



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 346 314**

⑤1 Int. Cl.:
A61K 39/10 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **04765806 .7**

⑨6 Fecha de presentación : **01.10.2004**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1667712**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2006**

⑤4 Título: **Antígenos de *B. pertussis* y uso de los mismos en vacunación.**

③0 Prioridad: **02.10.2003 GB 0323113**
02.10.2003 GB 0323112

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.10.2010

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.10.2010

⑦3 Titular/es: **GlaxoSmithkline Biologicals S.A.**
Rue de L'Institut 89
1330 Rixensart, BE

⑦2 Inventor/es: **Castado, Cindy;**
Denoel, Philippe;
Godfroid, Fabrice y
Poolman, Jan

⑦4 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Antígenos de *B. pertussis* y uso de los mismos en vacunación.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a polinucleótidos (en lo sucesivo en el presente documento denominados “polinucleótido o polinucleótidos de BASB232”), polipéptidos que los codifican (denominados en el presente documento “BASB232” o “polipéptido o polipéptidos de BASB232”), materiales recombinantes y procedimientos para su producción. En particular, la invención se refiere a composiciones inmunogénicas y vacunas que contienen polipéptidos o nucleótidos individuales o combinaciones ventajosas de los mismos. En otro aspecto de la invención, la invención se refiere a procedimientos para usar dichos polipéptidos y polinucleótidos para el tratamiento o la prevención de infecciones por Bordetella. En un aspecto adicional, la invención se refiere a ensayos de diagnóstico para detectar una infección por Bordetella.

15

Antecedentes de la invención

La bacteria *Bordetella pertussis* es el agente causal para la tos ferina, una enfermedad respiratoria que puede ser grave en lactantes y niños pequeños. El curso clínico de la enfermedad se caracteriza por paroxismos de toses rápidas seguidos de esfuerzo inspiratorio, con frecuencia asociado con un sonido de “tos ferina” característico. En casos graves, la falta de oxígeno puede conducir a daño cerebral, sin embargo la complicación más común es la neumonía secundaria.

La tos ferina se considera habitualmente que está causada por *B. pertussis*, pero ocasionalmente se aísla *B. parapertussis* de pacientes con signos típicos y síntomas de tos ferina. La infección por *B. parapertussis* es de menor frecuencia que la de *B. pertussis*, estando el 5-10% de la tos ferina asociada con *B. parapertussis* (Mertsola (1985) Eur J Clin Microbiol 4; 123; Lautrop (1971) Lancet 1 (7711) 1195-1198). *B. parapertussis* se asocia con síntomas clínicos leves que, combinados con su reactividad cruzada serológica con *B. pertussis*, hacen que *B. parapertussis* sea difícil de diagnosticar.

30

La primera generación de vacunas contra *B. pertussis* eran vacunas de células completas, compuestas por bacterias completas muertas. Éstas se introdujeron en muchos países en los años 50 y 60 y tuvieron éxito reduciendo la incidencia de la tos ferina. Un problema con la vacunas de *B. pertussis* de célula completa es el alto nivel de reactogenicidad asociado con las mismas. Las vacunas acelulares que contienen proteínas de *B. pertussis* purificadas son menos reactogénicas y se han adoptado para los programas de vacunación de muchos países. Las vacunas acelulares, que contienen típicamente toxina pertúsica (PT), hemaglutinina filamentosa (FHA) y muy frecuentemente pertactina (PRN), se usan ampliamente y proporcionan una protección eficaz frente a la gravedad de la tos ferina. Oliver y col. divulgan una composición inmunogénica que comprende proteína Brka recombinante que se usa para generar anticuerpos policlonales en conejos (VACCINE, vol. 20, 2002, páginas 235-241). Además, el documento US 5885587 (Eckhardt y col) describe “vacunas eficaces contra *Bordetella pertussis* que comprenden una combinación de antígenos pertúsicos purificados individualmente”.

35

40

A pesar de la vacunación, la tos ferina continúa siendo una enfermedad endémica (Mooi y col (2001) Emerging Infectious Diseases 7; 526). La tos ferina ha resurgido en Australia, Canadá y Países Bajos; países con poblaciones altamente vacunadas. Una comparación de cepas prevacunación con cepas aisladas recientemente ha demostrado una deriva antigénica, particularmente en PT y PRN (Mooi y col (1998) Infection and Immunity 66; 670). Está ampliamente reconocido que las vacunas actuales protegen frente a la enfermedad grave, pero no eliminan *Bordetella pertussis* del cuerpo (Cherry y col (1998) Vaccine 16; 1901, Hewlett y Halperin (1998) Vaccine 16; 1889, Storsaeter y col (1998) Vaccine 16; 1907). Los mecanismos de defensa de *Bordetella pertussis* permiten que evite su eliminación del cuerpo, indicando que las vacunas actuales no inutilizan completamente estos mecanismos de defensa.

45

50

La vacunación usando vacunas de *B. pertussis* de células completas (Pw) parece proteger frente a la infección por *B. parapertussis*, probablemente debido a la similitud de las dos bacterias. La infección por *B. parapertussis* en lactantes no vacunados puede conducir a complicaciones graves y mortales, mientras que en individuos vacunados con Pw, se observa un curso más leve, con frecuencia subclínico, de tos ferina (Long y col (1990) Pediatric Infect Dis J 9; 700). Teóricamente, la introducción de vacunas antitosferínicas acelulares que contienen sólo dos o tres proteínas purificadas podría reducir la capacidad de la vacunación para proteger frente a *B. parapertussis*.

55

60

Por consiguiente, son necesarias vacunas acelulares mejoradas adicionalmente contra la tos ferina que combinen una baja reactogenicidad con una capacidad para generar una respuesta protectora frente a la infección por *Bordetella*, particularmente tanto *B. pertussis* como *B. parapertussis*. La identificación de nuevos antígenos candidato y combinaciones particularmente eficaces de antígenos permitirá el desarrollo de dichas vacunas.

65

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a la <reivindicación 1> y a la <reivindicación 6>. En otro aspecto, la invención se refiere a procedimientos para usar dichas composiciones inmunogénicas, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades por *Bordetella*, entre otras. En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a ensayos de diagnóstico para detectar enfermedades asociadas con infecciones microbianas y afecciones asociadas con dichas infecciones, tales como ensayos para detectar la expresión o actividad de polinucleótidos o polipéptidos de BASB232.

Descripción de las figuras

Figura 1 - es una gráfica que muestra la protección frente a la exposición a *B. pertussis* cepa Tohama en grupos de ratones preinmunizados con vehículo DT BrkA, DTPa-2, DTPa-2 BrkA, DTPa-3 o DTPa-3 BrkA. Los resultados se expresan como el número de UFC aisladas por pulmón a diferentes puntos temporales después de la exposición. Pa-2 es una combinación de toxina pertúsica y FHA, mientras que Pa-3 es una combinación de toxina pertúsica, FHA y pertactina.

Figura 2 - es una gráfica que muestra la protección frente a la exposición a *B. pertussis* cepa 18323 en grupos de ratones preinmunizados con vehículo DT BrkA, DTPa-2, DTPa-2 BrkA, DTPa-3 o DTPa-3 BrkA. Los resultados se expresan como el número de UFC aisladas por pulmón a diferentes puntos temporales después de la exposición.

Figura 3 - gráficas que muestran la protección frente a la exposición a *B. pertussis* o *B. parapertussis* en grupos de ratones preinmunizados con DTPw o DTPa de varias fuentes. Los resultados se expresan como el número de UFC aisladas del pulmón a diferentes puntos temporales después de la exposición.

Figura 4 - gráficas que muestran la protección frente a *B. parapertussis* por anticuerpos contra *B. pertussis* de célula completa. El panel A muestra protección activa frente a *B. parapertussis* después de la inmunización de ratones con vacuna DTPw. El panel B muestra una protección pasiva frente a *B. parapertussis* por antisueros generados contra DTPw.

Figura 5 - alineamiento del SDS-PAGE de OMP de *B. parapertussis* y la transferencia de Western correspondiente tratada con sueros generados contra *B. pertussis* (DTPw). El tampón de procesamiento usado para estos geles era MES. El alineamiento se realizó usando patrones de peso molecular preteñidos como puntos de referencia.

Figura 6 - alineamiento del SDS-PAGE de OMP de *B. parapertussis* y la transferencia de Western correspondiente tratada con sueros generados contra *B. pertussis* (DTPw). El tampón de procesamiento usado para estos geles era MOPS. El alineamiento se realizó usando patrones de peso molecular preteñidos como puntos de referencia.

Descripción de la invención

La invención se refiere a polipéptidos de BASB232, como se describen con mayor detalle a continuación. En particular, la invención se refiere a polipéptidos de BASB232 de *B. pertussis* comprendidos en composiciones inmunogénicas. La invención se refiere especialmente a los polipéptidos de BASB232 enumerados en la tabla 1. Esos polinucleótidos y polipéptidos codificados tienen las secuencias de nucleótidos y aminoácidos expuestas en las SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 110, como se describe en la tabla 1.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 346 314 T3

TABLA 1

Nombre	Longitud (nT)	Longitud (aa)	SEC ID nucl.	SEC ID prot.	Descripción
Orf17	3033	1010	33	34	BrkA, <i>Bordetella pertussis</i> (81%)
Orf1	2211	737	1	2	Receptor de enterobactina férrica (BfeA), <i>Bordetella pertussis</i> (95%)
Orf2	2475	812	3	4	Probable receptor de ferrisideróforo tipo hidroxamato (BfrB), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (40%)
Orf3	2403	729	5	6	Supuesta proteína de péptido señal de receptor de ferrisideróforo tipo hidroxamato (BfrC), <i>Pseudomonas solanacearum</i> (38%)
Orf4	2304	734	7	8	Supuesto receptor de sideróforo férrico (FauA), <i>Bordetella bronchiseptica</i> (97%)
Orf5	2187	825	9	10	Receptor de sideróforo férrico no identificado, <i>Bordetella bronchiseptica</i> (94%)
Orf6	2064	801	11	12	Receptor de sideróforo férrico de alcaligina, <i>Bordetella pertussis</i> (100%)
Orf7	2229	743	13	14	Receptor de ferrisideróforo tipo hidroxamato (proteína de transporte de hierro fhu), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (37%)
Orf8	2268	756	15	16	Receptor de ferrisideróforo tipo hidroxamato (proteína de transporte de hierro fhu), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (41 %)
Orf9	2106	702	17	18	Supuesta proteína de péptido señal de receptor de ferrisideróforo tipo hidroxamato, <i>Pseudomonas solanacearum</i> (40%)
Orf10	2610	870	19	20	Receptor de hemo de membrana externa BhuR, <i>Bordetella pertussis</i> (100%)
Orf11	2280	760	21	22	Probable receptor dependiente de tonB, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (34%)
Orf12	1887	629	23	24	Probable receptor dependiente de tonB, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (34%)

ES 2 346 314 T3

Nombre	Longitud (nT)	Longitud (aa)	SEC ID nucl.	SEC ID prot.	Descripción
Orf13	1731	577	25	26	Proteína tipo receptor de ferrisideróforo, <i>Pseudomonas sp</i> (57%)
Orf14	1434	478	27	28	Probable precursor de receptor dependiente de tonB Yncd, <i>Escherichia coli</i> (56%)
Orf15	2730	910	29	30	Proteína de membrana externa pertactina, <i>Bordetella pertussis</i> (100%)
Orf16	2748	915	31	32	Proteína Vag8, <i>Bordetella pertussis</i> (96%)
Orf17	3033	1010	33	34	BrkA, <i>Bordetella pertussis</i> (81%)
Orf18	1944	647	35	36	Proteína Tcf, <i>Bordetella pertussis</i> (74%)
Orf19	1245	418	37	38	Proteína Phg, <i>Bordetella pertussis</i> (81%)
Orf20	2712	903	39	40	Proteína BapA, <i>Bordetella pertussis</i> (85%)
Orf21	1446	482	41	42	Proteína BapB, <i>Bordetella pertussis</i> (87%)
Orf22	2277	759	43	44	Supuesto autotransportador BapC, <i>Bordetella pertussis</i> (86%)
Orf23	1545	515	45	46	Proteína tipo pertactina, <i>Bordetella pertussis</i> (47%)
Orf24	1191	397	47	48	Proteína tipo Tcf, <i>Bordetella pertussis</i> (56%)
Orf25	6903	2300	49	50	Serina proteasa extracelular, <i>Brucella melitensis</i> (25%)
Orf26	2622	873	51	52	Proteína autotransportadora, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (43%)
Orf27	3120	1039	53	54	Proteasa autotransportadora tipo subtilisina (SphB1). <i>Bordetella pertussis</i> (93%)
Orf28	2241	747	55	56	Precursor de proteína c de utilización de hemo/hemopexina, <i>Haemophilus influenzae</i> (48%)
Orf29	1575	525	57	58	Lipoproteína (proteína pilnn), <i>Escherichia coli</i> (22%)
Orf30	1509	503	59	60	Proteína inmunogénica, <i>Deinococcus radiodurans</i> (35%)
Orf31	1491	497	61	62	Probable precursor de lipoproteína de membrana externa. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (48%)

ES 2 346 314 T3

Nombre	Longitud (nT)	Longitud (aa)	SEC ID nucl.	SEC ID prot.	Descripción
Orf32	1491	497	63	64	Probable precursor de proteína de flujo de salida de membrana externa. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (43%)
Orf33	1380	460	65	66	Oprm, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (45%)
Orf34	1347	449	67	68	Probable proteína de péptido señal de canal de membrana externo, <i>Ralstonia solanacearum</i> (40%)
Orf35	1287	429	69	70	Supuesta proteína transmembrana mureína transglicosilasa a lítica unida a membrana (MltA). <i>Ralstonia solanacearum</i> (42%)
Orf36	1143	381	71	72	Supuesta proteína mureína transglicosilasa b lítica unida a membrana (MltB), <i>Ralstonia solanacearum</i> (40%)
Orf37	1095	365	73	74	Supuesto precursor de proteína de exportación de polisacárido yccz, <i>Escherichia coli</i> (34%)
Orf38	897	299	75	76	Supuesta proteína serina proteasa transmembrana, <i>Ralstonia solanacearum</i> (55%)
Orf39	852	284	11	78	Proteína hipotética pa4632, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (52%)
Orf40	846	282	79	80	Precursor de lipoproteína de competencia comI, <i>Neisseria meningitidis</i> (45%)
Orf41	813	271	81	82	Probable precursor de lipoproteína (vacj) transmembrana, <i>Ralstonia solanacearum</i> (43%)
Orf42	801	267	83	84	Supuesta lipoproteína de membrana externa, <i>Salmonella typhimurium</i> (24%)
Orf43	690	230	85	86	Precursor de proteína de anillo I flagelar (proteína de anillo I de cuerpo basal), <i>Escherichia coli</i> (51%)
Orf44	678	226	87	88	Precursor de lipoproteína ydcl hipotético, <i>Escherichia coli</i> (32%)
Orf45	558	186	89	90	Probable precursor de lipoproteína asociada a peptidoglicano (Pal), <i>Ralstonia solanacearum</i> (63%)

ES 2 346 314 T3

Nombre	Longitud (nT)	Longitud (aa)	SEC ID nucl.	SEC ID prot.	Descripción
Orf46	552	184	91	92	Supuesta lipoproteína de membrana externa (OmlA), <i>Bordetella pertussis</i> (100%)
Orf47	546	182	93	94	Proteína transmembrana hipotética smc00354, <i>Rhizobium meliloti</i> (36%)
Orf48	501	167	95	96	Supuesta lipoproteína de membrana externa transmembrana, <i>Ralstonia solanacearum</i> (40%)
Orf49	456	152	97	98	Lipoproteína, <i>Vibrio cholerae</i> (44%)
Orf50	5307	1769	99	100	Autotransportador de <i>Bordetella parapertussis</i> (100%) BPP0452
Orf51	579	193	101	102	OmpA <i>Bordetella pertussis</i> (100%)
Orf52	579	193	103	104	OmpA <i>Bordetella parapertussis</i> (100%) BPP3135
Orf53	2229	743	105	106	Probable receptor dependiente de TonB para transporte de hierro de <i>Bordetella parapertussis</i> (100%) BPP3376
Orf54	1155	385	107	108	Precursor de proteína porina de membrana externa <i>Bordetella pertussis</i> (100%)
Orf55	1164	388	109	110	Precursor de proteína porina de membrana externa <i>Bordetella parapertussis</i> (100%) BPP3392

El porcentaje mostrado en la tabla 1 es el porcentaje identidad compartido por cada secuencia de los polipéptidos de BASB232 y sus polipéptidos homólogos encontrados en *B. pertussis* o en otros organismos (mediante una búsqueda de homología de BLAST).

Se entiende que las secuencias enumeradas en la Lista de Secuencias a continuación como “ADN” representan una ejemplificación de una realización de la divulgación, puesto que los expertos en la materia reconocerán que dichas secuencias pueden emplearse provechosamente en polinucleótidos en general, incluyendo ribopolinucleótidos.

Las secuencias de los polinucleótidos de BASB232 se exponen en las SEC ID N°: 33, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109. El Grupo de SEC 1 se refiere en el presente documento al grupo de polinucleótidos expuestos en las SEC ID N°: 33, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109.

Las secuencias de los polipéptidos codificados por BASB232 se exponen en las SEC ID N°: 34, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110. El grupo de SEC 2 se refiere en el presente documento al grupo de polipéptidos codificados expuestos en las SEC ID N°: 34, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110.

Los polinucleótidos de BASB232 expuestos en las SEC ID 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 y 105 pertenecen a la familia de proteínas transportadoras de hierro.

Los polinucleótidos de BASB232 expuestos en las SEC ID 33, 29, 31, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 y 99 pertenecen a la familia de proteínas autotransportadoras.

ES 2 346 314 T3

Los polinucleótidos de BASB232 expuestos en las SEC ID 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95 y 97 pertenecen a la familia de lipoproteínas.

Los polipéptidos de BASB232 expuestos en las SEC ID 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 y 106 pertenecen a la familia de proteínas transportadoras de hierro.

Los polipéptidos de BASB232 expuestos en las SEC ID 34, 30, 32, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 y 100 pertenecen a la familia de proteínas autotransportadoras.

Los polipéptidos de BASB232 expuestos en las SEC ID 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96 y 98 pertenecen a la familia de lipoproteínas.

Polipéptidos

En un aspecto de la invención se proporciona una composición inmunogénica que comprende FHA y toxina pertúsica, y que comprende además un polipéptido que comprende

a) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% (preferentemente una identidad de al menos el 90%, más preferentemente una identidad de al menos el 95%, más preferentemente una identidad de al menos el 97, 98 o 99% o exacta) con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 34, a lo largo de toda la longitud de la SEC ID N°:34, o

b) un fragmento inmunogénico que tiene al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 34, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los polipéptidos de BASB232 proporcionados en el Grupo de SEC 2 son los polipéptidos de BASB232 de *B. pertussis* (o *B. paraptussis*) que se describen en la tabla 1. Se prevé que puedan usarse secuencias de *B. paraptussis* (o *B. pertussis*).

El fragmento inmunogénico de polipéptidos de BASB232 descritos en el presente documento es una porción contigua del polipéptido de BASB232 que tiene la misma o sustancialmente la misma actividad inmunogénica que el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos correspondiente seleccionada del Grupo de SEC 2; es decir, el fragmento (si es necesario, cuando está acoplado a un vehículo) es capaz de generar una respuesta inmune que reconoce el polipéptido de BASB232. Dicho fragmento inmunogénico puede incluir, por ejemplo, el polipéptido de BASB232 que carece de una secuencia líder N-terminal y/o un dominio transmembrana y/o un dominio de anclaje C-terminal. En un aspecto preferido, el fragmento inmunogénico de BASB232 de acuerdo con la invención comprende sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 85%, preferentemente una identidad de al menos el 90%, más preferentemente una identidad de al menos el 95%, más preferentemente una identidad de al menos el 97-99%, con la SEC ID N°: 34 a lo largo de la longitud total de dicha secuencia.

Un fragmento es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es en su totalidad la misma, en parte pero no toda, que cualquier secuencia de aminoácidos de cualquier polipéptido de la invención. Como con los polipéptidos de BASB232, los fragmentos pueden ser “independientes” o estar comprendidos en el interior de un polipéptido de mayor tamaño del que forman parte o constituyen una región, más preferentemente como una sola región continua en un solo polipéptido de mayor tamaño.

Los fragmentos preferidos incluyen, por ejemplo, polipéptidos de truncamiento que tienen una porción de una secuencia de aminoácidos seleccionada del Grupo de SEC 2 o de variantes de la misma, tales como una serie continua de restos que incluye una secuencia de aminoácidos amino- y/o carboxilo-terminal. También se prefieren formas de degradación de los polipéptidos de la invención producidas por o en una célula huésped. Se prefieren adicionalmente fragmentos caracterizados por atributos estructurales o funcionales tales como fragmentos que comprenden regiones de hélice alfa y formadoras de hélice alfa, regiones de lámina beta y formadoras de lámina beta, regiones de giro y formadoras de giro, regiones superenrolladas y formadoras de superenrollamientos, regiones hidrófilas, regiones hidrófobas, regiones alfa anfipáticas, regiones beta anfipáticas, regiones flexibles, regiones formadoras de superficies, región de unión a sustrato y regiones de alto índice antigénico.

Los fragmentos preferidos adicionales incluyen un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 15, 20, 30, 40, 50 ó 100 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos seleccionada del Grupo de SEC 2, o un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 15, 20, 30, 40, 50 ó 100 aminoácidos contiguos truncados o delecionados de la secuencia de aminoácidos seleccionada del Grupo de SEC 2.

Los polipéptidos de BASB232 expuestos en las SEC ID 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 53 y 54 pertenecen a una familia de proteínas autotransportadoras. En esta familia existen dos dominios: el dominio pasajero que

ES 2 346 314 T3

está expuesto en superficie y el dominio beta que está anclado en la proteína de membrana externa. El dominio pasajero es un fragmento preferido para su uso vacunal. El dominio pasajero se predijo para cada uno de los polipéptidos de BASB232 expuestos en las SEC ID 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 50, 52 y 100 de la tabla 2.

TABLA 2

secuencias peptídicas codificadas	Primeros aminoácidos del fragmento preferido	Últimos aminoácidos del fragmento preferido
SEC ID N°: 30	35	604
SEC ID N°: 32	40	614
SEC ID N°: 34	41	706
SEC ID N°: 36	40	132
SEC ID N°: 38	36	114
SEC ID N°: 40	31	595
SEC ID N°: 42	1	185
SEC ID N°: 44	1	458
SEC ID N°: 50	38	1984
SEC ID N°: 52	43	561
SEC ID N°: 100	39	1453

Los fragmentos descritos en la tabla 2 son fragmentos preferidos. Estos fragmentos pueden modificarse fácilmente añadiendo o eliminando 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 ó 50 aminoácidos de cualquiera o de ambos extremos N- y C- terminales.

Son fragmentos aún más preferidos los que comprenden un epítipo de célula B o célula T auxiliar, por ejemplo los fragmentos/péptidos descritos en el ejemplo 8.

Los fragmentos de los polipéptidos de la invención pueden emplearse para producir el polipéptido de longitud completa correspondiente por síntesis de péptidos; por lo tanto, estos fragmentos pueden emplearse como intermedios para producir los polipéptidos de longitud completa de la invención. El término "fragmento" incluye el propio fragmento o el fragmento puede ser parte de una proteína de mayor tamaño o de una proteína de fusión.

Se prefieren particularmente variantes en las que varios, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 ó 1 aminoácido se sustituyen, delecionan o añaden en cualquier combinación.

Los polipéptidos, o fragmentos inmunogénicos, en relación con la invención pueden estar en forma de la proteína "madura" o pueden ser una parte de una proteína de mayor tamaño, tal como un precursor o una proteína de fusión. Con frecuencia es ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contiene secuencias líder o secretoras, prosequencias, secuencias que ayudan a la purificación, tales como múltiples restos de histidina, o una secuencia adicional para su estabilidad durante la producción recombinante. Además, también se tiene en cuenta la adición de un polipéptido exógeno o cola lipídica o secuencias polinucleotídicas para aumentar el potencial inmunogénico de la molécula final.

En un aspecto, la divulgación se refiere a proteínas de fusión solubles obtenidas por ingeniería genética que comprenden un polipéptido para su uso en la invención, un fragmento del mismo y diversas porciones de las regiones constantes de cadenas pesada o ligera de inmunoglobulinas de diversas subclases (IgG, IgM, IgA, IgE). Se prefiere como inmunoglobulina la parte constante de la cadena pesada de IgG humana, particularmente IgG1, en la que la fusión tiene lugar en la región de bisagra. En una realización particular, la parte Fc puede eliminarse simplemente por incorporación de una secuencia de escisión que puede escindirse con factor de coagulación sanguínea Xa.

Además, esta divulgación se refiere a procedimientos para la preparación de estas proteínas de fusión por ingeniería genética, y al uso de las mismas para exploración de fármacos, diagnóstico y terapia. Un aspecto adicional de la divulgación también se refiere a polinucleótidos que codifican dichas proteínas de fusión. Pueden encontrarse ejemplos de la tecnología de proteínas de fusión en la Solicitudes de Patente Internacional N°: WO 94/29458 y WO 94/22914.

Las proteínas pueden conjugarse químicamente o expresarse como proteínas de fusión recombinantes, permitiendo que se produzcan niveles aumentados en un sistema de expresión en comparación con una proteína no fusionada. El compañero de fusión puede contribuir a proporcionar epítopes de células T auxiliares (compañero de fusión inmunológico), preferentemente epítopes de células T auxiliares reconocidos por seres humanos, o contribuir a la expresión de la proteína (potenciador de la expresión) a mayores rendimientos que la proteína recombinante nativa. Preferentemente, el compañero de fusión será tanto un compañero de fusión inmunológico como un compañero potenciador de la expresión.

Los compañeros de fusión incluyen proteína D de *Haemophilus influenzae* y la proteína no estructural de virus influenza, NS1 (hemaglutinina). Otro compañero de fusión es la proteína conocida como Omp26 (documento WO 97/01638). Otro compañero de fusión es la proteína conocida como LytA. Preferentemente, se usa la porción C-terminal de la molécula. LytA procede de *Streptococcus pneumoniae*, que sintetiza una N-acetil-L-alanina amidasa, la amidasa LytA (codificada por el gen *lytA* {Gen, 43 (1986) páginas 265-272}) una autolisina que degrada específicamente ciertos enlaces en la estructura del peptidoglicano. El dominio C-terminal de la proteína LytA es responsable de la afinidad hacia la colina o hacia algunos análogos de colina tales como DEAE. Esta propiedad se ha aprovechado para el desarrollo de plásmidos de expresión de C-LytA en *E. coli*, útiles para la expresión de proteínas de fusión. Se ha descrito la purificación de proteínas híbridas que contienen al fragmento C-LytA en su extremo amino-terminal {Biotechnology: 10, (1992) páginas 795-798}. Es posible usar la porción de repetición de la molécula LytA que se encuentra en el extremo C-terminal que comienza en el resto 178, por ejemplo, los restos 188-305.

La presente invención también puede utilizar variantes de los polipéptidos mencionados anteriormente, es decir, polipéptidos que varían de los de referencia por sustituciones de aminoácidos conservativas, por las que un resto se sustituye por otro con características similares. Son sustituciones típicas de este tipo entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre los restos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln; y entre los restos básicos Lys y Arg; o los restos aromáticos Phe y Tyr.

Pueden prepararse polipéptidos de la presente invención de cualquier forma adecuada. Dicho polipéptidos incluyen polipéptidos de origen natural aislados, polipéptidos producidos de forma recombinante, polipéptidos producidos sintéticamente o polipéptidos producidos por una combinación de estos procedimientos. Se entienden bien en la técnica medios para preparar dichos polipéptidos.

