

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 170**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C07K 14/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2016 PCT/IT2016/000146**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16194014**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2016 E 16747629 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3303369**

54 Título: **Partícula quimérica vírica del virus de la patata x y uso de la misma para el diagnóstico in vitro del síndrome de Sjögren**

30 Prioridad:

03.06.2015 IT UB20151199

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

07.04.2020

73 Titular/es:

**ENEA - AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE
TECNOLOGIE, L'ENERGIA E LO SVILUPPO
ECONOMICO SOSTENIBILE (50.0%)
Lungotevere G.A. Thaon di Revel 76
00196 Roma (RM), IT y
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LICO, CHIARA;
BASCHIERI, SELENE;
BENVENUTO, EUGENIO;
AVESANI, LINDA;
TINAZZI, ELISA;
BARTOLONI BOCCI, ELENA;
PEZZOTTI, MARIO y
LUNARDI, CLAUDIO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 753 170 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

Partícula quimérica vírica del virus de la patata x y uso de la misma para el diagnóstico *in vitro* del síndrome de Sjögren

5 La presente invención se refiere a una partícula de virus quimérica del virus de la patata X y al uso de la misma en el diagnóstico *in vitro* del Síndrome de Sjögren.

De manera más detallada, la invención se refiere a una partícula de virus quimérica del virus de la patata X, teniendo dicha partícula fusionada a su proteína de la cápside un determinante autoantigénico derivado de lipocalina asociado al Síndrome de Sjögren, y al uso de la misma en el diagnóstico *in vitro* del Síndrome de Sjögren, por ejemplo, usando el método ELISA.

15 El Síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmunitaria con una incidencia del 0,6 % en la población general y una relación mujer:hombre de 9:1. La enfermedad se manifiesta precozmente con afectación de las glándulas exocrinas, sobre todo las glándulas salivales y lagrimales, dando como resultado xerostomía y xeroftalmia. Las manifestaciones sistémicas, caracterizadas por afectación de órganos a nivel cutáneo, articular, pulmonar, renal, pancreático y neurológico, son generalmente menos frecuentes y aparecen más tarde, aunque en un porcentaje que varía entre el 25 y el 92 % de los casos, la afectación neurológica puede representar el síntoma inicial.

20 Teniendo en cuenta la diferente afectación de órganos viscerales y no viscerales, el SS puede manifestarse con síntomas extremadamente diferentes y con una afectación y un grado de discapacidad extremadamente heterogéneos. Algunos pacientes, de hecho, pueden presentar una afectación glandular aislada, con xerostomía y xeroftalmia que varían de leves a graves, cuando la insuficiencia de la glándula y la pérdida de la función de secreción de saliva y/o lágrimas conducen a consecuencias extremas, tales como inflamación y dolor parotídeo, sequedad extrema de la boca con úlceras aftosas, disfagia asociada de forma variable a infecciones de la cavidad oral, así como una alteración importante de la vista con fotofobia, dolor y una afección de blefaritis y/o queratitis que eventualmente conduce a opacificación y ulceración corneal. La afectación sistémica puede caracterizarse por afectación cutánea, en primer lugar, fenómeno de Raynaud, pero también púrpura o vasculitis urticarial; afectación musculoesquelética, caracterizada por artromialgia o artritis, generalmente simétrica y rara vez de carácter erosivo; afectación pulmonar, con tos y/o disnea secundaria, traqueobronquitis seca o intersticiopatía; o afectación renal que varía desde una disfunción tubular asintomática con acidosis tubular hasta insuficiencia renal con un posible resultado que también requiere tratamiento de diálisis. La afectación del tracto gastrointestinal también es variable, con posible pancreatitis autoinmunitaria o asociación con afecciones autoinmunitarias tales como gastritis atrófica, enfermedad celíaca, cirrosis biliar primitiva o hepatitis autoinmunitaria, con el consiguiente conjunto de síntomas asociados, así como afectación neurológica, generalmente ligada a neuropatías periféricas sensitivas o, menos frecuentemente, motoras, con alodinia o hiperalgesia, parestesias y trastornos propioceptivos, o con menos frecuencia a formas centrales, que, sin embargo, se asocian a un mayor grado de discapacidad, como en el caso de vasculitis cerebral, síndromes cerebelosos y lapsus de memoria, o incluso formas manifiestas de demencia o mielitis transversa.

40 Como resultado de sus manifestaciones clínicas multifacéticas e incapacitantes, aún se desconocen muchos aspectos de la etiopatogenia de la enfermedad, como en el caso de una gran parte de los trastornos autoinmunitarios, aunque se sabe que existe una interacción entre la susceptibilidad genética, en particular, en lo que respecta tanto a los genes de complejo de histocompatibilidad de clase II como a los genes no HLA, y a los factores ambientales desencadenantes, principalmente agentes infecciosos, capaces de desencadenar un proceso inflamatorio que se caracteriza por la autoagresión del sistema inmunitario contra estructuras objetivo específicas, volviéndose crónico el proceso autoinmunitario posteriormente, dando como resultado daño tisular (Lee et al. 2009).

50 Tanto los linfocitos T como los linfocitos B están implicados en la patogenia del SS y en el daño tisular que lo caracteriza. En particular, los linfocitos Th1, Th2 y Th17, así como las células B, están implicados en las diferentes etapas que caracterizan la historia natural de la patología, desde la etapa preclínica hasta la etapa de expresión clínica con síntomas claros y manifiestos. En el SS, los linfocitos Th1 liberan interferón gamma (IFN γ), regulan la inmunidad mediada por células y desempeñan una función en el retraso de la maduración celular influyendo en la organogenia de las glándulas salivales y la expresión de antígenos celulares, con la consiguiente pérdida de auto-tolerancia. Los linfocitos Th2 liberan interleucina 4 (IL-4), que es fundamental en la etapa inicial de la respuesta inmunitaria adaptativa, en particular, para el cambio de isotipo de inmunoglobulina (Ig) y la consiguiente síntesis de autoanticuerpos IgG1 patógenos (Lee et al. 2009). Los linfocitos Th17 constituyen un subconjunto particular de células CD4 de memoria, capaces de secretar citocinas con una potente actividad proinflamatoria que pertenecen a la familia de IL 17 (Bettelli et al. 2008). En vista de la complejidad de las interacciones entre las células y los patrones de citocinas inducidos por estímulos ambientales e implicados en la patogenia del SS, Lee et al. (2009) han planteado la hipótesis de que la enfermedad se desarrolla en tres etapas sucesivas diferentes, dos de las cuales son preclínicas, es decir, asintomáticas y silenciosas, y una etapa es clínica. En la primera etapa, se observa una implicación prevalente del sistema Th1/IFN γ caracterizado por una organogenia retardada de las glándulas salivales, una expresión retardada de antígenos en la superficie de las células acinares, con la consiguiente pérdida de la supresión clonal de los linfocitos B y T, una pérdida de auto-tolerancia y una expresión aumentada de proteínas aberrantes y apoptosis celular. Esto va seguido, en la segunda etapa preclínica (es decir, silenciosa para el paciente y mediada por linfocitos Th2 y Th17 y linfocitos B), de una expresión aumentada de numerosos epítomos a nivel glandular, con la aparición de una infiltración

de leucocitos importante, el desencadenamiento de una respuesta inmunitaria local autorreactiva y el inicio de la síntesis activa de autoanticuerpos. Los efectos de estos fenómenos culminan en la tercera etapa, en la que el proceso autoinmunitario origina un daño funcional clínicamente evidente, que se expresa a través de una reducción en la secreción exocrina del tejido glandular implicado, con los consiguientes síntomas clínicos.

5 Se producen múltiples autoanticuerpos durante el curso del SS: algunos de ellos tienen un valor diagnóstico, otros predicen un posible daño a los órganos y otros tienen un valor pronóstico o poco claro. Con frecuencia se produce positividad de ANA, principalmente con un patrón moteado, anti-ENA Ro/SSA y La/SSB, anticuerpos anti-células del conducto salival, anticuerpos anti-tiroides, anticuerpos anti-células parietales gástricas y anticuerpos antimitocondriales. También se han descrito títulos elevados de anticuerpos anti- α -fodrina, anti-receptores muscarínicos de tipo 3, *anti-anhidrasa carbónica II* y anti-proteasoma. Recientemente, algunos autores también han descrito títulos elevados de anticuerpos anti-lipocalina (Navone et al. 2005), siendo la lipocalina una proteína que demuestra una alta homología de secuencia con α -fodrina, así como con la proteína temprana D del VEB (Epstein-Barr Virus), lo que parece confirmar que es un agente ambiental potencial que desencadena la enfermedad en sujetos genéticamente predispuestos. Dada la estrecha asociación entre el VEB y el SS, también en relación con la alta homología de secuencia que se ha demostrado entre un epítipo proteínico de ese virus y dos autoantígenos relevantes en la enfermedad en sí, es interesante evaluar su papel patógeno y su potencial diagnóstico.

20 Dentro del campo de las enfermedades autoinmunitarias, debido a la gama compleja y variada de síntomas, así como a la presencia de diferentes datos de laboratorio y/o instrumentales, el diagnóstico con frecuencia se basa en una evaluación global de la situación y los criterios para clasificar la enfermedad con frecuencia se usan para respaldar el propio diagnóstico. De hecho, los criterios de clasificación representan parámetros de diagnóstico objetivos, que son fundamentales para garantizar la normalización de los pacientes que se incluyen en estudios clínicos, facilitar el análisis y hacer comparables los resultados de diferentes estudios clínicos, así como permitir una comparación entre
25 pacientes referida a diferentes instalaciones clínicas.

Con respecto al diagnóstico del SS, los criterios de clasificación que todavía se usan más ampliamente hoy en día son los criterios del AECG (American European Consensus Group (Grupo de consenso estadounidense-europeo)) de 2002 (Vitali et al. 2002), que se basan en una evaluación de 6 fenómenos, concretamente: I) síntomas oculares (síntomas de ojos secos durante más de 3 meses o uso de lágrimas artificiales durante más de 3 meses); II) síntomas orales (boca seca durante al menos 3 meses o glándulas salivales inflamadas recurrentemente o persistentemente o necesidad de líquidos para tragar alimentos sólidos); III) signos oculares (ensayo de Shirmer anormal o tinción con rosa de bengala/fluoresceína); IV) características histopatológicas con una puntuación de foco >1 en biopsia de glándulas salivales menores; V) reducción de la salivación, documentada mediante medición del flujo salival o indirectamente con una sialografía parotídea o una gammagrafía de glándulas salivales; y VI) presencia de autoanticuerpos (positividad anti-ENA SSA/Ro y/o SSB/la).

Basándose en los criterios del AECG, con el fin de formular un diagnóstico del SS es necesario cumplir al menos 4 de los 6 criterios enumerados anteriormente, incluyendo necesariamente el criterio histopatológico o la presencia de autoanticuerpos, y al menos 3 de los 4 criterios objetivos. Dadas las grandes diferencias entre los dos procedimientos (biopsia y análisis serológico) en términos de coste e invasividad, en la práctica clínica, cuando se cumplen los otros criterios establecidos por el AECG (ojo seco y boca seca, medidos adecuadamente), se realiza en primer lugar un análisis serológico y solo en el caso de que este último sea negativo, se realizará una biopsia de glándula salival.

45 En 2012, se introdujeron nuevos criterios de clasificación del ACR (American College of Rheumatology (Colegio estadounidense de reumatología)) (Shiboski et al. 2012) que, en comparación con los criterios del AECG, introducen una simplificación del procedimiento, siendo necesarios cumplir solo 2 de los 3 criterios objetivos identificados. Los criterios que se han de cumplir son: I) signos oculares (tinción con fluoresceína con una puntuación >3); II) características histopatológicas con una puntuación de foco >1 en biopsia de glándula salival menor; III) presencia de autoanticuerpos (anti-ENA SSA/Ro y/o SSB/la positivo o, como alternativa, factor reumatoide positivo o ANA con un título $>1:320$).

A diferencia de los criterios del AECG, los criterios del ACR no tienen en cuenta los síntomas subjetivos del paciente (presencia de xerostomía/xeroftalmia) o las evaluaciones funcionales con respecto a las glándulas salivales principales (medición del flujo salival, sialografía o centellografía), sino solo una evaluación de afectación ocular con un ensayo de tipo cualitativo y la presencia de un espectro más amplio de autoanticuerpos, en particular ANA, que es positivo en un porcentaje de pacientes que varía del 60 al 85 % de los casos (Nardi et al. 2006), en comparación con lo que se ha documentado para anti-ENA SSA/Ro o anti-ENA SSB/la, igual, respectivamente, al 52-67 % o el 49 % (Routsias et al. 2007). Estos criterios sin duda permiten el reconocimiento de sujetos con SS en una etapa más precoz; específicamente, también permiten que el subconjunto de sujetos negativos para anti-ENA SSA/Ro o anti-ENA SSB/la (aproximadamente el 50 % de los sujetos afectados) se diagnostique con la enfermedad. Sin embargo, aún no se han validado en un número grande de estudios de casos europeos y, además, los criterios del AECG de 2002, aunque más estrictos, aún demuestran una mayor especificidad (especificidad de los criterios del AECG del 90,4 % frente a especificidad de los criterios del ACR del 83,5 %; Cornec et al. 2014) y, por tanto, aún se usan más ampliamente.

65 En aras de exhaustividad, dado que los criterios de diagnóstico, a diferencia de los criterios de clasificación, también

dependen de la información derivada del historial médico del paciente, de una evaluación global de los datos de laboratorio e instrumentales del paciente, así como de la experiencia del médico, vale la pena señalar la existencia de un subgrupo de pacientes que son negativos para autoanticuerpos (es decir, ANA, anti-ENA SSA/Ro y anti-ENA SSB/la negativo), pero tienen datos clínicos, de laboratorio e instrumentales globales muy sugestivos y una histología de glándulas salivales que respaldan el diagnóstico de la patología. En particular, para este subconjunto de pacientes, es esencial encontrar nuevos marcadores de diagnóstico que puedan servir para identificar también a las personas afectadas en las que se ha descartado el diagnóstico debido a la ausencia de los marcadores disponibles actualmente. Recientemente se ha propuesto someter a ensayo anticuerpos anti- α -fodrina como marcadores de la patología: hasta ahora, la utilidad de este ensayo se ha confirmado solamente como validación del diagnóstico en presencia de anti-ENA SSA/Ro o anti-ENA SSB/la (Qin et al. 2014).

Con respecto a nuevos marcadores de diagnóstico para el diagnóstico del SS, recientemente se ha demostrado la presencia de autoanticuerpos contra la lipocalina lagrimal humana en el suero de sujetos que padecen SS.

La lipocalina lagrimal, junto con la lisozima y la lactoferrina, es la proteína más representada en las lágrimas humanas, pero también es producida por las glándulas de von Ebner, en la mucosa nasal, en la mucosa traqueobronquial y a nivel de la próstata. Pertenece a la familia de las lipocalinas, proteínas de peso molecular bajo caracterizadas por la capacidad de unirse a pequeñas moléculas hidrófobas, formar complejos con otras macromoléculas solubles para formar macro complejos y unirse a receptores específicos expuestos en la superficie celular para mediar la transducción y la internalización de una señal. La lipocalina lagrimal se une a diversos ligandos, incluyendo fosfolípidos, ácidos grasos, alcoholes, glucolípidos y colesterol, y tiene una función estrechamente asociada al papel de sus ligandos. Previene la evaporación de las lágrimas mediante la unión de ácidos grasos y fosfolípidos, mantiene la integridad corneal a través de una función de barrera, nuevamente en virtud del enlace con los componentes lipídicos de las lágrimas y realiza una acción antimicrobiana, en particular una antifúngica (Gachon et al. 1998). La lipocalina también tiene la función de una enzima y un inhibidor enzimático; representa, de hecho, la principal endonucleasa lagrimal y tiene una actividad inhibidora sobre la cisteína-proteinasa (Glasgow et al. 2011). Se ha sugerido una reducción de la lipocalina lagrimal en todas las enfermedades con secreción lagrimal reducida; además, estudios recientes han demostrado que la concentración de la misma se reduce significativamente durante el curso del SS, mientras que en el caso del síndrome del ojo seco en la edad posmenopáusica, así como en situaciones de queratoconjuntivitis seca no asociadas a SS, la concentración de lipocalina lagrimal demuestra ser sustancialmente comparable a la presente en las lágrimas de los sujetos de control (Caffery et al. 2008).

