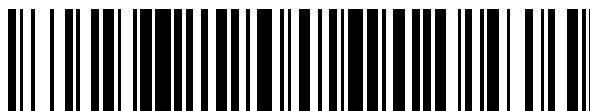


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 787 261**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2016** **PCT/US2016/032421**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2016** **WO16187027**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2016** **E 16797022 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020** **EP 3294329**

54 Título: **Nuevos vectores de baculovirus y métodos de uso**

30 Prioridad:

15.05.2015 US 201562162139 P

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

15.10.2020

73 Titular/es:

REBER GENETICS CO., LTD. (100.0%)
3F No. 25-1 Sec. 4 Ren-ai Rd. Da-an District
Taipei City, Taiwan 10685, TW

72 Inventor/es:

CHANG, CHIA-JUNG;
LIAO, YAN-CHIOU;
CHOU, WEI-I y
CHANG, HSIU-KANG

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 787 261 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

Nuevos vectores de baculovirus y métodos de uso

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a baculovirus recombinantes.

5 Antecedentes de la invención

El baculovirus infecta insectos y no es patógeno para los humanos, pero puede transducir una amplia gama de células de mamíferos y aves. Gracias a la bioseguridad, la gran capacidad de clonación, la baja citotoxicidad y la naturaleza de no replicación en las células transducidas, así como la facilidad de manipulación y producción, el baculovirus ha ganado una popularidad explosiva como vector de administración de genes para una amplia variedad de aplicaciones, tales como terapia antiviral, terapia contra el cáncer, medicina regenerativa y vacunas.

La patente de los Estados Unidos No. 7.527.967 (o US 2005/0208066) describe un baculovirus recombinante que muestra un polipéptido heterólogo de fusión en la superficie del baculovirus para usar en la generación de un anticuerpo o una respuesta inmune contra una proteína o virus heterólogo en un sujeto que requiera del mismo. Los polipéptidos heterólogos de fusión se preparan fusionando un antígeno heterólogo con los aminoácidos del extremo terminal carboxilo de 227 a 529 de la proteína GP64 de baculovirus (Figura 2C). El constructo contiene una porción sustancial del dominio extracelular de GP64 que incluye el sitio de unión a B12D5. Cuando se usa en la inmunización, el dominio extracelular de GP64 puede provocar una respuesta inmune y producir anticuerpos no deseados, tales como el anticuerpo B12D5 anti-GP64 inútil (Zhou et al., Virology 2006; 352 (2): 427-437). El anticuerpo B12D5 GP64 es un anticuerpo de neutralización contra el baculovirus en sí mismo en lugar de un antígeno foráneo de interés. Además, el baculovirus es ligeramente inmunogénico para el porcino.

La patente taiwanesa No. 1368656 describe un método para usar el péptido señal, el dominio transmembrana y el dominio de transducción citoplasmático de GP64 para presentar un antígeno. El constructo contiene solo el dominio transmembrana y el dominio de transducción citoplasmático sin el dominio extracelular de GP64 (Figura 2D). Tiene menos expresión de antígeno foráneo y es sensible a los reactivos de inactivación (Premanand et al., PLoS ONE 2013; 8 (2): e55536).

Por lo tanto, existe una necesidad hasta ahora no abordada en la técnica para abordar las deficiencias e insuficiencias mencionadas anteriormente, especialmente en relación con un vector de baculovirus que es insensible al reactivo de inactivación y tiene inmunogenicidad mejorada.

Spenger et al., (Eur. J. Biochem. 269, 4458-4467, 2002) describen la alteración de las propiedades de superficie del baculovirus Autographa californica NPV mediante mutagénesis de inserción de la proteína de envoltura gp64.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende un transgén que codifica una proteína de fusión, comprendiendo la proteína de fusión: (a) un péptido señal situado en el extremo terminal N de la proteína de fusión; (b) un antígeno; y (c) una región del extremo terminal C de la proteína GP64 de la envoltura del baculovirus, que comprende al menos 100 residuos de aminoácidos de longitud y que carece de un epítipo de unión a B12D5 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 3 ubicada dentro de la región básica central de la proteína GP64; en la que el antígeno se encuentra en el extremo terminal C del péptido señal.

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende un transgén que codifica una proteína de fusión, comprendiendo la proteína de fusión:

(a) un péptido señal situado en el extremo terminal N de la proteína de fusión;

(b) un antígeno; y

(c) una región del extremo terminal C de la proteína GP64 de la envoltura del baculovirus, que tiene al menos 100 residuos de aminoácidos de longitud y que carece de un epítipo de unión a B12D5 ubicado dentro de la región básica central de la proteína GP64 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;

en la que el antígeno se encuentra en el extremo terminal C del péptido señal.

En una realización de la invención, el vector de la invención es un baculovirus recombinante.

En otro aspecto, la invención se refiere a un baculovirus recombinante que presenta en su envoltura una proteína de fusión, comprendiendo la proteína de fusión: (i) un antígeno heterólogo; y (ii) una región del extremo terminal C de la proteína GP64 de la envoltura del baculovirus, que comprende al menos 100 residuos de aminoácidos de longitud y que carece de un epítipo de unión a B12D5 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 3 ubicada dentro de la región básica central de la proteína GP64; en la que el antígeno heterólogo se localiza en el

extremo terminal N de la proteína de fusión que se presenta en la envoltura del baculovirus recombinante.

Además, en otro aspecto, la invención se refiere a un baculovirus recombinante que presenta en su envoltura una proteína de fusión, comprendiendo la proteína de fusión:

(i) un antígeno heterólogo; y

- 5 (ii) una región del extremo terminal C de la proteína GP64 de la envoltura del baculovirus, que comprende al menos 100 residuos de aminoácidos de longitud y que carece de un epítipo de unión a B12D5 ubicado dentro de la región básica central de la proteína GP64 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;

en la que el antígeno heterólogo se localiza en el extremo terminal N de la proteína de fusión que se presenta en la envoltura del baculovirus recombinante.

- 10 En una realización de la invención, el genoma del baculovirus recombinante comprende un transgén que codifica una proteína de fusión que comprende: (a) un péptido señal; (b) el antígeno heterólogo; y (c) la región del extremo terminal C de la proteína GP64 de la envoltura del baculovirus; en la que el antígeno se encuentra en el extremo terminal C del péptido señal.

- 15 En otra realización de la invención, el transgén está operativamente unido a un promotor. En otra realización de la invención, el promotor es polihedrina.

En otra realización de la invención, la región del extremo terminal C de la proteína GP64 tiene una longitud de 186 a 220 aminoácidos.

En otra realización de la invención, la región del extremo terminal C de la proteína GP64 carece de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, 3 o 4.

- 20 En otra realización de la invención, la región del extremo terminal C de la proteína GP64 comprende los aminoácidos de 293 a 512 de la SEQ ID NO: 1.

En otra realización de la invención, la región del extremo terminal C de la proteína GP64 comprende aminoácidos de 327 a 512 de la SEQ ID NO: 1.

- 25 En otra realización de la invención, la región del extremo terminal C de la proteína GP64 tiene un extremo terminal N que comienza entre los residuos de aminoácidos 292 y 328 de la SEQ ID NO: 1.

En otra realización de la invención, el péptido señal comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

Además, en otro aspecto, la invención se refiere a una célula de insecto o una célula que comprende el vector o el baculovirus recombinante de la invención.

- 30 En otra realización de la invención, el antígeno es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en una proteína patógena, una proteína de células cancerosas y una proteína de punto de control inmune.

- 35 El patógeno puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en virus del papiloma humano, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, virus de inmunodeficiencia humana-1, virus del dengue, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, circovirus porcino 2, virus de la peste porcina clásica, virus de la fiebre aftosa, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la gastroenteritis transmisible, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la influenza, virus de la pseudorrabia, parvovirus, virus de la enfermedad vesicular porcina, poxvirus, rotavirus, neumonía por micoplasma, virus del herpes, bronquitis infecciosa y virus de la enfermedad infecciosa de la bursa. El cáncer puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de mama, melanoma, linfomas, carcinoma de colon, carcinoma hepatocelular y cualquier combinación de los mismos. El punto de control inmune puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en PD-1, PD-L1, PD-L2 y CTLA-4.

En otra realización de la invención, el antígeno es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en la glicoproteína E2 de la envoltura del virus de la peste porcina clásica, la proteína S1 del virus de la diarrea epidémica porcina, la proteína 1 de muerte celular programada y un antígeno asociado a tumor.

- 45 Aún en otro aspecto, la invención se refiere a un vector o un baculovirus recombinante de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento para provocar una respuesta inmunogénica específica de antígeno en un sujeto que lo necesite.

- 50 Estos y otros aspectos serán evidentes a partir de la siguiente descripción de la realización preferida tomada junto con los siguientes dibujos. Los dibujos adjuntos ilustran una o más realizaciones de la invención y, junto con la descripción escrita, sirven para explicar los principios de la invención. Siempre que sea posible, se usan los mismos números de referencia en todos los dibujos para referirse a los mismos elementos o elementos similares de una realización.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es un dibujo esquemático que ilustra un diseño de plataforma de vector de baculovirus de acuerdo con una realización de la invención.

5 La Figura 1B es un dibujo esquemático que ilustra un antígeno foráneo o genes foráneos que no solo se pueden anclar en la envoltura del virus sino que también se expresan en la fracción de membrana de las células de insecto mediante una plataforma de presentación en la superficie de gBac. El rectángulo representa un virus.

La Figura 2A es un dibujo esquemático que muestra una proteína GP64 de longitud completa. GP64 mínimo (GP64₃₂₇₋₄₈₂), dominio transmembrana GP64 (TM) (GP64₄₈₃₋₅₀₅); dominio de transducción citoplasmático (CTD) (GP64₅₀₆₋₅₁₂).

10 La Figura 2B es un dibujo esquemático que muestra un vector de baculovirus de acuerdo con una realización de la invención. SP: péptido señal; TM: dominio transmembrana, CTD: dominio de transducción citoplasmático.

La Figura 2C es un dibujo esquemático que muestra un diseño de vector de baculovirus descrito en la patente de los Estados Unidos No. 7.527.967.

La Figura 2D es un dibujo esquemático que muestra un diseño de vector de baculovirus descrito en la patente de Taiwán No. 1368656.

15 La Figura 3 es un gráfico que muestra una respuesta inmune inducida por vectores de baculovirus en ratones después de la vacunación (panel izquierdo) y la medición del título de suero de neutralización (SN) de la vacuna de la subunidad E2-gBac (panel derecho) en ratones. Cada valor de ELISA que se muestra es un valor promedio de 5 ratones. La diferencia entre los grupos gBac y Bac es estadísticamente significativa, $P \leq 0,05$. La cepa de baculovirus utilizada fue AcNPV. El término "SN" significa suero de neutralización. El término "E2-gBac" significa "vector de baculovirus CSFV E2-gBac" de acuerdo con el diseño del vector de la Figura. 2B. El término "E2-gBac (inactivado)" significa que el baculovirus se inactivó antes de usarse para la inmunización. El término "E2-Bac" significa "vector de baculovirus CSFV E2-Bac" de acuerdo con el diseño del vector de la Figura 2D

20 La Figura 4 es un gráfico que muestra una respuesta inmune inducida por vectores de baculovirus en cerdos después de la vacunación. Cada valor de ELISA que se muestra es un valor promedio de 3 cerdos. La diferencia entre los grupos gBac y gp64 es estadísticamente significativa, $P \leq 0,05$. El término "E2-gp64" significa "vector de baculovirus CSFV E2-gp64" de acuerdo con el diseño del vector de la Figura 2C.

