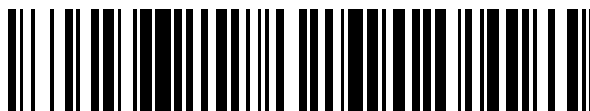


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 001**

51 Int. Cl.:

C12N 15/866 (2006.01)

A01K 67/033 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61M 5/20 (2006.01)

B01L 99/00 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2016 PCT/EP2016/072143**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017 WO17046415**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2016 E 16766970 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3350334**

54 Título: **Expresión de proteínas recombinantes en pupas de Trichoplusia ni**

30 Prioridad:

17.09.2015 EP 15382451

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.05.2020

73 Titular/es:

**ALTERNATIVE GENE EXPRESSION, S.L. (100.0%)
Centro empresarial Parque Científico y
Tecnológico Universidad Politécnica de Madrid
Campus de Montegancedo
28223 Pozuelo de Alarcón - Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍNEZ ESCRIBANO, JOSÉ ÁNGEL;
ALVARADO FRADUA, CARMEN;
REYTOR SAAVEDRA, EDEL y
CID FERNANDEZ, MIGUEL**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 763 001 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

Expresión de proteínas recombinantes en pupas de *Trichoplusia ni*

5 **Campo de la invención**

La presente invención puede incluirse en el campo de la biotecnología y cubre medios y métodos para aumentar la eficiencia de la expresión de proteínas recombinantes, en particular para la producción industrial de proteínas recombinantes en pupas de insectos, particularmente en pupas de *Trichoplusia ni* (*T. ni*), incluyendo su optimización. Además, la presente invención también se refiere a las pupas en sí que comprenden un baculovirus, pupas infectadas, transformadas, transducidas o transfectadas con baculovirus o bácmidos.

Estado de la técnica

El sistema de vector de expresión de baculovirus (BEVS) es un método bien establecido para la producción de proteínas recombinantes, por ejemplo, proteínas que van a usarse como vacunas, moléculas terapéuticas o reactivos de diagnóstico. Con su potencial de sobreexpresión y rápida velocidad de desarrollo, el BEVS es una de las elecciones más atractivas para producir proteínas recombinantes para cualquier propósito. El vector de baculovirus más empleado usado en la industria para la expresión de proteínas recombinantes se basa en el virus de la polihedrosis multinuclear de *Autographa californica* (AcMNPV) con células de insecto de *Spodoptera frugiperda* 9 (*Sf9*) o 21 (*Sf21*) como huéspedes de expresión adecuados (Nettleship, J.E., Assenberg, R., Diprose, J.M., Rahman-Huq, N., Owens, R.J. Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. J. Struct. Biol. 2010, 172, 55-65), así como larvas de insecto de *Trichoplusia ni* (*T. ni*) como biofábricas vivas (Gomez-Casado E, Gomez-Sebastian S, Núñez MC, Lasa-Covarrubias R, Martínez-Pulgarín S, Escribano JM. Insect larvae biofactories as a platform for influenza vaccine production. Protein Expr Purif. 79: 35-43. 2011). Dado que el BEVS se desarrolló en los años 80 (Smith, G.E., M.D. Summers y M.J. Fraser. 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell. Biol. 3: 2156-21 65), cientos de proteínas recombinantes, que oscilan desde enzimas citosólicas hasta proteínas unidas a membrana, se han producido con éxito en células de insecto infectadas con baculovirus.

Recientemente, se han descrito nuevos vectores de baculovirus. Por ejemplo, los documentos WO 2012/168493 y WO 2012168492 describen elementos de ADN recombinante para la expresión de proteínas recombinantes en insectos y células de insecto.

En todo el mundo, se producen aproximadamente 70.000 toneladas de seda al año en un proceso que convierte un sustrato de bajo valor, las hojas del árbol de la morera, en un producto basado en proteínas de alto valor: la seda. Los insectos son productores de proteínas altamente eficaces debido a su metabolismo acelerado.

Los lepidópteros tales como *Bombyx mori* (*B. mori*, gusano de seda) o *T. ni* (oruga de la col), son dos de los insectos más usados en biotecnología. Crecen en tamaño aproximadamente 5000 veces en menos de 2 semanas y producen más de un kilómetro de seda por insecto de *B. mori*. Aunque una célula de una glándula de seda puede producir aproximadamente 80 µg de proteína/célula/día, los mejores sistemas de cultivo de células de mamífero sólo producen aproximadamente 50 pg de proteína/célula/día.

Por consiguiente, los insectos como biofábricas vivas constituyen una alternativa prometedora a las células de insecto, tecnologías de fermentación convencionales y también a proteínas de origen vegetal debido a la versatilidad de producción, escalabilidad, posibilidad de automatización, eficiencia y velocidad de desarrollo. Por ejemplo, los insectos como biofábricas vivas evitan la necesidad de biorreactores para la expresión de proteínas en, por ejemplo, células de insecto. Los biorreactores son una barrera tecnológica y económica para producir proteínas recombinantes nuevas y existentes, dado que son ineficientes, costosos, tecnológicamente complejos (tardan varios años en construirse, son difíciles de validar, necesitan personal altamente cualificado para su manipulación, son propensos a contaminaciones y no son fiables). Además, se encuentran con el problema de la escalabilidad limitada.

Las larvas de *B. mori* se han usado ampliamente como biofábricas vivas para la expresión de proteínas recombinantes usando el sistema de vector de expresión de baculovirus (Wang, DN; Liu, JW; Yang, GZ; Zhang, WJ; Wu, XF. 2002. Cloning of anti-LPS factor cDNA from *Tachypleus tridentatus*, expression in *Bombyx mori* larvae and its biological activity in vitro. Molecular Biotechnology, 21(1), 1-7; Wu, XF; Kamei, K; Sato, H; Sato, S; Takano, R; Ichida, M; Mori, H; Hara, S. 2001. High-level expression of human acidic fibroblast growth factor and basic fibroblast growth factor in silkworm (*Bombyx mori* L.) using recombinant baculovirus. Protein Expression And Purification, 21(1), 192-200; Kulakosky, PC; Hughes, PR; Wood, HA. 1998. N-linked glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in insect larvae and tissue culture cells. Glycobiology, 8(7), 741-745; Suzuki, T; Kanaya, T; Okazaki, H; Ogawa, K; Usami, A; Watanabe, H; KadonoOkuda, K; Yamakawa, M; Sato, H; Mori, H; Takahashi, S; Oda, K. 1997. Efficient protein production using a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus lacking the cysteine proteinase gene. Journal Of General Virology, 78, 3073-3080; Sumathy, S; Palhan, VB; Gopinathan, KP. 1996. Expression of human growth hormone in silkworm larvae through recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. Protein Expression And Purification, 7(3), 262-268; U. Reis, B. Blum, B.U. von Specht, H. Domdey, J. Collins,

Antibody production in silkworm cells and silkworm larvae infected with a dual recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, *Biotechnology (NY)* 10 (1992) 910-912).

Las larvas de *T. ni* también se han usado para la expresión de proteínas recombinantes (Perez-Martin, E., Gomez-Sebastian, S., Argilaguet, J.M., Sibila, M., Fort, M., Nofrarias, M., Kurtz, S., Escribano, J.M., Segales, J., Rodriguez, F., 2010. Immunity conferred by an experimental vaccine based on the recombinant PCV2 Cap protein expressed in *Trichoplusia ni*-larvae. *Vaccine* 28 (11), 2340-2349); Gomez-Casado E, Gomez-Sebastian S, Núñez MC, Lasa-Covarrubias R, Martínez-Pulgarín S, Escribano JM. Insect larvae biofactories as a platform for influenza vaccine production, *Protein Expr. Purif.* 2011, 79: 35-43; Medin, JA; Hunt, L; Gathy, K; Evans, RK; Coleman, MS. 1990. Efficient, low-cost protein factories - expression of human adenosine-deaminase in baculovirus-infected insect larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(7), 2760-2764; Shafer, AL; Katz, JB; Eernisse, KA. 1998. Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of type A influenza antibodies in avian sera. *Avian Diseases*, 42(1), 28-34; Cha, HJ; Pham, MQ; Rao, G; Bentley, WE. 1997. Expression of green fluorescent protein in insect larvae and its application for heterologous protein production. *Biotechnology and Bioengineering*, 56(3), 239-247; Burden, JP; Hails, RS; Windass, JD; Suner, MM; Cory, JS. 2000. Infectivity, speed of kill, and productivity of a baculovirus expressing the itch mite toxin txp-1 in second and fourth instar larvae of *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75(3), 226-236; Perez-Filgueira, D. M.; Resino-Talavan, P.; Cubillos, C.; Angulo, I.; Barderas, M. G.; Barcena, J.; Escribano, J. M.. 2007. Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. *Virology*, 364(2), 422-430; Perez-Filgueira, D. A.; Gonzalez-Camacho, F.; Gallardo, C.; Resino-Talavan, P.; Blanco, E.; Gomez-Casado, E.; Alonso, C.; Escribano, J. M.. 2006. Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3114-3121; Hellers, M; Gunne, H; Steiner, H. 1991. Expression and posttranslational processing of preprocecropin-a using a baculovirus vector. *European Journal of Biochemistry*, 199(2), 435-439).

En el gusano de seda, estudios comparativos demostraron que, para la mayoría de proteínas, los rendimientos de expresión más altos se obtuvieron en larvas en lugar de en pupas (Akihiro Usami *et al* (Akihiro Usami, Seiji Ishiyama, Chiaki Enomoto, Hironobu Okazaki, Keiko Higuchi, Mashahiro Ikeda, Takeshi Yamamoto, Mutsumi Sugai, Yukiko Ishikawa, Yumiko Hosaka, Teruyuki Koyama, Yoneko Tobita, Syoko Ebihara, Toshiko Mochizuki, Yoshimi Asano y Hidekazu Nagaya, Comparison of recombinant protein expression in a baculovirus system in insect cells (Sf9) and silkworm, *J. Biochem.* 2011;149(2):219-227; Chazarra S, Aznar-Cervantes S, Sánchez-del-Campo L, Cabezas-Herrera J, Xiaofeng W, Cenis JL, Rodríguez-López JN, Purification and kinetic properties of human recombinant dihydrofolate reductase produced in *Bombyx mori* chrysalides, *Appl Biochem Biotechnol.* Noviembre de 2010;162(7):1834-46). Además, se ha descrito una disminución de la susceptibilidad de las pupas a la infección por baculovirus en gusanos de seda relacionada con la edad de las pupas (*Journal of General Virology* (1992), 73, 3195-320). Además, en las larvas, la infección del baculovirus se realiza generalmente por vía oral, en lugar de mediante inoculación (inyección) para la producción a gran escala. Las pupas no pueden infectarse por vía oral, de modo que hay que inyectarlas manualmente, lo cual es tedioso y requiere mucho tiempo. Además, las pupas de gusano de seda están cubiertas por un capullo grueso que ha de retirarse (manualmente) antes de que tenga lugar la inoculación del virus, lo que generalmente es un proceso tedioso.

Junto con el menor rendimiento de expresión de proteínas general en la pupa del gusano de seda y las dificultades en su manipulación, han conducido a una preferencia general del uso de larvas para la producción de proteínas recombinantes.

Pueden encontrarse desventajas similares en otros sistemas, tales como pupas de *Hyalophora cecropia*. La expresión de determinadas proteínas en pupas de *H. cecropia* es menor que en larvas de *T. ni* (Hellers, M. y Steiner, H.; *Insect Biochem. Molec. Biol.*, vol. 22, Bo.1, págs. 35-39, 1992). Además, las polillas de *Hyalophora cecropia* son difíciles de criar, son estrictamente univoltinas (tienen una generación al año), tienen cantidades muy bajas de huevos por ciclo y tienen un capullo de alta densidad (el capullo grueso ha de retirarse (manualmente) antes de que tenga lugar la inoculación del virus, lo que generalmente es un proceso tedioso). Todas estas desventajas hacen de las pupas de *Hyalophora cecropia* un mal sistema para la expresión de proteínas recombinantes, en particular un sistema poco eficiente, escalable y automatizado para la expresión de proteínas recombinantes.

Existe la necesidad de sistemas más eficientes y fáciles de automatizar (escalar) para la expresión de proteínas recombinantes en insectos usando el BEVS, particularmente para la expresión industrial de proteínas recombinantes en insectos usando el BEVS.

Después de una investigación intensiva, los inventores de la presente invención han encontrado una solución al problema anterior, concretamente un sistema de expresión de proteínas en pupas que pertenecen al género *Trichoplusia*, que es más eficiente que la expresión en larvas y permite además una automatización (escalado) casi completa, que aumenta la eficiencia y reduce los costes asociados con la expresión de proteínas recombinantes, en particular a escala industrial.

Por tanto, la presente invención se refiere al uso de pupas (crisálidas), del género *Trichoplusia*, en combinación con vectores de baculovirus derivados del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*

(AcMNPV), para producir proteínas recombinantes que van a usarse en diagnóstico, vacunas y tratamientos terapéuticos. El uso de pupas (crisálidas) de la especie *Trichoplusia ni* para la expresión de proteínas recombinantes, en particular el uso industrial de pupas (crisálidas) de la especie *Trichoplusia ni* para la expresión de proteínas recombinantes, no se ha comunicado aún.

Sumario de la invención

La invención a la que se refiere esta memoria descriptiva se expone en las reivindicaciones adjuntas a esta descripción.

La presente invención proporciona una pupa que comprende un baculovirus recombinante y/o un vector de transferencia/bácmido derivado del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV).

Además, la presente invención proporciona una pupa que comprende una secuencia de ácido nucleico que permite la expresión por encima de los niveles endógenos de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas que actúan como reguladores de la transcripción por encima de los niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus y una región homóloga recombinante (*hr*) ligada operativamente a cualquier promotor que es adecuado para dirigir la expresión de una proteína recombinante.

La invención también se refiere al uso de la pupa de la invención para la expresión de proteínas recombinantes.

Además, la presente invención proporciona un método para producir al menos una proteína recombinante que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una pupa;

(b) inocular la pupa de la etapa (a) con un baculovirus recombinante derivado del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV);

(c) incubar la pupa inoculada de la etapa (b) durante un periodo de tiempo suficiente para que se exprese la al menos una proteína recombinante;

(d) obtener las pupas que comprenden la al menos una proteína recombinante;

(e) opcionalmente, recoger la al menos una proteína recombinante; y

(f) opcionalmente, purificar la al menos una proteína recombinante.

Además, se proporciona en el presente documento un método que puede automatizarse para reducir la manipulación para producir una pupa libre de seda que pertenece al orden *Lepidoptera* que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una pupa contenida en un capullo;

(b) tratar la pupa contenida en un capullo, preferiblemente mediante un dispositivo especialmente diseñado, con una disolución de una sal de ácido hipocloroso, preferiblemente hipoclorito de sodio; y

(c) obtener una pupa libre de seda (y, opcionalmente, esencialmente desinfectada externamente).

Un método para producir un baculovirus recombinante que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una pupa;

(b) transfectar la pupa de la etapa (a) con un vector de transferencia/bácmido adecuado para producir un baculovirus recombinante derivado del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV);

(c) incubar la pupa inoculada de la etapa (b) durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca el baculovirus recombinante;

(d) obtener las pupas que comprenden el baculovirus recombinante;

(e) opcionalmente, recoger el baculovirus recombinante; y

(f) opcionalmente, purificar el baculovirus recombinante.

La presente divulgación también se refiere a un dispositivo que comprende una bomba de precisión, un brazo mecánico móvil y una(s) aguja(s) (retirable(s)) adecuada(s) para inyectar un fluido en una pupa que pertenece al orden *Lepidoptera*, preferiblemente a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliothis*, *Manduca*, *Helicoverpa*, *Ascalapha* o *Samia*, más preferiblemente a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliothis* o *Helicoverpa*, incluso más preferiblemente a las especies *Trichoplusia ni*, *Rachiplusia nu*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Manduca sexta*, *Ascalapha odorata* o *Sanda cynthia*.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Módulo de cría masiva de insectos de *T. ni* de un solo uso. Larvas que crecen en el módulo de cría de insectos en el quinto estadio del instar.

Figura 2: Comparación de capullos (parte izquierda de la imagen) y pupas libres de seda (parte derecha de la imagen) formados por los lepidópteros *Bombyx mori* y *Trichoplusia ni*.

Figura 3: Dispositivo semiautomático para la retirada de seda de los capullos de *T. ni*. Representación esquemática de la máquina que contiene dos recipientes y un brazo mecánico en el que está situado el módulo de cría de un solo uso. El primer recipiente contiene ácido hipocloroso y un sistema para proyectar el líquido a través de los módulos de cría que contienen los capullos (ayuda a disolver más eficazmente la seda que rodea a la pupa). El segundo recipiente es para lavar las pupas y pulveriza agua sobre las crisálidas. En la parte superior de este recipiente hay un sistema que dispensa aire para secar las pupas. Al final del proceso, las pupas están libres de seda y listas para usarse en la infección o para almacenarse refrigeradas hasta su uso.

Figura 4: Casetes de expresión de baculovirus usados para producir la proteína fluorescente verde (GFP). A) Casete de expresión convencional de baculovirus que usa el promotor de polihedrina (por ejemplo, SEQ ID NO: 23). B) Casete de expresión TB que comprende el ADNc de Ac-*ie-01* que codifica para los transactivadores IE1 e IE0 expresados bajo el control del promotor de polihedrina; la secuencia potenciadora *hr1* y el promotor quimérico *p6.9-p10* que dirige la expresión de la GFP (por ejemplo, SEQ ID NO: 17 y una secuencia de ácido nucleico que codifica para GFP, por ejemplo, SEQ ID NO: 38).

Figura 5: Inoculación automática de pupas de *T. ni* mediante un robot que inyecta el baculovirus recombinante. A) Representación esquemática del robot de inoculación. B) Representación esquemática de una matriz de alveolo en la que se sitúan las pupas de insectos. Estos alveolos que contienen las pupas tienen una parte superior perforada y pueden apilarse facilitando el transporte de las pupas al laboratorio de producción y son compatibles con el robot de inoculación. En el mismo panel, una imagen de fotografía real del alveolo que contiene las pupas y con la parte superior. C) Representación esquemática de la inoculación de las pupas con una aguja conectada con el brazo robótico.

Figura 6: Análisis comparativo de los rendimientos de expresión de la proteína GFP en pupas infectadas usando un baculovirus convencional TB(-) (promotor de polihedrina, por ejemplo, SEQ ID NO: 23) o un baculovirus modificado con TB TB(+). A) Tinción con azul de Coomassie de una SDS-PAGE que resuelve extractos de proteína de pupas infectadas con el baculovirus TB(-) o TB(+). (-) corresponde a un extracto de una pupa de control no infectada. B) Cuantificación de los rendimientos de producción de GFP obtenidos en pupas infectadas por cada baculovirus analizado expresados en mg por g de biomasa de pupas.

Figura 7: Casetes de expresión de baculovirus usados para producir la proteína de la cápside del circovirus porcino tipo 2 (Cap) (por ejemplo, SEQ ID NO: 26) o la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe (por ejemplo, SEQ ID NO: 30). A) Casete de expresión de baculovirus convencional que usa el promotor de polihedrina. B) Casete de expresión TB que comprende el ADNc de Ac-*ie-01* que codifica para los transactivadores IE1 e IE0 expresados bajo el control del promotor de polihedrina; la secuencia potenciadora *hr1* y el promotor quimérico *p6.9-p10* que dirige la expresión de las proteínas mencionadas anteriormente.

Figura 8: Análisis comparativo de los rendimientos de expresión de la proteína Cap (por ejemplo, SEQ ID NO: 26) en pupas infectadas usando un baculovirus convencional TB(-) (promotor de polihedrina, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 28) o un baculovirus modificado con TB TB(+) (por ejemplo, SEQ ID NO: 27 ó 29). A) Tinción con azul de Coomassie de una SDS-PAGE que resuelve extractos de proteína de pupas infectadas con el baculovirus TB(-) o TB(+). (-) corresponde a un extracto de una pupa de control no infectada. B) Cuantificación de los rendimientos de producción de Cap obtenidos en pupas infectadas por cada baculovirus analizado expresados en mg por g de biomasa de pupas.

Figura 9: Análisis comparativo de los rendimientos de expresión de la proteína HA (SEQ ID NO: 30) en pupas infectadas usando un baculovirus convencional TB(-) (promotor de polihedrina, SEQ ID NO: 10) o un baculovirus modificado con TB TB(+) (por ejemplo, SEQ ID NO: 31). A) Tinción con azul de Coomassie de una SDS-PAGE que resuelve extractos de proteína de pupas infectadas con el baculovirus TB(-) o TB(+). (-) corresponde a un extracto de una pupa de control no infectada. B) Cuantificación de los rendimientos de producción de HA obtenidos en pupas

infectadas por cada baculovirus analizado expresados en mg por g de biomasa de pupas.

Figura 10: Casete de expresión de baculovirus usado para producir la proteína GFP, Cap (SEQ ID NO: 26), HA (SEQ ID NO: 30) y VP60 a partir de virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV, SEQ ID NO: 32 ó 33) en larvas y pupas de *T. ni*. Representación esquemática del casete de expresión TB que comprende el ADNc de *Ac-*ie-01** que codifica para los transactivadores IE1 e IE0 expresados bajo el control del promotor de polihedrina; la secuencia potenciadora *hr1* y el promotor quimérico *p6.9-p10* que dirige la expresión de las proteínas mencionadas anteriormente.

Figura 11: Análisis comparativo de los rendimientos de expresión de la proteína GFP en pupas y larvas infectadas. A) Tinción con azul de Coomassie de una SDS-PAGE que resuelve extractos de proteína de pupas infectadas (P) o larvas infectadas (L) con el baculovirus TB(+). (-) corresponde a un extracto de una pupa de control no infectada. B) Cuantificación de los rendimientos de producción de GFP obtenidos en pupas o larvas infectadas y expresados en mg por g de biomasa de insectos.

Figura 12: Análisis comparativo de los rendimientos de expresión de la proteína Cap en pupas y larvas infectadas. A) Tinción con azul de Coomassie de una SDS-PAGE que resuelve extractos de proteína de pupas infectadas (P) o larvas infectadas (L) con el baculovirus TB(+). (-) corresponde a un extracto de una pupa de control no infectada. B) Cuantificación de los rendimientos de producción de Cap obtenidos en pupas o larvas infectadas y expresados en mg por g de biomasa de insectos.

Figura 13: Análisis comparativo de los rendimientos de expresión de la proteína HA en pupas y larvas infectadas. A) Tinción con azul de Coomassie de una SDS-PAGE que resuelve extractos de proteína de pupas infectadas (P) o larvas infectadas (L) con el baculovirus TB(+). (-) corresponde a un extracto de una pupa de control no infectada. B) Cuantificación de los rendimientos de producción de HA obtenidos en pupas o larvas infectadas y expresados en mg por g de biomasa de insectos.

Figura 14: Análisis comparativo de los rendimientos de expresión de las proteínas VP60 de la cápside del RHDV (G1 y RHDVb) en pupas y larvas infectadas. A) Tinción con azul de Coomassie de una SDS-PAGE que resuelve extractos de proteína de pupas infectadas (P) o larvas infectadas (L) con el baculovirus TB(+). (-) corresponde a un extracto de una pupa de control no infectada. B) Cuantificación de los rendimientos de producción de proteínas de la cápside del RHDV obtenidos en pupas o larvas infectadas y expresados en mg por g de biomasa de insectos (L) con el baculovirus TB(+). (-) corresponde a un extracto de una pupa de control no infectada. B) Cuantificación de los rendimientos de producción de proteínas de la cápside del RHDV obtenidos en pupas o larvas infectadas y expresados en mg por g de biomasa de insectos.

Figura 15: VLP formadas después de la infección de pupas de *T. ni* por un baculovirus TB(+) que expresa la proteína VP60 del G1 de RHDV y RHDVb. Se procesaron extractos de pupas infectadas en los momentos de producción óptimos con cada baculovirus para la purificación de VLP. Se observaron las muestras mediante microscopía electrónica usando tinción negativa. La figura muestra las VLP a dos aumentos. Las VLP obtenidas con los dos baculovirus presentaron tamaños y formas idénticas. Las micrografías son representativas de los campos analizados.

Figura 16: Ejemplo esquemático del procedimiento para obtener un inóculo de virus de pupas infectadas en ausencia de cultivos de células de insecto.

Figura 17: Ejemplo esquemático de procedimiento de procesamiento anterior y posterior para obtener una proteína recombinante purificada de pupas infectadas en tres etapas. A) Producción de crisálidas de *T. ni*, su manipulación y opcionalmente envío al destino final (por ejemplo, empresa farmacéutica) para la producción de proteínas recombinantes. B) Almacenamiento de las pupas, inoculación robótica con baculovirus recombinante usando el dispositivo de la presente invención, incubación y biomasa de insecto congelada, que puede almacenarse durante meses antes del procesamiento *in situ*, o que puede enviarse fácilmente a otras ubicaciones para proceder con el procesamiento posterior. C) Procesamiento posterior mediante medios convencionales de biomasa congelada, incluyendo homogeneización, filtración de flujo tangencial y purificación de proteínas.

Figura 18: Comparación de rendimientos de expresión de proteína Cap del circovirus porcino en células de insecto usando un baculovirus convencional y un baculovirus modificado mediante TopBac en células de insecto y en pupas de insectos.

Figura 19: Ejemplo esquemático de un procedimiento para obtener un inóculo de virus de pupas infectadas.

Figura 20: Ejemplo esquemático de un procedimiento de procesamiento posterior para obtener una proteína recombinante purificada de pupas infectadas.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, “pupa” se refiere al estadio vital de algunos insectos que experimentan transformación. El estadio pupal se encuentra en insectos que experimentan una metamorfosis completa (insectos holometábolos). Estos insectos pasan por cuatro estadios vitales: embrión, larva, pupa e imago. La pupa de las mariposas también se denomina crisálida. Los insectos pueden proteger la pupa cubriéndola con un capullo, que es una cubierta hilada de seda que protege la pupa de muchos insectos.

Tal como se usa en el presente documento, “baculovirus” se refiere a una familia de virus infecciosos para invertebrados, que infectan principalmente insectos y artrópodos. Un “baculovirus recombinante” ha introducido además ADN recombinante a través de, por ejemplo, recombinación homóloga o transposición. El baculovirus recombinante puede originarse a partir del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV).

Tal como se usa en el presente documento, un “casete de expresión” comprende elementos de ADN recombinante que están implicados en la expresión de un determinado gen, tal como el gen en sí y/o elementos que controlan la expresión de este gen (por ejemplo, el promotor). Por ejemplo, un casete de expresión útil en la presente invención comprende los siguientes elementos de ADN recombinante:

1. una secuencia de ácido nucleico que permite la expresión de una proteína recombinante, tal como las proteínas recombinantes descritas a continuación en la presente memoria descriptiva, y preferiblemente secuencias de ácido nucleico que controlan su expresión (al menos un promotor); y

2. una secuencia de ácido nucleico que permite la expresión de reguladores de la transcripción de baculovirus, tales como IE-1 e IE-0, por encima de los niveles normales, es decir, endógenos, de dichos reguladores que se obtienen durante la infección por baculovirus de una célula de insecto o un insecto.

En algunas realizaciones, el casete de expresión comprende además una región homóloga potenciadora (*hr*), tal como *hr1*, ligada operativamente al promotor de dicha secuencia que codifica para la proteína recombinante. Los elementos de ADN recombinante que forman parte del casete de expresión de la invención pueden estar presentes en una única molécula de ácido nucleico. Los elementos de ADN recombinante que forman parte del casete de expresión pueden estar presentes en moléculas de ácido nucleico distintas. Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico distintas están presentes dentro de la misma célula.

Tal como se usa en el presente documento, “ADN recombinante” se refiere a una forma de ADN artificial que se modifica por ingeniería genética a través de la combinación o inserción de una o más cadenas de ADN, combinando de ese modo ADN que no se produciría normalmente junto.

Tal como se usa en el presente documento, “elemento de ADN recombinante” se refiere a un elemento funcional dentro del ADN recombinante, tal como un promotor, un potenciador o un gen.

Tal como se usa en el presente documento, “regulador de la transcripción” se refiere a una proteína reguladora que tiene la capacidad de modular la transcripción de genes específicos mediante, por ejemplo, la unión a regiones potenciadoras o represoras y/o el reclutamiento de proteínas adicionales que están implicadas en la transcripción. IE-1 y su variante de corte y empalme IE-0 son reguladores de la transcripción que se expresan de manera endógena durante la infección por baculovirus. El nivel de expresión de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas puede determinarse tanto al nivel de ARNm como al nivel de proteína con métodos conocidos de manera convencional por el experto en la técnica, tales como PCR cuantitativa y análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

Según la presente invención, IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas pueden expresarse de manera recombinante para aumentar el nivel total de estas proteínas por encima de niveles endógenos durante la infección por baculovirus. Esto puede lograrse a través de, por ejemplo, la introducción de copias adicionales del gen endógeno o la manipulación de la expresión del promotor del gen endógeno. Pueden introducirse copias adicionales de los genes endógenos como transgenes bajo el control de un promotor adecuado tal como *polh* o *pB2*.

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

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos a las que se hace referencia en la presente invención se distinguirán de otras secuencias de ácido nucleico y aminoácidos por su grado de identidad o similitud de secuencia, respectivamente, tal como se determina usando EMBOSS Needle con los parámetros por defecto

(http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). Los métodos para la generación de tales variantes incluyen mutagénesis al azar o dirigida al sitio, mutagénesis de saturación de sitios, ensamblaje de fragmentos basado en PCR, intercambio de ADN, recombinación homóloga *in vitro* o *in vivo* y métodos de síntesis génica.

5 Tal como se usa en el presente documento, “variantes” son ácidos nucleicos o aminoácidos cuya secuencia de ácido nucleico o aminoácidos difiere en una o más posiciones de la secuencia original de ácido nucleico o aminoácidos, por lo cual las diferencias pueden ser adiciones, deleciones y/o sustituciones de ácidos nucleicos o residuos de aminoácido.

10 Tal como se usa en el presente documento, las “regiones homólogas”, (*hr*), están compuestas por unidades repetidas de aproximadamente 70 pb con un palíndromo imperfecto de 30 pb cerca de su centro. Por ejemplo, se repiten regiones homólogas en ocho ubicaciones en el genoma de AcMNPV con de 2 a 8 repeticiones en cada lado. Se han implicado a las regiones homólogas tanto como potenciadores de la transcripción como orígenes de replicación de ADN de baculovirus.

15 Tal como se usa en el presente documento, “región potenciadora” se refiere a una secuencia de control, cuya unión por reguladores de la transcripción aumenta el nivel de transcripción de genes asociados.

20 Tal como se usa en el presente documento, “proteína recombinante” se refiere a una proteína que se origina a partir de ADN recombinante. Tales proteínas pueden usarse para el beneficio de humanos y animales y pueden tener aplicación industrial, comercial o terapéutica.

25 Tal como se usa en el presente documento, “que están ligadas operativamente” se refiere a dos secuencias de ácido nucleico que están conectadas de manera que una influye en la otra en cuanto a, por ejemplo, regulación de la transcripción.

30 Tal como se usa en el presente documento, “promotor” se refiere a una secuencia de ADN a la que puede unirse ARN polimerasa para iniciar la transcripción. La secuencia puede contener además sitios de unión para diversas proteínas que regulan la transcripción, tales como factores de transcripción. La secuencia promotora puede estar compuesta de diferentes fragmentos de promotor (o bien fragmentos diferentes o bien iguales) que se ubican cerca en la secuencia de ADN y pueden separarse mediante ligadores o espaciadores. Tales promotores se denominan promotores quiméricos.

35 Tal como se usa en el presente documento, un “vector de transferencia” es un vector (concretamente una molécula de ADN usada como vehículo para portar material genético) que permite la inserción de información genética en un genoma de baculovirus.

40 Tal como se usa en el presente documento, un “bácmido” se refiere a un constructo de plásmido que contiene la secuencia de ADN suficiente para generar un baculovirus cuando se transfecta en una célula o un insecto.

45 Tal como se usa en el presente documento, un “vector de clonación” se refiere a cualquier vector que es adecuado para la clonación, que implica generalmente la presencia de sitios de restricción, un origen de replicación para la propagación bacteriana y un marcador seleccionable.

50 El vector de clonación que puede usarse en el contexto de la presente invención contiene preferiblemente además de (i) la secuencia para la expresión por encima de los niveles endógenos de las proteínas IE-0, IE-1 y/o fragmentos de las mismas, (ii) una región homóloga recombinante (*hr*) ligada a (iii) un promotor adecuado para dirigir la expresión de una proteína recombinante. Por ejemplo, el vector de clonación puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína recombinante (también denominado “vector donador”, concretamente un vector de clonación que comprende un casete de expresión). Alternativamente, el vector de clonación carece de tal secuencia.

55 Tal como se usa en el presente documento, una “vacuna” puede definirse como una preparación biológica, que comprende preferiblemente una proteína recombinante que proporciona inmunidad adquirida activa a una enfermedad particular.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” significa el valor indicado $\pm$ el 1% de su valor, o el término “aproximadamente” significa el valor indicado $\pm$ el 2% de su valor, o el término “aproximadamente” significa el valor indicado $\pm$ el 5% de su valor, el término “aproximadamente” significa el valor indicado $\pm$ el 10% de su valor, o el término “aproximadamente” significa el valor indicado $\pm$ el 20% de su valor, o el término “aproximadamente” significa el valor indicado $\pm$ el 30% de su valor; preferiblemente el término “aproximadamente” significa exactamente el valor indicado ($\pm$ el 0%).

Descripción detallada

65 La presente divulgación proporciona una pupa que comprende un baculovirus recombinante y/o un vector de

transferencia/bácmido. La presente divulgación muestra sorprendentemente que la introducción de baculovirus recombinantes en pupas de insectos, y particularmente de secuencias que provocan la expresión de reguladores de la transcripción de baculovirus por encima de los niveles endógenos y opcionalmente la introducción de una secuencia de región homóloga potenciadora (*hr*), un promotor o una combinación de promotores, puede aumentar la producción de una proteína recombinante hasta niveles sin precedentes. Esto indica la utilidad de este sistema para la expresión de proteínas recombinantes *in vivo*, en particular para la producción industrial de proteínas recombinantes *in vivo*.

La presente divulgación proporciona una pupa que comprende un baculovirus recombinante y/o vector de transferencia y/o bácmido. El baculovirus recombinante y/o vector de transferencia y/o bácmido se deriva preferiblemente del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV). Preferiblemente, la pupa pertenece al orden *Lepidoptera*, preferiblemente a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliothis*, *Manduca*, *Helicoverpa*, *Ascalapha* o *Samia*, preferiblemente a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliothis* o *Helicoverpa*, más preferiblemente a las especies *Trichoplusia ni*, *Rachiplusia nu*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Manduca sexta*, *Ascalapha odorata* o *Samia cynthia*. Incluso más preferiblemente, la pupa pertenece a la especie *Trichoplusia ni*. En un aspecto preferido, la pupa de la presente divulgación no pertenece a la especie *Bombyx mori*. En un aspecto preferido, la pupa de la presente divulgación no pertenece a la especie *Hyalophora cecropia*.

La pupa de la invención es una pupa que pertenece al género *Trichoplusia*, preferiblemente a la especie *Trichoplusia ni*, que comprende un baculovirus recombinante y/o un vector de transferencia/bácmido derivado del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV).

Las pupas de la invención, y en particular las pupas de *T. ni*, ofrecen varias ventajas para la expresión de proteínas recombinantes, en particular en procesos automatizados y escalables. Por ejemplo, una pareja de polillas de *T. ni* puede tener alrededor de 1.000 huevos por ciclo. Además, el capullo producido por pupas de *T. ni* no es tan grueso como el capullo que cubre las pupas de otras especies (tales como, por ejemplo, *Bombyx mori* o *Hyalophora cecropia*), que hacen que las pupas de *T. ni* sean especialmente adecuadas para su uso en procesos de producción automatizados y escalables (producción industrial de proteínas recombinantes). Por consiguiente, las pupas de *T. ni* infectadas con un baculovirus recombinante y/o un vector de transferencia y/o un bácmido preferiblemente derivado de virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV) proporcionan un sistema eficiente, escalable y fácilmente automatizado para la producción de proteínas recombinantes. Ventajas adicionales de este sistema son su elevada productividad (hasta 20 veces más productivo que los biorreactores), el hecho de que es técnicamente sencillo, fácil de implementar y validar, sus costes reducidos (> 90% de reducción en inversiones fijas con respecto al uso de biorreactores), el menor coste de los bienes, tiempos de desarrollo cortos (sistema de baculovirus), su alta eficiencia con proteínas difíciles de producir y la elevada calidad y seguridad de los productos producidos.

Los inventores de la presente solicitud encontraron sorprendentemente que la expresión de proteínas recombinantes en pupas, en particular en pupas que pertenecen al orden *Lepidoptera*, preferiblemente a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliothis*, *Manduca*, *Helicoverpa*, *Ascalapha* o *Samia*, preferiblemente a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliothis* o *Helicoverpa*, más preferiblemente a las especies *Trichoplusia ni*, *Rachiplusia nu*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Manduca sexta*, *Ascalapha odorata* o *Samia cynthia*, es comparable con e incluso mayor que la expresión en larvas.

La solicitud de patente publicada como WO 2012/168492 divulga baculovirus recombinantes y vectores de transferencia y bácmidos que pueden estar comprendidos en la pupa de la presente invención.

El baculovirus recombinante y/o vector de transferencia y/o bácmido comprendido en la pupa según la presente invención puede comprender preferiblemente un ADN recombinante. Por ejemplo, el baculovirus recombinante y/o vector de transferencia y/o bácmido comprendido en la pupa según la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína recombinante, en el que la proteína recombinante se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en vacuna monomérica de subunidades, vacuna multimérica de subunidades, partícula similar a virus, proteína terapéutica, anticuerpo, enzima, citocina, factor de coagulación de la sangre, anticoagulante, receptor, hormona, reactivos proteicos de diagnóstico y la proteína fluorescente verde (GFP), y/o en el que la proteína recombinante preferiblemente no es una proteína que producen de manera endógena las pupas, tal como se describirá a continuación. Por ejemplo, el baculovirus recombinante y/o vector de transferencia y/o bácmido comprendido en la pupa según la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que permite la expresión por encima de los niveles endógenos de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas que actúan como reguladores de la transcripción por encima de los niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus (por ejemplo, la expresión por encima de los niveles endógenos puede obtenerse mediante la presencia, en el baculovirus recombinante, de una copia adicional de la secuencia de ácido nucleico que permite la expresión de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas). Preferiblemente, el baculovirus recombinante y/o vector de transferencia y/o bácmido comprendido en la pupa según la presente invención comprende además una región homóloga recombinante (*hr*) ligada operativamente a cualquier promotor adecuado para dirigir la expresión de una proteína recombinante.

