfNIC-C se logró utilizando cebadores específicos de SfNIC-C (qSfCath.2F y qSfCsf36.2R, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO:8, respectivamente) que amplifican en la región de delección de 16 kb de este virus, 50 nucleótidos (nt) arriba y abajo del punto de delección. Para generar las rectas de calibrado se amplificó ADN plasmídico que contenían fragmentos clonados de SeUS2-A y SfNIC-C, utilizando los pares de cebadores previamente mencionados. Se cuantificó el ADN plasmídico por espectrofotometría y se llevaron a cabo diluciones seriadas 1/10 para producir curvas de calibrado en la región de  $10^{-1}$  ng a  $10^{-9}$  ng de ADN. La temperatura de hibridación de los cebadores fue de 60°C y el tiempo de elongación de 30 segundos.

El ADN extraído de CIs de virus individuales sólo produjeron amplificación positiva en las reacciones de qPCR en las que estaban implicados los cebadores dirigidos al virus correspondiente. Las muestras de ADN extraídas de los CIs de P<sub>0</sub> se estimó que comprendían un  $95,13 \pm 1,25\%$  (media  $\pm$  error estándar [SE]) de ADN de SeUS2-A y un  $4,87 \pm 1,25\%$  de ADN de SfNIC-C. El porcentaje del ADN de SfNIC-C extraído de muestras de CIs obtenidas en P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub> y P<sub>6</sub> descendió progresivamente alcanzando valores de  $1,17 \pm 0,45\%$ ,  $0,23 \pm 0,04\%$ ,  $0,10 \pm 0,06\%$ ,  $0,09 \pm 0,04\%$ ,  $0,03 \pm 0,01\%$  y  $0,01 \pm 0,004\%$ , respectivamente (Fig. 5).

- Ejemplo 2: Co-inclusión y co-entovra de genomas de dos especies de baculovirus

Los dos virus utilizados en estos experimentos fueron los siguientes:

- El nucleopoliedrovirus múltiple de *A. californica* (AcMNPV). El AcMNPV es la especie tipo del género *Alphabaculovirus*. Es un virus multicápsida que pertenece al Grupo I de los NPVs, que se caracterizan por la presencia de una glicoproteína (GP64) en la membrana de los BVs. Para este estudio se utilizó el genotipo clonado AcC6, que fue el primer genoma de baculovirus secuenciado completamente (número de acceso en GenBank: L22858; Ayres et al., 1994). Este genotipo se replica bien en las líneas celulares Sf21 y Sf9 y puede producir una infección letal productiva en larvas de *S. frugiperda*.

- El nucleopoliedrovirus múltiple de *S. frugiperda* (SfMNPV). Este es un NPV del Grupo II que se caracteriza por la presencia de la proteína F en los BV (Herniou et al., 2004), y por lo tanto es bastante distante filogenéticamente del AcMNPV. Para este estudio se utilizó un clon *in vitro*, denominado SfNIC-B, que fue el genotipo más abundante presente en un aislado silvestre de Nicaragua (SfNIC) (Simón et al., 2004b). El genotipo SfNIC-B es infeccioso *per os* para las larvas de *S. frugiperda* y se conoce la secuencia completa de su genoma (número de acceso en GenBank: HM595733.1, Simón et al., 2012).

#### A) Producción de ODVs y CIs mixtos que contienen los genomas de SfNIC-B y AcMNPV:

Para producir ODVs y CIs mixtos, se inocularon larvas de cuarto estadio de *S. frugiperda* con mezclas de CIs SfNIC-B y CIs del AcMNPV en una proporción 1:1, a una concentración de  $5 \times 10^7$  CI/ml de cada virus, mediante el método de alimentación de la gota (Hughes y Wood, 1986). Las larvas de *S. frugiperda* son permisivas para ambos virus. Se inocularon grupos de 24 larvas y se hicieron tres repeticiones del experimento. Las larvas inoculadas se mantuvieron individualmente en dieta semisintética de laboratorio en condiciones de temperatura constante (25°C) y en oscuridad hasta su muerte. Los CIs producidos se recogieron de los cadáveres infectados y se purificaron por filtración y centrifugación en las condiciones descritas anteriormente (Muñoz et al. 1998).

Para confirmar la presencia de ambos virus en estos CIs, se realizó una extracción de ADN genómico el cual fue sujeto a amplificación por PCR usando los cebadores SfDNApol.3 (SEQ ID NO:15) y SfDNApol.4 (SEQ ID NO:16) para amplificar ADN de SfNIC-B, o los cebadores AcDNApol.1 (SEQ ID NO:13) y AcDNApol.2 (SEQ ID NO:14) para amplificar ADN de AcMNPV.

La amplificación de ADN del AcMNPV dio como resultado un producto de 704 pb, mientras que la amplificación del ADN del SfNIC-B dio como resultado un producto de 964 pb (Fig. 6). La detección de la presencia de ADN genómico de ambos virus en las muestras de ADN extraído de los CIs, demostró que ambos virus se replicaron en los insectos inoculados.

Para demostrar la co-envoltura (co-encapsidación) de ambos virus en ODVs y la co-inclusión en CIs, se liberaron los ODVs por tratamiento de una suspensión de CIs ( $10^8$  CI/ml) mediante lisis alcalina utilizando un volumen igual de carbonato sódico 0,1 M, durante 30 minutos, a 28°C. Con los ODVs obtenidos se realizó un ensayo de placa utilizando células Sf9 (Invitrogen, Cat no. B825-01) tal como se ha descrito previamente (King et al., 1992). Para ello, se realizan diluciones seriadas ( $10^{-1}$ -  $10^{-6}$ ) y se añadieron 200  $\mu$ l de cada una de estas suspensiones a  $10^6$  células Sf9 en pocillos de placas de cultivo celular. Las células inoculadas se incubaron en un agitador orbital durante 1 hora. A continuación, se retiró el medio y se añadieron 2 ml de agarosa al 1% en TC100 con un 10% de suero bovino fetal (FCS) por pocillo. Entonces se incubaron las placas de cultivo celular durante 5-6 días a 28°C. Se picaron placas claramente aisladas, se sometieron a tratamiento con proteinasa K y se analizaron mediante PCR con los cebadores específicos del SfNIC-B (SfDNApol.3 y SfDNApol.4) o los cebadores específicos del AcMNPV (AcDNApol.1 y AcDNApol.2).

En conjunto, tras tres repeticiones,  $3,82 \pm 2,73\%$  (media  $\pm$  desviación estándar) de los clones contenían sólo el AcMNPV, mientras que aproximadamente  $48,1 \pm 8,9\%$  de las placas comprendían el SfNIC-B sólo y el restante aproximadamente  $48 \pm 6,5\%$  de las placas comprendían ambos virus. Los resultados obtenidos en cada repetición del ensayo y la media ( $\pm$  desviación estándar) se indican en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Virus	Repetición 1 % (n)	Repetición 2 % (n)	Repetición 3 % (n)	Media $\pm$ D.E.
AcMNPV	8,06 (5)	0,98 (1)	4,08 (4)	$3,8 \pm 2,7$
SfMNPV	32,2 (20)	53,9 (55)	52,0 (51)	$48,1 \pm 8,9$
Co-incluidos	59,6 (37)	45,1 (46)	43,9 (43)	$48,1 \pm 6,5$

n es el número de placas de cultivo celular analizadas con presencia de AcMNPV, SfMNPV o ambos virus en cada una de las repeticiones efectuadas. D.E. indica la desviación estándar.