25 La Figura 5 es un gráfico que muestra títulos de anticuerpos contra el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) en 3 cerdos libres de patógenos específicos (SPF) después de la vacunación con el vector de baculovirus PEDV S1-gBac. Los 3 cerdos SPF fueron etiquetados como los números 73, 74 y 75, respectivamente. El término "IFA" significa anticuerpo inmunofluorescente. Los resultados indicaron que el suero de los cerdos vacunados podría ser reconocido por el virus de la PED.

30 Las Figuras 6A-B son fotografías de transferencias Western que muestran que se detectaron los antígenos E2 de CSFV E2-gBac (Figura 6A) y S1 de PEDV S1-gBac (Figura 6B) de las muestras de células Sf9.

35 Las Figuras 6C-D son fotografías de transferencias Western que muestran que los antígenos de hPD-1-gBac en las muestras fueron reconocidos y detectados por el mAb anti-gp64 (panel izquierdo) y el anticuerpo PD-1 humano (panel derecho), respectivamente.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describe más particularmente en los siguientes ejemplos que pretenden ser solo ilustrativos. Varias realizaciones de la invención se describen ahora en detalle.

40 Definiciones

Un vector es un vehículo utilizado para transferir material genético a una célula objetivo. Un vector viral es un virus modificado para suministrar material genético foráneo en una célula.

El término "transducción génica", "transducir" o "transducción" es un proceso mediante el cual se introduce un ADN foráneo en otra célula a través de un vector viral.

45 Una secuencia señal o péptido señal (a veces denominada secuencia señal, señal de direccionamiento, señal de localización, secuencia de localización, péptido de tránsito, secuencia líder o péptido líder) es un péptido corto (de 5 a 30 aminoácidos de longitud) presente en el extremo terminal N de la mayoría de las proteínas recién sintetizadas que están destinadas a la vía secretora. Estas proteínas incluyen aquellas que residen dentro de ciertos orgánulos (el retículo endoplásmico, golgi o los endosomas), secretadas por la célula o insertadas en la mayoría de las membranas celulares.

50 El término "B12D5" se refiere a un anticuerpo monoclonal contra gp64. B12D5 tiene un epítipo de unión de

KKRPPTWRHNV (SEQ ID NO: 3) en 277-287 de gp64 (SEQ ID NO: 1), o HRVKKRPPTW (SEQ ID NO: 2) ubicado dentro de la región central de los residuos 271 a 292 (SEQ ID NO: 4) de gp64 (SEQ ID NO: 1). Véase Zhou et al., (2006) citado anteriormente; Wu et al., (2012) "A pH-Sensitive Heparin-Binding Sequence from Baculovirus gp64 Protein Is Important for Binding to Mammalian Cells but Not to Sf9 Insect Cells" Journal of Virology, Vol. 86 (1) 484-491.

La proteína 1 de muerte celular programada, también conocida como PD-1 y CD279 (grupo de diferenciación 279), es una proteína que en los humanos está codificada por el gen *PDCD1*. PD-1 es un receptor de superficie celular que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y se expresa en células T y células pro-B. PD-1 une dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. PD-1, que funciona como un punto de control inmunitario, desempeña un papel importante en la subregulación del sistema inmunitario al evitar la activación de las células T, lo que a su vez reduce la autoinmunidad y promueve la auto tolerancia. El efecto inhibidor de PD-1 se logra a través de un mecanismo dual de promoción de la apoptosis (muerte celular programada) en células T específicas de antígeno en los ganglios linfáticos mientras se reduce simultáneamente la apoptosis en las células T reguladoras (células T supresoras). Una nueva clase de medicamentos que bloquean la PD-1, los inhibidores de la PD-1, activan el sistema inmunitario para atacar tumores y, por lo tanto, se usan con un éxito variable para tratar algunos tipos de cáncer.

Un antígeno puede ser una proteína, polipéptido o péptido patógeno que es responsable de una enfermedad causada por el patógeno o es capaz de inducir una respuesta inmunológica en un huésped infectado por el patógeno, o antígeno asociado a tumor (TAA) que es un polipéptido expresado específicamente en células tumorales. El antígeno puede seleccionarse de un patógeno o células cancerosas que incluyen, entre otros, virus del papiloma humano (HPV), virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), virus de inmunodeficiencia humana-1 (HIV-1), virus del dengue, virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis B (HBV), circovirus porcino 2 (PCV2), virus de la peste porcina clásica (CSFV), virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), virus de la influenza, virus de la pseudorrabia, parvovirus, virus de la pseudorrabia, virus de la enfermedad vesicular porcina (SVDV), poxvirus, rotavirus, neumonía por micoplasma, virus del herpes, bronquitis infecciosa o virus de la enfermedad infecciosa de la bursa, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de mama, melanoma, linfomas, carcinoma de colon, carcinoma hepatocelular y cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, la proteína E7 del HPV (E7), la proteína del núcleo del HCV (núcleo del HCV), proteína X del HBV (HBx) se seleccionaron como antígenos para el desarrollo de la vacuna. El antígeno puede ser un antígeno de fusión de una fusión de dos o más antígenos seleccionados de una o más proteínas patógenas. Por ejemplo, un antígeno de fusión de fragmentos ORF6 y ORF5 del PRRSV, o una fusión de antígenos de patógenos del PRRSV y PCV2.

Como alternativa, un antígeno puede ser una proteína inhibidora del punto de control inmunitario, tal como PD-1, PD-L1, PD-L2 y CTLA-4, etc.

Los términos "proteína de punto de control inmunitario" y "punto de control inmunitario" son intercambiables. Los puntos de control inmunitarios afectan el funcionamiento del sistema inmunitario. Los puntos de control inmunitarios pueden ser estimulantes o inhibitorios. Los tumores pueden usar estos puntos de control para protegerse de los ataques del sistema inmunitario. La terapia de puntos de control puede bloquear los puntos de control inhibitorios, restaurando la función del sistema inmune. Una interacción ligando-receptor bajo investigación es la interacción entre la proteína de muerte celular programada transmembrana 1 (PDCD1, PD-1; también conocida como CD279) y su ligando, el ligando 1 de PD-1 (PD-L1, CD274). PD-L1 en la superficie celular se une a PD1 en una superficie celular inmune, lo que inhibe la actividad celular inmune. Entre las funciones de PD-L1 hay un papel regulador clave en las actividades de las células T. Parece que la sobreexpresión (mediada por el cáncer) de PD-L1 en la superficie celular puede inhibir las células T que de otro modo podrían atacar. Los anticuerpos que se unen a PD-1 o PD-L1 y, por lo tanto, bloquean la interacción pueden permitir que las células T ataquen el tumor. Ipilimumab es el primer anticuerpo de punto de control aprobado por la FDA. Bloquea el punto de control inmunitario inhibitorio de CTLA-4.

El término "tratar" o "tratamiento" se refiere a la administración de una cantidad efectiva de la proteína de fusión a un sujeto que lo necesita, que tiene cáncer o infección, o un síntoma o predisposición a dicha enfermedad, con el fin de curar, aliviar, mitigar, remediar, mejorar o prevenir la enfermedad, los síntomas o la predisposición hacia ella. Tal objetivo puede ser identificado por un profesional de la salud con base en los resultados de cualquier método de diagnóstico adecuado.

El término "una cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de un compuesto activo que se requiere para conferir un efecto terapéutico sobre el sujeto tratado. Las dosis efectivas variarán, como reconocen los expertos en la materia, dependiendo de la ruta de administración, el uso de excipientes y la posibilidad de uso conjunto con otro tratamiento terapéutico.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de vectores y generación de baculovirus recombinantes, partículas similares a virus y proteínas

La Figura 1A muestra una plataforma gBac. Se puede obtener un gen foráneo (por ejemplo, genes enriquecidos

optimizados del virus E2 de la peste porcina clásica (CSFV) del virus diarrea epidémica porcina (PEDV)) mediante síntesis por PCR y luego clonarse en un vector gBac a través de sitios de enzimas de restricción (por ejemplo, SacI/NotI) utilizando el kit de clonación IN-FUSION® (Clontech). El vector gBac se deriva del vector de transferencia de baculovirus pBACPAK8^{MR} (GENBANK^{MR} número de acceso U02446). Usando la plataforma de presentación en superficie de gBac de la Figura 1A, un antígeno foráneo o genes foráneos pueden anclarse en la envoltura del virus y también expresarse en la fracción de la membrana de células de insecto (Figura 1B). La Figura 2A muestra un GP64 de longitud completa. La proteína de fusión de envoltura GP64 del baculovirus (EFP GP64) es la glicoproteína de fusión principal de la envoltura en algunos, aunque no en todos, los baculovirus. Se encuentra en la superficie de las células infectadas y de los viriones en gemación como un homotrímero. El baculovirus ingresa a sus células huésped por endocitosis, seguido de una fusión de la envoltura viral con la membrana endosómica inducida por un pH bajo, lo que permite la entrada viral al citoplasma celular. Esta fusión de membrana, y también la gemación eficiente de viriones de la célula infectada, depende de GP64.

Las Figuras. 2B-D muestran comparaciones de tres vectores, gBac (o Reber-gBac), antígeno-gp64 (o abreviado como "gp64" descrito en el documento US 7527967) y antígeno-Bac (o abreviado como "Bac" descrito en el documento TW 1368656). El vector gBac se construyó usando el péptido señal (SP) y una región del extremo terminal C de GP64, que es de los aminoácidos 327 a 512 de la SEQ ID NO: 1. El vector gp64 se construyó usando el SP y una región del extremo terminal C de GP64, que es de los aminoácidos 227 a 512 de la SEQ ID NO: 1. El vector Bac comprende el péptido señal (SP) de insecto, el TM (dominio transmembrana) y CTD (dominio de transducción citoplasmático) de GP64 y no comprende los aminoácidos del dominio extracelular GP64. El símbolo de triángulo antes del "SP" representa el promotor de polihedrina, que se encuentra en el sitio -1 del codón de inicio del gen de inserción.

Se generó un fragmento de ADN que codifica el SP y se amplificó por PCR con cebadores directo e inverso 5'-GAGCTCATGGTAAGC-3' (SEQ ID NO: 19) y 5'-AGGCAGAATGCG-3' (SEQ ID NO: 20), respectivamente. La porción del extremo terminal C del gen gp64 (que codifica GP64 de aa 327 a aa 512 de la SEQ ID NO: 1) se generó y amplificó por PCR usando los cebadores directo e inverso 5'-GCGTGTCTGCTCA-3' (SEQ ID NO: 21) y 5'-TTAATATTGTCTA-3' (SEQ ID NO: 22), respectivamente. La porción del extremo terminal C del gen gp64 (que codifica GP64 de aa 227 a aa 512 de la SEQ ID NO: 1) se generó y amplificó por PCR usando los cebadores directo e inverso 5'-ATCAACAAGCTAA-3' (SEQ ID NO: 23) y 5'-TTAATATTGTCTA-3' (SEQ ID NO: 24), respectivamente. Los genes foráneos anteriores se clonaron respectivamente en el vector de transferencia pBACPAK8^{MR}.