Como se ha señalado anteriormente, se ha demostrado recientemente la presencia de autoanticuerpos contra lipocalina lagrimal humana en el suero de sujetos que padecen SS (Navone et al. 2005), lo que confirma la asociación estrecha entre la lipocalina lagrimal y la patología. Los títulos de estos anticuerpos no son detectables en el suero de sujetos de control o pacientes con otras patologías autoinmunitarias tales como la artritis reumatoide o LES, lo que confirma la unión selectiva entre la propia proteína y la enfermedad.

El reconocimiento de la lipocalina como un posible autoantígeno para el SS se basó en la selección de una biblioteca de péptidos, con el uso de secuencias peptídicas aleatorias sometidas a ensayo con el suero de pacientes que padecen la patología de interés, SS en este caso específico (Navone et al. 2005). Este método sirvió para revelar una secuencia dodecapeptídica sintética, denominada péptido de Sjögren (GDRDAGSRGLVS (SEQ ID NO: 1)), con una alta homología de secuencia con la lipocalina lagrimal (FEKAAGARGLST (SEQ ID NO: 2) y la α -fodrina, así como con el antígeno de la proteína D del VEB. Esta homología se validó por medio de un ensayo ELISA con anticuerpos purificados por afinidad del suero de pacientes con SS y usando la inmunoprecipitación de lipocalina de un lisado celular y lágrimas, sometidos a ensayo respectivamente con anticuerpos purificados de pacientes y anticuerpos anti-lipocalina comerciales. Por tanto, se planteó la hipótesis de que, en sujetos genéticamente predispuestos, a través de un mecanismo de mimetismo molecular, la infección por VEB o la reactivación de la infección por VEB puede inducir un aumento en la producción de fragmentos de degradación de α -fodrina, como un efecto de la respuesta inmunitaria contra el antígeno temprano D del VEB, con la consiguiente alteración de esta proteína citoesquelética, ya conocida como un autoantígeno importante durante el curso del SS (Qin et al. 2014). Los anticuerpos anti-antígeno D del VEB también parecen unirse a la lipocalina lagrimal, lo que lleva a una modificación funcional de la misma, así como a una reducción en la secreción de la glándula, con consecuencias clínicas obvias.

El ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas) es un método que permite determinar la presencia de anticuerpos específicos para un antígeno dado en el suero de pacientes que padecen la patología de interés. En el caso del SS, identificar un autoantígeno sensible y específico para la enfermedad es de interés considerable, ya que indudablemente hay una parte de pacientes que son diagnosticados tarde o no son diagnosticados con la enfermedad basándose en resultados negativos para anti-ENA SSA/Ro o anti-ENA SSB/la o, usando los criterios de ACR más recientes, ANA. Desde esta perspectiva, como se ha mencionado anteriormente, la lipocalina lagrimal demuestra ser una molécula de interés considerable, dada la estrecha asociación que la molécula tiene con la patología (Caffery et al. 2008) y su papel patógeno demostrado en el desencadenamiento de la enfermedad después de una infección por VEB o la reactivación de la infección por VEB (Navone et al. 2005). Como se ha descrito anteriormente, el péptido de lipocalina (péptido LIP) obtenido mediante síntesis química ya se ha usado para someter a ensayo sueros obtenidos de sujetos de control y sujetos con enfermedades autoinmunitarias, incluyendo SS, artritis reumatoide, LES y esclerodermia, precisamente con el objetivo de validar su sensibilidad y especificidad de diagnóstico, y ha demostrado

ser un autoantígeno potencial de valor diagnóstico significativo.

Sin embargo, un ELISA basado en el uso únicamente del péptido obtenido mediante síntesis química no es completamente fiable, ya que las pequeñas dimensiones y las características fisicoquímicas del propio péptido no pueden garantizar la adhesión al poliestireno de la placa utilizada para el ensayo, lo que altera su reproducibilidad y eficacia. En particular, a pesar del uso de placas de poliestireno altamente específicas para unir péptidos pequeños, el resultado obtenido con experimentos por triplicado no siempre ha demostrado ser reproducible y, en el caso de algunos lotes de placas, no utilizable, dado que los datos obtenidos de la reacción entre el péptido LIP sintético y el suero mostraron un valor más bajo que la absorbancia del sustrato solo, utilizado como el control experimental interno del sistema (el denominado blanco de referencia).

A la luz de lo anterior, existe una necesidad evidente de poder tener nuevos métodos para diagnosticar el SS que puedan superar las desventajas de los métodos conocidos.

El virus de la patata X (PVX, por sus siglas en inglés) pertenece a la familia *Alphaflexiviridae* y al género *Potexvirus*. Es un virus filamentoso y flexible de tipo varilla, con una longitud promedio de 500 nm y un diámetro de aproximadamente 13 nm. Su genoma consiste en una molécula de ARN monocatenario de sentido positivo de 6435 bases de longitud (para la cepa X3, que es la referencia en este caso;

Número de Acceso D00344) y codifica 5 proteínas diferentes: una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp (por sus siglas en inglés), replicasa), tres proteínas de movimiento víricas, identificadas como p8, p12 y p25 (o también proteínas del Bloque Génico Triple, TGBp1, TGBp2 y TGBp3, respectivamente) y la proteína de la cubierta vírica (CP, por sus siglas en inglés) (Figura 1). Con la excepción del gen de replicasa, la expresión de los marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) está regulada por la actividad de varios promotores subgenómicos específicos. El genoma está protegido con capuchón en 5' (es decir, tiene un capuchón de metilguanosa, m7GpppG) y poliadenilado en 3' (tiene una cola de poliA). El virión completamente ensamblado consiste en una molécula de ARN totalmente rodeada por aproximadamente 1300 copias idénticas de CP, que se asocian para formar una espiral alrededor del ácido nucleico vírico con un proceso progresivo. Es por eso que pueden identificarse *in vivo*, durante la replicación dentro de la célula vegetal, viriones de diferentes longitudes correspondientes a las diferentes etapas de progreso en el ensamblaje. Durante la purificación, sin embargo, el protocolo adoptado permite obtener una preparación de partículas que son homogéneas en longitud y tienen un tamaño esperado de 500 nm. El hospedador de elección del virus es la planta de patata, *Solanum tuberosum*, pero PVX es capaz de replicarse e infectar plantas que pertenezcan a la familia de las solanáceas en general, incluyendo las plantas que pertenezcan al género *Nicotiana* y en particular *N. benthamiana*, una planta herbácea anfitetraploide ($2n = 4x = 38$) nativa del oeste de Australia y ahora ampliamente utilizada como planta modelo en experimentos de virología vegetal y en la expresión transitoria de proteínas heterólogas.

El virus viaja desde el sitio de inoculación a través de un movimiento de célula a célula; después llega a los vasos del floema, a través de los cuales se mueve hacia las hojas de los fitómeros por encima de aquellas donde se realizó la inoculación. Los síntomas típicos que produce son manchas cloróticas y después necróticas que corresponden a los loci individuales de infección en las hojas inoculadas y un mosaico clorótico difuso acompañado de hojas enrolladas en las hojas infectadas sistémicamente.

Un enfoque habitualmente utilizado en la agricultura molecular para producir péptidos es fusionar genéticamente la secuencia de interés al gen que codifica la CP de virus vegetales. En el caso del PVX en particular, esto tiene lugar por fusión en el extremo 5' del gen, es decir, el extremo N-terminal de la proteína correspondiente. De esta manera, cuando se traduzca la CP será quimérica, es decir, portará una porción adicional, y cuando se ensamble en el virión maduro producirá partículas de virus quiméricas (CVP, por sus siglas en inglés) que expondrán la porción heteróloga en la superficie del virus (Figura 2b).

Después de la infección vírica, se toman muestras del tejido sistémico sintomático y las CVP se purifican y se usan en los experimentos planificados.

Todo el genoma de PVX se ha clonado, en forma de ADNc, en un vector de expresión para células vegetales denominado plásmido pPVX201 (Baulcombe et al. 1995; figura 3; véase la SEQ ID NO: 3 en la lista adjunta de las secuencias; véase también <http://www.plantsci.cam.ac.uk/research/davidbaulcombe/methods/pvx-expression-vectors/sequences>).

El vector consiste en: el promotor constitutivo fuerte 35S derivado del virus del mosaico de la coliflor, ubicado corriente arriba del ADNc del PVX; y el terminador NOS derivado del gen de nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*, ubicado corriente abajo del ADNc del PVX. Estas dos regiones constituyen las porciones del vector que regulan la expresión del genoma vírico dentro de la célula vegetal. Entre sus elementos más relevantes, el plásmido también tiene un origen de replicación bacteriana y el gen de beta-lactamasa, que le otorga resistencia al antibiótico ampicilina; Esto es útil para la selección de clones bacterianos correctamente transformados. En este vector, además, se inserta un único sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés) corriente arriba del gen de CP para la inserción de ORF adicionales, junto con una copia duplicada del promotor subgenómico de la CP, que tiene la función de dirigir la expresión del ORF adicional insertado mediante clonación en el MCS.

Gracias a este plásmido, que permite modificar fácilmente el genoma vírico, se ha usado PVX ampliamente como un vector de expresión, en plantas, de proteínas heterólogas, la mayoría de interés farmacéutico-biomedicinal, pero sin limitarse a éstas. En este enfoque, la secuencia que codifica la proteína de interés se inserta en el MCS y el plásmido recombinante obtenido de este modo se usa para la inoculación directa en las hojas de la planta de interés. Dentro de sus células, el promotor 35S iniciará la replicación del genoma vírico con la producción de una copia de ARN del ADNc vírico y la traducción de la primera proteína, RdRp. A partir de este momento, la ARN polimerasa vírica guiará la producción de ARN subgenómicos y otras proteínas víricas, junto con la proteína heteróloga de interés, que se producirán libres dentro del citoplasma celular. Como alternativa, con otro procedimiento, que se describe en detalle a continuación, la secuencia de interés puede fusionarse con la proteína de la cubierta del virus.

Con el método mencionado anteriormente, se produjo un PVX quimérico que porta en su superficie el péptido 2F5 (ELDKWAS (SEQ ID NO: 4)) derivado de la proteína de la cubierta gp41 del virus VIH-1 en el laboratorio ENEA para la producción de una vacuna (Marusic et al. 2001 y solicitud de patente RM2000A000327).

Durante la posterior clonación de otros péptidos de interés inmunológico, se identificó *in vivo* un mutante espontáneo derivado de una de estas nuevas quimeras. El virus se había reorganizado de manera de eliminar la secuencia heteróloga adicional, lo que evidentemente lo desestabilizó. Durante este proceso, sin embargo, también perdió una región que consistía en la porción 5' del gen de CP, correspondiente a los 63 nucleótidos que codificaban los primeros 21 aa de la CP y su promotor subgenómico (Figura 4b). El reordenamiento de nucleótidos es de manera de restablecer el ATG de la PC. Esto parece evidente a partir de la alineación de nucleótidos (Figura 5) y proteína (Figura 6) de la CP de tipo silvestre (wt, por sus siglas en inglés) y mutante. A pesar de esta supresión importante, la CP mutante originó un virus estable en las generaciones posteriores y, por tanto, se planteó la hipótesis de que el mutante (denominado PVX-CC) podría usarse para la clonación en fusión con secuencias de CP mucho más largas que las soportadas por la wt CP. Por tanto, la secuencia de este mutante se clonó de forma estable en el vector pPVX201, como un reemplazo para la wt CP, originando el plásmido pPVX-CC. En esta operación, también se eliminó el sitio útil para la clonación NheI, por lo que el plásmido pPVX-CC se modificó adicionalmente para facilitar la clonación posterior insertando el sitio de restricción SmaI/XmaI único, con una secuencia de nucleótidos CCCGGG, correspondiente a los aminoácidos prolina y glicina (Figura 4c). La secuencia de nucleótidos y proteínas de la nueva CP, que origina un virus denominado PVX-Sma (Lico et al. 2006), se modificó adicionalmente en comparación con CP-CC, como es evidente a partir de la alineación de nucleótidos (Figura 7) y proteína (Figura 6). El nuevo mutante es estable en las generaciones posteriores y muestra un estado físico y síntomas normales *in vivo*.

Desde el punto de vista de su aplicación, se conoce el uso del mutante para clonar un péptido antimicrobiano de amplio espectro (Donini et al. 2005) y un péptido derivado del virus de la gripe para una nueva formulación de vacuna (Lico et al. 2009).

De acuerdo con la presente invención, el plásmido pPVX-Sma se usó para insertar, en el extremo 5' del gen CP-Sma, la secuencia que codifica el péptido LIP. El plásmido obtenido de este modo se usó después para producir partículas víricas quiméricas de PVX que exponen, como la proteína de la cápside, la proteína de fusión que contiene la proteína de la cápside-Sma y el péptido LIP.

Se descubrió que la partícula de virus quimérica de PVX de acuerdo con la presente invención puede usarse ventajosamente para el diagnóstico *in vitro* del SS, en particular usando el método ELISA.

Una comparación entre los resultados del ELISA usando el péptido sintético y el péptido montado en el armazón vírico de PVX mostró una sensibilidad, es decir, la capacidad de identificar pacientes afectados por la enfermedad, del 84,7 % y del 97,1 %, respectivamente; mientras que la especificidad, es decir, la capacidad de identificar correctamente sujetos sanos es igual al 90,0 % en ambos sistemas.

El análisis realizado en un subgrupo de pacientes con SS que se caracterizaron por un perfil de anticuerpos ANA-negativos y que se reconocieron como que tenían la enfermedad basándose en la presencia de pruebas histopatológicas extraídas de la biopsia de la glándula salival utilizada para diagnosticar la enfermedad fue de interés particular. En estos pacientes, el ensayo ELISA realizado con las partículas víricas quiméricas de acuerdo con la presente invención demostró una mayor sensibilidad que el mismo ensayo ELISA con el péptido sintético, es decir, del 98,7 % frente al 75 %. Los datos para sujetos ANA-negativos son de interés particular, puesto que en este subgrupo de pacientes las pruebas de un ensayo positivo para este nuevo autoantígeno permitirían evitar depender de una biopsia de glándula salival con el fin de conseguir certeza diagnóstica, con ahorros considerables en términos de costes y tiempos (tiempo para programar la biopsia y la espera posterior para el ensayo histológico), así como una menor incomodidad para el paciente.

La materia objeto de la presente invención, por tanto, se refiere específicamente a una proteína de fusión que comprende o que consiste en:

- una porción amino-terminal que consiste en una secuencia peptídica que comprende o que consiste en un determinante antigénico de lipocalina, en la que dicho determinante antigénico de lipocalina puede seleccionarse

entre el grupo que consiste en FEKAAGARGLST (SEQ ID NO: 2), MSFEKAAGARGLST (SEQ ID NO: 5); y
 - una porción carboxi-terminal que consiste en una secuencia peptídica que comprende o que consiste en la proteína de la cápside de un virus PVX, estando dicha proteína de la cápside intacta o suprimida en la porción 5' del gen que codifica la proteína de la cápside de tipo silvestre, estando dicha porción amino-terminal fusionada con dicha porción carboxi-terminal de manera que dicho determinante antigénico esté en marco con dicha proteína de la cápside.

El virus PVX cuya proteína de la cápside se usa puede seleccionarse entre el grupo que consiste en PVX X3, BS, EX, NL4, HB, WS2, ROTH1, XS, UK3, OS, NL1, Taiwán, X4, preferentemente X3.

De acuerdo con una realización particular de la presente invención, la proteína de la cápside utilizada en la proteína de fusión de acuerdo con la presente invención consiste en la siguiente secuencia:

PGTPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLSKIEAIWKDMKVPT
 DTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIKEVCT
 LRQFCMKYAPVWVWMLTNNSPANWQAQGFKPEHKFAAFDFNGVTNPAAIMPKEGLIRPPSEAEEMNAAQTAAAFV
 KITKARQSNDFASLDAAVTR GRITGTTTAEAVVTLPPP (SEQ ID NO: 6). Esta proteína se obtiene mediante supresión en la porción 5' del gen de CP correspondiente a los nucleótidos 1-63 que codifican los aa 1-21 de la CP.