En la Fig. 7 se puede ver un diagrama de un ejemplo de un CI mezclado en el que están incluidos los ODVs mixtos obtenidos. Esto sólo sería posible si ambos virus estuvieran presentes en el mismo ODV, lo que demuestra que ambos virus se replicaron en la misma célula, fueron co-envueltos en el mismo ODV y quedaron co-incluidos en el mismo CI.

Estos resultados se confirmaron estadísticamente mediante ensayo de la dilución hasta el punto final (“*end point dilution*”) en células Sf9 (King et al, 1992). La infección con un único ODV se consiguió tras la infección de células Sf9 con bajas concentraciones de ODVs. De acuerdo con ello, las probabilidades con las cuales haya pocillos que no fueron inoculados con una dosis infectiva de ODVs se puede calcular mediante la distribución de Poisson. Para ello, se liberaron los ODVs de una suspensión de  $10^9$  CI/ml obtenidos de larvas de *S. frugiperda* que murieron tras la inoculación con ambos virus. Los resultados de los ensayos de dilución hasta el punto final de estos ODVs se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados del ensayo de la dilución hasta el punto final.

	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Positivos/Total	12/80	11/90	4/86
P(0)	85%	88%	95%
P(1)	14%	11%	5%
P(2)	1%	1%	1%
P(3)	0%	0%	0%

Los pocillos positivos fueron aquellos que contenían al menos una célula con signos patológicos de infección por baculovirus (CIs). P(0) es la probabilidad calculada en cada repetición de tener un pocillo sin signos de infección. P(1), P(2) y P(3) se estimaron mediante la distribución de Poisson y se refieren a la probabilidad de que las células de un determinado pocillo fueran infectadas por uno, dos o tres ODVs, respectivamente.

Se seleccionó una dilución en la que el porcentaje de pocillos sin infección rondó el 90%, lo que se refleja una situación en la que un único ODV será responsable de iniciar infección en aproximadamente un 10% de pocillos infectados y dos o más ODVs serán responsables de la infección en menos de un 1% de pocillos.

Todos los pocillos que fueron infectados a la dilución seleccionada (90% de pocillos sin infección) se analizaron por PCR como se ha descrito anteriormente. En todos los casos se confirmó la presencia de ambos virus (Fig. 8), una situación en la que la teoría probabilística requiere que ambos virus estén presentes en el mismo ODV que inició estas infecciones.

- Ejemplo 3: El intervalo entre la inoculación del primer y segundo virus afecta a la prevalencia en la co-inclusión y co-envoltura de diferentes especies de virus en los insectos infectados

A) Los dos virus utilizados en estos experimentos fueron los siguientes:

- El nucleopoliedrovirus múltiple de *A. californica* (AcMNPV): el genotipo clonado AcC6.
- El nucleopoliedrovirus múltiple de *S. frugiperda* (SfMNPV): el genotipo clonado SfNIC-B.

B) Ventana temporal de susceptibilidad en larvas de *S. frugiperda* con infección dual: efecto sobre la mortalidad larvaria.

Para determinar el efecto del intervalo de tiempo entre infecciones por dos especies de virus diferentes en la mortalidad de los insectos, se inocularon oralmente larvas de cuarto estadio recién mudadas de *S. frugiperda* con una suspensión de  $5 \times 10^7$  CI/ml de un primer virus mediante la técnica de la alimentación de la gota (Hughes y Wood, 1986). Dichos insectos inoculados fueron larvas criadas individualmente en dieta semisintética de laboratorio a 25°C. A las 12, 24, 48 o 72 horas posteriores a la primera inoculación, se permitió que estas mismas larvas se alimentaron con la misma concentración de CIs del segundo virus. En todos los casos, se usaron grupos de 24 larvas por cada tratamiento y el experimento se llevó a cabo por triplicado, utilizando CIs de AcC6 como el primer inóculo de virus y CIs de SfNIC-B como el segundo inóculo y viceversa. Las larvas inoculadas una o dos veces fueron criadas individualmente en dieta semisintética de laboratorio hasta la pupación o la muerte.

La prevalencia de mortalidad debida a la enfermedad de la poliedrosis difirió significativamente entre los tratamientos experimentales (análisis de Varianza: ( $F_{10,672}=230$ ;  $p<0,001$ ) y permitió clasificar los tratamientos en uno de tres grupos que difirieron significativamente en el porcentaje de mortalidad (test de Tuckey de la significación honesta,  $P\leq 0,05$ ) (Fig. 9):

(i) Larvas tratadas sólo con CIs de Ac6: este tratamiento dio como resultado la prevalencia de mortalidad del virus más baja.

(ii) Larvas tratadas sólo con CIs de SfNIC-B, con la administración simultánea de CIs de ambos virus en mezclas, o con CIs de SfNIC-B seguidos de CIs del AcMNPV: todos estos tratamientos dieron lugar de forma análoga a una alta prevalencia de mortalidad.

(iii): Larvas tratadas primero con CIs de Ac6 y posteriormente con CIs del SfMNPV: la prevalencia de mortalidad fue ligera pero significativamente mayor que la observada en las larvas tratadas con Ac6 sólo.



Estos resultados demuestran que, comparados con la infección de ambos virus en el mismo momento, retrasos de 12 – 72 h dieron como resultado una disminución marcada del efecto letal de los CIs de SfNIC-B en los insectos que habían sido tratados previamente con los CIs de Ac6. El retraso de tiempo entre infecciones es un factor importante a la hora de poder optimizar la mortalidad obtenida en la producción de CIs mixtos.

- 5 C) Composición de los CIs producidos en larvas inoculadas con diferentes especies de virus a diferentes intervalos.

El intervalo de tiempo entre los tratamientos de la primera y la segunda inoculación influyó en la proporción de cada virus en la progenie de CI, tal como se determinó mediante extracción de ADN seguida por la cuantificación del ADN de cada virus mediante qPCR utilizando cebadores específicos para cada virus (véase la Tabla 1) tal como se ha descrito anteriormente. El análisis estadístico de estos resultados identificó la presencia de cinco grupos diferentes (Análisis de varianza:  $F_{10,75} = 187,57$ ;  $p < 0,001$ ):

- 10 - (i) AcC6 sólo  
 - (ii) SfNIC-B sólo  
 - (iii) Larvas tratadas con ambos virus de manera simultánea y a todas los tratamientos que implicaban el  
 15 tratamiento inicial con CIs de SfNIC-B  
 - (iv) Larvas tratadas inicialmente con CIs de AcC6 y con CIs de SfNIC-B 12 ó 24 h más tarde  
 - (v) Larvas tratadas inicialmente con CIs de AcC6 y con CIs de SfNIC-B 48 ó 72 h más tarde

Las larvas infectadas inicialmente con CIs de AcC6 y 24 ó 48 horas más tarde con SfNIC-B produjeron una progenie de CIs que comprendían aproximadamente una proporción 1:1 de cada virus. Cuando las larvas se inocularon con dos especies de virus diferentes, siempre hubo presencia de ambos virus en la progenie de CIs recogidos de los insectos muertos por causa de los virus.