Usando la plataforma gBac de 2B (o la Figura 1A), se generaron dos vectores de baculovirus: el vector de baculovirus E2-gBac de CSFV y el vector de baculovirus S1-gBac de PEDV (diseño de la Figura 2B). El primero transduce un gen que codifica la glicoproteína E2 de la envoltura del virus de la peste porcina clásica (CSFV), y el segundo transduce un gen que codifica la proteína S1 del virus de la diarrea epidémica porcina.

Para una comparación paralela, también se usaron los vectores de las Figuras 2C y 2D y generaron dos vectores de baculovirus separados: el vector de baculovirus E2-gp64 de CSFV (diseño de la Figura 2C) y el vector de baculovirus E2-Bac de CSFV (diseño de la Figura 2D) para transducir un gen foráneo que codifica el antígeno E2 de CSFV.

Los genes de fusión en los vectores gBac, gp64 y Bac (diseños de las Figuras 2B-D, respectivamente) se secuenciaron para confirmar sus identidades. Los virus de baculovirus recombinantes que contienen el gen GP64 recombinante sin la cadena principal del vector de transferencia se generaron por recombinación homóloga. Los métodos para esta construcción y recombinación son bien conocidos en la técnica. Estos virus recombinantes se usaron para preparar antígenos. El gen GP64 modificado se insertó en un vector de transferencia de baculovirus bajo el promotor poliedro por PCR para formar el vector gBac. Debido a que el vector gBac tiene dos sitios de recombinación homólogos, el locus poliedro original del baculovirus de tipo silvestre se reemplaza por la secuencia de gBac cuando se cotransfecta con plásmido gBac y baculovirus de tipo silvestre.

Ejemplo 2

Expresión de proteínas y purificación de antígenos

Se usaron células Sf9 para propagación e infección de baculovirus recombinante. El baculovirus se propagó en líneas celulares Sf-9 *Spodoptera frugiperda* y se hizo crecer a 26 °C en un medio sin suero. Los baculovirus recombinantes se produjeron infectando células Sf-9 a una MOI de 5-10 y se recolectaron 3 días después de la infección. Para producir baculovirus a gran escala, las células pueden cultivarse e infectarse en biorreactores. La fracción de baculovirus se aisló del sobrenadante de cultivo de la célula infectada. Las partículas de baculovirus se recogieron por filtración de flujo tangencial (TFF) usando una membrana adecuada de corte de proteína y una membrana estéril de 0,45 µm.

Para probar la producción de los antígenos, los baculovirus parcialmente purificados o los lisados celulares infectados se sometieron a electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8-10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los antígenos foráneos se detectaron mediante mAb anti-gp64 de ratón (disponible a través de fuentes comerciales y utilizado a una dilución 1:5.000) como el anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios fueron mAb anti-conejo de cabra o anti-ratón de cabra conjugados con fosfatasa alcalina (dilución 1:5.000). Las bandas de proteínas se visualizaron con los reactivos de detección de transferencia Western ECL PLUS^{MR}.

(GE Healthcare). En el sistema de presentación en superficie del baculovirus, los antígenos anteriores se pueden expresar primero en la membrana celular del insecto, luego el baculovirus incipiente toma parte de la membrana celular para formar su envoltura. Como resultado, los antígenos de presentación de baculovirus se pueden recolectar del lisado celular infectado (fracción de membrana) y la superficie del virus.

5 Ejemplo 3

Expresión de los antígenos por virus recombinantes

Antes de la inmunización con vacunas de gBac, para confirmar si la proteína de fusión E2-gBac de CSFV o S1-gBac e PEDV se presentaron con éxito en la envoltura de baculovirus, se recogieron baculovirus recombinantes por centrifugación y TFF. Los baculovirus recombinantes se resuspendieron en PBS a diferentes concentraciones de pfu / μ L. La incorporación de proteínas recombinantes en las partículas de baculovirus se analizó mediante transferencia Western usando mAb anti-gp64 (eBioscience). La proteína de fusión E2-gBac de CSFV se detectó con un peso molecular de aproximadamente 80 kDa y la proteína de fusión S1-gBac de PEDV se detectó con un peso molecular de 130 kDa.

Ejemplo 4

15 Preparación de la vacuna e inmunización

Los baculovirus recombinantes que presentan antígenos se mezclaron con adyuvante de agua en aceite en agua (w /o/w) (MONTANIDE ISA 206 VG. SEPPIC.) para la preparación de la vacuna. Los ratones BALB/c hembra de 4 semanas de edad, adquiridos a través del Centro Experimental Nacional de Animales, Taiwán, R.O.C., se dividieron en cuatro grupos con 5 ratones por grupo. Los ratones se inmunizaron por vía subcutánea dos veces el día 0 y el día 14 (Figura 3) con 200 μ L de una solución que contenía 10^7 pfu de baculovirus recombinante. El virus de E2-gBac, E2-gp64 y E2-Bac. (Figuras 2B-D), que contiene la glicoproteína E2 de la envoltura de CSFV, se inactivaron y se formularon como vacunas. Como controles negativos, se inyectó a los ratones baculovirus de tipo silvestre (10^7 pfu) o PBS. Las muestras de sangre se recogieron de la vena caudal en la semana 6. Se usó etilenimina binaria (BEI) para inactivar los baculovirus. Se preparó disolviendo el bromhidrato de 2-bromoetilamina (BEA) 0,1 M en NaOH 0,2 N a 37 °C durante 1 h. Para inactivar el baculovirus, se añadió el medio viral BEI 4 mM y se incubó el virus durante 16 horas a 37 °C. Después de la inactivación, se añadió tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) al medio a una concentración final de 10 veces la concentración final de BEI para detener la inactivación.

Ejemplo 5

Inmunogenicidad de antígenos producidos por virus recombinantes

Después de la inmunización, se analizaron los suero de ratones por la presencia de anticuerpos E2 anti-CSFV utilizando el kit de prueba de Ab de CSFV IDEXX (IDEXX) para detectar anticuerpos del virus de la peste porcina clásica (CSFV). El grado de anticuerpos específicos de E2 de CSFV en el suero se calculó como positivo cuando el porcentaje de bloqueo era superior al 40% (Figura 3). Los resultados indican que el vector de baculovirus presentó la proteína de fusión E2-Bac de CSFV. La Figura 3 muestra que el vector de baculovirus E2-gBac de CSFV, tanto si el baculovirus se inactivó como si no, indujo un título de anticuerpo E2 anti-CSFV mucho mayor que el vector de baculovirus E2-Bac de CSFV en ratones.

También se compararon los efectos de los tres vectores de baculovirus en la inducción de respuestas inmunogénicas en cerdos. Se inmunizaron tres cerdos SPF (sin patógenos específicos) dos veces (6 semanas y 9 semanas) por vía intramuscular con 10^8 pfu de vectores de baculovirus recombinantes E2-gBac, E2-gp64, E2-Bac y PBS, respectivamente. Después de la inmunización, los sueros de lechones se analizaron para detectar la presencia del anticuerpo E2 de CSFV usando el kit de prueba Ab CSFV de IDEXX (IDEXX). El grado de anticuerpos de neutralización específicos de E2 de CSFV en el suero se calculó como positivo y eficiente cuando el porcentaje de bloqueo fue superior al 43%.

Como se muestra en la Figura 4, los cerdos inmunizados con E2-gBac pudieron sobrevivir al desafío del CSFV. Indica que se había inducido un anticuerpo de neutralización competente en los cerdos (título SN ≥ 16 , relación de bloqueo IDEXX $\geq 43\%$). Esto prueba que la plataforma gBac es una plataforma de vacuna. La Figura 4 muestra que el vector de baculovirus E2-gBac de CSFV indujo un título de anticuerpo E2 anti-CSFV mucho mayor que los vectores de baculovirus E2-Bac de CSFV y E2-gp64 de CSFV en cerdos. Los resultados indican que la plataforma de presentación en superficie de gBac de la invención puede inducir una inmunidad más fuerte que los vectores de baculovirus de la técnica anterior.

También se ha generado un vector de baculovirus para transducir la proteína S1 del virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV S1) en células para aplicaciones de vacunación. Se probaron sus efectos al inducir una respuesta inmunogénica. En resumen, tres cerdos SPF de 9 semanas de edad (marcados con los números 73, 74 y 75, respectivamente) se inmunizaron cada uno dos veces por vía intramuscular con 10^8 pfu del vector de baculovirus recombinante S1-gBac de PEDV o PBS. Después de la inmunización, los sueros de cerdos (de 1 a 4 semanas después de la vacunación) se analizaron para detectar la presencia de anticuerpos anti-PEDV usando un ensayo ELISA de

virus de PED. La Figura 5 muestra que el vector de baculovirus S1-gBac de PEDV indujo títulos de anticuerpos contra el virus de la diarrea epidémica porcina en los 3 cerdos.

Las Figs. 6A-B son fotografías de transferencias Western que muestran que se detectaron los antígenos E2 de E2-gBac de CSFV (Figura 6A) y S1 de S1-gBac de PEDV (Figura 6B) de las muestras de células Sf9. Los lisados celulares y el virus recogido se cargaron con diferentes números de células y títulos de virus. También se construyó la proteína de muerte celular programada humana del vector de baculovirus (hPD-1gBac) -gBac (hPD-1gBac). Para probar la producción del antígeno, los baculovirus recombinantes o los lisados celulares infectados se sometieron a electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8-10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los antígenos foráneos se detectaron mediante un mAb anti-gp64 de ratón (Figura 6C) y un anticuerpo anti-PDCD-1 (Figura 6D) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) como los anticuerpos primarios. Las bandas de proteínas se visualizaron con los reactivos de detección de transferencia Western ECL PLUS^{MR} (GE Healthcare). La Figura 6D muestra que el baculovirus que presentó el antígeno PD-1 humano en la envoltura, y el antígeno PD-1 presentado puede ser reconocido por el anticuerpo comercial anti-PDCD-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

En resumen, el vector de la invención es insensible a los reactivos de inactivación (Figura 3) y exhibe una mayor inmunogenicidad (Figura 4). La Tabla 1 muestra las secuencias de péptidos y las SEQ ID NOs.