En particular, la proteína de fusión de acuerdo con la presente invención puede tener la siguiente secuencia:

MSFEKAAGARGLSTPGTPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNED

 LSKIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSN
 GISRARLAAAIKEVCTLRQFCMKYAPVWVWMLTNNSPANWQAQGFK
 PEHKFAAFDFNGVTNPAAIMPKEGLIRPPSEAEEMNAAQTAAAFVKITKAR
 AQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP (SEQ ID NO:7)

La presente invención se refiere adicionalmente a un polinucleótido que codifica la proteína de fusión como se ha definido anteriormente. En particular, el polinucleótido puede tener la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 8):

atgtcttttgaaaaggctgctggtgctagaggttgtctactcccgggactcctgccacagctcaggcct
 gttcacatcccggatggggatttcttagtacagcccgtgccatagtagccagcaatgctgtcgcaac
 aatgaggacctcagcaagattgaggctatttgaaggacatgaagggtcccacagacactatggc
 acaggctgctgggacttagtcagacactgtgctgatgtaggatcatccgctcaaacagaaatgatag
 atacaggctcctattccaacggcatcagcagagctagactggcagcagcaattaaagagggtgtgcac
 acttaggcaatgtcatgaagtagctccagtggtatggaactggatgtaactaacaacagctccacct
 gctaactggcaagcacaaggtttcaagcctgagcacaattcgctgcattcgacttctcaatggagtc
 accaaccagctgccatcatgcccagaggggctcatccggccaccgtctgaagctgaaatgaat
 gctgcccactgctgcctttgtgaagattacaaaggccagggcacaatccaacgactttgccagcct
 agatgcagctgtcactcgaggctgatcactggaacaacaaccgctgaggctgtgtcactctaccacc
 accataa

La materia objeto de la presente invención se representa adicionalmente por un vector de expresión que comprende el polinucleótido como se ha definido anteriormente. Además, la presente invención se refiere a una célula hospedadora que comprende el vector de expresión como se ha definido anteriormente.

De acuerdo con una realización adicional, la presente invención se refiere a una secuencia genómica de un virus PVX, comprendiendo dicha secuencia genómica el polinucleótido como se ha definido anteriormente.

Además, la presente invención se refiere a una partícula de virus quimérica del virus de la patata X, caracterizándose dicha partícula de virus quimérica porque comprende, como proteína de la cápside, la proteína de fusión de la presente invención como se ha definido anteriormente, teniendo dicha partícula vírica expuesta, en el exterior de la misma, la porción amino-terminal que comprende o que consiste en el determinante antigénico de lipocalina.

El genoma vírico contenido en la partícula de virus quimérica consiste en la secuencia genómica como se ha definido anteriormente.

5 La presente invención se refiere adicionalmente al uso de la partícula de virus quimérica de acuerdo con la presente invención, o de la proteína de fusión como se ha definido anteriormente, para el diagnóstico *in vitro* del Síndrome de Sjögren, por ejemplo, usando el método ELISA, de tira reactiva o de microchip.

10 Por tanto, la materia objeto de la presente invención se refiere adicionalmente a un kit para el diagnóstico *in vitro* del Síndrome de Sjögren, comprendiendo o consistiendo dicho kit en la partícula de virus quimérica como se ha definido anteriormente, o en la proteína de fusión como se ha definido anteriormente, posiblemente en combinación con reactivos adecuados con fines de detección. Por ejemplo, el kit puede ser un kit de ELISA, de tira reactiva o de microchip.

15 La presente invención se refiere adicionalmente a una planta, que pertenece preferentemente a la familia de las solanáceas, incluyendo *Solanum lycopersicon*, *Solanum tuberosum* y las plantas que pertenecen al género *Nicotiana* y en particular *N. benthamiana*, caracterizándose dicha planta porque comprende dentro de la misma la partícula vírica quimérica como se ha definido anteriormente, o el vector de expresión como se ha definido anteriormente.

20 La presente invención también se refiere a células vegetales de la planta como se han definido anteriormente y que expresan la partícula vírica quimérica como se ha definido anteriormente, o el vector de expresión como se ha definido anteriormente.

25 La materia objeto de la presente invención se refiere adicionalmente al uso de una secuencia peptídica que comprende o que consiste en un determinante antigénico de lipocalina para la preparación de la proteína de fusión como se ha definido anteriormente, la partícula vírica quimérica como se ha definido anteriormente, la planta como se ha definido anteriormente y de células vegetales como se han definido anteriormente.

30 Además, la presente invención se refiere al uso de la planta como se ha definido anteriormente o de las células vegetales como se han definido anteriormente, para la producción de la partícula vírica quimérica como se ha definido anteriormente.

35 La materia objeto de la presente invención se refiere adicionalmente a un proceso para la preparación de la proteína de fusión de acuerdo con la presente invención, comprendiendo o consistiendo dicho proceso en las siguientes etapas:

a) clonar, en un vector, la secuencia peptídica que comprende o que consiste en la proteína de la cápside de un virus PVX, estando dicha proteína de la cápside intacta o suprimida en la porción 5' del gen que codifica la proteína de la cápside de tipo silvestre; y

40 b) clonar una secuencia peptídica que comprende o que consiste en un determinante antigénico de lipocalina, estando dicha secuencia peptídica fusionada con dicha secuencia peptídica que comprende o que consiste en la proteína de la cápside de un virus PVX en el vector resultante de la etapa a), en la que dicho determinante antigénico de lipocalina puede seleccionarse entre el grupo que consiste en FEKAAGARGLST (SEQ ID NO: 2), MSFEKAAGARGLST (SEQ ID NO: 5).

45 El virus PVX que puede usarse de acuerdo con la presente invención puede seleccionarse entre el grupo que consiste en PVX X3, BS, EX, NL4, HB, WS2, ROTH1, XS, UK3, OS, NL1, Taiwán, X4, preferentemente X3.

De acuerdo con una realización particular, dicha proteína de la cápside puede consistir en la siguiente secuencia:

50 MPGTPATASGLFTIPDGDFFSTARAIVASNAVATNEDLSKIEAIWKDMKV
PTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIKEV
CTLRQFCMKYAPVWVWMLTNSPPANWQAQGFKPEHKFAAFDFFNGVTNPAAIMPKEGLIRPPSEAE MNAAQTA
AFVKITKARAQSNDFASLDAV TRGRITGTTTAEAVVTLPPP (SEQ ID NO: 6). La proteína se obtiene mediante supresión en la porción 5' del gen de CP correspondiente a los nucleótidos 1-63 que codifican los aa 1-21 de la CP.

55 La presente invención se refiere adicionalmente a un proceso para la preparación de la partícula vírica quimérica de acuerdo con la presente invención, comprendiendo o consistiendo dicho proceso en la etapa de reemplazar la proteína de la cápside de un virus PVX, en dicho virus PVX, con la proteína de fusión definida anteriormente.

60 El proceso para la producción de la partícula vírica de acuerdo con la presente invención puede comprender o consistir en las siguientes etapas:

a1) infectar una planta, que pertenezca preferentemente a la familia de las solanáceas, incluyendo *Solanum lycopersicon*, *Solanum tuberosum* y plantas que pertenezcan al género *Nicotiana* y, en particular, *N. benthamiana* y *N. tabacum*, con la partícula vírica como se ha definido anteriormente o el vector de expresión como se ha definido anteriormente;

65 b1) cultivar la planta obtenida de acuerdo con la etapa a1);

c) extraer dicha partícula vírica de dicha planta.

La presente invención se describirá a continuación, *a modo de ilustración* de acuerdo con una realización preferida de la misma, con referencia particular a las figuras de los dibujos adjuntos, en las que:

5 la figura 1 muestra una representación en diagrama del genoma del virus de la patata X; RdRp, ARN polimerasa dependiente de ARN; MT, dominio de metiltransferasa; HEL, dominio de helicasa; POL, dominio de polimerasa; 25K/12K/8K, proteínas de movimiento; CP, proteína de la cápside; SGP, promotor subgenómico; ARNsg, ARN subgenómico; capuchón de 7-metilguanina; capuchón terminal 5'; Poli(A): cola de poli(A) 3' terminal.

10 La Figura 2 muestra una representación esquemática de cómo puede modificarse el genoma vírico y cómo se construye una partícula de virus quimérica (CVP). A) modificación mediante inserción génica: la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés se añade al genoma vírico con una duplicación del promotor subgenómico de la CP. B) modificación por fusión génica: la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína/péptido de interés se fusiona con la porción 5' del gen de CP (porción N-terminal de la proteína).

15 R, replicasa vírica; M, proteínas de movimiento; CP, proteína de la cubierta, proteína de la cápside; flecha, promotor subgenómico vírico.

La Figura 3 muestra una representación esquemática del plásmido pPVX201 que contiene el genoma de la subforma PVX del ADNc, 35S, promotor derivado de CaMV, 5'UTR: región no traducida 5'; RdRp, replicasa vírica dependiente de ARN; p8/p12/p25, proteínas de movimiento víricas; prom sg CP, promotor subgenómico de la CP; prom sg2CP, promotor subgenómico duplicado de la CP; CP, proteína de la cubierta; 3'UTR: región no traducida 3'; NOS term, terminador derivado del gen de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*; beta-lactamasa: codificación genética para la beta-lactamasa. Se indican los principales sitios de restricción y su correspondiente posición de nucleótidos en el vector.

20 La Figura 4 muestra una representación esquemática del plásmido que contiene el genoma de PVX en forma de ADNc, tanto las variantes de tipo silvestre como las mutantes con la supresión en 5' del gen de CP. Los paneles posteriores muestran la región que experimenta modificación en detalle, con los principales sitios de restricción, los dos oligonucleótidos (PVX Anterior y Nuevo) utilizados en las reacciones de PCR y sus respectivas posiciones de nucleótidos. A) pPVX201: el plásmido que contiene el genoma silvestre de PVX (origina partículas víricas de tipo silvestre, wt PVX). B) pPVXCC: el plásmido derivado de pPVX201 que contiene el mutante con la supresión N-terminal de la CP. C) pPVX-Sma: el plásmido derivado de pPVX-CC y modificado adicionalmente y utilizado en la presente patente para construir las partículas víricas quiméricas PVX-LIP.

La Figura 5 muestra la alineación de nucleótidos entre el gen de CP de wt PVX (SEQ ID NO: 16) y el de la CP suprimida de PVX-CC (SEQ ID NO: 15).

35 La Figura 6 muestra la alineación de proteína entre la CP de wt PVX (SEQ ID NO: 17), la de la suprimida de PVX-CC (SEQ ID NO: 18) y la suprimida y mutada de PVX-Sma (SEQ ID NO: 19).

La Figura 7 muestra la alineación de nucleótidos entre el gen de CP suprimido de PVX-CC (SEQ ID NO: 15) y el de la CP suprimida y mutada de PVX-Sma (SEQ ID NO: 20).

Ejemplo 1: *Preparación de la partícula vírica quimérica PVX de acuerdo con la presente invención*

40 *Preparación de PVX.LIP*

El plásmido pPVX-Sma se purificó a pequeña escala y se digirió con las enzimas de restricción NheI y XmaI para insertar la secuencia que codifica el péptido LIP en el extremo 5' del gen CP-Sma.

45 Esta secuencia se obtuvo mediante apareamiento *in vitro* de dos oligonucleótidos sintéticos complementarios que portan sitios de hemi-restricción adecuados en sus extremos, para permitir la clonación directamente en el vector vírico receptor, debidamente digerido.

50 El protocolo prevé la dilución en agua de cantidades equimolares de las dos cadenas (sentido y antisentido) y la ebullición de la solución durante 5 minutos; Después de enfriar a temperatura ambiente, las cadenas complementarias se aparearán.

Los oligonucleótidos diseñados son los siguientes:

55 LIP sentido: 5' - CTAGC CTCGAG ATG TCT TTT GAA AAG GCT GCT GGT GCT AGA GGT TTG TCT ACT C - 3' (SEQ ID NO: 9)

LIP antisentido: 5' - CCGGG AGT AGA CAA ACC TCT AGC ACC AGC AGC CTT TTC AAA AGA CAT CTCGAG G - 3'(SEQ ID NO: 10)

60 Los oligonucleótidos sentido y antisentido que codifican el péptido LIP se diseñaron de manera que tuvieran el uso de codones de *Nicotiana benthamiana*, el extremo 5' es compatible con el hemisito de restricción NheI y el extremo 3' es compatible con el hemisito XmaI, de manera que una vez que se haya producido el apareamiento *in vitro* estén listos para la clonación directa en el plásmido pPVX-Sma digerido con NheI-XmaI (Figura 4c). Además, se insertó una serina inmediatamente después de la metionina inicial para mejorar las características de estabilidad de la quimera *in vivo*.

65

El plásmido pPVX-Sma doblemente digerido se purificó a partir del gel de agarosa usando un kit comercial y la cantidad y calidad se volvieron a verificar en gel de agarosa y mediante análisis espectrofotométrico.

5 Una vez completada la reacción de ligadura entre el vector digerido y purificado y los oligonucleótidos apareados *in vitro*, el plásmido recombinante obtenido se inserta en células bacterianas de la cepa XL1-Blue mediante electroporación y se cultiva en placa en un medio selectivo de LB-agar que contiene ampicilina. Las placas se incuban a 37 °C y las colonias resultantes se analizan mediante PCR con oligonucleótidos específicos para la región de nucleótidos del vector PVX que se extiende en forma de horquilla sobre la región clonada (Figura 4):

10 5' anterior 5' AGCAGTCATTAGCACTTC 3' (SEQ ID NO: 11)
3' nuevo 5' CACCTTCATGTCCTTCCA 3' (SEQ ID NO: 12)

15 La banda esperada es de 370 bases. Las colonias positivas se usaron para la purificación a pequeña escala del plásmido y el análisis del mismo mediante secuenciación para verificar la presencia correcta de la secuencia de LIP adicional. El clon positivo identificado se purificó a gran escala y se usó para un primer ciclo de infecciones de plantas de *N. benthamiana*. Las plantas de *N. benthamiana* se cultivaron en invernaderos con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura constante de 24 °C. La intensidad de la luz en los invernaderos es de aproximadamente 16000 lux.

20 Por cada hoja de *N. benthamiana* que se ha de infectar (2 hojas por planta), se prepara una solución que contiene 20 µg de plásmido diluido en 50 µl de agua para la infección primaria, mientras que para las infecciones posteriores se usan 50 µl de extracto en bruto extraído del tejido infectado. La infección se realiza mecánicamente en el lado adaxial (superior) de la hoja frotando ligeramente con los dedos en presencia tanto de la solución preparada como del carburo de silicio o Carborundum (VWR International, Prolabo). La acción de este polvo provoca microabrasiones en la superficie de la hoja, lo que permite que el plásmido entre eficazmente en las células vegetales y se exprese.

25 Después de la aparición de síntomas sistémicos en un tiempo y de una manera similar a PVX-wt, el tejido se usó para:

- 30 1. extraer el ARN vírico, realizar una transcripción inversa a ADN (RT, por sus siglas en inglés) y una PCR, secuenciar el fragmento de PCR y verificar la presencia correcta de la secuencia de LIP a nivel de nucleótidos;
2. derivar un extracto de proteína en bruto con el que repetir un ciclo de infección *in vivo*.

35 Después, todo el proceso se repitió otra vez para determinar la estabilidad del PVX quimérico para LIP durante tres generaciones.

40 Con el fin de determinar la estabilidad del PVX quimérico, entre 6 y 8 días después de la infección, se extrajo ARN de las hojas infectadas sistémicamente por medio del kit RNeasy plant mini kit (Qiagen) (<http://www1.qiagen.com/literature/render.aspx?id=352>) y se realizaron reacciones de RT-PCR usando el kit GeneAmp ARN PCR Kit (Perkin Elmer). El ADNc se sintetizó con oligo d(T) y la PCR se realizó usando los oligonucleótidos 5' anteriores y 3' nuevos. Se seleccionó el ADNc obtenido de este modo y se verificó la presencia de la secuencia correcta que codifica el péptido LIP.

45 Después le siguió una infección a gran escala con la purificación del PVX quimérico (PVX-LIP) y PVX desprovisto del péptido LIP (PVX-wt) como control.

50 Para los fines de la extracción de proteínas, el tejido vegetal, congelado a -80 °C y pulverizado mecánicamente en un mortero enfriado en nitrógeno líquido, se mezcla en un volumen equivalente de solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS 1X) (Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2) y se tritura mecánicamente usando un homogeneizador eléctrico Ultraturrax llevado a la velocidad máxima. Después, el homogeneizado debe centrifugarse a aproximadamente 20000 g durante 3 minutos.