- 20 D) Efecto de co-envolver diferentes virus en ODVs y de la co-inclusión en CIs.

Se analizó la composición viral de los ODV mediante la técnica de ensayo de placa, al igual que en el Ejemplo 2. Al incrementar el tiempo transcurrido entre la primera y la segunda inoculación, la proporción de genomas (viriones) de una sola especie o de ambas especies juntas varió según el intervalo entre inoculaciones y la identidad del primer o segundo virus (Fig. 11). Por ejemplo, una inoculación primero con CIs de AcC6 seguida 24 h más tarde por la inoculación con SfNIC-B dio como resultado una progenie de CIs que comprenden aproximadamente un 50% de genomas de AcC6 y un 50% de genomas de SfNIC-B, quedando comprendidos ambos virus dentro de viriones mixtos en aproximadamente un 50% de los ODVs.

30 **Referencias bibliográficas**

Ahn, M., Song, M., Oh, E., Jamal, A., Kim, H., Ko, K., Choo, Y., Kim, B. & Ko, K. (2008) Production of therapeutic proteins with baculovirus expression system in insect cell. *Entomological Research* 38: S71-S78.

Arella, M., Devauchelle, G. & Belloncik, S. (1983) Dual infection of a lepidopteran cell line with the cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) and the Chilo iridescent virus (CIV). *Annales de l'Institut Pasteur / Virologie* 134: 455-463.

- 35 Argaud, O., Croizier, L., López-Ferber, M. & Croizier, G. (1998) Two key mutations in the host-range specificity domain of the *p143* gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus are required to kill *Bombyx mori* larvae. *Journal of General Virology* 79: 931-935.

Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., López-Ferber, M. & Possee, R.D. (1994) The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 202: 586-605.

- 40 Burges, H.D., Croizier, G. & Huber, J. (1980) A review of safety tests on baculoviruses. *Entomophaga* 25: 329-339.

Caballero, P., Zuidema, D., Santiago-Álvarez, C., Vlak, J.M., 1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocontrol Science and Technology*, 2: 145-157.

- 45 Clavijo, G., Williams, T., Simón, O., Muñoz, D., Cerutti, M., López-Ferber, M. & Caballero, P. (2009) Mixtures of complete and *pi1*- and *pi2*-deficient genotypes are required for increased potency of an insect nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology* 83: 5127-5136.

Croizier, G., Croizier, L., Argaud, O. & Poudevigne, D. (1994) Extension of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis-virus host range by interspecific replacement of a short DNA-sequence in the *P143* helicase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91: 48-52.

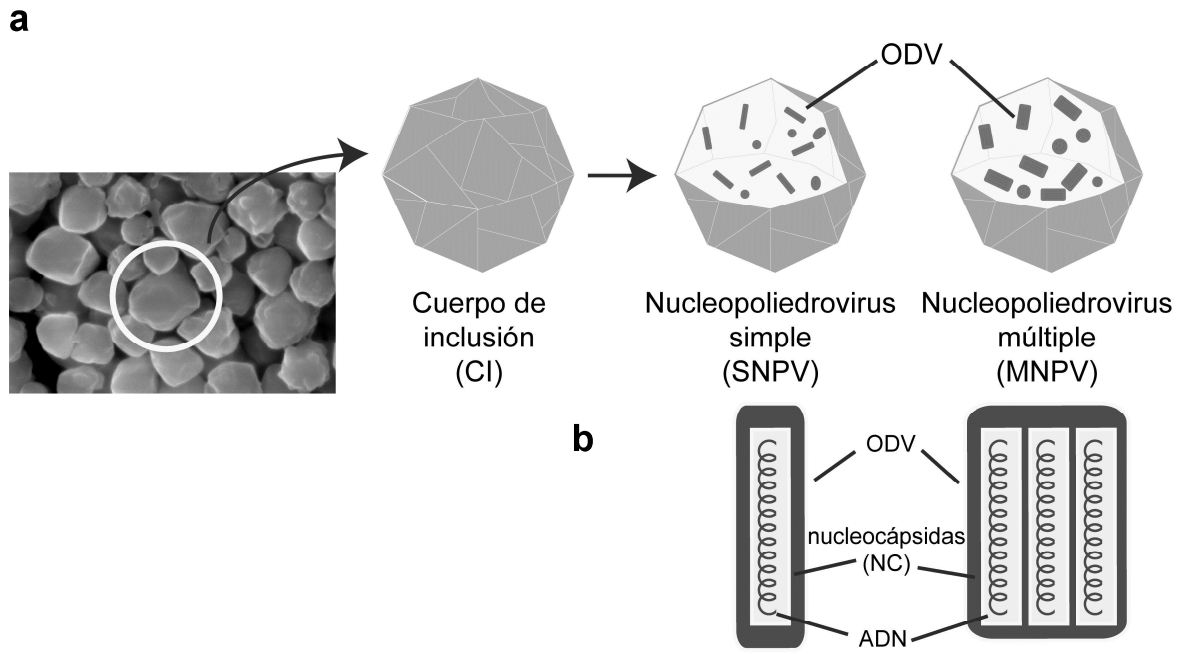
- Garzon, S. & Kurstak, E. (1972). Infection double inhabituelle de cellules d'un arthropode par le virus de la polyédrie nucléaire (VPN) et le virus irisant de *Tipula* (TIV). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. D 275, 507-509.
- Gröner, A. 1986. Specificity and safety of baculoviruses. In *The Biology of Baculoviruses*. Vol. I. Granados, R.R. and Federici, B.A. (eds). Boca Raton, FL.: CRC Press, pp. 177-202.
- 5 Hamblin, M., Vanbeek, N.A.M., Hughes, P.R. & Wood, H.A. (1990) Cocclusion and persistence of a baculovirus mutant lacking the polyhedrin gene. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 3057-3062.
- Harper, D.M. 2009. Currently approved prophylactic HPV vaccines. *Expert Review of Vaccines* 8: 1663-1679.
- Herniou, E.A., Olszewski, J.A., O'Reilly, D.R. & Cory, J.S. (2004) Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *Journal of Virology* 78: 3244-3251.
- 10 Hitchman, R.B., Locanto, E., Possee, R.D. & King, L.A. (2011) Optimizing the baculovirus expression vector system. *Methods* 55: 52-57.
- Hughes, P.R. & Wood, H.A. (1986) *In vivo* and *in vitro* bioassay methods for baculoviruses. In *The Biology of Baculoviruses*. Vol. II. Granados, R.R. and Federici, B.A. (eds). Boca Raton, FL.: CRC Press, pp. 1-30.
- 15 Inceoglu, A.B., Kamita, S.G., & Hammock, B.D. (2006) Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. *Advances in Virus Research*. 68: 323-360.
- Jarvis, D.L. Baculovirus-insect cell expression systems (2009). *Methods Enzymol.* 463:191-222.
- Jiang, H., Han, Y., Hu, L., Zhang, J. & Hu, Y. (2008) Advances in application of recombinant insect viruses as biopesticides. *Acta Entomologica Sinica* 51: 322-327.
- 20 Kaikkonen, M.U., Yla-Herttuala, S. & Airene, K.J. (2011) How to avoid complement attack in baculovirus-mediated gene delivery. *Journal of Invertebrate Pathology* 107: S71-S79.
- Kamita, S.G. & Maeda, S. (1996) Abortive infection of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in Sf-9 cells after mutation of the putative DNA helicase gene. *Journal of Virology* 70: 6244-6250.
- Kanthong, N., Khemnu, N., Pattanakitsakul, S.-N., Malasit, P. & Flegel, T. (2010) Persistent, triple-virus co-infections in mosquito cells. *BMC Microbiology* 10: 14.
- 25 Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D. Berger, E.R. Small, E.J. Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R. Sims, R.B. et al. 2010. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *New England Journal of Medicine* 363: 411-422.
- King, L.A. & Possee, R. (1992) The baculovirus expression system. A laboratory guide. London, United Kingdom: Chapman & Hall.
- 30 Kondo, A. & Maeda, S. (1991) Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis-virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis-virus. *Journal of Virology* 65: 3625-3632.
- Leuschner, R.G.K., Robinson, T.P., Hugas, M., Cocconcelli, P.S., Richard-Forget, F., Klein, G., Licht, T.R., Nguyen-The, C., Querol, A., Richardson, M., Suarez, J.E., Thrane, U., Vlak, J.M. & von Wright, A. (2010) Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends in Food Science & Technology* 21: 425-435.
- 35 Lynn D.E. (2007) Available lepidopteran insect cell lines. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 388: 117-138.
- López-Ferber, M., Simón, O., Williams, T., Caballero, P. (2003). Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 2249-2255.
- Madhan, S., Prabakaran, M. & Kwang, J. (2010) Baculovirus as vaccine vectors. *Current Gene Therapy* 10: 201-213.
- 40 McClintock, J.T. & Dougherty, E.M. (1987) Superinfection of baculovirus-infected gypsy-moth cells with the nuclear polyhedrosis viruses of *Autographa californica* and *Limantria dispar*. *Virus Research* 7: 351-364.
- Miller, D.W. (1991) Mixed baculovirus compositions and uses thereof. US Patent 5071748. Issued December 10, 1991.
- 45 Moscardi, F. (1999) Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 44: 257-289.