Se prefiere más que un polipéptido de la invención proceda de *B. pertussis*, sin embargo, opcionalmente se obtiene de otros organismos del mismo género taxonómico. Un polipéptido de la invención también puede obtenerse, por ejemplo, de organismos de la misma familia u orden taxonómico (por ejemplo, *Bordetella parapertussis* o *Bordetella bronchoseptica*).

Polinucleótidos

También se desvelan polinucleótidos que codifican polipéptidos de BASB232, particularmente polinucleótidos que codifican polipéptidos denominados en el presente documento BASB232.

El polinucleótido desvelado puede comprender una región que codifica polipéptidos de BASB232 que comprenden secuencias expuestas en el Grupo de SEC 1, que incluyen un gen de longitud completa o una variante o fragmento del mismo. Los polinucleótidos de la divulgación no incluyen un ADN genómico completo de una especie de *Bordetella*, por ejemplo, *B. pertussis* o *B. parapertussis*.

Como un aspecto adicional de la divulgación, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican y/o expresan polipéptidos y polinucleótidos de BASB232, particularmente polipéptidos y polinucleótidos de BASB232 de *B. pertussis* o *B. parapertussis*, incluyendo, por ejemplo, ARN no procesados, ARN de ribozimas, ARNm, ADNc, ADN-B y ADN-Z. Las realizaciones adicionales de la divulgación incluyen polinucleótidos y polipéptidos biológicamente, diagnósticamente, profilácticamente, clínicamente o terapéuticamente útiles, y variantes de los mismos, y composiciones, preferentemente composiciones inmunogénicas, que comprenden los mismos.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a polinucleótidos aislados, incluyendo al menos un gen de longitud completa, que codifica polipéptidos de BASB232 que tienen una secuencia de aminoácidos deducida del Grupo de SEC 2 y polinucleótidos estrechamente relacionados con los mismos y variantes de los mismos.

También se proporcionan polipéptidos de BASB232 de *B. pertussis* o *B. parapertussis* que comprenden o están constituidos por una secuencia de aminoácidos seleccionada del Grupo de SEC 2 o una variante de los mismos. Usando la información proporcionada en el presente documento, tal como una secuencia polinucleotídica expuesta en el Grupo de SEC 1, un polinucleótido de la divulgación que codifica un polipéptido de BASB232 puede obtenerse usando procedimientos de clonación y exploración convencionales, tales como los de clonación y secuenciación de fragmentos de ADN cromosómicos a partir de bacterias usando células de *B. pertussis* cepa Tohama I como material de partida, seguido de la obtención de un clon de longitud completa. Por ejemplo, para obtener una secuencia polinucleotídica de la divulgación, tal como una secuencia polinucleotídica dada en el Grupo de SEC 1, típicamente se sonda una biblioteca de clones de ADN cromosómico de *B. pertussis* cepa Tohama I en *E. coli* o algún otro huésped adecuado con un oligonucleótido radiomarcado, preferentemente de 17 nucleótidos o más largo, derivado

de una secuencia parcial. Los clones que llevan un ADN idéntico al de la sonda pueden distinguirse después usando condiciones de hibridación rigurosas. Por secuenciación de los clones individuales identificados de este modo por hibridación con cebadores de secuenciación diseñados a partir de la secuencia polipeptídica o polinucleotídica original, entonces es posible extender la secuencia polinucleotídica en ambas direcciones para determinar una secuencia génica de longitud completa. Convenientemente, dicha secuenciación se realiza, por ejemplo, usando ADN bicatenario desnaturalizado preparado a partir de un clon plasmídico. Se describen técnicas adecuadas por Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook y col., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989). (Véase, en particular, Screening By Hybridization 1.90 y Sequencing Denatured Double-Stranded ADN Templates 13.70). También puede realizarse secuenciación directa de ADN genómico para obtener una secuencia génica de longitud completa. Ilustrativo de la invención, se descubrió que cada polinucleótido expuesto en el Grupo de SEC 1 en una genoteca de ADN procedía de *B. pertussis* o *B. parapertussis*.

Además, cada secuencia de ADN expuesta en el Grupo de SEC 1 contiene una fase electroabierta que codifica una proteína que tiene aproximadamente el número de restos aminoácidos expuestos en el Grupo de SEC 2 con un peso molecular deducido que puede calcularse usando valores de peso molecular de restos aminoácidos bien conocidos por los expertos en la materia.

Los polinucleótidos de Grupo de SEC 1, entre el codón de inicio y el codón de terminación codifican en respectivamente los polipéptidos del Grupo de SEC 2. El número de nucleótidos del codón de inicio y el primer nucleótido del codón de terminación se enumera en la tabla 3 para cada polinucleótido del Grupo de SEC 1.

TABLA 3

La SEC ID N° respectiva para cada Orf se encuentra en la Tabla 1.		
Nombre	Codón de Inicio	Primer nucleótido del codón de terminación
Orf1	1	2212
Orf2	1	2476
Orf3	1	2404
Orf4	1	2305
Orf5	1	2188
Orf6	1	2065
Orf7	1	2230
Orf8	1	2269
Orf9	1	2107
Orf10	1	2611
Orf11	1	2281
Orf12	1	1888
Orf13	1	1732
Orf14	1	1435
Orf15	1	2731
Orf16	1	2746
Orf17	1	3031
Orf18	1	1942
Orf19	1	1255
Orf20	1	2710

ES 2 346 314 T3

	La SEC ID N° respectiva para cada Orf se encuentra en la Tabla 1.		
	Nombre	Codón de Inicio	Primer nucleótido del codón de terminación
5	Orf21	1	1447
	Orf22	1	2278
	Orf23	1	1546
10	Orf24	1	1192
	Orf25	1	6901
	Orf26	1	2620
15	Orf27	1	3118
	Orf28	1	2242
	Orf29	1	1576
20	Orf30	1	1510
	Orf31	1	1492
	Orf32	1	1492
25	Orf33	1	1381
	Orf34	1	1348
30	Orf35	1	1288
	Orf36	1	1144
	Orf37	1	1096
35	Orf38	1	898
	Orf39	1	853
	Orf40	1	847
40	Orf41	1	814
	Orf42	1	802
	Orf43	1	691
45	Orf44	1	679
	Orf45	1	559
50	Orf46	1	553
	Orf47	1	547
	Orf48	1	502
55	Orf49	1	457
	Orf50	1	5308
	Orf51	1	580
60	Orf52	1	580
	Orf53	1	2230
65	Orf54	1	1156
	Orf55	1	1165

ES 2 346 314 T3

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende o está constituido por:

- (a) una secuencia polinucleotídica que tiene una identidad de al menos el 85%, preferentemente una identidad de al menos el 90%, más preferentemente una identidad de al menos el 95%, o más preferentemente una identidad de al menos el 97, 98 ó 99%, o exacta, con cualquier secuencia del Grupo de SEC 1, a lo largo de la longitud completa de la secuencia polinucleotídica del Grupo de SEC 1; o
- (b) una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 85%, preferentemente una identidad de al menos el 90%, más preferentemente una identidad de al menos el 95%, aún más preferentemente una identidad de al menos el 97, 98, 99%, o exacta del 100%, con cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada del Grupo de SEC 2, a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos del Grupo de SEC 2.

Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención, incluyendo homólogos y ortólogos de especies distintas de *B. pertussis*, puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende las etapas de explorar una biblioteca apropiada en condiciones de hibridación rigurosas (por ejemplo, usando una temperatura en el intervalo de 45-65°C y una concentración de SDS del 0,1-1%) con una sonda marcada o detectable constituida por o que comprende cualquier secuencia seleccionada del Grupo de SEC 1 o un fragmento de la misma; y aislar un gen de longitud completa y/o clones genómicos que contienen dicha secuencia polinucleotídica.

La divulgación proporciona una secuencia polinucleotídica idéntica, a lo largo de su longitud completa, a una secuencia codificante (fase de lectura abierta) expuesta en el Grupo de SEC 1. También se proporciona por la divulgación una secuencia codificante para un polipéptido maduro o un fragmento del mismo, de por sí, así como una secuencia codificante para un polipéptido maduro o un fragmento en fase de lectura con otra secuencia codificante, tal como una secuencia que codifica una secuencia líder o secretora, una secuencia de pre- o pro- o prepro-proteína. El polinucleótido de la divulgación también puede contener al menos una secuencia no codificante, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitación, al menos una secuencia no codificante 5' y 3', tal como las secuencias transcritas pero no traducidas, señales de terminación (tales como señales de terminación dependientes de rho e independientes de rho), sitios de unión al ribosoma, secuencias de Kozak, secuencias que estabilizan ARNm, intrones y señales de poliadenilación. La secuencia polinucleotídica también puede comprender una secuencia codificante adicional que codifique aminoácidos adicionales. Por ejemplo, puede codificarse una secuencia marcadora que facilite la purificación del polipéptido fusionado. En ciertas realizaciones de la invención, la secuencia marcadora es un péptido de hexa-histidina, como se proporciona en el vector pQE (Qiagen, Inc.) y se describe en Gentz y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86: 821-824 (1989), o un marcador peptídico de HA (Wilson y col., Cell 37: 767 (1984), pudiendo ambos ser útiles en la purificación de la secuencia polipeptídica fusionada con los mismos. Los polinucleótidos de la divulgación también incluyen, pero sin limitación, polinucleótidos que comprenden un gen estructural y sus secuencias asociadas de forma natural que controlan la expresión génica.

Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos de BASB232 del Grupo de SEC 2 pueden ser idénticas a las secuencias codificantes de polinucleótidos correspondientes del Grupo de SEC 1. La posición del primer y último nucleótidos de las secuencias codificantes del Grupo de SEC1 se enumeran en la tabla 4. Como alternativa, puede ser cualquier secuencia, que como resultado de la redundancia (degeneración) del código genético, también codifique polipéptidos del Grupo de SEC2.

TABLA 4

Secuencia de nucleótidos	Secuencia peptídica codificada	Codón de inicio	Último nucleótido de la secuencia codificante
SEC ID Nº: 1	SEC ID Nº: 2	1	2211
SEC ID Nº: 3	SEC ID Nº: 4	1	2475
SEC ID Nº: 5	SEC ID Nº: 6	1	2403
SEC ID Nº: 7	SEC ID Nº: 8	1	2304
SEC ID Nº: 9	SEC ID Nº: 10	1	2187
SEC ID Nº: 11	SEC ID Nº: 12	1	2064
SEC ID Nº: 13	SEC ID Nº: 14	1	2229
SEC ID Nº: 15	SEC ID Nº: 16	1	2268
SEC ID Nº: 17	SEC ID Nº: 18	1	2106
SEC ID Nº: 19	SEC ID Nº: 20	1	2610
SEC ID Nº: 21	SEC ID Nº: 22	1	2280
SEC ID Nº: 23	SEC ID Nº: 24	1	1887
SEC ID Nº: 25	SEC ID Nº: 26	1	1731

ES 2 346 314 T3

	Secuencia de nucleótidos	Secuencia peptídica codificada	Codón de inicio	Último nucleótido de la secuencia codificante
5	SEC ID N°: 27	SEC ID N°: 28	1	1434
	SEC ID N°: 29	SEC ID N°: 30	1	2730
	SEC ID N°: 31	SEC ID N°: 32	1	2745
10	SEC ID N°: 33	SEC ID N°: 34	1	3030
	SEC ID N°: 35	SEC ID N°: 36	1	1941
	SEC ID N°: 37	SEC ID N°: 38	1	1254
15	SEC ID N°: 39	SEC ID N°: 40	1	2709
	SEC ID N°: 41	SEC ID N°: 42	1	1446
	SEC ID N°: 43	SEC ID N°: 44	1	2277
20	SEC ID N°: 45	SEC ID N°: 46	1	1545
	SEC ID N°: 47	SEC ID N°: 48	1	1191
	SEC ID N°: 49	SEC ID N°: 50	1	6900
25	SEC ID N°: 51	SEC ID N°: 52	1	2619
	SEC ID N°: 53	SEC ID N°: 54	1	3117
	SEC ID N°: 55	SEC ID N°: 56	1	2241
30	SEC ID N°: 57	SEC ID N°: 58	1	1575
	SEC ID N°: 59	SEC ID N°: 60	1	1509
	SEC ID N°: 61	SEC ID N°: 62	1	1491
35	SEC ID N°: 63	SEC ID N°: 64	1	1491
	SEC ID N°: 65	SEC ID N°: 66	1	1380
	SEC ID N°: 67	SEC ID N°: 68	1	1347
40	SEC ID N°: 69	SEC ID N°: 70	1	1287
	SEC ID N°: 71	SEC ID N°: 72	1	1143
	SEC ID N°: 73	SEC ID N°: 74	1	1095
45	SEC ID N°: 75	SEC ID N°: 76	1	897
	SEC ID N°: 77	SEC ID N°: 78	1	852
50	SEC ID N°: 79	SEC ID N°: 80	1	846
	SEC ID N°: 81	SEC ID N°: 82	1	813
	SEC ID N°: 83	SEC ID N°: 84	1	801
55	SEC ID N°: 85	SEC ID N°: 86	1	690
	SEC ID N°: 87	SEC ID N°: 88	1	678
	SEC ID N°: 89	SEC ID N°: 90	1	558

60

65

	Secuencia de nucleótidos	Secuencia peptídica codificada	Codón de inicio	Último nucleótido de la secuencia codificante
5	SEC ID N°: 91	SEC ID N°: 92	1	552
	SEC ID N°: 93	SEC ID N°: 94	1	546
10	SEC ID N°: 95	SEC ID N°: 96	1	501
	SEC ID N°: 97	SEC ID N°: 98	1	456
	SEC ID N°: 99	SEC ID N°: 100	1	5307
15	SEC ID N°: 101	SEC ID N°: 102	1	579
	SEC ID N°: 103	SEC ID N°: 104	1	579
	SEC ID N°: 105	SEC ID N°: 106	1	2229
20	SEC ID N°: 107	SEC ID N°: 108	1	1155
	SEC ID N°: 109	SEC ID N°: 110	1	1164

La expresión “polinucleótido que codifica un polipéptido”, como se usa en el presente documento, abarca polinucleótidos que incluyen una secuencia que codifica un polipéptido de la invención, particularmente un polipéptido bacteriano y, más particularmente, un polipéptido de BASB232 de *B. pertussis* o *B. paraptussis* que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las secuencias del Grupo de SEC 2. El término también abarca polinucleótidos que incluyen una sola región continua o regiones discontinuas que codifican el polipéptido (por ejemplo, polinucleótidos interrumpidos por un fago integrado, una secuencia de inserción integrada, una secuencia de vector integrada, una secuencia de transposón integrada o, debido a la edición de ARN o a la reorganización de ADN genómico) junto con regiones adicionales que también pueden contener secuencias codificantes y/o no codificantes.

La divulgación se refiere además a variantes de los polinucleótidos descritos en el presente documento que codifican variantes de polipéptidos que tiene una secuencia de aminoácidos deducida de cualquiera de las secuencias del Grupo de SEC 2. Pueden usarse fragmentos de polinucleótidos de la invención, por ejemplo, para sintetizar polinucleótidos de longitud completa de la invención.

Son fragmentos preferidos los polinucleótidos que codifican un epítipo de células B o de células T auxiliares, por ejemplo, los fragmentos/péptidos descritos en el Ejemplo 8, y genes quiméricos recombinantes que comprenden dichos fragmentos polinucleotídicos.

También se desvelan polinucleótidos que codifican variantes de BASB232 que tienen la secuencia de aminoácidos de polipéptidos de BASB232 de cualquier secuencia del Grupo de SEC 2 en la que varios, unos pocos, de 5 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2, 1 o ningún resto aminoacídico se sustituye, modifica, deleciona y/o añade en cualquier combinación. Entre éstas existen sustituciones, adiciones y delecciones silentes que no alteran las propiedades y actividades de los polipéptidos de BASB232. También se desvelan polinucleótidos que tienen una identidad de al menos el 85% a lo largo de su longitud completa con polinucleótidos que codifican polipéptidos de BASB232 que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las secuencias del Grupo de SEC 2, y polinucleótidos que son complementarios a dichos polinucleótidos. También se desvelan polinucleótidos que comprenden una región que tiene una identidad de al menos el 90% a lo largo de su longitud completa con polinucleótidos que codifican polipéptidos y polinucleótidos de BASB232 complementarios a los mismos, al igual que polinucleótidos que tienen una identidad de al menos el 95% a lo largo de su longitud completa y los que tienen una identidad de al menos el 97%, 98% o 99%. Se desvelan además polinucleótidos que codifican polipéptidos que conservan sustancialmente la misma función biológica o actividad que polipéptidos maduros codificados por secuencias de ADN seleccionadas del Grupo de SEC 1. También se desvelan polinucleótidos que hibridan, particularmente en condiciones rigurosas, con secuencias polinucleotídicas de BASB232, tales como los polinucleótidos del Grupo de SEC 1.

La divulgación se refiere además a polinucleótidos que hibridan con las secuencias polinucleotídicas desveladas en el presente documento. A este respecto, la divulgación se refiere especialmente a polinucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con los polinucleótidos descritos en el presente documento. Como se usan en el presente documento, las expresiones “condiciones rigurosas” y “condiciones de hibridación rigurosas” significan que la hibridación se produce solamente si existe una identidad de al menos el 95% y preferentemente una identidad de al menos el 97% entre las secuencias. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación rigurosas es la incubación durante una noche a 42°C en una solución que comprende: formamida al 50%, SSC 5x (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5 x, sulfato de dextrano al 10% y 20 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado, seguida de lavado del soporte de hibridación en SSC 0,1 x a

aproximadamente 65°C. La hibridación y las condiciones de lavado son bien conocidas y se ejemplifican en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989), particularmente en el Capítulo 11 del mismo. También puede usarse hibridación en solución con las secuencias polinucleotídicas proporcionadas por la divulgación.

La divulgación también proporciona un polinucleótido constituido por o que comprende una secuencia polinucleotídica obtenida por exploración de una biblioteca apropiada que contiene el gen completo para una secuencia polinucleotídica expuesta en cualquiera de las secuencias del Grupo de SEC 1 en condiciones de hibridación rigurosas con una sonda que tiene la secuencia de dicha secuencia polinucleotídica expuesta en las secuencias correspondientes del Grupo de SEC 1, o un fragmento de la misma; y aislamiento de dicha secuencia polinucleotídica. Los fragmentos útiles para obtener dicho polinucleótido incluyen, por ejemplo, sondas y cebadores descritos con todo detalle en otra parte del presente documento.

Como se analiza en otra parte del presente documento respecto a ensayos de polinucleótidos de la divulgación, por ejemplo, los polinucleótidos de la divulgación pueden usarse como sonda de hibridación para ARN, ADNc y ADN genómico para aislar clones de genómico y ADNc de longitud completa que codifican BASB232 y aislar clones de genómico y ADNc de otros genes que tienen una alta identidad, particularmente alta identidad de secuencia, con los genes de BASB232. Dichas sondas comprenderán generalmente al menos 15 restos nucleotídicos o pares de bases. Preferentemente, dichas sondas tendrán al menos 30 restos nucleotídicos o pares de bases y pueden tener al menos 50 restos nucleotídicos o pares de bases. Las sondas particularmente preferidas tendrán al menos 20 restos nucleotídicos o pares de bases y tendrán menos de 30 restos nucleotídicos o pares de bases.

Puede aislarse una región codificante de genes de BASB232 por exploración usando secuencias de ADN proporcionadas en el Grupo de SEC 1 para sintetizar una sonda oligonucleotídica. Después, se usa un oligonucleótido marcado que tiene una secuencia complementaria a la de un gen de la invención para explorar una biblioteca de ADNc, ADN genómico o ARNm para determinar con qué miembros de la biblioteca hibrida la sonda.

Existen varios procedimientos disponibles y bien conocidos por los expertos en la técnica para obtener ADN de longitud completa o extender ADN cortos, por ejemplo, los basados en el procedimiento de amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE) (véase, por ejemplo, Frohman, y col., PNAS USA 85: 8998-9002, 1988). Modificaciones recientes de la técnica, ejemplificada por la tecnología Marathon™ (Clontech Laboratories Inc.), por ejemplo, han simplificado significativamente la búsqueda de ADNc más largos. En la tecnología Marathon™, se han preparado ADNc a partir de ARNm extraído de un tejido seleccionado y se ha ligado una secuencia “adaptadora” en cada extremo. Después, se lleva a cabo amplificación de ácido nucleico (PCR) para amplificar el extremo 5’ “ausente” del ADN usando una combinación de cebadores oligonucleotídicos específicos de gen y específicos de adaptador. La reacción de PCR se repite después usando cebadores “anidados”, es decir, cebadores diseñados para hibridar dentro del producto amplificado (típicamente un cebador específico de adaptador que hibrida más 3’ en la secuencia del adaptador y un cebador específico de gen que hibrida más 5’ en la secuencia génica seleccionada). Los productos de esta reacción pueden analizarse después mediante secuenciación de ADN y puede construirse un ADN de longitud completa uniéndolo al producto directamente al ADN existente para dar una secuencia completa, o llevando a cabo una PCR de longitud completa separada usando la nueva información de secuencia para el diseño del cebador 5’.

Los polinucleótidos y polipéptidos de la divulgación pueden emplearse, por ejemplo, como reactivos y materiales de investigación para el descubrimiento de tratamientos y el diagnóstico de enfermedades, particularmente enfermedades humanas, como se analiza adicionalmente en el presente documento en relación con ensayos de polinucleótidos.

Los polinucleótidos de la divulgación, que son oligonucleótidos derivados de una secuencia del Grupo de SEC 1, pueden usarse en los procedimientos del presente documento como se describe, pero preferentemente para PCR, para determinar si los polinucleótidos identificados en el presente documento se transcriben o no en su totalidad o en parte en bacterias en tejido infectado. Se reconoce que dichas secuencias también tendrán utilidad en el diagnóstico de la fase de infección y del tipo de infección que ha logrado el patógeno.

La divulgación también proporciona polinucleótidos que codifican un polipéptido que es la proteína madura más aminoácidos amino- o carboxilo-terminales adicionales, o aminoácidos interiores al polipéptido maduro (cuando la forma madura tiene más de una cadena polipeptídica, por ejemplo). Dichas secuencias pueden desempeñar un papel en el procesamiento de una proteína a partir de un precursor hasta una forma madura, pueden permitir el transporte de proteínas, pueden alargar o acortar la semivida de la proteína o pueden facilitar la manipulación de una proteína para su ensayo o producción, entre otras cosas. Como generalmente es el caso *in vivo*, los aminoácidos adicionales pueden eliminarse por procesamiento de la proteína madura por enzimas celulares.

Para todos y cada uno de los polinucleótidos de la divulgación, se proporciona un polinucleótido complementario al mismo. Se prefiere que estos polinucleótidos complementarios sean totalmente complementarios a cada polinucleótido con el que son complementarios.

Una proteína precursora, que tiene una forma madura del polipéptido fusionada a una o más prosequencias puede ser una forma inactiva del polipéptido. Cuando se eliminan prosequencias dichos precursores inactivos se activan generalmente. Algunas o todas las prosequencias pueden eliminarse antes de la activación. Generalmente, dichos precursores se denominan proproteínas. Además de las representaciones A, G, C, T/U convencionales para nucleótidos,

el término "N" también puede usarse para describir ciertos polinucleótidos de la divulgación. "N" significa que cualquiera de los cuatro nucleótidos de ADN o ARN puede aparecer en dicha posición designada en la secuencia de ADN o ARN, excepto por que se prefiere que N no sea un ácido nucleico que cuando se tome en combinación con las posiciones de nucleótidos adyacentes, cuando se lea en la fase de lectura correcta, tenga el efecto de generar un codón de terminación prematuro en dicha fase de lectura. En resumen, un polinucleótido de la divulgación puede codificar una proteína madura, una proteína madura más una secuencia líder (que puede denominarse preproteína), un precursor de una proteína madura que tiene una o más prosequencias que no son secuencias líder de una preproteína, o una preproteína, que es un precursor de una preproteína, que tiene una secuencia líder y una o más prosequencias, que generalmente se eliminan durante las etapas de procesamiento que producen formas activas y maduras del polipéptido.

De acuerdo con un aspecto de la divulgación, se proporciona el uso de un polinucleótido de la invención para fines terapéuticos o profilácticos, en particular inmunización genética.

El uso de un polinucleótido de la divulgación en inmunización genética empleará preferentemente un procedimiento de administración adecuado, tal como inyección directa de ADN plasmídico en músculos (Wolff y col., Hum Mol Genet (1992) 1: 363, Manthorpe y col., Hum. Gene Ther. (1983) 4: 419), administración de ADN formando complejos con transportadores proteicos específicos (Wu y col., J Biol Chem. (1989) 264: 16985), coprecipitación de ADN con fosfato cálcico (Benvenisty y Reshef, PNAS USA, (1986) 83: 9551), encapsulación de ADN en diversas formas de liposomas (Kaneda y col., Science (1989) 243: 375), bombardeo de partículas (Tang y col., Nature (1992) 356: 152, Eisenbraun y col., ADN Cell Biol (1993) 12: 791) e infección *in vivo* usando vectores retrovirales clonados (Seeger y col., PNAS USA (1984) 81: 5849).

Vectores, Células Huésped, Sistemas de Expresión

La divulgación también se refiere a vectores que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos de la divulgación, a células huésped que se modifican por ingeniería genética con vectores de la divulgación, y a la producción de polipéptidos relacionados con la invención por técnicas recombinantes. También pueden emplearse sistemas de traducción sin células para producir dichas proteínas usando ARN derivados de las construcciones de ADN de la invención.

Pueden prepararse polipéptidos recombinantes de la presente invención, mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia, a partir de células huésped modificadas por ingeniería genética que comprenden sistemas de expresión. Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a sistemas de expresión que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos de la presente divulgación, a células huésped que están modificadas por ingeniería genética con dichos sistemas de expresión y a la producción de polipéptidos de la invención por técnicas recombinantes.

Para la producción recombinante de los polipéptidos de la invención, las células huésped pueden modificarse por ingeniería genética para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos o polinucleótidos de la divulgación. La introducción de un polinucleótido en la célula huésped puede efectuarse por procedimientos descritos en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis, y col., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, (1986) y Sambrook, y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), tales como, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, conjugación, transducción, carga con raspador, introducción balística e infección.

Los ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen células bacterianas, tales como células de estreptococos, estafilococos, enterococos, *E. coli*, Streptomyces, cianobacterias, *Bacillus subtilis*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*; células fúngicas tales como células de una levadura, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Pichia*, un basidiomiceto, *Candida albicans* y *Aspergillus*; células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales tales como CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293, CV-1 y células de melanoma de Bowes; y células vegetales tales como células de una gimnosperma o angiosperma.

Pueden usarse una gran diversidad de sistemas de expresión para producir los polipéptidos de la invención. Dichos vectores incluyen, entre otros, vectores derivados de cromosomas, episomas y virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófago, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como baculovirus, de papovavirus, tales como SV40, de virus vaccinia, de adenovirus, de virus de la viruela aviar, de virus de la pseudorrabia, picornavirus, retrovirus y alfavirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos plasmídicos y de bacteriófago, tales como cósmidos y fagémidos. Las construcciones de sistemas de expresión pueden contener regiones de control que regulen así como engendren expresión. Generalmente, cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos y/o expresar un polipéptido en un huésped puede usarse para la expresión a este respecto. La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el sistema de expresión por cualquiera de una diversidad de técnicas bien conocidas y de rutina, tales como, por ejemplo, las expuestas en Sambrook y col., MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL, (anteriormente).