Tabla 1

Proteína o péptido	Secuencia de aminoácidos* (SEQ ID NO:)	Longitud de aa
GP64 de longitud completa	<u>MVSAIVLYVLLAAAAHSAFAAEHCNAQMKTGPYKIKNLDITPPKET</u> <u>LQKDVEITIVETDYNENVIIGYKGYQAYAYNGGSLDPNTRVEE</u> <u>TMKTLNVGKEDLLMWSIRQQCEVGEELIDRWGSDSDDCFRDNE</u> <u>GRGQWVKGKELVKRQNNNHFAHHTCNKSWRCGISTSKMYSRL</u> <u>ECQDDTDECQVYILDAEGNPINVTVDTVLHRDGVSMILKQKSTF</u> <u>TTRQIKAACLLIKDDKNNPESVTRHCLIDNDIYDLSKNTWNCK</u> <u>FNRCIKRKVEHRVKKRPPTWRHNVRAKYTEGDTATKGDLMHIQ</u> <u>EELMYENDLLKMNIELMHAIHINKLNNMLHDLIVSVAKVDERLI</u> <u>GNLMNNSVSSTFLSDDTFLMPCTNPPAHTSNCYNNSIYKEGRW</u> <u>VANTDSSQCIDFSNYKELAIIDDDVEFWIPTIGNTTYHDSWKDAS</u> <u>GWSFIAOQKSNLITTMENKFKGGVGTSLSDITSMAEGELAAKLT</u> <u>SFMFGHVVNFIILIVILFLYCMIRNRNRQY</u> (SEQ ID NO: 1)	512
Epítipo de unión a B12D5	HRVKKRPPTW (SEQ ID NO: 2; 274-283 de GP64).	
Epítipo de unión a B12D5	KKRPPTWRHNV (277-287 de gp64; SEQ ID NO: 3)	
Región básica central de Gp64	KVEHRVKKRPPTWRHNVRAKYT (271-292 de gp64; SEQ ID NO: 4)	
Péptido señal (SP) GP64	MVSAIVLYVLLAAAAHSAFA (GP64 ₁₋₂₀ ; SEQ ID NO: 5)	20
proteína de 30K de <i>Bombyx mori</i>	MRLTLFAFVLAVCALASNA (SEQ ID NO: 6)	
SP1 de <i>Bombyx mori</i>	MRVLVLLACLAASA (SEQ ID NO: 7)	
SP2 de <i>Bombyx mori</i>	MKSVLILAGLVAVALSSAVPKP (SEQ ID NO: 8)	
Bombixina A-4	MKILLAIALLMLSTVMWVST (SEQ ID NO: 9)	
Vitelogenina	MKLFVLAIIIAVSS (SEQ ID NO: 10)	

Proteína o péptido	Secuencia de aminoácidos* (SEQ ID NO:)	Longitud de aa
Precursor de quitinasa	MRAIFATLAVLASCAALVQS (SEQ ID NO: 11)	
Hormona adipocinética	MYKLTVFLMFIAF VIIAGAQSMASTRQDLA (SEQ ID NO: 12)	
E2 de CSFV (Glicoproteína E2 de la envoltura del virus de la peste porcina clásica (CSFV)) CSFV 96TD	MLRGQVVQGIIWLLLVTGAQGRLSCKEDHRYAISSTNEIGPLGA EGLTTTWKEYNHGLQLDDGTVRAICIAGSFKV TALNVVSRRYL ASLHKRALPTSVTPELLFDGTSPAIEEMGDDFGFLCPFDTPPVV KGKYNTLLNGSAFYLVCPIGWTGVIECTAVSPTTLRTEVVKTF KREKPPHRVDCVTTIVEKEDLFYCKLGGNWTVCVKGNPVITYTG GQVRQCRWCGFDFKEPDGLPHYPIGKCILTNETGYRVVDSPLDCN RDGVVISTEGEHECLIGNTTVKVHALDGRLAPMPCRPEIVSSA GPVRKTSCTFNYYTKTLRNKYEPDSDYFQQYMLKGEYQYWF DL DVTDHHTDYFAEF (SEQ ID NO: 13)	363
S1 de PEDV	CSANTNFRFFFSKFNVAQAVVVLGGYLP IGENQGVNSTWYCA	708
(Proteína S1 del virus de diarrea epidémica porcina) PEDV USA/ Iowa/1898 4/2013	GQHPTASGVHGFVSHIRGGHGFEIGISQEPFDP SGYQLYLHKAT NGNTNATARLRICQFPSIKTLGPTANNDVTTGRNCLFNKAIPAH MSEHSVVGITWDNDRVTVFSDKIYYFYFKNDSRVATKCYNSG GCAMQYVVEPTYYYMLNVTSAGEDGISYQPCTANCIGYAANVFA TEPNNGHIPEGFSFNNWFLLSNDSTLVHGKVVS NQPLL VNCLLAIP KIYGLGQFFSFNQITIDGVCNGAAVQRAPEALRFNINDTSVILAEG SIVLHTALGTNFSFVCSNNSNPHLATFAIPLGATQVPYYCFFKVD TYNSTVYKFLAVLPPTVREIVITKYGDVYVNGFGYLHLGLLDAV TINFTGHGTDDDVS GFWTIASTNFVDALIEVQGTAIQRILYCDDP VSQ LKCSQVAFDLDDGFYPISSRNLLSHEQPISFVTLPSFNDHSFV NITVSASFSGHSGANLIASDTTNGFSSFCVDTRQFTISLFYNVTN SYGYVSKSQDSNCPFTLQSVNDYLSFSKFCVSTSL LASACTIDLF GYPEFGSGVKFTSLYFQFTKGELITGTPKPLEGVTDV SFMTLDVC TKYTIYGFKGEGII TLTNSSFLAGVYYTSDSGQLLAFKNVTSGAV YSVTPCSFSEQAA YVDDDIVGVISLSSSTFNSTRELPG (SEQ ID NO: 14)	
PD-1 humana (Proteína 1 de muerte celular programada)	QIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWN PPTFFPALLVV TEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQ PGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPK AQIKESLRAELRV TERRAEVPTAHPSPSRPAGQFQTDIY (SEQ ID NO: 15)	170

Proteína o péptido	Secuencia de aminoácidos* (SEQ ID NO:)	Longitud de aa
Proteína B2-gBac (SP-E2-GP64 mini-TM/CTD)	<u>MVSAIVLYVLLAAAAHSAFAM</u> LRGQVVQGIIWLLLVI GAQGR LSC KEDHRYAISSTNEIGPLGAEGLT TTTWKEYNHGLQLDDGT VRAICI AGSEKVTALNVVSRRYLASLHKRALPTSVTFELLFDGTSPAIEEM GDDFGFGLCPFD TTPVVKGKYNTTLLNGSAFYLVCPIGWTGVIE CTAVSPTTLRTEVVKTFKREKPPHRVDCVTTTIVEKEDLFYCKLG GNWTCVKGNPVITYTGGQVRQCRWCGFD FKEPDGLPHYPIGKCI LTNETGYRVVDSPDCNRDGVVISTEGEHECLIGNTTVKVHALDG RLAPMPCRPK EIVSSAGPVRKT SCTFENYKTLRNKYYEPRDSYF QQYMLKGEYQYWFDLDVTDHHTDYAEF <u>INKLNNMLHDLIVS</u> <u>VAKVDERLIGNLMNNSVSSTFLSDDTFLMPCTNPPAHTSN</u> <u>CYN NSIYKEGRWVAN</u> TDSSQCIDFSNYKELAI <u>DDDFEFWIPTIGN</u> <u>TTYHDSWKDASGWSFIAQOKSNLIT</u> MENTKFGGVGTSLSDITSMAE	569
	<u>GELAAKLTSFMFGHV</u> VNFV <u>HLIVILFLYCMIRNRNRQY</u> (SEQ ID NO: 16)	
Proteína S1-gBac (SP-S1-GP64 mini-TM/CTD)	<u>MVSAIVLYVLLAAAAHSAFAC</u> SANTNFRRFFSKFNVQAPAVVVLGG YLPIGENQGVNSTWYCAGQHPTASGVHGIFVSHIRGGHGFEIGIS QEPFDPSGYQLYLHKATNGNTNATARLRICQFPSIKTLGPTANN DVTTGRNCLFNKAIPAHMSEHSVVGITWDNDRVTVFSDKIYYFY FKNDWSRVATKCYNSGGCAMQYVVEPTYMYMLNVT SAGEDGIS YQPCTANCIGYAANVFATEPNGHIPEGFSFNNWFLLSNDSTLVH GKVVSNQPLL VNCLLAIPKIYGLGQFFSFNQ TIDGVCNGAAVQR APEALRFNINDTSVILAEGSIVLHTALGTNFSFVCSNSSNPHLATF AIPLGATQVPYYCFFKVDTYNSTVYKFLAVLPPTVREIVITKYGD VYVNGFGYLHLGLLDAVTINFTGHGTDDDDVSGFWTIAS TNFVD ALIEVQGTAIQRILYCDDPVSQ LKCSQVAFDLDDGFYPISSRNLLS HEQPI SFVTLP SFNDHSFVNITVSASFEGGHSGANLIASDTTNGFSS FCVDTRQFTISLFYNVTNSYGYVSKSQDSNCPFTLQSVNDYLSFS KFCVSTSL LASACTIDLFGYPEFGSGVKFTSLYFQFTKGELITGTP KPLEGVTDVSFMTLDVCTKYTIYGFKGEGIH TLTNSSFLAGVYYT SDSGQLLAFKNVTSGAVYSVTPCSFSEQAAYVDDDIVGVISLSS STFNSTRELPG <u>INKLNNMLHDLIVSVAKVDERLIGNLMNNSVSST</u> <u>FLSDDTFLMPCTNPPAHTSN</u> CYNNSIYKEGRWVAN <u>TDSSQCID</u> <u>FSNYKELAI</u> DDDFEFWIPTIGN <u>TTYHDSWKDASGWSFIAQOKSN</u> <u>LIT</u> MENTKFGGVGTSLSDITSMAE <u>GELAAKLTSFMFGHV</u> VNFV <u>HLIVILFLYCMIRNRNRQY</u> (SEQ ID NO: 17)	914

Proteína o péptido	Secuencia de aminoácidos* (SEQ ID NO:)	Longitud de aa
Proteína hPD1-gBac protein (SP-hPD1-GP64 mini-TM/CTD)	<u><i>MTSAIVLYVLLAAAAHSAFA</i></u>QIPQAPWPVWAVLQLGWRPGWFL DSPDRPWNPPTFEPALLVVTEDGNATFTCSFSNTSESFVLNWYR MSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVR ARRNDSGTYLCAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPS PSPRPAGQFQTDIY<u><i>INKLNNMLHDLIVSVAKVDERLIGNLMNNS</i></u> <u><i>VSSTFLSDDITFLMPCTNPPAHTSNCYNNSIYKEGRWVANTDSS</i></u> <u><i>QCIDFSNYKELAIDDDEFWIPTIGNTTYHDSWKDASGWSFIAQ</i></u> <u><i>QKSNLITTMENKFGGVGTSLSDITSMAEGELAAKLTSFMFGHV</i></u> VNFVHILIVILFLYCMIRNRNRQY (SEQ ID NO: 18)	376
*GP64 de longitud completa: el péptido señal (SP) GP64 (GP64₁₋₂₀) está subrayado y en cursiva. El GP64 mínimo (GP64₃₂₇₋₄₈₂) está subrayado sin cursiva. El dominio transmembrana (TM) GP64 (GP64₄₈₃₋₅₀₅) está en negrita solamente. El dominio de transducción citoplasmático (CTD) GP64 (GP64₅₀₆₋₅₁₂) está solo en cursiva. Proteína E2-gBac (SP-E2-GP64 mini-TM/CTD): el péptido señal (SP) GP64 (GP64₁₋₂₀) está subrayado y en cursiva. El GP64 mínimo (GP64₃₂₇₋₄₈₂) está subrayado sin cursiva. El dominio transmembrana (TM) GP64 (GP64₄₈₃₋₅₀₅) está en negrita solamente. El dominio de transducción citoplasmática (CTD) GP64 (GP64₅₀₆₋₅₁₂) está solo en cursiva. Proteína S1-gBac (SP-S1-GP64 mini-TM/CTD): el péptido señal (SP) GP64 (GP64₁₋₂₀) está subrayado y en cursiva. El GP64 mínimo (GP64₃₂₇₋₄₈₂) está subrayado sin cursiva. El dominio transmembrana (TM) GP64 (GP64₄₈₃₋₅₀₅) está en negrita solamente. El dominio de transducción citoplasmática (CTD) GP64 (GP64₅₀₆₋₅₁₂) está solo en cursiva. Proteína hPD1-gBac (SP-hPD1-GP64 mini-TM/CTD): el péptido señal (SP) GP64 (GP64₁₋₂₀) está subrayado y en cursiva. El GP64 mínimo (GP64₃₂₇₋₄₈₂) está subrayado sin cursiva. El dominio transmembrana (TM) GP64 (GP64₄₈₃₋₅₀₅) está en negrita solamente. El dominio de transducción citoplasmática (CTD) GP64 (GP64₅₀₆₋₅₁₂) está solo en cursiva.		