- Muñoz, D., Castillejo, J.I. & Caballero, P. (1998) Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population of *Spodoptera exigua*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4372-4377.
- 5 Parks, W.P., Casazza, A.M., Alcott, J. & Melnick, J.L. (1968) Adeno-associated satellite virus interference with replication of its helper. *Journal of Experimental Medicine* 127: 91-108.
- Rohrmann, G.F. (2008) *Baculovirus Molecular Biology*. Bethesda, MD: National Library of Medicine, USA.
- Salem, T., Cheng, X.H. & Cheng X.W. (2012) AcMNPV enhances infection by ThorNPV in Sf21 cells and SeMNPV in Hi5 cells. *Archives of Virology* 157: 1875-1885.
- 10 Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M. & Caballero, P. (2004a) Virus entry or the primary infection cycle are not the principal determinants of host specificity of *Spodoptera* spp. nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology* 85: 2845-2855.
- Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M. & Caballero, P. (2004b) Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: High prevalence of deletion genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 5579-5588.
- 15 Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M. & Caballero, P. (2005a) Functional importance of deletion mutant genotypes in an insect nucleopolyhedrovirus population. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4254-4262.
- Simón, O., Chevenet, F., Williams, T., Caballero, P. & López-Ferber, M. (2005b) Physical and partial genetic map of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) genome. *Virus Genes* 30: 403-417.
- 20 Simón, O., Palma, L., Beperet, I., Muñoz, D., López-Ferber, M., Caballero, P. & Williams, T. (2011) Sequence comparison between three geographically distinct *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus isolates: Detecting positively selected genes. *Journal of Invertebrate Pathology* 107: 33-42
- Simón, O., Palma, L., Williams, T., López-Ferber, M. & Caballero, P. (2012) Analysis of a naturally-occurring deletion mutant of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus reveals *sf58* as a new per os infectivity factor of lepidopteran-infecting baculoviruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 109: 117-126.
- 25 Summers, M.D. & Smith, G.E. (1987) A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell-culture procedures. *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin*: 1-56.
- Sun, X.I. & Peng, H.Y. (2007) Recent advances in biological control of pest insects by using viruses in China. *Virologica Sinica* 22: 158-162.
- 30 Van Oers, M. 2011. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *Journal of Invertebrate Pathology* 107: S3-S15.
- Watanabe, S., Ohta, M., Kokuho, T., Mori, H. & Inumaru, S. (2010) Rapid and accurate method for isolation of recombinant baculovirus with an expanded host range. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110: 66-68.
- 35 Yanase, T., Yasunaga, C., Hara, T. & Kawarabata, T. (1998) Coinfection of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda* cell lines with the nuclear polyhedrosis viruses of *Autographa californica* and *Spodoptera exigua*. *Intervirology* 41: 244-252.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir viriones derivados de cuerpos de inclusión de virus (ODV) mixtos que comprenden genomas de al menos dos especies de baculovirus diferentes co-envueltos en el mismo virión, y/o para producir cuerpos de inclusión de virus en los que está incluido al menos uno de dichos viriones derivados de cuerpos de inclusión de virus mixtos, en el que todos los baculovirus que infectan son nucleopoliedrovirus múltiples, y en el que los cuerpos de inclusión de virus se producen mediante las etapas de:
- a. coinfectar larvas o células en cultivo de una especie de insecto con los genomas de baculovirus que deben quedar co-envueltos en al menos uno de los viriones derivados de cuerpos de inclusión producidos, en donde cada genoma de baculovirus pertenece a una especie concreta que puede estar en el mismo o en un ODV diferente que la otra;
  - b. criar las larvas infectadas o cultivar las células hasta que se produzca la muerte por poliedrosis;
  - c. aislar los CIs producidos a partir de las larvas o de las células cultivadas tras su muerte;
- en donde las células o larvas son susceptibles de ser infectadas por uno cualquiera de los baculovirus cuyos genomas deben quedar co-envueltos en al menos uno de los viriones derivados de cuerpos de inclusión producidos.
2. El método según la reivindicación 1, en el que al menos dos de los diferentes genomas presentes en un mismo ODV son genomas que son cada uno de ellos capaces de dar lugar a una partícula infectiva de baculovirus, capaz de producir un ciclo viral completo en una célula sin necesidad de coinfección con un segundo baculovirus que comprende un genoma diferente.
3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los genomas de baculovirus se proporcionan o inoculan a las células de insecto o a las larvas de insecto formando nucleocápsidas, y en el que los genomas de baculovirus están envueltos
- i) formando viriones brotados (BVs), o
  - ii) formando ODVs, ODVs que pueden estar incluidos en cuerpos de inclusión o formando ODVs libres no incluidos en cuerpos de inclusión.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en el que los genomas de baculovirus están envueltos formando ODVs incluidos en cuerpos de inclusión y en el que al menos uno de los cuerpos de inclusión inoculados comprende al menos un ODV donde están co-envueltos genomas de más de una especie.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, en el que las nucleocápsidas con el genoma de un baculovirus perteneciente a una especie concreta se inoculan a las células de insecto o larvas de insecto
- a. simultáneamente con las nucleocápsidas con el(los) otro(s) genoma(s) de baculovirus que han de quedar incluidos con el primero en al menos un virión derivado de cuerpo de inclusión, o
  - b. separadamente en el tiempo con respecto a las nucleocápsidas con el(los) otro(s) genoma(s) de baculovirus que han de quedar incluidos con el primero en al menos un virión derivado de cuerpo de inclusión.
6. El método según la reivindicación 5, en el que las nucleocápsidas con el genoma de un baculovirus de una especie concreta se inoculan al cultivo de células de insecto o a las larvas de insecto dentro de un intervalo de tiempo inferior a 48 horas con respecto a las primeras nucleocápsidas inoculadas con el genoma de una especie de baculovirus diferente.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 6, en el que las nucleocápsidas se inoculan a larvas de insecto y en el que
- i) las nucleocápsidas están en forma de viriones brotados (BVs) u ODVs libres y se inoculan a las larvas de insecto mediante inyección, o
  - ii) las nucleocápsidas se inoculan a las larvas de insecto por vía oral y están envueltas formando ODVs incluidos en cuerpos de inclusión.
8. El método para producir CIs mixtos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende las etapas de