El vector de transferencia que puede estar comprendido en la pupa de la presente invención contiene preferiblemente además de (i) la secuencia para la expresión por encima de los niveles endógenos de las proteínas IE-0, IE-1 y/o fragmentos de las mismas, (ii) una región homóloga recombinante (*hr*) ligada a (iii) un promotor adecuado para dirigir la expresión de una proteína recombinante. En un aspecto preferido, el vector de transferencia comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para dicha proteína recombinante, mientras que en otra realización preferida, el vector de transferencia carece de tal secuencia. En una realización preferida, el vector de transferencia es un bácmido.

El vector de transferencia y/o bácmido puede derivarse de cualquier sistema de expresión de baculovirus comercialmente disponible "Bac-to-Bac®" (invitrogen™), "BacPAK™" (Clontech™), "FlashBAC™" (Oxford Expression Technologies™), "BacuVance™" (GenScript™), "Bac-N-Blue DNA™" (invitrogen™), "BaculoDirect™" (invitrogen™), "BacVector®" 1000, 2000, 3000 (Novagen®), "DiamondBac™" (Sigma-Aldrich®) o "BaculoGold™" (BD biosciences™).

La pupa de la presente divulgación (que pertenece preferiblemente al orden *Lepidoptera*, preferiblemente a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliothis*, *Manduca*, *Helicoverpa*, *Ascalapha* o *Samia*, preferiblemente a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliothis* o *Helicoverpa*, más preferiblemente a las especies *Trichoplusia ni*, *Rachiplusia nu*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Manduca sexta*, *Ascatapha odorata* o *Samia cynthia*, o cualquier otro lepidóptero susceptible a infección por AcMNPV, incluso más preferiblemente al género *Trichoplusia* y a la especie *Trichoplusia ni*) puede comprender una secuencia de ácido nucleico que permite la expresión por encima de los niveles endógenos de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas que actúan como reguladores de la transcripción por encima de los niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus. Los elementos descritos anteriormente de ADN recombinante se introducen preferiblemente en la pupa mediante un baculovirus recombinante.

La secuencia de ácido nucleico que permite la expresión de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas que actúan como reguladores de la transcripción por encima de los niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus según la presente invención se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en:

- (a) un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 1-5;
- (b) una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más preferiblemente al menos el 95% con la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 1-5 y que codifica para una proteína que puede actuar como regulador de la transcripción en un baculovirus recombinante;
- (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica para un aminoácido que contiene la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 6-9; y
- (d) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos que tiene una similitud de secuencia de al menos el 70%, preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más preferiblemente al menos el 95% con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 6-9 que puede actuar como regulador de la transcripción en un baculovirus recombinante.

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

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

La pupa de la presente invención puede comprender además una secuencia de ácido nucleico y/o baculovirus recombinante y/o un vector de transferencia y/o un bácmido que comprende además una región homóloga recombinante (*hr*) ligada operativamente a cualquier promotor que es adecuado para dirigir la expresión de una proteína recombinante.

La región homóloga recombinante (*hr*) es preferiblemente la secuencia indicada en SEQ ID NO: 21 (*hr1*).

El promotor que dirige la expresión de dicha proteína recombinante se selecciona preferiblemente del grupo de ácidos nucleicos que comprende:

- (a) un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 10-

14, preferiblemente indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 11-13; y

(b) una secuencia de ácido nucleico que puede actuar como promotor en un baculovirus recombinante y que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más preferiblemente al menos el 95% con la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 10-14, preferiblemente indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 11-13.

En una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico que comprende combinaciones de promotores recombinantes, secuencias que codifican para reguladores de la transcripción y regiones potenciadoras (las secuencias de ácido nucleico que están comprendidas en la pupa de la presente invención) se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15-20.

Los promotores recombinantes, las secuencias que codifican para reguladores de la transcripción y las regiones potenciadoras de la presente invención no necesitan formar parte de una única molécula, en su lugar, estas secuencias pueden formar parte de distintas moléculas siempre que estén ligadas operativamente, es decir, contenidas dentro de las mismas células dentro de la pupa.

La pupa de la presente invención y/o el baculovirus recombinante y/o vector de transferencia y/o bácmido pueden comprender además una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína recombinante. Esta secuencia de ácido nucleico está preferiblemente ligada operativamente a la secuencia de ácido nucleico que permite la expresión por encima de los niveles endógenos de las proteínas IE- 1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas, y opcionalmente a una región homóloga (*hr*), habiéndose descrito estas secuencias anteriormente.

Preferiblemente, la proteína recombinante se selecciona del grupo que consiste en vacuna monomérica de subunidades, vacuna multimérica de subunidades, partícula similar a virus, proteína terapéutica, anticuerpo, enzima, citocina, factor de coagulación de la sangre, anticoagulante, receptor, hormona, reactivos proteicos de diagnóstico y proteína fluorescente verde (GFP).

En una realización preferida, la proteína recombinante es una proteína de partícula similar a virus, que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en:

(a) proteína de la cápside del circovirus porcino, preferiblemente de circovirus porcino tipo 2 (por ejemplo, SEQ ID NO: 26),

(b) proteína VP1, VP3 o VP0 del virus de la enfermedad de pie y boca,

(c) proteínas VP1 y VP2 del parvovirus canino,

(d) proteínas VP1 y VP2 del parvovirus porcino,

(e) proteína de la cápside (genogrupo I o II) del norovirus humano,

(f) proteína de la cápside del calicivirus,

(g) proteína L1 del virus del papiloma humano, preferiblemente del virus del papiloma humano 16,

(h) proteína E2 de la hepatitis E,

(i) proteínas VP1, VP2 y VP3 del virus de la enfermedad bursal infecciosa,

(j) proteínas codificadas por ORF2 de astrovirus,

(k) proteínas HA (por ejemplo, SEQ ID NO:30), NA y M1 del virus de la gripe,

(l) antígenos de superficie y núcleo de la hepatitis B,

(m) proteína VP60 del calicivirus del conejo, preferiblemente de RHDVb y RHDVG1 del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (por ejemplo, SEQ ID NO: 32 y 33),

(n) proteínas VP1 y VP2 del parvovirus humano.

Por ejemplo, la proteína recombinante puede ser:

• Proteína de la cápside del circovirus porcino, preferiblemente de circovirus porcino tipo 2, que está representada, por ejemplo, por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 o codificada por la secuencia de ácido nucleico de

SEQ ID NO: 25.

• Proteína VP1, VP3 y VP0 del virus de la enfermedad de pie y boca (FMDV), cuya secuencia se indica o puede derivarse, por ejemplo, de las siguientes secuencias:

- genoma completo de FMDV serotipo O: GenBank JX570650.1
- genoma completo de FMDV serotipo A: GenBank HQ832592.1
- genoma completo de FMDV serotipo C: GenBank AY593810.1
- genoma completo de FMDV serotipo SAT 1: GenBank AY593846.1
- genoma completo de FMDV serotipo SAT 2: GenBank JX014256.1
- genoma completo de FMDV serotipo ASIA 1: GenBank HQ631363.1.

• Proteína VP1 y VP2 del parvovirus canino, cuya secuencia se indica o puede derivarse, por ejemplo, de las siguientes secuencias:

- gen de VP1 del parvovirus canino para la proteína VP1 de la cápside, cds parcial, cepa: 1887/f/3. GenBank: AB437434.1.
- gen de VP1 del parvovirus canino para la proteína VP1 de la cápside, cds parcial, cepa: 1887/M/2. GenBank: AB437433.1.
- gen de VP2 del parvovirus canino, cds completa, cepa: HNI-2-13. GenBank: AB120724.1.
- gen de VP2 del parvovirus canino, cds completa, cepa: HNI-3-4. GenBank: AB120725.1.
- gen de VP2 del parvovirus canino, cds completa, cepa: HNI-3-11. GenBank: AB 120726.1.
- gen de VP2 del parvovirus canino, cds completa, cepa: HNI-4-1. GenBank: AB120727.1.
- gen de VP2 del parvovirus canino, cds completa, cepa: HNI-1-18. GenBank: AB120728.1.
- gen (VP2) de proteína VP2 del parvovirus canino, cds completa. GenBank: DQ354068.1.
- gen de VP2 del parvovirus canino, cds completa, cepa: HCM-6. GenBank: AB120720.1.
- gen de VP2 de aislado de Taichung del parvovirus canino, cds completa. GenBank: AY869724.1.
- gen de VP2 del parvovirus canino, cds completa, cepa: HCM-8. GenBank: AB120721.1.
- proteínas VP1 y VP2 del parvovirus canino tipo 1: GenBank AB518883.1
- VP1 y VP2 del parvovirus canino tipo 2a. GenBank: M24003.1
- VP2 del parvovirus canino tipo 2b: GenBank FJ005265.1
- VP2 del parvovirus canino tipo 2C: GenBank FJ005248.1

• Proteína VP1 y VP2 del parvovirus porcino, cuya secuencia se indica o puede derivarse, por ejemplo, de las siguientes secuencias:

- Parvovirus porcino cepa 693a. GenBank: JN400519.1
- Parvovirus porcino cepa 8a. GenBank: JN400517.1

• Proteína VP1 y VP2 del parvovirus humano, cuya secuencia se indica o puede derivarse, por ejemplo, de las siguientes secuencias:

- VP1 de parvovirus humano B19, cds completa. GenBank: AF264149.1
- aislado Vn115 NS1 (NS1) del parvovirus humano B19, proteína de 7,5 kDa (NS1), VP1 (VP1), proteína de 9,5 kDa (VP1) y genes VP2 (VP2), cds completa. GenBank: DQ357065.1

- genes VP1 (VP1) y VP2 (VP2) de aislado FoBe del virus B19, cds completa. GenBank: AY768535.1
- genes NS1 (NS1), VP1 (VP1) y VP2 (VP2) de aislado Br543 del virus B19, cds completa. GenBank: AY647977.1
- genes NS1, VP1 y VP2 de aislado VES065CSF del parvovirus humano 4, cds completa. GenBank: HQ593532.1
- gen NS1 de aislado VES085CSF del parvovirus humano 4, cds parcial; y genes VP1 y VP2, cds completa. GenBank: HQ593531.1
- genes NS1, VP1 y VP2 del parvovirus humano B19 cepa BB-2, cds completa. GenBank: KF724387.1
- Proteína de la cápside (genogrupo I o II) del norovirus humano, cuya secuencia se indica o puede derivarse, por ejemplo, de las siguientes secuencias:
 - virus de Norwalk: GenBank M87661, NP056821
 - virus de Southampton: GenBank L07418
 - virus de México: GenBank U22498
 - virus de Seto: GenBank AB031013
 - virus de Chiba: GenBank AB042808
 - virus de Lordsdale: GenBank X86557
 - virus de la Montaña Nevada: GenBank U70059
 - virus de Hawái: GenBank U07611
- Proteína VP60 del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo, cuya secuencia se indica o puede derivarse, por ejemplo, de las siguientes secuencias:
 - genoma completo de RHDV AST/89: GenBank: Z49271.2
 - genoma completo de RHDV N11: GenBank: KM878681.1
 - genoma completo de RHDV CBVal16; GenBank: KM979445.1
 - SEQ ID NO: 32
 - SEQ ID NO: 33
- Proteína L1 del virus del papiloma humano, cuya secuencia se indica o puede derivarse, por ejemplo, de las siguientes secuencias:
 - HPV 6: GenBank: JN252323.1
 - HPV 11: GenBank : JQ773411.1
 - HPV 16: GenBank DQ155283.1
 - HPV 18: GenBank FJ528600.1
- Proteína E2 del virus de la hepatitis E, cuya secuencia se indica o puede derivarse, por ejemplo, de las siguientes secuencias:
 - virus de la hepatitis E, secuencia de referencia de NCBI del genoma completo: NC_001434.1
 - gen de proteína de la cápside del aislado ITFAE11 de virus de la hepatitis porcina E. GenBank: JN861806.1
- Proteínas VP1, VP2 y VP3 del virus de la enfermedad bursal infecciosa, cuya secuencia se indica o puede derivarse, por ejemplo, de las siguientes secuencias:
 - gen de VP1 (VP1) del virus de la enfermedad bursal infecciosa, cds completa. GenBank: AY099457.1

- gen de VP1 de aislado PT del virus de la enfermedad bursal infecciosa, cds completa. GenBank: DQ679814.1
- 5 - gen de VP1 de aislado OE/G2 del virus de la enfermedad bursal infecciosa, cds completa. GenBank: DQ679813.1
- gen de VP1 de aislado OA/G1 del virus de la enfermedad bursal infecciosa, cds completa. GenBank: DQ679812.1
- 10 - gen de VP1 de aislado HOL del virus de la enfermedad bursal infecciosa, cds completa. GenBank: DQ679811.1
- gen de VP1 del virus de la enfermedad bursal infecciosa cepa TL2004, cds completa. GenBank: DQ118374.1
- 15 - gen de VP1 de aislado CA-K785 del virus de la enfermedad bursal infecciosa, cds completa. GenBank: JF907705.1
- gen de VP1 de aislado D495 del virus de la enfermedad bursal infecciosa, cds completa. GenBank: JF907704.1
- 20 - ARNm de VP1 del virus de la enfermedad bursal infecciosa cepa A-BH83, cds completa. GenBank: EU544149.1
- gen de VP1 del virus de la enfermedad bursal infecciosa cepa Cro-Pa/98, cds completa. GenBank: EU184690.1
- ARNm de VP2 del virus de la enfermedad bursal infecciosa, cds completa. GenBank: AY321509.1
- 25 - genes VP2, VP3, VP4 del virus de la enfermedad bursal infecciosa, cds completa. GenBank: M97346.1
- gen de VP2 del virus de la enfermedad bursal infecciosa, cds completa. GenBank: AF508177.1
- 30 • Proteína de la cápside del calicivirus, cuya secuencia se indica o puede derivarse, por ejemplo, de las siguientes secuencias:
- gen de proteína de la cápside del calicivirus felino, cds completa. GenBank: L09719.1
- 35 - gen de proteína de la cápside del calicivirus felino, cds completa. GenBank: L09718.1
- ARN del calicivirus humano HU/NLV/Wortley/90/UK para la proteína de la cápside (ORF2), cepa HU/NLV/Wortley/90/UK. GenBank: AJ277618.1
- 40 - ARN del calicivirus humano HU/NLV/Thistlehall/90/UK para la proteína de la cápside (ORF2), cepa HU/NLV/Thistlehall/90/UK. GenBank: AJ277621.1
- ARN del calicivirus humano HU/NLV/Valetta/95/Malta para la proteína de la cápside (ORF2), cepa HU/NLV/Valetta/95/Malta. GenBank: AJ277616.1
- 45 - gen de proteína de la cápside del calicivirus humano NLV/Stav/95/Nor, cds completa. GenBank: AF145709.1
- gen de proteína de la cápside del calicivirus entérico bovino cepa Bo/CV500-OH/2002/US, cds completa. GenBank: AY549155.1
- 50 - gen de proteína de la cápside del calicivirus humano NLV/Mora/97/SE, cds completa. GenBank: AY081134.1
- gen de proteína de la cápside del calicivirus humano NLV/Potsdam 196/2000/DE, cds completa. GenBank: AF439267.1
- 55 - gen de proteína de la cápside del calicivirus humano NLV/1581-01/SWE, cds completa. GenBank: AY247442.1
- gen de proteína de la cápside del calicivirus humano Hu/NLV/GII/MD134-10/1987/US, cds completa. GenBank: AY030313.1
- 60 • Proteínas codificadas por ORF2 de astrovirus, cuya secuencia se indica o puede derivarse, por ejemplo, de las siguientes secuencias:
- gen de ORF1b de astrovirus porcino 4, cds parcial; y gen de ORF2, cds completa. GenBank: JX684071.1
- 65 - astrovirus MLB1 HK05, genoma completo. Secuencia de referencia de NCBI: NC_014320.1

- astrovirus boar/WBAstV-1/2011/HUN, genoma completo. Secuencia de referencia de NCBI: NC_016896.1
- astrovirus humano BF34, genoma completo. Secuencia de referencia de NCBI: NC_024472.1
- 5 - gen de ARN polimerasa dependiente de ARN (ORF1b) de astrovirus MLB1 cepa Hu/ITA/2007/PR326/MLB1, cds parcial; y gen de proteína de la cápside (ORF2), cds completa. GenBank: KF417713.1
- 10 - genes de proteína no estructural (ORF1a) y proteína no estructural (ORF1b) de astrovirus humano 5 cepa Hu/Budapest/HUN5186/2012/HUN, cds parcial; y gen de proteína de la cápside (ORF2), cds completa. GenBank: KF157967.1.
- gen de proteína de la cápside de aislado de Shanghai de astrovirus humano 1 (ORF2), cds completa. GenBank: FJ792842.1
- 15 - gen de ORF2 de astrovirus humano tipo 8 para proteína de la cápside. GenBank: Z66541.1
- Proteínas HA, NA y M1 del virus de la gripe, cuya secuencia se indica o puede derivarse, por ejemplo, de las siguientes secuencias:
- 20 - SEQ ID NO: 30
- Gen HA del virus de la gripe A (A/duck/Chiba/25-51-14/2013(H7N1)) para hemaglutinina, cds completa. GenBank: AB813060.1
- 25 - ARNm de hemaglutinina (HA) de constructo sintético, cds completa. GenBank: DQ868374.1
- gen de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A (A/swine/Shandong/2/03(H5N1)), cds completa. GenBank: AY646424.1
- 30 - ADNc que codifica para HA de la gripe tipo A. GenBank: E01133.1
- gen de NA del virus de la gripe A (A/swine/Korea/S452/2004(H9N2)), cds completa. GenBank: AY790307.1
- 35 - gen de neuraminidasa (NA) del virus de la gripe A (A/Thailand/2(SP-33)/2004(H5N1)), cds completa. GenBank: AY555152.3
- Gen de NA del virus de la gripe A (A/swine/Binh Doung/02-16/2010(H1N2)) para neuraminidasa, cds completa. GenBank: AB628082.1
- 40 - gen de neuraminidasa (NA) del virus de la gripe A (A/chicken/Jalgaon/8824/2006(H5N1)), cds completa. GenBank: DQ887063.1
- genes M2 y M1 del virus de la gripe A SC35M, cds completa. GenBank: DQ266100.1
- 45 - ARN de M1 y M2 del virus de la gripe tipo /Leningrad/134/47/57 (H2N2), cds completa. GenBank: M81582.1
- genes M2 y M1 del virus de la gripe A SC35M, cds completa. GenBank: DQ266100.1
- 50 - genes M2, M1 del virus de la gripe A (A/Tochigi/2/2010(H1N1)) para la proteína de la matriz 2, proteína de la matriz 1, cds completa. GenBank: AB704481.1
- Antígenos de superficie y núcleo de la hepatitis B, cuya secuencia se indica o puede derivarse, por ejemplo, de las siguientes secuencias:
- 55 - genes de proteína de prenúcleo y proteína de núcleo del virus de la hepatitis B cepa HBV248, cds completa. GenBank: KP857118.1
- genes de proteína de prenúcleo y proteína de núcleo del virus de la hepatitis B cepa HBV401, cds completa. GenBank: KP857113.1
- 60 - genes de proteína de prenúcleo y proteína de núcleo del virus de la hepatitis B cepa HBV403, cds completa. GenBank: KP857068.1
- gen S del virus de la hepatitis B para el antígeno de superficie de la hepatitis B, cds parcial, aislado: B0503327(PTK). GenBank: AB466596.1
- 65

Preferiblemente, la proteína recombinante no es una proteína producida de manera endógena por las pupas. Por ejemplo, la proteína recombinante no es una proteína producida de manera endógena por las pupas tales como pupas de la especie *Hyalophora cecropia*. Por ejemplo, la proteína recombinante no es cecropina A o atacina.

La pupa de la presente invención puede ser una pupa libre de seda, o puede estar dentro de un capullo de seda. Si la pupa no es una pupa libre de seda, el experto es consciente de métodos de retirada de la seda del capullo. Por ejemplo, la seda del capullo puede disolverse, preferiblemente con una disolución de una sal, preferiblemente una sal de ácido hipocloroso (HClO), preferiblemente hipoclorito de sodio (NaClO) (también denominada en la presente descripción "disolución que disuelve"). Este procedimiento puede automatizarse mediante un dispositivo específicamente diseñado, tal como se muestra en la figura 3.

Uso de la pupa de la presente invención para la expresión de proteínas recombinantes

La pupa de la presente invención, en cualquiera de sus variantes, puede usarse para la expresión de proteínas recombinantes. Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso de la pupa de la presente invención para la expresión de proteínas recombinantes, preferiblemente las proteínas recombinantes detalladas anteriormente en esta memoria descriptiva.

Métodos para producir proteínas recombinantes de la presente invención

La presente invención también proporciona métodos para producir proteínas recombinantes (que, tal como ya se describió anteriormente, preferiblemente no son proteínas que se producen de manera endógena por las pupas). Por ejemplo, un método para proporcionar al menos una proteína recombinante según la presente invención comprende, o, alternativamente, consiste en, las siguientes etapas:

- (a) proporcionar una pupa;
- (b) inocular la pupa de la etapa (a) con un baculovirus recombinante derivado del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV);
- (c) incubar la pupa inoculada de la etapa (b) durante un periodo de tiempo suficiente para que se exprese la al menos una proteína recombinante;
- (d) obtener las pupas que comprenden la al menos una proteína recombinante;
- (e) opcionalmente, recoger la al menos una proteína recombinante; y
- (f) opcionalmente, purificar la al menos una proteína recombinante.

La pupa de etapa (a) del método anterior en cuanto a la invención se refiere es la pupa según la presente invención, tal como se describió en detalle anteriormente. La pupa de la etapa (a) más generalmente pertenece preferiblemente al orden *Lepidoptera*. Preferiblemente, la pupa pertenece al orden *Lepidoptera*, preferiblemente a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliiothis*, *Manduca*, *Helicoverpa*, *Ascalapha* o *Samia*, preferiblemente a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliiothis* o *Helicoverpa*, más preferiblemente a las especies *Trichoplusia ni*, *Rachiplusia nu*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliiothis virescens*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Manduca sexta*, *Ascalapha odorata* o *Samia cynthia*, incluso más preferiblemente a la especie *Trichoplusia ni*. Tal como ya se describió anteriormente, la pupa puede comprender una secuencia de ácido nucleico que permite la expresión de una proteína recombinante. Tal como ya se describió anteriormente, la pupa puede comprender una secuencia de ácido nucleico que permite la expresión por encima de los niveles endógenos de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas que actúan como reguladores de la transcripción por encima de los niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus.

La pupa de etapa (a) anterior puede evolucionar de un huevo. Por ejemplo, la pupa de la etapa a) anterior puede evolucionar de huevo a pupa durante 15-18 días, por ejemplo, en cajas de cría reutilizables o de un solo uso especialmente diseñadas. La pupa de la etapa a) también puede proporcionarse ya en forma de una pupa.

Si la pupa de la etapa (a) anterior está dentro de un capullo, el método para producir proteínas recombinantes de la presente invención puede comprender además una etapa de retirar la seda del capullo de la pupa. Por ejemplo, la seda del capullo puede disolverse, preferiblemente con una disolución de una sal que comprende preferiblemente ácido hipocloroso (HClO), preferiblemente hipoclorito de sodio (NaClO), por ejemplo a concentraciones del 0,1% al 5% p/v, tal como el 0,1%, el 0,2%, el 0,5%, el 1%, el 3% o el 5% p/v. Por ejemplo, las pupas pueden sumergirse o pulverizarse con una disolución de hipoclorito de sodio a una concentración de desde el 0,1% hasta el 5% p/v. La disolución de la seda del capullo puede tardar desde varios segundos hasta varios minutos. La eliminación de la seda del capullo de la pupa de la etapa (a), cuando la pupa está dentro de un capullo, se realiza preferiblemente de forma semiautomatizada o automatizada (eliminación de seda robotizada). En este sentido, el hecho de que el capullo de algunas especies tales como *Hyalophora cecropia* o *Bombyx mori* sea un capullo grueso es una

desventaja respecto a otros géneros o especies (tal como el género *Trichoplusia*, en particular la especie *Trichoplusia ni*). Las pupas del género *Trichoplusia*, en particular la especie *Trichoplusia ni*, tienen un capullo que es menos denso en seda, y puede disolverse fácilmente. Esto representa una ventaja, dado que todo el proceso puede realizarse de forma automatizada o semiautomatizada, aumentando la eficiencia y reduciendo los costes globales.

El capullo puede retirarse en una máquina semiautomatizada que puede comprender un recipiente con la disolución que disuelve que va a aplicarse al capullo, preferiblemente con turbulencias de aire presurizado, para reducir el tiempo necesario para disolver el capullo de seda. Las pupas libres de seda pueden lavarse después en un recipiente de lavado para retirar trazas de la disolución que disuelve, y luego secarse con aire.

Por consiguiente, se prefieren pupas libres de seda, puesto que entonces, la etapa (b) es más fácil de realizar. Por consiguiente, las pupas con un capullo muy denso se prefieren menos. Por ejemplo, las pupas de *Bombyx mori* tienen un capullo muy denso, grueso y compacto, que no puede retirarse fácilmente mediante disolución con una disolución salina durante unos pocos minutos, tal como se describió anteriormente. Lo mismo es cierto para las pupas de *Hyalophora cecropia*. El capullo de *Bombyx mori* y/o las pupas de *Hyalophora cecropia* deben retirarse manualmente.

Por el contrario, las pupas de otras especies tales como *T. ni* comprenden un capullo que es menos denso en seda, y puede disolverse fácilmente tal como se describió anteriormente. Por tanto, estas pupas se prefieren para el método de producción de proteínas recombinantes de la presente invención, puesto que su capullo puede retirarse mediante procedimientos automáticos o semiautomáticos, facilitando el escalado para obtener pupas listas para inyectarse con un baculovirus recombinante (etapa (b)).

Después de retirar la seda del capullo, las pupas se lavan preferiblemente con agua, con el fin de retirar trazas de la disolución salina (por ejemplo, hipoclorito de sodio). Las pupas libres de seda pueden secarse posteriormente y almacenarse a una baja temperatura (por ejemplo, 4°C) antes de que la etapa (b) se lleve a cabo. Por ejemplo, las pupas libres de seda pueden almacenarse hasta 1 mes a baja temperatura (por ejemplo, 4°C) antes de que la etapa (b) se lleve a cabo.

La presente divulgación proporciona un método para producir una pupa libre de seda (preferiblemente una pupa libre de seda que pertenece al género *Lepidoptera*, preferiblemente la pupa de la presente invención), que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una pupa (preferiblemente la pupa de la presente invención tal como se describió anteriormente) contenida en un capullo;

(b) tratar la pupa contenida en un capullo con una disolución de una sal, preferiblemente una disolución de una sal de ácido hipocloroso, preferiblemente hipoclorito de sodio, tal como se describió en detalle anteriormente; y

(c) obtener una pupa libre de seda (y preferiblemente desinfectada esencialmente).

Por tanto, la presente invención también proporciona la pupa de la presente invención que está esencialmente libre de seda (concretamente, sin un capullo). La pupa esencialmente libre de seda de la divulgación preferiblemente no pertenece a la especie *Bombyx mori*. En un aspecto preferido, la pupa esencialmente libre de seda de la presente divulgación no pertenece a la especie *Hyalophora cecropia*. En un aspecto preferido, la pupa esencialmente libre de seda de la presente divulgación pertenece a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliothis*, *Manduca*, *Helicoverpa*, *Ascalapha* o *Samia*, preferiblemente a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliothis* o *Helicoverpa*. En un aspecto preferido, la pupa esencialmente libre de seda de la presente divulgación pertenece a las especies *Trichoplusia ni*, *Rachiplusia nu*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Manduca sexta*, *Ascalapha odorata* o *Samia cynthia*, incluso más preferiblemente a la especie *Trichoplusia ni*.

La etapa (b) del método de la presente invención se refiere a la inoculación de la pupa de la etapa (a) con un baculovirus recombinante derivado del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV). Se han descrito en detalle anteriormente baculovirus recombinantes que pueden estar comprendidos en la pupa de la presente invención, y también se muestra un esquema a modo de ejemplo en la figura 4B. Por consiguiente, preferiblemente, en la etapa (b), la pupa de la presente invención se inocula con un baculovirus recombinante, con el fin de proporcionar una pupa según la presente invención, que comprende un baculovirus recombinante, tal como se describió anteriormente. La solicitud de patente publicada como WO2012/168492 divulga un baculovirus recombinante que puede inocularse a la pupa según la presente invención en la etapa (b) del método para producir proteínas recombinantes de la presente invención. El baculovirus recombinante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína recombinante, preferiblemente una proteína recombinante seleccionada del grupo tal como se definió anteriormente en esta memoria descriptiva (casete de expresión).

Se prefieren pupas libres de seda, puesto que entonces la inoculación con el baculovirus recombinante es más fácil, y puede realizarse de manera automática o semiautomática, facilitando el escalado y la reproducibilidad del método.

La inoculación del baculovirus recombinante según la etapa (b) puede realizarse mediante técnicas conocidas en la técnica para el experto. Tal como se define en el presente documento, "inoculación" se refiere a la introducción de una sustancia en el cuerpo, en este caso, la introducción de baculovirus recombinante en pupas. La inoculación también puede denominarse "inyección". Puesto que las larvas se inoculan con un baculovirus, este proceso también puede denominarse en la presente descripción "infección de las larvas con un baculovirus".

Preferiblemente, la inoculación se realiza inyectando en la pupa una cantidad específica de una disolución que comprende al menos un baculovirus. La inyección se realiza preferiblemente con una aguja, que perfora la pupa y dispensa una cantidad específica de una disolución que comprende el baculovirus dentro del cuerpo de la pupa. Esta etapa también puede automatizarse; las pupas pueden disponerse, por ejemplo, en una matriz o serie de alveolo, y un robot o dispositivo de inoculación (descrito a continuación) puede dispensar automáticamente el baculovirus dentro de las pupas. Por ejemplo, la pupa puede disponerse en una matriz de alveolo (o serie), incluyendo la matriz una parte superior con un orificio en el centro, de modo que el robot o dispositivo de inoculación (que comprende una aguja, por ejemplo, en un brazo robótico) posiciona automáticamente la aguja en el alveolo, y la aguja accede a la pupa a través del orificio de la parte superior. La aguja penetra en el cuerpo de la pupa, por ejemplo, aproximadamente 1-5 milímetros, preferiblemente alrededor de 3 mm (esto también puede automatizarse) y dispensa la disolución que comprende el baculovirus dentro de la pupa. El dispositivo o robot puede comprender una bomba de precisión que puede dispensar una cantidad exacta de baculovirus (por ejemplo, cantidades de aproximadamente 0,5-10 microlitros de una disolución que comprende el baculovirus, preferiblemente de aproximadamente 5 μ l) en las pupas. El robot puede comprender un brazo que comprende una o más agujas que pueden inyectar el baculovirus en las pupas en posiciones precisas. Una vez se ha realizado esto, el robot deja el alveolo, y, gracias a la parte superior de la matriz donde se disponen las pupas, la pupa se deja fácilmente sobre el alveolo de la matriz, y no se retira del mismo cuando el brazo del robot retira la aguja de la pupa, puesto que el orificio en la parte superior de la matriz es más pequeño que la pupa, de modo que sólo la aguja puede atravesarlo, por lo que la aguja se retira de la pupa y de la matriz de alveolo dejando la pupa en el mismo. Con esta disposición preferible, el proceso de inoculación es automático, rápido, eficaz y altamente reproducible (cada pupa recibe la misma cantidad de disolución que comprende el baculovirus, con el mismo procedimiento). El robot puede tener varias agujas de inoculación (concretamente, agujas que pueden inocular o inyectar el baculovirus en las pupas en posiciones precisas) que pueden desmontarse, y pueden inocular baculovirus en las pupas a una velocidad de entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 10.000 pupas por hora.

Por ejemplo, se inocular una cantidad de más de aproximadamente 50 unidades formadoras de placas (UFP) de baculovirus en cada pupa. Por ejemplo, se inoculan aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 500, aproximadamente 1.000, aproximadamente 5.000, aproximadamente 10.000, aproximadamente 15.000, aproximadamente 20.000, aproximadamente 25.000, aproximadamente 30.000, aproximadamente 40.000, aproximadamente 50.000, aproximadamente 60.000, aproximadamente 75.000 o más UFP (incluso aproximadamente 1.000.000) en cada pupa. Por ejemplo, tal como ya se mencionó anteriormente, el baculovirus está comprendido en una disolución, de modo que una determinada cantidad de una disolución que comprende baculovirus se inyecta en las pupas. Por ejemplo, la disolución puede ser medio de cultivo celular que comprende baculovirus. Por ejemplo, la disolución puede ser una disolución tamponada que comprende baculovirus, tal como una disolución de PBS 1x pH 7,4, PMSF 1 mM (inhibidor de proteasas) y DTT 5 mM que comprende baculovirus. Por ejemplo, las pupas pueden inocularse con una cantidad de aproximadamente 0,5 - 10 μ l de una disolución que comprende un baculovirus, tal como aproximadamente 0,5 μ l, tal como aproximadamente 1-10 μ l, tal como aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 5, aproximadamente 7 o aproximadamente 10 μ l. Por ejemplo, cada pupa recibe 0,5 - 10 μ l de una disolución que comprende entre 50 y 1.000.000 UFP.

Gracias a la automatización de la inoculación, el robot puede inocular aproximadamente 3.000 pupas por hora o más, tal como entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 10.000 pupas por hora. El robot es adecuado para suministrar un fluido en pupas proporcionadas en una matriz o serie.

La etapa (c) del método de la presente invención comprende incubar la pupa inoculada de la etapa (b) durante un periodo de tiempo suficiente para que se exprese la al menos una proteína recombinante. Esta etapa de inoculación puede realizarse preferiblemente durante un periodo de tiempo de al menos aproximadamente 72 h, tal como aproximadamente 72 h, aproximadamente 96 h, aproximadamente 100 h, aproximadamente 125 h, aproximadamente 150 h, aproximadamente 168 h o más (tras la inoculación). Preferiblemente, el tiempo de incubación es de aproximadamente 96-168 h tras la inoculación o aproximadamente 72-168 h tras la inoculación. La etapa de inoculación puede realizarse preferiblemente a una temperatura de aproximadamente a 22-28°C, preferiblemente en una incubadora sin ninguna necesidad de control de humedad o luz.

Las pupas inoculadas (que se disponen preferiblemente en el alveolo de la matriz) pueden dejarse en el alveolo de la matriz durante el periodo de tiempo anterior (incubación). En otra realización, las pupas se retiran de la matriz y se colocan en cualquier otro sitio durante el tiempo de incubación, tal como bolsas o cualquier recipiente que permita la

transpiración (la incubación debe realizarse preferiblemente en un recipiente en el que haya un intercambio de gases no en un recipiente completamente cerrado).

5 El experto calcularía el tiempo de incubación y las condiciones de incubación requeridos para cada pupa y cada proteína recombinante basándose en experimentos previos, según la proteína que va a expresarse.

10 La etapa (d) del método de la presente invención comprende obtener las pupas que comprenden la al menos una proteína recombinante que se ha expresado durante la etapa de incubación (c). Las pupas que comprenden la al menos una proteína recombinante pueden recogerse de la matriz/serie (o lugar de incubación). Estas pupas que comprenden la al menos una proteína recombinante pueden almacenarse (congeladas o liofilizadas) para el procesamiento posterior. Por ejemplo, las pupas que comprenden la al menos una proteína recombinante pueden envasarse en un envase (preferiblemente a vacío). El envase que comprende las pupas puede almacenarse, transportarse y/o procesarse adicionalmente.

15 La presente invención también proporciona un envase que comprende las pupas de la presente invención, en el que preferiblemente, las pupas comprenden al menos una proteína recombinante. Preferiblemente, las pupas se envasan a vacío, y el envase de la presente invención comprende, por tanto, pupas a vacío, que están, por ejemplo, congeladas o liofilizadas, para evitar la oxidación. Esto permite una manipulación más fácil y periodos de almacenamiento más largos.

20 Las pupas obtenidas según la etapa (d) del método anterior también pueden congelarse y almacenarse para el procesamiento posterior. Por ejemplo, las pupas pueden congelarse inmediatamente después de recogerlas a aproximadamente -20°C, o a aproximadamente -80°C, hasta que se procesan adicionalmente. Por ejemplo, las pupas que comprenden la al menos una proteína recombinante pueden congelarse a una temperatura de, por ejemplo, entre aproximadamente -20°C y -70°C, hasta que se extraiga la proteína recombinante. Las pupas que comprenden la proteína recombinante pueden almacenarse congeladas durante largos periodos de tiempo, tales como, por ejemplo, durante más de 1 año.

30 La etapa (e) (opcional) del método de la presente invención comprende, opcionalmente, recoger la al menos una proteína recombinante. El experto es consciente de métodos y protocolos para recoger la al menos una proteína recombinante comprendida en las pupas obtenidas en la etapa (d). Por supuesto, estos métodos y/o protocolos pueden depender de la naturaleza de la proteína recombinante que se ha expresado.

35 Por ejemplo, la proteína puede extraerse homogeneizando las pupas (por ejemplo, en una máquina homogeneizadora o mezcladora homogeneizadora, tal como una homogeneizadora combinadora o una homogeneizadora de rotor-estator, durante al menos varios segundos/minutos), preferiblemente en presencia de un tampón de pH neutro, tampón que comprende preferiblemente antioxidantes (agentes reductores), inhibidores de la proteasa y detergentes apropiados. Por ejemplo, el tampón comprende aproximadamente 1-25 mM de un agente reductor y aproximadamente el 0,01%-2% (volumen/volumen) de un producto detergente. Preferiblemente, el
40 tampón comprende además una mezcla de inhibidores de la proteasa.