En sistemas de expresión recombinantes en eucariotas, para la secreción de una proteína traducida en la luz del retículo endoplásmico, en el espacio periplásmico o en el entorno extracelular, pueden incorporarse señales de secreción

apropiadas en el polipéptido expresado. Estas señales pueden ser endógenas para el polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

Los polipéptidos de la presente invención pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes mediante procedimientos bien conocidos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Más preferentemente, se emplea cromatografía de afinidad de metal iónico (IMAC) para su purificación. Pueden emplearse técnicas bien conocidas para el replegamiento de proteínas para regenerar la conformación activa cuando el polipéptido se desnaturaliza durante la síntesis intracelular, el aislamiento y/o la purificación.

El sistema de expresión también puede ser un microorganismo vivo recombinante, tal como un virus o una bacteria. El gen de interés puede insertarse en el genoma de una bacteria o virus vivo recombinante. La inoculación y la infección *in vivo* con este vector vivo conducirá a la expresión *in vivo* del antígeno y a la inducción de respuestas inmunes. Los virus y bacterias usados para este fin son, por ejemplo: poxvirus (por ejemplo; vaccinia, viruela aviar, viruela del canario), alfavirus (virus Sindbis, virus del bosque de Semliki, virus de la encefalitis equina venezolana), adenovirus, virus adenoasociados, picornavirus (poliovirus, rinovirus), herpesvirus (virus varicela zóster, etc.), *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, BCG, estreptococos. Estos virus y bacterias pueden ser virulentos, o atenuarse de diversas formas para obtener vacunas vivas. Dicha vacunas vivas también forman parte de la invención.

Combinaciones de antígenos de *Bordetella* en composiciones inmunogénicas

Un aspecto adicional de la invención desvela combinaciones particulares de antígenos de *Bordetella* que, cuando se combinan, conducen a una composición inmunogénica eficaz frente a la infección por *Bordetella*. La eficacia de la composición inmunogénica se determina como su capacidad para generar una respuesta protectora frente a *B. pertussis* principalmente, pero se prefiere que también genere un efecto protector frente a la bacteria relacionada *B. parapertussis* y/o *B. bronchiseptica*.

Las combinaciones preferidas de antígenos de *Bordetella*, cuando se combinan en una composición inmunogénica o vacuna, permiten que la respuesta inmune se dirija a diferentes funciones de *Bordetella*. Dicha respuesta inmune es más capaz de tratar o prevenir una infección por *Bordetella*. Por ejemplo, los factores de virulencia conocidos incluyen adhesinas como FHA, fimbrias, pertactina, que están implicadas en la unión de *Bordetella* a células huésped; toxinas tales como la toxina pertúsica, adenilato ciclasa, tienen un papel en la inutilización del sistema inmune del huésped; BrkA actúa como factor de resistencia en el suero y TcfA tienen un papel en la colonización de la tráquea.

En particular, combinaciones de determinados antígenos de diferentes clases, algunos de los cuales están implicados en la adhesión a células huésped, algunos de los cuales están implicados en la adquisición de hierro, algunos de los cuales son autotransportadores y algunos de los cuales son toxinas, pueden generar una respuesta inmune que proteja frente a múltiples funciones de *Bordetella* necesarias para mantener la infección. Dichas combinaciones de antígenos pueden conducir sorprendentemente a una eficacia vacunal mejorada frente a la infección por *Bordetella*, en la que la respuesta inmune se dirige a más de una función de la bacteria. Preferentemente, la eficacia vacunal mejorada es frente a *B. pertussis* y/o *B. purupertussis*.

Por consiguiente, la invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden

- (i) una proteína BrkA que es un polipéptido que comparte una identidad de al menos el 70% con la SEC ID N°: 34 o que comprende un fragmento antigénico de al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 34;
- (ii) FHA
- (iii) toxina pertúsica

y al menos, o exactamente, uno, dos, tres, preferentemente cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez antígenos de *Bordetella* diferentes, preferentemente *B. pertussis*, en las que los antígenos se seleccionan de al menos uno, dos, tres, cuatro o cinco de las categorías siguientes:

- a) al menos una proteína de adquisición de hierro de *Bordetella* seleccionada del grupo constituido por el polipéptido que comparte una identidad de al menos el 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% con la SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 ó 28, o que comprende un fragmento antigénico e inmunogénico de al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 ó 28;
- b) al menos una lipoproteína de *Bordetella* seleccionada del grupo constituido por el polipéptido que comparte una identidad de al menos el 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% con la SEC ID N°: 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96 ó 98, o que comprende un fragmento antigénico e inmunogénico de al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96 ó 98;

- c) al menos una adhesina de *Bordetella* seleccionada del grupo constituido por las fimbrias 2 y/o 3 o pertactina; y
- d) al menos una toxina/invasina de *Bordetella* o antígenos implicados en la secreción de toxina/invasina seleccionados del grupo constituido por adenilato ciclasa, toxina dermonecrótica (Dnt), Tipo III ss o lipopolisacárido.

Las combinaciones de la invención no incluyen pertussis de célula completa (Pw).

Por lo tanto, las composiciones inmunogénicas de la invención no abarcan combinaciones vacunales conocidas (por ejemplo, vacunas en las que el componente pertúsico acelular está constituido por 2, 3, 4 ó 5 de FHA, toxoide pertúsico, pertactina, fimbrias 2 y fimbrias 3), sin embargo, se abarca un sólo antígeno conocido de un grupo, combinado con un nuevo antígeno de un grupo diferente.

Los antígenos de *Bordetella* pueden proceder de cualquier cepa de *Bordetella* incluyendo una o más de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* (preferentemente la primera).

Preferentemente todos los grupos de antígenos están representados en la composición inmunogénica de la invención. Cuando un antígeno se incluye en dos grupos, la inclusión de ese antígeno en una composición inmunogénica conduce a la inclusión de ambos grupos en la composición inmunogénica.

Cuando una proteína se menciona específicamente en el presente documento, preferentemente es una referencia a una proteína de longitud completa nativa, pero también puede incluir fragmentos antigénicos, preferentemente inmunogénicos de la misma (particularmente en el contexto de vacunas de subunidades). Estos son fragmentos que contienen o comprenden al menos 10 aminoácidos, preferentemente al menos 20 aminoácidos, más preferentemente al menos 30 aminoácidos, más preferentemente al menos 40 aminoácidos o más preferentemente al menos 50 aminoácidos, tomados de forma contigua de la secuencia de aminoácidos de la proteína, en la que el fragmento es más corto que la longitud completa de la proteína. Son fragmentos particularmente preferidos los dominios pasajeros de proteínas autotransportadoras como se han definido anteriormente. Además, los fragmentos antigénicos denotan fragmentos que son inmunológicamente reactivos con anticuerpos generados contra las proteínas de *B. pertussis* o con anticuerpos generados por infección de un huésped de mamífero con *Bordetella*. Los fragmentos antigénicos también incluyen fragmentos que, cuando se administran a una dosis eficaz, generan una respuesta inmune protectora frente a la infección por *Bordetella*, más preferentemente es protectora frente a la infección por *B. pertussis* y/o *B. parapertussis* y/o *B. bronchiseptica*. Preferentemente dichos fragmentos se acoplan a una fuente de epítopes de células T.

También se proporcionan proteínas de fusión recombinantes de proteínas de *Bordetella* de la invención, o fragmentos de las mismas. Éstas pueden combinar diferentes proteínas de *Bordetella* o fragmentos de las mismas en el mismo polipéptido. Como alternativa, la invención también incluye proteínas de fusión individuales de proteínas de *Bordetella* o fragmentos de las mismas, como una proteína de fusión con secuencias heterólogas, tales como un proveedor de epítopes de células T o marcadores de purificación, por ejemplo: β -galactosidasa, glutatión-S-transferasa, proteínas verdes fluorescentes (GFP), marcadores epitópicos tales como FLAG, marcador myc; polihistidina o proteínas de superficie viral tales como hemaglutinina de virus influenza, toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197.

Antígenos de la invención

1. Proteínas autotransportadoras

Las proteínas autotransportadoras típicamente están compuestas por una secuencia señal, un dominio pasajero y un dominio de anclaje para su unión a la membrana externa. Los ejemplos de proteínas autotransportadoras incluyen pertactina (SEC ID 30), Vag8 (SEC ID 32), BrkA (SEC ID 34), TcfA (SEC ID 36) (Finn y Stevens (1995) Mol. Microbiol. 16; 625-634), Phg (SEC ID 38), BipA (Stockbauer y col 2001; Molecular Microbiology 39; 65-78), BapA (SEC ID 40), BapB (SEC ID 42), BapC (SEC ID 44), proteína tipo pertactina (SEC ID 46), proteína tipo Tcf (SEC ID 48), serina proteasa extracelular (SEC ID 50, SEC ID 100), YapE (SEC ID 52), SphB 1 (SEC ID 54). Estos antígenos pueden proceder de *Bordetella pertussis* o *Bordetella parapertussis* u otras cepas de *Bordetella*.

Es particularmente ventajoso usar el dominio pasajero de un autotransportador cuando se incluye en un vacuna de subunidades. La Tabla 2 anterior define los dominios pasajeros de las proteínas autotransportadoras enumeradas anteriormente.

BipA contiene repeticiones en tándem de 90 aminoácidos, estando presentes 5 en la proteína de *B. pertussis* y estando presentes 8 en la proteína de *B. bronchiseptica*. Estas repeticiones abarcan del aminoácido 581 al 1030 en *B. pertussis* y los aminoácidos 581 a 1300 en *B. bronchiseptica*. Los fragmentos preferidos de BipA incluyen los aminoácidos de 1031 a 1308, los aminoácidos de 941 a 1308, los aminoácidos de 851 a 1308, los aminoácidos de 761 a 1308, los aminoácidos de 671 a 1308 y de 581 a 1308 de la secuencia de *B. pertussis* (o secuencias relacionadas con éstos que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 ó 50 aminoácidos añadidos o deletados en cualquiera o ambos de extremos N y C terminales).

2. Proteínas de adquisición de hierro

La adquisición de hierro es de gran importancia para patógenos de mamífero, ya que el hierro está presente en condiciones limitantes en el huésped y cualquier hierro que esté presente se secuestra por hemo y otros compuestos quelantes de hierro. El hierro de los sideróforos y complejos de unión a hierro del huésped se internaliza a través de receptores complejos férricos de membrana externa dependientes de TonB. Las proteínas de adquisición de hierro de *Bordetella* incluyen BfeA (SEC ID 2), BfrB (SEC ID 4), BfrC (SEC ID 6), FauA (SEC ID 8), receptor de sideróforo férrico (SEC ID 10), receptor de sideróforo férrico de alcaligina (SEC ID 12), proteína de transporte de hierro fhu (SEC ID 14, SEC ID 106), proteína de transporte de hierro fhu (SEC ID 16), supuesta proteína de péptido señal de receptor de ferrisideróforo tipo hidroxamato (SEC ID 18), BhuR (SEC ID 20) (Infection y Immunity 2001, 69; 6951), receptor dependiente de tonb (SEC ID 22), receptor dependiente de tonb (SEC ID 24), proteína tipo receptor de ferrisideróforo (SEC ID 26) y precursor de receptor dependiente de tonb Yncd (SEC ID 28). Estas proteínas pueden proceder de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* u otras cepas de *Bordetella*, preferentemente la primera.

3. Lipoproteínas

Las lipoproteínas de *Bordetella* incluyen precursor de proteína C de utilización de hemo/hemopexina (SEC ID 56), proteína pilN (SEC ID 58), proteína inmunogénica (SEC ID 60), precursor de lipoproteína de membrana externa (SEC ID 62), precursor de proteína de flujo de salida de membrana externa (SEC ID 64), Oprm (SEC ID 66), proteína señal de canal de membrana externa (SEC ID 68), MltA (SEC ID 70), MltB (SEC ID 72), precursor de yccz (SEC ID 74), proteína transmembrana de serina proteasa (SEC ID 76), pa4632 (SEC ID 78), precursor de coml (SEC ID 80), VacJ (SEC ID 82), lipoproteína de membrana externa (SEC ID 84), proteína de anillo I flagelar (SEC ID 86), YdcI (SEC ID 88), Pal (SEC ID 90), OmIA (SEC ID 92), Smc00354 (SEC ID 94), Pcp (SEC ID 96) y lipoproteína (SEC ID 98).

Las lipoproteínas que tienen la secuencia de SEC ID 56-96 contienen un motivo de lipidación que indica que se lipificarían e insertarían en la membrana. En su forma más simple, el motivo de lipidación contiene la secuencia de consenso LXXC. Sin embargo, la secuencia de consenso está preferentemente próxima al extremo amino-terminal de la secuencia, dentro de la secuencia de consenso de mayor tamaño:

<(M, V, L)~*{1, 40}~(D, E, R, K, *)6(L, I, V, M, F, W, S, T, A, G)2(L, I, V, M, F, Y, S, T, A, G, C, Q)
(A, G, S) C

< indica el extremo amino-terminal de la proteína, de modo que el primer aminoácido debería ser M, V o L. {1, 40} indica que entre 1 y 40 aminoácidos deberían estar presentes entre el primer aminoácido y el resto de la secuencia de consenso. (D, E, R, K, *)6 indica que los 6 aminoácidos siguientes no deberían ser D, E, R o K. Los 2 aminoácidos siguientes deberían ser uno de los aminoácidos alifáticos indicados y preferentemente es L. Para los 2 aminoácidos siguientes, los aminoácidos mostrados en los paréntesis deberían estar presentes y el aminoácido final de la secuencia debería ser C. Estos antígenos pueden proceder de *Bordetella pertussis* o *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchoseptica* u otras cepas de *Bordetella*, preferentemente la primera.

4. Adhesinas

Las adhesinas tienen un papel en la unión de *Bordetella* a una célula huésped y, por lo tanto, tienen papeles importantes en la virulencia. Incluyen hemaglutinina filamentosa (FHA) (Relman y col (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86; 2634-2641), fimbrias (Fim) (Mooi y col (1992) Microb Pathog 12; 127-135), pertactina (Roberts y col (1991) Mol Microbiol 5: 1393-1404) y BrkA (Fernandez y col (1994) Infection y Immunity 62: 4727-4738).

Estos antígenos pueden proceder de *Bordetella pertussis* o *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchoseptica* u otras cepas de *Bordetella*, preferentemente la primera.

Las fimbrias o proteínas Fim también se conocen como aglutininas o adhesinas fimbriales. El término Fim comprende fimbrias 2 y fimbrias 3.

5. Toxinas

Las toxinas incluyen adenilato ciclasa (CyaA) (Hewlett y col (1989) J. Biol. Chem. 264; 19379-19384), toxina pertúsica (Munoz y col (1981) Infect Immun 33; 820-826), toxina dermonecrótica (Dnt) (Livey (1984) J. Med. Microbiol. 17; 91 -103) y lipopolisacáridos. Las toxinas también incluyen proteínas que están implicadas en la secreción de toxinas, puesto que una respuesta inmune contra el mecanismo secretor impediría el funcionamiento eficaz del mecanismo secretor y conduciría a una secreción de toxina reducida. Un ejemplo de dicho antígeno es el sistema de secreción Tipo III (Yuk y col (2000) Mol. Microbiol. 35; 991 -1004). Estos antígenos pueden proceder de *Bordetella pertussis* o *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchoseptica* u otras cepas de *Bordetella*, preferentemente la primera.

Los fragmentos preferidos de la adenilato ciclasa comprenden los aminoácidos 385-399 o secuencias relacionadas con éstos que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 ó 50 aminoácidos añadidos en cualquiera o ambos extremos N y C terminales. Los fragmentos preferidos desvelan en los documentos EP424518, EP787796 o WO 90/13312.

Cuando se describe una toxina en el presente documento, también se prevé que el término abarque derivados no tóxicos tales como toxoides o toxinas mutantes.

Combinaciones preferidas

5

En cualquiera de las combinaciones preferidas enumeradas a continuación, el término antígeno comprende fragmentos inmunogénicos de ese antígeno.

10

En una realización preferida de la combinación de antígenos de la invención, la composición inmunogénica comprende al menos una proteína de adquisición de hierro de *Bordetella* seleccionada del grupo constituido por el polipéptido que comparte una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% con la SEC ID 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 106 o un fragmento antigénico o inmunogénico del mismo.

15

En una realización particularmente preferida de la invención, la composición inmunogénica comprende FHA y toxina pertúsica (preferentemente FHA, toxina pertúsica y pertactina) y comprende además al menos una proteína de adquisición de hierro de *Bordetella* seleccionada del grupo constituido por el polipéptido que comparte una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% con la SEC ID 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 106 o un fragmento antigénico o inmunogénico del mismo.

20

En una realización preferida adicional de la invención, la composición inmunogénica comprenderá al menos una lipoproteína de *Bordetella* seleccionada del grupo constituido por el polipéptido que comparte una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% con la SEC ID 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98 o un fragmento antigénico o inmunogénico del mismo.

25

En una realización particularmente preferida de la invención, la composición inmunogénica comprende FHA y toxina pertúsica (preferentemente FHA, toxina pertúsica y pertactina) y al menos una lipoproteína de *Bordetella* seleccionada del grupo constituido por el polipéptido que comparte una identidad de aminoácidos de al menos el 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% con la SEC ID 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 94, 96, 98 o un fragmento antigénico o inmunogénico del mismo.

30

La composición inmunogénica de la invención comprende BrkA o un fragmento antigénico o inmunogénico del mismo.

35

En una realización preferida adicional de la invención, la composición inmunogénica comprende al menos una toxina de *Bordetella* o antígenos implicados en la secreción de toxina seleccionados del grupo constituido por adenilato ciclasa, toxina dermonecrótica (Dnt), Tipo III ss o lipopolisacárido o un fragmento antigénico o inmunogénico del mismo.

40

Las combinaciones particularmente preferidas de la invención contendrán pertactina, comprendiendo opcionalmente además fim 2, fim 3 o fim 2 y fim 3.

45

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención contiene TcfA y al menos 1, 2, 3, 4 antígenos seleccionados de la lista constituida por toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, Tipo III ss, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp. Las combinaciones preferidas comprenden TcfA y toxina pertúsica, (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); TcfA y adenilato ciclasa (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); TcfA y LPS (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); TcfA y BipA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, Tipo IIIss, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); TcfA y Tipo Hiss (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); TcfA y BhuR (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA, PCP); TcfA y FHA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, pertactina, BhuR, Tipo Hiss, MltA, MltB, VacJ, OmlA, PCP); TcfA y una lipoproteína seleccionada de MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, BhuR, Tipo IIIss, Fim, pertactina, BrkA y FHA).

50

Una composición inmunogénica preferida adicional para su uso en la invención contiene BipA y al menos 1, 2, 3, 4 antígenos seleccionados de la lista constituida por toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, Tipo III ss, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp. Las combinaciones preferidas comprenden BipA y toxina pertúsica, (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BhuR, FHA, pertactina, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); BipA y adenilato ciclasa (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BhuR, FHA, pertactina, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); BipA y LPS (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); BipA y Tipo IIIss (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); BipA y BhuR (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y PCP); BipA y FHA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, pertactina, BhuR, Tipo IIIss, MltA, MltB, VacJ, OmlA y PCP); BipA y una lipoproteína seleccionada de MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BhuR, Tipo IIIss, Fim, pertactina, BrkA y FHA).

65

con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, pertactina, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); proteína tipo pertactina y LPS (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, pertactina, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); proteína tipo pertactina y BipA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, Tipo IIIss, BhuR, FHA, pertactina, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); proteína tipo pertactina y Tipo IIIss (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, BipA, BhuR, FHA, pertactina, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); proteína tipo pertactina y BhuR (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, pertactina, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp); proteína tipo pertactina y FHA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, BhuR, pertactina, Fim, BrkA, Tipo IIIss, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp); proteína tipo pertactina y una lipoproteína seleccionada de MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, BhuR, Tipo IIIss, pertactina, Fim, BrkA y FHA).

Una composición inmunogénica preferida adicional para su uso en la invención contiene YapE y al menos 1, 2, 3, 4 antígenos seleccionados de la lista constituida por toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, Tipo III ss, BhuR, FHA, pertactina, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp. Las combinaciones preferidas comprenden YapE y toxina pertúsica, (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, pertactina, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp); YapE y adenilato ciclase (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, pertactina, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp); YapE y LPS (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, pertactina, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp); YapE y BipA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, Tipo IIIss, BhuR, FHA, pertactina, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp); YapE y Tipo IIIss (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, BipA, BhuR, FHA, pertactina, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp); YapE y BhuR (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, pertactina, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp); YapE y FHA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, BhuR, Tipo IIIss, pertactina, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp); YapE y una lipoproteína seleccionada de MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, BhuR, Tipo IIIss, pertactina, Fim, BrkA y FHA).

Una composición inmunogénica preferida adicional para su uso en la invención contiene BrkA y al menos 1, 2, 3, 4 antígenos seleccionados de la lista constituida por toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, Tipo III ss, BhuR, FHA, pertactina, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp. Las combinaciones preferidas comprenden BrkA y toxina pertúsica, (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, pertactina, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp); BrkA y adenilato ciclase (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, pertactina, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp); BrkA y LPS (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, pertactina, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); BrkA y BipA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, Tipo IIIss, BhuR, FHA, pertactina, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp); BrkA y Tipo IIIss (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, BipA, BhuR, FHA, pertactina, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp); BrkA y BhuR (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, pertactina, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp); BrkA y FHA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, BhuR, Tipo IIIss, pertactina, MltA, MltB, VacJ, OmlA, Pcp); BrkA y una lipoproteína seleccionada de MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, BhuR, Tipo IIIss, pertactina, Fim y FHA).

Una composición inmunogénica preferida adicional para su uso en la invención contiene FHA y al menos 1, 2, 3, 4 antígenos seleccionados de la lista constituida por toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, Tipo III ss, BhuR, BrkA, pertactina, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp. Las combinaciones preferidas comprenden FHA y toxina pertúsica, (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, BrkA, pertactina, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); FHA y adenilato ciclase (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, BrkA, pertactina, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); FHA y LPS (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, BrkA, pertactina, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); FHA y BipA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, Tipo IIIss, BhuR, BrkA, pertactina, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); FHA y Tipo IIIss (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, BipA, BhuR, BrkA, pertactina, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); FHA y BhuR (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, Tipo IIIss, BrkA, pertactina, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); FHA y una lipoproteína seleccionada de MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, BhuR, Tipo IIIss, pertactina, Fim y BrkA).

Una composición inmunogénica preferida adicional para su uso en la invención contiene BhuR y al menos 1, 2, 3, 4 antígenos seleccionados de la lista constituida por toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, Tipo III ss, FHA, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp. Las combinaciones preferidas comprenden BhuR y toxina pertúsica (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, FHA, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); BhuR y adenilato ciclase (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, toxina pertúsica, FHA, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); BhuR y LPS (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, toxina pertúsica, FHA, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); BhuR y TcfA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); BhuR y BapA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); BhuR y BapB (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclase, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp).

Pcp); BhuR y BapC (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); BhuR y pertactina (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); BhuR y proteína tipo pertactina (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); BhuR y YapE (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); BhuR y BrkA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); BhuR y una lipoproteína seleccionada de MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, Tipo IIIss, Fim y FHA).

Una composición inmunogénica preferida adicional para su uso en la invención contiene MltA y al menos 1, 2, 3, 4 antígenos seleccionados de la lista constituida por toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, Tipo III ss, BhuR, Fim y FHA. Las combinaciones preferidas comprenden MltA y toxina pertúsica (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, FHA, Fim y BhuR); MltA y adenilato ciclasa (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, toxina pertúsica, FHA, Fim y BhuR); MltA y LPS (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, toxina pertúsica, FHA, Fim y BhuR); MltA y TcfA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA y BhuR); MltA y BapA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA y BhuR); MltA y BapB (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA y BhuR); MltA y BapC (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 of toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA y BhuR); MltA y pertactina (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, BrkA y BhuR); MltA y proteína tipo pertactina (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA y BhuR); MltA y YapE (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina, BrkA y BhuR); MltA y BrkA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, BipA, Tipo IIIss, FHA, Fim, pertactina y BhuR); MltA y BhuR (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de toxina pertúsica, adenilato ciclasa, LPS, TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, Tipo IIIss, Fim y FHA), a condición de que la combinación no sea de MltA y PT y FHA.

Una composición inmunogénica preferida adicional para su uso en la invención contiene toxina pertúsica y al menos 1, 2, 3, 4 antígenos seleccionados de la lista constituida por TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, BhuR, FHA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp. Las combinaciones preferidas comprenden toxina pertúsica y TcfA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); toxina pertúsica y BapA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); toxina pertúsica y BapB (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); toxina pertúsica y BapC (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); toxina pertúsica y pertactina (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); toxina pertúsica y proteína tipo pertactina (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); toxina pertúsica y YapE (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); toxina pertúsica y BrkA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); toxina pertúsica y BhuR (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, FHA, Fim, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); toxina pertúsica y MltA, MltB (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, FHA, Fim y BhuR).

Una composición inmunogénica preferida adicional para su uso en la invención contiene adenilato ciclasa y al menos 1, 2, 3, 4 antígenos seleccionados de la lista constituida por TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, BhuR, FHA, Fim, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp. Las combinaciones preferidas comprenden adenilato ciclasa y TcfA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); adenilato ciclasa y BapA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); adenilato ciclasa y BapB (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); adenilato ciclasa y BapC (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); adenilato ciclasa y pertactina (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); adenilato ciclasa y proteína tipo pertactina (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); adenilato ciclasa y BrkA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); adenilato ciclasa y BhuR (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, FHA, Fim, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); adenilato ciclasa y MltA, MltB (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, FHA, Fim, toxina pertúsica y BhuR).

ES 2 346 314 T3

Una composición inmunogénica preferida adicional para su uso en la invención contiene LPS y al menos 1, 2, 3, 4 antígenos seleccionados de la lista constituida por TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, BhuR, FHA, Fim, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp. Las combinaciones preferidas comprenden LPS y TcfA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); LPS y BapA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); LPS y BapB (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); LPS y BapC (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); LPS y pertactina (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, BrkA, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); LPS y proteína tipo pertactina (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); LPS y YapE (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, BrkA, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); LPS y BrkA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de BipA, BhuR, FHA, Fim, pertactina, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); LPS y BhuR (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, FHA, Fim, toxina pertúsica, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp); LPS y MltA (opcionalmente con 1, 2, 3, 4 ó 5 de TcfA, BapA, BapB, BapC, pertactina, proteína tipo pertactina, YapE, BrkA, BipA, FHA, Fim y toxina pertúsica y BhuR).

Una combinación preferida adicional para su uso en la invención contiene FHA y toxina pertúsica (preferentemente FHA, pertactina y toxina pertúsica) y 1, 2, 3 ó 4 antígenos adicionales seleccionados del grupo constituido por TcfA, BipA, BapA, BapB, BapC, proteína tipo pertactina, YapE, BhuR, Fim, BrkA, adenilato ciclasa, Tipo III ss, MltA, MltB, VacJ, OmlA y Pcp. Una combinación preferida contiene FHA, pertactina, toxina pertúsica y BhuR. Una combinación preferida adicional contiene FHA, pertactina, toxina pertúsica y MltA. Una combinación preferida adicional contiene FHA, pertactina, toxina pertúsica y MltB. Una combinación preferida adicional contiene FHA, pertactina, toxina pertúsica y VacJ. Una combinación preferida adicional contiene FHA, pertactina, toxina pertúsica y OmlA. Una combinación preferida adicional contiene FHA, pertactina, toxina pertúsica y Pcp. Una combinación preferida adicional contiene FI-IA, pertactina, toxina pertúsica, una lipoproteína (preferentemente MltA, MltB, VacJ, OmlA o Pcp) y BhuR.

Una composición inmunogénica preferida de la invención comprende FHA, toxina pertúsica y BrkA o una proteína que comparte una identidad de al menos el 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 ó 100% con la SEC ID 34, comprendiendo preferentemente además pertactina.

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, toxina pertúsica y BhuR o una proteína que comparte una identidad de al menos el 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 ó 100% con la SEC ID 20, comprendiendo preferentemente además pertactina.