- a) coinfectar larvas de insecto con dos especies de baculovirus diferentes, mediante inoculación simultánea, o inoculación secuencial con un retraso de tiempo inferior al tiempo necesario para la manifestación de los signos de la primera infección, y
- 5 b) criar las larvas inoculadas en las condiciones necesarias hasta que se aprecia enfermedad evidente o muerte por poliedrosis.
9. Un método para producir CIs mixtos de la variante de baculovirus SeUS2-A del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* (SeMNPV) y de la variante SfNIC-C del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV), caracterizado por la coinfección de ambos baculovirus en larvas de cuarto estadio de *Spodoptera exigua*, y la subsiguiente cría de los insectos hasta que se aprecia enfermedad evidente o muerte por poliedrosis.
- 10 10. Un método para la producción de ODVs mixtos y CIs mixtos de la variante AcC6 del nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) y de la variante SfNIC-B del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV), caracterizado por la coinfección de ambos baculovirus en larvas de *Spodoptera frugiperda*, y la subsiguiente cría de los insectos hasta que se aprecia muerte por poliedrosis
- 15 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las nucleocápsidas se inoculan a larvas de insecto y en el que los CIs producidos se aíslan triturando en agua las larvas muertas, filtrando la suspensión resultante, permitiendo o provocando que los CIs se separen de la suspensión y se depositen por sedimentación, centrifugación o una técnica relacionada, y separando el sedimento de CIs del sobrenadante.
- 20 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las nucleocápsidas se inoculan a larvas de insecto y que incluye una etapa adicional en la que se obtienen ODVs libres, no incluidos, sometiendo los CIs aislados producidos a lisis alcalina.
- 25 13. Un virión derivado de cuerpo de inclusión de virus (ODV) mixto que comprende genomas de al menos dos especies de baculovirus diferentes co-envueltos en el mismo virión, en el que los genomas son genomas de nucleopoliedrovirus múltiples.
- 30 14. Un ODV según la reivindicación 13, que contiene al menos una copia del genoma de la variante AcC6 del AcMNPV y al menos una copia del genoma de la variante SfNIC-B del SfMNPV.
- 35 15. Un CI de virus mixto, en el que está incluido al menos un virión derivado de cuerpo de inclusión de la reivindicación 13.
16. Una composición que comprende los CIs mixtos de la reivindicación 15 y/o ODVs mixtos de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14.
- 40 17. Una composición según la reivindicación 16, que adicionalmente comprende CIs, cada uno de ellos conteniendo genomas de una sola especie de virus.
18. Uso de los CIs mixtos reivindicados en la reivindicación 15 o de una composición como la reivindicada en las reivindicaciones 16 o 17, para el control de plagas de insectos.
- 45 19. Uso según la reivindicación 18, para el control simultáneo de dos o más especies de insectos plaga.