Después de la homogeneización, los extractos pueden sonicarse y/o centrifugarse (por ejemplo, 15.000-20.000 G) para eliminar los residuos de insectos, y filtrarse.

45 Por ejemplo, los medios de extracción (métodos y protocolos para recoger la al menos una proteína recombinante comprendida en las pupas) comprenden romper físicamente las pupas, centrifugaciones, etapas de filtración de flujo tangencial, sonicación, métodos cromatográficos y/o filtraciones por esterilización.

50 En una realización preferida, la viscosidad del homogenado puede reducirse a través de su incubación (filtración) con una tierra de diatomeas (por ejemplo, Celite). Puede incluirse una etapa de precipitación de proteínas.

55 El extracto puede clarificarse a través de filtración de flujo tangencial, usando un filtro que está disponible para su selección por el experto según la naturaleza de la proteína recombinante. El tampón puede cambiarse mediante un proceso de diafiltración (por ejemplo, en el mismo dispositivo de filtración tangencial).

La etapa (f) (opcional) del método de la presente invención comprende, opcionalmente, purificar la al menos una proteína recombinante. El experto es consciente de técnicas de purificación de proteínas. Por ejemplo, la purificación puede lograrse mediante purificación por cromatografía, filtración o ultracentrifugación.

60 Por tanto, puede obtenerse la proteína recombinante purificada. Un esquema de una realización de este método se muestra en la figura 17.

La proteína recombinante que puede obtenerse mediante el método de la presente invención tiene un alto grado de pureza, y puede usarse en vacunas, diagnóstico, cosméticos o en terapia.

65 Método para producir un baculovirus recombinante

La presente divulgación proporciona además un método para producir un baculovirus recombinante que comprende las etapas de:

- 5 (a) proporcionar una pupa,
- (b) transfectar la pupa de la etapa (a) con un vector de bácmido adecuado para producir un baculovirus recombinante derivado del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV);
- 10 (c) incubar la pupa inoculada de la etapa (b) durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca el baculovirus recombinante;
- (d) obtener las pupas que comprenden el baculovirus recombinante;
- 15 (e) opcionalmente, recoger el baculovirus recombinante; y
- (f) opcionalmente, purificar el baculovirus recombinante.

20 Preferiblemente, la pupa proporcionada en la etapa (a) es una pupa libre de seda tal como se definió anteriormente. La pupa pertenece preferiblemente a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliothis*, *Manduca*, *Helicoverpa*, *Ascalapha* o *Samia*, preferiblemente a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliothis* o *Helicoverpa*, más preferiblemente a las especies *Trichoplusia ni*, *Rachiplusia nu*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Manduca sexta*, *Ascalapha odorata* o *Samia cynthia*, incluso más

25 preferiblemente a la especie *Trichoplusia ni*.
En la etapa (b), la pupa de la etapa (a) se transfecta con un vector de bácmido adecuado para producir un baculovirus recombinante derivado del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV).

30 Esta etapa (b) también puede denominarse “etapa de inoculación”, puesto que puede realizarse de manera similar que la etapa (b) del método para producir una proteína recombinante descrita anteriormente (pero en lugar de inocular un baculovirus, se inocula un vector de bácmido), concretamente de manera automática o semiautomática, usando el dispositivo de la presente invención (también descrito a continuación). El dispositivo puede inocular en la

35 pupa (que se coloca preferiblemente en el alveolo de una matriz, que comprende una tapa con orificios) una cantidad específica de una disolución que comprende el vector de transferencia y/o bácmido que va a inocularse a la pupa, por medio de inyección con una aguja, tal como se describió anteriormente.
El vector de bácmido puede generarse mediante procedimientos conocidos para el experto, por ejemplo, generando

40 de manera secuencial un vector de clonación, un vector donador, un vector de transferencia y, finalmente, un vector de bácmido. Por ejemplo, la generación de un vector de bácmido se describe en la solicitud de patente publicada como WO 2014/086981.
En una realización preferida, este vector de transferencia y/o bácmido comprende o alternativamente, consiste en,

- 45 una secuencia de ácido nucleico que permite la expresión por encima de los niveles endógenos de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas que actúan como reguladores de la transcripción por encima de los niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus y una región homóloga recombinante (*hr*) ligada operativamente a cualquier promotor que es adecuado para dirigir la expresión de una proteína recombinante. Estas secuencias de ácido nucleico ya se han descrito anteriormente. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que
- 50 permite la expresión de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en:
 - (a) un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 1-5;
 - 55 (b) una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más preferiblemente al menos el 95% con la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 1-5 y que codifica para una proteína que puede actuar como regulador de la transcripción en un baculovirus recombinante;
 - 60 (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica para un aminoácido que contiene la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 6-9; y
 - 65 (d) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos que tiene una similitud de secuencia de al menos el 70%, preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más

preferiblemente al menos el 95% con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 6-9 que puede actuar como regulador de la transcripción en un baculovirus recombinante.

Además, el promotor que dirige la expresión de dicha proteína recombinante se selecciona preferiblemente del grupo de ácidos nucleicos que comprende:

(a) un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 10-14, preferiblemente indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 11-13; y

(b) una secuencia de ácido nucleico que puede actuar como promotor en un baculovirus recombinante y que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más preferiblemente al menos el 95% con la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 10-14, preferiblemente indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 11-13.

La región homóloga recombinante (*hr*) es preferiblemente la secuencia indicada en SEQ ID NO: 21 (*hr1*). La secuencia de ácido nucleico que comprende combinaciones de promotor recombinante, secuencias que codifican para reguladores de la transcripción y regiones potenciadoras se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende SEQ ID NO: 15-20.

Preferiblemente, el vector inoculado a las pupas es un bácmido.

La etapa (c) se refiere a la incubación de la pupa inoculada de la etapa (b) durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca el baculovirus recombinante. Por ejemplo, este periodo de tiempo para la pupa de *T. ni* puede ser desde aproximadamente 72 h hasta aproximadamente 7 días, según la dosis de virus y la temperatura. El experto puede calcular el periodo de tiempo suficiente para que se produzca el baculovirus recombinante.

Después, se obtienen las pupas que comprenden el baculovirus recombinante (etapa (d)). Las pupas que comprenden el baculovirus recombinante pueden almacenarse para procesamiento adicional. Por ejemplo, pueden envasarse a vacío, para reducir el proceso de oxidación y facilitan su manipulación y aumentar el tiempo de almacenamiento seguro. Por ejemplo, las pupas que comprenden el baculovirus recombinante pueden congelarse (por ejemplo, a de -20°C a -80°C) antes de que se procesen adicionalmente. Por ejemplo, las pupas que comprenden el baculovirus recombinante pueden liofilizarse antes de que se procesen adicionalmente.

Opcionalmente, el baculovirus recombinante puede recogerse y purificarse (etapas (e) y (f)).

Dispositivo de la presente divulgación

La presente divulgación también proporciona un dispositivo (también denominado en la presente invención robot) que comprende una bomba de precisión, un brazo mecánico móvil y una aguja (desmontable) adecuada para inyectar un fluido (preferiblemente una disolución que comprende baculovirus o vectores de bácmido) en una pupa (preferiblemente a la pupa de la presente invención, que es preferiblemente una pupa libre de seda y que pertenece preferiblemente al orden *Lepidoptera*, preferiblemente a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliiothis*, *Manduca*, *Helicoverpa*, *Ascalapha* o *Samia*, preferiblemente a los géneros *Trichoplusia*, *Rachiplusia*, *Spodoptera*, *Heliiothis* o *Helicoverpa*, más preferiblemente a las especies *Trichoplusia ni*, *Rachiplusia nu*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliiothis virescens*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Manduca sexta*, *Ascalapha odorata* o *Samia cynthia*.

Tal como se describió en detalle anteriormente, la pupa puede proporcionarse preferiblemente en una matriz (o serie), concretamente la pupa se dispone en el alveolo de una matriz, de modo que el dispositivo puede ubicar fácilmente las pupas de manera automática. Preferiblemente, la matriz comprende una tapa, con orificios que son más pequeños que la pupa (concretamente las pupas no pueden atravesar los orificios).

El dispositivo puede comprender además un programa informático para definir la posición de la aguja (y/o la posición del brazo mecánico) y/o para calcular la distancia desde la punta (extremo) de la aguja hasta la pupa y/o la distancia de penetración de la aguja en la pupa y/o el volumen de líquido (preferiblemente una disolución que comprende baculovirus o vectores de bácmido) que va a inocularse en la pupa. Además, el dispositivo de la presente divulgación puede comprender además un programa informático para calcular el tiempo de inoculación y/o el tiempo entre diferentes inoculaciones en las pupas. El dispositivo puede comprender además una cámara para definir la posición de la aguja.

En un aspecto preferido, el fluido inyectado por el dispositivo de la presente divulgación comprende un baculovirus recombinante. En otro aspecto, el fluido inyectado por el dispositivo de la presente invención comprende un vector de bácmido adecuado para producir un baculovirus recombinante derivado de AcMNPV, tal como se describió anteriormente en esta descripción.

El dispositivo de la presente divulgación es adecuado para realizar la etapa (b) del método para producir una proteína recombinante de la presente invención y la etapa (b) del método para proporcionar un baculovirus recombinante de la presente invención.

5 Por ejemplo, el dispositivo de la presente divulgación es adecuado para inyectar (inocular) en la pupa una cantidad de fluido que está en el intervalo de desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 10,0 μ l, tal como aproximadamente 0,5 μ l, tal como aproximadamente 1-10 μ l, tal como aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 5, aproximadamente 7 o aproximadamente 10 μ l.

10 Por ejemplo, la aguja comprendida en el dispositivo de la presente divulgación puede penetrar en la pupa una distancia de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4,5 mm, preferiblemente alrededor de 3 mm.

Por ejemplo, el dispositivo de la presente divulgación comprende varias agujas de inoculación desmontables, y puede inocular fluido (preferiblemente una disolución que comprende baculovirus o vectores de bácmido) a velocidades de entre aproximadamente 3.000 y 10.000 pupas por hora.

15 Por ejemplo, el fluido inyectado por el dispositivo de la presente divulgación comprende baculovirus, preferiblemente en una cantidad de desde 50 hasta 10^6 UFP/dosis inyectada en cada pupa. Por ejemplo, el dispositivo de la presente divulgación inyecta (inocula) a cada pupa una cantidad de más de aproximadamente 50, o más de aproximadamente 100, o más de aproximadamente 500 unidades formadoras de placas (UFP) de baculovirus. Por ejemplo, se inoculan aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 300, aproximadamente 500, aproximadamente 1.000, aproximadamente 5.000, aproximadamente 10.000, aproximadamente 15.000, aproximadamente 20.000, aproximadamente 25.000, aproximadamente 30.000, aproximadamente 40.000, aproximadamente 50.000, aproximadamente 100.000, aproximadamente 500.000 o más UFP en cada pupa, tal como aproximadamente 1.000.000 UFP.

El dispositivo de la presente divulgación comprende preferiblemente bombas de alta precisión que permiten que el dispositivo inocule el volumen deseado de fluido (preferiblemente una disolución que comprende baculovirus o vectores de bácmido) en las pupas con una alta precisión.

30 El dispositivo de la presente divulgación es adecuado para suministrar un fluido en pupas proporcionadas en una matriz o serie.

Preferiblemente, el dispositivo de la presente divulgación comprende además un programa informático para calcular el tiempo de inoculación y/o el tiempo entre inoculaciones en las pupas, que debe ser un tiempo suficiente para dispensar el líquido que contiene el baculovirus a cada pupa.

Preferiblemente, el dispositivo de la presente divulgación comprende además una cámara para definir la posición de la aguja.

40 La presente divulgación proporciona además un dispositivo para la retirada de seda (dispositivo de retirada de seda). Una representación esquemática de un ejemplo de dispositivo de retirada de seda de la presente invención se representa en la figura 3 (dispositivo semiautomático para la retirada de seda de los capullos de *T. ni*).

45 El dispositivo de retirada de seda de la presente divulgación (también denominado "máquina de retirada de seda") comprende al menos un recipiente que contiene una disolución que disuelve seda, tal como se explicó anteriormente. Por ejemplo, el recipiente comprende ácido hipocloroso. El primer recipiente puede comprender también preferiblemente un sistema para proyectar el líquido a través de los módulos de cría que contienen los capullos (ayuda a disolver más eficazmente la seda alrededor de la pupa). La disolución que disuelve se aplica preferiblemente al capullo con turbulencias de aire presurizado, para reducir el tiempo necesario para disolver el capullo de seda.

50 Preferiblemente, el dispositivo de retirada de seda de la presente divulgación comprende además un segundo recipiente, que es un recipiente de lavado y comprende y/o dispersa una disolución adecuada para retirar trazas de seda y disolución que disuelve seda de las pupas, tal como agua. La disolución (preferiblemente agua) se pulveriza preferiblemente sobre las crisálidas (pupas). Preferiblemente, en la parte superior de este recipiente, hay un sistema que dispensa aire para secar las pupas. Por consiguiente, después del lavado de las pupas, se secan preferiblemente con aire. Al final del proceso, las pupas están libres de seda y listas para infectarse o almacenarse (refrigeradas) hasta su uso.

60 Resumen de secuencias

SEQ ID NO:	Nombre:
1	ADNc de <i>Ac-ie-01</i> completo

2	Secuencia codificante de proteínas (CDS) de IE-1
3	CDS de IE-0
4	CDS del dominio N-terminal de IE-1
5	CDS del dominio N-terminal de IE-0
6	Proteína IE-1
7	Proteína IE-0
8	Proteína de dominio N-terminal de IE-1
9	Proteína de dominio N-terminal de IE-0
10	<i>polh</i> (promotor)
11	<i>p10</i> (promotor)
12	<i>pB2₉p10</i> (promotor)
13	<i>p6.9p10</i> (promotor)
14	<i>pB2₉</i> (promotor)
15	<i>polhAc-ie-01/hr1p10</i>
16	<i>polhAc-ie-01/hr1pB2₉p10</i>
17	<i>polhAc-ieee-01/hr1p6.9p10</i>
18	<i>pB2₉Ac-ie-01/hr1p10</i>
19	<i>pB2₉Ac-ie-01/hr1pB2₉p10</i>
20	<i>pB2₉Ac-ie-01/hr1p6.9p10</i>
21	Potenciador de la región homóloga <i>hr1</i>
22	<i>polhAc-ie-01</i>
23	<i>polhGFP</i>
24	<i>hr1pB2₉p10</i>
25	ORF2 de circovirus porcino tipo 2
26	Proteína de la cápside (Cap) del circovirus porcino tipo 2
27	<i>polhAc-ie-01/hrp6.9p10Cap</i> (incluyendo la señal de poliadenilación del gen <i>p10</i> después del gen <i>Cap</i>)
28	<i>polhCap</i>
29	<i>polhAc-ie-01/hr1p6.9p10Cap</i>
30	Proteína de hemaglutinina sin dominio transmembrana de un virus de la gripe H1, cepa PR8 (MelHAHis)
31	<i>polhAc-ie-01/hrp6.9p10HA1</i> (incluyendo la señal de poliadenilación del gen <i>p10</i> después del gen H1) (<i>polhAc-ie-01/hr1p6.9p10MelHA</i>)
32	VP60 de RHDV AST789 (genogrupo G1)
33	VP60 de RHDV N11 (genogrupo RHDVb)
34	<i>polhAc-ie-01/hrp6.9p10VP60G1</i> (incluyendo la señal de poliadenilación del gen <i>p10</i> después del gen H1)
35	<i>polhAc-ie-01/hr1p6.9p10VP60RHDVb</i> (incluyendo la señal de poliadenilación del gen <i>p10</i> después del gen H1)
36	VP60 de RHDV AST789 (genogrupo G1) (secuencia de aminoácidos)
37	VP60 de RHDV N11 (genogrupo RHDVb) (secuencia de aminoácidos)
38	<i>polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP</i>

Ejemplos

Ejemplo 1. Producción de pupas de *T. ni*

Se criaron larvas de insecto en cajas de cría reutilizables o de un solo uso que contenían varios cientos de larvas a las que se les permitió evolucionar durante 15-18 días de huevo a pupa (figura 1). A continuación, se sumergieron o pulverizaron las cajas de cría completas o pupas recogidas con una disolución de hipoclorito de sodio a concentraciones del 0,1% al 5% p/v para disolver las fibras de seda de los capullos. Se disolvió la seda en unos pocos minutos y luego se lavaron las pupas con agua para retirar trazas de hipoclorito. Se secaron posteriormente las pupas y se almacenaron a 4°C hasta la inoculación de baculovirus. Este proceso es más sencillo con respecto a la misma operación con capullos de *Bombyx mori* dada la menor densidad de las hebras de seda de lepidópteros de *T. ni*, tal como puede observarse en la figura 2. Los capullos de *Bombyx mori* requieren intervención manual para liberar las pupas, mientras que la seda de *T. ni* es fácil de disolver y retirar mediante procedimientos automáticos o semiautomáticos, facilitando el escalado de la obtención de pupas listas para inyectarse con un baculovirus recombinante para la producción de proteínas recombinantes.

Ejemplo 2. Baculovirus recombinantes dobles que contienen una secuencia potenciadora (*hr1*) ligada operativamente a un promotor quimérico (*p6.9* y *p10*) y los factores de transactivación IE-1 e IE-0 sobreexpresados son altamente eficaces en la producción de proteínas recombinantes en pupas de insecto

Se comparó la expresión de proteína recombinante dirigida bajo el control de un promotor quimérico potenciada por la secuencia repetida homóloga de baculovirus *hr1* y transactivada por los factores IE-1 e IE-0 sobreexpresados en pupas de insecto (*T. ni*) con la obtenida usando un baculovirus convencional. Se clonó el gen codificante para la proteína fluorescente verde recombinante (GFP) en un baculovirus de AcMNPV convencional bajo el control del promotor de polihedrina mediante medios convencionales (figura 4A). También se generó otro baculovirus de AcMNPV modificado mediante el casete que contiene los elementos reguladores mencionados anteriormente (casete de expresión TB) que contenía el gen codificante de GFP (figura 4B). Se infectaron pupas con 50.000 UFP de cada baculovirus mediante un robot de inoculación (figura 5A), que comprende una bomba de precisión que puede dispensar cantidades de microlitros del inóculo de virus y un brazo robótico que puede inyectar el virus en posiciones precisas. Se distribuyeron las pupas en una matriz de alveolo con una parte superior con un orificio en el centro de cada alveolo (figura 5B). La aguja de inoculación (desmontable) accedió a las pupas a través del orificio y penetró en las pupas varios milímetros para inyectar el baculovirus (figura 5C). Se dispensó el virus recombinante contenido en de 0,5 a 10 microlitros (μl) en las pupas y durante la retracción de la aguja las pupas se retuvieron en el alveolo debido a la parte superior. Este robot de inoculación mostró una velocidad de inoculación de al menos 3.000 pupas por hora, al menos 6 veces más velocidad que la inoculación manual por un experto.

Después de un periodo de incubación tras la inoculación de 96-168 h, se recogieron las pupas y se extrajo la proteína en una máquina homogeneizadora en presencia de un tampón de pH neutro que contenía antioxidantes, inhibidores de la proteasa y detergentes no iónicos (por ejemplo, PBS1X pH 7,4 + ditiotreitól (DTT) 5 mM + fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM + Brij 35 al 0,1% + Sarkosyl al 0,5%). Se centrifugaron los extractos a 15.000-20.000 g y se filtraron. Se analizaron los extractos mediante electroforesis SDS-PAGE y se tiñeron los geles con azul de Coomassie (figura 6A). Los rendimientos de producción (expresados como miligramos por unidad de biomasa) de la proteína GFP producida por cada baculovirus en las pupas infectadas se calcularon mediante densitometría usando una curva de albúmina sérica bovina (BSA). Este análisis dio un aumento de alrededor de 5,6 veces de la productividad de GFP en pupas obtenidas mediante el baculovirus modificado genéticamente con el casete TB con respecto a la obtenida con el baculovirus convencional (concretamente un baculovirus que comprende, por ejemplo, el promotor de polihedrina sin ningún otro elemento regulador en el casete de expresión) (figura 6B).

Ejemplo 3. Expresión de diferentes proteínas mediante baculovirus modificados con TB en pupas de *T. ni*

Para analizar el beneficio de usar el casete de expresión TB (TopBac) (SEQ ID NO: 17) para la expresión de proteínas adicionales, se clonaron dos genes en el casete TB y se obtuvieron los baculovirus recombinantes correspondientes, así como baculovirus convencionales que expresan los genes bajo el control del promotor de polihedrina (*polh*) (figura 7). Los dos genes usados para obtener los baculovirus recombinantes eran aquellos que codifican para las proteínas Cap del circovirus porcino tipo 2 derivadas de la capa PCV2a GER3 (SEQ IS NO: 25 y 27) y la hemaglutinina del virus de la gripe (H1) derivada de la cepa de virus A/PR/8/34 (SEQ ID NO: 30 y 31). Los baculovirus TB(-) (concretamente un baculovirus convencional que incluye el promotor de polihedrina para expresar la proteína en el casete de expresión pero que no se modificó mediante el casete de expresión TopBac (TB)) y TB(+) resultantes se compararon para determinar su productividad en pupas de *T. ni* usando los mismos protocolos de infección y extracción de proteínas que los usados y descritos en el ejemplo 2.

La comparación de los rendimientos de producción (expresados como miligramos por unidad de biomasa) en pupas infectadas mediados por baculovirus convencionales (TB(-)) o modificados con TB (TB(+)) mostraron que para ambas proteínas el casete de expresión TB aumentó el rendimiento de producción. En el caso de la proteína Cap del circovirus porcino, un aumento de 2,79 veces en la producción de proteínas cuando se infectó la pupa con un baculovirus modificado con TB en comparación con una pupa infectada con baculovirus convencional (figura 8). Para la proteína HA del virus de la gripe, este aumento fue de 2,04 veces (figura 9). Estos resultados confirmaron que el casete TB aumenta significativamente la producción de proteínas recombinantes en pupas de *T. ni*.

Ejemplo 4. La producción de proteínas recombinantes en pupas de *T. ni* infectadas por baculovirus es más eficaz que en larvas

Se llevó a cabo la expresión comparativa de cinco proteínas recombinantes en baculovirus TB(+) en pupas y larvas de *T. ni*. Las proteínas expresadas fueron las siguientes: GFP (SEQ ID NO: 23), Cap (SEQ ID NO: 25), HA (SEQ ID NO: 30) y la VP60 (proteína de la cápside) de dos cepas de calicivirus hemorrágico del conejo (genogrupo 1 de RHDV y RHDVb; SEQ ID NO: 32 y 33) (figura 10). Se infectaron pupas y larvas con 50.000 UFP del baculovirus TB(+) correspondiente. Se recogieron los insectos infectados (larva y pupa) a las 96 h tras la infección. Se analizaron los extractos solubles de proteína mediante electroforesis SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie (figuras 11A, 12A, 13A y 14A). Se cuantificaron las proteínas recombinantes mediante densitometría usando una curva de BSA y se expresaron los rendimientos de producción como miligramos por unidad de biomasa (figuras 11B, 12B, 13B y 14B). En todos los casos, las pupas expresaron mayores cantidades de proteína recombinante que las larvas, con razones crecientes de desde 1,06 hasta 3,64.

Ejemplo 5. Producción de partículas similares a virus (VLP) en pupas de *T. ni*

Para demostrar la producción de VLP en pupas infectadas, se procesaron extractos de proteína de pupas infectadas con el baculovirus TB(+) que expresaban la proteína VP60 de las dos cepas de calicivirus del conejo analizadas en el ejemplo 4 para la purificación de VLP. Se extrajeron las VLP de pupas infectadas a las 96 h tras la infección mediante centrifugación en presencia de detergentes (Sarkosyl al 2% (Sigma) y EDTA 5 mM (Sigma) en PBS (fosfato de sodio 0,2 M, NaCl 0,1 M, pH 6,0) e inhibidores de la proteasa (Complete®, Roche) y se incubaron durante la noche a 4°C. A continuación, se trataron con ADNasa I (Roche Diagnostics) durante 1 h a 37°C. Después de una centrifugación adicional (2.000 x g, 5 min), se sometieron los sobrenadantes a ultracentrifugación (131.453 x g; 2,5 h). Se extrajeron los sedimentos dos veces en Vertrel (Sigma) y se sometieron a una segunda ultracentrifugación (131.453 x g; 2,5 h). Finalmente, se resuspendieron los sedimentos en PBS 1X y se almacenaron a 4°C hasta el análisis.

Se analizaron los sedimentos mediante microscopía electrónica de transmisión realizada mediante medios convencionales. En resumen, se aplicaron VLP purificadas (aproximadamente 5 µl) a rejillas recubiertas con carbono sometidas a descarga luminiscente durante 2 min. Se tiñeron negativamente las células con acetato de uranilo acuoso al 2% (p/v). Se registraron micrografías con un microscopio EM 2000 Ex (JEOL, Japón). Tal como se muestra en la figura 14, se observaron VLP de la forma y el tamaño esperados correspondientes a RHDV, lo que demuestra que se lleva a cabo un plegamiento y autoensamblaje corregidos en los tejidos de pupas infectadas por baculovirus (figura 15).

Ejemplo 6. Producción de inóculo de virus en pupas de *T. ni* infectadas

Se cultivaron líneas celulares de *Spodoptera frugiperda* (Sf21 y Sf9) a 27°C en medio TNMFH (PAN Biotech GmbH, Alemania) con suero bovino fetal inactivado con calor al 10% (PAN Biotech GmbH) y gentamicina (50 µg/ml) (PAN Biotech GmbH). Se evaluaron la viabilidad y la densidad celular mediante tinción con azul de tripano. Se calculó la viabilidad celular basándose en el porcentaje de células vivas con respecto al número total de células a diversos tiempos tras la infección.

Las células Sf9, que se cultivaron en suspensión, se infectaron en frascos rotatorios (80 ml de medio de cultivo) a una densidad celular de 2×10^6 células/ml. La viabilidad celular en el momento de la infección era >99% en suspensión. Se infectaron células Sf9 *in vitro* con baculovirus recombinantes a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 a 0,1. Después de 72-96 h tras la infección, se recuperó el inóculo de virus a partir de los sobrenadantes después de la centrifugación. Se calculó el título de virus mediante un ensayo de unidades formadoras de placas (ufp), obteniendo títulos de virus entre 10^7 y 10^8 virus por ml.

Se usaron los virus para infectar pupas de *T. ni* con dosis que oscilaban desde 5×10^2 hasta 10^4 ufp. Después de 3-7 días, se homogeneizaron las pupas para recoger el virus infeccioso en medios de cultivo celular o en un tampón de PBS específico que contenía DTT e inhibidor de la proteasa PMSF. Se centrifugaron homogenizados de pupas para eliminar los residuos de pupas a 5.000 x g durante 30 min. Después, se filtró secuencialmente el sobrenadante que contenía el virus mediante un filtro de 0,45 y 0,22 micrómetros y se conservó la preparación de virus resultante mezclando con glicerol y luego pudo congelarse o liofilizarse. Se titularon las reservas de virus en larvas en el quinto instar de *T. ni* usando el método de Karber en concreto, DIL50 (dosis infecciosa de larvas 50). El significado estadístico de una dosis infecciosa calculada de esta manera es que una población de larvas infectada con una DI50 mostrará un 50% de individuos infectados. Se observaron las larvas durante al menos 96 h con el fin de detectar signos clínicos y para seguir su evolución hasta pupa. Los títulos típicos de virus estaban entre 10^6 y 10^8 ufp/ml de preparación de virus. Además, puede obtenerse un inóculo de baculovirus sin una generación de vector de baculovirus previa en cultivos celulares. Pueden transfectarse las pupas con un bácmido obtenido en bacterias mediante un procedimiento de transposición. La figura 16 representa el procedimiento general para obtener una reserva de virus en pupa mediante un sistema libre de células.

Ejemplo 7. Cultivo celular y virus

Se cultivaron las líneas celulares de *Spodoptera frugiperda* Sf21 o Sf9 en placas de cultivo tisular de 6 pocillos (1x10⁶ células/pocillo) en medio de insectos TNM-FH (Pan Biotech™, Alemania) que contenía suero bovino fetal inactivado con calor al 10% (Pan Biotech™, Alemania) a 27°C. Se obtuvieron baculovirus de AcMNPV recombinante mediante el sistema de expresión de baculovirus "Bac-to-Bac®" (invitrogen™, EE.UU.). Se generaron los diferentes vectores de transferencia TB(+) que contenían los elementos reguladores de ADN recombinante usando el plásmido pFastBac™-DUAL (invitrogen™). Se usaron estos vectores de transferencia para transfectar células Sf21 con Cellfectin® (invitrogen™, EE.UU.). Los baculovirus recombinantes resultantes de la infección de células Sf21 se hicieron pasar entonces dos veces en células y se titularon mediante el método de ensayo de placa. Los constructos génicos obtenidos de los casetes de expresión de baculovirus TB (+) se muestran esquemáticamente en las figuras 4, 7 y 10, que muestran las combinaciones de elementos reguladores genéticos implicados en la expresión de genes (*polhAc-ie-01/hr1p6.9p10*, SEQ ID NO: 17, más la secuencia del gen que codifica para la proteína deseada, por ejemplo, SEQ ID NO: 26, 30, 32 y 33). Se usaron los diferentes casetes de expresión para generar los baculovirus recombinantes usados en los ejemplos mostrados en las figuras 6, 8, 9, 11, 12, 13 y 14.

Ejemplo 8. Generación del vector de clonación

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

Ejemplo 9. Generación del vector donador que contiene el casete de expresión de baculovirus de la presente invención

Un vector donador consiste en un vector de clonación, por ejemplo, un plásmido pUC57, que contiene el casete de expresión de baculovirus, en el que se ha clonado un gen foráneo usando las enzimas de restricción apropiadas. Se sintetizó el casete de expresión de baculovirus TB(+) usado ligando las siguientes secuencias de ADN: (i) el regulador de la transcripción de baculovirus que codifica para la secuencia de *Ac-ie-01* (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-5) hacia 3' de una secuencia de promotor, tal como el promotor *polh* (por ejemplo, SEQ ID NO: 10) y hacia 5' de la señal de poliadenilación de TK de VHS y (ii) en otro locus una secuencia potenciadora, por ejemplo, la región homóloga *hr1*, hacia 5' de (iii) una secuencia de promotor, por ejemplo, p6.9p10 (por ejemplo, SEQ ID NO: 13), seguida por un sitio de clonación múltiple (MCS) para clonar el gen de interés y la señal de poliadenilación de p10 hacia 3' del MCS (figuras 4, 7 y 10). El casete de expresión de baculovirus está flanqueado por sitios de restricción específicos (por ejemplo, Bg1II y BstZ171 en el extremo 5'-terminal y Bg1 II y Sgf I en el extremo 3'-terminal) para facilitar la subclonación en un vector de transferencia de un sistema de generación de baculovirus comercial (basado en la transposición, por ejemplo, el sistema "Bac-to-Bac®" (invitrogen™) o basado en recombinación homóloga, por ejemplo, "flashBAC™" (Oxford Expression Technologies™), "Baculogold™" (BD Biosciences™), "BacPAK6™" (Clontech™). "Bac-N-Blue DNA™" (invitrogen™).

Se clonaron los genes foráneos codificantes en el MCS del vector de clonación usando los sitios de restricción Nco I y Spe I, generando los vectores de plásmido donador.

Ejemplo 10. Generación del vector de transferencia que contiene el casete de expresión de baculovirus de la presente invención

Se generó el vector de transferencia digiriendo un vector donador con *BstZ171* del sitio flanqueante en 5' y con *Xba* I, y clonándolo en el vector de transferencia pFastBac™1 que también se digirió con las mismas enzimas. En este caso, como resultado de la subclonación, la señal de poliadenilación de SV40 del casete de expresión de baculovirus se intercambia por la señal de poliadenilación de p10 del vector de transferencia. Aparte de esto, todos los elementos del casete de expresión se incluyen en el vector de transferencia pFastBac, sustituyendo el promotor *polh* y el MCS del vector de transferencia comercial original.

Ejemplo 11. Generación del vector de expresión de baculovirus que contiene el casete de expresión de baculovirus de la presente invención usando el sistema "Bac-to-Bac®"

Se usaron el vector de transferencia modificado pFastBac™1 y el casete de expresión de baculovirus TB(+) para generar el baculovirus recombinante usando el sistema de expresión de baculovirus "Bac-to-Bac®". Más específicamente, se usó el vector de transferencia modificado para transformar la cepa huésped de *E. coli* DH10Bac™ que contiene un vector lanzadera de baculovirus (bácmido) y un plásmido auxiliar, y permite la generación de un bácmido recombinante tras la transposición del casete de expresión. Se usaron entonces el ADN del bácmido recombinante que contenía el casete de expresión de baculovirus TB(+) de la presente invención y los diferentes genes codificantes foráneos para transfectar células de insecto, por ejemplo, células Sf21, usando

Cellfectin®. Además, se usó el bácnido para transfectar pupas de insectos. Se usaron pupas de *Trichoplusia ni* (oruga de la col) a una edad de 1 a 5 días para este experimento. 72 horas tras la transfección, se recogieron o procesaron las células o pupas y se obtuvo la primera generación de baculovirus recombinante. Este baculovirus recombinante pudo entonces amplificarse y/o titularse adicionalmente siguiendo protocolos convencionales. Pueden usarse procedimientos similares para generar baculovirus recombinante con otros vectores de transferencia proporcionados por BEVS comerciales.

Ejemplo 12. Infección de pupas de insectos

Se usaron pupas de *Trichoplusia ni* (oruga de la col) a una edad de 1 a 5 días para todos los experimentos. El peso estándar de cada pupa era de aproximadamente 200-300 mg y se les inyectó a las pupas manualmente o mediante un robot específicamente diseñado de 1 a 10 µl de baculovirus recombinantes diluidos en medio de cultivo celular o PBS 1X para alcanzar el número de unidades formadoras de placas (UFP) por dosis seleccionado. Se recogieron las pupas a las 72-168 h tras la infección. Se congelaron las pupas recogidas inmediatamente para almacenarse a -20°C o -80°C hasta que se procesaron para la cuantificación de proteína recombinante. Se obtuvieron proteínas no desnaturalizadas, solubles totales (TSNDP) de pupas de *T. ni* congeladas infectadas por los baculovirus mediante homogeneización en presencia de un tampón de extracción usando una combinadora o una mezcladora homogeneizadora durante varios minutos.

Ejemplo 13. Procesamiento posterior de pupas de insectos

Se rompen las pupas congeladas mediante una homogeneizadora para obtener un extracto en bruto que contenía un agente reductor en una concentración de 1-25 mM, un detergente en una concentración del 0,01%-2% y una mezcla de inhibidores de la proteasa. La viscosidad del extracto en bruto se reduce mediante su incubación con una tierra de diatomeas durante un periodo de tiempo específico y luego se centrifuga para eliminar los residuos de insectos y se filtra para eliminar la tierra de diatomeas. A continuación, se clarifica el extracto a través de filtración de flujo tangencial usando un filtro apropiado según la naturaleza de la proteína recombinante. Finalmente, se realiza un proceso de diafiltración en el mismo dispositivo de filtración tangencial para cambiar el tampón antes de la purificación por cromatografía adicional. La figura 17 representa el procedimiento general para obtener un extracto de proteína recombinante soluble a partir de pupas infectadas por baculovirus.

Lista de secuencias

<110> ALTERNATIVE GENE EXPRESSION S.L.