Para la purificación de las partículas víricas quiméricas, se usa el siguiente protocolo.

55 Homogeneizar 50 g de tejido almacenado a -80 °C y pulverizado con un mortero y una mano de mortero en 2 volúmenes de ácido bórico frío 0,5 M pH 7,8 (aproximadamente 200-300 ml); filtrar la mezcla a través de 3 capas de gasa estéril y ajustar el pH a 6,5 con HCl. Después añadir un 0,2 % (p/v) de ácido ascórbico y un 0,2 % (p/v) de sulfito de sodio y dejar en agitación hasta que se disuelva completamente. Retirar las partículas mediante centrifugación a 5500 g durante 20 minutos a 4 °C y dejar el sobrenadante a temperatura ambiente durante 3 horas después de haber añadido 0,15 volúmenes de una solución de nitrato de plata al 0,5 %. Después de repetir la centrifugación a 5500 g durante 20 minutos a 4 °C, permitir que el sobrenadante se asiente durante la noche a 4 °C en 0,2 volúmenes de una solución que contenga NaCl 1 M y PEG al 20 % en ácido bórico 0,5 M pH 7,8. Al día siguiente, precipitar las partículas víricas mediante centrifugación a 8000 g durante 30 minutos a 4 °C y resuspender el sedimento en 10 ml de una solución que contenga ácido bórico 0,5 M, urea 0,5 M, 2-mercaptoetanol al 0,1 %, pH 7,8; centrifugar la mezcla a 8000 g durante 30 minutos a 4 °C. Cargar el sobrenadante que contiene el virus en un cojín de sacarosa al 30 % preparado en agua y centrifugar a 72500 g durante 2 horas y 30 minutos a 4 °C. Por último, resuspender el sedimento en 1 ml de ácido bórico 0,5 M pH 7,8 y, después de dos horas de sedimentación, centrifugar a 6000 g durante 15

minutos a 4 °C. El sobrenadante que contiene el virus después se carga en un gradiente de sacarosa al 10-45 % preparado en ácido bórico y centrifugado a 90000 g durante 1 hora. Las fracciones individuales del gradiente después se analizan para identificar aquellas con el mayor contenido de partículas víricas. El protocolo se extrae de Udhe et al. 2005. El virus purificado se dializó y se concentró por filtración a través de una membrana usando columnas Vivaspín 2 HS (Vivascience, http://teachline.ls.huji.ac.il/72682/Booklets/VIVASPIN_Ultrafiltration_products_II.pdf).

Después, el virus purificado se analizó a través de un gel de poliacrilamida teñido con plata para verificar el grado de pureza de la preparación y la presencia de una banda con un peso superior al de la wt CP debido a la presencia del péptido LIP y se cuantificó leyendo con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar ϵ igual a 1,25 ml/(mg*cm).

También se realizó un ensayo LAL (siguiendo el protocolo proporcionado por pbi International); verificó la presencia de endotoxinas en las preparaciones descritas, presumiblemente debido a una contaminación "ambiental" proporcionada por la instrumentación de laboratorio. Se usó una columna EndoTrap red1/1 (Hyglos) para retirar las endotoxinas, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las partículas víricas PVX-LIP y wt PVX se purificaron a partir de la planta con un rendimiento de 0,12 mg por gramo de tejido fresco.

Preparación de CPMV.LIP

Para la producción de partículas quiméricas derivadas del CPMV (virus del mosaico del caupí) que exponen el péptido LIP, se hizo uso del sistema pEAQ-HT, en el que el precursor de la proteína de la cubierta (VP60) y la proteasa 24K se introducen por separado en dos construcciones de pEAQ para producir partículas similares a los virus vacíos (desprovistos de material genético). La secuencia que codifica el péptido LIP se clonó en el vector mediante ligadura del propio vector digerido con las enzimas NheI y AatII y la secuencia que codifica el péptido obtenido apareando el cebador CPMV-para 5'-CTAGC ACT CCT CCT GCT TTT GAA AAG GCT GCT GGT GCT AGA GGT TTG TCT ACT CCA TTT TCA GACGT - 3' (SEQ ID NO: 13) y el cebador CPMV-inv 5'-C TGA AAA TGG AGT AGA CAA ACC TCT AGC ACC AGC AGC CTT TTC AAA AGC AGG AGG AGT G - 3' (SEQ ID NO: 14). El vector obtenido de este modo, denominado pEAQ-HT-VP60-LIP, permite la exposición del péptido en un bucle BB-BC de la pequeña subunidad de la proteína de la cubierta y de esta manera el péptido queda expuesto en su superficie externa. Posteriormente, los vectores pEAQ-HT-VP60-LIP y pEAQ-HT-24K se sometieron a electroporación en células de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* y ambos se usaron para agroinfiltrar plantas de *N. benthamiana*. En particular, los cultivos bacterianos transformados para los dos vectores se cultivaron por separado en un medio líquido que contenía agentes antibióticos, se precipitaron mediante centrifugación a 4000 g y se resuspendieron en MMA (MES 10 mM pH 5,6, MgCl₂ 10 mM y acetosiringona 100 mM) hasta llegar a una D.O.600 igual a 0,8. Posteriormente, después de 4 h de incubación a temperatura ambiente, se mezclaron volúmenes iguales de las dos suspensiones bacterianas y se usaron para la infiltración, por medio de una jeringuilla sin aguja, de hojas de plantas de *N. benthamiana* de 4 a 5 semanas de edad. Se infiltraron cuatro hojas por planta. Después se tomaron muestras de las hojas infiltradas 6 días después de la infiltración (ppp). Para la expresión del CPMV vacío se realizó el mismo procedimiento con los vectores pEAQ-HT-VP60 y pEAQ-HT-24K.

Para la purificación de las partículas víricas, se procesaron 30 g de hojas infiltradas. El material vegetal se homogeneizó con 4 volúmenes de fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0 que contenía *polivinilpolipirrolidona* al 2 % y un inhibidor de proteasa (Complete EDTA-Free Cocktail, Roche, 04693132001).

El extracto se aclaró mediante filtración con dos hojas de papel Miracloth (Merck Millipore, 475855-1R) y centrifugación posterior (30000 g, 1 h, 4 °C). El sobrenadante se cargó en una resina de intercambio aniónico (DEAE Sephadex™ A-50, GE Healthcare, 17-0180-01), con una relación muestra:resina de 4:1. Después, el flujo continuo se concentró a 4 ml, se centrifugó (10000 g X 10 minutos) y se cargó en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR, GE Healthcare, 28-9356-06) en fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0 que contenía 0,15 M de NaCl a una caudal de 0,8 ml/min. Las fracciones eluidas se analizaron usando gel SDS-PAGE al 12 % teñido con nitrato de plata. Las fracciones que contenían CPMV, LIP y CPMV se unieron por separado y se filtraron con un sistema de filtro centrífugo de 100 kDa (Amicon® Ultra-15, Merck Millipore, UFC910024). Las partículas purificadas se analizaron usando un gel SDS-PAGE al 12 % teñido con nitrato de plata y posteriormente se cuantificaron leyendo la absorbancia con un espectrofotómetro a 280 nm.

Ejemplo 2: Ensayo diagnóstico ELISA usando la partícula vírica quimérica de PVX de acuerdo con la presente invención

Con el objetivo de optimizar la sensibilidad y especificidad de este ensayo diagnóstico y superar los obstáculos metodológicos (tipo de placa), se realizó una evaluación de la conveniencia de realizar un ensayo ELISA que aprovechara simultáneamente el péptido LIP sintético y el péptido LIP expresado por partículas quiméricas de PVX (PVX-LIP), así como por el PVX de control, con el fin de poder comparar el resultado para el suero del paciente individual sometido a ensayo, mediante la eliminación de la variabilidad intraexperimento. Los inventores procedieron de manera análoga, en una placa diferente, usando el péptido LIP sintético y el péptido LIP expresado por partículas

quiméricas de CPMV, así como por el CPMV de control.

Los siguientes grupos de sujetos se inscribieron en el presente estudio:

- 5 1) 91 pacientes con la enfermedad (5 hombres y 86 mujeres) que cumplían los criterios de diagnóstico del AECG;
 2) 60 donantes sanos, comparables en términos de edad y sexo;
 3) 60 pacientes con otras enfermedades autoinmunitarias (20 con esclerosis sistémica, 20 con artritis reumatoide
 y 20 sujetos con *lupus eritematoso sistémico*).

10 Con el fin de evaluar el enlace de los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes, se prepararon ensayos ELISA (Immunolon II-Dynax y Maxisorp-NUNC) con el péptido LIP producido mediante síntesis química y con PVX.LIP y CVP de tipo silvestre.

15 Las placas se recubrieron con 50 µl de 40 µg/ml de péptido sintético en PBS 1X (2 microgramos de péptido) y con 50 µl de una solución 50 µg/ml de PVX de tipo silvestre y PVX.LIP purificado (2,5 microgramos de CP química correspondiente a aproximadamente 131,6 ng de péptido), diluido de manera similar en PBS 1X. La escala de referencia se obtuvo usando concentraciones conocidas de grupos de inmunoglobulinas de donantes (Sandoglobulina 50 y 100 µg/ml). Después, las placas se bloquearon usando BSA al 3 % en PBS 1X y posteriormente se incubaron con el suero de los sujetos pertenecientes a los tres grupos experimentales descritos anteriormente diluidos 1:50 en PBS 1X con BSA al 1 % durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, se realizó una secuencia de lavados, una vez con una solución de PBS 1X y Tween-20 y 3 lavados sucesivos en PBS 1X. Posteriormente, las placas se incubaron a 4 °C durante la noche con un anti-IgG humano conjugado con fosfatasa alcalina. Al final de la incubación, las placas se trataron con una nueva secuencia de lavados (solución PBS 1X y Tween20 una vez y 3 lavados sucesivos en PBS 1X) y la señal se detectó usando fosfato de p-nitrofenilo y un lector de microplacas TECAN SUNRISE III (longitud de onda 405 nm).

20 El resultado del ensayo ELISA reveló varias dificultades de tipo metodológico. En primer lugar, a pesar de usar placas de poliestireno que fueran altamente específicas para la unión a péptidos pequeños, los inventores tuvieron que limitar el análisis del resultado a placas que permitieran la comparabilidad de los datos obtenidos, para el mismo sujeto, con el uso del péptido LIP sintético y del péptido LIP expresado por las partículas quiméricas de PVX y CPMV. En segundo lugar, los inventores tuvieron que descartar el uso del péptido LIP expresado por las partículas quiméricas de CPMV, puesto que el resultado obtenido no era analizable. De hecho, la absorbancia obtenida de la reacción con las partículas víricas solas, para todos los sujetos, independientemente de si eran pacientes o sujetos de control o estaban afectados por otra patología autoinmunitaria, demostró ser superior al valor obtenido con el péptido LIP expresado por las partículas quiméricas de CPMV. Por tanto, el sistema CPMV se excluyó del análisis y se consideró inadecuado para realizar un ensayo diagnóstico.

30 Los resultados del ensayo ELISA obtenidos usando el péptido sintético y el péptido montado en el armazón vírico de PVX mostraron una sensibilidad del 84,7 % y del 97,1 % respectivamente, mientras que la especificidad en ambos sistemas fue igual al 90,0 %.

35 La sensibilidad del ensayo ELISA realizado usando el péptido de la invención en el subgrupo de pacientes con SS caracterizados por un perfil de anticuerpos ANA-negativo es igual al 98,7 %, en comparación con un valor del 75 % obtenido con el uso del péptido sintético.

40 Con el fin de validar adicionalmente el método de diagnóstico que se acaba de describir, los inventores decidieron evaluar la estabilidad y la reproducibilidad del ensayo ELISA con el sistema PVX.LIP. Por tanto, los inventores prepararon placas recubiertas con el sistema PVX.LIP (es decir, PVX de tipo silvestre y PVX.LIP) y las almacenaron a 4 °C para su uso 1, 15, 30 y 60 días después de recubrirlas. Las placas se sometieron a ensayo con el suero de 30 sujetos con SS, 10 pacientes con artritis reumatoide, 10 con lupus y 10 individuos de control y el resultado fue sustancialmente uniforme. En particular, los datos se mantuvieron sin cambios con el tiempo, tanto cuando los inventores analizaron el resultado para sujetos individuales o grupos de sujetos y como cuando evaluaron la sensibilidad y especificidad del ensayo.

45 Referencias

- 50 Baulcombe DC, Chapman S, Santa Cruz S. (1995). *Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. Plant J. 7: 1045-1053.*
 Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. (2008). *Induction and effector functions of T(h)17 cells. Nature 453: 1051-1057.*
 Caffery B, Joyce E, Boone E, Slomovic A, Simpson T, Jones L, Senchyna M. (2008). *Tear lipocalin and lysozyme in Sjogren and non-Sjogren dry eye. Optom Vis Sci 85: 661-667.*
 Cornec D, Saraux A, Cochener B, Pers JO, Jousse-Jolin S, Renaudineau Y, Marhadour T, Devauchelle-Pensec V. (2014) *Level of agreement between 2002 American-European Consensus Group and 2012 American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome and reasons for discrepancies. Arthritis Res Ther. 16: R74.*

- Donini M, Lico C, Baschieri S, Conti S, Magliani W, Polonelli L, Benvenuto E. (2005). *Production of an engineered killer peptide in Nicotiana benthamiana by using a Potato Virus X expression system. Appl Environ Microbiol.* 71: 6360-6367.
- 5 Gachon AM, Lacazette E. (1998). *Tear lipocalin and the eye's front line of defence. Br J Ophthalmol.* 82: 453-455.
- Glasgow BJ, Gasymov OK. (2011). *Focus on molecules: tear lipocalin. Exp Eye Res.* 92: 242-243.
- Lee BH, Tudares MA, Nguyen CQ. (2009). *Sjogren syndrome: an old tale with a new twist. Arch Immunol Ther Exp.* 57: 57-66.
- Lico C, Capuano F, Renzone G, Donini M, Marusic C, Scaloni A, Benvenuto E, Baschieri S. (2006). *Peptide display on Potato virus X: molecular features of the coat protein-fused peptide affecting cell-to-cell and phloem movement of chimeric virus particles. J Gen Virol.* 87: 3103-3112.
- 10 Lico C, Mancini C, Italiani P, Betti C, Boraschi D, Benvenuto E, Baschieri S. (2009). *Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8+ T cells in mice. Vaccine* 27: 5069-5076.
- Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, Mancini C, Spada M, Belardelli F, Benvenuto E, Capone I. (2001). *Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. J Virol* 75: 8434-8439.
- 15 Nardi N, Brito-Zeron P, Ramos-Casals M, Aguilo S, Cervera R, Ingelmo M et al. (2006). *Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjögren's syndrome: prevalence and clinical significance in 335 patients. Clin Rheumatol.* 25: 341-346.
- 20 Navone R, Lunardi C, Gerli R, Tinazzi E, Peterlana D, Bason C, Corrocher R, Puccetti A. (2005). *Identification of tear lipocalin as a novel autoantigen target in Sjögren's syndrome. J Autoimmun.* 25: 229-234.
- Qin Q, Wang H, Wang HZ, Huang YL, Li H, Zhang WW, Zhang JR, He LL, Xia R, Zhao DB, Deng AM. (2014). *Diagnostic accuracy of anti-alpha-fodrin antibodies for primary Sjögren's syndrome. Mod Rheumatol.* 24: 793-797.
- 25 Routsias JG, Tzioufas AG. (2007). *Sjögren's syndrome-study of autoantigens and autoantibodies. Clin Rev Allergy Immunol.* 32: 238-251.
- Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell LA, Baer AN, Challacombe S, Lanfranchi H, Schjødt M, Umehara H, Vivino F, Zhao Y, Dong Y, Greenspan D, Heidenreich AM, Helin P, Kirkham B, Kitagawa K, Larkin G, Li M, Lietman T, Lindergaard J, McNamara N, Sack K, Shirlaw P, Sugai S, Volleinweinder C, Whitcher J, Wu A, Zhang S, Zhang W, Greenspan JS. (2012). *American College of rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance Cohort. Arthritis Care Res.* 64: 475-487.
- 30 Uhde K, Fischer R, Commandeur U. (2005). *Expression of multiple foreign epitopes presented as synthetic antigens on the surface of Potato virus X particles. Arch Virol.* 150: 327-340.
- 35 Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, FOX PC, Fox RI, Kassin S (2002). *Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. Ann Rheum Dis.* 61: 554-558.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> ENEA Universita degli Studi di Verona
- <120> Partícula quimérica vírica de virus de la patata X y uso de la misma en el diagnóstico in vitro del Síndrome de Sjögren
- 45 <130> PCT39895
- <150> 102015000020005
- <151> 03-06-2015
- 50 <160> 20
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 55 <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 60 <223> Péptido de Sjögren
- <400> 1