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, toxina pertúsica y BapB o una proteína que comparte una identidad de al menos el 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 ó 100% con la SEC ID 42, comprendiendo preferentemente además pertactina.

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, toxina pertúsica y YapE, comprendiendo preferentemente además pertactina.

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, toxina pertúsica y VacJ o una proteína que comparte una identidad de al menos el 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 ó 100% con la SEC ID 82, comprendiendo preferentemente además pertactina.

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, toxina pertúsica y Pcp o una proteína que comparte una identidad de al menos el 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 ó 100% con la SEC ID 96, comprendiendo preferentemente además pertactina.

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, toxina pertúsica y MltB o una proteína que comparte una identidad de al menos el 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 ó 100% con la SEC ID 72, comprendiendo preferentemente además pertactina.

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, toxina pertúsica y TcfA o una proteína que comparte una identidad de al menos el 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99 ó 100% con la SEC ID 36, comprendiendo preferentemente además pertactina.

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, toxina pertúsica y adenilato ciclasa, comprendiendo preferentemente además pertactina.

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, toxina pertúsica y Tipo III ss, comprendiendo preferentemente además pertactina.

Es adicionalmente ventajoso combinar antígenos que estén presentes en diferentes fases del ciclo vital de Bordetella en las composiciones inmunogénicas de la invención. Bordetella tiene tres fases identificables, durante las que la

ES 2 346 314 T3

expresión de proteína está controlada por el locus *bvgAS*. La fase virulenta *Bvg+* se caracteriza por la expresión de varios factores de virulencia incluyendo FHA, fimbrias y pertactina, una diversidad de toxinas incluyendo adenilato ciclasa, toxina dermonecrótica y toxina pertúsica. Durante la fase *Bvgi*, se expresan algunos de los factores de virulencia y se expresan un nuevo conjunto de proteínas incluyendo BipA (Deora y col Molecular Microbiology (2001) 40; 669-683).

Las composiciones inmunogénicas que comprenden antígenos expresados en digerentes fases del ciclo vital de *Bordetella* definen además realizaciones previas de la invención y también constituyen una realización independiente de la invención.

Los antígenos expresados en las fases *Bvg* pueden determinarse como se expone en Deora y col Molecular Microbiology (2001) 40; 669-683; Stockbauer y col Molecular Microbiology (2001) 39; 65-78; Cotter y Miller (1994) Infect. Immun. 62; 3381-3390 y Scarlato y Rappuoli (1991) J. Bacteriol. 173; 7401-7404 y US6387377.

Las vacunas antitosferónicas acelulares disponibles en la actualidad incluyen proteínas de FHA, adenilato ciclasa, pertactina y fimbrias que son todos genes *Bvg+* tempranos. Por consiguiente, un aspecto adicional para su uso en la invención es una composición inmunogénica que contiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o más antígenos que se expresan en dos, tres o cuatro fases seleccionadas de *Bvg+* temprana, *Bvg+* tardía, *Bvg-* y *Bvgi*, por ejemplo, *Bvg+* temprana y *Bvg+* tardía; *Bvg+* temprana y *Bvg-*; *Bvg+* temprana y *Bvgi*; *Bvg+* tardía y *Bvg-*; *Bvg+* tardía y *Bvgi*; *Bvg-* y *Bvgi*; *Bvg+* temprana y *Bvg+* tardía y *Bvg-*; *Bvg+* temprana y *Bvg+* tardía y *Bvg-* y *Bvgi*; *Bvg+* temprana y *Bvg-* y *Bvgi*; *Bvg+* temprana y *Bvg+* tardía y *Bvg-* y *Bvgi*. FHA, toxina pertúsica, adenilato ciclasa, Fim y pertactina se expresan en la fase *Bvg+* temprana. Vag8, SphB1, Tcf y Tipo III SS se expresan en la fase *Bvg+* tardía. BipA se expresa durante la fase *Bvgi*. LPS está presente en todas las fases incluyendo la fase *Bvg-*.

Por consiguiente, las composiciones inmunogénicas preferidas para su uso en la invención comprenden antígenos de FHA y toxina pertúsica expresados en la fase *Bvg+* temprana (preferentemente Fim o pertactina y comprenden además 1, 2 ó 3 antígenos que se expresan durante la fase *Bvg+* tardía y/o la fase *Bvgi* y/o la fase *Bvg-* (preferentemente *Bvgi*).

Las composiciones inmunogénicas preferidas para su uso en la invención comprenden BipA y un antígeno expresado durante la fase *Bvg+* temprana y/o la fase *Bvg+* tardía y/o la fase *Bvg-*.

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, PT y Tcf (comprendiendo opcionalmente además 1, 2 ó 3 de Fim, pertactina, Vag8, SphB 1, Tipo III SS, BipA y LPS).

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, PT y Vag8 (comprendiendo opcionalmente además 1, 2 ó 3 de Fim, pertactina, Tcf, SphB1, Tipo III SS, BipA y LPS).

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, PT y Vag8 (comprendiendo opcionalmente además 1, 2 ó 3 de Fim, pertactina, Tcf, SphB1, Tipo III SS, BipA y LPS).

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, PT y SphB1 (comprendiendo opcionalmente además 1, 2 ó 3 de Fim, pertactina, Tcf, Vag8, Tipo III SS, BipA y LPS).

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, PT y Tipo III SS (comprendiendo opcionalmente además 1, 2 ó 3 de Fim, pertactina, Tcf, Vag8, SphB1, BipA y LPS).

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, PT y BipA (comprendiendo opcionalmente además 1, 2 ó 3 de Fim, pertactina, Tcf, Vag8, SphB1, Tipo III SS, BipA y LPS).

Una composición inmunogénica preferida para su uso en la invención comprende FHA, PT y LPS (comprendiendo opcionalmente además 1, 2 ó 3 de Fim, pertactina, Tcf, Vag8, SphB1, Tipo III SS y BipA).

Las combinaciones enumeradas anteriormente pueden estar en forma de una vacuna de subunidades que contiene antígenos aislados, preferentemente purificados. Cuando sea el caso, se prefiere que se usen fragmentos solubles de algunos de los antígenos. Por ejemplo, se prefiere el dominio pasajero soluble en agua de proteínas autotransportadoras como se ha definido anteriormente.

Una composición adicional para su uso en la invención es una combinación de una proteína implicada en la resistencia de *Bordetella* al complemento (por ejemplo, BrkA) y un antígeno implicado en la resistencia de *Bordetella* a la inmunidad celular (por ejemplo, toxina pertúsica). Dicha combinación genera preferentemente una respuesta inmune protectora frente a *Bordetella*. Este aspecto define además realizaciones previas de la invención.

Una proteína implicada en la resistencia de *Bordetella* al complemento se define como proteína de *Bordetella* que es capaz de alterar el funcionamiento eficaz del sistema de complemento del huésped, preferentemente inhibiendo la ruta de activación clásica del complemento. El grado de inhibición será de al menos el 10%, preferentemente el 20%, más preferentemente el 30%, más preferentemente el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, más preferentemente el 90% o el 95%.

Esto puede medirse por la capacidad de la proteína para inhibir un ensayo de destrucción en suero, como se describe en Infect. Immun. 69; 3067 (2001). Los ejemplos de esta clase de proteína incluyen BrkA y BrkB de Bordetella y fragmentos de las mismas que generan una respuesta inmunogénica frente a dichas proteínas, en particular un dominio pasajero (aproximadamente del aminoácido 41 al aminoácido 706).

Una proteína implicada en la resistencia de Bordetella a la inmunidad celular se define como una proteína de Bordetella que es capaz de inhibir (en al menos el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, preferentemente el 90% o 95%) el funcionamiento eficaz de al menos un tipo de célula que compone el sistema inmune celular del huésped. Puede actuar teniendo un efecto tóxico sobre una o más de las poblaciones celulares del huésped implicadas en la inmunidad celular, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas o monocitos. Los ejemplos de dichos antígenos incluyen toxina pertúsica, adenilato ciclasa y LPS. Como alternativa, puede inhibir la inmunidad celular alterando la función de las células implicadas en la inmunidad.

Bordetella pertussis es un patógeno humano obligado y ha desarrollado mecanismos para sobrevivir en el entorno hostil del huésped humano. Un mecanismo para hacer esto es por medio de la acción de la toxina pertúsica, que cataliza la ADP-ribosilación de proteínas de unión a GTP de células de mamífero. Puesto que las proteínas de unión a GTP son moléculas de señalización implicadas en la regulación de procesos celulares, dicha ADP-ribosilación puede conducir a la alteración de la función celular. Varias células importantes del sistema inmune incluyendo neutrófilos, macrófagos, monocitos y linfocitos se inhiben por toxina pertúsica (Weiss (1997) ASM News 63; 22). Por lo tanto, la acción de la toxina pertúsica inutiliza la respuesta inmune celular contra *B. pertussis*.

El sistema del complemento es otro mecanismo de defensa importante en el cuerpo humano. El nivel de complemento en el pulmón es generalmente del 10-20% del del suero, sin embargo, esto aumenta durante la inflamación (Persson (1991) Eur. Respir. 4; 1268). *B. pertussis* ha desarrollado mecanismos de evasión del sistema del complemento. En primer lugar, los lipopolisacáridos de *B. pertussis* no activan la ruta alternativa del complemento (Fernandez y Weiss (1994) Infection y Immunity 62; 4727). Sin embargo, la unión de anticuerpos a *B. pertussis* podría conducir a la activación de la ruta clásica del complemento. *B. pertussis* ha desarrollado un mecanismo para inhibir la ruta clásica del complemento usando la proteína BrkA.

Un aspecto de la invención se refiere a una composición inmunogénica, más preferentemente una vacuna, y más preferentemente una vacuna acelular contra la infección por Bordetella, que comprende un antígeno implicado en la resistencia de Bordetella al complemento y un antígeno implicado en la resistencia de Bordetella a la inmunidad celular. Dichos antígenos pueden ser proteínas, lipoproteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos o cualquier otro constituyente de Bordetella.

En una realización preferida para su uso en la invención, la composición inmunogénica comprende BrkA y, opcionalmente, BrkB como una proteína implicada en la resistencia de Bordetella al complemento, y PT y, opcionalmente, adenilato ciclasa como proteína implicada en la resistencia de Bordetella a la inmunidad celular. Los lipopolisacáridos (LPS) son antígenos que también son tóxicos para las células implicadas en la inmunidad y, en algunas realizaciones de la invención, podrían complementar o sustituir a la toxina pertúsica o a la adenilato ciclasa. En la composición inmunogénica de la invención, la composición farmacéutica comprende BrkA como proteína implicada en la resistencia de Bordetella al complemento, PT como proteína implicada en la resistencia de Bordetella a la inmunidad celular y FHA. En una realización adicional de la invención, la composición farmacéutica comprende BrkA como una proteína implicada en la resistencia de Bordetella al complemento, PT como proteína implicada en la resistencia de Bordetella a la inmunidad celular, FHA y pertactina de 69 kDa.

Las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden preferentemente uno o más antígenos de Bordetella de protección cruzada adicionales. Es ventajoso para una vacuna generar protección frente a *B. parapertussis*, así como *B. pertussis*, de modo que una sola vacuna pueda proteger frente a ambas formas de infección. BrkA está de por sí bien conservada entre *B. pertussis* y *B. parapertussis*, sin embargo, se consigue un mejor nivel de protección mediante la inclusión de uno o más antígenos adicionales que estén conservados entre varias cepas de Bordetella.

Pueden usarse varios procedimientos para identificar antígenos con reactividad cruzada de Bordetella. Usando prospección genómica, una comparación de los genomas de *B. pertussis* y *B. parapertussis* mostraría qué antígenos están conservados entre las dos especies. Como alternativa, podrían usarse microplacas de ADN junto con la información de secuencia para evaluar la expresión de antígenos candidato en *B. pertussis* y *B. parapertussis*. Podrían usarse antisueros contra Pw para identificar antígenos con reactividad cruzada mediante el uso de electroforesis en gel y transferencia de Western. La microsecuenciación puntual podría identificar con exactitud antígenos con reactividad cruzada. Véase el Ejemplo 16 para un procedimiento adecuado de este tipo. La invención puede utilizar vacunas que contienen antígenos de *Bordetella* con reactividad cruzada identificados por los procedimientos anteriores o procedimientos similares (preferentemente proteínas del Grupo de SEC 2, más preferentemente proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o 100% con la SEC ID N°: 14, 50, 100, 102, 104, 106, 108 ó 110).

Son proporciones preferidas de antígenos para su inclusión en una composición farmacéutica de 1-10 PT a 1 BrkA o BrkB, son proporciones más preferidas de 1-5 PT a 1 BrkA o BrkB, son proporciones más preferidas de 2,5 PT a 1 BrkA o BrkB.

La incorporación de antígenos con protección cruzada de *B. pertussis*/*B. parapertussis* en las composiciones inmunogénicas de la invención define además realizaciones previamente descritas de la invención. Puede usarse una composición inmunogénica (o vacuna acelular) que comprende uno o más antígenos (preferentemente aislados de cualquiera o de tanto *B. pertussis* como *B. parapertussis*, particularmente los antígenos descritos en el Ejemplo 16) que son capaces de generar una respuesta inmune que presenta reactividad cruzada frente a *B. pertussis* y *B. parapertussis*, preferentemente una protección cruzada frente a una enfermedad por *Bordetella*, más preferentemente frente a *B. pertussis* y *B. parapertussis*, con la condición de que la composición inmunogénica no comprenda pertussis de célula completa (Pw).

10 Ensayos de diagnóstico, pronóstico, serotipado y mutación

Esta divulgación también se refiere al uso de polinucleótidos y polipéptidos de BASB232 de la invención para su uso como reactivos de diagnóstico. La detección de polinucleótidos y/o polipéptidos de BASB232 en un eucariota, particularmente un mamífero, y especialmente un ser humano, proporcionará un procedimiento de diagnóstico para el diagnóstico de una enfermedad, la clasificación de la fase de enfermedad o la respuesta de un organismo infeccioso a fármacos. Eucariotas, particularmente mamíferos, y especialmente seres humanos, particularmente los infectados o sospechosos de estar infectados con un organismo que comprende genes o proteínas BASB232, pueden detectarse a nivel de ácido nucleico o de aminoácido mediante una diversidad de técnicas bien conocidas, así como por procedimientos proporcionados en el presente documento.

Los polipéptidos y polinucleótidos para pronóstico, diagnóstico u otro análisis pueden obtenerse a partir de un material corporal del individuo supuestamente infectado y/o infectado. Pueden usarse polinucleótidos de cualquiera de estas fuentes, particularmente ADN o ARN, directamente para su detección, o pueden amplificarse enzimáticamente mediante el uso de PCR o cualquier otra técnica de amplificación antes del análisis. También puede usarse ARN, particularmente ARNm, ADNc y ADN genómico de la misma forma. Usando la amplificación, la caracterización de la especie y cepa del organismo infeccioso o huésped presente en un individuo puede realizarse mediante un análisis del genotipo de un polinucleótido seleccionado del organismo. Pueden detectarse delecciones e inserciones por un cambio en el tamaño del producto amplificado en comparación con un genotipo de una secuencia de referencia seleccionada de un organismo relacionado, preferentemente una especie diferente del mismo género o una cepa diferente de la misma especie. Pueden identificarse mutaciones puntuales por hibridación de ADN amplificado con secuencias polinucleotídicas de BASB232 marcadas. Las secuencias perfectamente o significativamente emparejadas pueden distinguirse de dúplex imperfectamente emparejados o más significativamente emparejados erróneamente por digestión con ADNasa o ARNasa, para ADN o ARN, respectivamente, o por detección de diferencias en las temperaturas de fusión o en la cinética de renaturalización. También pueden detectarse diferencias de secuencia polinucleotídica por alteraciones en la movilidad electroforética de fragmentos polinucleotídicos en geles en comparación con una secuencia de referencia. Esto puede realizarse con o sin agentes desnaturalizantes. También pueden detectarse diferencias de polinucleótidos por secuenciación directa de ADN o ARN. Véase, por ejemplo, Myers y col., Science, 230: 1242 (1985). También pueden ponerse de manifiesto cambios de secuencia en localizaciones específicas por ensayos de protección de nucleasa, tales como ensayo de protección de ARNasa, V 1 y S 1, o un procedimiento de escisión química. Véase, por ejemplo, Cotton y col., Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 85: 4397-4401 (1985).

También se desvela una matriz de sondas oligonucleotídicas que comprende secuencias de nucleótidos de BASB232 o fragmentos de las mismas, que pueden construirse para realizar una exploración eficaz de, por ejemplo, mutaciones genéticas, serotipo, clasificación taxonómica o identificación. Son bien conocidos procedimientos de tecnología de matrices y tienen aplicabilidad general y pueden usarse para abordar una diversidad de cuestiones en genética molecular incluyendo expresión génica, conexión genética y variabilidad genética (véase, por ejemplo, Chee y col., Science, 274: 610 (1996)).

La presente divulgación se refiere a un kit de diagnóstico que comprende:

- (a) un polinucleótido de la presente divulgación, preferentemente cualquiera de las secuencias de nucleótidos del Grupo de SEC 1, o un fragmento del mismo;
- (b) una secuencia de nucleótidos complementaria a la de (a);
- (c) un polipéptido de la presente divulgación, preferentemente cualquiera de los polipéptidos del Grupo de SEC 2 o un fragmento del mismo; o
- (d) un anticuerpo contra un polipéptido de la presente invención, preferentemente contra los polipéptidos del Grupo de SEC 2.

Se apreciará que en cualquier kit de este tipo, (a) (b), (c) o (d) pueden comprender un componente sustancial. Dicho kit será de utilidad en el diagnóstico de una enfermedad o de susceptibilidad a una enfermedad, entre otros.

La presente divulgación también se refiere al uso de polinucleótidos de la presente divulgación como reactivos de diagnóstico. La detección de una forma mutada de un polinucleótido de la divulgación, preferentemente cualquier secuencia del Grupo de SEC 1, que se asocie con una enfermedad o patogenicidad proporcionará una herramienta de diagnóstico que puede aumentar, o definir, un diagnóstico de enfermedad, un pronóstico de un curso de enfermedad,

una determinación de una fase de enfermedad o una susceptibilidad a una enfermedad, que sea el resultado de una subexpresión, sobreexpresión o expresión alterada del polinucleótido. Pueden detectarse organismos, particularmente organismos infecciosos, que lleven mutaciones en dicho polinucleótido a nivel de polinucleótido por una diversidad de técnicas, tales como las descritas en otra parte en el presente documento.

También pueden detectarse células de un organismo que lleve mutaciones o polimorfismos (variaciones alélicas) en un polinucleótido y/o polipéptido de la divulgación, a nivel de polinucleótido o polipéptido por una diversidad de técnicas, para permitir el serotipado, por ejemplo. Por ejemplo, puede usarse RT-PCR para detectar mutaciones en el ARN. Se prefiere particularmente el uso de RT-PCR junto con sistemas de detección automáticos, tales como, por ejemplo, GeneScan. También puede usarse ARN, ADNc o ADN genómico con el mismo fin, PCR. Como ejemplo, pueden usarse cebadores de PCR complementarios a un polinucleótido que codifica un polipéptido de BASB232 para identificar y analizar mutaciones.

La divulgación proporciona además cebadores con 1, 2, 3 ó 4 nucleótidos eliminados del extremo 5' y/o 3'. Estos cebadores pueden usarse, entre otras cosas, para amplificar ADN y/o ARN de BASB232 aislado de una muestra obtenida de un individuo, tal como un material corporal. Los cebadores pueden usarse para amplificar un polinucleótido aislado de un individuo infectado, de modo que el polinucleótido puede someterse después a diversas técnicas para elucidar su secuencia polinucleotídica. De este modo, pueden detectarse mutaciones en la secuencia polinucleotídica y usarse para diagnosticar y/o pronosticar la infección o su fase o curso, o para serotipar y/o clasificar el agente infeccioso.

La divulgación proporciona además un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad, preferentemente infecciones bacterianas, más preferentemente infecciones causadas por *Bordetella*, particularmente *B. pertussis*, que comprende determinar a partir de una muestra obtenida de un individuo, tal como un material corporal, un nivel aumentado de expresión de polinucleótido que tiene una secuencia de cualquiera de las secuencias del Grupo de SEC 1. Puede medirse la expresión aumentada o disminuida de polinucleótidos de BASB232 usando cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica para la cuantificación de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, amplificación, PCR, RT-PCR, protección frente a ARNasa, transferencia de Northern, espectrometría y otros procedimientos de hibridación.

Además, puede usarse un ensayo de diagnóstico de acuerdo con la divulgación para detectar la sobreexpresión de polipéptidos de BASB232 en comparación con muestras de tejido de control normal para detectar la presencia de una infección, por ejemplo. Son bien conocidas por los expertos en la materia técnicas de ensayo que pueden usarse para determinar los niveles de polipéptidos de BASB232 en una muestra obtenida de un huésped, tal como un material corporal. Dichos procedimientos de ensayo incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis de transferencia de Western, ensayos tipo sándwich de anticuerpos, detección de anticuerpos y ensayos ELISA.

Los polinucleótidos de la divulgación pueden usarse como componentes de matrices de polinucleótidos, preferentemente matrices o rejillas de alta densidad. Estas matrices de alta densidad son particularmente útiles con fines de diagnóstico o pronóstico. Por ejemplo, un conjunto de puntos, comprendiendo cada uno un gen diferente, y comprendiendo además un polinucleótido o polinucleótidos de la divulgación, puede usarse para sondear, tal como usando hibridación o amplificación de ácido nucleico, usando sondas obtenidas o procedentes de una muestra corporal, para determinar la presencia de una secuencia polinucleotídica particular o secuencia relacionada en un individuo. Dicha presencia puede indicar la presencia de un patógeno, particularmente *B. pertussis*, y puede ser útil en el diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad o de un curso de enfermedad. Se prefiere una rejilla que comprende un número de variantes de cualquier secuencia polinucleotídica del Grupo de SEC 1. También se prefiere una que comprenda un número de variantes de una secuencia polinucleotídica que codifique cualquier secuencia polipeptídica del Grupo de SEC 2.

Anticuerpos

Los polipéptidos y polinucleótidos de la divulgación, o variantes de los mismos, o células que expresen los mismos pueden usarse como inmunógenos para producir anticuerpos inmuno-específicos para dichos polipéptidos o polinucleótidos, respectivamente. Como alternativa, también pueden usarse mimótopos, particularmente mimótopos peptídicos, de epítopes dentro de la secuencia polipeptídica como inmunógenos para producir anticuerpos inmuno-específicos para el polipéptido de la invención. El término "inmuno-específico" significa que los anticuerpos tienen una afinidad sustancialmente mayor por los polipéptidos de la divulgación que su afinidad por otros polipéptidos relacionados en la técnica anterior.

Se desvelan anticuerpos contra polipéptidos o polinucleótidos de BASB232.

Pueden obtenerse anticuerpos generados contra los polipéptidos o polinucleótidos de la divulgación por administración de los polipéptidos y/o polinucleótidos de la divulgación, o fragmentos que lleven epítopes de cualquiera o ambos, análogos de cualquiera o ambos o células que expresen cualquiera o ambos a un animal, preferentemente uno no humano, usando protocolos de rutina. Para la preparación de anticuerpos monoclonales puede usarse cualquier procedimiento conocido en la técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas celulares. Los ejemplos incluyen diversas técnicas, tales como las de Kohler, G. y Milstein, C, *Nature* 256: 495-497 (1975); Kozbor y col., *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole y col., págs. 77-96 en *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc. (1985).

Pueden adaptarse técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de Estados Unidos N°: 4,946,778) para producir anticuerpos de cadena sencilla contra polipéptidos o polinucleótidos de la presente divulgación. Además, pueden usarse ratones transgénicos u otros organismos o animales, tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados inmunoespecíficos contra los polipéptidos o polinucleótidos de la invención.

Como alternativa, puede utilizarse tecnología de presentación en fago para seleccionar genes de anticuerpo con actividades de unión contra un polipéptido de la divulgación a partir de repertorios de genes v amplificados por PCR de linfocitos de seres humanos explorados para determinar su posesión de anti-BASB232, o a partir de bibliotecas sin tratamiento previo (McCafferty, y col., (1990), Nature 348, 552-554; Marks, y col., (1992) Biotechnology 10, 779-783). La afinidad de estos anticuerpos también puede mejorarse, por ejemplo, por reordenamiento de cadenas (Clackson y col., (1991) Nature 352: 628).

Los anticuerpos descritos anteriormente pueden emplearse para aislar o identificar clones que expresen los polipéptidos para su uso en la invención para purificar los polipéptidos o, por ejemplo, por cromatografía de afinidad.

Por lo tanto, entre otros, pueden emplearse anticuerpos contra polipéptidos de BASB232 o polinucleótidos de BASB232 para tratar infecciones, particularmente infecciones bacterianas.

Las variantes polipeptídicas incluyen variantes antigénicamente, epitópicamente o inmunológicamente equivalentes en la presente invención.

Preferentemente, el anticuerpo o variante del mismo se modifica para hacerlo menos inmunogénico en el individuo. Por ejemplo, si el individuo es un ser humano, el anticuerpo puede más preferentemente “humanizarse” cuando la región o regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo derivado de hibridoma se ha transplantado en un anticuerpo monoclonal humano, por ejemplo, como se describe en Jones y col. (1986), Nature 321, 522-525 o Tempest y col., (1991) Biotechnology 9, 266-273.

Antagonistas y agonistas - Ensayos y moléculas

También pueden usarse polipéptidos y polinucleótidos de la divulgación para evaluar la unión de sustratos de molécula pequeña y ligandos en, por ejemplo, células, preparaciones sin células, bibliotecas químicas y mezclas de productos naturales. Estos sustratos y ligandos pueden ser sustratos y ligandos naturales, o pueden ser miméticos estructurales o funcionales. Véase, por ejemplo, Coligan y col., Current Protocols in Immunology 1(2): Capítulo 5 (1991).

Los procedimientos de exploración pueden medir simplemente la unión de un compuesto candidato al polipéptido o polinucleótido, o a células o membranas que lleven el polipéptido o polinucleótido, o una proteína de fusión del polipéptido por medio de un marcador directamente o indirectamente asociado con el compuesto candidato. Como alternativa, el procedimiento de exploración puede implicar la competición con un competidor marcado. Además, estos procedimientos de exploración pueden ensayar si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por activación o inhibición del polipéptido o polinucleótido, usando sistemas de detección apropiados para las células que comprenden el polipéptido o polinucleótido. Generalmente se ensayan inhibidores de la activación en presencia de un agonista conocido y se observa el efecto sobre la activación por el agonista mediante la presencia del compuesto candidato. Pueden emplearse polipéptidos constitutivamente activos y/o polipéptidos y polinucleótidos constitutivamente expresados en procedimientos de exploración para agonistas inversos o inhibidores en ausencia de un agonista o inhibidor, por ensayo de si el compuesto candidato da como resultado la inhibición de la activación del polipéptido o polinucleótido, como puede ser el caso. Además, los procedimientos de exploración pueden comprender simplemente las etapas de mezclar un compuesto candidato con una solución que contiene un polipéptido o polinucleótido de la presente divulgación para formar una mezcla, medir la actividad de polipéptidos y/o polinucleótidos de BASB232 en la mezcla y comparar la actividad de los polipéptidos y/o polinucleótidos de BASB232 de la mezcla con un patrón. También pueden usarse proteínas de fusión, tales como las generadas a partir de la porción Fc y polipéptidos de BASB232, como se ha descrito en el presente documento anteriormente, para ensayos de exploración de alto rendimiento para identificar antagonistas del polipéptido de la presente divulgación, así como de polipéptidos relacionados filogenéticamente y/o funcionalmente (véase D. Bennett y col., J Mol Recognition, 8:52-58 (1995); y K. Johanson y col., J Biol Chem, 270(16):9459-9471 (1995)).