<120> EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN PUPAS DE TRICHOPLUSIA NI

<130> 192120

<150> Documento EP15382451

<151> 17.09.2015

<160> 38

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1911

<212> ADN

<213> Virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*

<400> 1

ES 2 763 001 T3

atgatccgta catccagcca cgtcctgaac gtccaagaaa acatcatgac ttccaactgt	60
gcttccagcc cctactcctg tgaggccact tcagcctgcg ctgaggccca gcaactgcag	120
gtggacacag gtggcgataa gatcgtgaac aaccaggtca ccatgactca aatcaacttc	180
aacgcttcct acacctctgc cagcactccc tctcgtgcta gcttcgacaa ctcatactcg	240
gagttctgcg acaagcaacc taacgattac ttgtcttact acaaccaccc aaccccgac	300
ggagctgata ctgtcatctc cgactctgaa accgctgccg ctagcaactt cctcgcctca	360
gttaactcgc tcaactgacaa cgatttggtg gagtgtctgc tcaagaccac tgacaacctg	420
gaggaagctg tgtcctctgc ctactacagc gagtcaactg aacagccagt ggtcgaacaa	480
ccctctccta gctcagctta ccacgccgag tccttcgaac actctgctgg tgtcaaccag	540
ccgtcggcca caggcaccaa gaggaagttg gacgagtacc tggataactc ccagggagtt	600
gtgggtcaat tcaacaagat caagttgaga cctaagtaca agaagagcac catccagtca	660
tgcgctacac tggaacaaac catcaaccac aactaaca tctgtacagt ggcttccacc	720
caggagatca ctcaactact cacaacgac ttcgccccct acctgatgag gttcgacgat	780
aacgactaca actcgaacag attctccgat cacatgtctg aaaccggtta ctacatgttc	840
gtcgttaaga agtccgaggt gaagcctttc gaaatcatct tcgccaagta cgtctctaac	900
gtggtctacg agtacacaaa caactactac atgggttgaca accgtgtggt cgttgtgacc	960
ttcgataaga tccgcttcat gatcagctac aacctgggta aggagactgg catcgaaatc	1020
ccacactcac aggacgtctg caacgatgag accgccgctc aaaactgcaa gaagtgtcac	1080
ttcgtggacg tccaccacac attcaaggcc gctctgacct cctacttcaa cctcgatatg	1140
tactacgctc agacaacctt cgtgaccttg ctgcaatcac tcggcgagcg taagtgtgga	1200
ttcctcttgt cgaagttgta cgagatgtac caggacaaga acctcttcac tttgccatc	1260

atgctgagcc gcaaggaatc aaacgagatc gaaaccgcct ctaacaactt cttcgtctcg	1320
ccatacgttt cccagatcct caagtactcg gagtccgtcc aattcccgga caaccctccc	1380
aacaagtacg tcgttgataa cctgaacctc atcgtgaaca agaagagcac tctgacatac	1440
aagtactcgt ccgtcgctaa cctgctcttc aacaactaca agtaccacga caacatcgct	1500
tctaacaaca acgccgagaa cctcaagaag gtcaagaagg aagacggaag catgcacatc	1560
gttgagcagt acttgactca aaacgtcgat aacgttaagg gtcacaactt catcgtgttg	1620
tccttcaaga acgaggaaa gctgaccatc gctaagaaga acaaggagtt ctactggatc	1680
tctggcgaaa tcaaggacgt tgatgtgagc caggatcatcc aaaagtacaa cagattcaag	1740
caccacatgt tcgtgatcgg caaggtcaac cgtcgcgagt caactacact gcacaacaac	1800
ttgctgaagc tcttggcctt gatcctgcag ggactgggtgc cactctccga cgccatcaca	1860
ttcgccgagc aaaagctcaa ctgcaagtac aagaagtctg agttcaacta a	1911

<210> 2

<211> 1749

<212> ADN

<213> Virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*

<400> 2

atgactcaaa tcaacttcaa cgcttcctac acctctgcc a gactccctc tcgtgctagc	60
ttcgacaact catactcgga gttctgcgac aagcaaccta acgattactt gtcttactac	120
aaccacccaa ccccgagcgg agctgatact gtcactctccg actctgaaac cgctgccgct	180
agcaacttcc tcgcctcagt taactcgctc actgacaacg atttgggtgga gtgtctgctc	240
aagaccactg acaacctgga ggaagctgtg tcctctgcct actacagcga gtcactcgaa	300
cagccagtgg tcgaacaacc ctctcctagc tcagcttacc acgccgagtc cttcgaacac	360
tctgctgggtg tcaaccagcc gtcggccaca ggcaccaaga ggaagttgga cgagtacctg	420
gataactccc agggagttgt gggatcaattc aacaagatca agttgagacc taagtacaag	480
aagagcacca tccagtcagt cgctacactg gaacaaacca tcaaccacaa cactaacatc	540
tgtacagtgg cttccaccca ggagatcact cactacttca caaacgactt cgccccctac	600
ctgatgaggt tcgacgataa cgactacaac tcgaacagat tctccgatca catgtctgaa	660
accggttact acatgttcgt cgtaagaag tccgaggtga agcctttcga aatcatcttc	720
gccaaagtacg tctctaactg ggtctacgag tacacaaaca actactacat ggttgacaac	780
cgtgtgttcg ttgtgacctt cgataagatc cgcttcatga tcagctacaa cctgggttaag	840
gagactggca tcgaaatccc aactcacag gacgtctgca acgatgagac cgccgctcaa	900
aactgcaaga agtgtcactt cgtggacgtc caccacacat tcaaggccgc tctgacctcc	960
tacttcaacc tcgatatgta ctacgctcag acaaccttcg tgaccttgct gcaatcactc	1020

ggcgagcgta agtgtggatt cctcttgtcg aagttgtacg agatgtacca ggacaagaac	1080
ctcttcactt tgcccatcat gctgagccgc aaggaatcaa acgagatcga aaccgcctct	1140
aacaacttct tcgtctcgcc atacgtttcc cagatcctca agtactcgga gtccgtccaa	1200
ttcccggaca accctcccaa caagtacgtc gttgataacc tgaacctcat cgtgaacaag	1260
aagagcactc tgacatacaa gtactcgtcc gtcgctaacc tgctcttcaa caactacaag	1320
taccacgaca acatcgcttc taacaacaac gccgagaacc tcaagaaggt caagaaggaa	1380
gacggaagca tgcacatcgt tgagcagtag ttgactcaaa acgtcgataa cgttaagggt	1440
cacaacttca tcgtgttgtc cttcaagaac gaggaaggc tgaccatcgc taagaagaac	1500
aaggagttct actggatctc tggcgaaatc aaggacgttg atgtgagcca ggtcatccaa	1560
aagtacaaca gattcaagca ccacatgttc gtgatcggca aggtcaaccg tcgcgagtca	1620
actacactgc acaacaactt gctgaagctc ttggccttga tcctgcaggg actggtgcc	1680
ctctccgacg ccatcacatt cgccgagcaa aagctcaact gcaagtacaa gaagttcgag	1740
ttcaactaa	1749

<210> 3

<211> 1911

<212> ADN

<213> Virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*

<400> 3

atgatccgta catccagcca cgtcctgaac gtccaagaaa acatcatgac ttccaactgt	60
gcttccagcc cctactcctg tgaggccact tcagcctgcg ctgaggccca gcaactgcag	120
gtggacacag gtggcgataa gatcgtgaac aaccaggtca ccatgactca aatcaacttc	180
aacgcttcct acacctctgc cagcactccc tctcgtgcta gcttcgacaa ctcatactcg	240
gagttctgcg acaagcaacc taacgattac ttgtcttact acaaccaccc aaccccgac	300
ggagctgata ctgtcatctc cgactctgaa accgctgccg ctagcaactt cctcgcctca	360
gttaactcgc tcaactgacaa cgatttggtg gagtgtctgc tcaagaccac tgacaacctg	420
gaggaagctg tgtcctctgc ctactacagc gagtcactcg aacagccagt ggtcgaacaa	480
ccctctccta gctcagctta ccacgccgag tccttcgaac actctgctgg tgtcaaccag	540
ccgtcggcca caggcaccaa gaggaagttg gacgagtacc tggataactc ccagggagtt	600
gtgggtcaat tcaacaagat caagttgaga cctaagtaca agaagagcac catccagtca	660
tgcgctacac tggaacaaac catcaaccac aacactaaca tctgtacagt ggcttccacc	720
caggagatca ctcaactact cacaacgac ttgcgccct acctgatgag gttcgacgat	780
aacgactaca actcgaacag attctccgat cacatgtctg aaaccggtta ctacatgttc	840
gtcgttaaga agtccgaggt gaagcctttc gaaatcatct tcgccaaagta cgtctctaac	900

gtggtctacg agtacacaaa caactactac atggttgaca accgtgtgtt cgttgtgacc 960
 ttcgataaga tccgcttcat gatcagctac aacctgggta aggagactgg catcgaaatc 1020
 ccacactcac aggacgtctg caacgatgag accgccgctc aaaactgcaa gaagtgtcac 1080
 ttcggtggacg tccaccacac attcaaggcc gctctgacct cctacttcaa cctcgatatg 1140
 tactacgctc agacaacctt cgtgaccttg ctgcaatcac tcggcgagcg taagtgtgga 1200
 ttctctttgt cgaagttgta cgagatgtac caggacaaga acctcttcac tttgcccatac 1260
 atgctgagcc gcaaggaatc aaacgagatc gaaaccgcct ctaacaactt cttcgtctcg 1320
 ccatacgttt cccagatcct caagtactcg gagtccgtcc aattcccga caacctccc 1380
 aacaagtacg tcgttgataa cctgaacctc atcgtgaaca agaagagcac tctgacatac 1440
 aagtactcgt ccgtcgctaa cctgctcttc aacaactaca agtaccacga caacatcgct 1500
 tctaacaaca acgccgagaa cctcaagaag gtcaagaagg aagacggaag catgcacatc 1560
 gttgagcagt acttgactca aaacgtcgat aacgttaagg gtcacaactt catcgtgttg 1620
 tccttcaaga acgaggaaag gctgaccatc gctaagaaga acaaggagtt ctactggatc 1680
 tctggcgaaa tcaaggacgt tgatgtgagc caggatcatc aaaagtacaa cagattcaag 1740
 caccacatgt tcgtgatcgg caaggtcaac cgtcgcgagt caactacact gcacaacaac 1800
 ttgctgaagc tcttggcctt gatcctgcag ggactgggtgc cactctccga cgccatcaca 1860
 ttcgccgagc aaaagctcaa ctgcaagtac aagaagttcg agttcaacta a 1911

<210> 4

<211> 666

<212> ADN

<213> Virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*

<400> 4

atgactcaaa tcaacttcaa cgcttcctac acctctgcc a gcaactccctc tcgtgctagc 60
 ttcgacaact catactcgga gttctgcgac aagcaacct a acgattactt gtcttactac 120
 aaccacccaa ccccgagcgg agctgatact gtcactctccg actctgaaac cgctgccgct 180
 agcaacttcc tcgcctcagt taactcgctc actgacaacg atttggtgga gtgtctgctc 240
 aagaccactg acaacctgga ggaagctgtg tcctctgcct actacagcga gtcactcgaa 300
 cagccagtgg tcgaacaacc ctctcctagc tcagcttacc acgccgagtc cttcgaacac 360
 tctgctgggtg tcaaccagcc gtcggccaca ggcaccaaga ggaagttgga cgagtacctg 420
 gataactccc agggagttgt gggtaattc aacaagatca agttgagacc taagtacaag 480
 aagagcacca tccagtcatg cgctacactg gaacaaacca tcaaccacaa cactaacatc 540
 tgtacagtgg cttccaccca ggagatcact cactacttca caaacgactt cgccccctac 600
 ctgatgaggt tcgacgataa cgactacaac tcgaacagat tctccgatca catgtctgaa 660
 accggt 666

<210> 5

<211> 828

<212> ADN

5 <213> Virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*

<400> 5

```

atgatccgta catccagcca cgtcctgaac gtccaagaaa acatcatgac ttccaactgt      60
gcttccagcc cctactcctg tgaggccact tcagcctgcg ctgaggccca gcaactgcag      120
gtggacacag gtggcgataa gatcgtgaac aaccaggtca ccatgactca aatcaacttc      180
aacgcttcct acacctctgc cagcactccc tctcgtgcta gcttcgacaa ctcatactcg      240
gagttctgcg acaagcaacc taacgattac ttgtcttact acaaccaccc aaccccgagc      300
ggagctgata ctgtcatctc cgactctgaa accgctgccg ctagcaactt cctcgcctca      360
gttaactcgc tcaactgacaa cgatttggtg gagtgtctgc tcaagaccac tgacaacctg      420
gaggaagctg tgctcctctg ctactacagc gagtcactcg aacagccagt ggtcgaacaa      480
ccctctccta gctcagctta ccacgccgag tccttcgaac actctgctgg tgtcaaccag      540
ccgtcggcca caggcaccaa gaggaagttg gacgagtacc tggataactc ccagggagtt      600
gtgggtcaat tcaacaagat caagttgaga cctaagtaca agaagagcac catccagtca      660
tgcgctacac tggaacaaac catcaaccac aactaaca tctgtacagt ggcttccacc      720
caggagatca ctcaactact cacaacgac ttcgccccct acctgatgag gttcgacgat      780
aacgactaca actcgaacag attctccgat cacatgtctg aaaccggt      828

```

10 <210> 6

<211> 582

<212> PRT

<213> Virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*

15 <400> 6

```

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

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

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

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

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

```

ES 2 763 001 T3

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

ES 2 763 001 T3

			325						330						335		
Leu	Gln	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Lys	Cys	Gly	Phe	Leu	Leu	Ser	Lys	Leu		
			340				345						350				
Tyr	Glu	Met	Tyr	Gln	Asp	Lys	Asn	Leu	Phe	Thr	Leu	Pro	Ile	Met	Leu		
			355				360						365				
Ser	Arg	Lys	Glu	Ser	Asn	Glu	Ile	Glu	Thr	Ala	Ser	Asn	Asn	Phe	Phe		
			370				375						380				
Val	Ser	Pro	Tyr	Val	Ser	Gln	Ile	Leu	Lys	Tyr	Ser	Glu	Ser	Val	Gln		
			385				390						395				
Phe	Pro	Asp	Asn	Pro	Pro	Asn	Lys	Tyr	Val	Val	Asp	Asn	Leu	Asn	Leu		
			405				410						415				
Ile	Val	Asn	Lys	Lys	Ser	Thr	Leu	Thr	Tyr	Lys	Tyr	Ser	Ser	Val	Ala		
			420				425						430				
Asn	Leu	Leu	Phe	Asn	Asn	Tyr	Lys	Tyr	His	Asp	Asn	Ile	Ala	Ser	Asn		
			435				440						445				
Asn	Asn	Ala	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys	Val	Lys	Lys	Glu	Asp	Gly	Ser	Met		
			450				455						460				
His	Ile	Val	Glu	Gln	Tyr	Leu	Thr	Gln	Asn	Val	Asp	Asn	Val	Lys	Gly		
			465				470						475				
His	Asn	Phe	Ile	Val	Leu	Ser	Phe	Lys	Asn	Glu	Glu	Arg	Leu	Thr	Ile		
			485				490						495				
Ala	Lys	Lys	Asn	Lys	Glu	Phe	Tyr	Trp	Ile	Ser	Gly	Glu	Ile	Lys	Asp		
			500				505						510				
Val	Asp	Val	Ser	Gln	Val	Ile	Gln	Lys	Tyr	Asn	Arg	Phe	Lys	His	His		
			515				520						525				
Met	Phe	Val	Ile	Gly	Lys	Val	Asn	Arg	Arg	Glu	Ser	Thr	Thr	Leu	His		
			530				535						540				
Asn	Asn	Leu	Leu	Lys	Leu	Leu	Ala	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly	Leu	Val	Pro		
			545				550						555				
Leu	Ser	Asp	Ala	Ile	Thr	Phe	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Asn	Cys	Lys	Tyr		
			565				570						575				
Lys	Lys	Phe	Glu	Phe	Asn												
			580														

ES 2 763 001 T3

<210> 7

<211> 636

<212> PRT

5 <213> Virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 763 001 T3

Leu	Arg	Pro	Lys	Tyr	Lys	Lys	Ser	Thr	Ile	Gln	Ser	Cys	Ala	Thr	Leu
210						215					220				
Glu	Gln	Thr	Ile	Asn	His	Asn	Thr	Asn	Ile	Cys	Thr	Val	Ala	Ser	Thr
225					230					235					240
Gln	Glu	Ile	Thr	His	Tyr	Phe	Thr	Asn	Asp	Phe	Ala	Pro	Tyr	Leu	Met
				245					250					255	
Arg	Phe	Asp	Asp	Asn	Asp	Tyr	Asn	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Asp	His	Met
			260					265					270		
Ser	Glu	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Met	Phe	Val	Val	Lys	Lys	Ser	Glu	Val	Lys
		275					280					285			
Pro	Phe	Glu	Ile	Ile	Phe	Ala	Lys	Tyr	Val	Ser	Asn	Val	Val	Tyr	Glu
	290					295					300				
Tyr	Thr	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Met	Val	Asp	Asn	Arg	Val	Phe	Val	Val	Thr
305					310					315					320
Phe	Asp	Lys	Ile	Arg	Phe	Met	Ile	Ser	Tyr	Asn	Leu	Val	Lys	Glu	Thr
				325					330					335	
Gly	Ile	Glu	Ile	Pro	His	Ser	Gln	Asp	Val	Cys	Asn	Asp	Glu	Thr	Ala
			340					345					350		
Ala	Gln	Asn	Cys	Lys	Lys	Cys	His	Phe	Val	Asp	Val	His	His	Thr	Phe
		355					360					365			
Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Ser	Tyr	Phe	Asn	Leu	Asp	Met	Tyr	Tyr	Ala	Gln
	370					375					380				
Thr	Thr	Phe	Val	Thr	Leu	Leu	Gln	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Lys	Cys	Gly
385					390					395					400
Phe	Leu	Leu	Ser	Lys	Leu	Tyr	Glu	Met	Tyr	Gln	Asp	Lys	Asn	Leu	Phe
				405					410					415	
Thr	Leu	Pro	Ile	Met	Leu	Ser	Arg	Lys	Glu	Ser	Asn	Glu	Ile	Glu	Thr
			420					425					430		
Ala	Ser	Asn	Asn	Phe	Phe	Val	Ser	Pro	Tyr	Val	Ser	Gln	Ile	Leu	Lys
		435					440					445			
Tyr	Ser	Glu	Ser	Val	Gln	Phe	Pro	Asp	Asn	Pro	Pro	Asn	Lys	Tyr	Val
	450					455					460				

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 222

<212> PRT

<213> Virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*

<400> 8

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

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

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

5

ES 2 763 001 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 276

<212> PRT

<213> Virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*

<400> 9

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

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

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

5

ES 2 763 001 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Glu Thr Gly
275

<210> 10
<211> 128
<212> ADN

ES 2 763 001 T3

	<213> Virus de la polihedrosis nuclear de <i>Autographa californica</i>	
	<400> 10	
	atcatggaga taattaaaat gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc	60
	gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca	120
	tcgggcgc	128
5	<210> 11	
	<211> 122	
	<212> ADN	
	<213> Virus de la polihedrosis nuclear de <i>Autographa californica</i>	
10	<400> 11	
	atacggacct ttaattcaac ccaacacaat atattatagt taaataagaa ttattatcaa	60
	atcatttgta tattaattaa aatactatac tgtaaattac attttattta caatcactcg	120
	ac	122
	<210> 12	
15	<211> 571	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Promotor quimérico recombinante	
	<400> 12	
	aaaaacatcg attaggggtga ctgaagggtta cattggggta ggttatgggt aatacgtaat	60
	ggtttaacac caaaacgata tcatggattt tatataaggt gtaataatat ttttaatgag	120
	tggacgcgtc ggggtcaatgt cctgcctatt gacgtcataa catattaggt gattatatta	180
	aaaatagttt aaactcaaat attacttgca agtttaagtt tcatcataat ctgatcataa	240
	gtttcaccca aacagaaacc aaaagcataa ctatcgaata tcttttagctt cccatgaaga	300
	aagattaccg taaccatcac taggatttta tacgattgta gaaaataaag tattctcagt	360
	ctcttttcag agcgctataa aaaggggtgc attctcggta agagtacagt tgaactcaca	420
	tcgagttaac tccacgctgc agtctcgaga tacggacctt taattcaacc caacacaata	480
	tattatagtt aaataagaat tattatcaaa tcatttgtat attaatataa atactatact	540
	gtaaattaca ttttattttac aatcactcga c	571
25	<210> 13	
	<211> 465	
	<212>ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Promotor quimérico recombinante	
	<400> 13	

	ggtacccaaat tccgttttgc gacgatgcag agtttttgaa caggctgctc aaacacatag	60
	atccgtaccc gctcagtcg atgtattaca atgcagccaa taccatgttt tacacgacta	120
	tggaaaacta tgccgtgtcc aattgcaagt tcaacattga ggattacaat aacatattta	180
	aggtgatgga aaatattagg aaacacagca acaaaaattc aaacgaccaa gacgagttaa	240
	acatatattt gggagttcag tcgtcgaatg caaagcgtaa aaaatattaa taaggtaaaa	300
	attacagcta cataaattac acaatttaaa ctgcagtctg gagatacgga cctttaattc	360
	aacccaacac aatatattat agttaataa gaattattat caaatcattt gtatattaat	420
	taaaatacta tactgtaaat tacattttat ttacaatcac tcgac	465
	<210> 14	
	<211> 436	
5	<212> ADN	
	<213> Virus de la polihedrosis nuclear de <i>Autographa californica</i>	
	<400> 14	
	aaaaacatcg attaggggtga ctgaagggtta cattgggggtta ggttatgggtt aatacgtaat	60
	ggtttaacac caaaacgata tcatggattt tatataaggt gtaataatat ttttaatgag	120
	tggacgcgctc ggggtcaatgt cctgcctatt gacgtcataa catattaggt gattatatta	180
	aaaatagttt aaactcaaatt attacttgca agtttaaggt tcatcataat ctgatcataa	240
	gtttcaccaca aacagaaacc aaaagcataa ctatcgaata tcttttagctt cccatgaaga	300
	aagattaccg taaccatcac taggatttta tacgattgta gaaaataaag tattctcagt	360
	ctcttttcag agcgctataa aaaggggtgc attctcggtta agagtacagt tgaactcaca	420
	tcgagttaac tccacg	436
10	<210> 15	
	<211> 3163	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Casete de expresión recombinante	
	<400> 15	
	ttagttgaac tcgaacttct tgtacttgca gttgagcttt tgctcggcga atgtgatggc	60
	gtcggagagt ggcaccagtc cctgcaggat caaggccaag agcttcagca agttgttgtg	120
	cagtgtagtt gactcgcgac gggtgacctt gccgatcacg aacatgtggt gcttgaatct	180
	gttgtacttt tggatgacct ggctcacatc aacgtccttg atttcgccag agatccagta	240
	gaactccttg ttcttcttag cgatggctcag cctttcctcg ttcttgaagg acaacacgat	300
	gaagttgtga cccttaacgt tatcgacgtt ttgagtcaag tactgctcaa cgatgtgcat	360
20	gcttccgtct tccttcttga ccttcttgag gttctcggcg ttgttggttag aagcgatggt	420

gtcgtggtac ttgtagttgt tgaagagcag gttagcgacg gacgagtact tgtatgtcag	480
agtgtctcttc ttgttcacga tgagggttcag gttatcaacg acgtacttgt tgggaggggtt	540
gtccgggaat tggacggact ccgagtactt gaggatctgg gaaacgtatg gcgagacgaa	600
gaagttgtta gaggcggttt cgatctcggt tgattccttg cggctcagca tgatgggcaa	660
agtgaagagg ttcttgtcct ggtacatctc gtacaacttc gacaagagga atccacactt	720
acgctcgccg agtgattgca gcaaggctac gaaggttgtc tgagcgtagt acatatcgag	780
gttgaagtag gaggtcagag cggccttgaa tgtgtggtgg acgtccacga agtgacactt	840
cttgcagttt tgagcggcgg tctcatcggt gcagacgtcc tgtgagtgtg ggatttcgat	900
gccagtctcc ttaaccagggt tgtagctgat catgaagcgg atcttatcga aggtcacaac	960
gaacacacgg ttgtcaacca tgtagtagtt gtttgtgtac tcgtagacca cgtagagac	1020
gtacttggcg aagatgattt cgaaaggctt cacctcggac ttcttaacga cgaacatgta	1080
gtaaccgggt tcagacatgt gatcggagaa tctgttcgag ttgtagtcgt tatcgtcgaa	1140
cctcatcagg tagggggcga agtcgtttgt gaagtagtga gtgatctcct gggtggaagc	1200
cactgtacag atgttagtgt tgtggttgat ggtttgttcc agttagcgc atgactggat	1260
gggtgtcttc ttgtacttag gtctcaactt gatcttggtt aattgaccca caactccctg	1320
ggagttatcc aggtactcgt ccaacttcct cttggtgcct gtggccgacg gctggttgac	1380
accagcagag tgttcgaagg actcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac	1440
cactggctgt tcgagtgact cgctgtagta ggcagaggac acagcttcct ccaggttgtc	1500
agtggctctt agcagacact ccaccaaatac gttgtcagtg agcgagttaa ctgaggcgag	1560
gaagttgcta gcggcagcgg ttccagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccggggt	1620
tgggtggttg tagtaagaca agtaatcggt aggttgcttg tcgcagaact ccgagtatga	1680
gttgtcgaag ctagcacgag agggagtgtt ggcagagggt taggaagcgt tgaagttgat	1740
ttgagtcatg gtgacctggt tggtcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg	1800
ctgggcctca gcgcaggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga	1860
agtcatgatg ttttcttgga cggtcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatt	1920
gggtcatcta gattcgaag cggccgcgac tagtgagctc gtcgacgtag gcctttgaat	1980
tccgcgcgct tcggaccggg atccgcgccc gatggtggga cggtatgaat aatccggaat	2040
atttataggt ttttttatta caaaactggt acgaaaacag taaaatactt atttatttgc	2100
gagatgggtta tcattttaat tatctccatg atctattaat attccggagt atacatcgat	2160
gttgaccca acaaaagatt tataattaat cataatcacg aacaacaaca agtcaatgaa	2220
acaaataaac aagttgtcga taaaacattc ataaatgaca cagcaacata caattcttgc	2280
ataataaaaa tttaaagac atcatatttg agaataacaa atgacattat ccctcgattg	2340

tgtttttacaa gtagaattct acccgtaaag cgagtttagt tttgaaaaac aaatgacatc	2400
atgtgtataa tgacatcatc ccctgattgt gttttacaag tagaattcta tccgtaaagc	2460
gagttcagtt ttgaaaacaa atgagtcata cctaaacacg ttaataatct tctgatataca	2520
gcttatgact caagttatga gccgtgtgca aaacatgaga taagtttatg acatcatcca	2580
ctgatcgtgc gttacaagta gaattctact cgtaaagcca gttcggttat gagccgtgtg	2640
caaaacatga catcagctta tgactcatc ttgattgtgt tttacgcgta gaattctact	2700
cgtaaagcga gttcggttat gagccgtgtg caaaacatga catcagctta tgagtcataa	2760
ttaatcgtgc gttacaagta gaattctact cgtaaagcga gttgaaggat catatttagt	2820
tgcgtttatg agataagatt gaaagcacgt gtaaaatgtt tcccgcgcgt tggcacaact	2880
atttacaatg cggccaagtt ataaaagatt ctaatctgat atgttttaaa acacctttgc	2940
ggcccgagtt gtttgctac gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag	3000
taaaacaaaa ccctagtatt ggagcaataa tcgatgagct catacggacc ttttaattcaa	3060
cccaacacaa tatattatag ttaaataaga attattatca aatcatttgt atattaatta	3120
aaatactata ctgtaaaatta cattttattt acaatcactc gac	3163

<210> 16
 <211> 3656
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Casete de expresión recombinante

ttagttgaac tcgaacttct tgtacttgca gttgagcttt tgctcggcga atgtgatggc	60
gtcggagagt ggcaccagtc cctgcaggat caaggccaag agcttcagca agttgttgtg	120
cagtgtagtt gactcgcgac ggttgacctt gccgatcacg aacatgtggt gcttgaatct	180
gttgtacttt tggatgacct ggctcacatc aacgtccttg atttcgccag agatccagta	240
gaactccttg ttcttcttag cgatggtcag cctttcctcg ttcttgaagg acaacacgat	300
gaagttgtga cccttaacgt tatcgacgtt ttgagtcaag tactgctcaa cgatgtgcat	360
gcttccgtct tccttcttga ccttcttgag gttctcggcg ttgttggttag aagcgatgtt	420
gtcgtggtac ttgtagttgt tgaagagcag gttagcgacg gacgagtact tgtatgtcag	480
agtgtctctt ttgttcacga tgaggttcag gttatcaacg acgtacttgt tgggaggggtt	540
gtccgggaat tggacggact ccgagtactt gaggatctgg gaaacgtatg gcgagacgaa	600
gaagttgtta gaggcggttt cgatctcgtt tgattccttg cggctcagca tgatgggcaa	660
agtgaagagg ttcttgtcct ggtacatctc gtacaacttc gacaagagga atccacactt	720

ES 2 763 001 T3

acgctcgccg agtgattgca gcaagggtcac gaagggtgtc tgagcgtagt acatatcgag	780
gttgaagtag gaggtcagag cggccttgaa tgtgtggtgg acgtccacga agtgacactt	840
cttgcagttt tgagcggcgg tctcatcggt gcagacgtcc tgtgagtgtg ggatttcgat	900
gccagtctcc ttaaccaggt tgtagctgat catgaagcgg atcttatcga aggtcacaac	960
gaacacacgg ttgtcaacca tgtagtagtt gtttgtgtac tcgtagacca cgtagagac	1020
gtacttggcg aagatgattt cgaaaggctt cacctcggac ttcttaacga cgaacatgta	1080
gtaaccgggt tcagacatgt gatcggagaa tctgttcgag ttgtagtcgt tategtcgaa	1140
cctcatcagg tagggggcga agtcgtttgt gaagtagtga gtgatctcct gggtggaagc	1200
cactgtacag atgttagtgt tgtggttgat ggtttgttcc agttagcgc atgactggat	1260
gggtctcttc ttgtacttag gtctcaactt gatcttggtg aattgaccca caactccctg	1320
ggagttatcc aggtactcgt ccaacttcct cttggtgcct gtggccgacg gctggttgac	1380
accagcagag tgttcgaagg actcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac	1440
cactggctgt tcgagtgact cgctgtagta ggcagaggac acagcttcct ccaggttgtc	1500
agtggctctt agcagacact ccaccaaatac gttgtcagtg agcgagttaa ctgaggcgag	1560
gaagttgcta gcggcagcgg tttcagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccgggggt	1620
tgggtggttg tagtaagaca agtaatcggt aggttgcttg tcgcagaact ccgagtatga	1680
gttgtcgaag ctagcacgag agggagtgtt ggcagagggt taggaagcgt tgaagttgat	1740
ttgagtcatt gtgacctggt tggtcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg	1800
ctgggcctca gcgcaggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga	1860
agtcattgat ttttcttga cgttcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatt	1920
gggtcatcta gattcgaaag cggccgcgac tagtgagctc gtcgacgtag gcctttgaat	1980
tccgcgcgct tcggaccggg atccgcgccc gatgggtgga cggatgaat aatccggaat	2040
atttataggt ttttttatta caaaactggt acgaaaacag taaaatactt atttatttgc	2100
gagatgggta tcattttaat tatctccatg atctattaat attccggagt atacatcgat	2160
gttgaccca acaaaagatt tataattaat cataatcacg aacaacaaca agtcaatgaa	2220
acaaataaac aagttgtcga taaaacattc ataatgaca cagcaacata caattcttgc	2280
ataataaaaa tttaaagac atcatatttg agaataacaa atgacattat ccctcgattg	2340
tgttttacaa gtagaattct acccgtaaag cgagtttagt tttgaaaaac aaatgacatc	2400
atttgtataa tgacatcatc ccctgattgt gttttacaag tagaattcta tccgtaaagc	2460
gagttcagtt ttgaaaacaa atgagtcata cctaaacacg ttaataatct tctgatatca	2520
gcttatgact caagttatga gccgtgtgca aaacatgaga taagtttatg acatcatcca	2580
ctgatcgtgc gttacaagta gaattctact cgtaaagcca gttcggttat gagccgtgtg	2640

caaaacatga catcagctta tgactcatac ttgattgtgt tttacgcgta gaattctact	2700
cgtaaagcga gttcgggttat gagccgtgtg caaaacatga catcagctta tgagtcataa	2760
ttaatcgtgc gttacaagta gaattctact cgtaaagcga gttgaaggat catattttagt	2820
tgcgtttatg agataagatt gaaagcacgt gtaaaatgtt tcccgcgcgt tggcacaact	2880
atttacaatg cggccaagtt ataaaagatt ctaatctgat atgttttaaa acacctttgc	2940
ggcccagagtt gtttgcgtag gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag	3000
taaaacaaaa ccctagtatt ggagcaataa tcgatgagct cgtcgacgta ggcctttgaa	3060
ttccgcgcgc ttcggaccggt gatccaaaaa catcgattag ggtgactgaa gggtacattg	3120
gggtaggtta tgggtaatac gtaatggttt aacacaaaa cgatatcatg gattttatat	3180
aaggtgtaat aatattttta atgagtggac gcgtcgggtc aatgtcctgc ctattgacgt	3240
cataacatat taggtgatta tattaaaaat agtttaaaact caaatattac ttgcaagttt	3300
aagtttcatc ataatctgat cataagtttc acccaaacag aaacaaaaag cataactatc	3360
gaatatcttt agcttcccat gaagaaagat taccgtaacc atcactagga ttttatacga	3420
ttgtagaaaa taaagtattc tcagtctctt ttcagagcgc tataaaaagg ggtgcattct	3480
cggtaagagt acagttgaac tcacatcgag ttaactccac gctgcagtct cgagatacgg	3540
acctttaatt caaccaca caatatatta tagttaata agaattatta tcaaatcatt	3600
tgtatattaa ttaaaatact atactgtaaa ttacatttta tttacaatca ctcgac	3656

<210> 17
 <211> 3541
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Casete de expresión recombinante

<400> 17	
ttagttgaac tcgaacttct tgtacttgca gttgagcttt tgctcggcga atgtgatggc	60
gtcggagagt ggcaccagtc cctgcaggat caaggccaag agcttcagca agttgtttgtg	120
cagtgtagtt gactcgcgac gggtgacctt gccgatcacg aacatgtggt gcttgaatct	180
gttgtacttt tggatgacct ggctcacatc aacgtccttg atttcgccag agatccagta	240
gaactccttg ttcttcttag cgatggtcag cctttcctcg ttcttgaagg acaacacgat	300
gaagtttgtga cccttaacgt tatcgacgtt ttgagtcaag tactgctcaa cgatgtgcat	360
gcttccgtct tccttcttga ccttcttgag gttctcggcg ttgttggttag aagcgatgtt	420
gtcgtggtac ttgtagttgt tgaagagcag gtttagcgacg gacgagtact tgtatgtcag	480
agtgtctctt ttgttcacga tgagggttcag gttatcaacg acgtacttgt tgggaggggtt	540

ES 2 763 001 T3

gtccgggaat tggacggact ccgagtactt gaggatctgg gaaacgtatg gcgagacgaa	600
gaagttgtta gaggcggttt cgatctcggt tgattccttg cggctcagca tgatgggcaa	660
agtgaagagg ttcttgcctt ggtacatctc gtacaacttc gacaagagga atccacactt	720
acgctcgccg agtgattgca gcaagggtcac gaaggttgct tgagcgtagt acatatcgag	780
gttgaagtag gaggtcagag cggccttgaa tgtgtggtgg acgtccacga agtgacactt	840
cttgacgttt tgagcggttg tctcatcggt gcagacgtcc tgtgagtgtg ggatttcgat	900
gccagtctcc ttaaccaggt tgtagctgat catgaagcgg atcttatcga aggtcacaaac	960
gaacacacgg ttgtcaacca tgtagtagtt gtttgtgtac tcgtagacca cgtagagac	1020
gtacttggcg aagatgattt cgaaaggctt cacctcggac ttcttaacga cgaacatgta	1080
gtaaccggtt tcagacatgt gatcggagaa tctgttcgag ttgtagtcgt tatcgtcgaa	1140
cctcatcagg tagggggcga agtcgtttgt gaagtagtga gtgatctcct gggtggaagc	1200
cactgtacag atgttagtgt tgtggttgat ggtttgttcc agtgtagcgc atgactggat	1260
ggtgctcttc ttgtacttag gtctcaactt gatcttggtt aattgaccca caactccctg	1320
ggagttatcc aggtactcgt ccaacttcct cttggtgcct gtggccgacg gctggttgac	1380
accagcagag tgttcgaagg actcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac	1440
cactggctgt tcgagtgact cgctgtagta ggcagaggac acagcttcct ccaggttgtc	1500
agtggctctt agcagacact ccaccaaatac gttgtcagtg agcgagttaa ctgaggcgag	1560
gaagttgcta gcggcagcgg ttccagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccggggt	1620
tgggtggttg tagtaagaca agtaatcggt aggttgcttg tcgcagaact ccgagtatga	1680
gttgtcgaag ctagcacgag agggagtgtt ggcagagggt taggaagcgt tgaagttgat	1740
ttgagtcatg gtgacctggt tgttcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg	1800
ctgggcctca gcgcaggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga	1860
agtcattgat ttttcttga cgttcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatc	1920
tagattcgaa agcggccgcg actagtgagc tcgtcgacgt aggcctttga attccgcgcg	1980
cttcggaccg ggatccgcgc ccgatggtgg gacggtatga ataaccgga atatttatag	2040
gtttttttat tacaaaactg ttacgaaaac agtaaaatac ttatttattt gcgagatggt	2100
tatcatttta attatctcca tgatctatta atattccgga gtatacatcg atgttgaccc	2160
caacaaaaga ttataatta atcataatca cgaacaacaa caagtcaatg aaacaaataa	2220
acaagttgtc gataaaacat tcataaatga cacagcaaca tacaattctt gcataataaa	2280
aatttaaatg acatcatatt tgagaataac aaatgacatt atccctcgat tgtgttttac	2340
aagtagaatt ctaccgtaa agcgagttta gttttgaaaa acaaatgaca tcatttgtat	2400
aatgacatca tcccctgatt gtgttttaca agtagaattc tatccgtaaa gcgagttcag	2460

ttttgaaaac	aaatgagtca	tacctaaaca	cgtaataaat	cttctgatat	cagcttatga	2520
ctcaagttat	gagccgtgtg	caaacatga	gataagttta	tgacatcatc	cactgatcgt	2580
gcgttacaag	tagaattcta	ctcgtaaagc	cagttcgggt	atgagccgtg	tgcaaacat	2640
gacatcagct	tatgactcat	acttgattgt	gttttacgcg	tagaattcta	ctcgtaaagc	2700
gagttcgggt	atgagccgtg	tgcaaacat	gacatcagct	tatgagtcac	aattaatcgt	2760
gcgttacaag	tagaattcta	ctcgtaaagc	gagttgaagg	atcatattta	gttgcgttta	2820
tgagataaga	ttgaaagcac	gtgtaaaatg	tttccgcgcg	gttggcacia	ctattttacia	2880
tgccggccaag	ttataaaaaga	ttctaactctg	atatgtttta	aaacaccttt	gcggcccgag	2940
ttgtttgcgt	acgtgactag	cgaagaagat	gtgtggaccg	cagaacagat	agtaaaacia	3000
aaccctagta	ttggagcaat	aatcgatgag	ctcgtcgacg	taggcctttg	aattccgcgc	3060
gcttcggacc	gggatcggtg	ccaaattccg	ttttgcgacg	atgcagagtt	tttgaacagg	3120
ctgctcaaac	acatagatcc	gtaccgcgtc	agtcggatgt	attacaatgc	agccaatacc	3180
atgtttttaca	cgactatgga	aaactatgcc	gtgtccaatt	gcaagttcaa	cattgaggat	3240
tacaataaca	tatttaaggt	gatggaaaat	attaggaaac	acagcaacia	aaattcaaac	3300
gaccaagacg	agttaaacat	atatttgga	gttcagtcgt	cgaatgcaaa	gcgtaaaaaa	3360
tattaataag	gtaaaaatta	cagctacata	aattacacia	tttaaactgc	agtctggaga	3420
tacggacctt	taattcaacc	caacacaata	tattatagtt	aaataagaat	tattatcaaa	3480
tcatttgtat	attaattaaa	atactatact	gtaaattaca	ttttatttac	aatcactcga	3540
c						3541