ES 2 753 170 T3

Gly Asp Arg Asp Ala Gly Ser Arg Gly Leu Val Ser
 1 5 10

5 <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> determinante antigénico de lipocalina

<400> 2

Phe Glu Lys Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr
 1 5 10

15 <210> 3
 <211> 9880
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> secuencia del plásmido pPVX201

<400> 3

gaaaactaaa ccatacacca ccaacacaac caaaccacc acgcccaatt gttacacacc 60
 cgcttgaaaa agaaagtta acaaatggcc aaggtgcgcg aggtttacca atctttaca 120
 gactccacca caaaaactct catccaagat gaggcttata gaaacattcg ccccatcatg 180
 gaaaaacaca aactagctaa cccttagcgt caaacggttg aagcggctaa tgatctagag 240
 25 gggttcggca tagccaccaa tcctatagc attgaattgc atacacatgc agccgctaag 300

ES 2 753 170 T3

accatagaga ataaacttct agaggtgctt ggttccatcc taccacaaga acctgttaca 360
 tttatgtttc ttaaaccagc aaagctaaac tacatgagaa gaaacccgcg gatcaaggac 420
 attttccaaa atgttgccat tgaaccaaga gacgtagcca ggtaccccaa ggaacaata 480
 attgacaaac tcacagagat cacaacggaa acagcataca ttagtgacac tctgcacttc 540
 ttggatccga gctacatagt ggagacattc caaaactgcc caaaattgca aacattgtat 600
 gcgaccttag ttctccccgt tgaggcagcc tttaaaatgg aaagcactca cccgaacata 660
 tacagcctca aatacttcgg agatggtttc cagtatatac caggcaacca tgggtggcggg 720
 gcataccatc atgaattcgc tcactctaaa tggctcaaag tgggaaagat caagtggagg 780
 gacccaagg atagctttct cggacatctc aattacacga ctgagcaggt tgagatgcac 840
 acagtgcagc tacagttgca ggaatcgctc gcggcaaacc acttgactg catcaggaga 900
 ggagacttgc tcacaccgga ggtgcgcact ttcggccaac ctgacaggta cgtgattcca 960
 ccacagatct tcctccaaa agttcacaac tgcaagaagc cgattctcaa gaaaactatg 1020
 atgcagctct tcttgtatgt taggacagtc aaggctgcaa aaaattgtga catttttggc 1080
 aaagtcagac aattaattaa atcatctgac ttggacaaat actctgctgt ggaactgggt 1140
 tacttagtaa gctacatgga gttccttgcc gatttacaag ctaccacctg cttctcagac 1200
 aactttctg gtggcttgct acaaagacc cttgcaccgg tgagggcttg gatacaagag 1260
 aaaaagatgc agctgtttgg tcttgaggac tacgcgaagt tagtcaaagc agttgatttc 1320
 cccccgtgg atttttcttt caaagtggaa acttgggact tcagattcca ccccttgcaa 1380
 gcgtggaaa ccttcogacc aagggagtg tcggatgtag aggaaatgga aagtttgctc 1440
 tcagatgggg acctgcttga ttgcttcaca agaatgccag cttatgcggt aaacgcagag 1500
 gaagatttag ctgcaatcag gaaaacgccc gagatggatg tcggtaaga agttaaagag 1560
 cctgcaggag acagaaatca atactcaaac cctgcagaaa ctttcctcaa caagctccac 1620
 aggaaacaca gtagggaggt gaaacaccag gccgcaaaga aagctaaacg cctagctgaa 1680
 atccaggagt caatgagagc tgaaggtgat gccgaaccaa atgaaataag cgggacgatg 1740
 ggggcaatac ccagcaacgc cgaacttcct ggcacgaatg atgccagaca agaactcaca 1800
 ctcccaacca ctaaacctgt ccctgcaagg tgggaagatg cttcattcac agattctagt 1860
 gtggaagagg agcaggttaa actccttga aaagaaaccg ttgaaacagc gacgcaacaa 1920
 gtcacogaag gacttccttg gaaacactgg attcctcaat taaatgctgt tggattcaag 1980
 gcgctgaaa ttcagagga taggagtga acaatgatca tgcccatcac agaaatggtc 2040
 tccgggctgg aaaaagagga cttccctgaa ggaactcaa aagagttggc acgagaattg 2100
 ttcgctatga acagaagccc tgccaccatc ctttggacc tgcttagagc cagagactac 2160

ES 2 753 170 T3

ggcagtgatg taaagaacaa gagaattggt gccatcacia agacacaggc aacgagttgg 2220
 ggcgaaactact tgacaggaaa gatagaaagc ttaactgaga ggaaagttgc gacttgtgtc 2280
 attcatggag ctggagggttc tggaaaaagt catgccatcc agaaggcatt gagagaaatt 2340
 ggcaagggtc cggacatcac tgtagtcctg ccgaccaatg aactgcggct agattggagt 2400
 aagaaagtgc ctaacactga gccctatatg ttcaagacct ctgaaaaggc gtttaattggg 2460
 ggaacaggca gcatagtcat ctttgacgat tactcaaaac ttcctcccgg ttacatagaa 2520
 gccttagtct gtttctactc taaaatcaag ctaatcattc taacaggaga tagcagacia 2580
 agcgtctacc atgaaactgc tgaggacgcc tccatcaggc atttgggacc agcaacagag 2640
 tacttctcaa aatactgccg atactatctc aatgccacac accgcaacia gaaagatctt 2700
 gcgaacatgc ttggtgtcta cagtgagaga acgggagtca ccgaaatcag catgagcgcc 2760
 gagttcttag aaggaatccc aactttggta ccctcggatg agaagagaaa gctgtacatg 2820
 ggcaccggga ggaatgacac gttcacatac gctggatgcc aggggctaac taagccgaag 2880
 gtacaaatag tgttgacca caacacccaa gtgtgtagcg cgaatgtgat gtacacggca 2940
 ctttctagag ccaccgatag gattcacttc gtgaacacia gtgcaaattc ctctgccttc 3000
 tgggaaaagt tggacagcac cccttacctc aagactttcc tatcagtggg gagagaaaa 3060
 gcactcaggg agtacgagcc ggcagaggca gagccaattc aagagcctga gcccagaca 3120
 cacatgtgtg tcgagaatga ggagtccgtg ctagaagagt acaaagagga actcttgaa 3180
 aagtttgaca gagagatcca ctctgaatcc catggtcatt caaactgtgt ccaaactgaa 3240
 gacacaacca ttcagttggt ttcgcatcaa caagcaaaag atgagaccct cctctgggcg 3300
 actatagatg cgcggctcaa gaccagcaat caagaaacia acttccgaga attcctgagc 3360
 aagaaggaca ttggggacgt tctgttttta aactaccaa aagctatggg tttacccaaa 3420
 gagcgtattc ctttttccaa agaggctctg gaagcttgtg cccacgaagt acaaagcaag 3480
 tacctcagca agtcaaagtg caacttgatc aatgggactg tgagacagag cccagacttc 3540
 gatgaaaata agattatggt attcctcaag tcgcagtggg tcacaaaggg gaaaaacta 3600
 ggtctacca agattaagcc aggtcaaacc atagcagcct tttaccagca gactgtgatg 3660
 ctttttgaa ctatggctag gtacatgcga tggttcagac aggctttcca gccaaaagaa 3720
 gtcttcataa actgtgagac cacgccagat gacatgtctg catgggcctt gaacaactgg 3780
 aatttcagca gacctagctt ggctaagac tacacagctt tcgaccagtc tcaggatgga 3840
 gccatgttgc aatttgaggt gctcaaagcc aaacaccact gcataccaga ggaatcatt 3900
 caggcataca tagatattaa gactaatgca cagattttcc taggcagctt atcaattatg 3960
 cgcctgactg gtgaaggtcc cacttttgat gcaaacactg agtgcaacat agcttacacc 4020
 catacaaagt ttgacatccc agccggaact gctcaagttt atgcaggaga cgactccgca 4080

ES 2 753 170 T3

ctggactgtg ttccagaagt gaagcatagt ttccacaggc ttgaggacaa attactccta 4140
 aagtcaaagc ctgtaatcac gcagcaaaag aagggcagtt ggcctgagtt ttgtggttg 4200
 ctgatcacac caaaaggggt gatgaaagac ccaattaagc tccatgtag cttaaaattg 4260
 gctgaagcta aggggtgaact caagaaatgt caagattcct atgaaattga tctgagttat 4320
 gcctatgacc acaaggactc tctgcatgac ttgttcgatg agaaacagtg tcaggcacac 4380
 aactcactt gcagaacact aatcaagtca gggagaggca ctgtctcact ttcccgcctc 4440
 agaaactttc ttaaccggtt aagttacctt agagatttga ataagatgga tattctcatc 4500
 agtagtttga aaagtttagg ttattctagg acttccaaat ctttagattc aggaccttg 4560
 gtagtacatg cagtagccgg agccggtaag tccacagccc taaggaagtt gatcctcaga 4620
 cacccaacat tcaccgtgca tacactcggg gtccctgaca aggtgagtat cagaactaga 4680
 ggcatacaga agccaggacc tattcctgag ggcaacttcg caatcctcga tgagtatact 4740
 ttggacaaca ccacaaggaa ctctaaccag gcactttttg ctgaccctta tcaggcaccg 4800
 gagttagcc tagagccca cttctacttg gaaacatcat ttcgagttcc gaggaaagtg 4860
 gcagatttga tagctggctg tggcttcgat ttcgagacca actcacgga agaagggcac 4920
 ttagagatca ctggcatatt caaagggccc ctactcgaa aggtgatagc cattgatgag 4980
 gagtctgaga caaactgtc caggcatggt gttgagttt ttaagccctg ccaagtgacg 5040
 ggacttgagt tcaaagtagt cactattgtg tctgccgcac caatagagga aattggccag 5100
 tccacagctt tctacaacgc tatcaccagg tcaaagggat tgacatatgt ccgcgcaggg 5160
 ccataggctg accgctccgg tcaattctga aaaagtgtac atagtattag gtctatcatt 5220
 tgctttagtt tcaattacct ttctgcttc tagaaatagc ttaccccacg tcggtgacaa 5280
 cattcacagc ttgccacacg gaggagctta cagagacggc accaaagcaa tcttgtaaa 5340
 ctccccaaat ctagggtcac gagtgagtct acacaacgga aagaacgcag catttgctgc 5400
 cgttttgcta ctgactttgc tgatctatgg aagtaaatac atatctcaac gcaatcatac 5460
 ttgtgcttgt ggtaacaatc atagcagtca ttagcacttc cttagtgagg actgaacctt 5520
 gtgtcatcaa gattactggg gaatcaatca cagtgttggc ttgcaaaacta gatgcagaaa 5580
 ccataagggc cattgccgat ctcaagccac tctccgttga acggttaagt ttccattgat 5640
 actcgaaaga ggtcagcacc agctagcatc gatcgcgata tcgtcgaccg ccgatgaacg 5700
 gtaagtttc cattgatact cgaaagatgt cagcaccagc tagcacaaca cagcccatag 5760
 ggtcaactac ctcaactacc acaaaaactg caggcgcaac tcctgccaca gcttcaggcc 5820
 tgttcaccat cccggatggg gatttcttta gtacagcccg tgccatagta gccagcaatg 5880
 ctgtcgcaac aatgaggac ctcagcaaga ttgaggctat ttggaaggac atgaaggtgc 5940

ES 2 753 170 T3

ccacagacac tatggcacag gctgcttggg acttagtcag aactgtgct gatgtaggat 6000
 catccgctca aacagaaatg atagatacag gtccctattc caacggcatc agcagagcta 6060
 gactggcagc agcaattaa gaggtgtgca cacttaggca attttgcag aagtatgctc 6120
 cagtggatg gaactggatg ttaactaaca acagtccacc tgctaactgg caagcacaag 6180
 gtttcaagcc tgagcacaaa ttcgctgcat tcgacttctt caatggagtc accaaccag 6240
 ctgccatcat gcccaaagag gggctcatcc ggccaccgtc tgaagctgaa atgaatgctg 6300
 cccaaactgc tgcctttgtg aagattacaa aggccagggc acaatccaac gactttgcca 6360
 gcctagatgc agctgtcact cgaggctgta tcaactggaac aacaaccgct gaggctgttg 6420
 tcactctacc accaccataa ctacgtctac ataaccgacg cctaccccag tttcatagta 6480
 ttttctgggt tgattgtatg aataatataa ataaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaactag 6540
 tggtaaccgag ctgcatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt 6600
 tgccggtcct gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat 6660
 taacatgtaa tgcattgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcaatt 6720
 atacatthaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg 6780
 cgcggtgtca tctatgttac tagatcgaat tcaactggccg tcgttttaca acgtcgtgac 6840
 tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat cgccttgacg cacatcccc tttcgccagc 6900
 tggcgttaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgag cagcctgaat 6960
 ggcaaatggc gcctgatgag gtattttctc cttacgcacg tgtgaggat ttcacaccgc 7020
 atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat agttaagcca gccccgacac 7080
 ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcacg cgcttacaga 7140
 caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagagg tttcaccgct atcaccgaaa 7200
 cgcgcgagac gaaagggcct cgtgatacgc ctatthttat aggttaatgt catgataata 7260
 atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 7320
 ttatthttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 7380
 cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt 7440
 ccctthtttg cggcattttg ccttctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta 7500
 aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 7560
 ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactthttaa 7620
 gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggctcgc 7680
 cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gactactcac cagtcacaga aaagcatctt 7740
 acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtctgcca taaccatgag tgataaact 7800
 gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc thttttgcac 7860

ES 2 753 170 T3

aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cggtgggaac cggagctgaa tgaagccata 7920
ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 7980
ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 8040
gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat 8100
aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 8160
aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 8220
aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa 8280
gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttaatttaa aaggatctag 8340
gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac 8400
tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc 8460
gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccgat 8520
caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat 8580
actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct 8640
acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtogtgt 8700
cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg 8760
gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaaacgacct acaccgaact gagataccta 8820
cagcgtgagc attgagaaaag cgccacgctt cccgaagggg gaaaggcggg caggatccg 8880
gtaagcggca gggctcggaa aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg 8940
tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc 9000
tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg 9060
gccttttgct ggctttttgc tcacatgttc tttcctgogt tatcccctga ttctgtggat 9120
aacgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc 9180
agcgagtcag tgagcgagga agcgggaagag cgcccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg 9240
cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gacaggtttc ccgactggaa agcgggcagt 9300
gagcgcaacg caattaatgt gagttagctc actcattagg caccacaggc tttacacttt 9360
atgcttccgg ctcgatggt gtgtggaatt gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac 9420
agctatgacc atgattacgc caagcttgca tgcctgcagg tcaacatggt ggagcacgac 9480
acgcttgct actccaaaaa tatcaaagat acagtctcag aagaccaaag ggcaattgag 9540
acttttcaac aaagggtaat atccggaaac ctctcggat tccattgccc agctatctgt 9600
cactttattg tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca tcattgcgat 9660
aaaggaaagg ccatcgttga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccca 9720

ES 2 753 170 T3

cccacgagga gcatcgtgga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat 9780
 tgatgtgata tctccactga cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac 9840
 ccttctctta tataaggaag ttcatttcat ttggagagga 9880

5 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido gp41 2F5 del VIH1
 <400> 4

Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser
 1 5

15 <210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> determinante antigénico de lipocalina
 <400> 5

Met Ser Phe Glu Lys Ala Ala Gly Ala Arg Gly Leu Ser Thr
 1 5 10

25 <210> 6
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> proteína de la cápside X3 de PVX
 35 <400> 6