Listado de secuencias

<110> Reber Genetics Co., Ltd.

<120> NUEVOS VECTORES DE PRESENTACIÓN DE BACULOVIRUS Y SUS USOS

5

<130> 10025-00001

<150> 62/162.139

<151> 2015-05-15

10

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 512

<212> PRT

<213> Virus nucleopoliedro Autographa californica

20

<400> 1

ES 2 787 261 T3

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

ES 2 787 261 T3

165								170				175			
Cys	Gln	Asp	Asp	Thr	Asp	Glu	Cys	Gln	Val	Tyr	Ile	Leu	Asp	Ala	Glu
			180					185					190		
Gly	Asn	Pro	Ile	Asn	Val	Thr	Val	Asp	Thr	Val	Leu	His	Arg	Asp	Gly
		195					200					205			
Val	Ser	Met	Ile	Leu	Lys	Gln	Lys	Ser	Thr	Phe	Thr	Thr	Arg	Gln	Ile
	210					215					220				
Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Ile	Lys	Asp	Asp	Lys	Asn	Asn	Pro	Glu	Ser
225					230					235					240
Val	Thr	Arg	Glu	His	Cys	Leu	Ile	Asp	Asn	Asp	Ile	Tyr	Asp	Leu	Ser
				245					250					255	
Lys	Asn	Thr	Trp	Asn	Cys	Lys	Phe	Asn	Arg	Cys	Ile	Lys	Arg	Lys	Val
			260					265					270		
Glu	His	Arg	Val	Lys	Lys	Arg	Pro	Pro	Thr	Trp	Arg	His	Asn	Val	Arg
		275					280					285			
Ala	Lys	Tyr	Thr	Glu	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Lys	Gly	Asp	Leu	Met	His
	290					295					300				
Ile	Gln	Glu	Glu	Leu	Met	Tyr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Lys	Met	Asn	Ile
305					310					315					320
Glu	Leu	Met	His	Ala	His	Ile	Asn	Lys	Leu	Asn	Asn	Met	Leu	His	Asp
				325					330					335	
Leu	Ile	Val	Ser	Val	Ala	Lys	Val	Asp	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu
			340					345					350		
Met	Asn	Asn	Ser	Val	Ser	Ser	Thr	Phe	Leu	Ser	Asp	Asp	Thr	Phe	Leu
		355					360					365			
Leu	Met	Pro	Cys	Thr	Asn	Pro	Pro	Ala	His	Thr	Ser	Asn	Cys	Tyr	Asn
	370					375					380				
Asn	Ser	Ile	Tyr	Lys	Glu	Gly	Arg	Trp	Val	Ala	Asn	Thr	Asp	Ser	Ser
385					390					395					400
Gln	Cys	Ile	Asp	Phe	Ser	Asn	Tyr	Lys	Glu	Leu	Ala	Ile	Asp	Asp	Asp
				405					410					415	

ES 2 787 261 T3

Val Glu Phe Trp Ile Pro Thr Ile Gly Asn Thr Thr Tyr His Asp Ser
420 425 430

Trp Lys Asp Ala Ser Gly Trp Ser Phe Ile Ala Gln Gln Lys Ser Asn
435 440 445

Leu Ile Thr Thr Met Glu Asn Thr Lys Phe Gly Gly Val Gly Thr Ser
450 455 460

Leu Ser Asp Ile Thr Ser Met Ala Glu Gly Glu Leu Ala Ala Lys Leu
465 470 475 480

Thr Ser Phe Met Phe Gly His Val Val Asn Phe Val Ile Ile Leu Ile
485 490 495

Val Ile Leu Phe Leu Tyr Cys Met Ile Arg Asn Arg Asn Arg Gln Tyr
500 505 510

<210> 2

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Virus nucleopoliedro Autographa californica

<400> 2

His Arg Val Lys Lys Arg Pro Pro Thr Trp
1 5 10

10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Virus nucleopoliedro Autographa californica

<400> 3

Lys Lys Arg Pro Pro Thr Trp Arg His Asn Val
1 5 10

20

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> Virus nucleopoliedro Autographa californica

25

<400> 4

Lys Val Glu His Arg Val Lys Lys Arg Pro Pro Thr Trp Arg His Asn
1 5 10 15

Val Arg Ala Lys Tyr Thr
20

30

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Virus nucleopoliedro Autographa californica

35

<400> 5

ES 2 787 261 T3

Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala Ala His
1 5 10 15

Ser Ala Phe Ala
20

<210> 6
<211> 19
5 <212> PRT
<213> Bombyx mori

<400> 6

Met Arg Leu Thr Leu Phe Ala Phe Val Leu Ala Val Cys Ala Leu Ala
1 5 10 15

10 Ser Asn Ala

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
15 <213> Bombyx mori

<400> 7

Met Arg Val Leu Val Leu Leu Ala Cys Leu Ala Ala Ala Ser Ala
1 5 10 15

20 <210> 8
<211> 22
<212> PRT
25 <213> Bombyx mori

<400> 8

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

Ser Ala Val Pro Lys Pro
20

30 <210> 9
<211> 19
<212> PRT
<213> Bombyx mori

35 <400> 9

Met Lys Ile Leu Leu Ala Ile Ala Leu Met Leu Ser Thr Val Met Trp
1 5 10 15

Val Ser Thr

40 <210> 10
<211> 15
<212> PRT
45 <213> Bombyx mandarina

<400> 10

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

<210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Bombyx mori

5

<400> 11

Met Arg Ala Ile Phe Ala Thr Leu Ala Val Leu Ala Ser Cys Ala Ala
 1 5 10 15

Leu Val Gln Ser
 20

10

<210> 12
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Bombyx mori

15

<400> 12

Met Tyr Lys Leu Thr Val Phe Leu Met Phe Ile Ala Phe Val Ile Ile
 1 5 10 15

Ala Gly Ala Gln Ser Met Ala Ser Leu Thr Arg Gln Asp Leu Ala
 20 25 30

20

<210> 13
 <211> 363
 <212> PRT
 <213> Virus de la peste porcina clásica

25

<400> 13

Met Leu Arg Gly Gln Val Val Gln Gly Ile Ile Trp Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15

Thr Gly Ala Gln Gly Arg Leu Ser Cys Lys Glu Asp His Arg Tyr Ala
 20 25 30

Ile Ser Ser Thr Asn Glu Ile Gly Pro Leu Gly Ala Glu Gly Leu Thr

ES 2 787 261 T3

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

ES 2 787 261 T3

Leu Asp Gly Arg Leu Ala Pro Met Pro Cys Arg Pro Lys Glu Ile Val
290 295 300

Ser Ser Ala Gly Pro Val Arg Lys Thr Ser Cys Thr Phe Asn Tyr Thr
305 310 315 320

Lys Thr Leu Arg Asn Lys Tyr Tyr Glu Pro Arg Asp Ser Tyr Phe Gln
325 330 335

Gln Tyr Met Leu Lys Gly Glu Tyr Gln Tyr Trp Phe Asp Leu Asp Val
340 345 350

Thr Asp His His Thr Asp Tyr Phe Ala Glu Phe
355 360

<210> 14

<211> 708

5 <212> PRT

<213> Virus de la diarrea epidémica porcina

<400> 14

Cys Ser Ala Asn Thr Asn Phe Arg Arg Phe Phe Ser Lys Phe Asn Val
1 5 10 15

Gln Ala Pro Ala Val Val Val Leu Gly Gly Tyr Leu Pro Ile Gly Glu
20 25 30

Asn Gln Gly Val Asn Ser Thr Trp Tyr Cys Ala Gly Gln His Pro Thr
35 40 45

Ala Ser Gly Val His Gly Ile Phe Val Ser His Ile Arg Gly Gly His
50 55 60

Gly Phe Glu Ile Gly Ile Ser Gln Glu Pro Phe Asp Pro Ser Gly Tyr
65 70 75 80

Gln Leu Tyr Leu His Lys Ala Thr Asn Gly Asn Thr Asn Ala Thr Ala
85 90 95

Arg Leu Arg Ile Cys Gln Phe Pro Ser Ile Lys Thr Leu Gly Pro Thr
100 105 110

Ala Asn Asn Asp Val Thr Thr Gly Arg Asn Cys Leu Phe Asn Lys Ala
115 120 125

Ile Pro Ala His Met Ser Glu His Ser Val Val Gly Ile Thr Trp Asp
130 135 140

ES 2 787 261 T3

Asn	Asp	Arg	Val	Thr	Val	Phe	Ser	Asp	Lys	Ile	Tyr	Tyr	Phe	Tyr	Phe	
145					150					155						160
Lys	Asn	Asp	Trp	Ser	Arg	Val	Ala	Thr	Lys	Cys	Tyr	Asn	Ser	Gly	Gly	
				165					170					175		
Cys	Ala	Met	Gln	Tyr	Val	Tyr	Glu	Pro	Thr	Tyr	Tyr	Met	Leu	Asn	Val	
			180					185					190			
Thr	Ser	Ala	Gly	Glu	Asp	Gly	Ile	Ser	Tyr	Gln	Pro	Cys	Thr	Ala	Asn	
		195					200					205				
Cys	Ile	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asn	Val	Phe	Ala	Thr	Glu	Pro	Asn	Gly	His	
	210					215					220					
Ile	Pro	Glu	Gly	Phe	Ser	Phe	Asn	Asn	Trp	Phe	Leu	Leu	Ser	Asn	Asp	
225					230					235					240	
Ser	Thr	Leu	Val	His	Gly	Lys	Val	Val	Ser	Asn	Gln	Pro	Leu	Leu	Val	
				245					250					255		
Asn	Cys	Leu	Leu	Ala	Ile	Pro	Lys	Ile	Tyr	Gly	Leu	Gly	Gln	Phe	Phe	
		260						265					270			
Ser	Phe	Asn	Gln	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Cys	Asn	Gly	Ala	Ala	Val	Gln	
		275					280					285				
Arg	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Arg	Phe	Asn	Ile	Asn	Asp	Thr	Ser	Val	Ile	
	290					295					300					
Leu	Ala	Glu	Gly	Ser	Ile	Val	Leu	His	Thr	Ala	Leu	Gly	Thr	Asn	Phe	
305					310					315					320	
Ser	Phe	Val	Cys	Ser	Asn	Ser	Ser	Asn	Pro	His	Leu	Ala	Thr	Phe	Ala	
				325					330					335		
Ile	Pro	Leu	Gly	Ala	Thr	Gln	Val	Pro	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Phe	Lys	Val	
			340					345					350			
Asp	Thr	Tyr	Asn	Ser	Thr	Val	Tyr	Lys	Phe	Leu	Ala	Val	Leu	Pro	Pro	
		355					360					365				
Thr	Val	Arg	Glu	Ile	Val	Ile	Thr	Lys	Tyr	Gly	Asp	Val	Tyr	Val	Asn	
	370					375					380					
Gly	Phe	Gly	Tyr	Leu	His	Leu	Gly	Leu	Leu	Asp	Ala	Val	Thr	Ile	Asn	
385					390					395					400	