<210> 18
 <211> 3512
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Casete de expresión recombinante

ttagttgaac	tcgaacttct	tgtacttgca	gttgagcttt	tgctcggcga	atgtgatggc	60
gtcggagagt	ggcaccagtc	cctgcaggat	caaggccaag	agcttcagca	agttgttgtg	120
cagtgtagtt	gactcgcgac	ggttgacctt	gccgatcacg	aacatgtggt	gcttgaatct	180
gttgtacttt	tggtatgacct	ggctcacatc	aacgtccttg	atttcgccag	agatccagta	240
gaactccttg	ttcttcttag	cgatggtcag	cctttcctcg	ttcttgaagg	acaacacgat	300
gaagtttgtga	cccttaacgt	tatcgacgtt	ttgagtcaag	tactgctcaa	cgatgtgcat	360
gcttccgtct	tccttcttga	ccttcttgag	gttctcggcg	ttgttggttag	aagcgatggt	420

gtcgtggtac	ttgtagttgt	tgaagagcag	gtagcgacg	gacgagtact	tgtatgtcag	480
agtgtctcttc	ttgttcacga	tgagggttcag	gttatcaacg	acgtacttgt	tgggaggggtt	540
gtccgggaat	tggacggact	ccgagtactt	gaggatctgg	gaaacgtatg	gcgagacgaa	600
gaagttgtta	gaggcggttt	cgatctcggt	tgattccttg	cggtcagca	tgatgggcaa	660
agtgaagagg	ttcttgtcct	ggtacatctc	gtacaacttc	gacaagagga	atccacactt	720
acgctcgccg	agtgattgca	gcaaggtcac	gaaggttgtc	tgagcgtagt	acatatcgag	780
gttgaagtag	gaggtcagag	cggccttgaa	tgtgtggtgg	acgtccacga	agtgacactt	840
cttgcagttt	tgagcggcgg	tctcatcggt	gcagacgtcc	tgtgagtgtg	ggatttcgat	900
gccagtctcc	ttaaccaggt	tgtagctgat	catgaagcgg	atcttatcga	aggtcacaac	960
gaacacacgg	ttgtcaacca	tgtagtagtt	gtttgtgtac	tcgtagacca	cgtagagac	1020
gtacttggcg	aagatgattt	cgaaaggctt	cacctcggac	ttcttaacga	cgaacatgta	1080
gtaaccgggt	tcagacatgt	gatcggagaa	tctgttcgag	ttgtagtcgt	tatcgtcgaa	1140
cctcatcagg	tagggggcga	agtcgtttgt	gaagtagtga	gtgatctcct	gggtggaagc	1200
cactgtacag	atgttagtgt	tgtggttgat	ggtttggtcc	agtgtagcgc	atgactggat	1260
gggtgtcttc	ttgtacttag	gtctcaactt	gatcttggtg	aattgaccca	caactccctg	1320
ggagttatcc	aggtactcgt	ccaacttcct	cttggtgcct	gtggccgacg	gctggttgac	1380
accagcagag	tgttcgaagg	actcggcgtg	gtaagctgag	ctaggagagg	gttgttcgac	1440
cactggctgt	tcgagtgact	cgctgtagta	ggcagaggac	acagcttcct	ccaggttgtc	1500
agtggctctt	agcagacact	ccaccaaatc	gttgtcagtg	agcgagttaa	ctgaggcgag	1560
gaagttgcta	gcggcagcgg	tttcagagtc	ggagatgaca	gtatcagctc	cgtccgggggt	1620
tgggtgggtg	tagtaagaca	agtaatcggt	aggttgcttg	tcgcagaact	ccgagtatga	1680
gttgtcgaag	ctagcacgag	agggagtgtc	ggcagagggt	taggaagcgt	tgaagttgat	1740
ttgagtcatg	gtgacctggt	tggtcacgat	cttatcgcca	cctgtgtcca	cctgcagttg	1800
ctgggcctca	gcgcaggctg	aagtggcctc	acaggagtag	gggctggaag	cacagttgga	1860
agtcatgatg	ttttcttgga	cgttcaggac	gtggctggat	gtacggatca	tagatctatc	1920
tagatgcatt	cgcgaggtag	cgagctcgaa	ttcactggcc	gtcgtttttac	aacgtcgtga	1980
ctgggaaaac	cctggcggtta	cccaacttaa	tcgccttgca	gcacatcccc	ctttcgccag	2040
ctgctagcac	catggctcga	gcgtggagtt	aactcgatgt	gagttcaact	gtactcttac	2100
cgagaatgca	ccccttttta	tagcgtctctg	aaaagagact	gagaataactt	tattttctac	2160
aatcgtataa	aatcctagt	atggttacgg	taatctttct	tcatgggaag	ctaaagatat	2220
tcgatagtta	tgtttttggt	ttctgtttgg	gtgaaactta	tgatcagatt	atgatgaaac	2280
ttaaacttgc	aagtaatatt	tgagtttaaa	ctatttttaa	tataatcacc	taatatgtta	2340

ES 2 763 001 T3

tgacgtcaat aggcaggaca ttgacccgac gcgtccactc attaaaaata ttattacacc	2400
ttatataaaa tccatgatat cgttttgggtg tttaaccatt acgtattaac cataacctac	2460
cccaatgtaa ccttcagtca ccctaacga tgtttttgta tacatcgatg ttgaccccaa	2520
caaaagattt ataattaatc ataatcacga acaacaacaa gtcaatgaaa caaataaaca	2580
agttgtcgat aaaacattca taaatgacac agcaacatac aattcttgca taataaaaat	2640
ttaaatgaca tcatatttga gaataacaaa tgacattatc cctcgattgt gttttacaag	2700
tagaattcta cccgtaaagc gagtttagtt ttgaaaaaca aatgacatca tttgtataat	2760
gacatcatcc cctgattgtg ttttacaagt agaattctat ccgtaaagcg agttcagttt	2820
tgaaaacaaa tgagtcatac ctaaacacgt taataatctt ctgatatcag cttatgactc	2880
aagttatgag ccgtgtgcaa aacatgagat aagtttatga catcatccac tgatcgtgcg	2940
ttacaagtag aattctactc gtaaagccag ttcggttatg agccgtgtgc aaaacatgac	3000
atcagcttat gactcatact tgattgtgtt ttacgcgtag aattctactc gtaaagcgag	3060
ttcggttatg agccgtgtgc aaaacatgac atcagcttat gagtcataat taatcgtgcg	3120
ttacaagtag aattctactc gtaaagcgag ttgaaggatc atatttagtt gcgtttatga	3180
gataagattg aaagcacgtg taaaatgttt cccgcgcgtt ggcacaacta tttacaatgc	3240
ggccaagtta taaaagattc taatctgata tgttttaaaa cacctttgcg gcccgagttg	3300
tttgcgtagc tgactagcga agaagatgtg tggaccgcag aacagatagt aaaacaaaac	3360
cctagtattg gagcaataat cgatgagctc atacggacct ttaattcaac ccaacacaat	3420
atattatagt taaataagaa ttattatcaa atcatttgta tattaattaa aatactatac	3480
tgtaaattac attttattta caatcactcg ac	3512

<210> 19
 <211> 4005
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Casete de expresión recombinante

<400> 19	
ttagttgaac tcgaacttct tgtacttgca gttgagcttt tgctcggcga atgtgatggc	60
gtcggagagt ggcaccagtc cctgcaggat caaggccaag agcttcagca agttgttgtg	120
cagtgtagtt gactcgcgac ggttgacctt gccgatcacg aacatgtggt gcttgaatct	180
gttgtacttt tggatgacct ggctcacatc aacgtccttg atttcgccag agatccagta	240
gaactccttg ttcttcttag cgatggctcag cctttcctcg ttcttgaagg acaacacgat	300
gaagttgtga cccttaacgt tatcgacgtt ttgagtcaag tactgctcaa cgatgtgcat	360

gcttccgtct	tccttcttga	ccttcttgag	gttctcggcg	ttgttgtag	aagcgatgtt	420
gtcgtggtac	ttgtagtgt	tgaagagcag	gttagcgacg	gacgagtact	tgtatgtcag	480
agtgtctctc	ttgttcacga	tgagggttcag	gttatcaacg	acgtacttgt	tgggaggggt	540
gtccgggaat	tggacggact	ccgagtactt	gaggatctgg	gaaacgtatg	gcgagacgaa	600
gaagttgtta	gaggcgggtt	cgatctcgtt	tgattccttg	cggctcagca	tgatgggcaa	660
agtgaagagg	ttcttgtcct	ggtacatctc	gtacaacttc	gacaagagga	atccacactt	720
acgctcggcg	agtgattgca	gcaaggtcac	gaaggttgtc	tgagcgtagt	acatatcgag	780
gttgaagtag	gaggtcagag	cggccttgaa	tgtgtggtgg	acgtccacga	agtgacactt	840
cttgcagttt	tgagcggcgg	tctcatcgtt	gcagacgtcc	tgtgagtgtg	ggatttcgat	900
gccagtctcc	ttaaccaggt	tgtagctgat	catgaagcgg	atcttatcga	aggtcacaac	960
gaacacacgg	ttgtcaacca	tgtagtagtt	gtttgtgtac	tcgtagacca	cgtagagac	1020
gtacttggcg	aagatgattt	cgaagggctt	cacctcggac	ttcttaacga	cgaacatgta	1080
gtaaccgggt	tcagacatgt	gatcggagaa	tctgttcgag	ttgtagtcgt	tatcgtcgaa	1140
cctcatcagg	tagggggcga	agtcgtttgt	gaagtagtga	gtgatctcct	gggtggaagc	1200
caactgtacag	atgttagtgt	tgtggttgat	ggtttggtcc	agtgtagcgc	atgactggat	1260
ggtgctcttc	ttgtacttag	gtctcaactt	gatcttggtg	aattgaccca	caactccctg	1320
ggagttatcc	aggtactcgt	ccaacttcct	cttggtgcct	gtggccgacg	gctgggtgac	1380
accagcagag	tgttcgaagg	actcggcgtg	gtaagctgag	ctaggagagg	gttggttcgac	1440
caactggctgt	tcgagtgact	cgtctgtagta	ggcagaggac	acagcttcct	ccaggttgtc	1500
agtggctctt	agcagacact	ccaccaaata	gttggtcagt	agcgagttaa	ctgaggcgag	1560
gaagttgcta	gcggcagcgg	tttcagagtc	ggagatgaca	gtatcagctc	cgtccgggggt	1620
tgggtggttg	tagtaagaca	agtaatcgtt	aggttgcttg	tcgcagaact	ccgagtatga	1680
gttgctgaag	ctagcacgag	agggagtgt	ggcagaggtg	taggaagcgt	tgaagttgat	1740
ttgagtcatg	gtgacctggt	tggtcacgat	cttatcgcca	cctgtgtcca	cctgcagttg	1800
ctgggcctca	gcgcaggctg	aagtggcctc	acaggagtag	gggctggaag	cacagttgga	1860
agtcatgatg	ttttcttgga	cggttcaggac	gtggctggat	gtacggatca	tagatctatc	1920
tagatgcatt	cgcgaggtag	cgagctcgaa	ttcactggcc	gtcgttttac	aacgtcgtga	1980
ctgggaaaac	cctggcggtta	cccaacttaa	tcgccttgca	gcacatcccc	ctttcgccag	2040
ctgctagcac	catggctcga	gcgtggagtt	aactcgatgt	gagttcaact	gtactcttac	2100
cgagaatgca	ccccttttta	tagcgtctctg	aaaagagact	gagaatactt	tattttctac	2160
aatcgtataa	aatcctagt	atggttacgg	taatctttct	tcatgggaag	ctaaagatat	2220
tcgatagtta	tgcttttggt	ttctgtttgg	gtgaaactta	tgatcagatt	atgatgaaac	2280

ttaaacttgc aagtaatat	tgagtttaaa ctat	tttttaaa tataatcacc	taatatgtta	2340
tgacgtcaat aggcaggaca	ttgacccgac gcgtccactc	attaaaaata ttattacacc		2400
ttatataaaa tccatgat	at cgttttgggtg	ttaaaccatt acgtattaac	cataacctac	2460
cccaatgtaa ccttcagtca	ccctaatacga tgtttttgta	tacatcgatg ttgaccccaa		2520
caaaagattt ataattaatc	ataatcacga acaacaacaa	gtcaatgaaa caaataaaca		2580
agttgtcgat aaaacattca	taaatgacac agcaacatac	aattcttgca taataaaaaat		2640
ttaaatgaca tcatat	tttga gaataacaaa	tgacattatc cctcgattgt	gttttacaag	2700
tagaattcta cccgtaaagc	gagtttagtt ttgaaaaaca	aatgacatca tttgtataat		2760
gacatcatcc cctgattgtg	ttttacaagt agaattctat	ccgtaaagcg agttcagttt		2820
tgaaaacaaa tgagtcatac	ctaaacacgt taataatctt	ctgatatcag cttatgactc		2880
aagttatgag ccgtgtgcaa	aacatgagat aagtttatga	catcatccac tgatcgtgcg		2940
ttacaagtag aattctactc	gtaaagccag ttcggttatg	agccgtgtgc aaaacatgac		3000
atcagcttat gactcatact	tgattgtgtt ttacgcgtag	aattctactc gtaaagcgag		3060
ttcggttatg agccgtgtgc	aaaacatgac atcagcttat	gagtcataat taatcgtgcg		3120
ttacaagtag aattctactc	gtaaagcgag ttgaaggatc	atatttagtt gcgtttatga		3180
gataagattg aaagcacgtg	taaaatgttt cccgcgcgtt	ggcacaacta tttacaatgc		3240
ggccaagtta taaaagattc	taatctgata tgttttaaaa	cacctttgcg gcccgagttg		3300
tttgcgtagc tgactagcga	agaagatgtg tggaccgcag	aacagatagt aaaacaaaac		3360
cctagtattg gagcaataat	cgatgagctc gtcgacgtag	gcctttgaat tccgcgcgct		3420
tcggaccggg atccaaaaac	atcgattagg gtgactgaag	gttacattgg ggtaggttat		3480
ggttaatacgt taatggttta	acacccaaaac gatatcatgg	attttatata aggtgtaata		3540
atatttttaa tgagtggacg	cgtcgggtca atgtcctgcc	tattgacgtc ataacatatt		3600
aggtgattat attaaaaata	gtttaaaactc aaatattact	tgcaagttta agtttcatca		3660
taatctgatc ataagtttca	cccaaacaga aaccaaagc	ataactatcg aatatcttta		3720
gcttcccatg aagaaagatt	accgtaacca tcactaggat	tttatacgat tgtagaaaat		3780
aaagtattct cagtctcttt	tcagagcgct ataaaaagg	gtgcattctc ggtaagagta		3840
cagttgaact cacatcgagt	taactccacg ctgcagtctc	gagatacggg cctttaattc		3900
aaccaaacac aatatattat	agttaaataa gaattattat	caaatcattt gtatattaat		3960
taaaatacta tactgtaaat	tacattttat ttacaatcac	tcgac		4005

<210> 20
 <211> 3898
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Casete de expresión recombinante

5	<400>	20				
ttagttgaac	tcgaacttct	tgtacttgca	g ttgagcttt	tgc tggcgca	atgtgatggc	60
gtcggagagt	ggcaccagtc	cctgcaggat	caaggccaag	agcttcagca	agttgttgtg	120
cagtgtagtt	gactcgcgac	ggttgacctt	gccgatcacg	aacatgtggt	gcttgaatct	180
gttgtacttt	tggatgacct	ggctcacatc	aacgtccttg	atttcgccag	agatccagta	240
gaactccttg	ttcttcttag	cgatggtcag	cctttcctcg	ttcttgaagg	acaacacgat	300
gaagtttgta	cccttaacgt	tatcgacggt	ttgagtc aag	tactgctcaa	cgatgtgcat	360
gcttccgtct	tccttcttga	ccttcttgag	gttctcggcg	ttgttgttag	aagcgatggt	420
gtcgtggtac	ttgtagttgt	tgaagagcag	gttagcgacg	gacgagtact	tgtatgtcag	480
agtgtctctc	ttgttcacga	tgagggttcag	gttatcaacg	acgtacttgt	tgggaggggt	540
gtccgggaat	tggacggact	ccgagtactt	gaggatctgg	gaaacgtatg	gcgagacgaa	600
gaagttgtta	gaggcgggtt	cgatctcggt	tgattccttg	cggctcagca	tgatgggcaa	660
agtgaagagg	ttcttgtcct	ggtacatctc	gtacaacttc	gacaagagga	atccacactt	720
acgctcgccg	agtgattgca	gcaagggtcac	gaagggttgtc	tgagcgtagt	acatatcgag	780
gttgaagtag	gaggtcagag	cggccttgaa	tgtgtggtgg	acgtccacga	agtgacactt	840
cttgcagttt	tgagcggcgg	tctcatcggt	gcagacgtcc	tgtgagtggt	ggatttcgat	900
gccagtctcc	ttaaccaggt	tgtagctgat	catgaagcgg	atcttatcga	aggtcacaac	960
gaacacacgg	ttgtcaacca	tgtagtagtt	gtttgtgtac	tcgtagacca	cgttagagac	1020
gtacttggcg	aagatgattt	cgaaaggctt	cacctcggac	ttcttaacga	cgaacatgta	1080
gtaaccgggt	tcagacatgt	gatcggagaa	tctgttcgag	ttgtagtcgt	tatcgtcgaa	1140
cctcatcagg	tagggggcga	agtcgtttgt	gaagtagtga	gtgatctcct	gggtggaagc	1200
cactgtacag	atgttagtgt	tgtggttgat	ggtttggtcc	agtgtagcgc	atgactggat	1260
ggtgctcttc	ttgtacttag	gtctcaactt	gatcttggtg	aattgacceca	caactccctg	1320
ggagttatcc	aggtactcgt	ccaacttcct	cttgggtgcct	gtggccgacg	gctgggttgac	1380
accagcagag	tgttcgaagg	actcggcgtg	gtaagctgag	ctaggagagg	gttggttcgac	1440
cactggctgt	tcgagtgact	cgctgtagta	ggcagaggac	acagcttcct	ccaggttgtc	1500
agtggctctg	agcagacact	ccaccaaata	gttggtcagtg	agcgagttaa	ctgagggcgag	1560
gaagttgcta	gcggcagcgg	tttcagagtc	ggagatgaca	gtatcagctc	cgtccgggggt	1620
tgggtggttg	tagtaagaca	agtaatcggt	aggttgcttg	tcgcagaact	ccgagtatga	1680
gttgctcgaag	ctagcacgag	agggagtgct	ggcagaggtg	taggaaqcgt	tgaagttgat	1740

ttgagtcattg	gtgacctggt	tgttcacgat	cttatcgcca	cctgtgtcca	cctgcagttg	1800
ctgggcctca	gocgaggctg	aagtggcctc	acaggagtag	gggctggaag	cacagttgga	1860
agtcattgatg	ttttcttgga	cgttcaggac	gtggctggat	gtacggatca	tagatctatc	1920
tagatgcatt	cgcgaggtag	cgagctcgaa	ttcactggcc	gtcgtttttac	aacgtcgtga	1980
ctgggaaaac	cctggcggtta	cccaacttaa	tgccttgca	gcacatcccc	ctttcgccag	2040
ctgctagcac	catggctcga	gcgtggagtt	aactcgatgt	gagttcaact	gtactcttac	2100
cgagaatgca	ccctttttta	tagcgctctg	aaaagagact	gagaataactt	tattttctac	2160
aatcgtataa	aatcctagt	atggttacgg	taatctttct	tcatgggaag	ctaaagatat	2220
togatagtta	tgtttttggt	ttctgtttgg	gtgaaactta	tgatcagatt	atgatgaaac	2280
ttaaacttgc	aagtaatatt	tgagttttaa	ctatttttaa	tataatcacc	taatagtta	2340
tgacgtcaat	aggcaggaca	ttgacccgac	gcgtccactc	attaaaaata	ttattacacc	2400
ttatataaaa	tccatgatat	cgtttttggtg	ttaaaccatt	acgtattaac	cataacctac	2460
cccaatgtaa	ccttcagtca	ccctaatacg	tgtttttgta	tacatcgatg	ttgaccccaa	2520
caaaagattt	ataattaatc	ataatcacga	acaacaacaa	gtcaatgaaa	caaataaaca	2580
agttgtcgat	aaaacattca	taaatgacac	agcaacatac	aattcttgca	taataaaaat	2640
ttaaatgaca	tcatattttga	gaataacaaa	tgacattatc	cctcgattgt	gttttacaag	2700
tagaattcta	cccgtaaagc	gagtttagtt	ttgaaaaaca	aatgacatca	tttgtataat	2760
gacatcatcc	cctgattgtg	ttttacaagt	agaattctat	ccgtaaagcg	agttcagttt	2820
tgaaaacaaa	tgagtcatac	ctaaacacgt	taataatctt	ctgatatcag	cttatgactc	2880
aagttatgag	ccgtgtgcaa	aacatgagat	aagtttatga	catcatccac	tgatcgtgcg	2940
ttacaagtag	aattctactc	gtaaagccag	ttcggttatg	agccgtgtgc	aaaacatgac	3000
atcagcttat	gactcatact	tgatttgtgt	ttacgcgtag	aattctactc	gtaaagcgag	3060
ttcggttatg	agccgtgtgc	aaaacatgac	atcagcttat	gagtcataat	taatcgtgcg	3120
ttacaagtag	aattctactc	gtaaagcgag	ttgaaggatc	atatttagtt	gcgtttatga	3180
gataagattg	aaagcacgtg	taaaatgttt	cccgcgcggt	ggcacaacta	tttacaatgc	3240
ggccaagtta	taaaagattc	taatctgata	tgttttaaaa	cacctttgcg	gcccagagttg	3300
tttgcgtagc	tgactagcga	agaagatgtg	tggaccgcag	aacagatagt	aaaacaaaac	3360
cctagtattg	gagcaataat	cgatgagctc	gtcgacgtag	gcctttgaat	tccgcgcgct	3420
toggaccggg	atcggtagca	aattccggtt	tgcgacgatg	cagagttttt	gaacaggctg	3480
ctcaaacaca	tagatccgta	cccgctcagt	cggatgtatt	acaatgcagc	caataccatg	3540
ttttacacga	ctatggaaaa	ctatgccgtg	tccaattgca	agttcaacat	tgaggattac	3600

	aataacatat ttaaggtgat ggaaaatatt aggaaacaca gcaacaaaaa ttcaaacgac	3660
	caagacgagt taaacatat tttgggagtt cagtcgtcga atgcaaagcg taaaaaatat	3720
	taataaggta aaaattacag ctacataaat tacacaatth aaactgcagt ctggagatac	3780
	ggacctttta ttcaacccaa cacaatatat tatagttaaa taagaattat tatcaaatac	3840
	tttgtatatatt aattaaaata ctatactgta aattacatth tattttacaat cactcgac	3898
	<210> 21	
	<211> 881	
5	<212> ADN	
	<213> Virus de la polihedrosis nuclear de <i>Autographa californica</i>	
	<400> 21	
	atcgatggtt accccaacaa aagatttata attaatcata atcacgaaca acaacaagtc	60
	aatgaaacaa ataaacaagt tgtcgataaa acattcataa atgacacagc aacatacaat	120
	tcttgcataa taaaaattta aatgacatca tatttgagaa taacaaatga cattatccct	180
	cgattgtggt ttacaagtag aattctaccc gttaaagcgag tttagttttg aaaaacaaat	240
	gacatcatth gtataatgac atcatcccct gattgtgtth tacaagtaga attctatccg	300
	taaagcgagt tcagttttga aaacaaatga gtcataccta aacacgttaa taatcttctg	360
	atatcagctt atgactcaag ttatgagccg tgtgcaaac atgagataag tttatgacat	420
	catccactga tcgtgcgta caagtagaat tctactcgta aagccagttc ggttatgagc	480
	cgtgtgcaaa acatgacatc agcttatgac tcatacttga ttgtgtttta cgcgtagaat	540
	tctactcgta aagcgagttc ggttatgagc cgtgtgcaaa acatgacatc agcttatgag	600
	tcataattaa tcgtgcgta caagtagaat tctactcgta aagcgagttg aaggatcata	660
	tttagttgag tttatgagat aagattgaaa gcacgtgtaa aatgtttccc gcgcgttggc	720
	acaactatth acaatgcggc caagttataa aagattctaa tctgatatgt tttaaaacac	780
	ctttgcggcc cgagttgtth gcgtacgtga ctagcgaaga agatgtgtgg accgcagaac	840
10	agatagtaaa acaaaaccct agtattggag caataatcga t	881
	<210> 22	
	<211> 2124	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Constructo de ADN recombinante que fusiona el ADNc de Ac-ie-01 con el promotor polh	
	<400> 22	
	atcatggaga taattaaaat gataaccatc tcgcaaataa ataagtatth tactgttttc	60
	gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca	120
20	tcgggagcgg atcccgtcc gaagcgcgcg gaattcaaag gcctacgtcg acgagctcac	180

tagtcgcggc	cgctttcgaa	tctagataga	tctatgatcc	gtacatccag	ccacgtcctg	240
aacgtccaag	aaaacatcat	gacttccaac	tgtgcttcca	gcccctactc	ctgtgaggcc	300
acttcagcct	gcgctgaggc	ccagcaactg	caggtggaca	caggtggcga	taagatcgtg	360
aacaaccagg	tcaccatgac	tcaaataaac	ttcaacgctt	cctacacctc	tgccagcact	420
ccctctcgtg	ctagcttcga	caactcatac	tgggagttct	gcgacaagca	acctaacgat	480
tacttgtctt	actacaacca	cccaaccccg	gacggagctg	atactgtcat	ctccgactct	540
gaaaccgctg	ccgctagcaa	cttcctcgcc	tcagttaaact	cgctcactga	caacgatttg	600
gtggagtgtc	tgctcaagac	cactgacaac	ctggagggaag	ctgtgtcctc	tgccactact	660
agcgagtca	tcgaacagcc	agtggtcgaa	caaccctctc	ctagctcagc	ttaccacgcc	720
gagtccttcg	aacactctgc	tgggtgtcaac	cagccgtcgg	ccacaggcac	caagaggaag	780
ttggacgagt	acctggataa	ctcccaggga	gttgtgggtc	aattcaacaa	gatcaagttg	840
agacctagt	acaagaagag	caccatccag	tcatgcgcta	cactggaaca	aaccatcaac	900
cacaacacta	acatctgtac	agtggcttcc	accaggaga	tcactcacta	cttcacaaac	960
gacttcgccc	cctacctgat	gaggttcgac	gataacgact	acaactcgaa	cagattctcc	1020
gatcacatgt	ctgaaaccgg	ttactacatg	ttcgtcgtta	agaagtccga	ggtgaagcct	1080
ttcgaaatca	tcttcgccaa	gtacgtctct	aacgtggtct	acgagtacac	aaacaactac	1140
tacatggttg	acaaccgtgt	gttcgtttgt	accttcgata	agatccgctt	catgatcagc	1200
tacaacctgg	ttaaggagac	tggcatcgaa	atcccacact	cacaggacgt	ctgcaacgat	1260
gagaccgccc	ctcaaaaactg	caagaagtgt	cacttcgtgg	acgtccacca	cacattcaag	1320
gocgctctga	cctcctactt	caacctcgat	atgtactacg	ctcagacaac	cttcgtgacc	1380
ttgctgcaat	cactcggcga	gcgtaagtgt	ggattcctct	tgtcgaagtt	gtacgagatg	1440
taccaggaca	agaacctctt	cactttgccc	atcatgctga	gccgcaagga	atcaaacgag	1500
atcgaaaccg	cctctaacaa	cttcttcgtc	tcgccatacg	tttcccagat	cctcaagtac	1560
tcggagtccg	tccaattccc	ggacaaccct	cccaacaagt	acgtcgttga	taacctgaac	1620
ctcatcgtga	acaagaagag	cactctgaca	tacaagtact	cgtccgtcgc	taacctgctc	1680
ttcaacaact	acaagtacca	cgacaacatc	gcttctaaca	acaacgccga	gaacctcaag	1740
aagggtcaaga	aggaagacgg	aagcatgcac	atcgttgagc	agtacttgac	tcaaaacgtc	1800
gataacgtta	aggggtcaca	cttcacgtg	ttgtccttca	agaacgagga	aagggtgacc	1860
atcgctaaga	agaacaagga	gttctactgg	atctctggcg	aatcaagga	cgttgatgtg	1920
agccaggtca	tccaaaagta	caacagattc	aagcaccaca	tgttcgtgat	cggcaaggtc	1980
aacgctcgcg	agtcaactac	actgcacaac	aacttgctga	agctcttggc	cttgatcctg	2040

	caggggactgg tgccactctc cgacgccatc acattcgccg agcaaaagct caactgcaag	2100
	tacaagaagt tcgagttcaa ctaa	2124
5	<210> 23 <211> 911 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Constructo de ADN recombinante que fusiona el ADNc de GFP cDNA con el promotor polh	
	<400> 23 atcatggaga taattaaaaat gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc	60
	gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca	120
	tcgggcgcgg atccaaggcc actagtgcgg ccgctctgca gtctcgagca tgcggtacca	180
	agcttgaatt catggtgagc aagggcgagg agctgttcac cggggtggtg cccatcctgg	240
	tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt gtccggcgag ggcgagggcg	300
	atgccaccta cggcaagctg accctgaagt tcattctgcac caccggcaag ctgcccgtgc	360
	cctggcccac cctcgtgacc accctgacct acggcgtgca gtgcttcagc cgctaccccg	420
	accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccatgcc cgaaggctac gtccaggagc	480
	gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagacccg cgccgaggtg aagttcgagg	540
	gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga cttcaaggag gacggcaaca	600
	tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa cgtctatatc atggccgaca	660
	agcagaagaa cggcatcatg gtgaacttca agatccgcca caacatcgag gacggcagcg	720
	tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgg cgacggcccc gtgctgctgc	780
	ccgacaacca ctacctgagc acccagtcgg ccctgagcaa agaccccaac gagaagcgcg	840
	atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgccgggat cactctcggc atggacgagc	900
	tgtacaagta a	911
15	<210> 24 <211> 1502 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> hr1pB2(9)p10	
	<400> 24 atcgatgttg accccaacaa aagatttata attaatcata atcacgaaca acaacaagtc	60
	aatgaaacaa ataaacaagt tgtcgataaa acattcataa atgacacagc aacatacaat	120
	tcttgcataa taaaaattta aatgacatca tatttgagaa taacaaatga cattatccct	180

cgattgtggtt ttacaagtag aattctaccc gtaaagcgag tttagttttg aaaaacaaat	240
gacatcattt gtataatgac atcatcccct gattgtgttt tacaagtaga attctatccg	300
taaagcgagt tcagttttga aaacaaatga gtcataccta aacacgttaa taatcttctg	360
atatcagctt atgactcaag ttatgagccg tgtgcaaaac atgagataag tttatgacat	420
catccactga tcgtgcggtt caagtagaat tctactcgta aagccagttc gggtatgagc	480
cgtgtgcaaa acatgacatc agcttatgac tcatacttga ttgtgtttta cgcgtagaat	540
tctactcgta aagcgagttc gggtatgagc cgtgtgcaaa acatgacatc agcttatgag	600
tcataattaa tcgtgcggtt caagtagaat tctactcgta aagcgagttg aaggatcata	660
tttagttgcg tttatgagat aagattgaaa gcacgtgtaa aatgtttccc gcgcgttggc	720
acaactattht acaatgcggc caagttataa aagattctaa tctgatattgt tttaaaacac	780
ctttgcggcc cgagttgttt gcgtacgtga ctagcgaaga agatgtgtgg accgcagaac	840
agatagtaaa acaaaaccct agtattggag caataatcga tgagctcgtc gacgtaggcc	900
tttgaattcc gcgcgcttcg gaccgggac caaaaacatc gattaggggtg actgaagggt	960
acattgggggt aggttatggt taatacgtaa tgggttaaca ccaaaacgat atcatggatt	1020
ttatataagg tgtaataata tttttaatga gtggacgcgt cgggtcaatg tcctgcctat	1080
tgacgtcata acatattagg tgattatatt aaaaatagtt taaactcaaa tattacttgc	1140
aagtttaagt ttcatacataa tctgatcata agtttcaccc aaacagaaac caaaagcata	1200
actatcgaat atcttttagct tcccatgaag aaagattacc gtaaccatca ctaggatttt	1260
atacgattgt agaaaataaa gtattctcag tctcttttca gagcgctata aaaaggggtg	1320
cattctcggt aagagtacag ttgaactcac atcgagttaa ctccacgctg cagtctcgag	1380
atacggacct ttaattcaac ccaacacaat atattatagt taaataagaa ttattatcaa	1440
atcatttgta tattaattaa aatactatac tgtaaattac attttattta caatcactcg	1500
ac	1502

<210> 25

<211> 702

<212> ADN

<213> Circovirus porcino tipo 2

<400> 25

atgacgtatc caaggaggcg tttccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc	60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg	120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctacc	180
acagtcacaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatatata cgactttggt	240
cccccgggag gggggaccaa caaatctct ataccctttg aatactacag aataagaaag	300

gttaagggttg aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgacccc 420
 tatgtaaact actcctcccg ccatacaatc cccaaccct tctcctacca ctcccgttac 480
 ttcacaccca aacctgtact ggatagaact attgattact tccagccaaa caacaaaaaa 540
 aatcagcttt ggctgaggct acaaacctct gcaaagttag accacgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtaaata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccct aa 702

<210> 26

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirus porcino tipo 2

<400> 26

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Phe Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
 50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Val
 65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Arg Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro

ES 2 763 001 T3

165

170

175

Asn Asn Lys Lys Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Ala Asn
180 185 190

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp
195 200 205

Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
225 230

<210> 27

<211> 4550

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polhAc-ie-01/hrp6.9p10Cap-p10

<400> 27

ttagttgaac tcgaacttct tgtacttgca gttgagcttt tgctcggcga atgtgatggc	60
gtcggagaggt ggcaccagtc cctgcaggat caaggccaag agcttcagca agttgttgtg	120
cagtgtagtt gactcgcgac ggttgacctt gccgatcacg aacatgtggt gcttgaatct	180
gttgactttt tggatgacct ggctcacatc aacgtccttg atttcgccag agatccagta	240
gaactccttg ttcttcttag cgatggtcag cctttcctcg ttcttgaagg acaacacgat	300
gaagtttgtga cccttaacgt tatcgacgtt ttgagtcaag tactgctcaa cgatgtgcat	360
gcttccgtct tccttcttga ccttcttgag gttctcggcg ttgttggttag aagcgatgtt	420
gtcgtggttac ttgtagttgt tgaagagcag gtttagcgacg gacgagtact tgtatgtcag	480
agtgtctctt ttgttcacga tgagggttcag gttatcaacg acgtacttgt tgggaggggtt	540
gtccgggaat tggacggact ccgagtactt gaggatctgg gaaacgtatg gcgagacgaa	600
gaagttgtta gaggcgggtt cgatctcggt tgattccttg cggctcagca tgatgggcaa	660
agtgaagagg ttcttgtcct ggtacatctc gtacaacttc gacaagagga atccacactt	720
acgctcgccg agtgattgca gcaaggcac gaaggttgtc tgagcgtagt acatatacag	780
gttgaagtag gaggtcagag cggccttgaa tgtgtggtgg acgtccacga agtgacactt	840
cttgcagttt tgagcggcgg tctcatcggt gcagacgtcc tgtgagtgtg ggatttcgat	900
gccagtctcc ttaaccaggt ttagctgat catgaagcgg atcttatcga aggtcacaac	960
gaacacacgg ttgtcaacca ttagtagtt gtttgtgtac tcgtagacca cgtagagac	1020
gtacttggcg aagatgattt cgaaaggctt cacctcggac ttcttaacga cgaacatgta	1080

gtaaccgggtt tcagacatgt gatcggagaa tctgttcgag ttgtagtcgt tatcgtcgaa	1140
cctcatcagg tagggggcga agtcgtttgt gaagtagtga gtgatctcct gggtggaagc	1200
cactgtacag atgttagtgt tgtggttgat ggtttgttcc agtgtagcgc atgactggat	1260
gggtgctcttc ttgtacttag gtctcaactt gatcttgttg aattgacca caactccctg	1320
ggagttaatcc aggtactcgt ccaacttcct cttggtgcct gtggccgacg gctggttgac	1380
accagcagag tgttcgaagg actcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac	1440
cactggctgt tcgagtgact cgctgtagta ggcagaggac acagcttcct ccaggttgtc	1500
agtggctcttg agcagacact ccaccaaate gttgtcagtg agcaggttaa ctgaggcgag	1560
gaagttgcta gcggcagcgg tttcagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccgggggt	1620
tgggtgggtt tagtaagaca agtaatcgtt aggttgcttg tcgcagaact ccgagtatga	1680
gttgtcgaag ctagcacgag agggagtgct ggcagagggt taggaagcgt tgaagttgat	1740
ttgagtcatg gtgacctggt tgttcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg	1800
ctgggcctca gcgcaggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga	1860
agtcatgatg ttttcttgga cgttcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatc	1920
tagattcgaa agcggccgcg actagtgagc tcgtcgacgt aggcctttga attccgcgcg	1980
cttcggaccg ggatccgcgc ccgatggtgg gacggtatga ataatccgga atatttatag	2040
gtttttttat taaaaaactg ttacgaaaac agtaaaatac ttattttattt gcgagatggt	2100
tatcatttta attatctcca tgatctatta atattccgga gtatacctac ccgtaaagcg	2160
agtttagttt tgaaaaacaa atgacatcat ttgtataatg acatcatccc ctgatttgtgt	2220
tttacaagta gaattctatc cgtaaagcga gttcagtttt gaaaacaaat gagtcatacc	2280
taaacacggt aataatcttc tgatatcagc ttatgactca agttatgagc cgtgtgcaaa	2340
acatgagata agtttatgac atcatccact gatcgtgcgt tacaagtaga attctactcg	2400
taaagccagt tcggttatga gccgtgtgca aaacatgaca tcagcttatg actcatactt	2460
gatttgtgtt tacgcgtaga attctactcg taaagcgagt tcggttatga gccgtgtgca	2520
aaacatgaca tcagcttatg agtcataatt aatcgtgcgt tacaagtaga attctactcg	2580
taaagcgagt tgaaggatca tatttagttg cgtttatgag ataagattga aagcacgtgt	2640
aaaatgtttc cgagctcgtc gacgtaggcc tttgaattcc gcgcgcttcg gaccgggac	2700
ggtaccaaatt tccgttttgc gacgatgcag agtttttgaa caggctgctc aaacacatag	2760
atccgtaccc gctcagtcgg atgtattaca atgcagccaa taccatgttt tacacgacta	2820
tggaaaacta tgccgtgtcc aattgcaagt tcaacattga ggattacaat aacatattta	2880
aggtgatgga aaatattagg aaacacagca acaaaaattc aaacgaccaa gacgagttaa	2940