**Fig. 1**



Fig. 2

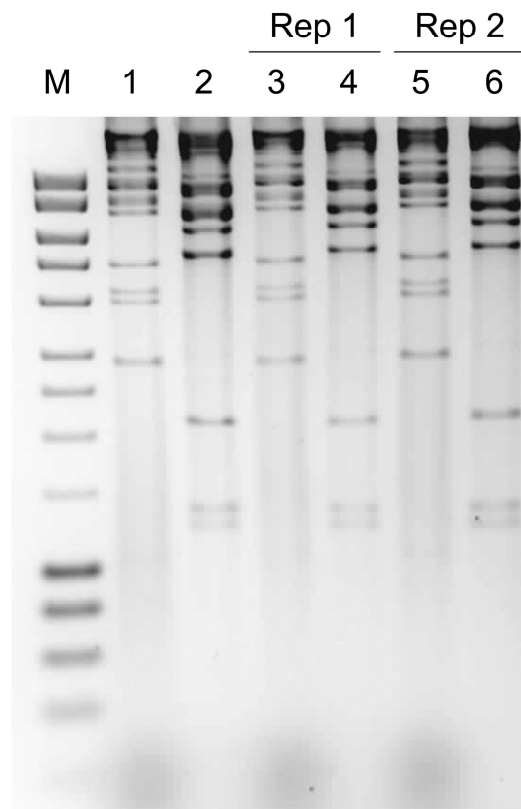


Fig. 3

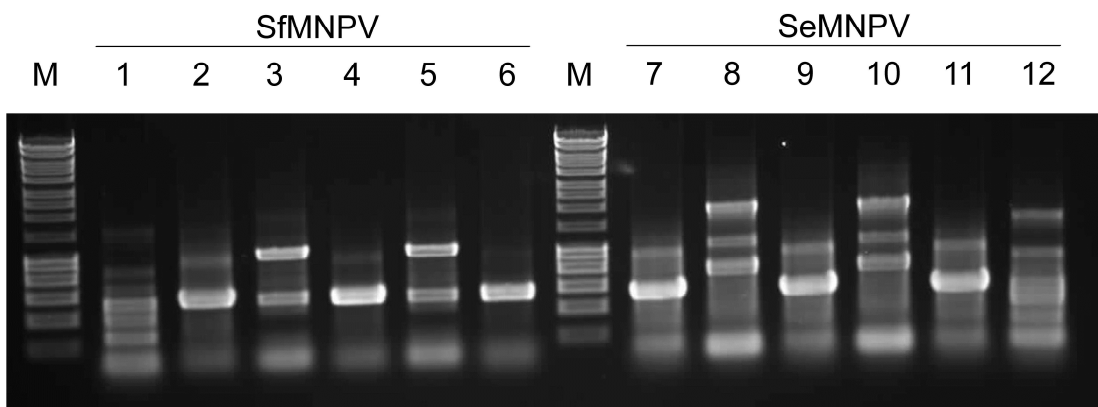
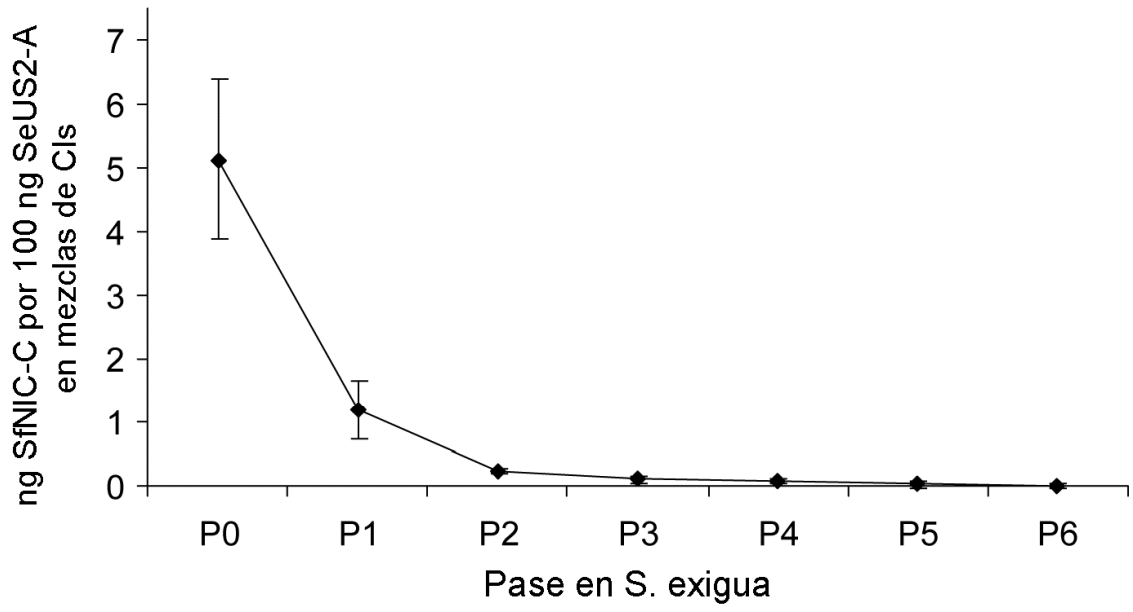