ES 2 753 170 T3

Pro Gly Thr Pro Ala Thr Ala Ser Gly Leu Phe Thr Ile Pro Asp Gly
 1 5 10 15

Asp Phe Phe Ser Thr Ala Arg Ala Ile Val Ala Ser Asn Ala Val Ala
 20 25 30

Thr Asn Glu Asp Leu Ser Lys Ile Glu Ala Ile Trp Lys Asp Met Lys
 35 40 45

Val Pro Thr Asp Thr Met Ala Gln Ala Ala Trp Asp Leu Val Arg His
 50 55 60

Cys Ala Asp Val Gly Ser Ser Ala Gln Thr Glu Met Ile Asp Thr Gly
 65 70 75 80

Pro Tyr Ser Asn Gly Ile Ser Arg Ala Arg Leu Ala Ala Ala Ile Lys
 85 90 95

Glu Val Cys Thr Leu Arg Gln Phe Cys Met Lys Tyr Ala Pro Val Val
 100 105 110

Trp Asn Trp Met Leu Thr Asn Asn Ser Pro Pro Ala Asn Trp Gln Ala
 115 120 125

Gln Gly Phe Lys Pro Glu His Lys Phe Ala Ala Phe Asp Phe Phe Asn
 130 135 140

Gly Val Thr Asn Pro Ala Ala Ile Met Pro Lys Glu Gly Leu Ile Arg
 145 150 155 160

Pro Pro Ser Glu Ala Glu Met Asn Ala Ala Gln Thr Ala Ala Phe Val
 165 170 175

Lys Ile Thr Lys Ala Arg Ala Gln Ser Asn Asp Phe Ala Ser Leu Asp
 180 185 190

Ala Ala Val Thr Arg Gly Arg Ile Thr Gly Thr Thr Thr Ala Glu Ala
 195 200 205

Val Val Thr Leu Pro Pro Pro
 210 215

<210> 7
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> proteína de fusión obtenida por fusión de la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6

<400> 7

5

10

ES 2 753 170 T3

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

Thr Pro Ala Thr Ala Ser Gly Leu Phe Thr Ile Pro Asp Gly Asp Phe
 20 25 30

Phe Ser Thr Ala Arg Ala Ile Val Ala Ser Asn Ala Val Ala Thr Asn
 35 40 45

Glu Asp Leu Ser Lys Ile Glu Ala Ile Trp Lys Asp Met Lys Val Pro
 50 55 60

Thr Asp Thr Met Ala Gln Ala Ala Trp Asp Leu Val Arg His Cys Ala
 65 70 75 80

Asp Val Gly Ser Ser Ala Gln Thr Glu Met Ile Asp Thr Gly Pro Tyr
 85 90 95

Ser Asn Gly Ile Ser Arg Ala Arg Leu Ala Ala Ala Ile Lys Glu Val
 100 105 110

Cys Thr Leu Arg Gln Phe Cys Met Lys Tyr Ala Pro Val Val Trp Asn
 115 120 125

Trp Met Leu Thr Asn Asn Ser Pro Pro Ala Asn Trp Gln Ala Gln Gly
 130 135 140

Phe Lys Pro Glu His Lys Phe Ala Ala Phe Asp Phe Phe Asn Gly Val
 145 150 155 160

Thr Asn Pro Ala Ala Ile Met Pro Lys Glu Gly Leu Ile Arg Pro Pro
 165 170 175

Ser Glu Ala Glu Met Asn Ala Ala Gln Thr Ala Ala Phe Val Lys Ile
 180 185 190

Thr Lys Ala Arg Ala Gln Ser Asn Asp Phe Ala Ser Leu Asp Ala Ala
 195 200 205

Val Thr Arg Gly Arg Ile Thr Gly Thr Thr Thr Ala Glu Ala Val Val
 210 215 220

Thr Leu Pro Pro Pro
 225

<210> 8
 <211> 690
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 753 170 T3

<220>

<223> secuencia de polinucleótidos que codifica la SEQ ID NO: 7

5

<400> 8

```

atgtcttttg aaaaggctgc tgggtgctaga ggtttgtcta ctcccgggac tcttgccaca      60
gcttcaggcc tgttcaccat cccggatggg gatttcttta gtacagcccg tgccatagta      120
gccagcaatg ctgtcgcaac aaatgaggac ctcagcaaga ttgaggctat ttggaaggac      180
atgaaggtgc ccacagacac tatggcacag gctgcttggg acttagtcag aactgtgct      240
gatgtaggat catccgctca aacagaaatg atagatacag gtccctattc caacggcatc      300
agcagagcta gactggcagc agcaattaa gaggtgtgca cacttaggca attttgcattg      360
aagtatgctc cagtggatg gaactggatg ttaactaaca acagtccacc tgctaactgg      420
caagcacaag gtttcaagcc tgagcacaaa ttcgctgcat tcgacttctt caatggagtc      480
accaaccag ctgccatcat gcccaaagag gggctcatcc ggccaccgtc tgaagctgaa      540
atgaatgctg cccaaactgc tgcctttgtg aagattacaa aggccagggc acaatccaac      600
gactttgcca gcctagatgc agctgtcact cgaggctgta tcaactggaac aacaaccgct      660
gaggctgttg tcaactctacc accaccataa      690

```

10

<210> 9

<211> 54

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> cebador directo de lipocalina

<400> 9

ctagcctcga gatgtctttt gaaaaggctg ctgggtgctag aggtttgtct actc 54

20

<210> 10

<211> 54

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> cebador inverso de lipocalina

<400> 10

ccgggagtag acaaacctct agcaccagca gcctttcaa aagacatctc gagg 54

30

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> cebador directo del vector de PVX

40

<400> 11

agcagtcatt agcacttc 18

<210> 12

<211> 18

ES 2 753 170 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> cebador inverso del vector de PVX

<400> 12
caccttcattg tcctcca 18

10 <210> 13
<211> 67
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> cebador directo de CPMV

<400> 13

ctagcactcc tcctgctttt gaaaaggctg ctggtgctag aggtttgtct actccatttt 60

20 cagacgt 67

<210> 14
<211> 59
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso de CPMV

30 <400> 14
ctgaaaatgg agtagacaaa cctctagcac cagcagcctt ttcaaaagca ggaggagtg 59

35 <210> 15
<211> 651
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápside suprimida de PVX

<400> 15

ES 2 753 170 T3

Ala Thr Gly Thr Gly Thr Gly Cys Cys Ala Cys Thr Cys Cys Thr Gly
1 5 10 15

Cys Cys Ala Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys Ala Gly Gly Cys Cys Thr
20 25 30

Gly Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Cys Cys Gly Gly Ala Thr
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ala Thr Thr Thr Cys Thr Thr Thr Ala Gly Thr Ala
50 55 60

Cys Ala Gly Cys Cys Cys Gly Thr Gly Cys Cys Ala Thr Ala Gly Thr
65 70 75 80

Ala Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Gly Cys Thr Gly Thr Cys
85 90 95

Gly Cys Ala Ala Cys Ala Ala Ala Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Cys
100 105 110

ES 2 753 170 T3

Thr Cys Ala Gly Cys Ala Ala Gly Ala Thr Thr Gly Ala Gly Gly Cys
 115 120 125

Thr Ala Thr Thr Thr Gly Gly Ala Ala Gly Gly Ala Cys Ala Thr Gly
 130 135 140

Ala Ala Gly Gly Thr Gly Cys Cys Cys Ala Cys Ala Gly Ala Cys Ala
 145 150 155 160

Cys Thr Ala Thr Gly Gly Cys Ala Cys Ala Gly Gly Cys Thr Gly Cys
 165 170 175

Thr Thr Gly Gly Gly Ala Cys Thr Thr Ala Gly Thr Cys Ala Gly Ala
 180 185 190

Cys Ala Cys Thr Gly Thr Gly Cys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Ala Gly
 195 200 205

Gly Ala Thr Cys Ala Thr Cys Cys Gly Cys Thr Cys Ala Ala Ala Cys
 210 215 220

Ala Gly Ala Ala Ala Thr Gly Ala Thr Ala Gly Ala Thr Ala Cys Ala
 225 230 235 240

Gly Gly Thr Cys Cys Cys Thr Ala Thr Thr Cys Cys Ala Ala Cys Gly
 245 250 255

Gly Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly Cys Thr Ala Gly
 260 265 270

Ala Cys Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Thr
 275 280 285

Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Thr Gly Thr Gly Cys Ala Cys Ala Cys
 290 295 300

Thr Thr Ala Gly Gly Cys Ala Ala Thr Thr Thr Thr Gly Cys Ala Thr
 305 310 315 320

Gly Ala Ala Gly Thr Ala Thr Gly Cys Thr Cys Cys Ala Gly Thr Gly
 325 330 335

Gly Thr Ala Thr Gly Gly Ala Ala Cys Thr Gly Gly Ala Thr Gly Thr
 340 345 350

Thr Ala Ala Cys Thr Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala Gly Thr Cys Cys

ES 2 753 170 T3

355	360	365																
Ala	Cys	Cys	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gly	Gly	Cys	Ala	Ala			
	370					375					380							
Gly	Cys	Ala	Cys	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Thr	Thr	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys			
385					390					395					400			
Cys	Thr	Gly	Ala	Gly	Cys	Ala	Cys	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr	Cys	Gly	Cys			
				405					410					415				
Thr	Gly	Cys	Ala	Thr	Thr	Cys	Gly	Ala	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	Thr	Cys			
			420					425					430					
Ala	Ala	Thr	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Cys	Ala	Cys	Cys	Ala	Ala	Cys	Cys			
		435					440					445						
Cys	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Cys	Cys	Ala	Thr	Cys	Ala	Thr	Gly	Cys	Cys			
450						455					460							
Cys	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Cys	Thr	Cys	Ala	Thr	Cys			
465					470					475					480			
Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Ala	Cys	Cys	Gly	Thr	Cys	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly			
				485					490					495				
Cys	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Thr	Gly	Cys	Thr	Gly	Cys			
			500					505					510					
Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Cys	Thr	Gly	Cys	Thr	Gly	Cys	Cys	Thr	Thr	Thr			
		515					520					525						
Gly	Thr	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Ala	Cys	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly			
	530					535					540							
Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Gly	Cys	Ala	Cys	Ala	Ala	Thr	Cys	Cys	Ala	Ala			
545					550					555					560			
Cys	Gly	Ala	Cys	Thr	Thr	Thr	Gly	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys	Cys	Thr	Ala			
				565					570					575				
Gly	Ala	Thr	Gly	Cys	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Thr	Cys	Ala	Cys	Thr	Cys			
			580					585					590					
Gly	Ala	Gly	Gly	Thr	Cys	Gly	Thr	Ala	Thr	Cys	Ala	Cys	Thr	Gly	Gly			
		595					600					605						

ES 2 753 170 T3

Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala Cys Cys Gly Cys Thr Gly Ala Gly
610 615 620

Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Thr Cys Ala Cys Thr Cys Thr Ala Cys
625 630 635 640

Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Ala Ala
645 650

5 <210> 16
<211> 714
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápside de PVX

<400> 16

```

atgtcagcac cagctagcac aacacagccc ataggggtcaa ctacctcaac taccacaaaa      60
actgcaggcg caactcctgc cacagcttca ggctgtttca ccatcccgga tggggatttc      120
tttagtacag cccgtgccat agtagccagc aatgctgtcg caacaaatga ggacctcagc      180
aagattgagg ctatttgga gacatgaag gtgccacag aactatggc acaggctgct      240
tgggacttag tcagacactg tgctgatgta ggatcatccg ctcaaacaga aatgatagat      300
acaggtccct attccaacgg catcagcaga gctagactgg cagcagcaat taaagaggtg      360
tgcacactta ggcaattttg catgaagtat gctccagtgg tatggaactg gatgttaact      420
aacaacagtc cacctgctaa ctggcaagca caaggtttca agcctgagca caaattcgct      480
gcattcgact tcttcaatgg agtcaccaac ccagctgcc aatgcccga agaggggctc      540
atccggccac cgtctgaagc tgaatgaat gctgcccaaa ctgctgcctt tgtgaagatt      600
aaaaggcca gggcacaatc caacgacttt gccagcctag atgcagctgt cactcgaggt      660
cgtatcactg gaacaacaac cgctgaggct gttgtcactc taccaccacc ataa          714

```

15 <210> 17
<211> 237
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> proteína de la cápside de PVX

<400> 17

ES 2 753 170 T3

Met Ser Ala Pro Ala Ser Thr Thr Gln Pro Ile Gly Ser Thr Thr Ser
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Lys Thr Ala Gly Ala Thr Pro Ala Thr Ala Ser Gly Leu
 20 25 30

Phe Thr Ile Pro Asp Gly Asp Phe Phe Ser Thr Ala Arg Ala Ile Val
 35 40 45

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

Ile Trp Lys Asp Met Lys Val Pro Thr Asp Thr Met Ala Gln Ala Ala
 65 70 75 80

Trp Asp Leu Val Arg His Cys Ala Asp Val Gly Ser Ser Ala Gln Thr
 85 90 95

Glu Met Ile Asp Thr Gly Pro Tyr Ser Asn Gly Ile Ser Arg Ala Arg
 100 105 110

Leu Ala Ala Ala Ile Lys Glu Val Cys Thr Leu Arg Gln Phe Cys Met
 115 120 125

Lys Tyr Ala Pro Val Val Trp Asn Trp Met Leu Thr Asn Asn Ser Pro
 130 135 140

Pro Ala Asn Trp Gln Ala Gln Gly Phe Lys Pro Glu His Lys Phe Ala
 145 150 155 160

Ala Phe Asp Phe Phe Asn Gly Val Thr Asn Pro Ala Ala Ile Met Pro
 165 170 175

Lys Glu Gly Leu Ile Arg Pro Pro Ser Glu Ala Glu Met Asn Ala Ala
 180 185 190

Gln Thr Ala Ala Phe Val Lys Ile Thr Lys Ala Arg Ala Gln Ser Asn
 195 200 205

Asp Phe Ala Ser Leu Asp Ala Ala Val Thr Arg Gly Arg Ile Thr Gly
 210 215 220

Thr Thr Thr Ala Glu Ala Val Val Thr Leu Pro Pro Pro
 225 230 235

<210> 18
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

5

ES 2 753 170 T3

<223> proteína de la cápside de PVX suprimida

<400> 18

```

Met Cys Ala Thr Pro Ala Thr Ala Ser Gly Leu Phe Thr Ile Pro Asp
1          5          10          15

Gly Asp Phe Phe Ser Thr Ala Arg Ala Ile Val Ala Ser Asn Ala Val
20          25          30

Ala Thr Asn Glu Asp Leu Ser Lys Ile Glu Ala Ile Trp Lys Asp Met
35          40          45

Lys Val Pro Thr Asp Thr Met Ala Gln Ala Ala Trp Asp Leu Val Arg
50          55          60

His Cys Ala Asp Val Gly Ser Ser Ala Gln Thr Glu Met Ile Asp Thr
65          70          75          80

Gly Pro Tyr Ser Asn Gly Ile Ser Arg Ala Arg Leu Ala Ala Ala Ile
85          90          95

Lys Glu Val Cys Thr Leu Arg Gln Phe Cys Met Lys Tyr Ala Pro Val
100         105         110

Val Trp Asn Trp Met Leu Thr Asn Asn Ser Pro Pro Ala Asn Trp Gln
115         120         125

Ala Gln Gly Phe Lys Pro Glu His Lys Phe Ala Ala Phe Asp Phe Phe
130         135         140

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

Arg Pro Pro Ser Glu Ala Glu Met Asn Ala Ala Gln Thr Ala Ala Phe
165         170         175

Val Lys Ile Thr Lys Ala Arg Ala Gln Ser Asn Asp Phe Ala Ser Leu
180         185         190

Asp Ala Ala Val Thr Arg Gly Arg Ile Thr Gly Thr Thr Thr Ala Glu
195         200         205

Ala Val Val Thr Leu Pro Pro Pro
210         215