ES 2 763 001 T3

acatatatattt gggagttcag tcgtcgaatg caaagcgtaa aaaatattaa taaggtaaaa 3000
 attacagcta cataaattac acaatttaaa ctgcagtcctg gagatacggga cctttaattc 3060
 aacccaacac aatatattat agttaataa gaattattat caaatcattt gtatattaat 3120
 taaaatacta tactgtaaat tacattttat ttacaatcac tcgacctcga gatgacgtat 3180
 ccaaggaggc gtttccgcag acgaagacac cgcccccgca gccatcttgg ccagatcctc 3240
 cgccgcgcgc cctggctcgt ccacccccgc caccgttacc gctggagaag gaaaaatggc 3300
 atcttcaaca cccgcctctc ccgcaccttc ggatatactg tcaaggctac cacagtcaca 3360
 acgcccctcct gggcggtgga catgatgaga tttaatatta acgactttgt tccccggga 3420
 ggggggacca acaaaatctc tatacccttt gaatactaca gaataagaaa ggttaagggtt 3480
 gaattctggc cctgctcccc aatcacccag ggtgacaggg gagtgggctc cactgctggt 3540
 attctagatg ataactttgt aacaaaggcc acagccctaa cctatgacct ctatgtaaac 3600
 tactcctccc gccatacaat cccccaacct ttctcctacc actcccgta cttcacacct 3660
 aaacctgtac tggatagaac tattgattac ttccagccaa acaacaaaaa aaatcagctt 3720
 tggttgaggc tacaaacctc tgcaaagtga gaccacgtag gcctcggcac tgcgttcgaa 3780
 aacagtaaat acgaccagga ctacaatatc cgtgtaacca tgtatgtaca attcagagaa 3840
 tttaatctta aagaccccc acttaaacct taaccatgga agcttatgaa tcgtttttta 3900
 aataacaaat caattgtttt ataatttcg tacgattctt tgattatgta ataaaatgtg 3960
 atcattagga agattacgaa aaatataaaa aatatgagtt ctgtgtgtat aacaaatgct 4020
 gttaaaccgca caattgtggt tgttgcaaat aaacccatga ttatttgatt aaaattgttg 4080
 ttttctttgt tcatagacaa tagtgtgttt tgcctaaacg tgtactgcat aaactccatg 4140
 cgagtgtata gcgagctagt ggctaacgct tgccccacca aagtagattc gtcaaaatcc 4200
 tcaatttcat caccctcctc caagttaaac atttggccgt cggaattaac ttctaaagat 4260
 gccacataat ctaataaatg aaatagagat tcaaacgtgg cgtcatcgtc cgtttcgacc 4320
 atttccgaaa agaactcggg cataaactct atgatttctc tggacgtggt gttgtcgaaa 4380
 ctctcaaagt acgcagtcag gaacgtgcgc gacatgtcgt cgggaaactc gcgcggaaac 4440
 atgttggtgt aaccgaacgg gtcccatagc gccaaaacca aatctgccag cgtcaataga 4500
 atgagcacga tgccgacaat ggagctggct tggatagcga ttcgagttaa 4550

<210> 28
 <211> 836
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polhCap

ES 2 763 001 T3

<400> 28
 atcatggaga taattaaaaat gataaccatc tgcgaaataa ataagtatct tactgttttc 60
 gtaacagttt tgtaataaaa aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca 120
 tcgggagcgg atccatgacg tatccaagga ggcgtttccg cagacgaaga caccgcccc 180
 gcagccatct tggccagatc ctccgcccgc gccctggct cgtccacccc cgccaccgtt 240
 accgctggag aaggaaaaat ggcatcttca acaccgcct ctccgcacc ttccgatata 300
 ctgtcaaggc taccacagtc acaacgcct cctgggagggt ggacatgatg agatttaata 360
 ttaacgactt tggtcccccg ggagggggga ccaacaaaat ctctataccc ttggaatact 420
 acagaataag aaagggttaag gttgaattct ggccctgctc cccaatcacc cagggtgaca 480
 ggggagtggt ctccactgct gttattctag atgataactt tgtaacaaag gccacagccc 540
 taacctatga cccctatgta aactactcct cccgccatac aatcccccaa cccttctcct 600
 accactcccg ttacttcaca cccaaacctg tactggatag aactattgat tacttccagc 660
 caaacaacaa aaaaaatcag ctttggtgta ggctacaaac ctctgcaaata gtagaccacg 720
 taggcctcgg cactgcgttc gaaaacagta aatacgacca ggactacaat atccgtgtaa 780
 ccatgtatgt acaattcaga gaatttaatc ttaaagaccc cccacttaaa ccctaa 836

<210> 29
 <211> 3873
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polhAc-ie-01/hr1p6.9p10Cap

<400> 29
 ttagttgaac tcgaacttct tgtacttgca gttgagcttt tgctcggcga atgtgatggc 60
 gtcggagagt ggcaccagtc cctgcaggat caaggccaag agcttcagca agttgttgtg 120
 cagtgtagtt gactcgcgac ggttgacctt gccgatcagc aacatgtggt gcttgaatct 180
 gttgtacttt tggatgacct ggctcacatc aacgtccttg atttcgccag agatccagta 240
 gaactccttg ttcttcttag cgatggctcag cctttcctcg ttcttgaagg acaacacgat 300
 gaagttgtga cccttaacgt tatcgacgtt ttgagtcaag tactgctcaa cgatgtgcat 360
 gcttccgtct tccttcttga ccttcttgag gttctcggcg ttgttggttag aagcgatgtt 420
 gtcgtggtac ttgtagttgt tgaagagcag gttagcgacg gacgagtact tgtatgtcag 480
 agtgctcttc ttgttcacga tgagggtcag gttatcaacg acgtacttgt tgggaggggtt 540
 gtccgggaat tggacggact ccgagtactt gaggatctgg gaaacgtatg gcgagacgaa 600
 gaagttgtta gaggcgggtt cgatctcgtt tgattccttg cggctcagca tgatgggcaa 660
 agtgaagagg ttcttgtcct ggtacatctc gtacaacttc gacaagagga atccacactt 720

acgctcgccg agtgattgca gcaagggtcac gaagggtgtc tgagcgtagt acatatcgag	780
gttgaagtag gaggtcagag cggccttgaa tgtgtggtgg acgtccacga agtgacacct	840
cttgcagttt tgagcggcgg tctcatcggt gcagacgtcc tgtgagtgtg ggatttcgat	900
gccagtctcc ttaaccaggt tgtagctgat catgaagcgg atcttatcga aggtcacaac	960
gaacacacgg ttgtcaacca tgtagtagtt gtttgtgtac tcgtagacca cgtagagac	1020
gtacttggcg aagatgattt cgaaaggctt cacctcggac ttcttaacga cgaacatgta	1080
gtaaccgggt tcagacatgt gatcggagaa tctgttcgag ttgtagtcgt tategtcgaa	1140
cctcatcagg tagggggcga agtcgtttgt gaagtagtga gtgatctcct gggtggaagc	1200
cactgtacag atgttagtgt tgtggttgat ggtttgttcc agtgtagcgc atgactggat	1260
ggtgctcttc ttgtacttag gtctcaactt gatcttggtg aattgaccca caactccctg	1320
ggagttatcc aggtactcgt ccaacttcct cttggtgcct gtggccgacg gctggttgac	1380
accagcagag tgttcgaagg actcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac	1440
cactggctgt tcgagtgact cgctgtagta ggcagaggac acagcttcct ccaggttgtc	1500
agtggctctt agcagacact ccaccaaatac gttgtcagtg agcgagttaa ctgaggcgag	1560
gaagttgcta gcggcagcgg tttcagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccggggg	1620
tgggtggttg tagtaagaca agtaatcggt aggttgcttg tcgcagaact ccgagtatga	1680
gttgtcgaag ctagcacgag agggagtgtt ggcagagggt taggaagcgt tgaagttgat	1740
ttgagtcatg gtgacctggt tggtcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg	1800
ctgggcctca gcgcaggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga	1860
agtcatgatg ttttcttga cgttcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatc	1920
tagattcgaa agcggccgcg actagtgagc tcgtcgacgt aggcctttga attccgcgcg	1980
cttcggaccg ggatccgcgc ccgatgggtg gacggatga ataaccgga atatttatag	2040
gtttttttat taaaaactg ttacgaaaac agtaaaatac ttatttatat gcgagatggt	2100
tatcatttta attatctcca tgatctatta atattccgga gtatacctac ccgtaaagcg	2160
agtttagttt tgaaaaacaa atgacatcat ttgtataatg acatcatccc ctgatttgtt	2220
tttacaagta gaattctatc cgtaaagcga gttcagtttt gaaaacaaat gagtcatacc	2280
taaacacggt aataatcttc tgatatcagc ttatgactca agttatgagc cgtgtgcaaa	2340
acatgagata agtttatgac atcatccact gatcgtgctg tacaagtaga attctactcg	2400
taaagccagt tcggttatga gccgtgtgca aaacatgaca tcagcttatg actcatactt	2460
gattgtgttt tacgcgtaga attctactcg taaagcgagt tcggttatga gccgtgtgca	2520
aaacatgaca tcagcttatg agtcataatt aatcgtgctg tacaagtaga attctactcg	2580
taaagcgagt tgaaggatca tatttagttg cgtttatgag ataagattga aagcacgtgt	2640

ES 2 763 001 T3

aaaatgtttc cgagctcgtc gacgtaggcc tttgaattcc gcgcgcttcg gaccgggatac	2700
ggtaccaaata tccgttttgc gacgatgcag agttttttgaa caggctgctc aaacacatag	2760
atccgtaccc gctcagtcgg atgtattaca atgcagccaa taccatgttt tacacgacta	2820
tggaaaaacta tgccgtgtcc aattgcaagt tcaacattga ggattacaat aacatattta	2880
aggtgatgga aaatattagc aaacacagca acaaaaattc aaacgaccaa gacgagttaa	2940
acatatattt gggagttcag tcgtcgaatg caaagcgtaa aaaatattaa taaggtaaaa	3000
attacagcta cataaattac acaatttaaa ctgcagtcctg gagatacggg cctttaattc	3060
aaccaaacac aatatattat agttaataa gaattattat caaatcattt gtatattaat	3120
taaaatacta tactgtaaat tacattttat ttacaatcac tcgacctcga gatgacgtat	3180
ccaaggaggc gtttccgcag acgaagacac cgcccccgca gccatcttgg ccagatcctc	3240
cgccgcccgc cctggctcgt ccacccccgc caccgttacc gctggagaag gaaaaatggc	3300
atcttcaaca cccgcctctc ccgcaccttc ggatatactg tcaaggctac cacagtcaca	3360
acgccctcct gggcggtgga catgatgaga tttaatatta acgactttgt tccccggga	3420
gggggggacca acaaaatctc tatacccttt gaatactaca gaataagaaa ggttaagggt	3480
gaattctggc cctgctcccc aatcacccag ggtgacaggg gagtgggctc cactgctgtt	3540
attctagatg ataactttgt aacaaaggcc acagccctaa cctatgaccc ctatgtaaac	3600
tactcctccc gccatacaat cccccaaccc ttctcctacc actcccgtta cttcacaccc	3660
aaacctgtac tggatagaac tattgattac ttccagccaa acaacaaaaa aaatcagctt	3720
tggctgaggc taaaacctc tgcaaatgta gaccacgtag gcctcggcac tgcgttcgaa	3780
aacagtaaat acgaccagga ctacaatatc cgtgtaacca tgtatgtaca attcagagaa	3840
tttaatctta aagaccccc acttaaaccc taa	3873

<210> 30

<211> 1632

<212> ADN

<213> Cepa PR8 del virus de la gripe

<400> 30

atgaaattct tagtcaacgt tgcccttgtt tttatggctg tatacatttc ttacatctat	60
gcggatcctg acacaatatg tataggctac catgcgaaca attcaaccga cactgttgac	120
acagtactcg agaagaatgt gacagtgaca cactctgtta acctgctcga agacagccac	180
aacggaaaac tatgtagatt aaaaggaata gcccactac aattggggaa atgtaacatc	240
gccggatggc tcttgggaaa ccagaatgc gaccactgc ttccagtgag atcatgggtcc	300
tacattgtag aaacacccaaa ctctgagaat ggaatatgtt atccaggaga tttcatcgac	360
tatgaggagc tgaggggagca attgagctca gtgtcatcat tcgaaagatt cgaaatattt	420

ES 2 763 001 T3

```

cccaaagaaa gctcatggcc caaccacaac acaaacggag taacggcagc atgctcccat      480
gaggggaaaa gcagttttta cagaaatttg ctatggctga cggagaagga gggctcatac      540
ccaaagctga aaaattctta tgtgaacaaa aaagggaag aagtccttgt actgtggggt      600
attcatcacc cgcctaacag taaggaacaa cagaatctct atcagaatga aaatgcttat      660
gtctctgtag tgacttcaaa ttataacagg agatttacc cggaaatagc agaaagaccc      720
aaagtaagag atcaagctgg gaggatgaac tattactgga ccttgctaaa acccggagac      780
acaataatat ttgaggcaaa tggaaatcta atagcaccaa tgtatgcttt cgactgagt      840
agaggctttg ggtccggcat catcacctca aacgcatcaa tgcatgagt taacacgaag      900
tgtcaaacac ccctgggagc tataaacagc agtctccctt accagaatat acaccagtc      960
acaataggag agtgcccaaa atacgtcagg agtgccaaat tgaggatggg tacaggacta     1020
aggaacactc cgtccattca atccagaggt ctatttgagg ccattgccgg ttttattgaa     1080
gggggatgga ctggaatgat agatggatgg tatggttata atcatcagaa tgaacaggga     1140
tcaggctatg cagcggatca aaaaagcaca caaatgcc aataacgggat tacaacaag      1200
gtgaacactg ttatcgagaa aatgaacatt caattcacag ctgtgggtaa agaattcaac      1260
aaattagaaa aaaggatgga aaatttaaat aaaaagttg atgatggatt tctggacatt      1320
tggaacatata atgcagaatt gtagtttcta ctggaaaatg aaaggactct ggatttccat      1380
gactcaaatg tgaagaatct gtatgagaaa gtaaaaagcc aattaaagaa taatgcaaaa      1440
gaaatcggaa atggatgttt tgagttctac cacaagtgtg acaatgaatg catggaaagt      1500
gtaagaaatg ggacttatga ttatcccaaa tattcagaag agtcaaagtt gaacagggaa      1560
aaggtagatg gagtgaaatt ggaatcaatg gggatctatc agatttctag acatcaccac      1620
caccatcact aa                                                                1632

```

<210> 31
 <211> 10273
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polhAc-ie-01/hr1p6.9p10MelHA

```

<400> 31
ttctctgtca cagaatgaaa atttttctgt catctcttcg ttattaatgt ttgtaattga      60
ctgaatatca acgcttattt gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc      120
attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt      180
agcgcgccgt cctttcgttt tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccg      240
tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctoga      300

```

ccccaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt	360
ttttcgccct ttgacgttgg agtccacggt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg	420
aacaacactc aaccctatct cgggtctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc	480
ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat	540
attaacgttt acaatttcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg	600
tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat	660
gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat	720
tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt	780
aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag	840
cggtaagatc cttgagagtt ttgcgccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa	900
agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg	960
ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct	1020
tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac	1080
tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca	1140
caacatgggg gatcatgtaa ctgcgcttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat	1200
accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact	1260
attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc	1320
ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggg ttattgtctga	1380
taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggatcatt gcagcactgg ggccagatgg	1440
taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg	1500
aaatagacag atcgttgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca	1560
agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta	1620
ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca	1680
ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg	1740
cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtgggtt gtttgccgga	1800
tcaagagcta ccaactcttt ttccgaagg aactggcttc agcagagcgc agataccaaa	1860
tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc	1920
tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg	1980
tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac	2040
gggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct	2100
acagcgtgag cattgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc	2160
ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgaggag cttccagggg gaaacgcctg	2220

gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg	2280
ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct	2340
ggccttttgc tggccttttg ctacatgtt ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga	2400
taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg	2460
cagcgagtca gtgagcgagg aagcgggaaga gcgcctgatg cggatattttc tccttacgca	2520
tctgtgcggt atttcacacc gcagaccagc cgcgtaacct ggcaaaatcg gttacggttg	2580
agtaataaat ggatgccctg cgtaagcggg tgtgggcgga caataaagtc ttaaaactgaa	2640
caaaatagat ctaaaactatg acaataaagt cttaaaactag acagaatagt tgtaaaactga	2700
aatcagttca gttatgctgt gaaaaagcat actggacttt tgttatggct aaagcaaaact	2760
cttcattttc tgaagtgcaa attgcccgtc gtattaaaga ggggcgtggc caagggcatg	2820
gtaaagacta tattcgcggc gttgtgacaa tttaccgaac aactccgcgg ccgggaagcc	2880
gatctcggtc tgaacgaatt gttagggtggc ggtacttggg tcgatatcaa agtgcacac	2940
ttcttcccgt atgcccact ttgtatagag agccactgcg ggatcgtcac cgtaatctgc	3000
ttgcacgtag atcacataag caccaagcgc gttggcctca tgcttgagga gattgatgag	3060
cgcggtggca atgccctgcc tccggtgctc gccggagact gcgagatcat agatatagat	3120
ctcactacgc ggctgctcaa acctgggcag aacgtaagcc gcgagagcgc caacaaccgc	3180
ttcttggtcg aaggcagcaa gcgcgatgaa tgtcttacta cggagcaagt tcccgaggta	3240
atcggagtcc ggctgatgtt gggagtaggt ggctacgtct ccgaactcac gaccgaaaag	3300
atcaagagca gcccgcatgg atttgacttg gtcagggccg agcctacatg tgcgaaatgat	3360
gcccatactt gagccacctt actttgtttt agggcgactg ccctgctgcg taacatcggt	3420
gctgctgctg aacatcgttg ctgctccata acatcaaaca tcgaccacg gcgtaacgcg	3480
cttgctgctt ggatgcccgga ggcatagact gtacaaaaaa acagtcataa caagccatga	3540
aaaccgccac tgcgcggtta ccaccgctgc gttcgggtcaa ggttctggac cagttgctg	3600
agcgcatacg ctacttgcat tacagtttac gaaccgaaca ggcttatgtc aactgggttc	3660
gtgccttcat cgtttccac ggtgtgcgtc acccggcaac cttgggcagc agcgaagtcg	3720
aggcatctct gtcctggctg gcgaacgagc gcaaggtttc ggtctccacg catcgtcagg	3780
cattggcggc cttgctgttc ttctacggca aggtgctgtg cacggatctg ccctggcttc	3840
aggagatcgg tagacctcgg ccgtcgcggc gcttgccggt ggtgctgacc ccggatgaag	3900
tggttcgcat cctcggtttt ctggaaggcg agcatcgttt gttcgcccag gactctagct	3960
atagttctag tggttggcct acgtaccgct agtggctatg gcagggcttg ccgccccgac	4020
gttggctgcg agccctgggc cttcacccga acttgggggt tgggggtggg aaaaggaaga	4080

ES 2 763 001 T3

aacgcgggcg	tattggtccc	aatgggggtct	cggtggggta	tcgacagagt	gccagccctg	4140
ggaccgaacc	ccgcgtttat	gaacaaacga	cccaacaccc	gtgcgtttta	ttctgtcttt	4200
ttattgccgt	catagcgcg	gttccttccg	gtattgtctc	cttccgtgtt	tcagttagcc	4260
tccccatct	cccgttaccg	catgctatgc	atcagctggc	acgacagggt	tcccgactgg	4320
aaagcgggca	gtgagcgcaa	cgcaattaat	gtgagttagc	tcactcatta	ggcaccccag	4380
gctttacact	ttatgcttcc	ggctcgtatg	ttgtgtggaa	ttgtgagcgg	ataacaattt	4440
cacacaggaa	acagctatga	ccatgattac	gccaagcttg	catgcaggcc	tctgcagtcg	4500
acgggcccgg	gatccgatga	cccaatacta	gtttagttga	actcgaactt	cttgtacttg	4560
cagttgagct	tttgctcggc	gaatgtgatg	gcgtcggaga	gtggcaccag	tccctgcagg	4620
atcaaggcca	agagcttcag	caagttgttg	tgcagtgtag	ttgactcgcg	acggttgacc	4680
ttgccgatca	cgaacatgtg	gtgcttgaat	ctgttgtact	tttggatgac	ctggctcaca	4740
tcaacgtcct	tgatttcgcc	agagatccag	tagaactcct	tgttcttctt	agcgatggtc	4800
agcctttcct	cgttcttgaa	ggacaacacg	atgaagttgt	gacccttaac	gttatcgacg	4860
ttttgagtca	agtactgctc	aacgatgtgc	atgcttccgt	cttccttctt	gaccttcttg	4920
aggttctcgg	cgttgttgtt	agaagcgatg	ttgtcgtggg	acttgtagtt	gttgaagagc	4980
aggttagcga	cggacgagta	cttgatatgtc	agagtgtctc	tcttgttcac	gatgaggttc	5040
aggttatcaa	cgacgtactt	gttgggaggg	ttgtccggga	attggacgga	ctccgagtac	5100
ttgaggatct	gggaaacgta	tggcgagacg	aagaagttgt	tagaggcggg	ttcgatctcg	5160
tttgattcct	tgcggctcag	catgatgggc	aaagtgaaga	ggttcttgtc	ctggtacatc	5220
tcgtacaact	tcgacaagag	gaatccacac	ttacgctcgc	cgagtgattg	cagcaaggtc	5280
acgaagggtg	tctgagcgta	gtacatatcg	aggttgaagt	aggaggtcag	agcggccttg	5340
aatgtgtggg	ggacgtccac	gaagtgcac	ttcttgtagt	tttgagcggc	ggtctcatcg	5400
ttgcagacgt	cctgtgagt	tgggatttcg	atgccagtct	ccttaaccag	gttgtagctg	5460
atcatgaagc	ggatcttatc	gaaggtcaca	acgaacacac	ggttgtcaac	catgtagtag	5520
ttgtttgtgt	actcgtagac	cacgttagag	acgtacttgg	cgaagatgat	ttcgaaaggc	5580
ttcacctcgg	acttcttaac	gacgaacatg	tagtaaccgg	tttcagacat	gtgatcggag	5640
aatctgttcg	agttgtagtc	gttatcgtcg	aacctcatca	ggtagggggc	gaagtcgttt	5700
gtgaagtagt	gagtgatctc	ctgggtggaa	gccactgtac	agatgttagt	gttgtggttg	5760
atggtttgtt	ccagtgtagc	gcatgactgg	atggtgctct	tcttgacttt	aggtctcaac	5820
ttgatcttgt	tgaattgacc	cacaactccc	tgggagttat	ccaggtagct	gtccaacttc	5880
ctcttggtgc	ctgtggccga	cggtcggttg	acaccagcag	agtgttcgaa	ggactcggcg	5940
tggtaagctg	agctaggaga	gggttggttcg	accactggct	gttcgagtga	ctcgtgtag	6000

taggcagagg acacagcttc ctccagggttg tcagtggtct tgagcagaca ctccaccaa	6060
tcgttgtcag tgagcgaggtt aactgagggc aggaagttgc tagcggcagc ggtttcagag	6120
tcggagatga cagtatcagc tccgtccggg gttgggtggt tgtagtaaga caagtaatcg	6180
ttaggttgct tgtcgcagaa ctccgagtat gagttgtcga agctagcacg agagggagtg	6240
ctggcagagg tgtaggaagc gttgaagttg atttgagtca tgggtgacctg gttgttcacg	6300
atcttatcgc cacctgtgtc cacctgcagt tgctgggcct cagcgcaggc tgaagtggcc	6360
tcacaggagt aggggctgga agcacagttg gaagtcata tgttttcttg gacgttcagg	6420
acgtggctgg atgtacggat catagatcta tctagattcg aaagcggccg cgactagtga	6480
gctcgtcgac gtaggccttt gaattccgcg cgcttcggac cgggatccgc gcccgatggt	6540
gggacgggat gaataatccg gaatatattat aggttttttt attacaaaac tgttacgaaa	6600
acagtaaaat acttatattat ttgcgagatg gttatcattt taattatctc catgatctat	6660
taatattccg gagtatacct acccgtaaag cgagtttagt ttgaaaaac aaatgacatc	6720
atgtgtataa tgacatcatc cctgattgt gttttacaag tagaattcta tccgtaaagc	6780
gagttcagtt ttgaaaacaa atgagtcata cctaaacacg ttaataatct tctgatatca	6840
gcttatgact caagttatga gccgtgtgca aaacatgaga taagtttatg acatcatcca	6900
ctgatcgtgc gttacaagta gaattctact cgtaaagcca gttcggttat gagccgtgtg	6960
caaaacatga catcagctta tgactcatac ttgatttgtt ttacgcgta gaattctact	7020
cgtaaagcga gttcggttat gagccgtgtg caaaacatga catcagctta tgagtcataa	7080
ttaatcgtgc gttacaagta gaattctact cgtaaagcga gttgaaggat catatttagt	7140
tgcgtttatg agataagatt gaaagcacgt gtaaaatgtt tccgagctcg tcgacgtagg	7200
cctttgaatt ccgcgcgctt cggaccggga tcggtaccaa attccgtttt gcgacgatgc	7260
agagtttttg aacaggctgc tcaaacacat agatccgtac ccgctcagtc ggatgtatta	7320
caatgcagcc aataccatgt ttacacgac tatggaaaac tatgccgtgt ccaattgcaa	7380
gttcaacatt gaggattaca ataacatatt taaggatgat gaaaatatta ggaaacacag	7440
caacaaaaat tcaaacgacc aagacgagtt aaacatatat ttgggagttc agtcgtcgaa	7500
tgcaaagcgt aaaaaatatt aataaggtaa aaattacagc tacataaatt acacaattta	7560
aactgcagtc tggagatacg gacctttaat tcaacccaac acaatatatt atagttaaat	7620
aagaattatt atcaaatcat ttgtatatta attaaaatac tatactgtaa attacatttt	7680
atttacaatc actcgacctc gacatgaaat tcttagtcaa cgttgccctt gtttttatgg	7740
tcgtatacat ttcttacatc tatgcggatc ctgacacaat atgtataggc taccatgcga	7800
acaattcaac cgacactggt gacacagtac tcgagaagaa tgtgacagtg acacactctg	7860

ES 2 763 001 T3

ttaacctgct	cgaagacagc	cacaacggaa	aactatgtag	attaaaagga	atagccccac	7920
tacaattggg	gaaatgtaac	atcgccggat	ggctcttggg	aaaccacagaa	tgcgacccac	7980
tgcttccagt	gagatcatgg	tcctacattg	tagaaacacc	aaactctgag	aatggaatat	8040
gttatccagg	agatttcatc	gactatgagg	agctgaggga	gcaattgagc	tcagtgtcat	8100
cattcgaaag	attcgaaata	tttcccaaag	aaagctcatg	gccaaccac	aacacaaacg	8160
gagtaacggc	agcatgctcc	catgagggga	aaagcagttt	ttacagaaat	ttgctatggc	8220
tgacggagaa	ggagggctca	tacccaaagc	tgaaaaattc	ttatgtgaac	aaaaaaggga	8280
aagaagtcct	tgtactgtgg	ggtattcatc	acccgcctaa	cagtaaggaa	caacagaatc	8340
tctatcagaa	tgaaaatgct	tatgtctctg	tagtgacttc	aaattataac	aggagattta	8400
ccccggaaat	agcagaaaga	cccaaagtaa	gagatcaagc	tgggaggatg	aactattact	8460
ggaccttgct	aaaaccggga	gacacaataa	tatttgaggc	aatggaaat	ctaatagcac	8520
caatgtatgc	tttcgcactg	agtagaggct	ttgggtccgg	catcatcacc	tcaaacgcat	8580
caatgcatga	gtgtaacacg	aagtgtcaaa	caccctggg	agctataaac	agcagtctcc	8640
cttaccagaa	tatacaccca	gtcacaatag	gagagtgcc	aaaatacgtc	aggagtgcc	8700
aattgaggat	ggttacagga	ctaaggaaca	ctccgtccat	tcaatccaga	ggtctatttg	8760
gagccattgc	cggttttatt	gaagggggat	ggactggaat	gatagatgga	tggtatgggt	8820
atcatcatca	gaatgaacag	ggatcaggct	atgcagcgga	tcaaaaaagc	acacaaaatg	8880
ccattaacgg	gattacaaac	aaggtgaaca	ctgttatcga	gaaaatgaac	attcaattca	8940
cagctgtggg	taaagaattc	aacaaattag	aaaaaaggat	ggaaaattta	aataaaaaag	9000
ttgatgatgg	atttctggac	atttgacat	ataatgcaga	attgttagtt	ctactggaaa	9060
atgaaaggac	tctggatttc	catgactcaa	atgtgaagaa	tctgtatgag	aaagtaaaaa	9120
gccaattaaa	gaataatgcc	aaagaaatcg	gaaatggatg	ttttgagttc	taccacaagt	9180
gtgacaatga	atgcatggaa	agtgtgaagaa	atgggactta	tgattatccc	aaatattcag	9240
aagagtcaaa	gttgaacagg	gaaaaggtag	atggagtga	attggaatca	atggggatct	9300
atcagatttc	tagacatcac	caccaccatc	actaaccatg	gaagcttatg	aatcgttttt	9360
aaaataacaa	atcaattgtt	ttataatatt	cgtacgattc	tttgattatg	taataaaatg	9420
tgatcattag	gaagattacg	aaaaatataa	aaaatatgag	ttctgtgtgt	ataacaaatg	9480
ctgtaaacgc	cacaattgtg	tttggtgcaa	ataaaccat	gattatttga	ttaaaattgt	9540
tgttttcttt	gttcatagac	aatagtgtgt	tttgccataa	cgtgtactgc	ataaactcca	9600
tgcgagtgt	tagcgagcta	gtggctaacg	cttgccccac	caaagtagat	togtcaaaat	9660
cctcaatttc	atcacctcc	tccaagttta	acatttggcc	gtcggaaat	acttctaaag	9720
atgccacata	atctaataaa	tgaaatagag	attcaaacgt	ggcgtcatcg	tcogtttcga	9780

ccattttccga aaagaactcg ggcataaact ctatgatttc tctggacgtg gtgttgtcga	9840
aactctcaaa gtacgcagtc aggaacgtgc gcgacatgtc gtcgggaaac tcgcgcggaa	9900
acatgttggt gtaaccgaac gggccccata gcgccaaaac caaatctgcc agcgtcaata	9960
gaatgagcac gatgccgaca atggagctgg cttggatagc gattcgagtt aacctaggag	10020
atccgaacca gataagtga atctagttcc aaactatttt gtcattttta attttcgtat	10080
tagcttacga cgctacaccc agttcccatc tattttgtca ctcttccta aataatcctt	10140
aaaaactcca tttccacccc tcccagttcc caactatttt gtccgccac agcggggcat	10200
ttttcttcct gttatgtttt taatcaaaca tcctgccaac tccatgtgac aaaccgtcat	10260
cttcggctac ttt	10273

<210> 32

<211> 2074

<212> ADN

<213> Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo AST789

<400> 32

atggagggca aagcccgcac agcgccgcaa ggcgaagcag caggcactgc caccacagca	60
tcagtccctg gaaccacaac cgatggcatg gaccccgcg ttgtggccac taccagcgtg	120
gtcactgcag agaattcatc cgcacgatt gcaacggcag ggattggcgg accaccccaa	180
caggtggacc aacaagagac atggagaacg aacttttatt ataatgacgt tttcacttgg	240
tcagtgcggy atgccccctg cagcatactt tacaccgttc aacattctcc acagaacaac	300
ccattcacag ccgtgctgag ccagatgtat gctggctggg ctggtggcat gcagtttcgc	360
ttcatagttg ccggatcggg tgtgtttggt gggcggttg ttgcggccgt gataccaccg	420
ggcatcgaga ttggaccagg gctggaggtc aggcaattcc cccatgttgt catcgacgct	480
cgttcacttg aacctgtcac catcaccatg ccagacttgc gtcccaacat gtaccatcca	540
actggtgacc ctggccttgt tcccacacta gtccttagtg tttataacaa cctcatcaac	600
ccgtttggtg ggtccaccag cgcaatccag gtgacagtgg aaacaaggcc aagtgaagat	660
tttgagttcg tgatgattcg agccccctcc agcaagactg ttgactcaat ttcacccgca	720
ggcctcctca cgaccccagt cctcactggg gttggcaatg acaacaggtg gaatggccaa	780
atagtgggac tgcaaccagt acctggaggg ttctctacgt gcaacaggca ttggaacttg	840
aatggcagca catatggctg gtcaagcccc cggtttgccg acattgacca tcgaagaggc	900
agtgcaagtt accctggatc caacgcaacc aacgtgcttc agttttggta tgccaatgct	960
gggtctgcaa tcgacaatcc catctccag gttgcaccag acggctttcc tgatatgtcg	1020
ttcgtgccct ttaacggccc tggcattcca gccgcggggg gggcggatt tgggtgcaatc	1080
tggaacagta acagcgggtg ccccaacggt acgactgtgc aggcttatga gttagggtttt	1140

gccactggggg caccaggcaa cctccagccc accaccaaca cttcagggttc acagactgtc	1200
gccaagtcca tatatgccgt ggtaactggc acagcccaaa accccgccgg attgtttgtg	1260
atggcctcgg gtgttatctc caccccaagt gccaacgcca tcacatacac gccccaacca	1320
gacagaattg taaccacacc cggcactcct gccgctgcac ctgtgggtaa gaacacacccc	1380
atcatgttcg cgtctgtcgt caggcgcacc ggtgacgtca acgccacagc tgggtcagct	1440
aacgggaccc agtacggcac aggctctcaa ccactgccag taacaattgg actttcgctc	1500
aacaactact cgtcagcact tatgcccga cagtttttcg tttggcagtt aacctttgca	1560
tctggtttca tggagattgg tttaagtgtg gacgggtatt tttatgcagg aacaggagcc	1620
tcaaccacac tcattgactt gactgaactc attgacgtac gccctgtggg acccaggcca	1680
tccaagagca cactcgtgtt caacctgggg ggacagcca atggcttttc ttatgtctga	1740
attcatcgga ctgggacttg cagggtccag cgttttgagc aatgcattgc tccgcaggca	1800
agagctgcaa ctacaaagac aagctttgga gaatgggttg gttttgaaag ccgaccaatt	1860
aggtaggtta ggttttaatc caaatgaagt taagaatgtg attgtaggta atagttttag	1920
tagtaatgtt agattaagta atatgcataa tgatgctagt gtagttaatg cttataatgt	1980
gtataatcct gccagcaatg gcatcagaaa gaaaattaag agtttgaata atagtgttaa	2040
gatttataac accactgggg agtccagtgt ttaa	2074

<210> 33

<211> 1740

<212> ADN

<213> Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo N11

<400> 33

atggagggtta aagccagaac ggctcgcaa ggagaaaccg caggaacagc tacaaccgca	60
agcgtgccag gaacaacaac cgatggaatg gaccctgggtg tgggtggcaac cacttccgtt	120
gtgacaacgg agaacgcac tacctcaatc gccactgcag gaattgggtg ccctccccag	180
caagtggatc agcaagaaac atggaggacg aacttctact acaacgacgt tttcacctgg	240
agcgtggcgg atgctccttg taacatcctg tacaccgtgc agcactcgcc tcaaaacaac	300
cccttcaactg ctgtcctctc ccagatgtac gccggctggg cagggtggtat gcaattcagg	360
ttcatcgtcg ccggttcagg cgttttcggc ggaagactcg tggctgccgt cattccaccg	420
ggcatcgaga ttggaccggg tttggaagtg aggcagttcc cacacgtcgt tatcgacgcc	480
agatccctgg agcctgtcac aattacgatg ccagatttgc gccgaacat gtaccatcct	540
accggcaacc ccggatttgt cccaactttg gttctgtcag tgtacaacaa cctgatcaac	600
cccttcgggtg gcagtacctc ggctattcag gttaccgtgg agactcgccc tagtgaggac	660
ttcgaattcg tcatgatccg tgccccctcc agcaagactg ttgactccat tagcccgcca	720

gatctgctca ccaactcctgt gttgacaggc gtcggaacgg ataaccgctg gaacggagaa	780
atcgtgggtc tgcagcctgt ccccgagggt ttcagcacat gcaaccgtca ctggaacctc	840
aacggctcta ccttcggatg gtcttcacca cgcttcgcag cgatcgacca tgatcgtggt	900
aacgctagct accctggcag ttcgtccagc aacgtgctgg agttgtggta cgcctctgca	960
ggttcagctg ccgacaaccc catctctcag attgctccgg acggtttccc tgatatgtcc	1020
ttcgtcccct tcagcggcac aacggtgcc aacagctggtt gggtcggctt cggcggaaac	1080
tggaactctt caaacggagc gcccttcgtc accactgttc aagcttacga actgggtttc	1140
gcgactggcg ctccatcaaa cccacagccg acaacgacca ctagtggtgc ccaaactcgtt	1200
gcaaagtcga tttacggagt ggctacagg atcaaccagg cgacggctgg actgttcggtt	1260
atggcgagtg gtgtgatctc gacccctaac agttcggcta ttacctacac tcctcaaccc	1320
aacaggatcg tgaacgcacc aggaacacct gcagctgtc ccatcgga aaacacgcca	1380
attatgttcg cttccgtggt ccgccgtact ggcgacatca acgccgaagc aggtctaca	1440
aacggaacgc agtacggtgc tggctcacia ccaactgccg tcacagttgg actgagtctc	1500
aacaactact ccagcgtct gatgccagga cagttcttcg tgtggcaact caacttcgct	1560
tccggtttca tggagttggg cctgagcgtc gacggatact tctacgccgg aaccggtgcg	1620
tctgctactc tcacgcactt gtcagaactg gtcgatatta ggcctgttgg tcctagaccc	1680
agcacgagca ctctggtcta caacttgggc ggcactacta acggattctc atacgtctaa	1740