Fig. 4



**Fig. 5**



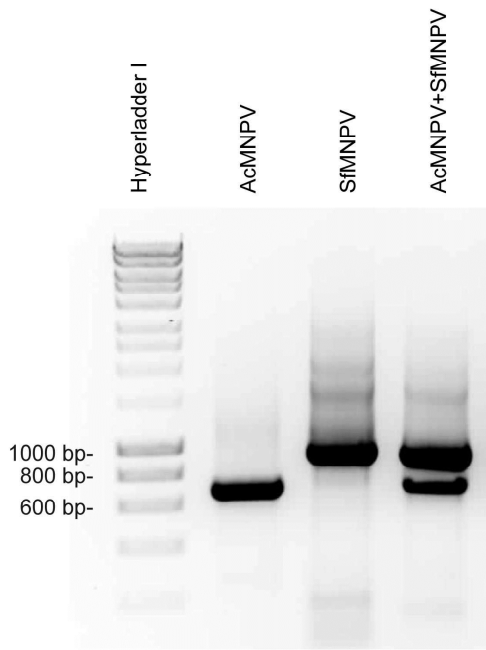


Fig. 6

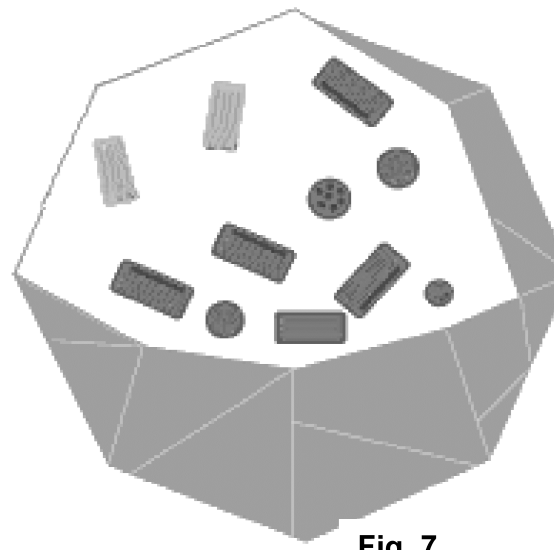


Fig. 7

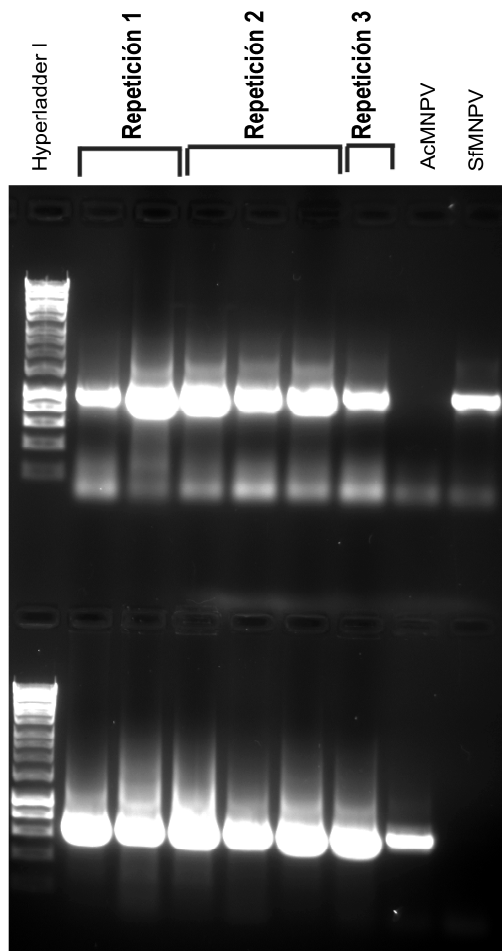


Fig. 8

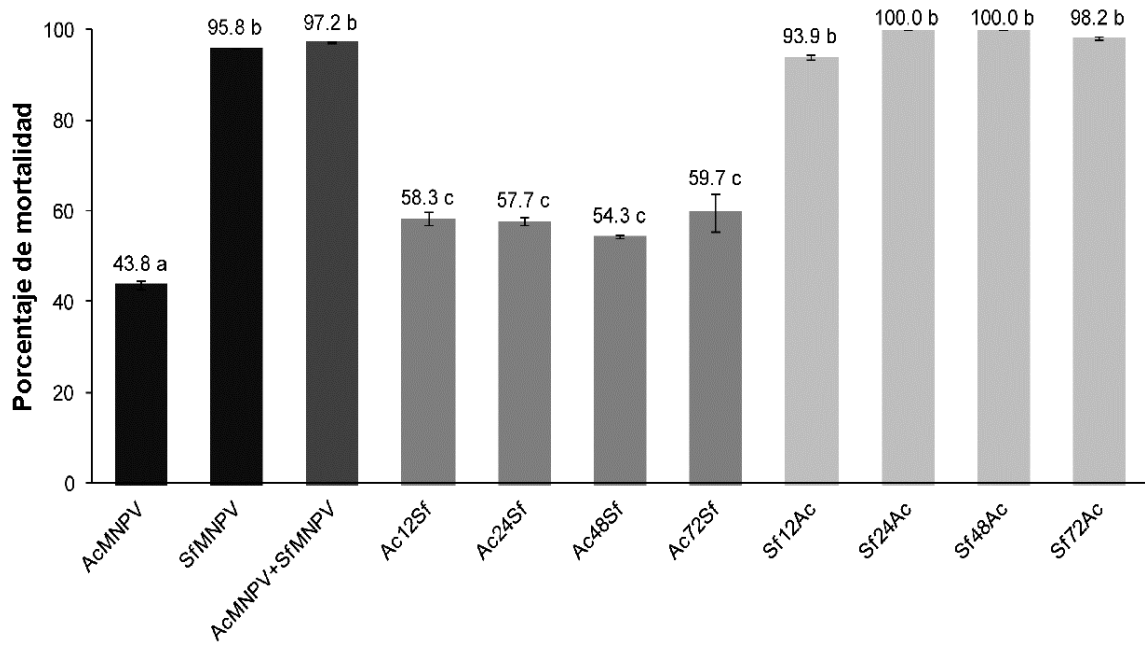


Fig. 9

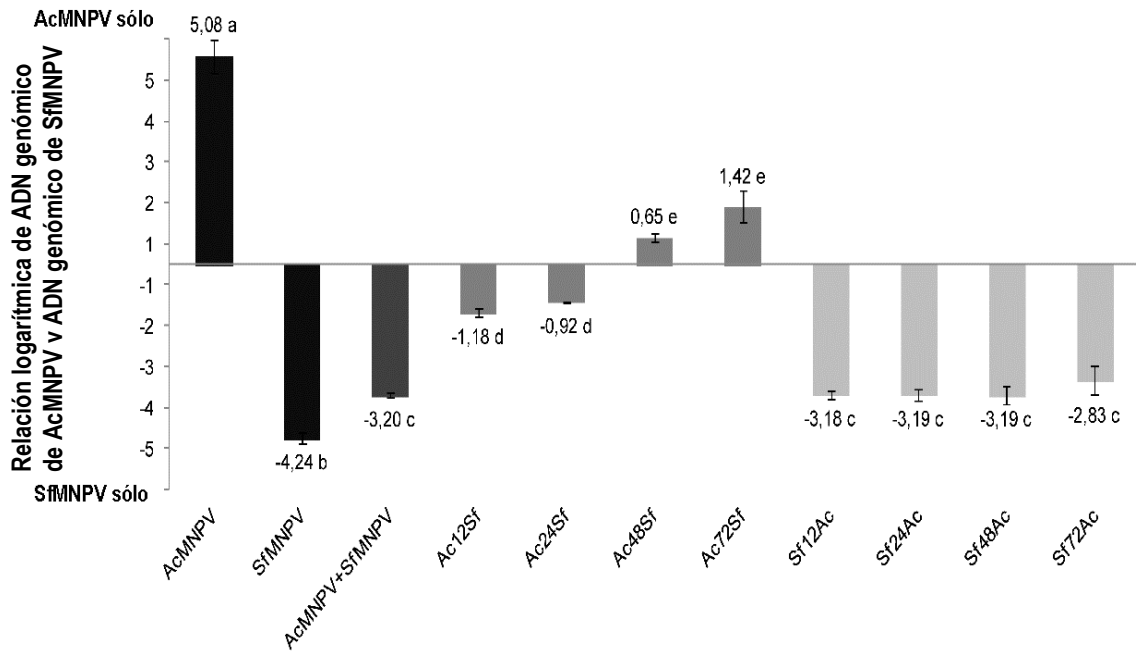


Fig. 10

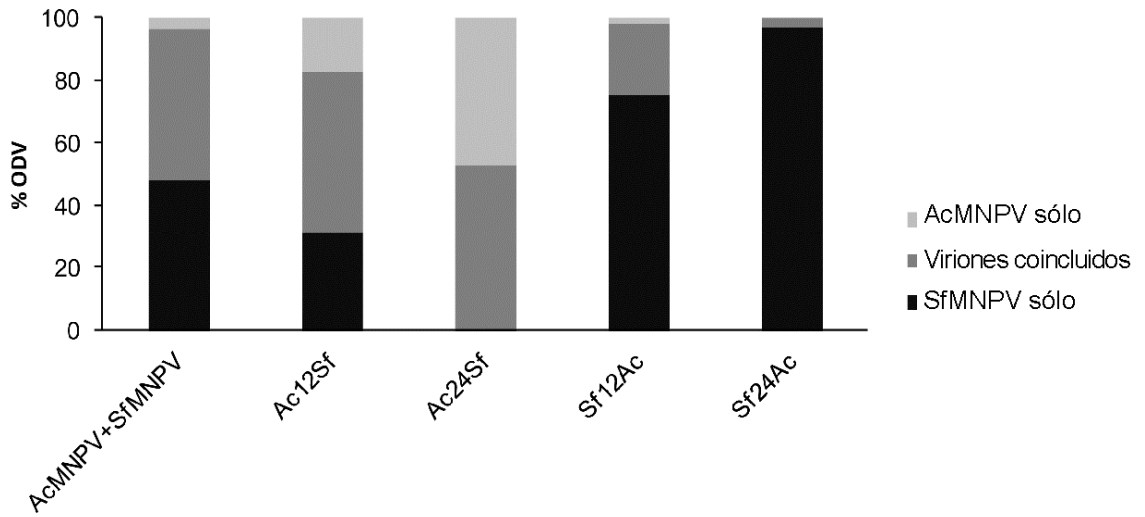


Fig. 11

# ES 2 693 153 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA  
Consejo Superior De Investigaciones Científicas  
Instituto de Ecología, A.C.  
ASSOCIATION POUR LA RECHERCHE ET LE DEVELOPPEMENT DES METHODES ET PROCESSUS  
INDUSTRIELS (ARMINES)