```

5

<210> 19

<211> 216

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

ES 2 753 170 T3

<220>

<223> proteína de la cápside de PVX suprimida y mutada

<400> 19

5

```

Met Pro Gly Thr Pro Ala Thr Ala Ser Gly Leu Phe Thr Ile Pro Asp
1          5          10          15

Gly Asp Phe Phe Ser Thr Ala Arg Ala Ile Val Ala Ser Asn Ala Val
          20          25          30

Ala Thr Asn Glu Asp Leu Ser Lys Ile Glu Ala Ile Trp Lys Asp Met
          35          40          45

Lys Val Pro Thr Asp Thr Met Ala Gln Ala Ala Trp Asp Leu Val Arg
          50          55          60

His Cys Ala Asp Val Gly Ser Ser Ala Gln Thr Glu Met Ile Asp Thr
65          70          75          80

Gly Pro Tyr Ser Asn Gly Ile Ser Arg Ala Arg Leu Ala Ala Ala Ile
          85          90          95

Lys Glu Val Cys Thr Leu Arg Gln Phe Cys Met Lys Tyr Ala Pro Val
          100          105          110

Val Trp Asn Trp Met Leu Thr Asn Asn Ser Pro Pro Ala Asn Trp Gln
          115          120          125

Ala Gln Gly Phe Lys Pro Glu His Lys Phe Ala Ala Phe Asp Phe Phe
130          135          140

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

Arg Pro Pro Ser Glu Ala Glu Met Asn Ala Ala Gln Thr Ala Ala Phe
          165          170          175

Val Lys Ile Thr Lys Ala Arg Ala Gln Ser Asn Asp Phe Ala Ser Leu
          180          185          190

Asp Ala Ala Val Thr Arg Gly Arg Ile Thr Gly Thr Thr Thr Ala Glu
          195          200          205

Ala Val Val Thr Leu Pro Pro Pro
210          215
    
```

<210> 20

<211> 651

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

ES 2 753 170 T3

<220>

<223> secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápside de PVX suprimida y mutada

5

<400> 20

```

atgcccggga ctccctgccac agcttcaggc ctgttcacca tcccggatgg ggatttcttt      60
agtacagccc gtgccatagt agccagcaat gctgtcgcaa caaatgagga cctcagcaag      120
attgaggcta tttggaagga catgaagggtg cccacagaca ctatggcaca ggctgcttgg      180
gacttagtca gacctgtgc tgatgtagga tcatccgctc aaacagaaat gatagataca      240
ggtccctatt ccaacggcat cagcagagct agactggcag cagcaattaa agagggtgtgc      300
acacttaggc aatdddgcat gaagtatgct ccagtggat ggaactggat gttaactaac      360
aacagtccac ctgctaactg gcaagcacia ggtttcaagc ctgagcacia attcgctgca      420
ttcgacttct tcaatggagt caccaacca gctgccatca tgcccaaaga ggggctcatc      480
cggccacogt ctgaagctga aatgaatgct gcccaaactg ctgcctttgt gaagattaca      540
aaggccaggg cacaatccaa cgactttgcc agcctagatg cagctgtcac tcgaggctgt      600
atcactggaa caacaaccgc tgaggctggt gtcactctac caccaccata a      651

```

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende o que consiste en:

5 - una porción amino-terminal que consiste en una secuencia peptídica que comprende o que consiste en un determinante antigénico de lipocalina, en la que dicho determinante antigénico de lipocalina se selecciona entre el grupo que consiste en FEKAAGARGLST (SEQ ID NO: 2), MSFEKAAGARGLST (SEQ ID NO: 5); y
 10 - una porción carboxi-terminal que consiste en una secuencia peptídica que comprende o que consiste en la proteína de la cápside de un virus PVX, estando dicha proteína de la cápside intacta o suprimida en la porción 5' del gen que codifica la proteína de la cápside de tipo silvestre, estando dicha porción amino-terminal fusionada con dicha porción carboxi-terminal de manera que dicho determinante antigénico esté en marco con dicha proteína de la cápside.

15 2. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el virus PVX se selecciona entre el grupo que consiste en PVX X3, BS, EX, NL4, HB, WS2, ROTH1, XS, UK3, OS, NL1, Taiwán, X4, preferentemente X3.

3. La proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que dicha proteína de la cápside consiste en la siguiente secuencia:

PGTPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLSKIEAIWKDMKVPT
 DTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIKEVCT
 LRQFCMKYAPVVWNWMLTNNSPANWQAQGFKPEHKFAAFDFFNGVT
 NPAAIMPKEGLIRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKARAQSNDFASLDAAVTR
 20 GRITGTTTAEAVVTLPPP (SEQ ID NO:6).

4. La proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, teniendo dicha proteína de fusión la siguiente secuencia:

MSFEKAAGARGLSTPGTPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNED
 LSKIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSN
 GISRARLAAAIKEVCTLRQFCMKYAPVVWNWMLTNNSPANWQAQGFK
 PEHKFAAFDFFNGVTNPAAIMPKEGLIRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKAR
 25 AQSNDFASLDAAVTRGRITGTTTAEAVVTLPPP (SEQ ID NO:7)

5. Un polinucleótido que codifica la proteína de fusión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

30 6. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5, teniendo dicho polinucleótido la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 8):

atgtctttgaaaaggctgctggtgctagaggttgtctactcccgggactcctgccacagcttcaggcct
gttcacccatcccggatggggatttcittagtagcagcccgtgccatagtagccagcaatgctgtcgcaac
aaatgaggacctcagcaagattgaggctatttgaaggacatgaaggtgccacagacactatggc

acaggctgctgggacttagtcagacactgtgctgatgtaggatcatccgctcaaacagaaatgatag
atacaggtcctattccaacggcatcagcagagctagactggcagcagcaattaaagagggtgtgcac
acttaggcaattttgcatgaagtatgctccagtggtatggaactggatgtaactaacaacagtccacct
gctaactggcaagcacaaggttcaagcctgagcacaattcgtgctcattcgacttcttcaatggagtc
accaaccagctgccatcatgcccagagggtcctccggccaccgtctgaagctgaaatgaat
gctgcccactgctgcctttgtgaagattacaaggccagggcacaatccaacgactttgccagcct
agatgcagctgtcactcgaggctgtatcactggaacaacaaccgctgaggctgtgtcactctaccacc
accataa

- 5 7. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5-6.
8. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión como se define en la reivindicación 7.
- 10 9. Una secuencia genómica de un virus PVX, comprendiendo dicha secuencia genómica el polinucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5-6.
- 15 10. Una partícula de virus quimérica de virus de la patata X, caracterizándose dicha partícula de virus quimérica porque comprende, como proteína de la cápside, la proteína de fusión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, teniendo dicha partícula vírica expuesta, en el exterior de la misma, la porción amino-terminal que comprende o que consiste en el determinante antigénico de lipocalina.
- 20 11. La partícula de virus quimérica de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el genoma vírico consiste en la secuencia genómica como se define en la reivindicación 9.
- 25 12. Un uso de la partícula de virus quimérica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-11 o de la proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el diagnóstico *in vitro* del Síndrome de Sjögren, por ejemplo, usando el método ELISA, de tira reactiva o de microchip.
- 30 13. Un kit para el diagnóstico *in vitro* del Síndrome de Sjögren, comprendiendo o consistiendo dicho kit en la partícula de virus quimérica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-11 o en la proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, posiblemente en combinación con reactivos adecuados con fines de detección.
- 35 14. Una planta caracterizada porque comprende dentro de ella la partícula vírica quimérica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10-11, o el vector de expresión como se define en la reivindicación 7.
- 40 15. Células vegetales de la planta de acuerdo con la reivindicación 14, que expresan la partícula vírica quimérica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10-11, o el vector de expresión como se define en la reivindicación 7.
- 45 16. Un uso de una secuencia peptídica que comprende o que consiste en un determinante antigénico de lipocalina para la preparación de la proteína de fusión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, la partícula vírica quimérica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-11, la planta de acuerdo con la reivindicación 14, y las células vegetales de acuerdo con la reivindicación 15.
17. Un uso de la planta de acuerdo con la reivindicación 14 o de las células vegetales de acuerdo con la reivindicación 15, para la producción de la partícula vírica quimérica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-11.
18. Un proceso para la preparación de la proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, comprendiendo o consistiendo dicho proceso en las siguientes etapas:
- a) clonar, en un vector, la secuencia peptídica que comprende o que consiste en la proteína de la cápside de un

virus PVX, estando dicha proteína de la cápside intacta o suprimida en la porción 5' del gen que codifica la proteína de la cápside de tipo silvestre; y

5 b) clonar una secuencia peptídica que comprende o que consiste en un determinante antigénico de lipocalina, estando dicha secuencia peptídica fusionada con dicha secuencia peptídica que comprende o que consiste en la proteína de la cápside de un virus PVX en el vector resultante de la etapa a), en el que dicho determinante antigénico de lipocalina se selecciona entre el grupo que consiste en FEKAAGARGLST (SEQ ID NO: 2) y MSFEKAAGARGLST (SEQ ID NO: 5).

10 19. El proceso de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el virus PVX se selecciona entre el grupo que consiste en PVX X3, BS, EX, NL4, HB, WS2, ROTH1, XS, UK3, OS, NL1, Taiwán, X4, preferentemente X3.

20. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18-19, en la que dicha proteína de la cápside consiste en la siguiente secuencia:

MPGTPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLSKIEAIWKDMKV
PTDTMAQAAWDLVRHCADVGSQAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIKEV
CTLRQFCMKYAPVVWNWMLTNNSPANWQAQGFKPEHKFAAFDFFNG
VTNPAAIMPK EGLIRPPSEAEMNAAQTAAFKITKARAQSND FASLDAAV
15 TRGRITGTTTAEAVVTLPPP (SEQ ID NO:6).

20 21. Un proceso para la preparación de la partícula vírica quimérica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, comprendiendo o consistiendo dicho proceso en la etapa de reemplazar la proteína de la cápside de un virus PVX, en dicho virus PVX, con la proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

22. Un proceso para la producción de la partícula vírica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11; comprendiendo o consistiendo dicho proceso en las siguientes etapas:

- 25 a1) infectar una planta con la partícula vírica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 o el vector de expresión como se define en la reivindicación 7;
b1) cultivar la planta obtenida de acuerdo con la etapa a1);
c) extraer dicha partícula vírica de dicha planta.