Los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos que se unen a y/o interaccionan con un polipéptido de la presente divulgación también pueden usarse para configurar procedimientos de exploración para detectar el efecto de compuestos añadidos sobre la producción de ARNm y/o polipéptido en células. Por ejemplo, puede construirse un ensayo ELISA para medir niveles de polipéptido secretado o asociado a células usando anticuerpos monoclonales y policlonales por procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Esto puede usarse para descubrir agentes que pueden inhibir o aumentar la producción del polipéptido (también denominado antagonista o agonista, respectivamente) a partir de células o tejidos convenientemente manipulados.

La divulgación también proporciona un procedimiento de exploración de compuestos para identificar los que aumentan (agonista) o bloquean (antagonista) la acción de un polipéptido o polinucleótido de BASB232, particularmente los compuestos que son bacteriostáticos y/o bactericidas. El procedimiento de exploración puede implicar técnicas de alto rendimiento. Por ejemplo, para explorar agonistas o antagonistas, una mezcla de reacción sintética,

una compartimento celular tal como una membrana, envuelta celular o pared celular, o una preparación de cualquiera de los mismos que comprende un polipéptido de BASB232 y un sustrato o ligando marcado de dichos polipéptidos, se incuban en ausencia o presencia de una molécula candidata que puede ser un agonista o antagonista de BASB232. La capacidad de la molécula candidata para agonizar o antagonizar el polipéptido de BASB232 se refleja en una unión disminuida del ligando marcado o una producción disminuida de producto a partir de dicho sustrato. Las moléculas que se unen gratuitamente, es decir, sin inducir los efectos de polipéptido de BASB232, es más probable que sean buenos antagonistas. Las moléculas que se unen bien y, según sea el caso, aumentan la velocidad de producción de producto a partir de sustrato, aumentan la transducción de señales o aumentan la actividad de canales químicos son agonistas. La detección de la velocidad o nivel de, según sea el caso, producción de producto a partir de sustrato, transducción de señal o actividad de canales químicos puede aumentarse usando un sistema indicador. Los sistemas indicadores que pueden ser útiles a este respecto incluyen, pero sin limitación, sustrato colorimétrico marcado convertido en producto, un gen indicador que es sensible a cambios en la actividad polipeptídica o polinucleotídica de BASB232 y ensayos de unión conocidos en la técnica.

Otro ejemplo de un ensayo para agonistas de BASB232 es un ensayo competitivo que combina BASB232 y un agonista potencial con moléculas de unión a BASB232, moléculas de unión a BASB232 recombinantes, sustratos naturales o ligandos, o miméticos de sustratos o ligandos, en condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitiva. El BASB232 puede marcarse, tal como por radioactividad o un compuesto colorimétrico, de modo que el número de moléculas de BASB232 unidas a una molécula de unión o convertidas en producto puede determinarse con exactitud para evaluar la eficacia del antagonista potencial.

Los antagonistas potenciales incluyen, entre otros, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, polipéptidos y anticuerpos que se unen a un polinucleótido y/o polipéptido de la divulgación y de ese modo inhiben o extinguen su actividad o expresión. Los antagonistas potenciales también pueden ser moléculas orgánicas pequeñas, un péptido, un polipéptido tal como un proteína o anticuerpo estrechamente relacionado que se une a los mismos sitios en una molécula de unión, tal como molécula de unión, sin inducir actividades inducidas por BASB232, evitando de este modo la acción o expresión de polipéptidos y/o polinucleótidos de BASB232 por exclusión de la unión de polipéptidos y/o polinucleótidos de BASB232.

Los antagonistas potenciales incluyen una molécula pequeña que se une a y ocupa el sitio de unión del polipéptido, evitando de este modo la unión a moléculas de unión celulares, de modo que se impide la actividad biológica normal. Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero sin limitación, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos o moléculas similares a péptidos. Otros antagonistas potenciales incluyen moléculas antisentido (véase Okano, J. *Neurochem.* 56: 560 (1991); OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION, CRC Press, Boca Raton, FL (1988), para una descripción de estas moléculas). Los antagonistas potenciales preferidos incluyen compuestos relacionados con y variantes de BASB232.

En la presente invención puede usarse una proteína de fusión soluble obtenida por ingeniería genética, que comprende un polipéptido para su uso en la presente invención, o un fragmento del mismo, y diversas porciones de las regiones constantes de cadenas pesada o ligera de inmunoglobulinas de diversas subclases (IgG, IgM, IgA, IgE). Se prefiere como inmunoglobulina la parte constante de la cadena pesada de IgG humana, particularmente IgG1, en la que la fusión tiene lugar en la región de bisagra. En una realización particular, la parte Fc puede eliminarse simplemente por incorporación de una secuencia de escisión que puede escindirse con el factor de coagulación sanguínea Xa. Además, la presente divulgación se refiere a procedimientos para la preparación de estas proteínas de fusión por ingeniería genética y al uso de las mismas para exploración de fármacos, diagnóstico y terapia. Un aspecto adicional de la divulgación también se refiere a polinucleótidos que codifican dichas proteínas de fusión. Pueden encontrarse ejemplos de la tecnología de proteínas de fusión en las Solicitudes de Patente Internacional N° WO94/29458 y WO94/22914.

Cada una de las secuencias polinucleotídicas desveladas en el presente documento puede usarse en el descubrimiento y desarrollo de compuestos antibacterianos. La proteína codificada, tras la expresión, puede usarse como diana para la exploración de fármacos antibacterianos. Además, las secuencias polinucleotídicas que codifican las regiones aminoterminales de la proteína codificada o de Shine-Delgarno, u otras secuencias que facilitan la traducción del ARNm respectivo pueden usarse para construir secuencias antisentido para controlar la expresión de la secuencia codificante de interés. La divulgación también proporciona el uso del polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista de la invención para interferir con la interacción física inicial entre un patógeno o patógenos y un huésped eucariota, preferentemente un mamífero, responsable de las secuelas de infección. En particular, las moléculas de la divulgación pueden usarse: en la prevención de la adhesión de bacterias, en particular *Bordetella*, a proteínas de la matriz extracelular de eucariotas, preferentemente mamíferos, en dispositivos permanentes o a proteínas de la matriz extracelular en heridas; para bloquear la adhesión bacteriana entre proteínas de la matriz extracelular de eucariotas, preferentemente mamíferos, y proteínas BASB232 bacterianas que median la lesión tisular y/o; para bloquear la progresión normal de la patogénesis en infecciones iniciadas distintas por causas distintas a la implantación de dispositivos permanentes o por otras técnicas quirúrgicas.

De acuerdo con otro aspecto más de la divulgación, se proporcionan agonistas y antagonistas de BASB232, preferentemente agonistas y antagonistas bacteriostáticos o bactericidas.

Los antagonistas y agonistas de la divulgación pueden emplearse, por ejemplo, para prevenir, inhibir y/o tratar enfermedades.

En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a mimótopos del polipéptido para su uso en la invención. Un mimótopo es una secuencia peptídica lo bastante similar al antígeno nativo, preferentemente un péptido o LPS (secuencialmente o estructuralmente), que es capaz de ser reconocido por anticuerpos que reconocen al péptido nativo; o que es capaz de generar anticuerpos que reconocen al péptido nativo cuando se acopla a un vehículo adecuado.

Pueden diseñarse mimótopos de péptidos para un fin particular por adición, delección o sustitución de los aminoácidos elegidos. Por lo tanto, los péptidos pueden modificarse con el fin de facilitar la conjugación con un transportador proteico. Por ejemplo, puede ser deseable para algunos procedimientos de conjugación química incluir una cisteína terminal. Además, puede ser deseable para péptidos conjugados con un transportador proteico incluir un extremo terminal hidrófobo distal del extremo terminal conjugado del péptido, de modo que el extremo libre no conjugado del péptido permanezca asociado con la superficie de la proteína transportadora. Presentando de este modo el péptido en una conformación que se parece más estrechamente a la del péptido como se encuentra en el contexto de la molécula nativa completa. Por ejemplo, los péptidos pueden alterarse para que tengan una cisteína N-terminal y una cola amida hidrófoba C-terminal. Como alternativa, la adición o sustitución de una forma D-estereoisomérica de uno o más de los aminoácidos puede realizarse para generar un derivado beneficioso, por ejemplo, para aumentar la estabilidad del péptido.

Como alternativa, pueden identificarse mimótopos peptídicos usando anticuerpos que sean capaces por sí mismos de unirse a los polipéptidos para su uso en la presente invención usando técnicas tales como tecnología de presentación en fago (documento EP 0 552 267 B1). Esta técnica genera un gran número de secuencias peptídicas que mimetizan la estructura de los péptidos nativos y, por lo tanto, son capaces de unirse a anticuerpos anti-péptido nativo, pero pueden no necesariamente compartir de por sí una homología de secuencia significativa con el polipéptido nativo.

Vacunas

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica en un individuo, particularmente un mamífero, preferentemente seres humanos, que comprende inocular al individuo polipéptido de BASB232, o un fragmento o variante del mismo, o una combinación del mismo como se ha descrito anteriormente, adecuado para producir una respuesta inmune de anticuerpos y/o células T para proteger a dicho individuo de una infección, particularmente una infección bacteriana y, más particularmente, una infección por *Bordetella* incluyendo infección por *B. pertussis* y/o *B. parapertussis*. También se proporcionan procedimientos por los que dicha respuesta inmunológica ralentiza la replicación bacteriana.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición inmunológica que, cuando se introduce en un individuo, preferentemente un ser humano, capaz de haber inducido en el mismo una respuesta inmunológica, induce una respuesta inmunológica en dicho individuo contra un polipéptido de BASB232, o una combinación de los mismos como se ha descrito anteriormente, en el que la composición comprende un polipéptido para su uso en la invención. La respuesta inmunológica puede usarse terapéuticamente o profilácticamente y puede adoptar la forma de inmunidad de anticuerpos y/o inmunidad celular, tal como la inmunidad celular que surge de CTL o células T CD4+.

Un polipéptido de BASB232 o fragmento del mismo puede fusionarse con una coproteína o resto químico que puede o no producir por sí misma anticuerpos, pero que es capaz de estabilizar la primera proteína y producir una proteína fusionada o modificada que tendrá propiedades antigénicas y/o inmunogénicas y, preferentemente, propiedades protectoras. Por lo tanto, la proteína recombinante fusionada, preferentemente comprende además una coproteína antigénica, tal como lipoproteína D de *Haemophilus influenzae*, Glutación-S-transferasa (GST) o beta-galactosidasa o cualquier otra coproteína relativamente grande que solubiliza la proteína y facilita la producción y purificación de la misma. Además, la coproteína puede actuar como adyuvante en el sentido de proporcionar una estimulación generalizada del sistema inmune del organismo que recibe la proteína. La coproteína puede unirse al extremo amino o carboxi terminal de la primera proteína.

En una composición de vacuna de acuerdo con la invención, un polipéptido de BASB232 para su uso en la invención, o un fragmento, o un mimótopo o una variante del mismo, o una combinación de los mismos como se ha descrito anteriormente, puede estar presente en un vector, tal como los vectores vivos recombinantes descritos anteriormente, por ejemplo, vectores vivos bacterianos.

También son adecuados vectores no vivos para el polipéptido de BASB232, o una combinación de los mismos como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, vesículas o "ampollas" de membrana externa bacteriana. Las ampollas de OM proceden de la membrana externa de la membrana bicapa de bacterias Gram negativas y se han documentado en muchas bacterias Gram negativas (Zhou, L y col. 1998. FEMS Microbiol. Lett. 163: 223-228), incluyendo *C. trachomatis* y *C. psittaci*. Una lista no exhaustiva de patógenos bacterianos que se ha descrito que producen ampollas también incluye: *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Yersinia enterocolitica*.

Las ampollas tienen la ventaja de proporcionar proteínas de la membrana externa en su conformación nativa y por lo tanto son particularmente útiles para vacunas. Las ampollas también pueden mejorarse para uso vacunal por ingeniería genética de la bacteria, para modificar la expresión de una o más moléculas en la membrana externa. Por lo tanto, por ejemplo, la expresión de una proteína inmunogénica deseada en la membrana externa, tal como el polipéptido de

BASB232, puede introducirse o regularse positivamente (por ejemplo, por alteración del promotor). En su lugar, o además, la expresión de moléculas de membrana externa que no son relevantes (por ejemplo, antígenos no protectores o proteínas inmunodominantes pero variables) o que son perjudiciales (por ejemplo, moléculas tóxicas tales como LPS o inductores potenciales de una respuesta inmune) puede regularse negativamente. Estas estrategias se analizan en más detalle a continuación.

Las regiones flanqueantes no codificantes de los genes de BASB232 contienen elementos reguladores importantes en la expresión del gen. Esta regulación tiene lugar tanto a nivel transcripcional como traduccional. La secuencia de estas regiones, cadena arriba o cadena abajo de la fase de lectura abierta del gen, puede obtenerse por secuenciación de ADN. Esta información de secuencia permite la determinación de motivos reguladores potenciales tales como los diferentes elementos promotores, secuencias de terminación, elementos de secuencia inducibles, represores, elementos responsables de variación de fase, la secuencia de Shine-Dalgarno, regiones con estructura secundaria potencial implicada en la regulación, así como otros tipos de motivos o secuencias reguladoras.

Esta información de secuencia permite la modulación de la expresión natural de los genes de BASB232. La regulación positiva de la expresión génica puede lograrse alterando el promotor, la secuencia de Shine-Dalgarno, elementos represores u operadores potenciales o cualquier otro elemento implicado. Asimismo, la regulación negativa de la expresión puede conseguirse por tipos de modificación similares. Como alternativa, cambiando las secuencias de variación de fase, la expresión del gen puede ponerse bajo el control de variación de fase o puede desacoplarse de esta regulación. En otra estrategia, la expresión del gen puede ponerse bajo el control de uno o más elementos inducibles que permiten una expresión regulada. Los ejemplos de dicha regulación incluyen, pero sin limitación, inducción por cambio de temperatura, adición de sustratos inductores como carbohidratos seleccionados o sus derivados, oligoelementos, vitaminas, cofactores, iones metálicos, etc.

Dichas modificaciones, como se han descrito anteriormente, pueden introducirse por varios medios diferentes. La modificación de secuencias implicadas en la expresión génica puede realizarse *in vivo* por mutagénesis aleatoria seguida de selección del fenotipo deseado. Otra estrategia está constituida por el aislamiento de la región de interés y modificación de la misma por mutagénesis aleatoria o sustitución dirigida, mutagénesis de inserción o delección. La región modificada puede reintroducirse después en el genoma bacteriano por recombinación homóloga, y puede evaluarse el efecto sobre la expresión génica. En otra estrategia, el conocimiento de la secuencia de la región de interés puede usarse para sustituir o deleccionar todas o parte de las secuencias reguladoras naturales. En este caso, la región reguladora diana se aísla y modifica para que contenga los elementos reguladores de otro gen, una combinación de elementos reguladores de genes diferentes, una región reguladora sintética o cualquier otra región reguladora, o para deleccionar partes seleccionadas de las secuencias reguladoras de tipo silvestre. Estas secuencias modificadas pueden reintroducirse después en la bacteria por recombinación homóloga en el genoma. Una lista no exhaustiva de promotores preferidos que podrían usarse para la regulación positiva de la expresión génica incluye los promotores porA, porB, IbpB, tpbB, p110, Ist, hpuAB de *N. meningitidis* o *N. gonorrhoeae*; ompCD, copB, IbpB, ompE, UspA 1; UspA2; TbpB de *M. Catarrhalis*; p1, p2, p4, p5, p6, IpD, tpbB, D15, Hia, Hmw1, Hmw2 de *H. influenzae* y cualquier promotor fuerte conocido de *B. pertussis* o *B. paraptussis*. En un ejemplo, la expresión del gen puede modularse por intercambio de su promotor con un promotor más fuerte (por medio de aislamiento de la secuencia cadena arriba del gen, la modificación *in vitro* de esta secuencia y la reintroducción en el genoma por recombinación homóloga). La expresión regulada positivamente puede obtenerse tanto en la bacteria como en las vesículas de membrana externa desprendidas (o generadas) a partir de la bacteria.

En otros ejemplos, las estrategias descritas pueden usarse para generar cepas bacterianas recombinantes con características mejoradas para aplicaciones de vacunas. Éstas pueden ser, pero sin limitación, cepas atenuadas, cepas con una expresión aumentada de antígenos seleccionados, cepas *knock-out* (o con expresión disminuida) para genes que interfieren con la respuesta inmune, cepas con expresión modulada de proteínas inmunodominantes, cepas con desprendimiento modulado de vesículas de membrana externa.

Por lo tanto, también se proporciona por la divulgación una región cadena arriba modificada de los genes de BASB232, conteniendo dicha región cadena arriba modificada un elemento regulador heterólogo que altera el nivel de expresión de las proteínas de BASB232 localizadas en la membrana externa. La región cadena arriba de acuerdo con este aspecto de la invención incluye la secuencia cadena arriba de los genes de BASB232. La región cadena arriba comienza inmediatamente cadena arriba de los genes de BASB232 y continúa habitualmente hasta una posición no más de aproximadamente 1000 pb cadena arriba del gen desde el codón de inicio ATG. En el caso de un gen localizado en una secuencia policistónica (operón), la región cadena arriba puede comenzar inmediatamente antes del gen de interés o antes del primer gen del operón. Preferentemente, una región cadena arriba modificada de acuerdo con este aspecto de la invención contiene un promotor heterólogo en una posición de entre 500 y 700 pb cadena arriba del ATG.

Por lo tanto, la divulgación proporciona polipéptidos de BASB232, o una combinación de los mismos como se ha descrito anteriormente, en una ampolla bacteriana modificada. La divulgación proporciona además células huésped modificadas capaces de producir los vectores no vivos de ampollas a base de membrana. La divulgación proporciona además vectores de ácido nucleico que comprenden los genes de BASB232 que tienen un región cadena arriba modificada que contiene un elemento regulador heterólogo.

Se proporcionan además por la divulgación procedimientos para preparar las células huésped y ampollas bacterianas para su uso en la invención.

También se proporcionan por la presente invención composiciones, particularmente composiciones vacunales, que comprenden los polipéptidos para su uso en la invención y secuencias de ADN inmunoestimuladoras, tales como las descritas en Sato, Y. y col. Science 273: 352 (1996).

Además, se proporcionan por la presente divulgación procedimientos que usan el polinucleótido descrito, o fragmentos particulares del mismo, que se ha demostrado que codifica regiones no variables de proteínas de la superficie celular bacteriana, en construcciones polinucleotídicas usadas en dichos experimentos de inmunización genética en modelos animales de infección con *B. pertussis*. Dichos experimentos serán particularmente útiles para identificar epítopes proteicos capaces de provocar una respuesta inmune profiláctica o terapéutica. Se cree que esta estrategia permitirá la preparación posterior de anticuerpos monoclonales de un valor particular, obtenidos del órgano necesario del animal que resiste o elimina con éxito la infección, para el desarrollo de agentes profilácticos o tratamiento terapéuticos de infección bacteriana, particularmente infección por *B. pertussis*, en mamíferos, particularmente seres humanos.

Composiciones inmunogénicas

Es ventajoso para los antígenos y combinaciones de antígenos de la invención que se formulen en composiciones inmunogénicas que comprendan cantidades inmunogénicas, preferentemente inmunológicamente eficaces, de antígenos adicionales para generar inmunidad contra otros patógenos, preferentemente virus y/o bacterias. Dichos antígenos adicionales incluyen toxoide diftérico, toxoide tetánico, antígeno superficial de hepatitis B, vacuna de la polio inyectable, PRP de *Haemophilus influenzae* tipo b, polisacáridos capsulares o preparaciones de vesículas de membrana externa de *N. meningitidis* y polisacáridos capsulares de *S. pneumoniae*.

Las composiciones inmunogénicas preferidas de la invención se formulan con 1, 2, 3 o preferentemente los 4 polisacáridos u oligosacáridos capsulares meningocócicos siguientes: A, C, Y o W, que pueden ser sencillos o estar conjugados con un transportador proteico. Las combinaciones de polisacáridos u oligosacáridos meningocócicos incluyen A y C; A e Y; A y W; C e Y; C y W; Y y W; A, C e Y; A, C y W; A, Y y W; C, Y y W y A, C, Y y W. Dicha vacuna que contiene proteínas de *N. meningitidis* serogrupo B puede combinar ventajosamente una vacuna meningocócica global con una vacuna de Bordetella.

En una realización preferida adicional, las composiciones inmunogénicas de la invención se formulan con un polisacárido u oligosacárido capsular de *H. influenzae* b conjugado o no conjugado y uno o más polisacáridos u oligosacáridos neumocócicos sencillos o conjugados. Opcionalmente, la vacuna también puede comprender una o más antígenos proteicos que pueden proteger a un huésped frente a la infección por *Streptococcus pneumoniae*. Dicha vacuna puede usarse ventajosamente como vacuna de *Bordetella/H. influenzae/Streptococcus pneumoniae*.

En una realización preferida adicional, la composición inmunogénica de la invención se formula con polisacáridos u oligosacáridos capsulares derivados de uno o más de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, Estreptococos del Grupo A, Estreptococos del Grupo B, *Staphylococcus aureus* o *Staphylococcus epidermidis*. En una realización preferida, la composición inmunogénica comprende polisacáridos u oligosacáridos capsulares derivados de uno o más de los serogrupos A, C, W e Y de *Neisseria meningitidis*. Una realización preferida adicional comprende polisacáridos u oligosacáridos capsulares derivados de *Streptococcus pneumoniae*. Los antígenos polisacáridos u oligosacáridos capsulares neumocócicos se seleccionan preferentemente de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11 A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F (más preferentemente de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F). Una realización preferida adicional comprende los polisacáridos u oligosacáridos capsulares PRP de *Haemophilus influenzae*. Una realización preferida adicional comprende los polisacáridos u oligosacáridos capsulares Tipo 5, Tipo 8 o 336 de *Staphylococcus aureus*. Una realización preferida adicional comprende los polisacáridos capsulares Tipo I, Tipo II o Tipo III de *Staphylococcus epidermidis*. Una realización preferida adicional comprende los polisacáridos u oligosacáridos capsulares Tipo Ia, Tipo Ic, Tipo II o Tipo III de estreptococos del Grupo B. Una realización preferida adicional comprende los polisacáridos u oligosacáridos capsulares de estreptococos del Grupo A, comprendiendo preferentemente además al menos una proteína M y más preferentemente múltiples tipos de proteína M.

Los polisacáridos u oligosacáridos capsulares incluidos en composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar conjugados o no conjugados con una proteína transportadora tal como toxoide tetánico, fragmento C del toxoide tetánico, mutantes no tóxicos de toxina tetánica, toxoide diftérico, CRM 197, otros mutantes no tóxicos de toxina diftérica (tales como CRM 176, CRM 197, CRM 228, CRM 45 (Uchida y col J. Biol. Chem. 218: 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM 102, CRM 103 y CRM 107 y otras mutaciones descritas por Nicholls y Youle en Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; delección o mutación de Glu-148 a Asp, Gln o Ser y/o Ala 158 a Gly y otras mutaciones desveladas en el documento US 4709017 o US 4950740; la mutación de al menos uno o más restos Lys 516, Lys 526, Phe 530 y/o Lys 534 y otras mutaciones desveladas en el documento US 5917017 o US 6455673; o un fragmento desvelado en el documento US 5843711), pneumolisina o Proteína D (documento US6342224).

El conjugado de polisacárido puede prepararse por cualquier técnica de acoplamiento conocida. Por ejemplo, el polisacárido puede acoplarse por medio de un enlace tioéter. Este procedimiento de conjugación depende de la activación del polisacárido con tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino piridinio (CDAP) para formar un éster de cianato. El polisacárido activado puede acoplarse por lo tanto directamente o por medio de un grupo espaciador a un grupo amino en la proteína transportadora. Preferentemente, el éster de cianato se acopla con hexano diamina y el polisacárido derivatizado con amino se conjuga con la proteína transportadora usando química de heterologación que implica la formación del enlace tioéter. Dichos conjugados se describen en la solicitud PCT publicada WO93/15760, Uniformed Services University.

Los conjugados también se preparan por procedimientos de aminación reductora directos como se describe en los documentos US 4365170 (Jennings) y US 4673574 (Anderson). Otros procedimientos se describen en los documentos EP-0-161-188, EP-208375 y EP-0-477508.

Un procedimiento adicional implica el acoplamiento de un polisacárido activado con bromuro de cianógeno derivatizado con hidrazida del ácido adípico (ADH) con el transportador proteico por condensación de Carbodiimida (Chu C. y col Infect. Immunity, 1983 245 256).

Las composiciones inmunogénicas de la invención también pueden comprender proteínas de otros patógenos. Los antígenos proteicos neumocócicos preferidos son las proteínas neumocócicas que se exponen en la superficie externa del neumococo (capaces de ser reconocidas por el sistema inmune del huésped durante al menos parte del ciclo vital del neumococo) o son proteínas que se secretan o liberan por el neumococo. Más preferentemente, la proteína es una toxina, adhesina, transductor de señal de 2 componentes, o lipoproteína de *Streptococcus pneumoniae* o fragmentos de la misma. Las proteínas particularmente preferidas incluyen, pero sin limitación: pneumolisina (preferentemente detoxificada por tratamiento químico o mutación) [Mitchell y col. Nucleic Acids Res. 11 Jul 1990; 18 (13): 4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types I and 2.", Mitchell y col. Biochim Biophys Acta 23 Ene 1989; 1007 (1): 67-72 "Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*, rapid purification and biological properties.", documentos WO 96/05859 (A. Cyanamid), WO 90/06951 (Paton y col), WO 99/03884 (NAVA)]; PspA y variantes de delección transmembrana de la misma (documento US 5804193 - Briles y col.); PspC y variantes de delección transmembrana de la misma (documento WO 97/09994 - Briles y col); PsaA y variantes de delección transmembrana de la misma (Berry y Paton, Infect Immun Dic 1996; 64 (12): 5255-62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*"); proteínas de unión a colina neumocócicas y variantes de delección transmembrana de las mismas; CbpA y variantes de delección transmembrana de la misma (documentos WO 97/41151; WO 99/51266); Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (Infect. Immun. 1996 64: 3544); HSP70 (documento WO 96/40928); PcpA (Sanchez-Beato y col. FEMS Microbiol Lett 1998, 164: 207-14); proteína tipo M (documento EP 0837130) y adhesina 18627, (documento EP 0834568). Son antígenos proteicos neumocócicos preferidos adicionales los desvelados en el documento WO 98/18931, particularmente los seleccionados en los documentos WO 98/18930 y PCT/US99/30390.

Las proteínas preferidas para su inclusión en la composición inmunogénica de la invención incluyen adhesinas, proteínas autotransportadoras, proteínas de adquisición de hierro y toxinas de *N. meningitidis* serotipo B, opcionalmente como parte de una preparación de vesículas de membrana externa. Las adhesinas incluyen FhaB (documento WO98/02547), NadA (J. Exp. Med (2002) 195: 1445; NMB 1994), Hsf también conocida como NhhA (NMB 0992) (documento WO99/31132), Hap (NMB 1985) (documento WO99/55873), NspA (documento WO96/29412), MafA (NMB 0652) y MafB (NMB 0643) (Annu Rev Cell Dev Biol. 16; 423-457 (2000); Nature Biotech 20; 914-921 (2002)), Omp26 (NMB 0181), NMB 0315, NMB 0995, NMB 1119 y PilC (Mol. Microbiol. 1997,23; 879-892). Éstas son proteínas que están implicadas en la unión de Neisseria a la superficie de células huésped.