ES 2 787 261 T3

Phe Thr Gly His Gly Thr Asp Asp Asp Val Ser Gly Phe Trp Thr Ile
 405 410 415
 Ala Ser Thr Asn Phe Val Asp Ala Leu Ile Glu Val Gln Gly Thr Ala
 420 425 430
 Ile Gln Arg Ile Leu Tyr Cys Asp Asp Pro Val Ser Gln Leu Lys Cys
 435 440 445
 Ser Gln Val Ala Phe Asp Leu Asp Asp Gly Phe Tyr Pro Ile Ser Ser
 450 455 460
 Arg Asn Leu Leu Ser His Glu Gln Pro Ile Ser Phe Val Thr Leu Pro
 465 470 475 480
 Ser Phe Asn Asp His Ser Phe Val Asn Ile Thr Val Ser Ala Ser Phe
 485 490 495
 Gly Gly His Ser Gly Ala Asn Leu Ile Ala Ser Asp Thr Thr Ile Asn
 500 505 510
 Gly Phe Ser Ser Phe Cys Val Asp Thr Arg Gln Phe Thr Ile Ser Leu
 515 520 525
 Phe Tyr Asn Val Thr Asn Ser Tyr Gly Tyr Val Ser Lys Ser Gln Asp
 530 535 540
 Ser Asn Cys Pro Phe Thr Leu Gln Ser Val Asn Asp Tyr Leu Ser Phe
 545 550 555 560
 Ser Lys Phe Cys Val Ser Thr Ser Leu Leu Ala Ser Ala Cys Thr Ile
 565 570 575
 Asp Leu Phe Gly Tyr Pro Glu Phe Gly Ser Gly Val Lys Phe Thr Ser
 580 585 590
 Leu Tyr Phe Gln Phe Thr Lys Gly Glu Leu Ile Thr Gly Thr Pro Lys
 595 600 605
 Pro Leu Glu Gly Val Thr Asp Val Ser Phe Met Thr Leu Asp Val Cys
 610 615 620
 Thr Lys Tyr Thr Ile Tyr Gly Phe Lys Gly Glu Gly Ile Ile Thr Leu
 625 630 635 640
 Thr Asn Ser Ser Phe Leu Ala Gly Val Tyr Tyr Thr Ser Asp Ser Gly
 645 650 655

ES 2 787 261 T3

Gln Leu Leu Ala Phe Lys Asn Val Thr Ser Gly Ala Val Tyr Ser Val
660 665 670

Thr Pro Cys Ser Phe Ser Glu Gln Ala Ala Tyr Val Asp Asp Asp Ile
675 680 685

Val Gly Val Ile Ser Ser Leu Ser Ser Ser Thr Phe Asn Ser Thr Arg
690 695 700

Glu Leu Pro Gly
705

<210> 15

<211> 170

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln Leu
1 5 10 15

Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn
20 25 30

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

Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu
50 55 60

Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala
65 70 75 80

Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val
85 90 95

Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala
100 105 110

Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala
115 120 125

Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr
130 135 140

Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg
145 150 155 160

Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Asp Ile Tyr
165 170

<210> 16

15 <211> 569

ES 2 787 261 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Proteína E2-gBac de CSFV

5

<400> 16

```

Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala Ala His
1           5           10           15

Ser Ala Phe Ala Met Leu Arg Gly Gln Val Val Gln Gly Ile Ile Trp
20           25           30

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

His Arg Tyr Ala Ile Ser Ser Thr Asn Glu Ile Gly Pro Leu Gly Ala
50           55           60

Glu Gly Leu Thr Thr Thr Trp Lys Glu Tyr Asn His Gly Leu Gln Leu
65           70           75           80

Asp Asp Gly Thr Val Arg Ala Ile Cys Ile Ala Gly Ser Phe Lys Val
85           90           95

Thr Ala Leu Asn Val Val Ser Arg Arg Tyr Leu Ala Ser Leu His Lys
100          105          110

Arg Ala Leu Pro Thr Ser Val Thr Phe Glu Leu Leu Phe Asp Gly Thr
115          120          125

Ser Pro Ala Ile Glu Glu Met Gly Asp Asp Phe Gly Phe Gly Leu Cys
130          135          140

Pro Phe Asp Thr Thr Pro Val Val Lys Gly Lys Tyr Asn Thr Thr Leu
145          150          155          160

Leu Asn Gly Ser Ala Phe Tyr Leu Val Cys Pro Ile Gly Trp Thr Gly
165          170          175

Val Ile Glu Cys Thr Ala Val Ser Pro Thr Thr Leu Arg Thr Glu Val
180          185          190
  
```

ES 2 787 261 T3

Val	Lys	Thr	Phe	Lys	Arg	Glu	Lys	Pro	Phe	Pro	His	Arg	Val	Asp	Cys	195	200	205
Val	Thr	Thr	Ile	Val	Glu	Lys	Glu	Asp	Leu	Phe	Tyr	Cys	Lys	Leu	Gly	210	215	220
Gly	Asn	Trp	Thr	Cys	Val	Lys	Gly	Asn	Pro	Val	Thr	Tyr	Thr	Gly	Gly	225	230	235
Gln	Val	Arg	Gln	Cys	Arg	Trp	Cys	Gly	Phe	Asp	Phe	Lys	Glu	Pro	Asp	245	250	255
Gly	Leu	Pro	His	Tyr	Pro	Ile	Gly	Lys	Cys	Ile	Leu	Thr	Asn	Glu	Thr	260	265	270
Gly	Tyr	Arg	Val	Val	Asp	Ser	Pro	Asp	Cys	Asn	Arg	Asp	Gly	Val	Val	275	280	285
Ile	Ser	Thr	Glu	Gly	Glu	His	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Asn	Thr	Thr	Val	290	295	300
Lys	Val	His	Ala	Leu	Asp	Gly	Arg	Leu	Ala	Pro	Met	Pro	Cys	Arg	Pro	305	310	315
Lys	Glu	Ile	Val	Ser	Ser	Ala	Gly	Pro	Val	Arg	Lys	Thr	Ser	Cys	Thr	325	330	335
Phe	Asn	Tyr	Thr	Lys	Thr	Leu	Arg	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Glu	Pro	Arg	Asp	340	345	350
Ser	Tyr	Phe	Gln	Gln	Tyr	Met	Leu	Lys	Gly	Glu	Tyr	Gln	Tyr	Trp	Phe	355	360	365
Asp	Leu	Asp	Val	Thr	Asp	His	His	Thr	Asp	Tyr	Phe	Ala	Glu	Phe	Ile	370	375	380
Asn	Lys	Leu	Asn	Asn	Met	Leu	His	Asp	Leu	Ile	Val	Ser	Val	Ala	Lys	385	390	395
Val	Asp	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu	Met	Asn	Asn	Ser	Val	Ser	Ser	405	410	415
Thr	Phe	Leu	Ser	Asp	Asp	Thr	Phe	Leu	Leu	Met	Pro	Cys	Thr	Asn	Pro	420	425	430
Pro	Ala	His	Thr	Ser	Asn	Cys	Tyr	Asn	Asn	Ser	Ile	Tyr	Lys	Glu	Gly	435	440	445

ES 2 787 261 T3

Arg Trp Val Ala Asn Thr Asp Ser Ser Gln Cys Ile Asp Phe Ser Asn
450 455 460

Tyr Lys Glu Leu Ala Ile Asp Asp Asp Val Glu Phe Trp Ile Pro Thr
465 470 475 480

Ile Gly Asn Thr Thr Tyr His Asp Ser Trp Lys Asp Ala Ser Gly Trp
485 490 495

Ser Phe Ile Ala Gln Gln Lys Ser Asn Leu Ile Thr Thr Met Glu Asn
500 505 510

Thr Lys Phe Gly Gly Val Gly Thr Ser Leu Ser Asp Ile Thr Ser Met
515 520 525

Ala Glu Gly Glu Leu Ala Ala Lys Leu Thr Ser Phe Met Phe Gly His
530 535 540

Val Val Asn Phe Val Ile Ile Leu Ile Val Ile Leu Phe Leu Tyr Cys
545 550 555 560

Met Ile Arg Asn Arg Asn Arg Gln Tyr
565

<210> 17
<211> 914
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína S1-gBac

<400> 17

Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala Ala His
1 5 10 15

Ser Ala Phe Ala Cys Ser Ala Asn Thr Asn Phe Arg Arg Phe Phe Ser
20 25 30

Lys Phe Asn Val Gln Ala Pro Ala Val Val Val Leu Gly Gly Tyr Leu
35 40 45

Pro Ile Gly Glu Asn Gln Gly Val Asn Ser Thr Trp Tyr Cys Ala Gly
50 55 60

Gln His Pro Thr Ala Ser Gly Val His Gly Ile Phe Val Ser His Ile
65 70 75 80

ES 2 787 261 T3

Arg Gly Gly His Gly Phe Glu Ile Gly Ile Ser Gln Glu Pro Phe Asp
 85 90 95
 Pro Ser Gly Tyr Gln Leu Tyr Leu His Lys Ala Thr Asn Gly Asn Thr
 100 105 110
 Asn Ala Thr Ala Arg Leu Arg Ile Cys Gln Phe Pro Ser Ile Lys Thr
 115 120 125
 Leu Gly Pro Thr Ala Asn Asn Asp Val Thr Thr Gly Arg Asn Cys Leu
 130 135 140
 Phe Asn Lys Ala Ile Pro Ala His Met Ser Glu His Ser Val Val Gly
 145 150 155 160
 Ile Thr Trp Asp Asn Asp Arg Val Thr Val Phe Ser Asp Lys Ile Tyr
 165 170 175
 Tyr Phe Tyr Phe Lys Asn Asp Trp Ser Arg Val Ala Thr Lys Cys Tyr
 180 185 190
 Asn Ser Gly Gly Cys Ala Met Gln Tyr Val Tyr Glu Pro Thr Tyr Tyr
 195 200 205
 Met Leu Asn Val Thr Ser Ala Gly Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Gln Pro
 210 215 220
 Cys Thr Ala Asn Cys Ile Gly Tyr Ala Ala Asn Val Phe Ala Thr Glu
 225 230 235 240
 Pro Asn Gly His Ile Pro Glu Gly Phe Ser Phe Asn Asn Trp Phe Leu
 245 250 255
 Leu Ser Asn Asp Ser Thr Leu Val His Gly Lys Val Val Ser Asn Gln
 260 265 270
 Pro Leu Leu Val Asn Cys Leu Leu Ala Ile Pro Lys Ile Tyr Gly Leu
 275 280 285
 Gly Gln Phe Phe Ser Phe Asn Gln Thr Ile Asp Gly Val Cys Asn Gly
 290 295 300
 Ala Ala Val Gln Arg Ala Pro Glu Ala Leu Arg Phe Asn Ile Asn Asp
 305 310 315 320
 Thr Ser Val Ile Leu Ala Glu Gly Ser Ile Val Leu His Thr Ala Leu
 325 330 335