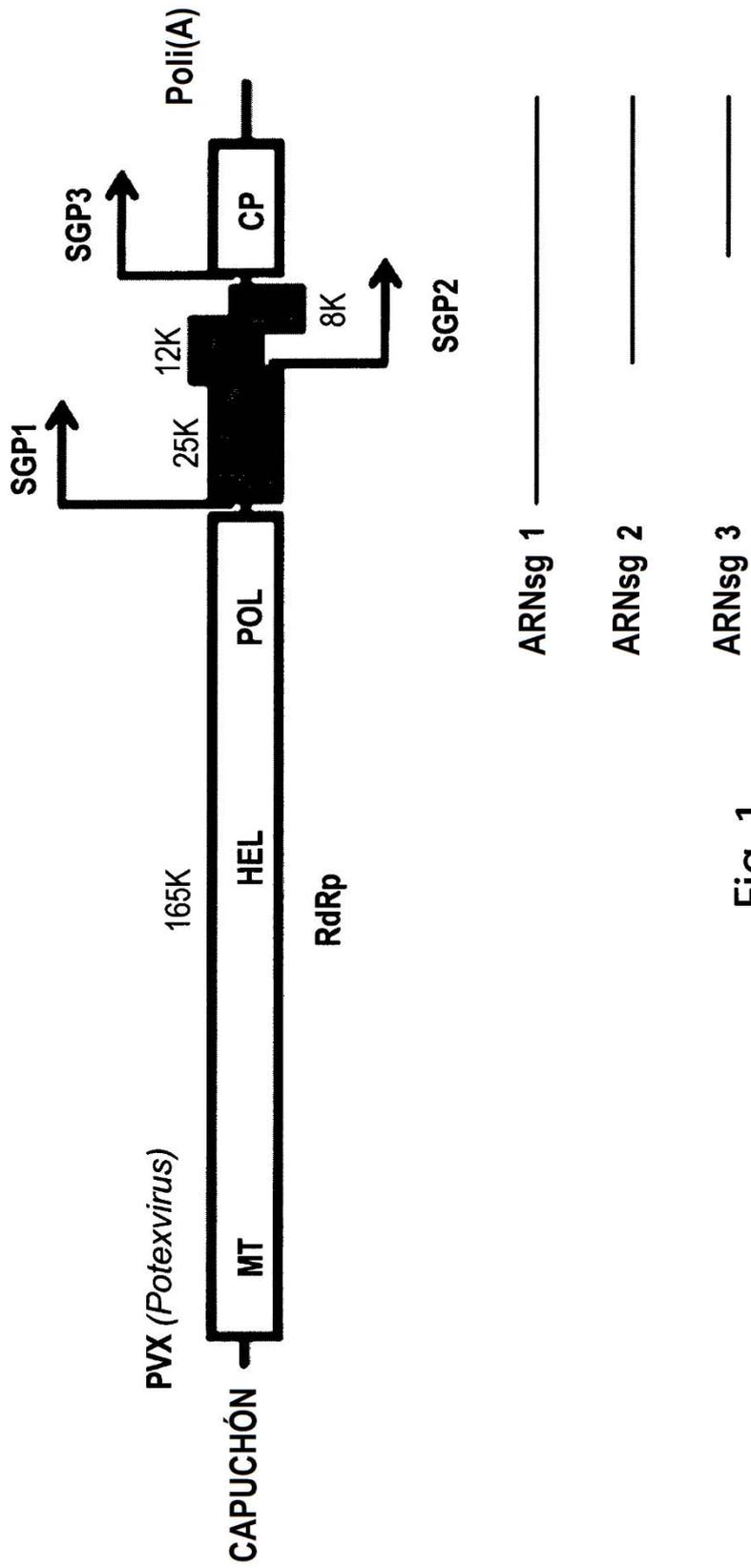


Fig. 1

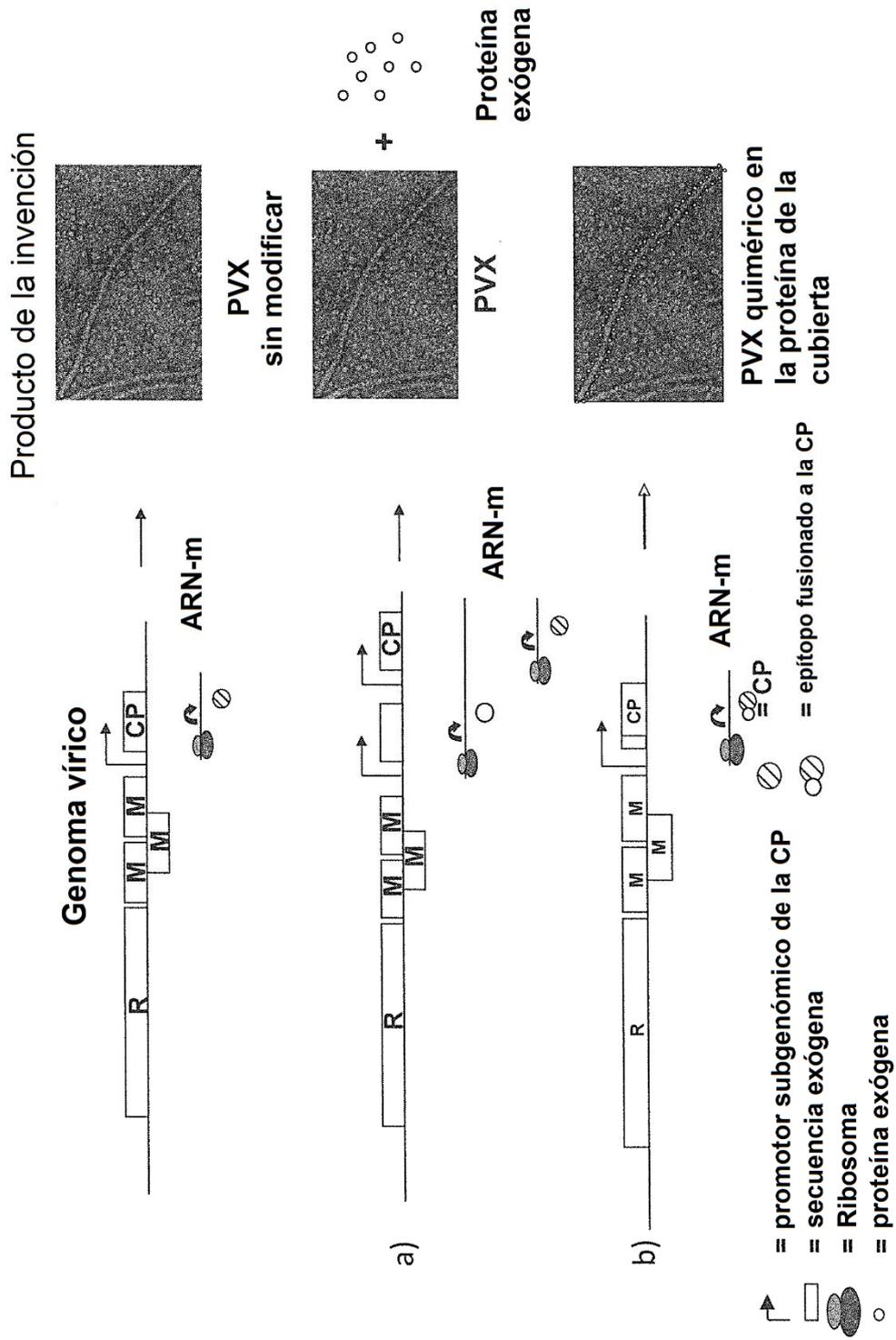


Fig. 2

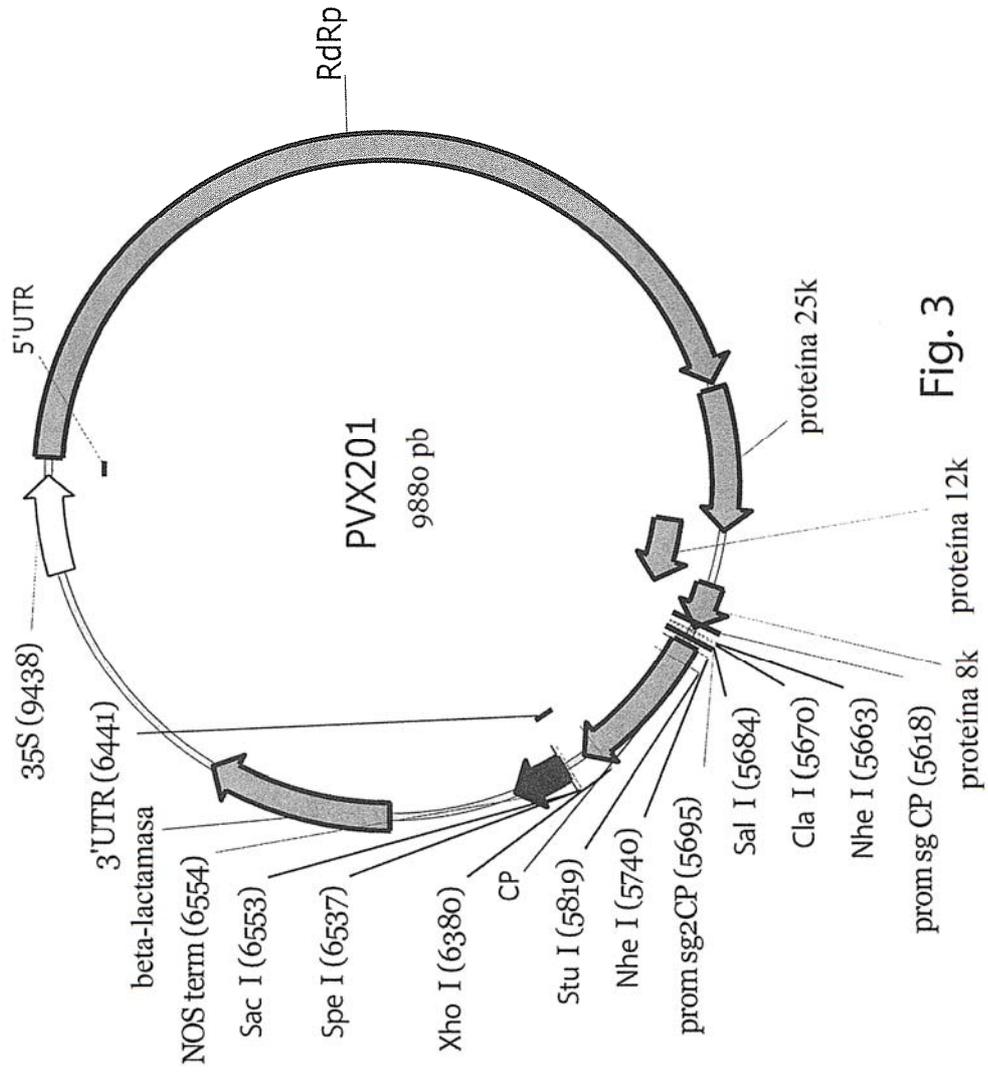


Fig. 3

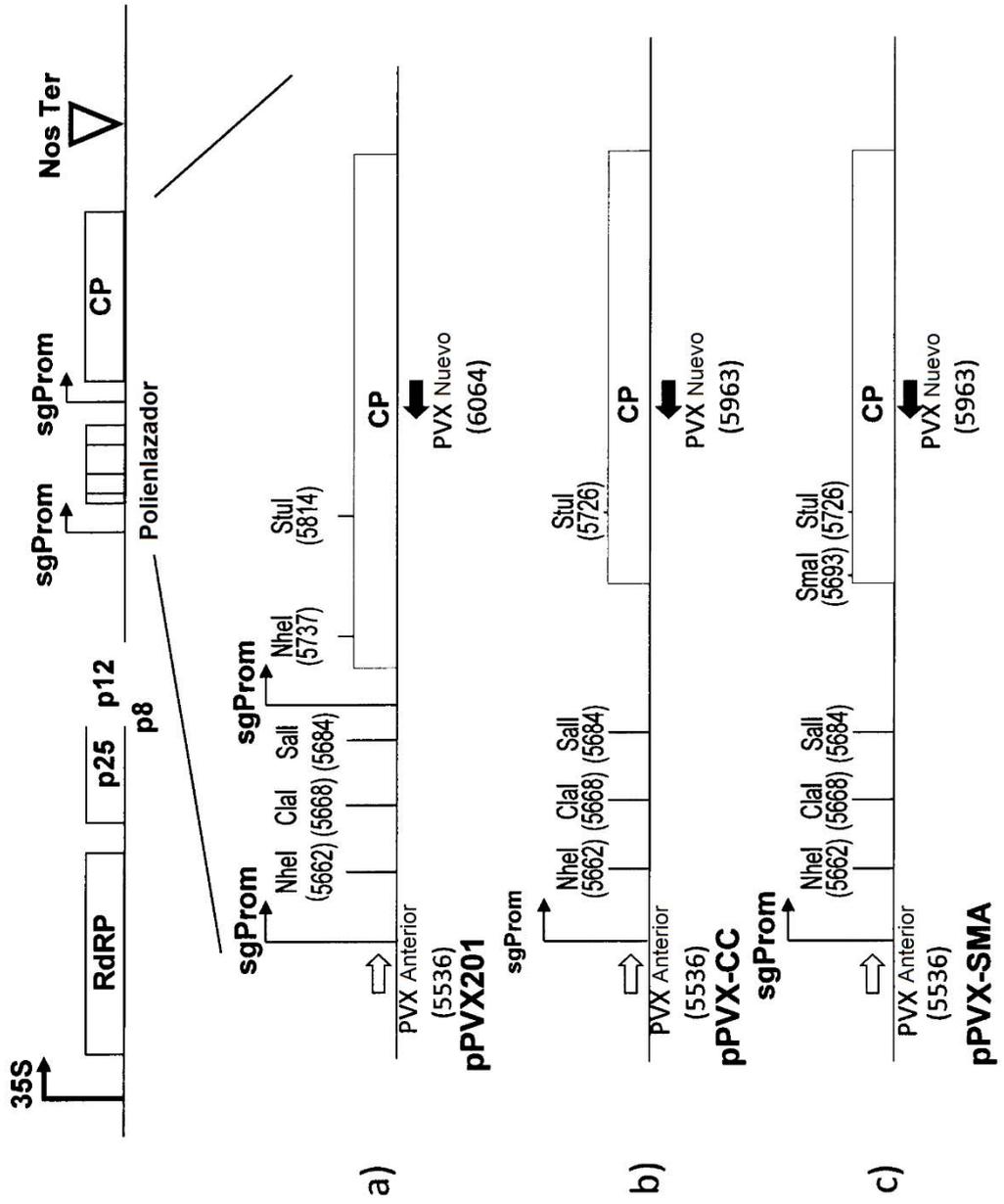


Fig. 4

CLUSTAL 2.1 Alineación de secuencia múltiple

```

CPPVX-CC  ATGT----- 4
CPPVX-wt  ATGTCAGCACCAGCTAGCACAAACACAGCCATAGGGTCAACTACCTCAACTACCACAAA 60
          ****

CPPVX-CC  -----GTGCCACTCCTGCCACAGCTTCAGGCCTGTTACCATCCCGGATGGGGATTTC 57
CPPVX-wt  ACTGCAGGCGCAACTCCTGCCACAGCTTCAGGCCTGTTACCATCCCGGATGGGGATTTC 120
          * * * *****

CPPVX-CC  TTTAGTACAGCCCGTGCCATAGTAGCCAGCAATGCTGTCGCAACAAATGAGGACCTCAGC 117
CPPVX-wt  TTTAGTACAGCCCGTGCCATAGTAGCCAGCAATGCTGTCGCAACAAATGAGGACCTCAGC 180
          *****

CPPVX-CC  AAGATTGAGGCTATTTGGAAGGACATGAAGGTGCCACAGACACTATGGCACAGGCTGCT 177
CPPVX-wt  AAGATTGAGGCTATTTGGAAGGACATGAAGGTGCCACAGACACTATGGCACAGGCTGCT 240
          *****

CPPVX-CC  TGGGACTTAGTCAGACACTGTGCTGATGATAGGATCATCCGCTCAAACAGAAATGATAGAT 237
CPPVX-wt  TGGGACTTAGTCAGACACTGTGCTGATGATAGGATCATCCGCTCAAACAGAAATGATAGAT 300
          *****

CPPVX-CC  ACAGGTCCTATTCCAACGGCATCAGCAGAGCTAGACTGGCAGCAGCAATTAAGAGGTG 297
CPPVX-wt  ACAGGTCCTATTCCAACGGCATCAGCAGAGCTAGACTGGCAGCAGCAATTAAGAGGTG 360
          *****

CPPVX-CC  TGCACACTTAGCAATTTTGCATGAAGTATGCTCCAGTGGTATGGAAGTGGATGTTAACT 357
CPPVX-wt  TGCACACTTAGCAATTTTGCATGAAGTATGCTCCAGTGGTATGGAAGTGGATGTTAACT 420
          *****

CPPVX-CC  AACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTCAAGCCTGAGCACAATTCGCT 417
CPPVX-wt  AACAACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTCAAGCCTGAGCACAATTCGCT 480
          *****

CPPVX-CC  GCATTGACTTCTTCAATGGAGTCACCAACCCAGCTGCCATCATGCCCAAAGAGGGGCTC 477
CPPVX-wt  GCATTGACTTCTTCAATGGAGTCACCAACCCAGCTGCCATCATGCCCAAAGAGGGGCTC 540
          *****

CPPVX-CC  ATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAAGTCTGCCTTTGTGAAGATT 537
CPPVX-wt  ATCCGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAAGTCTGCCTTTGTGAAGATT 600
          *****

CPPVX-CC  ACAAAGGCCAGGGCACAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACCTCGAGGT 597
CPPVX-wt  ACAAAGGCCAGGGCACAATCCAACGACTTTGCCAGCCTAGATGCAGCTGTCACCTCGAGGT 660
          *****

CPPVX-CC  CGTATCACTGGAACAACAACCGCTGAGGCTGTTGTCACTCTACCACCACCATAA 651
CPPVX-wt  CGTATCACTGGAACAACAACCGCTGAGGCTGTTGTCACTCTACCACCACCATAA 714
          *****
    
```

Fig. 5

CLUSTAL 2.1 Alineación de secuencia múltiple

```

CPPVX-CC      -----MCATPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLS 39
CPPVX-Sma     -----MPGTPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLS 39
CPPVX-wt      MSAPASTTQPIGSTTSTTTKTAGATPATASGLFTIPDGDFSTARAIVASNAVATNEDLS 60
               *****

CPPVX-CC      KIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIKEV 99
CPPVX-Sma     KIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIKEV 99
CPPVX-wt      KIEAIWKDMKVPTDTMAQAAWDLVRHCADVGSSAQTEMIDTGPYSNGISRARLAAAIKEV 120
               *****

CPPVX-CC      CTRLQFCMKYAPVVWMLTNNSPANWQAQGFKPEHKFAAFDFFNQVGNPAAIMPKEGL 159
CPPVX-Sma     CTRLQFCMKYAPVVWMLTNNSPANWQAQGFKPEHKFAAFDFFNQVGNPAAIMPKEGL 159
CPPVX-wt      CTRLQFCMKYAPVVWMLTNNSPANWQAQGFKPEHKFAAFDFFNQVGNPAAIMPKEGL 180
               *****

CPPVX-CC      IRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKARASNDFASLDAAVTRGRITGTTAEAVTLPPP 216
CPPVX-Sma     IRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKARASNDFASLDAAVTRGRITGTTAEAVTLPPP 216
CPPVX-wt      IRPPSEAEMNAAQTAAFVKITKARASNDFASLDAAVTRGRITGTTAEAVTLPPP 237
               *****
    
```

Fig. 6

CLUSTAL 2.1 Alineación de secuencia múltiple

```

CPPVX-CC      ATGTGTGCCACTCCTGCCACAGCTTCAGGCCTGTTACCATCCCGGATGGGGATTTCTTT 60
CPPVX-Sma     ATGCCCGGGACTCCTGCCACAGCTTCAGGCCTGTTACCATCCCGGATGGGGATTTCTTT 60
***      *      *****

CPPVX-CC      AGTACAGCCCCTGCCATAGTAGCCAGCAATGCTGTCGCAACAAATGAGGACCTCAGCAAG 120
CPPVX-Sma     AGTACAGCCCCTGCCATAGTAGCCAGCAATGCTGTCGCAACAAATGAGGACCTCAGCAAG 120
*****

CPPVX-CC      ATTGAGGCTATTTGGAAGGACATGAAGGTGCCACAGACTATGGCACAGGCTGCTTGG 180
CPPVX-Sma     ATTGAGGCTATTTGGAAGGACATGAAGGTGCCACAGACTATGGCACAGGCTGCTTGG 180
*****

CPPVX-CC      GACTTAGTCAGACACTGTGCTGATGTAGGATCATCCGCTCAAACAGAAATGATAGATACA 240
CPPVX-Sma     GACTTAGTCAGACACTGTGCTGATGTAGGATCATCCGCTCAAACAGAAATGATAGATACA 240
*****

CPPVX-CC      GGTCCCTATTCCAACGGCATCAGCAGAGCTAGACTGGCAGCAGCAATTAAGAGGTGTGC 300
CPPVX-Sma     GGTCCCTATTCCAACGGCATCAGCAGAGCTAGACTGGCAGCAGCAATTAAGAGGTGTGC 300
*****

CPPVX-CC      ACACCTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCTCCAGTGGTATGGAAGTGGATGTTAACTAAC 360
CPPVX-Sma     ACACCTAGGCAATTTTGCATGAAGTATGCTCCAGTGGTATGGAAGTGGATGTTAACTAAC 360
*****

CPPVX-CC      AACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTCAAGCCTGAGCACAATTCGCTGCA 420
CPPVX-Sma     AACAGTCCACCTGCTAACTGGCAAGCACAAGGTTTCAAGCCTGAGCACAATTCGCTGCA 420
*****

CPPVX-CC      TTCGACTTCTTCAATGGAGTCACCAACCCAGCTGCCATCATGCCAAAGAGGGGCTCATC 480
CPPVX-Sma     TTCGACTTCTTCAATGGAGTCACCAACCCAGCTGCCATCATGCCAAAGAGGGGCTCATC 480
*****

CPPVX-CC      CGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAAGTCTGCCTTTGTGAAGATTACA 540
CPPVX-Sma     CGGCCACCGTCTGAAGCTGAAATGAATGCTGCCCAAAGTCTGCCTTTGTGAAGATTACA 540
*****

CPPVX-CC      AAGGCCAGGGCACAATCCAACGACTTTGCCAGCTAGATGCAGCTGCTACTCGAGGTCGT 600
CPPVX-Sma     AAGGCCAGGGCACAATCCAACGACTTTGCCAGCTAGATGCAGCTGCTACTCGAGGTCGT 600
*****

CPPVX-CC      ATCACTGGAACAACAACCGCTGAGGCTGTTGTCACTCTACCACCACCATAA 651
CPPVX-Sma     ATCACTGGAACAACAACCGCTGAGGCTGTTGTCACTCTACCACCACCATAA 651
*****

```

Fig. 7