Las proteínas autotransportadoras típicamente están compuestas por una secuencia señal, un dominio pasajero y un dominio de anclaje para la unión a la membrana externa. Los ejemplos de proteínas autotransportadoras incluyen Hsf (documento WO99/31132) (NMB 0992), HMW, Hia (van Ulsen y col. Immunol. Med. Microbiol. 2001 32; 53-64), Hap (NMB 1985) (documento WO99/55873; van Ulsen y col Immunol. Med. Microbiol. 2001 32; 53-64), UspA, UspA2, NadA (NMB 1994) (Comanducci y col. J. Exp. Med. 2002 195; 1445-1454), AspA (Infection and Immunity 2002, 70(8); 4447-4461; NMB 1029), proteína tipo Aida-1, SSH-2 y Tsh. El dominio pasajero de una proteína autotransportadora es un fragmento preferido para su incorporación en la composición inmunogénica de la invención.

Las proteínas de adquisición de hierro incluyen TbpA (NMB 0461) (documentos WO92/03467, US5912336, WO93/06861 y EP586266), TbpB (NMB 0460) (documentos WO93/06861 y EP586266), LbpA (NMB 1540) (Med Microbiol (1999) 32: 1117), LbpB (NMB 1541) (documento WO/99/09176), HpuA (U73112.2) (Mol Microbiol. 1997, 23; 737-749), HpuB (NC_003116.1) (Mol Microbiol. 1997, 23; 737-749), P2086, también conocida como XthA (NMB 0399) (13th International Pathogenic Neisseria Conference 2002), FbpA (NMB 0634), FbpB, BfrA (NMB 1207), BfrB (NMB 1206), Lipo28, también conocida como GNA2132 (NMB 2132), Sibp (NMB 1882), HmbR, HemH, Bcp (NMB 0750), proteína permeasa-transportador ABC de hierro (III) (Tettelin y col Science 287; 1809-1815 2000), periplásmica-transportador ABC de hierro (III) (Tettelin y col Science 287; 1809-1815 2000), receptor dependiente de TonB (NMB 0964 y NMB 0293) (Tettelin y col Science 287; 1809-1815 2000) y proteína relacionada con la proteína de unión a transferrina (Tettelin y col Science 287; 1809-1815 2000).

Las toxinas incluyen FrpA (NMB 0585; NMB 1405), FrpA/C (véase a continuación para su definición), FrpC (NMB 1415; NMB 1405) (documento WO92/01460), NM-ADPRT (NMB 1343) (13th International Pathogenic Neis-

sería Conference 2002 Masignani y col p135), VapD (NMB 1753), lipopolisacárido (LPS; también denominado lipooligosacárido o LOS) inmunotipo L2 y LPS inmunotipo L3. FrpA y FrpC contienen una región que está conservada entre estas dos proteínas y un fragmento preferido de las proteínas sería un polipéptido que contiene este fragmento conservado, preferentemente que comprende los aminoácidos 227-1004 de la secuencia de FrpA/C.

Las proteínas meningocócicas incluidas en la composición inmunogénica de la invención pueden estar presentes como una composición de subunidades en la que la proteína purificada o un fragmento inmunogénico de la proteína se añade a la composición inmunogénica. Opcionalmente, la proteína se añade como parte de una preparación de vesícula de membrana externa.

La composición inmunogénica comprende opcionalmente antígenos que proporcionan protección frente a infecciones por difteria y/o tétanos. Típicamente, los antígenos que proporcionan protección frente a difteria y tétanos serían toxoide diftérico y toxoide tetánico. Los toxoides pueden ser toxinas inactivadas químicamente o toxinas inactivadas por introducción de mutaciones puntuales.

Es ventajoso combinar la composición inmunogénica de la invención con antígenos que confieren inmunidad frente a uno o más de *Haemophilus influenzae* b, hepatitis B y/o poliovirus. Las composiciones farmacéuticas preferidas de la invención comprenderán además uno o más, más preferentemente los tres polisacáridos u oligosacáridos PRP de *Haemophilus influenzae* b, antígeno superficial de hepatitis B y/o virus de la polio inyectable (IPV).

La composición inmunogénica comprende opcionalmente uno o más antígenos que pueden proteger a un huésped frente a RSV y/o uno o más antígenos que pueden proteger a un huésped frente a virus influenza. Los antígenos de virus influenza preferidos incluyen virus completo, vivo o inactivado, virus influenza dividido, cultivado en huevos o en células MDCK, o células Vero o virosomas de la gripe completos (como se describe por R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos, tales como proteínas HA, NP, NA, o M, o combinaciones de las mismas. Los antígenos de RSV preferidos (Virus Respiratorio Sincitial) incluyen la glicoproteína F, la glicoproteína G, la proteína HN o derivados de las mismas.

Los antígenos proteicos de *H. influenzae* no tipables preferidos incluyen proteína fimbrina (documento US 5766608) y fusiones que comprenden péptidos de la misma (por ejemplo, Fusión de LB1) (documento US 5843464 - Ohio State Research Foundation), OMP26, P6, proteína D, TbpA, TbpB, Hia, Hmw1, Hmw2, Hap, y D 15.

Debería apreciarse que las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender uno o más polisacáridos u oligosacáridos capsulares de una sola especie de bacteria. Las composiciones inmunogénicas también pueden comprender polisacáridos u oligosacáridos capsulares derivados de una o más especies de bacteria.

Vacunas

Una realización adicional de la invención proporciona una formulación de vacuna que comprende la composición inmunogénica de la invención junto con un vehículo/excipientes adecuado, tal como un vehículo/excipientes farmacéuticamente aceptable. Puesto que los polipéptidos para su uso en la invención pueden degradarse en el estómago, cada uno se administra preferentemente por vía parenteral, incluyendo, por ejemplo, la administración que es subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica. Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, compuestos bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con el fluido corporal, preferentemente la sangre del individuo; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes unidos dosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril inmediatamente antes del uso.

La formulación de vacuna de la invención también puede incluir sistemas adyuvantes para aumentar la inmunogenicidad de la formulación. El adyuvante puede ser hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Cuando está presente antígeno superficial de hepatitis B como parte de la vacuna, el adyuvante es preferentemente fosfato de aluminio. Preferentemente, el sistema adyuvante genera preferentemente un tipo de respuesta TH1.

Una respuesta inmune puede distinguirse en líneas generales en dos categorías extremas, siendo respuestas inmunes humorales o mediadas por células (caracterizadas tradicionalmente por mecanismos de protección de anticuerpos y efectores celulares, respectivamente). Estas categorías de respuesta se han denominado respuestas tipo TH1 (respuesta mediada por células) y respuestas inmunes tipo TH2 (respuesta humoral).

Las respuestas inmunes tipo TH1 extremas pueden caracterizarse por la generación de respuestas de linfocitos T citotóxicos restringidos por haplotipo específicos de antígeno y células asesinas naturales. En ratones, las respuestas tipo TH1 se caracterizan con frecuencia por la generación de anticuerpos del subtipo IgG2a, mientras que en el ser humano éstas corresponden a anticuerpos tipo IgG1. Las respuestas inmunes tipo TH2 se caracterizan por la generación de un amplio intervalo de isotipos de inmunoglobulina, incluyendo en ratones IgG1, IgA e IgM.

Puede considerarse que la fuerza impulsora que está detrás del desarrollo de estos dos tipos de respuestas inmunes son las citocinas. Altos niveles de citocinas tipo TH1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células contra el antígeno dado, mientras que altos niveles de citocinas tipo TH2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales contra el antígeno.

La distinción de respuestas inmunes tipo TH1 y TH2 no es absoluta. En realidad un individuo sostendrá una respuesta inmune que se describe que es predominantemente TH1 o predominantemente TH2. Sin embargo, con frecuencia es conveniente considerar las familias de citocinas en los términos de las descritas en clones de células T CD4 positivas murinas por Mosmann y Coffman (Mosmann, T. R. y Coffman, R. L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, págs. 145-173). Tradicionalmente, las respuestas tipo TH1 se asocian con la producción de las citocinas IFN- γ e IL-2 por linfocitos T. Otras citocinas asociadas directamente con frecuencia con la inducción de respuestas inmunes tipo TH1 no se producen por células T, tales como IL-12. Por el contrario, las respuestas tipo TH2 se asocian con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13.

Se sabe que determinados adyuvantes de vacunas están particularmente adaptados a la estimulación de respuestas de citocinas tipo TH1 o TH2. Tradicionalmente, los mejores indicadores del equilibrio TH1:TH2 de la respuesta inmune después de una vacunación o infección incluyen la medición directa de la producción de citocinas TH1 o TH2 por linfocitos T *in vitro* después de la reestipulación con antígeno y/o la medición de la proporción de IgG1:IgG2a de respuestas de anticuerpos específicos de antígeno.

Por lo tanto, un adyuvante tipo TH1 es uno que estimula preferentemente poblaciones de células T aisladas para producir altos niveles de citocinas tipo TH1 cuando se reestiman con antígeno *in vitro*, y promueve el desarrollo tanto de linfocitos T citotóxicos CD8+ como de respuestas de inmunoglobulinas específicas de antígeno asociadas con isotipo tipo TH1.

Se describen adyuvantes que son capaces de una estimulación preferente de la respuesta celular TH1 en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/00153 y WO 95/17209.

Un adyuvante de este tipo es monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL). Se conoce del documento GB 2220211 (Ribi). Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-des-O-acilado con cadenas 4, 5 ó 6-aciladas y se fabrica por Ribi Immunochem, Montana. Una forma preferida del monofosforil lípido A 3-des-O-acilado se desvela en la Patente Europea 0 689 454 B I (SmithKline Beecham Biologicals SA).

Preferentemente, las partículas de 3D-MPL son lo bastante pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros (Patente Europea número 0 689 454). El 3D-MPL estará presente en el intervalo de 10 μ g-100 μ g, preferentemente 25-50 μ g por dosis en la que el antígeno estará típicamente presente en un intervalo de 2-50 μ g por dosis.

Otros adyuvante preferido comprende QS21, una fracción no tóxica purificada por Hplc derivada de la corteza de *Quillaja Saponaria Molina*. Opcionalmente esto puede mezclarse con monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL), opcionalmente junto con un vehículo.

El procedimiento de producción de QS21 se desvela en la patente de Estados Unidos N° 5.057.540.

Se han descrito anteriormente formulaciones de adyuvante no reactogénico que contienen QS21 (documento WO 96/33739). Se ha demostrado que dichas formulaciones que comprenden QS21 y colesterol son adyuvantes estimulantes de TH1 de éxito cuando se formulan junto con un antígeno.

Los adyuvantes adicionales que son estimulantes preferentes de la respuesta celular TH1 incluyen oligonucleótidos inmunomoduladores, por ejemplo, secuencias CpG no metiladas como se desvelan en el documento WO 96/02555.

También se contemplan combinaciones de diferentes adyuvantes estimulantes de TH1, tales como los mencionados anteriormente en el presente documento, que proporcionan un adyuvante que es un estimulante preferente de respuesta celular TH1. Por ejemplo, QS21 puede formularse junto con 3D-MPL. La proporción de QS21:3D-MPL será típicamente del orden de 1:10 a 10:1; preferentemente de 1:5 a 5:1 y, con frecuencia, sustancialmente de 1:1. El intervalo preferido para una sinergia óptima es de 2,5:1 a 1:1 3D-MPL:QS21.

Preferentemente también está presente un vehículo en la composición de vacuna de acuerdo con la invención. El vehículo puede ser una emulsión de aceite en agua, o una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

Una emulsión de aceite en agua preferida comprende un aceite metabolizable, tal como escualeno, alfa-tocoferol y Tween 80. En un aspecto particularmente preferido los antígenos de la composición de vacuna de acuerdo con la invención se combinan con QS21 y 3D-MPL en dicha emulsión. Además, la emulsión de aceite en agua puede contener span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina.

Típicamente, para su administración a seres humanos, QS21 y 3D-MPL estarán presentes en una vacuna en el intervalo de 1 μg -200 μg , tal como de 10-100 μg , preferentemente de 10 μg -50 μg por dosis. Típicamente, el aceite en agua comprenderá del 2 al 10% de escualeno, del 2 al 10% de alfa-tocoferol y del 0,3 al 3% de Tween 80. Preferentemente, la proporción de escualeno:alfa-tocoferol es igual a o inferior a 1 ya que ésta proporciona una emulsión más estable. También puede estar presente span 85 a un nivel del 1%. En algunos casos, puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan además un estabilizante.

Las emulsiones de aceite en agua no tóxicas contienen preferentemente un aceite no tóxico, por ejemplo, escualeno o escualeno, un emulsionante, por ejemplo, Tween 80 en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

Una formulación de adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210.

Aunque la invención se ha descrito con respecto a ciertos polipéptidos de BASB232, se entenderá que esto abarca fragmentos de los polipéptidos de origen natural y polipéptidos similares con adiciones, deleciones o sustituciones que no afecten sustancialmente a las propiedades inmunogénicas de los polipéptidos recombinantes.

Composiciones, kits y administración

En un aspecto adicional de la invención se proporcionan composiciones que comprenden un polipéptido de BASB232 para su uso en la invención para su administración a una célula o a un organismo multicelular.

La divulgación también se refiere a composiciones que comprenden un polinucleótido y/o un polipéptido analizado en el presente documento o sus agonistas o antagonistas. Los polipéptidos y polinucleótidos para su uso en la invención pueden emplearse en combinación con un vehículo o vehículos estériles o no estériles para su uso con células, tejidos u organismos, tales como un vehículo farmacéutico adecuado para su administración a un individuo. Dichas composiciones comprenden, por ejemplo, un aditivo de medio o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido para su uso en la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos vehículos pueden incluir, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La formulación se adaptaría al modo de administración. La invención se refiere además a paquetes y kits farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes rellenos con 1, 2, 3, 4 ó 5 de los ingredientes de las composiciones de la invención mencionadas anteriormente.

Los polipéptidos para su uso en la invención pueden emplearse en solitario o junto con otros compuestos, tales como compuestos terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de cualquier forma eficaz conveniente incluyendo, por ejemplo, la administración por vía tópica, oral, anal, vaginal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o intradérmica, entre otras.

En terapia o como profiláctico, el agente activo puede administrarse a un individuo como una composición inyectable, por ejemplo, como una dispersión acuosa estéril, preferentemente isotónica.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, tal como la forma soluble del polipéptido, en combinación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos vehículos incluyen, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La invención se refiere además a paquetes y kits farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones de la invención mencionadas anteriormente. Pueden emplearse polipéptidos, para su uso en la presente invención, en solitario o junto con otros compuestos, tales como compuestos terapéuticos.

La composición se adaptará a la vía de administración, por ejemplo, por una vía sistémica u oral. Las formas preferidas de administración sistémica incluyen inyección, típicamente por inyección intravenosa. Pueden usarse otras vías de inyección, tales como subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. Los medios alternativos para administración sistémica incluyen administración transmucosa y transdérmica usando penetrantes tales como sales biliares o ácidos fusídicos u otros detergentes. Además, si un polipéptido para su uso en la presente invención puede formularse en una formulación entérica o encapsulada, también puede ser posible la administración oral. La administración de estos compuestos también puede ser tópica y/o localizada en forma de pomadas balsámicas, pastas, geles, soluciones, polvos y similares.

Para su administración a mamíferos, y particularmente a seres humanos, se espera que el nivel de dosificación diario del agente activo sea de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg, típicamente de aproximadamente 1 mg/kg. El médico en cualquier caso determinará la dosificación real que será más adecuada para un individuo y variará con la edad, el peso y la respuesta del individuo particular. Las dosificaciones anteriores son ejemplares del caso medio. Por supuesto, pueden existir casos individuales que merezcan intervalos de dosificación superiores o inferiores y dichos casos se incluyen en el alcance de la presente invención.

El intervalo de dosificación necesario depende de la elección del péptido, de la vía de administración, de la naturaleza de la formulación, de la naturaleza de la afección del sujeto y el juicio del médico que lo atienda. Las dosificaciones adecuadas, sin embargo, están en el intervalo de 0,1-100 $\mu\text{g/kg}$ de sujeto.

Una composición de vacuna está convenientemente en forma inyectable. Pueden emplearse adyuvantes convencionales para aumentar la respuesta inmune. Una dosis unitaria adecuada para la vacunación es de 0,5-5 microgramos/kg de antígeno y dicha dosis se administra preferentemente 1-3 veces y con un intervalo de 1-3 semanas. Con el intervalo de dosis indicado, no se observarán efectos toxicológicos adversos con las composiciones de la invención que impedirían su administración a individuos adecuados.

Sin embargo, deben esperarse amplias variaciones en la dosificación necesaria, en vista de la diversidad de compuestos disponibles y de las diferentes eficacias de las diversas vías de administración. Por ejemplo, se esperaría que la administración oral requiriese mayores dosificaciones que la administración por inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse usando rutinas empíricas convencionales para su optimización, como se entiende bien en la técnica.

Bases de Datos de Secuencias, Secuencias en un Medio Tangible y Algoritmos

Las secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas constituyen un recurso de información valioso con el que determinar sus estructuras bi- y tridimensionales, así como identificar secuencias adicionales de homología similar. Estas estrategias se favorecen más fácilmente por almacenamiento de la secuencia en un medio legible por ordenador y después uso de los datos almacenados en un programa de estructuras macromoleculares conocido o para realizar una búsqueda en una base de datos de secuencia usando herramientas de búsqueda bien conocidas, tales como el paquete de programas GCG.

También se desvelan procedimientos para el análisis de secuencias de caracteres o hebras, particularmente secuencias genéticas o secuencias proteicas codificadas. Los procedimientos preferidos de análisis de secuencia incluyen, por ejemplo, procedimientos de análisis de homología de secuencia, tales como análisis de identidad y similitud. Análisis de la estructura de ADN, ARN y proteínas, ensamblaje de secuencia, análisis cladístico, análisis de motivos de secuencia, determinación de la fase de lectura abierta, lectura automática de ácido nucleico, análisis del uso de codones, recorte de bases de ácido nucleico y análisis de picos de cromatograma de secuenciación.

Puede usarse un procedimiento basado en ordenador para realizar la identificación de la homología. Este procedimiento comprende las etapas de: proporcionar una primera secuencia polinucleotídica que comprende la secuencia de un polinucleótido de la divulgación en un medio legible por ordenador; y comparar dicha primera secuencia polinucleotídica con al menos una segunda secuencia polinucleotídica o polipeptídica para identificar su homología.

También puede usarse un procedimiento basado en ordenador para realizar la identificación de la homología, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de: proporcionar una primera secuencia polipeptídica que comprende la secuencia de un polipéptido de uso en la invención en un medio legible por ordenador; y comparar dicha primera secuencia polipeptídica con al menos una segunda secuencia polinucleotídica o polipeptídica para identificar su homología.

Definiciones

El término "identidad", como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, según sea el caso, como se determina por comparación de las secuencias. En la técnica, la "identidad" también se refiere al grado de relación de secuencia entre secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, según sea el caso, como se determina por el emparejamiento entre hebras de dichas secuencias. La "identidad" puede calcularse fácilmente por procedimientos conocidos, incluyendo, pero sin limitación, los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Los procedimientos para determinar la identidad están diseñados para dar el emparejamiento más largo entre las secuencias ensayadas. Además, los procedimientos para determinar la identidad están codificados en programas informáticos disponibles públicamente. Los procedimientos de programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el programa GAP en el paquete de programas GCG (Devereux, J., y col., Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN (Altschul, S. F. y col. J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990) y FASTA (Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448 (1988). La familia de programas BLAST está disponible públicamente del NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El algoritmo de Smith Waterman bien conocido también puede usarse para determinar la identidad.

ES 2 346 314 T3

Los parámetros para la comparación de secuencias polipeptídicas incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970).

Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 10915-10919 (1992).

Penalización por Huecos: 8.

Penalización por Longitud de Hueco: 2.

Un programa útil con estos parámetros está disponible públicamente como el programa "gap" de Genetics Computer Group, Madison WI. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de péptidos (junto con la no penalización por huecos terminales).

Los parámetros para la comparación de polinucleótidos incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970).

Matriz de comparación: emparejamientos = +10, emparejamiento erróneo = 0.

Penalización por Huecos: 50.

Penalización por Longitud de Hueco: 3.

Disponible como: el programa "gap" de Genetics Computer Group, Madison WI. Estos son los parámetros por defecto para comparaciones de ácidos nucleicos.

Un significado preferido para el término "identidad" para polinucleótidos y polipéptidos, según sea el caso, se proporciona en (1) y (2) a continuación.

- (1) Los polinucleótidos desvelados incluyen además un polinucleótido aislado que comprende una secuencia polinucleotídica que tiene una identidad de al menos el 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 ó 100% con la secuencia de referencia de la SEC ID N°: 1, en el que dicha secuencia polinucleotídica puede ser idéntica a la secuencia de referencia de la SEC ID N°: 1 o puede incluir hasta un número entero determinado de modificaciones de nucleótidos en comparación con la secuencia de referencia, en el que dichas modificaciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una delección, sustitución, incluyendo transición y transversión, o inserción de nucleótidos, y en el que dichas modificaciones pueden producirse en las posiciones 5' ó 3' terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los nucleótidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia, y en el que dicho número de modificaciones de nucleótidos se determina multiplicando el número total de nucleótidos en la SEC ID N°: 1 por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido por 100 y después restando ese producto de dicho número total de nucleótidos en la SEC ID N°: 1, o:

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

en la que n_n es el número de modificaciones de nucleótidos, x_n es el número total de nucleótidos en la SEC ID N°: 1, y es 0,50 para el 50%, 0,60 para el 60%, 0,70 para el 70%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, 0,90 para el 90%, 0,95 para el 95%, 0,97 para el 97% o 1,00 para el 100%, y $\cdot$ es el símbolo para el operador de multiplicación, y en la que cualquier producto que no sea un número de entero de x_n e y se redondea hacia abajo hasta el número entero más próximo antes de restarlo de x_n . Las modificaciones de una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de la SEC ID N°: 2 pueden generar mutaciones sin sentido, con sentido erróneo o de desplazamiento de fase de lectura en esta secuencia codificante y de este modo alterar el polipéptido codificado por el polinucleótido después de dichas modificaciones.

A modo de ejemplo, una secuencia polinucleotídica de la presente divulgación puede ser idéntica a la secuencia de referencia de la SEC ID N°: 1, es decir puede tener una identidad del 100% o puede incluir hasta cierto número entero de modificaciones de ácido nucleico en comparación con la secuencia de referencia, de modo que el porcentaje de identidad sea inferior a una identidad del 100%. Dichas modificaciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una delección, sustitución, incluyendo transición y transversión, o inserción de ácido nucleico, y en las que dichas modificaciones pueden producirse en las posiciones 5' ó 3' terminales de la secuencia polinucleotídica de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los ácidos nucleicos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de modificaciones de ácido nucleico

ES 2 346 314 T3

para un porcentaje de identidad dado se determina multiplicando el número total de ácidos nucleicos en la SEC ID N°: 1 por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido por 100 y después restando ese producto de dicho número total de ácidos nucleicos en la SEC ID N°: 1, o:

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

en la que n_n es el número de modificaciones de ácido nucleico, x_n es el número total de ácidos nucleicos en la SEC ID N°: 1, y es por ejemplo, 0,70 para el 70%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, etc., $\cdot$ es el símbolo del operador de multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de x_n e y se redondea hacia abajo hasta el número entero más próximo antes de restarlo de x_n .

- (2) Los polipéptidos desvelados incluyen además un polipéptido aislado que comprende un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 ó 100% con una secuencia polipeptídica de referencia de la SEC ID N°: 2, en el que dicha secuencia polipeptídica puede ser idéntica a la secuencia de referencia de la SEC ID N°: 342 o puede incluir hasta cierto número entero de modificaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia, en el que dichas modificaciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una delección, sustitución, incluyendo sustitución conservativa y no conservativa, o inserción de aminoácido, y en el que dichas modificaciones pueden producirse en las posiciones amino- o carboxi-terminales de la secuencia polipeptídica de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los aminoácidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia, y en el que dicho número de modificaciones de aminoácidos se determina multiplicando el número total de aminoácidos en la SEC ID N°: 2 por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido por 100 y después restando ese producto de dicho número total de aminoácidos en la SEC ID N°: 2, o:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y),$$

A modo de ejemplo, una secuencia polipeptídica de la presente divulgación puede ser idéntica a la secuencia de referencia de la SEC ID N°: 2, es decir, puede tener una identidad del 100%, o puede incluir hasta un número entero determinado de modificaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia, de modo que el porcentaje de identidad sea inferior a una identidad del 100%. Dichas modificaciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una delección, sustitución, incluyendo sustitución conservativa y no conservativa, o inserción de aminoácido, y en las que dichas modificaciones pueden producirse en las posiciones amino- o carboxi-terminales de la secuencia polipeptídica de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los aminoácidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de modificaciones de aminoácidos para un % de identidad dado se determina multiplicando el número total de aminoácidos en la SEC ID N°: 342 por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido por 100 y después restando ese producto de dicho número total de aminoácidos en la SEC ID N°: 2, o:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y),$$

en la que n_a es el número de modificaciones de aminoácidos, x_a es el número total de aminoácidos en la SEC ID N°: 2, y es, por ejemplo, 0,70 para el 70%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, etc., $\cdot$ es el símbolo para el operador de multiplicación, y en la que cualquier producto que no sea un número entero de x_a e y se redondea hacia abajo hasta el número entero más próximo antes de restarlo de x_a .

Los inventores pretenden que los términos “comprendiendo”, “comprenden” y “comprende” en el presente documento sean opcionalmente sustituibles por los términos “estando constituido por”, “constituidos por” y “constituido por”, respectivamente, en cada caso.

La “composición inmunogénica”, en el contexto de un polinucleótido, significa que cuando el polinucleótido se introduce en un huésped y se expresa una proteína a partir de ese polinucleótido, la proteína expresada es inmunogénica.

El término “individuo(s)”, cuando se usa en el presente documento con respecto a un organismo, significa un eucariota multicelular incluyendo, pero sin limitación, metazoos, un mamífero, un óvulo, un bívulo, un simio, un primate y un ser humano.

El término “aislado” significa alterado “por la mano del hombre” de su estado natural, es decir, si aparece en la naturaleza, se ha modificado o retirado de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido presente de forma natural en un organismo vivo no está “aislado”, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está “aislado”, como se emplea el término en el presente documento. Además, un polinucleótido o polipéptido que se introduce en un organismo por transformación, manipulación genética o por cualquier otro procedimiento recombinante está “aislado” incluso si está todavía presente en dicho organismo, pudiendo dicho organismo estar vivo o no vivo.

El término “polinucleótido(s)” se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser un ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado, incluyendo regiones mono- y bicatenarias.

El término “toxina” incluye preferentemente una forma toxoide de la toxina.

El término “variante” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido de referencia pero conserva sus propiedades esenciales. Una variante típica de un polinucleótido difiere en la secuencia de nucleótidos de otro polinucleótido de referencia. Los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden o no alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Los cambios de nucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se analiza a continuación. Una variante típica de un polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido de referencia. Generalmente, las diferencias son limitadas, de modo que las secuencias del polipéptido de referencia y de la variante son muy similares en su conjunto y, en muchas regiones, idénticas. Un polipéptido variante y de referencia pueden diferir en su secuencia de aminoácidos por una o más sustituciones, adiciones o deleciones en cualquier combinación. Un resto aminoacídico sustituido o insertado puede o no ser uno codificado por el código genético. Una variante de un polinucleótido o polipéptido puede ser de origen natural, tal como una variante alélica, o puede ser una variante de la que no se tenga conocimiento de que aparezca en la naturaleza. Pueden generarse variantes de origen no natural de polinucleótidos y polipéptidos por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

El término “enfermedad(es)” se refiere a cualquier enfermedad causada por o relacionada con una infección por una bacteria, incluyendo, por ejemplo, otitis media en lactantes y niños, neumonía en ancianos, sinusitis, infecciones intrahospitalarias y enfermedades invasivas, otitis media crónica con pérdida de audición, comunicación de líquido en el oído medio, lesión de los nervios auditivos, aprendizaje del habla retardado, infección del tracto respiratorio superior e inflamación del oído medio.