ES 2 787 261 T3

Gly Thr Asn Phe Ser Phe Val Cys Ser Asn Ser Ser Asn Pro His Leu
 340 345 350
 Ala Thr Phe Ala Ile Pro Leu Gly Ala Thr Gln Val Pro Tyr Tyr Cys
 355 360 365
 Phe Phe Lys Val Asp Thr Tyr Asn Ser Thr Val Tyr Lys Phe Leu Ala
 370 375 380
 Val Leu Pro Pro Thr Val Arg Glu Ile Val Ile Thr Lys Tyr Gly Asp
 385 390 395 400
 Val Tyr Val Asn Gly Phe Gly Tyr Leu His Leu Gly Leu Leu Asp Ala
 405 410 415
 Val Thr Ile Asn Phe Thr Gly His Gly Thr Asp Asp Asp Val Ser Gly
 420 425 430
 Phe Trp Thr Ile Ala Ser Thr Asn Phe Val Asp Ala Leu Ile Glu Val
 435 440 445
 Gln Gly Thr Ala Ile Gln Arg Ile Leu Tyr Cys Asp Asp Pro Val Ser
 450 455 460
 Gln Leu Lys Cys Ser Gln Val Ala Phe Asp Leu Asp Asp Gly Phe Tyr
 465 470 475 480
 Pro Ile Ser Ser Arg Asn Leu Leu Ser His Glu Gln Pro Ile Ser Phe
 485 490 495
 Val Thr Leu Pro Ser Phe Asn Asp His Ser Phe Val Asn Ile Thr Val
 500 505 510
 Ser Ala Ser Phe Gly Gly His Ser Gly Ala Asn Leu Ile Ala Ser Asp
 515 520 525
 Thr Thr Ile Asn Gly Phe Ser Ser Phe Cys Val Asp Thr Arg Gln Phe
 530 535 540
 Thr Ile Ser Leu Phe Tyr Asn Val Thr Asn Ser Tyr Gly Tyr Val Ser
 545 550 555 560
 Lys Ser Gln Asp Ser Asn Cys Pro Phe Thr Leu Gln Ser Val Asn Asp
 565 570 575
 Tyr Leu Ser Phe Ser Lys Phe Cys Val Ser Thr Ser Leu Leu Ala Ser

ES 2 787 261 T3

580					585					590					
Ala	Cys	Thr	Ile	Asp	Leu	Phe	Gly	Tyr	Pro	Glu	Phe	Gly	Ser	Gly	Val
		595					600					605			
Lys	Phe	Thr	Ser	Leu	Tyr	Phe	Gln	Phe	Thr	Lys	Gly	Glu	Leu	Ile	Thr
	610					615					620				
Gly	Thr	Pro	Lys	Pro	Leu	Glu	Gly	Val	Thr	Asp	Val	Ser	Phe	Met	Thr
625					630					635					640
Leu	Asp	Val	Cys	Thr	Lys	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Gly	Phe	Lys	Gly	Glu	Gly
				645					650					655	
Ile	Ile	Thr	Leu	Thr	Asn	Ser	Ser	Phe	Leu	Ala	Gly	Val	Tyr	Tyr	Thr
			660					665					670		
Ser	Asp	Ser	Gly	Gln	Leu	Leu	Ala	Phe	Lys	Asn	Val	Thr	Ser	Gly	Ala
		675					680					685			
Val	Tyr	Ser	Val	Thr	Pro	Cys	Ser	Phe	Ser	Glu	Gln	Ala	Ala	Tyr	Val
	690					695					700				
Asp	Asp	Asp	Ile	Val	Gly	Val	Ile	Ser	Ser	Leu	Ser	Ser	Ser	Thr	Phe
705					710					715					720
Asn	Ser	Thr	Arg	Glu	Leu	Pro	Gly	Ile	Asn	Lys	Leu	Asn	Asn	Met	Leu
				725					730					735	
His	Asp	Leu	Ile	Val	Ser	Val	Ala	Lys	Val	Asp	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly
			740					745					750		
Asn	Leu	Met	Asn	Asn	Ser	Val	Ser	Ser	Thr	Phe	Leu	Ser	Asp	Asp	Thr
		755					760					765			
Phe	Leu	Leu	Met	Pro	Cys	Thr	Asn	Pro	Pro	Ala	His	Thr	Ser	Asn	Cys
	770					775					780				
Tyr	Asn	Asn	Ser	Ile	Tyr	Lys	Glu	Gly	Arg	Trp	Val	Ala	Asn	Thr	Asp
785					790					795					800
Ser	Ser	Gln	Cys	Ile	Asp	Phe	Ser	Asn	Tyr	Lys	Glu	Leu	Ala	Ile	Asp
				805					810					815	
Asp	Asp	Val	Glu	Phe	Trp	Ile	Pro	Thr	Ile	Gly	Asn	Thr	Thr	Tyr	His
			820					825					830		

ES 2 787 261 T3

Asp Ser Trp Lys Asp Ala Ser Gly Trp Ser Phe Ile Ala Gln Gln Lys
835 840 845

Ser Asn Leu Ile Thr Thr Met Glu Asn Thr Lys Phe Gly Gly Val Gly
850 855 860

Thr Ser Leu Ser Asp Ile Thr Ser Met Ala Glu Gly Glu Leu Ala Ala
865 870 875 880

Lys Leu Thr Ser Phe Met Phe Gly His Val Val Asn Phe Val Ile Ile
885 890 895

Leu Ile Val Ile Leu Phe Leu Tyr Cys Met Ile Arg Asn Arg Asn Arg
900 905 910

Gln Tyr

<210> 18

<211> 376

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> hPD1-gBac protein

<400> 18

Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala Ala His
1 5 10 15

Ser Ala Phe Ala Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala
20 25 30

Val Leu Gln Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp
35 40 45

Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Phe Pro Ala Leu Leu Val Val Thr
50 55 60

Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu
65 70 75 80

Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp
85 90 95

Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys
100 105 110

Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser

ES 2 787 261 T3

	115						120						125					
Val	Val	Arg	Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala			
	130					135					140							
Ile	Ser	Leu	Ala	Pro	Lys	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu			
145					150					155					160			
Leu	Arg	Val	Thr	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser			
				165					170					175				
Pro	Ser	Pro	Arg	Pro	Ala	Gly	Gln	Phe	Gln	Thr	Asp	Ile	Tyr	Ile	Asn			
			180					185					190					
Lys	Leu	Asn	Asn	Met	Leu	His	Asp	Leu	Ile	Val	Ser	Val	Ala	Lys	Val			
		195					200					205						
Asp	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu	Met	Asn	Asn	Ser	Val	Ser	Ser	Thr			
	210					215					220							
Phe	Leu	Ser	Asp	Asp	Thr	Phe	Leu	Leu	Met	Pro	Cys	Thr	Asn	Pro	Pro			
225					230					235					240			
Ala	His	Thr	Ser	Asn	Cys	Tyr	Asn	Asn	Ser	Ile	Tyr	Lys	Glu	Gly	Arg			
				245					250					255				
Trp	Val	Ala	Asn	Thr	Asp	Ser	Ser	Gln	Cys	Ile	Asp	Phe	Ser	Asn	Tyr			
			260					265					270					
Lys	Glu	Leu	Ala	Ile	Asp	Asp	Asp	Val	Glu	Phe	Trp	Ile	Pro	Thr	Ile			
		275					280					285						
Gly	Asn	Thr	Thr	Tyr	His	Asp	Ser	Trp	Lys	Asp	Ala	Ser	Gly	Trp	Ser			
	290					295					300							
Phe	Ile	Ala	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	Leu	Ile	Thr	Thr	Met	Glu	Asn	Thr			
305					310					315					320			
Lys	Phe	Gly	Gly	Val	Gly	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp	Ile	Thr	Ser	Met	Ala			
				325					330					335				
Glu	Gly	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Leu	Thr	Ser	Phe	Met	Phe	Gly	His	Val			
			340					345					350					
Val	Asn	Phe	Val	Ile	Ile	Leu	Ile	Val	Ile	Leu	Phe	Leu	Tyr	Cys	Met			
		355					360					365						
				Ile	Arg	Asn	Arg	Asn	Arg	Gln	Tyr							
					370					375								

<210> 19
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador directo del SP
 <400> 19
 10 gagctcatgg taagc 15
 <210> 20
 <211> 12
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso del SP
 20 <400> 20
 aggcagaatg cg 12
 <210> 21
 <211> 13
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo de gp64
 30 <400> 21
 gcgtgtctgc tca 13
 <210> 22
 <211> 13
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Cebador inverso de gp64
 <400> 22
 ttaatattgt cta 13
 45 <210> 23
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador directo de gp64
 <400> 23
 atcaacaagc taa 13
 55 <210> 24
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador inverso de gp64
 <400> 24
 65 ttaatattgt cta 13

REIVINDICACIONES

1. Un baculovirus recombinante que presenta en su envoltura una proteína de fusión, comprendiendo la proteína de fusión:
 - (i) un antígeno heterólogo; y
 - 5 (ii) una región del extremo terminal C de la proteína GP64 de la envoltura del baculovirus, que comprende al menos 100 residuos de aminoácidos de longitud y que carece de un epítipo de unión a B12D5 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 3 ubicada dentro de la región básica central de la proteína GP64;en la que el antígeno heterólogo se encuentra en el extremo terminal N de la proteína de fusión que se presenta en la envoltura del baculovirus recombinante.
- 10 2. El baculovirus recombinante de la reivindicación 1, cuyo genoma comprende un transgén que codifica una proteína de fusión que comprende:
 - (a) un péptido señal;
 - (b) el antígeno heterólogo; y
 - (c) la región del extremo terminal C de la proteína GP64 de la envoltura del baculovirus,
 - 15 en la que el antígeno se encuentra en el extremo terminal C del péptido señal.
3. Un vector que comprende un transgén que codifica una proteína de fusión, comprendiendo la proteína de fusión:
 - (a) un péptido señal situado en el extremo terminal N de la proteína de fusión;
 - (b) un antígeno; y
 - (c) una región del extremo terminal C de la proteína GP64 de la envoltura del baculovirus, que comprende al menos
 - 20 100 residuos de aminoácidos de longitud y que carece de un epítipo de unión a B12D5 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 3 ubicada dentro de la región básica central de la proteína GP64;en la que el antígeno se encuentra en el extremo terminal C del péptido señal.
4. El vector de la reivindicación 3, que es un baculovirus recombinante.
5. Un baculovirus recombinante que presenta en su envoltura una proteína de fusión, comprendiendo la proteína de fusión:
 - (i) un antígeno heterólogo; y
 - (ii) una región del extremo terminal C de la proteína GP64 de la envoltura del baculovirus, que comprende al menos
 - 25 100 residuos de aminoácidos de longitud y que carece de un epítipo de unión a B12D5 ubicado dentro de la región básica central de la proteína GP64 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;en la que el antígeno heterólogo se encuentra en el extremo terminal N de la proteína de fusión que se presenta en la envoltura del baculovirus recombinante.
- 30 6. Un vector que comprende un transgén que codifica una proteína de fusión, comprendiendo la proteína de fusión:
 - (a) un péptido señal situado en el extremo terminal N de la proteína de fusión;
 - (b) un antígeno; y
 - (c) una región del extremo terminal C de la proteína GP64 de la envoltura del baculovirus, que comprende al menos
 - 35 100 residuos de aminoácidos de longitud y que carece de un epítipo de unión a B12D5 ubicado dentro de la región básica central de la proteína GP64 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;en la que el antígeno se encuentra en el extremo terminal C del péptido señal.
- 40 7. El baculovirus recombinante de la reivindicación 1, en el que la región del extremo terminal C de la proteína GP64 comprende aminoácidos de 327 a 512 de la SEQ ID NO: 1.
8. El baculovirus recombinante de la reivindicación 1, en el que la región del extremo terminal C de la proteína GP64 tiene un extremo terminal N que comienza entre los residuos de aminoácidos 292 y 328 de la SEQ ID NO: 1.