<210> 34
 <211> 5249
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polhAc-ie-01/hr1p6.9p10CVP60 G1 (AST89)

agttgaactc gaacttcttg tacttgacgt tgagcttttg ctggcggaat gtgatggcgt	60
cggagagtg caccagtccc tgcaggatca aggccaaagag cttcagcaag ttgttgtgca	120
gtgtagttga ctgcgcacgg ttgacctgc cgatcacgaa catgtggtgc ttgaatctgt	180
tgtacttttg gatgacctgg ctcacatcaa cgtccttgat ttcgccagag atccagtaga	240
actccttggt cttcttagcg atggtcagcc tttcctcggt cttgaaggac aacacgatga	300
agttgtgacc cttaacgtta tcgacgtttt gagtcaagta ctgctcaacg atgtgcatgc	360
ttccgtcttc cttcttgacc ttcttgagg tctcggcggt gttgttagaa gcgatgttgt	420
cgtgggtact gtagtgttg aagagcagg tagcgacgga cgagtacttg tatgtcagag	480
tgctcttctt gttcacgatg aggttcagg tatcaacgac gtacttggtg ggagggttgt	540

ccgggaattg gacggactcc gagtacttga ggatctggga aacgtatggc gagacgaaga	600
agttgttaga ggcggtttcg atctcgtttg attccttgcg gctcagcatg atgggcaaag	660
tgaagaggtt cttgtcctgg tacatctcgt acaacttcga caagaggaat ccacacttac	720
gctcgccgag tgattgcagc aaggtcacga aggttgtctg agcgtagtag atatacgaggt	780
tgaagtagga ggtcagagcg gccttgaatg tgtggtggac gtccacgaag tgacacttct	840
tgcagttttg agcggcggtc tcatcgttgc agacgtcctg tgagtgtggg atttcgatgc	900
cagtctcctt aaccaggttg tagctgatca tgaagcggat cttatcgaag gtcacaacga	960
acacacggtt gtcaaccatg tagtagttgt ttgtgtactc gtagaccacg ttagagacgt	1020
acttggcgaa gatgatttcg aaaggcttca cctcggactt cttaacgacg aacatgtagt	1080
aaccggtttc agacatgtga tcggagaatc tgttcgagtt gtagtcgtta tcgtcgaacc	1140
tcatcaggta gggggcgaag tcgtttgtga agtagtgagt gatctcctgg gtggaagcca	1200
ctgtacagat gttagtgttg tggttgatgg tttgttccag ttagcgcgat gactggatgg	1260
tgctcttctt gtacttaggt ctcaacttga tcttgttgaa ttgaccaca actccctggg	1320
agttatccag gtactcgtcc aacttcctct tgggtgcctgt ggccgacggc tggttgacac	1380
cagcagagtg ttcgaaggac tcggcgtggg aagctgagct aggagagggg tgttcgacca	1440
ctggctgttc gagtgactcg ctgtagtagg cagaggacac agcttcctcc aggttgtcag	1500
tggctctgag cagacactcc accaaatcgt tgtcagttag cgagttaact gaggcgagga	1560
agttgctagc ggcagcgggt tcagagtcgg agatgacagt atcagctccg tccgggggtg	1620
ggtggttgta gtaagacaag taatcgtagg gttgcttgtc gcagaactcc gagtatgagt	1680
tgtcgaagct agcacgagag ggagtgtgg cagaggtgta ggaagcgttg aagttgattt	1740
gagtcattgg gacctggttg ttcacgatct tatcgccacc tgtgtccacc tgcagttgct	1800
gggcctcagc gcaggctgaa gtggcctcac aggagtaggg gctggaagca cagttggaag	1860
tcatgatgtt ttcttgagcg ttcaggacgt ggctggatgt acggatcata gatctatcta	1920
gattcgaaaag cggccgcgac tagtgagctc gtcgacgtag gcctttgaat tccgcgcgct	1980
tcggaccggg atccgcgccc gatggtggga cggtagaat aatccggaat atttataggt	2040
ttttttatta caaaactgtt acgaaaacag taaaatactt atttatttgc gagatgggta	2100
tcattttaat tatctccatg atctattaat attccggagt atacctaccc gtaaagcgag	2160
tttagttttg aaaaacaaat gacatcattt gtataatgac atcatcccct gattgtgttt	2220
tacaagtaga attctatccg taaagcgagt tcagttttga aaacaaatga gtcataccta	2280
aacacgttaa taatcttctg atatacagctt atgactcaag ttatgagccg tgtgcaaaac	2340
atgagataag tttatgacat catccactga tcgtgcgtta caagtagaat tctactcgta	2400
aagccagttc ggttatgagc cgtgtgcaaa acatgacatc agcttatgac tcatacttga	2460

tttgtgtttta	cgcgtagaat	tctactcgta	aagcgagttc	ggttatgagc	cgtgtgcaaa	2520
acatgacatc	agcttatgag	tcataattaa	tcgtgcgtta	caagtagaat	tctactcgta	2580
aagcgagttg	aaggatcata	tttagttgcg	tttatgagat	aagattgaaa	gcacgtgtaa	2640
aatgtttccg	agctcgtcga	cgtaggcctt	tgaattccgc	gcgcttcgga	ccgggatcgg	2700
taccaaattc	cgtttttgca	cgatgcagag	tttttgaaca	ggctgctcaa	acacatagat	2760
cogtaccgcg	tcagtcggat	gtattacaat	gcagccaata	ccatgtttta	cacgactatg	2820
gaaaactatg	cogtgtccaa	ttgcaagttc	aacattgagg	attacaataa	catatttaag	2880
gtgatggaaa	atattaggaa	acacagcaac	aaaaattcaa	acgaccaaga	cgagttaaac	2940
atatattttg	gagttcagtc	gtcgaatgca	aagcgtaaaa	aatattaata	aggtaaaaat	3000
tacagctaca	taaattacac	aattttaaact	gcagtctgga	gatacggacc	tttaattcaa	3060
cccaacacaa	tatattatag	ttaaataaga	attattatca	aatcatttgt	atattaatta	3120
aaatactata	ctgtaaaatta	cattttatatt	acaatcactc	gacctcgaga	taaatatgga	3180
gggcaaagcc	cgcacagcgc	cgcaaggcga	agcagcaggc	actgccacca	cagcatcagt	3240
ccctggaacc	acaaccgatg	gcatggaccc	cggcgttgtg	gccactacca	gcgtggtcac	3300
tgcagagaat	tcacccgcat	cgattgcaac	ggcagggatt	ggcggaccac	cccaacaggt	3360
ggaccaacaa	gagacatgga	gaacgaactt	ttattataat	gacgttttca	cttggtcagt	3420
cgcggatgcc	cctggcgaga	tactttacac	cgttcaacat	tctccacaga	acaaccattt	3480
cacagccgtg	ctgagccaga	tgtatgctgg	ctgggctggg	ggcatgcagt	ttcgcttcat	3540
agttgcggga	tcgggtgtgt	ttggtgggcg	gttggttgcg	gccgtgatac	caccgggcat	3600
cgagattgga	ccagggtctg	aggtcaggca	attcccccat	gttgtcatcg	acgctcgttc	3660
acttgaacct	gtcaccatca	ccatgccaga	cttgcgctccc	aacatgtacc	atccaactgg	3720
tgaccctggc	cttggttcca	cactagtcc	tagtgtttat	aacaacctca	tcaaccggtt	3780
tggtgggtcc	accagcgcaa	tccaggtgac	agtggaaaca	aggccaagtg	aagattttga	3840
gttcgtgatg	attcgagccc	cctccagcaa	gactgttgac	tcaatttcac	ccgcaggcct	3900
cctcacgacc	ccagtccctca	ctgggggttg	caatgacaac	aggtggaatg	gccaaatagt	3960
gggactgcaa	ccagtacctg	gagggttctc	tacgtgcaac	aggcattgga	acttgaatgg	4020
cagcacatat	ggctgggtcaa	gccccgggtt	tgcgcacatt	gaccatcgaa	gaggcagtcg	4080
aagttaccct	ggatccaacg	caaccaacgt	gcttcagttt	tggtatgcca	atgctgggtc	4140
tgcaatcgac	aatcccatct	cccagggtgc	accagacggc	tttcctgata	tgtcgttcgt	4200
gccctttaac	ggccctggca	ttccagccgc	ggggtgggtc	ggatttggtg	caatctggaa	4260
cagtaacagc	ggtgccccca	acgttacgac	tgtgcaggct	tatgagttag	gttttgccac	4320

ES 2 763 001 T3

tggggcacca	ggcaacctcc	agcccaccac	caacacttca	ggttcacaga	ctgtcgccaa	4380
gtccatata	gccgtggtaa	ctggcacagc	ccaaaacccc	gccggattgt	ttgtgatggc	4440
ctcgggtgtt	atctccaccc	caagtgccaa	cgccatcaca	tacacgcccc	aaccagacag	4500
aattgtaacc	acacccggca	ctcctgccgc	tgcacctgtg	ggtaagaaca	cacccatcat	4560
gttcgcgtct	gtcgtcaggc	gcaccggtga	cgtcaacgcc	acagctgggt	cagctaacgg	4620
gacccagtac	ggcacaggct	ctcaaccact	gccagtaaca	attggacttt	cgctcaacaa	4680
ctactcgtca	gcacttatgc	ccggacagtt	tttcgtttgg	cagttaacct	ttgcatctgg	4740
tttcatggag	attggtttta	gtgtggacgg	gtatttttat	gcaggaacag	gagcctcaac	4800
cacactcatt	gacttgactg	aactcattga	cgtacgccct	gtgggaccca	ggccatccaa	4860
gagcacactc	gtgttcaacc	tggggggcac	agccaatggc	ttttcttatg	tctgaattca	4920
tccgactggg	acttgcaggt	gccagcgttt	tgagcaatgc	attgctccgc	aggcaagagc	4980
tgcaactaca	aagacaagct	ttggagaatg	ggttggtttt	gaaagccgac	caattaggta	5040
ggttagggtt	taatccaaat	gaagttaaga	atgtgattgt	aggtaatagt	tttagtagta	5100
atgttagatt	aagtaatatg	cataatgatg	ctagtgtagt	taatgcttat	aatgtgtata	5160
atcctgccag	caatggcatc	agaaagaaaa	ttaagagttt	gaataatagt	gttaagattt	5220
ataacaccac	tggggagtcc	agtgtttta				5249

<210> 35
 <211> 4918
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polhAc-ie-01/hr1p6.9p10CVP60 RHDVb (N11)

agttgaactc	gaacttcttg	tacttgcagt	tgagcttttg	ctcggcgaat	gtgatggcgt	60
cggagagtgg	caccagtccc	tgcaggatca	aggccaagag	cttcagcaag	ttgttgtgca	120
gtgtagttga	ctcgcgacgg	ttgaccttgc	cgatcacgaa	catgtggtgc	ttgaatctgt	180
tgtacttttg	gatgacctgg	ctcacatcaa	cgtccttgat	ttcgccagag	atccagtaga	240
actccttggt	cttcttagcg	atggtcagcc	tttcctcggt	cttgaaggac	aacacgatga	300
agttgtgacc	cttaacgtta	tcgacgtttt	gagtcaagta	ctgctcaacg	atgtgcatgc	360
ttccgtcttc	cttcttgacc	ttcttgaggt	tctcggcggt	gttggttagaa	gcgatgttgt	420
cgtgggtactt	gtagttgttg	aagagcaggt	tagcgacgga	cgagtacttg	tatgtcagag	480
tgctcttctt	gttcacgatg	aggttcaggt	tatcaacgac	gtacttgttg	ggaggggtgt	540
ccgggaattg	gacggactcc	gagtacttga	ggatctggga	aacgtatggc	gagacgaaga	600
agttgttaga	ggcgggtttcg	atctcgtttg	attccttgcg	gctcagcatg	atgggcaaag	660

tgaagagggtt cttgtcctgg tacatctcgt acaacttcga caagaggaat ccacacttac	720
gctcgccgag tgattgcagc aaggtcacga aggttgtctg agcgtagtag atatacgaggt	780
tgaagtagga ggtcagagcg gccttgaatg tgtgggtggac gtccacgaag tgacacttct	840
tgcagttttg agcggcggtc tcatcgttgc agacgtcctg tgagtgtggg atttcgatgc	900
cagtctcctt aaccagggtg tagctgatca tgaagcggat cttatcgaag gtcacaacga	960
acacacgggt gtcaaccatg tagtagttgt ttgtgtactc gtagaccacg ttagagacgt	1020
acttggcgaa gatgatttcg aaaggcttca cctcggaact cttaacgacg aacatgtagt	1080
aaccggtttc agacatgtga tccggagaatc tgttcgagtt gtagtcgtta tcgtcgaacc	1140
tcatcaggta gggggcgaa tctgtttgtga agtagtgagt gatctcctgg gtggaagcca	1200
ctgtacagat gttagtgttg tggttgatgg tttgttccag tgtagcgcat gactggatgg	1260
tgctcttctt gtacttaggt ctcaacttga tcttgttgaa ttgaccaca actccctggg	1320
agttatccag gtactcgtcc aacttcctct tgggtgcctgt ggccgacggc tggttgacac	1380
cagcagagtg ttogaaggac tccggcgtgg aagctgagct aggagagggg tgttcgacca	1440
ctggctgttc gagtgaactc ctgtagtagg cagaggacac agcttcctcc aggttgtcag	1500
tggctcttgag cagacactcc accaaatcgt tgtcagttag cgagttaact gaggcgagga	1560
agttgctagc ggcagcgggt tcagagtcgg agatgacagt atcagctccg tccgggggtg	1620
gggtggttga gtaagacaag taatcgttag gttgcttgtc gcagaactcc gagtatgagt	1680
tgtcgaagct agcacgagag ggagtgtctg cagaggtgta ggaagcgttg aagttgattt	1740
gagtcattgt gacctggtt ttcacgatct tatcgccacc tgtgtccacc tgcagttgct	1800
gggcctcagc gcaggctgaa gtggcctcac aggagttagg gctggaagca cagttggaag	1860
tcatgatgtt ttcttgagc ttcaggacgt ggctggatgt acggatcata gatctatcta	1920
gattcgaaag cggccgcgac tagtgagctc gtgcagctag gcctttgaat tccgcgcgct	1980
tccgaccggg atccgcgccc gatggtgga cggtagaat aatccggaat atttataggt	2040
ttttttatta caaaactgtt acgaaaacag taaaatactt atttatttgc gagatggtta	2100
tcattttaat tatctccatg atctattaat attccggagt atacctacc gtaaagcgag	2160
tttagttttg aaaaacaaat gacatcattt gtataatgac atcatcccct gattgtgttt	2220
tacaagtaga attctatccg taaagcgagt tcagttttga aaacaaatga gtcataccta	2280
aacacgttaa taatcttctg atatacagct atgactcaag ttatgagccg tgtgcaaaac	2340
atgagataag tttatgacat catccactga tcgtgcgtta caagtagaat tctactcgta	2400
aagccagttc ggttatgagc cgtgtgcaaa acatgacatc agcttatgac tcatacttga	2460
ttgtgtttta cgcgtagaat tctactcgta aagcgagttc ggttatgagc cgtgtgcaaa	2520

acatgacatc agcttatgag tcataattaa tcgtgcgtta caagtagaat tctactcgta	2580
aagcgagttg aaggatcata tttagttgcg tttatgagat aagattgaaa gcacgtgtaa	2640
aatgtttccg agctcgtcga cgtaggcctt tgaattccgc gcgcttcgga ccgggatcgg	2700
taccaaattc cgttttgcga cgatgcagag tttttgaaca ggctgctcaa acacatagat	2760
ccgtacccgc tcagtcggat gtattacaat gcagccaata ccatgtttta cagcactatg	2820
gaaaactatg ccgtgtccaa ttgcaagttc aacattgagg attacaataa catatttaag	2880
gtgatggaaa atattaggaa acacagcaac aaaaattcaa acgaccaaga cgagttaaac	2940
atatatttg gaggttcagtc gtogaatgca aagcgtaaaa aatattaata aggtaaaaat	3000
tacagctaca taaattacac aatttaaact gcagtcctgga gatacggacc ttttaattcaa	3060
cccaacacaa tatattatag ttaaataaga attattatca aatcatttgt atattaatta	3120
aaatactata ctgtaaatta cattttatctt acaatcactc gacctcgaga taaatatgga	3180
gggtaaagcc agaacggcgt cgcaaggaga aaccgcagga acagctacaa ccgcaagcgt	3240
gccaggaaca acaaccgatg gaatggaccc tgggtgtggtg gcaaccactt ccgttgtgac	3300
aacggagaac gcatctacct caatcgccac tgcaggaatt ggtggccctc ccagcaagt	3360
ggatcagcaa gaaacatgga ggacgaactt ctactacaac gacgttttca cctggagcgt	3420
ggcggatgct cctggtaaca tcctgtacac cgtgcagcac tcgcctcaa acaaccctt	3480
cactgctgtc ctctcccaga tgtacgccgg ctgggcaggt ggtatgcaat tcaggttcat	3540
cgtcgccggt tcaggcgttt tcggcggaag actcgtggct gccgtcattc caccgggcat	3600
cgagattgga ccgggttttg aagtgaggca gttcccacac gtcgttatcg acgccagatc	3660
cctggagcct gtcacaatta cgatgccaga tttgcgcccg aacatgtacc atcctaccgg	3720
caaccccgga ttggtcccaa ctttggttct gtcagtgtac aacaacctga tcaaccctt	3780
cggtggcagt acctcggcta ttcaggttac cgtggagact cgccctagtg aggacttoga	3840
attcgtcatg atccgtgccc cctccagcaa gactgttgac tccattagcc cggcagatct	3900
gctcaccact cctgtgttga caggcgtcgg aacggataac cgctggaacg gagaaatcgt	3960
gggtctgcag cctgtccccg gaggtttcag cacatgcaac cgtcactgga acctcaacgg	4020
ctctaccttc ggatggtctt caccacgctt cgcagcgatc gaccatgatc gtggtaacgc	4080
tagctaccct ggcagttcgt ccagcaacgt gctggagttg tggtagcct ctgcaggttc	4140
agctgccgac aaccccatct ctcagattgc tccggacggt ttccctgata tgtccttcgt	4200
ccccttcagc ggcacaacgg tgccaacagc tggttgggtc ggcttcggcg gaatctggaa	4260
ctcttcaaac ggagcgccct tcgtcaccac tgttcaagct tacgaactgg gtttcgcgac	4320
tggcgctcca tcaaaccac agccgacaac gaccactagt ggtgccccaa tcgttgcaaa	4380
gtcgatttac ggagtggcta caggatatcaa ccaggcgacg gctggactgt tcgttatggc	4440

gagtgggtgtg atctcgaccc ctaacagttc ggctattacc tacactcctc aacccaacag 4500
gatcgtgaac gcaccaggaa cacctgcagc tgctcccatc ggaaaaaaca cgccaattat 4560
gttcgcttcc gtgggtccgcc gtactggcga catcaacgcc gaagcaggct ctacaaacgg 4620
aacgcagtac ggtgctggct cacaaccact gccggtcaca gttggactga gtctcaacaa 4680
ctactccagc gctctgatgc caggacagtt cttcgtgtgg caactcaact tcgcttccgg 4740
tttcatggag ttgggcctga gcgtcgacgg atacttctac gccggaaccg gtgcgtctgc 4800
tactctcatc gacttgtcag aactggtcga tattaggcct gttggtccta gaccagcac 4860
gagcactctg gtctacaact tgggcggcac tactaacgga ttctcatacg tctaataa 4918

<210> 36

<211> 579

<212> PRT

<213> Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo AST89

<400> 36

Met Glu Gly Lys Ala Arg Thr Ala Pro Gln Gly Glu Ala Ala Gly Thr
1 5 10 15

Ala Thr Thr Ala Ser Val Pro Gly Thr Thr Thr Asp Gly Met Asp Pro
20 25 30

Gly Val Val Ala Thr Thr Ser Val Val Thr Ala Glu Asn Ser Ser Ala
35 40 45

Ser Ile Ala Thr Ala Gly Ile Gly Gly Pro Pro Gln Gln Val Asp Gln
50 55 60

Gln Glu Thr Trp Arg Thr Asn Phe Tyr Tyr Asn Asp Val Phe Thr Trp
65 70 75 80

Ser Val Ala Asp Ala Pro Gly Ser Ile Leu Tyr Thr Val Gln His Ser
85 90 95

Pro Gln Asn Asn Pro Phe Thr Ala Val Leu Ser Gln Met Tyr Ala Gly
100 105 110

Trp Ala Gly Gly Met Gln Phe Arg Phe Ile Val Ala Gly Ser Gly Val
115 120 125

Phe Gly Gly Arg Leu Val Ala Ala Val Ile Pro Pro Gly Ile Glu Ile
130 135 140

Gly Pro Gly Leu Glu Val Arg Gln Phe Pro His Val Val Ile Asp Ala
145 150 155 160

ES 2 763 001 T3

Arg Ser Leu Glu Pro Val Thr Ile Thr Met Pro Asp Leu Arg Pro Asn
 165 170 175

Met Tyr His Pro Thr Gly Asp Pro Gly Leu Val Pro Thr Leu Val Leu
 180 185 190

Ser Val Tyr Asn Asn Leu Ile Asn Pro Phe Gly Gly Ser Thr Ser Ala
 195 200 205

Ile Gln Val Thr Val Glu Thr Arg Pro Ser Glu Asp Phe Glu Phe Val
 210 215 220

Met Ile Arg Ala Pro Ser Ser Lys Thr Val Asp Ser Ile Ser Pro Ala
 225 230 235 240

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

Trp Asn Gly Gln Ile Val Gly Leu Gln Pro Val Pro Gly Gly Phe Ser
 260 265 270

Thr Cys Asn Arg His Trp Asn Leu Asn Gly Ser Thr Tyr Gly Trp Ser
 275 280 285

Ser Pro Arg Phe Ala Asp Ile Asp His Arg Arg Gly Ser Ala Ser Tyr
 290 295 300

Pro Gly Ser Asn Ala Thr Asn Val Leu Gln Phe Trp Tyr Ala Asn Ala
 305 310 315 320

Gly Ser Ala Ile Asp Asn Pro Ile Ser Gln Val Ala Pro Asp Gly Phe
 325 330 335

Pro Asp Met Ser Phe Val Pro Phe Asn Gly Pro Gly Ile Pro Ala Ala
 340 345 350

Gly Trp Val Gly Phe Gly Ala Ile Trp Asn Ser Asn Ser Gly Ala Pro
 355 360 365

Asn Val Thr Thr Val Gln Ala Tyr Glu Leu Gly Phe Ala Thr Gly Ala
 370 375 380

Pro Gly Asn Leu Gln Pro Thr Thr Asn Thr Ser Gly Ser Gln Thr Val
 385 390 395 400

Ala Lys Ser Ile Tyr Ala Val Val Thr Gly Thr Ala Gln Asn Pro Ala

ES 2 763 001 T3

405 410 415
 Gly Leu Phe Val Met Ala Ser Gly Val Ile Ser Thr Pro Ser Ala Asn
 420 425 430
 Ala Ile Thr Tyr Thr Pro Gln Pro Asp Arg Ile Val Thr Thr Pro Gly
 435 440 445
 Thr Pro Ala Ala Ala Pro Val Gly Lys Asn Thr Pro Ile Met Phe Ala
 450 455 460
 Ser Val Val Arg Arg Thr Gly Asp Val Asn Ala Thr Ala Gly Ser Ala
 465 470 475 480
 Asn Gly Thr Gln Tyr Gly Thr Gly Ser Gln Pro Leu Pro Val Thr Ile
 485 490 495
 Gly Leu Ser Leu Asn Asn Tyr Ser Ser Ala Leu Met Pro Gly Gln Phe
 500 505 510
 Phe Val Trp Gln Leu Thr Phe Ala Ser Gly Phe Met Glu Ile Gly Leu
 515 520 525
 Ser Val Asp Gly Tyr Phe Tyr Ala Gly Thr Gly Ala Ser Thr Thr Leu
 530 535 540
 Ile Asp Leu Thr Glu Leu Ile Asp Val Arg Pro Val Gly Pro Arg Pro
 545 550 555 560
 Ser Lys Ser Thr Leu Val Phe Asn Leu Gly Gly Thr Ala Asn Gly Phe
 565 570 575

Ser Tyr Val

<210> 37

<211> 579

<212> PRT

<213> Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo N11

<400> 37

Met Glu Gly Lys Ala Arg Thr Ala Ser Gln Gly Glu Thr Ala Gly Thr
 1 5 10 15

Ala Thr Thr Ala Ser Val Pro Gly Thr Thr Thr Asp Gly Met Asp Pro
 20 25 30

Gly Val Val Ala Thr Thr Ser Val Val Thr Thr Glu Asn Ala Ser Thr

ES 2 763 001 T3

35					40					45					
Ser	Ile	Ala	Thr	Ala	Gly	Ile	Gly	Gly	Pro	Pro	Gln	Gln	Val	Asp	Gln
50						55					60				
Gln	Glu	Thr	Trp	Arg	Thr	Asn	Phe	Tyr	Tyr	Asn	Asp	Val	Phe	Thr	Trp
65					70					75					80
Ser	Val	Ala	Asp	Ala	Pro	Gly	Asn	Ile	Leu	Tyr	Thr	Val	Gln	His	Ser
				85					90					95	
Pro	Gln	Asn	Asn	Pro	Phe	Thr	Ala	Val	Leu	Ser	Gln	Met	Tyr	Ala	Gly
			100					105					110		
Trp	Ala	Gly	Gly	Met	Gln	Phe	Arg	Phe	Ile	Val	Ala	Gly	Ser	Gly	Val
		115					120					125			
Phe	Gly	Gly	Arg	Leu	Val	Ala	Ala	Val	Ile	Pro	Pro	Gly	Ile	Glu	Ile
	130					135					140				
Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Val	Arg	Gln	Phe	Pro	His	Val	Val	Ile	Asp	Ala
145					150					155					160
Arg	Ser	Leu	Glu	Pro	Val	Thr	Ile	Thr	Met	Pro	Asp	Leu	Arg	Pro	Asn
				165					170					175	
Met	Tyr	His	Pro	Thr	Gly	Asn	Pro	Gly	Leu	Val	Pro	Thr	Leu	Val	Leu
			180					185					190		
Ser	Val	Tyr	Asn	Asn	Leu	Ile	Asn	Pro	Phe	Gly	Gly	Ser	Thr	Ser	Ala
		195					200					205			
Ile	Gln	Val	Thr	Val	Glu	Thr	Arg	Pro	Ser	Glu	Asp	Phe	Glu	Phe	Val
	210					215					220				
Met	Ile	Arg	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Thr	Val	Asp	Ser	Ile	Ser	Pro	Ala
225					230					235					240
Asp	Leu	Leu	Thr	Thr	Pro	Val	Leu	Thr	Gly	Val	Gly	Thr	Asp	Asn	Arg
				245					250					255	
Trp	Asn	Gly	Glu	Ile	Val	Gly	Leu	Gln	Pro	Val	Pro	Gly	Gly	Phe	Ser
			260					265					270		
Thr	Cys	Asn	Arg	His	Trp	Asn	Leu	Asn	Gly	Ser	Thr	Phe	Gly	Trp	Ser
		275					280					285			

ES 2 763 001 T3

Ser Pro Arg Phe Ala Ala Ile Asp His Asp Arg Gly Asn Ala Ser Tyr
 290 295 300
 Pro Gly Ser Ser Ser Ser Asn Val Leu Glu Leu Trp Tyr Ala Ser Ala
 305 310 315 320
 Gly Ser Ala Ala Asp Asn Pro Ile Ser Gln Ile Ala Pro Asp Gly Phe
 325 330 335
 Pro Asp Met Ser Phe Val Pro Phe Ser Gly Thr Thr Val Pro Thr Ala
 340 345 350
 Gly Trp Val Gly Phe Gly Gly Ile Trp Asn Ser Ser Asn Gly Ala Pro
 355 360 365
 Phe Val Thr Thr Val Gln Ala Tyr Glu Leu Gly Phe Ala Thr Gly Ala
 370 375 380
 Pro Ser Asn Pro Gln Pro Thr Thr Thr Thr Ser Gly Ala Gln Ile Val
 385 390 395 400
 Ala Lys Ser Ile Tyr Gly Val Ala Thr Gly Ile Asn Gln Ala Thr Ala
 405 410 415
 Gly Leu Phe Val Met Ala Ser Gly Val Ile Ser Thr Pro Asn Ser Ser
 420 425 430
 Ala Ile Thr Tyr Thr Pro Gln Pro Asn Arg Ile Val Asn Ala Pro Gly
 435 440 445
 Thr Pro Ala Ala Ala Pro Ile Gly Lys Asn Thr Pro Ile Met Phe Ala
 450 455 460
 Ser Val Val Arg Arg Thr Gly Asp Ile Asn Ala Glu Ala Gly Ser Thr
 465 470 475 480
 Asn Gly Thr Gln Tyr Gly Ala Gly Ser Gln Pro Leu Pro Val Thr Val
 485 490 495
 Gly Leu Ser Leu Asn Asn Tyr Ser Ser Ala Leu Met Pro Gly Gln Phe
 500 505 510
 Phe Val Trp Gln Leu Asn Phe Ala Ser Gly Phe Met Glu Leu Gly Leu
 515 520 525
 Ser Val Asp Gly Tyr Phe Tyr Ala Gly Thr Gly Ala Ser Ala Thr Leu
 530 535 540

ES 2 763 001 T3

Ile Asp Leu Ser Glu Leu Val Asp Ile Arg Pro Val Gly Pro Arg Pro
545 550 555 560

Ser Thr Ser Thr Leu Val Tyr Asn Leu Gly Gly Thr Thr Asn Gly Phe
565 570 575

Ser Tyr Val

<210> 38
<211> 3891
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polhAc-ie-01/hr1p6.9p10GFP

<400> 38
ttagttgaac tcgaacttct tgtacttgca gttgagcttt tgctcggcga atgtgatggc 60
gtcggagagt ggcaccagtc cctgcaggat caaggccaag agcttcagca agttgttgtg 120
cagtgtagtt gactcgcgac gggtgacctt gccgatcacg aacatgtggt gcttgaatct 180
gttgtacttt tggatgacct ggctcacatc aacgtccttg atttcgccag agatccagta 240
gaactccttg ttcttcttag cgatggtcag cctttcctcg ttcttgaagg acaacacgat 300
gaagtttgtga cccttaacgt tatcgacgtt ttgagtcaag tactgctcaa cgatgtgcat 360
gcttcogtct tccttcttga ccttcttgag gttctcggcg ttgttggttag aagcgatggt 420
gtcgtggtac ttgtagttgt tgaagagcag gttagcgacg gacgagtact tgtatgtcag 480
agtgtctctt ttgttcacga tgagggttcag gttatcaacg acgtacttgt tgggaggggtt 540
gtccgggaat tggacggact ccgagtactt gaggatctgg gaaacgtatg gcgagacgaa 600
gaagttgtta gaggcgggtt cgatctcggt tgattccttg cggctcagca tgatgggcaa 660
agtgaagagg ttcttgtcct ggtacatctc gtacaacttc gacaagagga atccacactt 720
acgctcgccg agtgattgca gcaaggtcac gaaggttgtc tgagcgtagt acatatcgag 780
gttgaagtag gaggtcagag cggccttgaa tgtgtggtgg acgtccacga agtgacactt 840
cttgcagttt tgagcggcgg tctcatcggt gcagacgtcc tgtgagtggt ggatttcgat 900
gccagtctcc ttaaccaggt ttagctgat catgaagcgg atcttatcga aggtcacaac 960
gaacacacgg ttgtcaacca ttagtagtt gtttgtgtac tcgtagacca cgtagagac 1020
gtacttggcg aagatgattt cgaaaggctt cacctcggac ttcttaacga cgaacatgta 1080
gtaaccggtt tcagacatgt gatcggagaa tctgttcgag ttgtagtcgt tatcgtcgaa 1140
cctcatcagg tagggggcga agtcgtttgt gaagtagtga gtgatctcct ggggtggaagc 1200
cactgtacag atgttagtgt tgtggttgat gggttggtcc agtgtagcgc atgactggat 1260

ggtgctcttc ttgtacttag gtctcaactt gatcttggtg aattgaccca caactccctg	1320
ggagttatcc aggtactcgt ccaacttcct cttgggtgcct gtggccgacg gctgggttgac	1380
accagcagag tgttcgaagg actcggcgtg gtaagctgag ctaggagagg gttgttcgac	1440
cactggctgt tcgagtgaact cgctgtagta ggcagaggac acagcttcct ccaggttgtc	1500
agtggctctg agcagacact ccaccaaatac gttgtcagtg agcgagttaa ctgaggcgag	1560
gaagttgcta gcggcagcgg ttccagagtc ggagatgaca gtatcagctc cgtccgggggt	1620
tgggtggttg tagtaagaca agtaatcgtt aggttgcttg tcgcagaact ccgagtatga	1680
gttgtcgaag ctagcacgag agggagtgct ggcagagggt taggaagcgt tgaagttgat	1740
ttgagtcatt gtgacctggt tgttcacgat cttatcgcca cctgtgtcca cctgcagttg	1800
ctgggcctca gcgcaggctg aagtggcctc acaggagtag gggctggaag cacagttgga	1860
agtcattgatg ttttcttgga cgttcaggac gtggctggat gtacggatca tagatctatc	1920
tagattcgaa agcggccgcg actagtgagc tcgtcgacgt aggcctttga attccgcgcg	1980
cttcggaccg ggatccgcgc ccgatgggtg gacgggtatga ataatccgga atatttatag	2040
gtttttttat taaaaaactg ttacgaaaac agtaaaatac ttattttattt gcgagatggt	2100
tatcatttta attatctcca tgatctatta atattccgga gtatacctac ccgtaaagcg	2160
agtttagttt tgaaaaacaa atgacatcat ttgtataatg acatcatccc ctgattgtgt	2220
tttacaagta gaattctatc cgtaaagcga gttcagtttt gaaaacaaat gagtcatacc	2280
taaacacggt aataatcttc tgatatcagc ttatgactca agttatgagc cgtgtgcaaa	2340
acatgagata agtttatgac atcatccact gatcgtgcgt tacaagtaga attctactcg	2400
taaagccagt tcggttatga gccgtgtgca aaacatgaca tcagcttatg actcatactt	2460
gattgtgttt tacgcgtaga attctactcg taaagcgagt tcggttatga gccgtgtgca	2520
aaacatgaca tcagcttatg agtcataatt aatcgtgcgt tacaagtaga attctactcg	2580
taaagcgagt tgaaggatca tatttagttg cgtttatgag ataagattga aagcacgtgt	2640
aaaatgtttc cgagctcgtc gacgtaggcc tttgaattcc gcgcgcttcg gaccgggatc	2700
ggtaccaaata tcggttttgc gacgatgcag agtttttgaa caggctgctc aaacacatag	2760
atccgtaccc gctcagtcgg atgtattaca atgcagccaa taccatgttt tacacgacta	2820
tggaaaaacta tgccgtgtcc aattgcaagt tcaacattga ggattacaat aacatattta	2880
aggtgatgga aaatattagg aaacacagca acaaaaattc aaacgaccaa gacgagttaa	2940
acatatattt gggagttcag tcgtcgaatg caaagcgtaa aaaatattaa taaggtaaaa	3000
attacagcta cataaattac acaatttaaa ctgcagtctg gagatacggga cctttaattc	3060
aaccaaacac aatatattat agttaaataa gaattattat caaatcattt gtatattaat	3120

ES 2 763 001 T3

taaaatacta tactgtaaat tacatTTTTat ttacaatcac tcgacctcga gatggtgagc	3180
aagggcgagg agctgttcac cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta	3240
aacggccaca agttcagcgt gtccggcgag ggcgagggcg atgccaccta cggcaagctg	3300
accctgaagt tcatctgcac caccggcaag ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc	3360
accctgacct acggcgtgca gtgcttcagc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac	3420
ttcttcaagt ccgccatgcc cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac	3480
gacggcaact acaagacccg cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc	3540
atcgagctga agggcatcga cttcaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag	3600
tacaactaca acagccacaa cgtctatatc atggccgaca agcagaagaa cggcatcatg	3660
gtgaacttca agatccgcca caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac	3720
cagcagaaca ccccatcgg cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc	3780
accagtcgg ccctgagcaa agaccccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag	3840
ttcgtgaccg ccgccgggat cactctcggc atggacgagc tgtacaagta a	3891

REIVINDICACIONES

1. Pupa que comprende un baculovirus recombinante y/o un bácmido derivado del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV), en la que la pupa pertenece al género *Trichoplusia*.
2. Pupa según la reivindicación 1, en la que el baculovirus recombinante y/o el bácmido comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína recombinante.
3. Pupa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el baculovirus y/o el bácmido comprenden una secuencia de ácido nucleico que permite la expresión por encima de los niveles endógenos de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas que actúan como reguladores de la transcripción por encima de los niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus y una región homóloga recombinante (*hr*) ligada operativamente a cualquier promotor que es adecuado para dirigir la expresión de una proteína recombinante,
 en la que la secuencia de ácido nucleico que permite la expresión de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas se selecciona del grupo que consiste en:
 - (a) un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 1-5;
 - (b) una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 1-5 y que codifica para una proteína que puede actuar como regulador de la transcripción en un baculovirus recombinante;
 - (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica para un aminoácido que contiene la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 6-9; y
 - (d) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos que tiene una similitud de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 6-9 que puede actuar como regulador de la transcripción en un baculovirus recombinante.
4. Pupa que comprende una secuencia de ácido nucleico que permite la expresión por encima de los niveles endógenos de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas que actúan como reguladores de la transcripción por encima de los niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus y una región homóloga recombinante (*hr*) ligada operativamente a cualquier promotor que es adecuado para dirigir la expresión de una proteína recombinante, en la que la pupa pertenece al género *Trichoplusia*,
 en la que la secuencia de ácido nucleico que permite la expresión de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas se selecciona del grupo que consiste en:
 - (a) un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 1-5;
 - (b) una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 1-5 y que codifica para una proteína que puede actuar como regulador de la transcripción en un baculovirus recombinante;
 - (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica para un aminoácido que contiene la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 6-9; y
 - (d) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos que tiene una similitud de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 6-9 que puede actuar como regulador de la transcripción en un baculovirus recombinante.
5. Pupa según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que el promotor que dirige la expresión de dicha proteína recombinante se selecciona del grupo de ácidos nucleicos que comprende:
 - (a) un ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 10-14; y
 - (b) una secuencia de ácido nucleico que puede actuar como promotor en un baculovirus recombinante y que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% con la secuencia de

nucleótidos indicada en cualquiera de SEQ ID NO: 10-14; y/o

en la que la región homóloga recombinante (*hr*) es la secuencia indicada en SEQ ID NO: 21 (*hr1*).