Ejemplos

Los ejemplos a continuación se llevan a cabo usando técnicas convencionales que son bien conocidas y de rutina para los expertos en la materia, excepto donde se describa en detalle otra cosa. Los ejemplos son ilustrativos pero no limitan la invención.

Ejemplo 1

Clonación de los genes de BASB232 de B. pertussis cepa Tohama I

Se extrae el ADN genómico de *B. pertussis* cepa Tohama I a partir de 10^{10} células bacterianas usando el kit de extracción de ADN genómico de QIAGEN (Qiagen GmbH). Este material (1 μ g) se somete después a amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa usando dos cebadores específicos. Se obtiene un fragmento de ADN, se digiere por las endonucleasas de restricción adecuadas y se inserta en los sitios compatibles del vector de clonación/expresión pET (Novagen) usando técnicas de biología molecular convencionales (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Segunda Edición, Eds: Sambrook, Fritsch y Maniatis, Cold Spring Harbor press 1989). El pET-BASB232 recombinante se somete después a secuenciación de ADN usando el kit Big Dyes (Applied biosystems) y se analiza en un secuenciador de ADN ABI 373/A en las condiciones descritas por el proveedor.

Ejemplo 2

Expresión y purificación de proteínas BASB232 recombinantes en Escherichia coli

La construcción del vector de clonación/expresión pET-BASB232 se describe en el Ejemplo 1. Este vector alberga el gen de BASB232 aislado de *Bordetella pertussis* cepa Tohama I en fusión con una extensión de 6 restos de Histidina, colocado bajo el control del promotor fuerte del gen 10 del bacteriófago T7. Para el estudio de la expresión, este vector se introduce en la *Escherichia coli* cepa Novablue (DE3) (Novagen), en la que el gen para la polimerasa de T7 está colocado bajo el control del promotor *lac* regulable por isopropil-beta-D-tiogalactósido (IPTG). Cultivos líquidos (100 ml) de la cepa recombinante de *E. coli* Novablue (DE3) [pET-BASB232] se dejan crecer a 37°C con agitación hasta que se alcanza una densidad óptica a 600 nm (DO600) de 0,6. En ese punto temporal, se añade IPTG a una concentración final de 1 mM y el cultivo se deja crecer durante 4 horas adicionales. Después el cultivo se centrifuga a 10.000 rpm y el sedimento se congela a -20°C durante al menos 10 horas. Después de descongelar, el sedimento se resuspende durante 30 min a 25°C en tampón A (clorhidrato de guanidina 6 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris 0,01 M, pH 8,0), se pasa tres veces a través de una aguja y se aclara por centrifugación (20000 rpm, 15 min). Después, la muestra se carga a un caudal de 1 ml/min en una columna Hitrap cargada con Ni²⁺ (Pharmacia Biotech). Después del pase del flujo a su través, la columna se lava sucesivamente con 40 ml de tampón B (Urea 8 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris 0,01 M, pH 8,0), 40 ml de tampón C (Urea 8 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris 0,01 M, pH 6,3). La proteína recombinante BASB232/His6 se eluye después de la columna con 30 ml de tampón D (Urea 8 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris 0,01 M, pH 6,3) que contiene 500 mM de imidazol y se recogen fracciones de 3 ml de tamaño. Puede eluirse proteína BASB232/His6 altamente enriquecida a partir de la columna. Este polipéptido se detecta mediante un anticuerpo monoclonal de ratón generado contra el motivo de 5-histidina. Además, la proteína BASB232-His6 recombinante desnaturalizada se solubiliza en una solución desprovista de urea. Con este fin, la BASB232-His6 desnaturalizada

contenida en urea 8 M se dializa exhaustivamente (2 horas) contra tampón R (NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, Arginina 0,5 M, pH 6,8) que contiene sucesivamente 6 M, 4 M, 2 M y sin urea. Como alternativa, este polipéptido se purifica en condiciones no desnaturizantes usando protocolos descritos en el folleto de Qiexpresssionist (Qiagen GmbH).

Ejemplo 3

Producción de antisueros contra BASB232 recombinante

Se generaron antisueros polivalentes dirigidos contra la proteína BASB232 vacunando conejos con la proteína BASB232 recombinante purificada. También se generaron antisueros polivalentes dirigidos contra la proteína BASB232 vacunando ratones con la proteína BASB232 recombinante purificada. Se extrajo sangre de los animales antes de la primera inmunización ("extracción de sangre preinmunización") y después de la última inmunización.

Se midieron los títulos anti-proteína BASB232 mediante un ELISA usando proteína BASB232 recombinante purificada como el antígeno de revestimiento. El título se define como los títulos a medio punto calculados mediante un modelo logístico de 4 parámetros usando el programa informático XL Fit. Los antisueros también se usan como el primer anticuerpo para identificar la proteína en una transferencia de Western, como se describe en el ejemplo 5 a continuación.

Ejemplo 4

Caracterización Inmunológica: Exposición en superficie de BASB232

Se determinaron los títulos anti-proteínas BASB232 mediante un ELISA usando células completas de *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) destruidas con formalina. El título se define como los títulos a medio punto calculados mediante un modelo logístico de 4 parámetros usando el programa informático XL Fit.

Ejemplo 5

Caracterización Inmunológica: Análisis de Transferencia de Western

Se cultivaron varias cepas de *B. pertussis*, así como aislados clínicos, en placas de agar Bordet Gengou durante 24 horas a 36°C y CO₂ al 5%. Se usaron varias colonias para inocular caldo de Agar Tripticasa Soja (TSA) complementado por NAD y hemina, cada uno a 10 µg/ml. Los cultivos se dejaron crecer hasta que la absorbancia a 620 nm era de aproximadamente 0,4 y las células se recogieron por centrifugación. Después las células se concentraron y se solubilizaron en tampón de muestras de PAGE. Las células solubilizadas se resolvieron después en geles de poliacrilamida al 4-20% y las proteínas separadas se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF. Las membranas de PVDF se pretrataron después con tampón de saturación. Todas las incubaciones posteriores se llevaron a cabo usando este tampón de pretratamiento.

Las membranas de PVDF se incubaron con suero preinmune y suero inmune de conejo o ratón. Después se lavaron las membranas de PVDF. Las membranas de PVDF se incubaron con anticuerpo de oveja anti-Ig de conejo o de ratón marcado con biotina. Después las membranas de PVDF se lavaron 3 veces con tampón de lavado, y se incubaron con estreptavidina peroxidasa. Después las membranas de PVDF se lavaron 3 veces con tampón de lavado y se revelaron con 4-cloro-1-naftol.

Ejemplo 6

Presencia de Anticuerpo contra BASB232 en Sueros de Convalecientes Humanos

Se realizó un análisis de transferencia de Western de BASB232 recombinante purificada, como se ha descrito en el Ejemplo 5 anterior, excepto por que se usó una combinación de sueros humanos de niños infectados por *B. pertussis* como la preparación de primer anticuerpo.

Ejemplo 7

Eficacia de vacuna de BASB232: aumento de la eliminación pulmonar de B. pertussis en ratones

Este modelo de ratón se basa en el análisis de la invasión pulmonar por *B. pertussis* después de una exposición intranasal convencional de ratones vacunados.

Se inmunizaron grupos de ratones con vacuna de BASB232. Después del refuerzo, los ratones se expusieron por instilación de una suspensión bacteriana en los orificios nasales bajo anestesia. Los ratones se sacrificaron entre 30 minutos, así como 2, 5 y 8 días después de la exposición y los pulmones se extirparon asépticamente y se homogeneizaron individualmente. El log₁₀ del número medio ponderado de UFC/pulmón se determinó contando las colonias crecidas en placas de agar después de sembrar diluciones del homogeneizado. La media aritmética del log₁₀ del nú-

ES 2 346 314 T3

mero medio ponderado de UFC/pulmón y las desviaciones típicas se calcularon para cada grupo. Los resultados se analizaron estadísticamente.

En este experimento, se inmunizaron grupos de ratones con BASB232 o con una preparación de células completas destruidas (kwc) de *B. pertussis*, o se sometieron a una inmunización simulada.

Ejemplo 8

Epítopes Útiles

Los epítopes de células B de una proteína se localizan principalmente en su superficie. Para predecir epítopes de células B de polipéptidos de BASB232 se combinan dos procedimientos: predicción de la estructura 2D y predicción del índice antigénico. La predicción de la estructura 2D se realizó usando el programa PSIPRED (de David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, Reino Unido). El índice antigénico se calculó basándose en el procedimiento descrito por Jameson y Wolf (CABIOS 4:181-186). Los parámetros usados en este programa son el índice antigénico y la longitud mínima para un péptido antigénico. Se usó un índice antigénico de 0,9 para un mínimo de 5 aminoácidos consecutivos como umbral en el programa. Los péptidos que comprenden epítopes de células B potenciales buenos se enumeran en la tabla 5. Estos pueden ser útiles (preferentemente conjugados o unidos recombinantemente a una proteína de mayor tamaño) en una composición de vacuna para la prevención de infecciones por Bordetella, como podrían serlo péptidos similares que comprenden mutaciones conservativas (preferentemente con una identidad del 70, 80, 95, 99 ó 100% con las secuencias de la tabla 5) o truncados que comprenden 5 o más (por ejemplo 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12) aminoácidos de los mismos, o extensiones que comprenden, por ejemplo, 1, 2, 3, 5, 10 aminoácidos adicionales en cualquiera o ambos extremos del contexto nativo de polipéptidos de BASB232, que conservan un epítipo eficaz que puede generar una respuesta inmune en un huésped contra los polipéptidos de BASB232.

TABLA 5

Epítopes de células B potenciales de la SEC ID N°: 34

Posición	Secuencia
56	QDAGQEGEF
84	DDDPDELGE
106	EHKNPMS
236	PGFPPPPPLP
265	GQDGK
339	DGANT
381	TLRQTRI
404	PQSGSG
538	DGNKPL
579	ADSRVQD
599	APEASY
628	QNDQL
636	GRADGQ
653	ADSRGA
692	AEDPKT
753	TFSERQQISNRH
766	RAYDQT
785	ASGGRW

ES 2 346 314 T3

Posición	Secuencia
800	YADRTYPGDGGG
839	GRYDQQY
858	DYRTSG
869	EGGRRF
893	TSGKRYRASN
944	QEFKSTGDVRTNG
962	AGRHGR
1004	AGYRYSF

Los epítopes de células T auxiliares son péptidos unidos a moléculas de HLA clase II y reconocidos por células T auxiliares. La predicción de epítopes de células T auxiliares útiles de polipéptidos de BASB232 se basaba en el procedimiento TEPITOPE descrito por Sturniolo y col. (Nature Biotech. 17: 555-561). Los péptidos que comprenden epítopes de células T potenciales buenos se enumeran en la tabla 6. Estos pueden ser útiles (preferentemente conjugados con péptidos, polipéptidos o polisacáridos) con fines vacunales, como podrían serlo péptidos similares que comprendan mutaciones conservativas (preferentemente con una identidad del 70, 80, 95, 99 ó 100% con las secuencias a continuación) o truncados que comprendan 5 o más (por ejemplo, 6, 7, 8, 9,10,11,12,14,16,18 ó 20) aminoácidos de los mismos, o extensiones que comprendan por ejemplo, 1, 2, 3, 5, 10 aminoácidos adicionales en cualquiera o ambos extremos del contexto nativo de polipéptidos de BASB232, que conserven un epítope de células T auxiliares eficaz de polipéptidos de BASB232.

TABLA 6

Epítopes de células T auxiliares potenciales de la SEC ID N°: 34

Posición	Secuencia
20	WRLHALAAALA
34	MARLAPAAA
105	VEHKNPMSK
118	VRVSGAGRA
144	VVRRGGTLELDGVTVA
164	MEPMTVSDA
192	LVRAAQGGQ
208	LQSILGPALIADGGSIS
270	VTREVALRAHGPQAT
287	VYAYMPGSEI
298	LQGGTVSVQ

ES 2 346 314 T3

	Posición	Secuencia
5	329	VRLDGTTVS
	347	LVRGDAARAEWNTVLRTAKSLAA
	380	VTLRQTRIE
10	420	ITTTGNRAA
	444	VRAEGSGSS
	461	LWSAGSLAS
15	483	LKLMPGALASS
	497	VRLTDGATA
	513	LQQHSTIPV
20	535	IVADGNKPL
	563	VLQSATLGK
	576	VVNADSRVQD
25	586	MSMRGGRVEFQAPAPE
	609	LQTLDGNGVFVLNTNVAA
	644	VLVRNAGGEA
30	660	LGLVHTQGQ
	673	FRLANVGKAVD
	687	WRYSLAEDP
35	699	VWSLQRAGQALS
	725	IALAESNAL
40	740	LRLRADAGGPWARTFSERQ
	824	YVGDDGGYYLDTVLRLGRYDQ
	845	YNIAGTDGG
45	859	YRTSGAAWS
	888	VMLWRTSGKRYRASNGLRV
	915	LGRLGLRFGRRIALAG
50	934	VQPYARLGW
	952	VRTNGIGHA
55	996	INIPWSFHA

Los mismos análisis (predicción de epítopes de células B y predicción de epítopes de células T auxiliares) podían realizarse para cada secuencia polipeptídica de BASB232 comprendida en el Grupo de SEC 2.

60 Ejemplo 9

Expresión de BrkA

65 BrkB es un proteína de 1010 aminoácidos. Un vector de expresión pET30b que contiene los aminoácidos 60-702 de BrkA, fusionados en el C y N-terminal con un marcador 6x-His se usó para expresar BrkA en *E. coli*. La bacteria se cultivó hasta una DO600 de aproximadamente 0,6 y se indujo con IPTG 1 mM durante 2 horas. Se purificó BrkA recombinante en condiciones desnaturalizantes usando el protocolo del manual de Purificación

ES 2 346 314 T3

de Proteína del Sistema Xpress (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las bacterias se lisaron en clorhidrato de guanidina 6 M y el lisado se aplicó a agarosa con ácido nitrilotriacético-Ni²⁺ (Qiagen, Mississauga, Ont.). Después de lavados sucesivos en urea 8 M de pH decreciente, se eluyó la BrkA purificada a pH 4 y las fracciones se combinaron. La urea se eliminó por diálisis lenta a 4°C contra Tris 10 mM, pH 8,0, en presencia de Tritón X-100 al 0,1%.

La proteína purificada se replegó de modo que tuviera una estructura beta parecida a PRN (controlada por CD) y fuera funcional en un ensayo de suero. La proteína se esterilizó por filtración y se diluyó en tampón Tris 10 mM, pH 8, a una concentración de aproximadamente 0,4 mg/ml.

Ejemplo 10

Formulación de vacunas

Se formularon seis vacunas:

1. DTPa018A2 - contiene 6,25 Lf de DT, 2,5 Lf de TT, 6,25 ug de PT y 6,25 ug de FHA por dosis de ratón. Todos los antígenos se adsorbieron por separado sobre Al(OH)₃ antes de combinarlos.
2. DTPa14885B9 - contiene 6,25 Lf de DT, 2,5 Lf de TT, 6,25 ug de PT y 6,25 ug de FHA y 2 ug de pertactina por dosis de ratón. Todos los antígenos se adsorbieron por separado sobre Al(OH)₃ antes de combinarlos.
3. DTPw13126A9 - contiene 6,25 Lf de DT, 2,5 Lf de TT y 1 U.I de células completas de *B. pertussis* por dosis de ratón. Todos los antígenos se adsorbieron por separado sobre Al(OH)₃ antes de combinarlos.
4. DTBrkA - contiene 6,25 Lf de DT, 2,5 Lf de TT y 2,5 ug de BrkA por dosis de ratón. Todos los antígenos se adsorbieron por separado sobre Al(OH)₃ antes de combinarlos.
5. DTPa-2 BrkA - contiene 6,25 Lf de DT, 2,5 Lf de TT, 6,25 ug de PT, 6,25 ug de FHA y 2,5 ug de BrkA por dosis de ratón. Todos los antígenos se adsorbieron por separado sobre Al(OH)₃ antes de combinarlos.
6. DTPa-3 BrkA - contiene 6,25 Lf de DT, 2,5 Lf de TT, 6,25 ug de PT, 6,25 ug de FHA, 2,5 ug de pertactina y 2,5 ug de BrkA por dosis de ratón. Todos los antígenos se adsorbieron por separado sobre Al(OH)₃ antes de combinarlos.

Ejemplo 11

Protección frente a la invasión pulmonar por B. pertussis en un modelo animal

Se inmunizaron grupos de 20 ratones BALB/c (hembras, 5 semanas de edad) por vía subcutánea con ¼ de una dosis humana (125 µl de vacuna) y se reforzaron 3 semanas después. Una semana después del refuerzo, se recogió una muestra de sangre de cada ratón para determinación de anticuerpos. Después, los ratones se expusieron por instilación de 50 µl de suspensión bacteriana (+/- 5 10⁶ UFC/50 µl) en el orificio nasal izquierdo bajo anestesia con éter. Se sacrificaron cinco ratones de cada grupo a 4 tiempos diferentes (2 horas, 2, 5 y 8 días) después de la exposición y se extirparon los pulmones asépticamente y se homogeneizaron individualmente. El log₁₀ del número medio ponderado de UFC/pulmón se determinó contando las colonias crecidas en placas de agar Bordet-Gengou después de la siembra en placa de 100 µl de 4 diluciones seriadas del homogeneizado. La media aritmética del log₁₀ del número medio ponderado de UFC/pulmón y la desviación típica se calcularon para cada grupo y cada punto temporal. Se realizaron tres experimentos. Los mismos grupos de vacuna se incluyeron en cada experimento pero los animales se expusieron a *B. pertussis* cepa Tohama, *B. pertussis* cepa 18323 o *B. paraptussis*.

El día antes de la exposición, se recogió sangre de cada ratón. Los niveles de anticuerpos anti-PT, anti-FHA, anti-PRN y anti-BrkA se determinaron mediante ELISA. Se calculó el título medio geométrico para cada grupo de ratones.

Ejemplo 12

Exposición a B. pertussis cepa Tohama

En un experimento se expusieron ratones inmunizados a *B. pertussis* cepa Tohama. El número de UFC/pulmón en cada punto temporal después de la exposición y para cada grupo se resume en la figura 1. El experimento tenía una variabilidad reducida, teniendo los datos un error cuadrático medio de 0,450.

Se usó el análisis estadístico de los datos usando ANOVA1 para evaluar los datos. No se observaron diferencias significativas entre la protección frente a *B. pertussis* ofrecida por DTBrkA en comparación con el control, indicando que la inmunización con BrkA en solitario es insuficiente para generar protección. Por el contrario, la adición de BrkA a una vacuna de DTPa-2 producía un aumento estadísticamente significativo de la protección que mostraba que, en combinación con PT y FHA, BrkA puede producir una protección adicional. El nivel de protección conferido por DTPa-2 BrkA era estadísticamente ligeramente inferior al conferido por DTPa-3, que confería una protección estadísticamente equivalente a DTPw. La vacuna de DTPa-3 BrkA proporcionaba una protección excelente frente a la exposición después de 2 y 5 días pero una protección inferior después del día 8.

Ejemplo 13

Exposición a B. pertussis cepa 18323

En este experimento se expusieron ratones inmunizados con *B. pertussis* cepa 18323. El número de UFC/pulmón en cada punto temporal después de la exposición y para cada grupo se resume en la figura 2. El experimento mostraba una variabilidad reducida, siendo el error cuadrático medio del experimento de 0,402. El análisis estadístico usando ANOVA1 mostraba que, de nuevo, DTBrkA no proporcionaba una protección significativa sobre el control. Sin embargo, DTPa-2 BrkA proporcionaba una protección mejor que DTPa, mostrando que BrkA, en combinación con otros antígenos de *B. pertussis* proporciona una protección adicional. La protección conseguida por la vacunación con DTPa-2 BrkA frente a la exposición a *B. pertussis* cepa 18323 era estadísticamente equivalente a la proporcionada por DTPa-3, DTPa-3 BrkA y DTPw.

Ejemplo 14

Comparación de la protección frente a B. pertussis y B. paraptussis en ratones vacunados con DTPw o DTPa

Se inmunizaron por vía subcutánea grupos de 25 ó 30 ratones BALB/c (hembras, 5 semanas de edad) por vía subcutánea con ¼ de una dosis humana de DT, DTPa o DTPw de diferentes fuentes (125 µl de vacuna) y se reforzaron 3 semanas después. Las fuentes de DTPw eran Triple antigen (CSL), Tri-immune (Lederle), Pentacoq (MSD), Combivax (Behring), Infanrix (SB), DKTP (RVM), DTPw (Connaght) y Trivax (Wellcome). Las fuentes de DTPa eran Infanrix (SB), Triacel (PMCS), DI-TE-KIK (Amvax), Acell-immune (Lederle), Tropedia (Biken), Tricelluvax (Biocine/Chiron), Pentavac (PM-MSD) y DTPa-2 (SB). Una o dos semanas después del refuerzo, se recogió una muestra de sangre de cada ratón para la determinación de anticuerpos. Los ratones se expusieron después por instilación de 50 µl de suspensión bacteriana (+/- 5 10⁶ UFC/50 µl) en el orificio nasal izquierdo bajo anestesia. Se sacrificaron cinco ratones de cada grupo a 5 ó 6 tiempos diferentes (que variaban de 2 horas a 14 días) después de la exposición y los pulmones se extirparon asépticamente y se homogeneizaron individualmente. El log10 del número medio ponderado de UFC/pulmón se determinó contando las colonias crecidas en placas de agar Bordet-Gengou después de la siembra en placa de 100 µl de 4 diluciones seriadas del homogeneizado. La media aritmética del log10 del número medio ponderado de UFC/pulmón y la desviación típica se calcularon para cada grupo y cada punto temporal.

El día antes de la exposición, se recogió sangre de cada ratón para determinación de los niveles de anticuerpos anti-PT, anti-FHA y anti-PRN por ELISA. Se calculó el título medio geométrico para cada grupo de ratones.

Los resultados se analizaron estadísticamente por aplicación de ANOVA unidireccional y bidireccional después de asumir igualdad de varianza (comprobado por el ensayo de Brown y Forsythe) y normalidad (comprobado usando el ensayo de Shapiro-Wilk). Se analizaron las diferencias entre grupos usando el ensayo de Dunnet, el ensayo de intervalo calculado con la prueba T de Student de Tukey (HSD) y el ensayo de Student-Newman-Keuls.

Los resultados se muestran en la figura 3, y muestran que las vacunas de DTPw inducían una buena eliminación pulmonar de *B. pertussis* y *B. paraptussis*. Sin embargo, las vacunas de DTPa inducían una marcada eliminación pulmonar de *B. pertussis* pero una eliminación sólo limitada de *B. paraptussis*.

Este experimento demuestra que los antígenos presentes en la vacuna de DTPw y ausentes en la vacuna de DTPa son protectores frente a paraptussis. Además, los antígenos presentes en la vacuna de DTPa, en concreto FHA y pertactina, pueden presentar variabilidad antigénica cuando se comparan con los antígenos de paraptussis correspondientes.

Ejemplo 15

Protección frente a B. paraptussis por inmunización con DTPw

La protección frente a una exposición a *B. paraptussis* en el modelo de eliminación pulmonar de ratón puede obtenerse por inmunización activa con una vacuna de DTPw (compuesta por células completas muertas de *B. pertussis*).

ES 2 346 314 T3

En este experimento se inmunizaron ratones dos veces (día 0 y 21) con $\frac{1}{4}$ de dosis humana de vacuna de DTPw y se expusieron por vía intranasal a *B. parapertussis* el día 28. Se midió la protección por recuento de *B. parapertussis* en los pulmones 0 (2 horas), 2, 5 y 8 días después de la exposición.

Los resultados mostrados en la Figura 15A demuestran que la inmunización con DTPw daba como resultado una gran disminución en el número de *B. parapertussis* presentes en el pulmón en comparación con ratones de control.

Como se muestra en la Figura 15B, también puede obtenerse protección frente a *B. parapertussis* después de la inmunización pasiva usando un suero anti-DTPw. En este caso, se inyectaron 500 μ l de suero anti-Pw o suero de ratones normales por vía intraperitoneal a ratones 20 horas antes de la exposición intranasal a *B. parapertussis*. Las bacterias restantes en los pulmones se evaluaron 0, 1, 2, 5 y 8 días después de la exposición.

Como se muestra en la Figura 15B, la inmunización pasiva con antisueros contra DTPw daba como resultado una reducción considerable del número de *B. parapertussis* en los pulmones de ratones en comparación con el grupo de control.

La protección observada frente a *B. parapertussis* después de la inmunización activa y también pasiva con una vacuna DTPw que contiene células completas muertas de *B. pertussis* sugiere que existen epítopes con protección cruzada entre las dos cepas.

Ejemplo 16

Identificación de antígenos de Bordetella con protección cruzada

Materiales y Procedimientos

Muestras de proteína de membrana externa

Se aislaron muestras de proteínas de membrana externa (OMP) de *B. parapertussis* de ATCC15237, usando el protocolo descrito en Inf. Imm. 1998, 66 (8), 3597. Esto proporcionaba OMP de *B. parapertussis* a aproximadamente 64 μ g/ml.

Electroforesis en gel (SDS-PAGE)

Se combinaron cuatro alícuotas (de aproximadamente 13 μ g cada una) de muestra de OMP y se evaporaron hasta sequedad al vacío. El residuo se solubilizó en 100 μ l de n-octilglucósido al 0,1% p/v en agua. La muestra se redujo por adición de 10 μ l de tributilfosfina 200 mM y se alquiló con 5 μ l de 2-vinilpiridina. La reacción se realizó a 4°C durante 4 horas. Después la mezcla se precipitó y se lavó con el kit de limpieza de SDS-PAGE de Amersham. La muestra completa (36 μ l) se disolvió después con el tampón de muestras de SDS-PAGE (36 μ l) y el reductor (7 μ l) suministrado con los geles Criterion XT de Bio-Rad. Se añadieron 64 μ l de agua y la mezcla se calentó a 95°C durante 5 min.

Se procesaron dos geles con carriles cargados con 14 μ l (aproximadamente 5 μ g) de cada muestra usando un tampón de procesamiento de MES (ácido 2-morfolinoetanosulfónico) para proporcionar resolución para el intervalo de tamaño pequeño. Otros dos geles, también con carriles cargados con 14 μ l de muestra cada uno, se procesaron usando MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico) para la resolución de las proteínas de mayor tamaño. Para cada gel, a cada lado de los carriles de muestra, se coelectroconcentraron patrones preteñidos y no teñidos (BioLabs n° cat. P7708S y Bio-Rad n° cat. 161-0317) como guías de alineamiento de gel y Western, respectivamente.

Los geles se tiñeron con el reactivo coloidal Azul de Coomassie EZ G250 (Sigma).

Transferencia de Western

Inmediatamente después de la electroforesis en gel, para cada tampón de procesamiento usado, se electrotransfirió un gel sobre una membrana de electrocelulosa (Hybond ECL, Amersham), usando un tampón de transferencia de Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1% p/v y metanol al 20% v/v a 4°C con un voltaje de 100 V durante 1 a 1,5 horas. La transferencia se efectuó usando el sistema en húmedo Trans-Blot Cell de Bio-Rad.

Se revelaron las proteínas sometidas a electrotransferencia por combinación de sueros de ratón generados contra *B. pertussis* (α DTPw), producidos como se describe en el Ejemplo 15, seguidos de anticuerpo de cabra anti-IgG/IgM de ratón conjugado con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario. Se visualizaron las inmunotransferencias de Western usando el kit de cromógeno de AP de nitroazul de tetrazolio (NBT)/sal potásica de 5-bromo-4-cloro-3-indoilo fosfato (BCIP) de Promega.