9. El baculovirus recombinante de la reivindicación 2, en el que el péptido señal comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.
10. Una célula de insecto que comprende el baculovirus recombinante de la reivindicación 1.
11. El baculovirus recombinante de la reivindicación 1, en el que el antígeno es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en una proteína patógena, una proteína de células cancerosas y una proteína de punto de control inmune.
12. El baculovirus recombinante de la reivindicación 11, en el que:
 - (i) el patógeno es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en virus del papiloma humano, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, virus de inmunodeficiencia humana-1, virus del dengue, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, circovirus porcino 2, virus de la peste porcina clásica, virus de la fiebre aftosa, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la gastroenteritis transmisible, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la influenza, virus de la pseudorrabia, parvovirus, virus de la enfermedad vesicular porcina, poxvirus, rotavirus, neumonía por micoplasma, virus del herpes, bronquitis infecciosa y virus infecciosa de la enfermedad de la bursa;
 - (ii) el cáncer es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de mama, melanoma, linfomas, carcinoma de colon, carcinoma hepatocelular y cualquier combinación de los mismos; y
 - (iii) el punto de control inmunitario es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en PD-1, PD-L1, PD-L2 y CTLA-4.
13. El baculovirus recombinante de la reivindicación 1, en el que el antígeno es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en la glicoproteína E2 de la envoltura del virus de la peste porcina clásica, la proteína S1 del virus de la diarrea epidémica porcina, la proteína 1 de muerte celular programada y un antígeno asociado a un tumor.
14. El vector de la reivindicación 3, en el que el antígeno es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en una proteína patógena, una proteína de células cancerosas y una proteína de punto de control inmune.
15. Un vector de acuerdo con la reivindicación 3 o 6 o un baculovirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 5 para uso en el tratamiento para provocar una respuesta inmunogénica específica de antígeno en un sujeto que lo necesite.

FIG. 1A

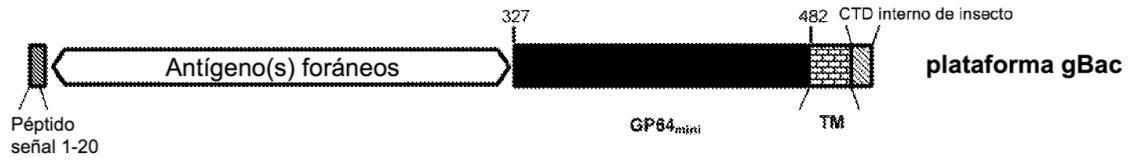


FIG. 1B

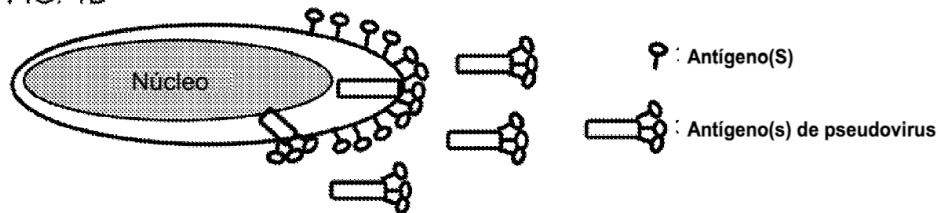


FIG. 2A

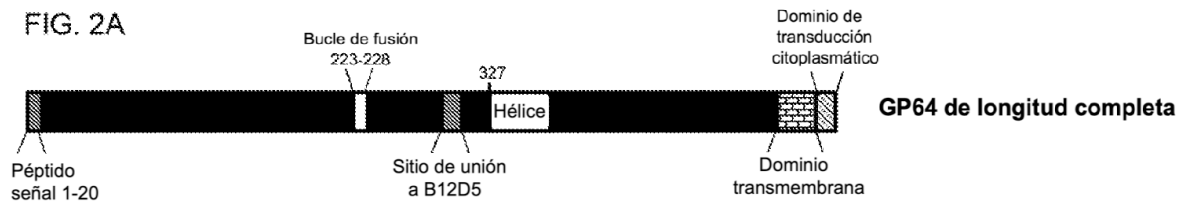


FIG. 2B



FIG. 2C



FIG. 2D



FIG. 3

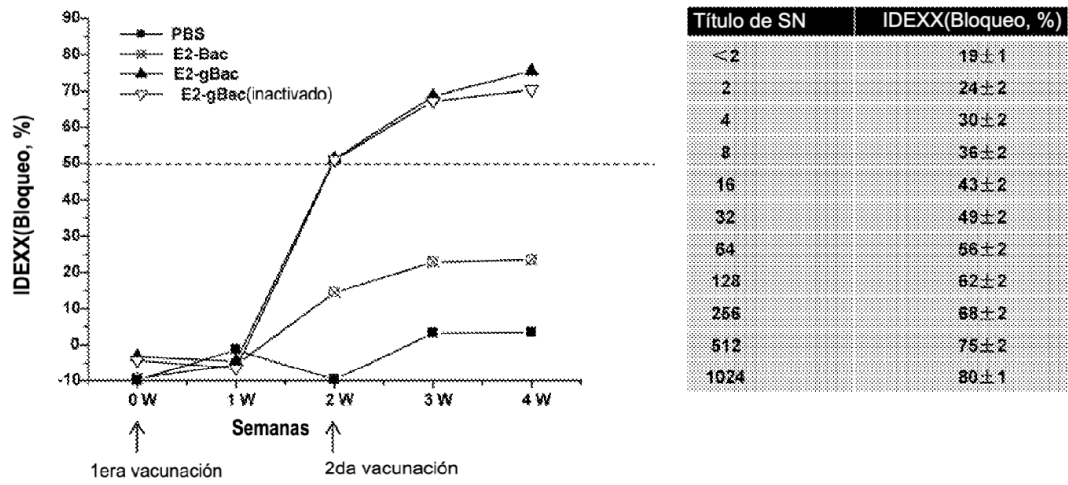


FIG. 4

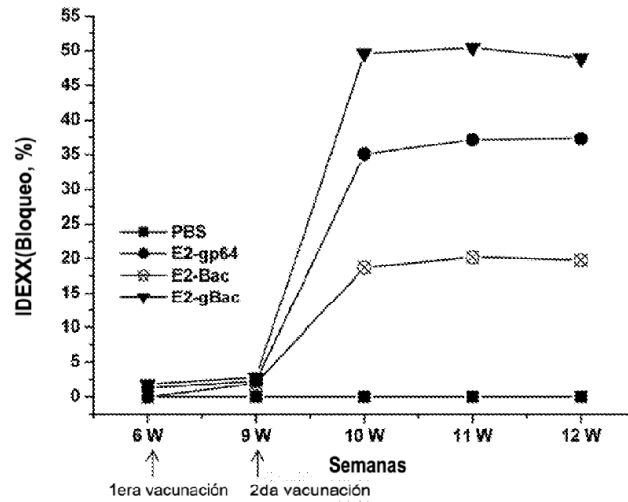


FIG. 5

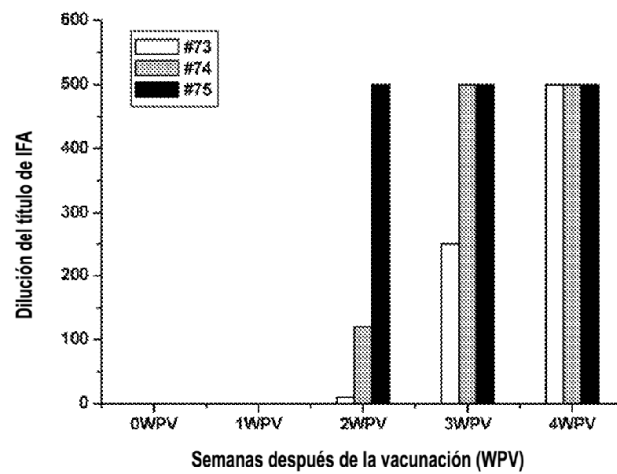


FIG. 6A

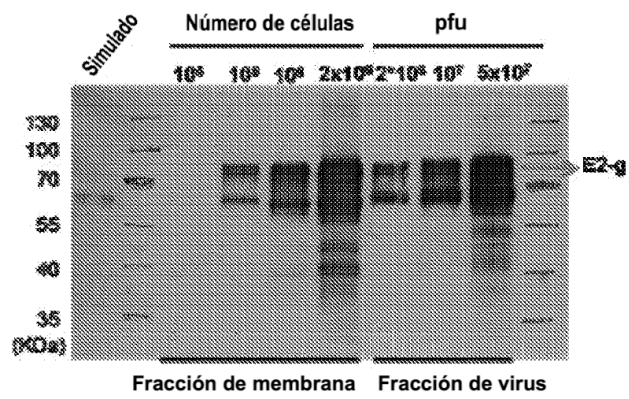


FIG. 6B

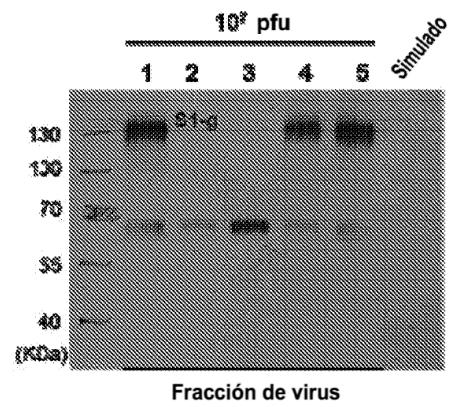


FIG. 6C

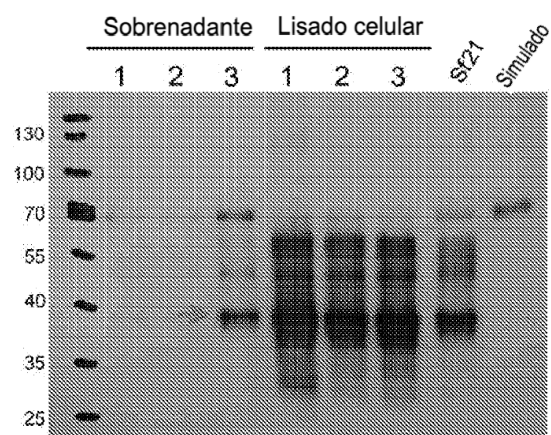


FIG. 6D