<120> PRODUCCIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN DE VIRUS QUE INCLUYEN VIRIONES QUE CONTIENEN  
GENOMAS DE DIFERENTES ESPECIES DE BACULOVIRUS QUE PUEDEN USARSE PARA COMBATIR PLAGAS DE  
INSECTOS

<130> PCT-724

<160> 16

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<222> 1..20  
<223> /tipo\_molécula="ADN"  
/nota="Cebador directo Seie0.1, para cuantificar ADN de SeUS2-A"  
/nota="Basado en el gen ie0 de SeUS2-A (nt 131937-131959)"  
/organismo="Secuencia artificial"

<400> 1  
ctatagctcg acgctcggtg 20

<210> 2  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<222> 1..20  
<223> /tipo\_molécula="ADN"  
/nota="Cebador inverso Seie0.2, para cuantificar ADN de SeUS2-A"  
/nota="Basado en el gen ie0 de SeUS2-A (nt 132447-132428)"  
/organismo="Secuencia artificial"

<400> 2  
atcgtcttcg ataccgcgag 20

<210> 3  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<222> 1..20  
<223> /tipo\_molécula="ADN"  
/nota="Cebador directo Sfie0.1 para cuantificar ADN de SfNIC-C"  
/nota="Basado en el gen ie0 de SfNIC-B (nt 130128-130147)"  
/organismo="Secuencia artificial"

<400> 3  
atgagtatta atcatgattc 20

<210> 4  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

# ES 2 693 153 T3

<220>  
<221> origen  
<222> 1..20  
<223> /tipo\_molécula="ADN"  
/nota="Cebador inverso Sfie0.2, para cuantificar ADN de SfNIC-C"  
/nota="Basado en el gen ie0 de SfNIC-B (nt 129612-129631)"  
/organismo="Secuencia artificial"

<400> 4  
tcttggcaaa tgttacactg 20

<210> 5  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<222> 1..20  
<223> /tipo\_molécula="ADN"  
/nota="Cebador directo qSe5.F, para cuantificar ADN de SeUS2-A (qPCR)"  
/nota="Basado en el gen sf5 de SeUS2-A (nt 6274-6293)"  
/organismo="Secuencia artificial"

<400> 5  
agcagcgagc caatgcagta 20

<210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<222> 1..20  
<223> /tipo\_molécula="ADN"  
/nota="Cebador inverso qSe5.R, para cuantificar ADN de SeUS2-A (qPCR)"  
/nota="Basado en el gen se5 de SeUS2-A (nt 6354-6373)"  
/organismo="Secuencia artificial"

<400> 6  
cttcttgcaa ccgctcgttc 20

<210> 7  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<222> 1..20  
<223> /tipo\_molécula="ADN"  
/nota="Cebador directo qSfCcath.2F, para cuantificar ADN de SfNIC-C (qPCR)"  
/nota="Basado en la proximidad de la región delecionada de SfNIC-C (nt 18717-18736)"  
/organismo="Secuencia artificial"

<400> 7  
acgcccggtt tagtaacagc 20

<210> 8  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<222> 1..20  
<223> /tipo\_molécula="ADN"  
/nota="Cebador inverso qSfCsf36.2R para cuantificar ADN de SfNIC-C (qPCR)"  
/nota="Basado en la proximidad de la región delecionada de SfNIC-C (nt 35150-35169)"

# ES 2 693 153 T3

```

      /organismo="Secuencia artificial"

<400> 8
taaaactatt tcttgcaatc                                20

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> origen
<222> 1..20
<223> /tipo_molécula="ADN"
      /nota="Cebador directo Ac.1, para cuantificar ADN de AcC6 (qPCR)"
      /nota="Basado en el gen único ac97 de AcC6 (nt 84850-84869)"
      /organismo="Secuencia artificial"

<400> 9
gatttgttgg ccgaataacg                                20

<210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> origen
<222> 1..21
<223> /tipo_molécula="ADN"
      /nota="Cebador inverso Ac.2, para cuantificar ADN de AcC6 (qPCR)"
      /nota="Basado en el gen único ac97 de AcC6(nt 84958-84938)"
      /organismo="Secuencia artificial"

<400> 10
tgactctttc acccattgca g                              21

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> origen
<222> 1..20
<223> /tipo_molécula="ADN"
      /nota="Cebador directo Sf.1 para cuantificar ADN de SfNIC-B (qPCR)"
      /nota="Basado en el gen único sf43 de SfNIC-B (nt 42832-42851)"
      /organismo="Secuencia artificial"

<400> 11
acgccgttca aagacacgag                                20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> origen
<222> 1..20
<223> /tipo_molécula="ADN"
      /nota="Cebador inverso Sf.2 para cuantificar ADN de SfNIC-B (qPCR)"
      /nota="Basado en el gen único sf43 de SfNIC-B (nt 42976-42957)"
      /organismo="Secuencia artificial"

<400> 12
ccgctttgcc ttcgacatag                                20
```

## ES 2 693 153 T3

<210> 13  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<222> 1..20  
<223> /tipo\_molécula="ADN"  
/nota="Basado en el gen de la ADN polimerasa de AcC6 (nt 53264-53283)"  
/nota="Cebador directo AcADNpol.1 para detección de ADN de AcC6 en placas de cultivo de células"  
/organismo="Secuencia artificial"

<400> 13  
caaatgtaga atctgtgtcg 20

<210> 14  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<222> 1..20  
<223> /tipo\_molécula="ADN"  
/nota="Basado en el gen de la ADN polimerasa de AcC6 (nt 53968-53949)"  
/nota="Cebador inverso AcADNpol.2 para detección de ADN de AcC6 en placas de cultivo de células"  
/organismo="Secuencia artificial"

<400> 14  
cagccatcac aaacacgcg 20

<210> 15  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<222> 1..20  
<223> /tipo\_molécula="ADN"  
/nota="Basado en el gen de la ADN polimerasa de SfNIC-B (nt 88358-88377)"  
/nota="Cebador directo SfADNpol.3 para detección de ADN de SfNIC-B en placas de cultivo de células"  
/organismo="Secuencia artificial"

<400> 15  
caacgacatc aatagagtgc 20

<210> 16  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<222> 1..20  
<223> /tipo\_molécula="ADN"  
/nota="Basado en el gen de la ADN polimerasa de SfNIC-B (nt 89322-89303)"  
/nota="Cebador inverso SfADNpol.4 para detección de ADN de SfNIC-B en placas de cultivo de células"  
/organismo="Secuencia artificial"

<400> 16  
aaatattgct aagcacatcg 20