- 5 6. Pupa según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que la secuencia de ácido nucleico que comprende combinaciones de promotores recombinantes, secuencias que codifican para reguladores de la transcripción y regiones potenciadoras se seleccionan del grupo que comprende SEQ ID NO: 15-20.
- 10 7. Pupa según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en la que la pupa comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína recombinante.
8. Uso de la pupa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la expresión de proteínas recombinantes.
- 15 9. Método para producir al menos una proteína recombinante que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar una pupa;
 - 20 (b) inocular la pupa de la etapa (a) con un baculovirus recombinante derivado del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV);
 - (c) incubar la pupa inoculada de la etapa (b) durante un periodo de tiempo suficiente para que se exprese la al menos una proteína recombinante; y
 - 25 (d) obtener las pupas que comprenden la al menos una proteína recombinante,en el que la pupa pertenece al género *Trichoplusia*.
- 30 10. Método según la reivindicación 9, en el que el baculovirus recombinante comprende una secuencia de ácido nucleico que permite la expresión por encima de los niveles endógenos de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas que actúan como reguladores de la transcripción por encima de los niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus y una región homóloga recombinante (*hr*) ligada operativamente a cualquier promotor que es adecuado para dirigir la expresión de una proteína recombinante, en el que la secuencia de ácido nucleico que permite la expresión por encima de los niveles endógenos de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas que actúan como reguladores de la transcripción por encima de los niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus y la región homóloga recombinante (*hr*) ligada operativamente a cualquier promotor que es adecuado para dirigir la expresión de una proteína recombinante son según las reivindicaciones 3 y/o 4;
- 40 en el que, opcionalmente, la secuencia de ácido nucleico que comprende combinaciones de promotores recombinantes, secuencias que codifican para reguladores de la transcripción y regiones potenciadoras se seleccionan del grupo que comprende SEQ ID NO: 15-20.
- 45 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en el que la pupa comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína recombinante.
12. Método según la reivindicación 9, en el que la pupa de la etapa (a) es una pupa libre de seda;
- 50 en el que, opcionalmente, la pupa libre de seda se obtiene o puede obtenerse a través de un método para producir una pupa libre de seda, que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar una pupa contenida en un capullo de seda;
 - 55 (b) tratar el capullo de seda que contiene una pupa con una disolución de una sal de ácido hipocloroso; y
 - (c) obtener una pupa libre de seda y desinfectada externamente.
- 60 13. Método para producir un baculovirus recombinante que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar una pupa libre de seda que pertenece al género *Trichoplusia*;
 - (b) transfectar la pupa de la etapa (a) con un bácmido adecuado para producir un baculovirus recombinante derivado del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV);
 - 65

(c) incubar la pupa inoculada de la etapa (b) durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca el baculovirus recombinante; y

(d) obtener las pupas que comprenden el baculovirus recombinante.

- 5
14. Método según la reivindicación 13, en el que el bácmido adecuado para producir un baculovirus recombinante derivado del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV) comprende o alternativamente, consiste en, una secuencia de ácido nucleico que permite la
10 expresión por encima de los niveles endógenos de las proteínas IE-1, IE-0 y/o fragmentos de las mismas que actúan como reguladores de la transcripción por encima de los niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus y una región homóloga recombinante (*hr*) ligada operativamente a cualquier promotor que es adecuado para dirigir la expresión de una proteína recombinante, en el que la secuencia de ácido nucleico que permite la expresión por encima de los niveles endógenos de las proteínas IE-1, IE-0
15 y/o fragmentos de las mismas que actúan como reguladores de la transcripción por encima de los niveles endógenos obtenidos durante la infección por baculovirus y la región homóloga recombinante (*hr*) ligada operativamente a cualquier promotor que es adecuado para dirigir la expresión de una proteína recombinante son según las reivindicaciones 3 y/o 4;
20 en el que, opcionalmente, la secuencia de ácido nucleico que comprende combinaciones de promotores recombinantes, secuencias que codifican para reguladores de la transcripción y regiones potenciadoras se seleccionan del grupo que comprende SEQ ID NO: 15-20.
- 25
15. Uso de un dispositivo que comprende una bomba de precisión, un brazo mecánico móvil y una aguja adecuada para inyectar un fluido en una pupa
30 para inocular una pupa que pertenece al género *Trichoplusia* con un baculovirus recombinante derivado del virus multicápside de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV);
en el que, opcionalmente, el dispositivo comprende además un programa informático para definir la posición de la aguja y/o para calcular la distancia desde la aguja hasta la pupa y/o la distancia de penetración de la aguja en la pupa y/o el volumen de líquido que va a inocularse en la pupa.

Figura 1

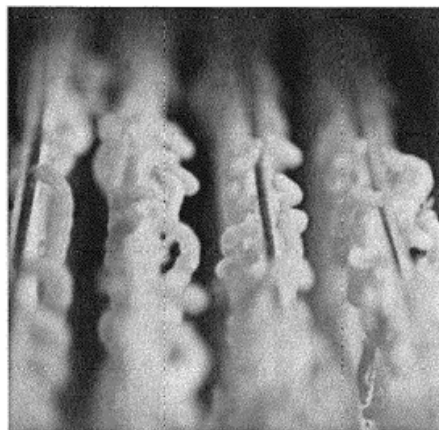
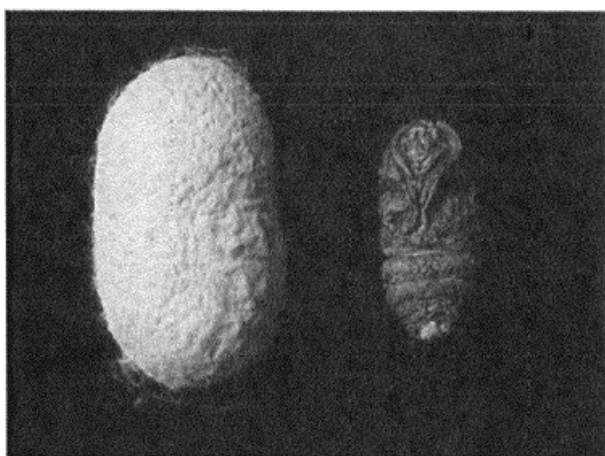


Figura 2

Bombyx mori



Trichoplusia ni

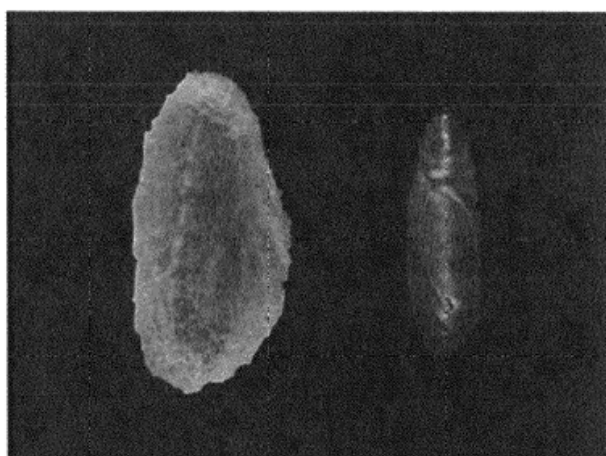


Figura 3

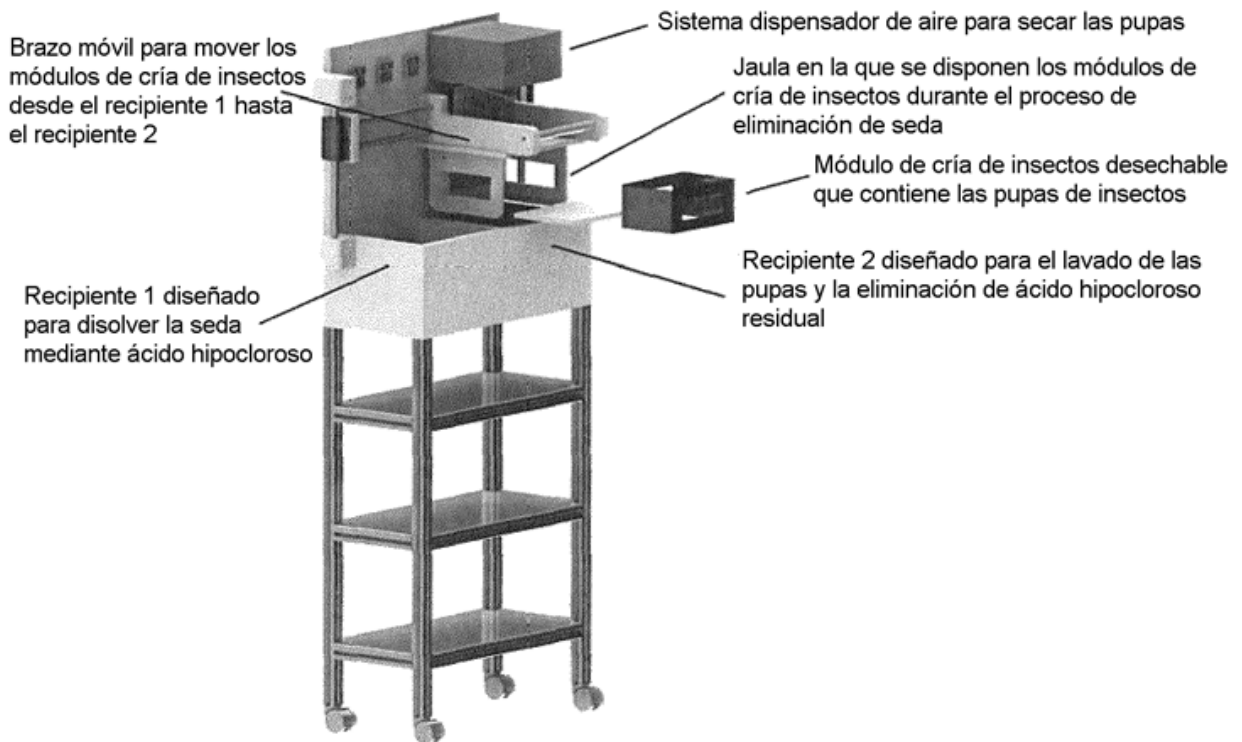


Figura 4

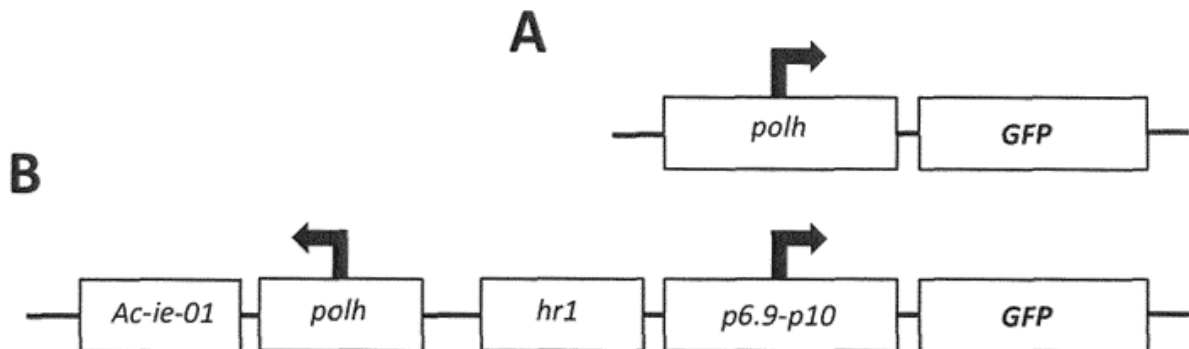


Figura 5

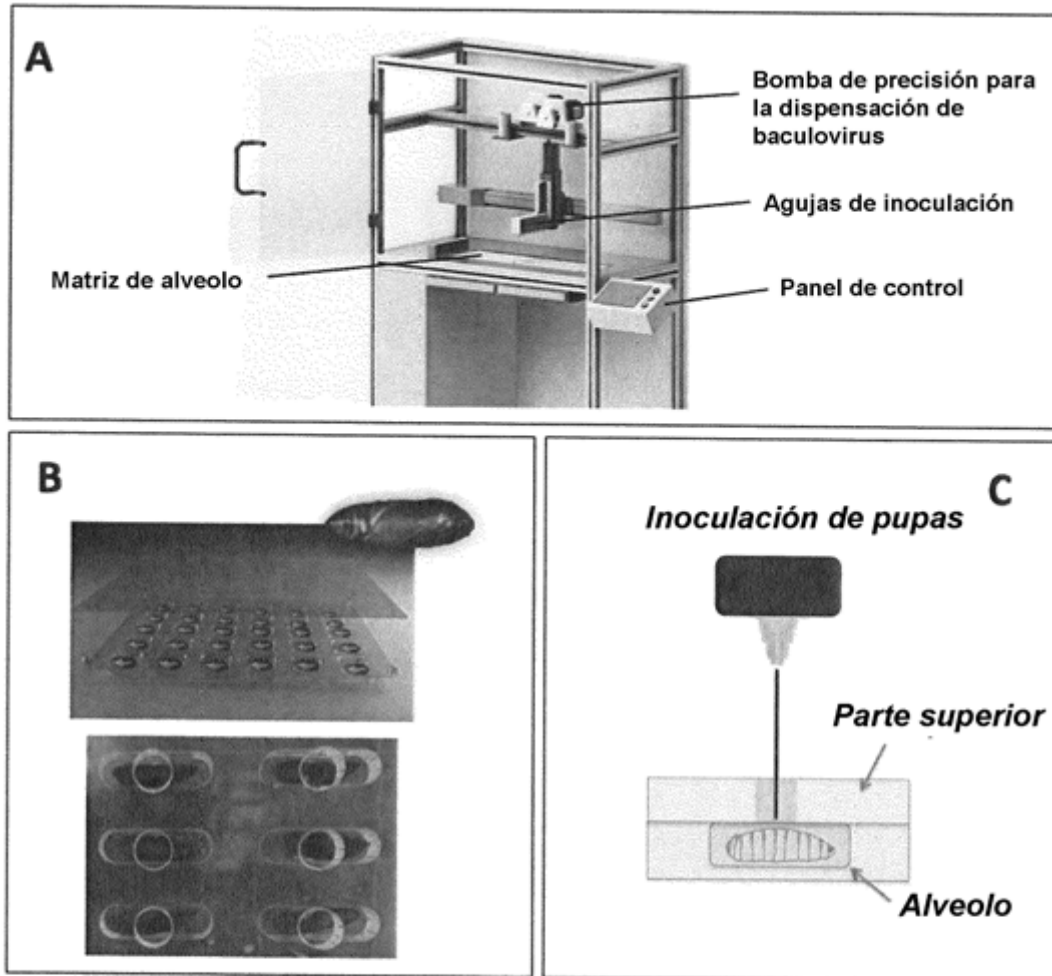


Figura 6

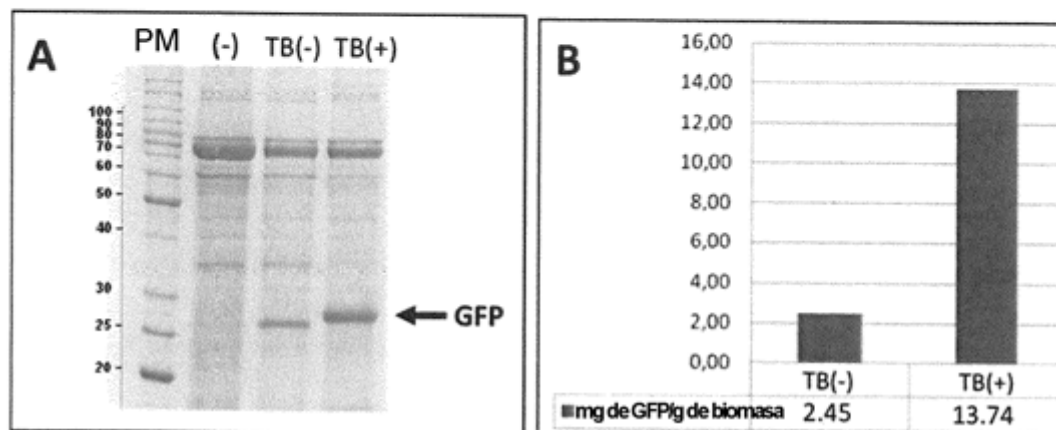


Figura 7

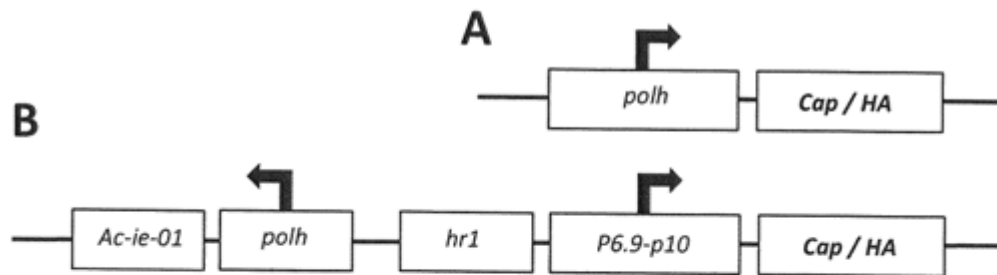


Figura 8

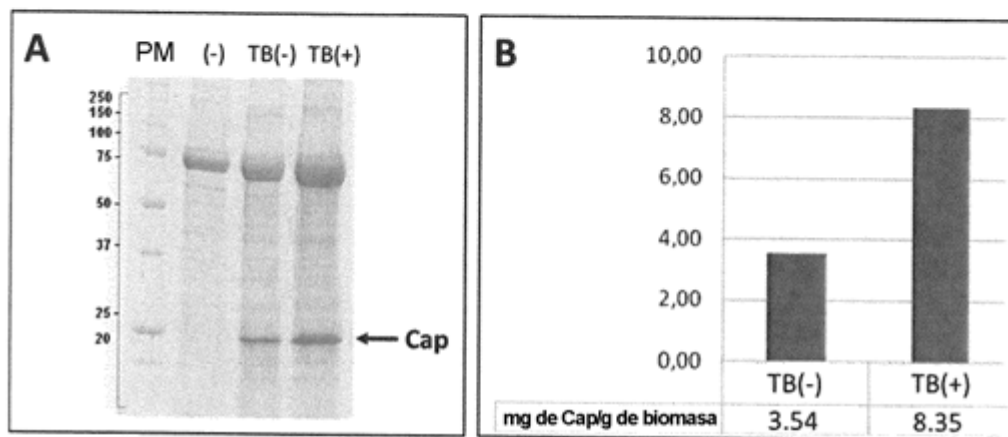


Figura 9

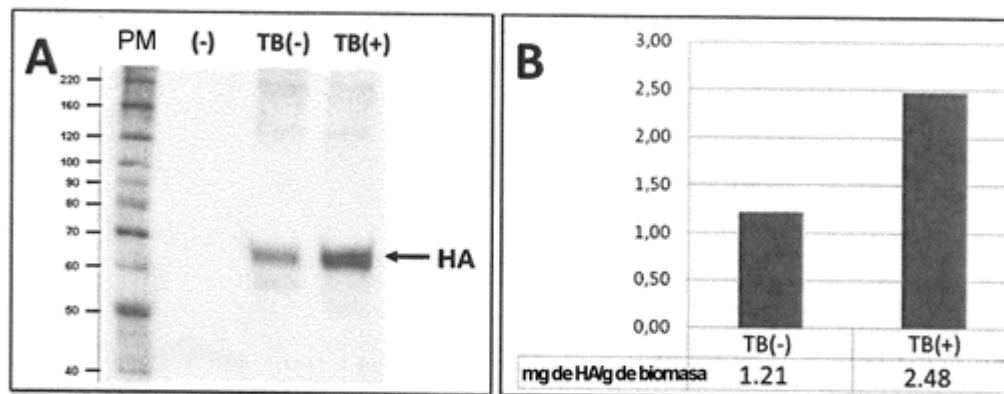


Figura 10

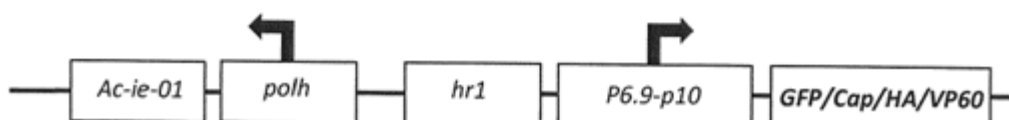


Figura 11

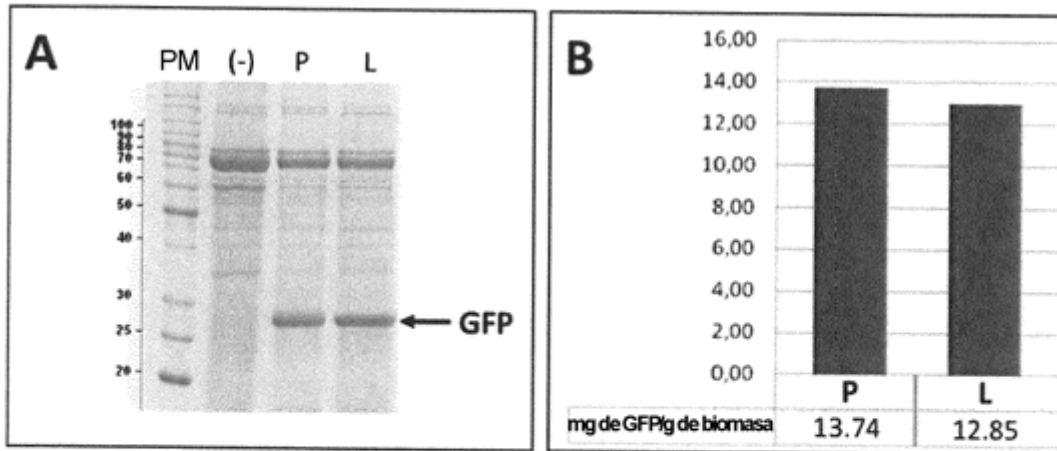


Figura 12

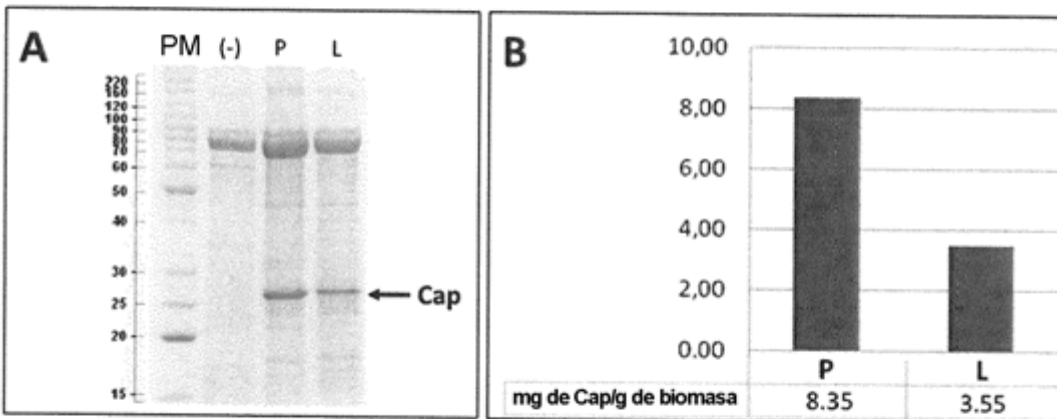


Figura 13

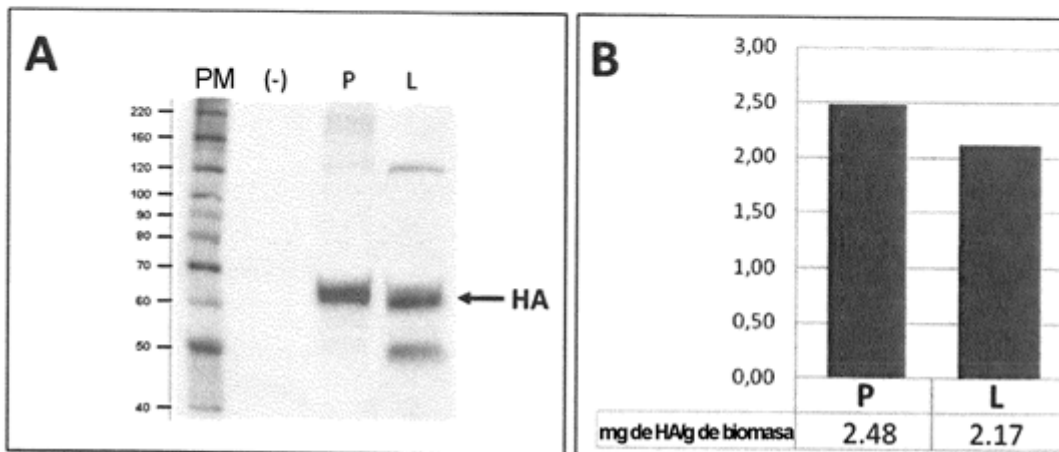


Figura 14

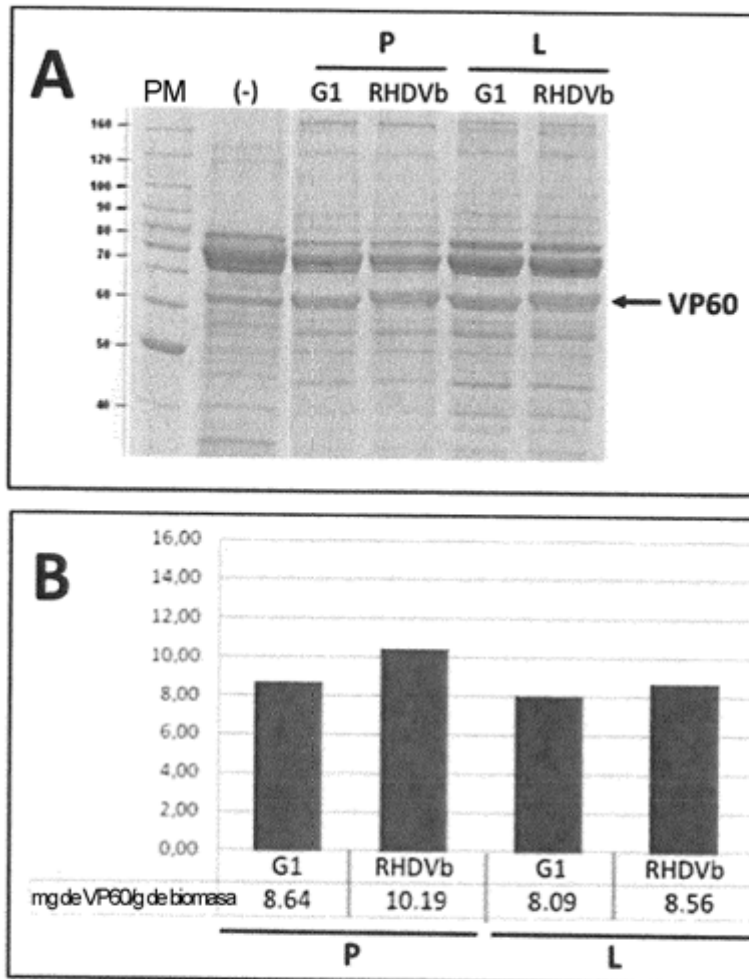


Figura 15

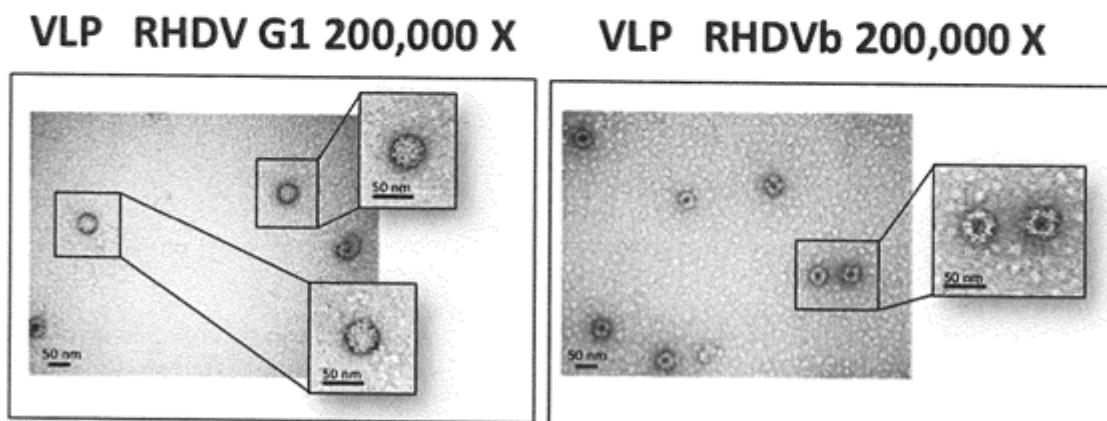


Figura 16

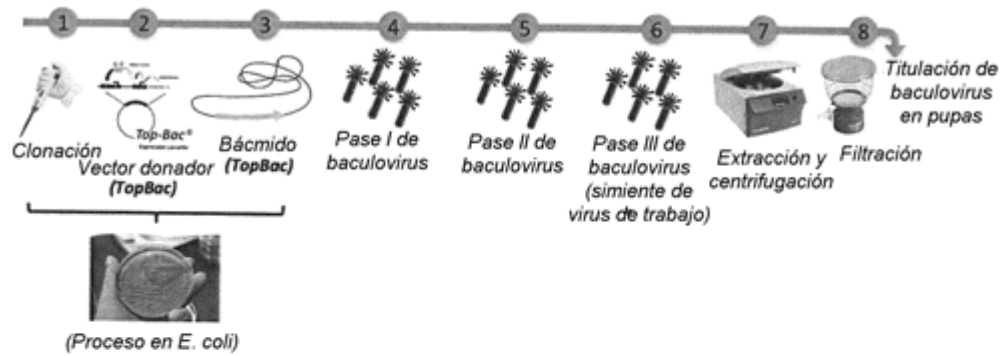


Figura 17

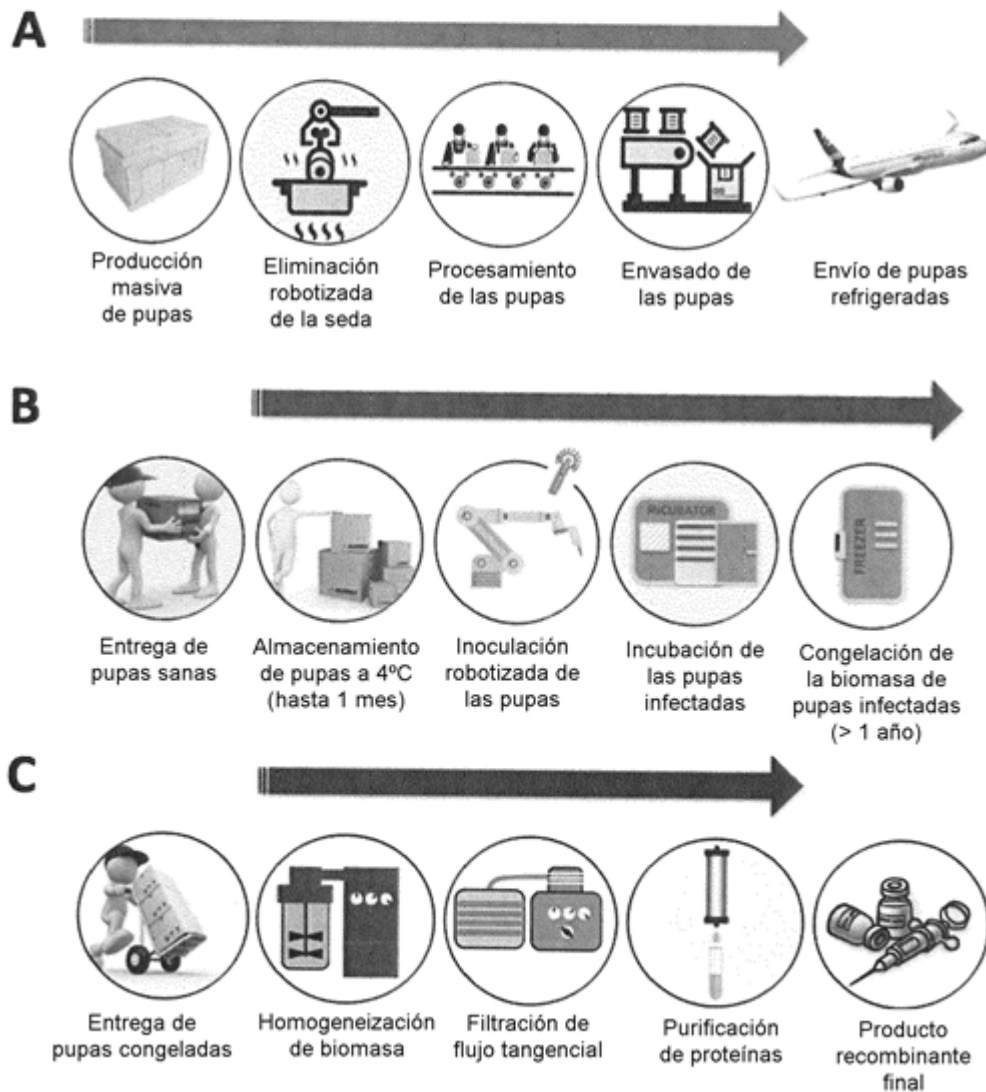


Figura 18

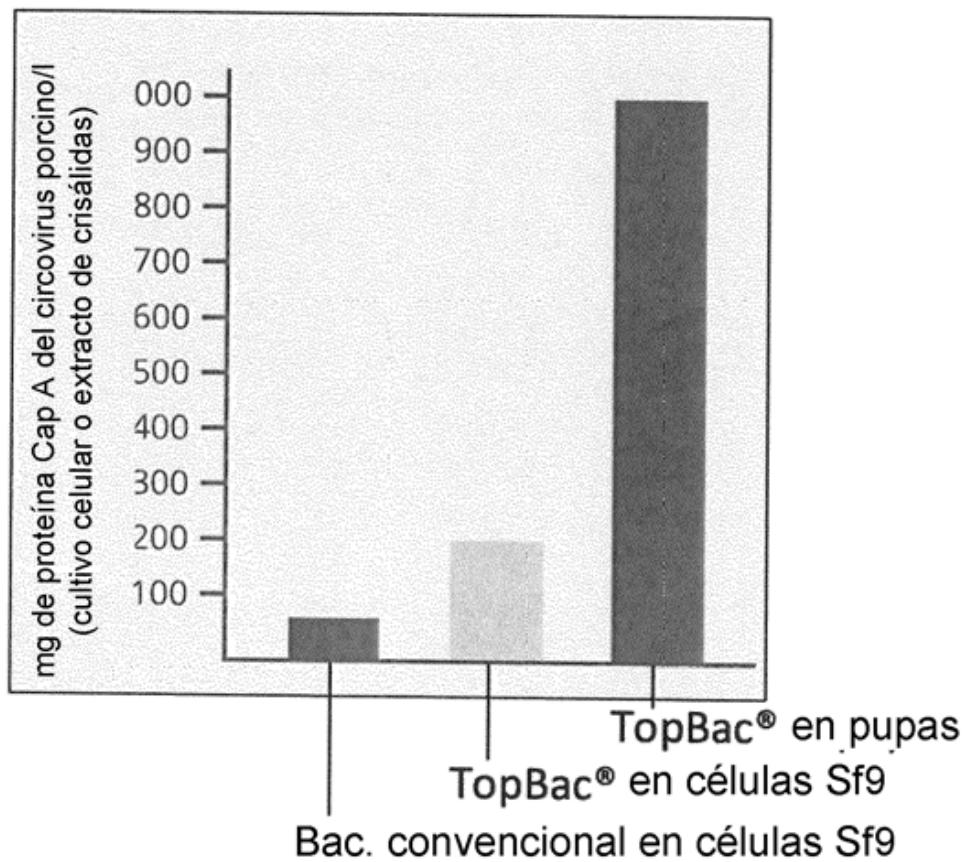


Figura 19

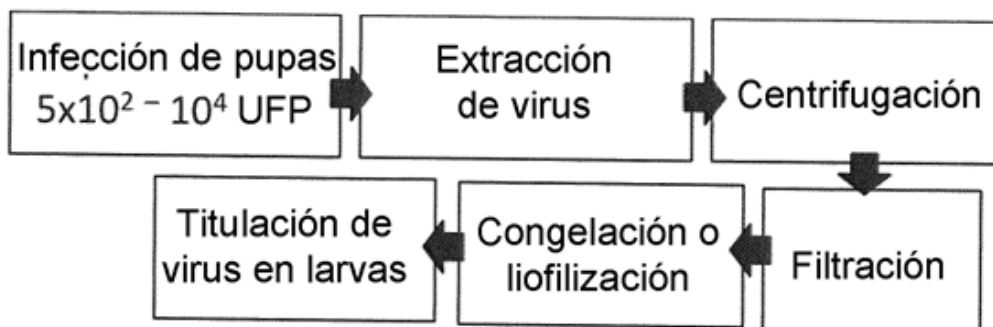


Figura 20