Emparejamiento de gel y transferencia de Western

Se emparejaron bandas inmunoactivas en la membrana de transferencia de Western con la banda de gel teñido con Coomassie correspondiente por alineamiento después de redimensionar los marcadores de peso molecular presentes en las imágenes exploradas.

Digestión en el gel y extracción de péptido

Las bandas se escindieron y se cortaron en fragmentos (aproximadamente 1 mm³). Después, se transfirieron a tubos eppendorf de baja unión a proteínas de 500 µl. Los fragmentos de gel se lavaron tres veces con 300 µl de metanol al 50% v/v y ácido acético al 5% v/v en agua durante 15 min, seguido de 300 µl de bicarbonato de amonio 100 mM durante 5 min. Los fragmentos de gel se encogieron en 300 µl de acetonitrilo durante 5 min y se secaron al vacío en un evaporador Speedvac durante 5 min. Los fragmentos de gel secos se volvieron a hinchar en 100 µl de tributilfosfina 5 mM, 2-vinilpiridina 100 mM y bicarbonato de amonio 100 mM a 4°C durante 1 hora. El sobrenadante se desechó.

Los fragmentos de gel se lavaron con 300 µl de bicarbonato de amonio 100 mM durante 5 min y se encogieron en 300 µl de acetonitrilo durante 5 min. Esa etapa se repitió dos veces. Los fragmentos de gel se secaron al vacío en un evaporador Speedvac durante 5 min. Se realizó una digestión en gel durante una noche por adición de 50 µl de una solución de tripsina bovina nativa (bicarbonato de amonio 100 mM, CaCl₂ 5 mM, n-octilglucósido al 0,01% p/v). Los productos peptídicos proteolíticos se extrajeron por sonicación en ácido fórmico al 5% y acetonitrilo. Los extractos combinados se redujeron después hasta aproximadamente 20 µl por evaporación al vacío.

Espectrometría de masas

Se analizaron las digestiones de bandas por nanoCL-EM/EM usando un espectrómetro de masas en tándem Micromass QToF-2 (Micromass) que funciona mediante el sistema de datos Masslynx (Micromass). El Q-ToF funcionaba en modo exploración de estudio usando una exploración de estudio de EM 1-s de 400 a 1500 Da, seguida de exploraciones de EM/EM 1-s en ocho iones precursores diferentes, de 50 a 2000 Da. Se permitió una adquisición de espectros de EM/EM de hasta un total de 4 s en cada ión precursor o se interrumpió cuando la intensidad de señal disminuía por debajo de 3 recuentos/segundo. Los precursores se excluyeron de cualquier experimento de EM/EM adicional durante 200 s. Sólo se seleccionaron los iones doblemente y triplemente cargados como precursores para EM/EM. El voltaje de cono era de 35 V. La energía de colisión se ajustó de acuerdo con el estado de carga y la masa del ión precursor. El espectrómetro de masas estaba equipado con un emisor SilicaTip de nanonebulización (New Objective). Se puso a punto para alcanzar una resolución (fwhm) de entre 6000 y 8000 a m/z 432,9 (angiotensina). El voltaje capilar se ajustó a entre 2000 y 2700 V. La temperatura de fuente era de 100°C.

El sistema de HPLC era un CapLC (Micromass) que usaba una válvula de diez orificios que permite la desalación en línea. El cartucho de inmovilización era un C18 Symmetry (5 x 0,3 mm - 5 µm - 300 Å) (Waters) que funcionaba a 10 µl/min con metanol al 1% v/v y TFA al 0,1% v/v en agua. Después de 8 min se conectó la válvula de diez orificios. Las columnas analíticas eran Atlantis C18 (150 x 0,075 mm - 3 µm - 100 Å) (Waters). Se hicieron funcionar a 250 nl/min a temperatura ambiente. Un gradiente de AB se procesó desde B al 5 hasta al 40% en 30 min. El eluyente A era ácido fórmico al 0,1% v/v y acetonitrilo al 2% v/v en agua. El eluyente B era ácido fórmico al 0,1% v/v y agua al 5% v/v en acetonitrilo. El tiempo de equilibrio después de la elución del gradiente era de 20 min.

Búsqueda de bases de datos de secuencias de proteínas

Las masas máximas extraídas de los espectros de EM/EM por electronebulización usando la macro PeptideAuto se usaron para la identificación de proteínas usando el programa informático Mascot 1.9 (Matrix Science). La interrogación se realizó contra la base de datos de secuencias de proteínas de *Bordetella parapertussis* cepa 12822 (4185 entradas de secuencia) descargada de la página web del Instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk>). Las tolerancias de masa permitidas en los iones precursores y fragmento eran de 0,25 Da. Sólo se tuvieron en cuenta proteínas para las que se identificaron tres péptidos tripticos.

Resultados

El alineamiento de las transferencias de Western y los geles teñidos con Coomassie correspondientes para los dos sistemas de tampón de procesamiento usados se presenta en las Figuras 5 y 6. Las bandas de gel de OMP de *B. parapertussis* detectadas mediante transferencia de Western usando sueros generados contra *B. pertussis* (DTPw) se escindieron del gel. Se añadió tripsina y los péptidos se extrajeron por elución de las bandas de gel como se describe en la sección de Materiales y Procedimientos. Los péptidos hidrolizados con tripsina de cada banda se sometieron a cromatografía por nanoCL y se secuenciaron mediante EM/EM. Los datos de secuencia de EM/EM se usaron para

ES 2 346 314 T3

realizar una búsqueda contra la base de datos de secuencias proteicas de *B. paraptussis*. Los éxitos se evaluaron manualmente para determinar sus puntuaciones, intensidad iónica y número de péptidos tripsicos emparejados. La identificación de bandas de gel se resume en la Tabla 7.

Para 6 bandas de gel de MOPS y sus equivalentes de MES, se identificaron cuatro proteínas de membrana:

- i) bandas N° 8 (MOPS) y N° 14 (MES): autotransportador (gen de BPP0452);
- ii) bandas N° 9 (MOPS) y N° 15 (MES): receptor dependiente de TonB para transporte de hierro (gen de BPP3376 o BFRD);
- iii) bandas N° 12 (MOPS): proteína porina de membrana externa (gen de BPP3392);
- iv) bandas N° 13 (MOPS) y N° 18 (MES): proteína A de membrana externa (gen de BPP3135 u OMPA).

La identificación de la proteína autotransportadora (BPP0452- PM teórico = 177 kDa) en bandas de gel a aproximadamente 60 kDa podía asignarse provisionalmente a un fragmento proteolítico o a otras proteínas autotransportadoras que presenten un alto nivel de homología. Esta proteína es el homólogo de *B. paraptussis* de la SEC ID N°: 50, que comparte una identidad del 94%.

El receptor dependiente de TonB para transporte de hierro (BPP3376) es el homólogo de *B. paraptussis* de la SEC ID N°: 14, que comparte una identidad del 98%.

Se identificó una proteína chaperonina citoplasmática para las bandas de gel N° 10 (MOPS) y N° 16 (MES) que podría estar asociada con una contaminación de la fracción de membrana externa durante el procesamiento de la muestra.

Conclusión

El procedimiento identificó varios antígenos que generan una respuesta inmune que presenta reactividad cruzada entre *B. pertussis* y *B. paraptussis*. Las proteínas codificadas por las SEC ID N°: 50, 100, 14, 106, 108, 110, 102 y 104 son dichas proteínas. Las proteínas identificadas aisladas de *B. pertussis* o *B. paraptussis* podían incorporarse provechosamente en una vacuna acelular para proporcionar protección frente a enfermedad tanto por *B. pertussis* como por *B. paraptussis*.

TABLA 7

Banda de gel (tampón de procesamiento)	Éxito N° (Puntuación ^a)	Descripción de proteína (PM Teórico en Da)	N° péptidos emparejados	Gen
N° 8 (MOPS)	1 (821)	autotransportador (176978)	15	BPP0452
	2 (55)	factor de inicio de la traducción (103481)	3	BPP1862
N° 14 (MES)	1 (S99)	autotransportador (176978)	16	BPP0452
	2(112)	proteína A de membrana externa (20985)	3	BPP3135
N° 9 (MOPS)	1 (229)	Receptor dependiente de TonB para transporte de hierro (81321)	7	BPP3376 o BFRD
	2 (174)	polirribonucleótido nucleotidiltransferasa (77294)	4	BPP3431
	3(123)	probable antígeno de superficie (86290)	4	BPP1535

ES 2 346 314 T3

Banda de gel (tampón de procesamiento)	Éxito Nº (Puntuación ^a)	Descripción de proteína (PM Teórico en Da)	Nº péptidos emparejados	Gen
Nº 15 (MES)	1 (314)	Receptor dependiente de <i>TonB</i> para transporte de hierro (81321)	8	BPP3376 o BFRD
	2 (229)	polirribonucleótido nucleotidiltransferasa (77294)	7	BPP3431
Nº 10 (MOPS)	1 (938)	<i>chaperonina</i> (57447)	27	BPP0868
Nº 16 (MES)	1 (621)	<i>chaperonina</i> (57447)	16	BPP0868
Nº 11 (MOPS)	1 (446)	<i>autotransportador</i> (176978)	10	BPP0452
	2 (288)	factor de elongación (42889)	6	BPP0007
Nº 17 (MES)	1 (388)	<i>autotransportador</i> (176978)	8	BPP0452
	2 (271)	factor de elongación (42889)	6	BPP0007
	3 (112)	supuesta proteína de membrana (47410)	3	BPP2847
	4 (98)	enolasa (45885)	3	BPP3252
Nº 12 (MOPS)	1 (528)	<i>proteína porina de membrana externa</i> (41319)	18	BPP3392
Nº 13 (MOPS)	1 (209)	<i>proteína A de membrana externa</i> (20985)	6	BPP3135 u OMPA
	2(151)	proteína porina de membrana externa (41319)	5	BPP3392
Nº 18 (MES)	1 (196)	<i>proteína A de membrana externa</i> (20985)	6	BPP3135 u OMPA

Puntuación^a – El algoritmo de puntuación MOWSE se describe en DJC Pappin y col Curr. Biol., 3(6); 327-32(1993).

Materiales depositados

Un depósito de la cepa 3 (cepa 3224A) se ha depositado en la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC) el 5 de mayo de 2000 y se le ha asignado el número de depósito PTA-1816.

El depósito *B. pertussis*_cepa se denomina en el presente documento “la cepa depositada” o “el ADN de la cepa depositada”.

La cepa depositada contiene un gen de BASB232 de longitud completa.

La secuencia de los polinucleótidos contenidos en la cepa depositada, así como la secuencia de aminoácidos de cualquier polipéptido codificado por los mismos, son determinantes en el caso de cualquier conflicto con cualquier descripción de secuencias del presente documento.

El depósito de la cepa depositada se ha realizado bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes. La cepa depositada se liberará irrevocablemente y sin restricciones o condiciones al público tras la expedición de una patente. La cepa depositadas se proporciona simplemente por comodidad para los expertos en la técnica y no es una admisión de que sea necesario un depósito para su habilitación, tal como el necesario de acuerdo con la norma 35 U.S.C. §112. Puede ser necesaria una autorización para generar, usar o comercializar la cepa depositada y compuestos derivados a partir de la misma, y no se concede dicha autorización por la presente.

ES 2 346 314 T3

Información de secuencia

Secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas de BASB232

5 El grupo de SEC 1 contiene las SEC ID N°: 33, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 35, 27, 29, 31, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95 y 97. El Grupo SEC 2 contiene las SEC ID N°: 34, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96 y 98.

10 SEC ID N°: 1 secuencia polinucleotídica de la Orf1

Atgtccaccccccgattcgcgctgcattacgccagcgcgctcagtcctgctggccgcgcatcc
 Ggcctggccatggcgagacggccacccagatccacgatccgtcgaggtgcagcagatg
 15 Ggcagcgggtgcaggtgctgggcacggccgaagaggaaatcaaggagtcgctgggctctcg
 gtcattcacccgcccaggagatcgcccgcgcccgcacccaatgacctgtccgacctgatc
 cgccgcgaacccggcgctcaacctgacgggcaacagcgccagcgggcgcgggggcaacagc
 cgccaggtcgacatccgcgcatgggcccgcgagaacacctcatcctgatcgacggcaag
 cccgtcacctcgcgcaatcgcggtgcgctatggctggaacggcgacccgggacacgcgcggg
 20 gacaccaactgggtgcccgcgcgaggaagtgcgagcgcatcgaagtgatccgcgggcccgcc
 gccgcccgtacgggtccggggccatgggcggcggtggtcaacatcatcaccaagcgcccc
 gccgatcgcgccaccgggtccatcacctactacacgaaccagccggaagacagccgcgag
 ggcaacaccaacccgctcaatgcgcgcatcagcgcgccgatcagcgacacgctgagcatg
 cggtgtacggcaactacaacaagaccaatccggatgcccgcgacatcaacgcccggccac
 25 gcgaacaccagcgacaacggcaacccctcgaccgcccggacgcgagggcgctcatcaaccag
 gacctgagcgcgctgttctcggtggaagccgacagccacaacacctggacctggacatg
 ggcttcagccggcagggcaacctgttcgcccggcagaccatgaacaacgccaacagcgac
 ttctcggaacagcctgtacggcaaggaaaccaatcgcatgtaccgcgagaactatgcgctg
 acgcacccggcgctctacgactggggcacctcgcgccgagcgctcggtatgactacacg
 30 cgcaacgcgcgcgcagcggaaggcctggccggcgcccccagggcgcgcccaaccggggc
 ggctacgacacccgcgcgctgaagaactggcgcgcccgccgagggccagcgtgccgttc
 catctcggtttcgagcaggtcgccacggctcgcggtggaatggctgcgcgaatcgctggaa
 gaccccgccggcagcgccagacctataccggcgcgccatcggcggcagggcccccggcc
 gaccgcgacccgaaatcgcgccagaccagctatcgcgctgttcgcccaggacaacatcgag
 35 atcgacgagcgcaccatgctcagccccggcgctgcgctggaccacaacagcgaattcgcc
 agcaactggagtcacagcctgaacgcctcgtaacgcctcaccgacgcgctcaagctcaag
 ggtggcatcgcgcgcgctacaaggcgcccaacctctaccaatccaaccaccaactacgt
 ctgtacagccgcggaatggctgcctggcctcgagaccaacaccaacggctgctatctg
 gtcggaacagaggacctctcgccggaaaccagcgtcaacaaggaaatcggttcgagtac
 40 gaccggggcacgtggcgacacagcatggcctatttcgcaacgactaccgcaacaagatc
 gtccgcccgcacagcgtccagtaccgctggccaatggcgcccggtgctgcaatggacc
 aacagcggcaaggccgctggtcgaagggtggaaggcaacctgttcattccgctggccagc
 aatctcgactggaacaccaacttcacctacatgatccagtcgaaggaaaaggctaccggc
 gaaccttgagcgtgattccgaatacaccatcaacagcagcgtggactggttctacacg
 45 ccgcagctgtcggttcaggccaatctcacctatacggcaagcaggaaggcccgctccacc
 aatgtacgcacccggcgctgaactgaacggcgacggccgagaccatcagtcggatgccc
 ctggcgggcctgagcatgggtacgaagtcaaccggaacctgaagtccgcgctcggcgtg
 agcaacctgttcgacaagcagctgtaccgcgaaggcaatgccagcagcgcgggcgcgcc
 acctacaacgaacggggcgcgctattacgccacggcgacgggtgtcgttctga

50 SEC ID N°: 2 secuencia polipeptídica de la Orf 1

MSTPRFALHYASASVLLAASGLAMAQTATQIHDP SQVQMATVQVLGTAE E E I KESLGVS
 55 VITAE E IARRPPTNDLSDLIRREPGVNLTGNSASGARGNSRQVDIRGMGPENTLILIDGK
 PVTSRNAVRYGWNDRDTRGDTNWVPAEEVERIEVIRGPAAARYGSGAMGGVVNIITKRP
 ADRTGSIITYTNQPEDSREGNTNRVNARISAPISDTLSMRLYGNYNKTNPDARDINAGH
 ANTS DNGNPSTAGREGVINQDLSALFSWKADSHNTVDLDMGFSRQGNLFAGDTMNNANS
 FSDSLYGKETNAMYRENYALTHRGVYDWGTSRASVG YDYTRNARQREGLAGGPEGAPTAG
 60 GYD TARLKNWRAAEASVPFHLGF EQVATVGV EWLRESLEDPA GTRQTYTGGAIGGTAPA
 DRDPKSRQTSYALFAEDNIEIDERTMLTPGVRLDHNSEFGSNWSPSLNASYAVTDALKLK
 GGIARAYKAPNLYQSNPNYLLYSRNGCLASQTNTNGCYLVGNEDLSPETS VNKEIGFEY
 DPGTWRTSMAYFRNDYRNKIVAGTDVQYRLANGARVLQWNTNSGKAVVEGLEGNLFIPLAS
 NLDWNTNFTYMIQSKEKATGEPLSVIPEY TINSTLDWFYTPQLSFQANLTYYGKQEGPST
 65 NVRTGVELNGDGRQTI SPYALAGLSMGYEVNRNLKFRVGVSNLFDKQLYREGNASSAGAA
 TYNEPGRAYYATATVSP

ES 2 346 314 T3

SEC ID Nº: 3 secuencia polinucleotídica de la Orf2

5 Gtgttttctcgagtcagaagcatccgtcctggcgccctgtcgccatgcgtaacttggggcc
 Gccttgtgcccgtcgcggtcggttagcgcggaacccggccgagcgagggcgcccgccg
 Agcgcccagcattatgaaatcgcgccggaccgctggcgacgcactgacccgcttcgcg
 cgcggtgcccggcggtggtgctgctgcttcgacccggccctgggtgcagggcgcgacggcg
 ggccgtgcagggcggtgacggcggtgcgcgacgggttcgcgcgctgctggccggctcgggc
 ctgcagggcgcgccggcgcggaacaactggtcgctggcgggcgctgccgcgcgggcg
 10 gatgcgcagacgctggcgccggtgacgggtgctgggctggagggcgcgctggcgccacg
 gtcggctatgtcgccagtgccagcctgagcggcaccaagaccgatacgccgctgatcgaa
 acgcccgaatcgatttcggtggtgactcgcgaccagataaaccgagcagggcgccagacg
 ctgaaccaggtgctgctgctataccgcccggcggtggcgaccgagacgcgcggcgacggcg
 acgcggtcgaccagttcagcggtgcgcgggtttctcgccgccacctaactggaacggcatg
 15 cgctgttcggcgccgggaacgcttgcggcggtcgacgcctaccggctcgaaacgggtc
 gatgtgctcaagggcgcggttcggtgctgctatggccagggcgccggcgcggtggtc
 aaccaggtcagcaagcgtccctggacgagccttcgcgcgagatcgaaagtgcagcgggc
 aatttcgatttcggcggggtcaacatggatttttcggcccggtggacgaggacggcg
 ttctgtaccgggtaaccggcgcggtcctatgtcgatggccaggtggatcacaccagg
 20 gagegcgctacttcgtctcgccgctggttcacgtggcgcccgagcgcggtaccacgctg
 accgtgctgaccaacttcagcgcgaccccgacatgggttcgtacggatcgatctcgcc
 atgcgcacgctgctgctcggcgcccgcagcgagcggtgggcccgaaccactacgacggc
 agcgccgatttcgaaaagagcgacgcgcgagctattcgctgggctatcaactggagcat
 cgcttcaacgataccttcaggcctcgacagaacctgcgttcacagcatgcccagggcgctc
 25 tatecgagcatctacggcgccagcaacaacaattacggctatctcgacaaggactaccgc
 tactcgacgcgccgctggccatcagcgacgtggacgtggatgcgttcacgatacgacaac
 aacctgcagggcgcttcgataccggggcgctggcgcatacggtgctggtggggttcgac
 taccagcgctgcagaccgacaccttgcgggctatggcagcgcgcccgctcgacgtg
 ttcgatccggactatcacatgggtatcgagcgcccgccgtttacgtccgatcagacccag
 30 tacaactaccagaccggcctctacctgcaggaccagatcaggtggatcgccgtgctg
 ctgctggcgggcgctacgactggtcgcgcccccacacgggcaccgacaacctggccaac
 ggctcgacacgagcgtcgcgctcgcccgccgagcggttcaccggcggggtcgggcgatc
 tacaacttcgacaacggcggtggcgccgtacgccagctactcgaggtcgttcgagccgag
 accggcacggggtggaacaacacgcccgttcaagccgacccaagggaagcagatgaggtc
 35 ggcgtaaataccagccgcccgggtcgggccacgctgctcagctggcgcccttcgacatc
 ggcgcaagaacctgccaccgacccgacccggtatccacccatattgctggcggttcgccc
 tgctcgatacagggcgggcggaagtgcgcaccccgggcatogaactggaggccaagaccgaa
 ccgctgcgcggcgctgagcctgatcgccgctattcgtacctcgacaacgaatacgagaag
 40 gcctatccgaacacgaccgggttggaacctcaagggcaagaagccggtggccgtgcggcg
 caccagggcgctggcgctggggccgctatcaactgcaggagggcccgctggccggcctggg
 atggcgcggggggtgctgctacatcggcagttcgtacgccaacgaaaccaacacgctcaag
 gtgcatcggtgacgctggtggacatgatgctcgactacgacctgggcccggcgccagccc
 45 gcgctcaagggcgatgcaggtggcggtgaacgtctcaacctgttcgacaagggaatacatc
 ggctcgctgctgctcgatctggtgctggtatggctaccagcgctcgatcaaggccagc

45

ttgcgctatcgctgggtga

50

SEC ID Nº: 4 secuencia polipeptídica de la Orf2

55 VFSRSQKHPSWRLSPCVLAAALCAVAVGSADTARAQAPAASAQHYEIAAGPLADALTRFA
 RRAGVVLSPDPALVQGRSTAGLQGVYGVVDGFAALLAGSGLQARAGGGNNWSLAALPRGG
 DAQTLAPVTVLLEGALAPTVGYVASASLSGTKTDTPLIETPQSI SVVTRDQITEQGAQT
 60 LNQVLRITAGVATETRGATATRLDQFSVRGFSAAATYLDGMRVFGGRDALPQVDAYRLERV
 DVLKGPASVLYGQGGPGGVVNQVSKRPLDEPLREIEVQAGNDFRRVNMDFSGPVDEDRR
 FLYRVTGAAYMSDGQVDHTRERRYFVSPSFTWRPSADTTTLVLTNFORDPDMGSYGSISA
 MRTLLSAPDGRRLGPNHYDGDADFEKSDRRSYSLSGYQLEHRFNDTFKASQNLRFQHAEGV
 YRSIYGASNNNYGLDKDYRSQRLAISDVVDVAFTIDNNLQARFDTGALAHTVLVGFD
 65 YQRVQDTLSGYGSAPPLDVFDPDYHMGIERPPFTSDQTQYNYQTGLYLQDQIRLDRSL
 LLGGRYDWSRTHGTDNLANGSHSSSALAAEAPTGRVGAIYNFNGVAPYASYSESFEPO
 TGTGWNNTPFKPTGKQYEVGVKYQPPGSATLLTLAAFDIRKKNLPTDPDPHMCVSR
 CSIQAGEVTRTGIIEAKTEPLRGLSLIAAYSYLDNEYEKAYPNTTGLDLKGKKPVAVPA
 HQASAWARYQLQEGPLAGLGMGAGVRYIGSSYANETNTLKVPSTLVDMMLDYDLGRASP
 ALKGMQVALNVSNFLDKEYIGSCLSDSWCWYGYQRSIKASLRWR

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 5 secuencia polinucleotídica de la Orf3

5 Atgcgagccagaccgagcgcgccgaacccgcgcctgcactcatcgtegcgccccgcgcg
 Ctgatccctgccctgctgggcgcgcttgccctgcctgggcactggcgtagaggccgcgcgc
 Atcgacgtcgatatcccgcccccagaacctggcccaagccctgcaccagcttggccggcaa
 gccaacctgcaggtcctgtacagccaggacctggtegatggccagcgagccccgcgctg
 cagggccgcatggaacctgccgaagcgctggaacgcctgctgaaaggccgcaacatccgc
 10 tattcgatccagcacaacacgtcacgctcacgcccattgccgctgactgcgacgctgccg
 gcaatcagcgtggtcggcgccctgctgactccgacacctacgtggccacaggcacgaca
 gccggcaccagaagcggacacgcgcgtgatcgaaataccgcaatccatttcggtggtgac
 gccgcgcagatccgcgagcagaatccgcgacgcctggcgacgcgcgtgcgctacacgccc
 ggtatcgtggtgcaggaaggattcaaccgcacccagcagatcctttcatcatccgcggcttc
 gacgtccgcaccaatcccgcgctcatgttcgcgacgggctgaaaatccccctgcccctat
 15 tacagcgcgatgtccgaacctacgcgctcgaacgcacgaggtcgtgaaaggccccgct
 tcggtgctgtacggacaggcctcccgaggcgccatcgtcaacgtggtatccaagcgccg
 acagacagcccgctgcgcgagctgcagctgagcggcggtccgcacagcaacaggcagctc
 gccggcgacttcggcggaacgcacgcagcagggagggctgacctaccgcctgacgggc
 ctggcgcgcaatgccgacacgatgatcgacctgtcccgacgacccgctactatctcgcc
 20 cccgcgctgacctggcgcatcagcccgacacctcgctgacgctgctggcgagctacatg
 aagaacaagaccatcaacaacgcggctacccgctcgaaggcagcgtcaagtacaacccc
 aacggccgcatcccgctcacgcttcacccggcagccgactggagcaagtgggaccag
 gaggtcgcaacgtgggtaccagtttgccgacccgctcaacgacacctggcaattcaag
 cagaacctgggtacgcccagtccgcgaacccgctcaaccacgcctactggtggacctgg
 25 gtgcccgggaagcgacttctccacggccgagcgcgccgctaccgcgcgacgatgacgcc
 cagggcgtgagcatcgacaaccagttcgaggccacgtggcaatccggccgcttcaggcac
 aacacgctgttcggcctcgattacaccgaaacctcgttcaccgcgcaaacagtagcgcggc
 tacaacaacctccgcccgatcgacttcttcgatccggcgtacggctcggacgtactgctg
 ccggcgaagccggacacctacaccaacgagaagcgcagccagctcggcctgtacttgacg
 30 gaccagataaagttcgacgacaaactggtggtggtgctcagcggccgctacgacaatgcc
 gacggctcgacgctgaacaagctgagcggcgtcaatacccgccacccggcgacaacgcgttc
 acgtggcgccacggcctgctctaccttgccgacaacggctcggcgccctataccagctat
 tcgacttcgttcagcgcgagccggcaccacctcgcccgacgcggcaccacgcttc
 gaccgcaccaagggcagcgtgggaagccggcgtgaagtaccagcccaatggttcgaac
 35 tcggttcacaccgcacccgtcttcgagctgacgcgcaccaacgtccccacgacccgccc
 gccaaccccgctctacagcgtgcaggaaggcgaggtgcgctcgcgccgctcgaattgctcg
 gccaccgcgaacctggcctcgggctggaacctgatccggcgctacacgtataccgacgcg
 gaaatcaccgaagagcaactccaacacgctaggcaacacgcccagggcgtgcccgcgcaac
 atggcgctcgctatggtccgactacaccgtcccgctccggtgcgctggcgggctgaatatc
 40 ggcgcggcgctgcgctacatgggctcgacctacaacaacaccaatgcccgcaaggtcggc
 gactacaccgtgttcgacgcgcctgcgctacgacttcggggcgcgacccgctccctg

 aaaggctggacggccgatctcaccgtgcgcaacctgttcgacaaggactacgtggcctcg
 tgcacctagcctgcttctacggagaaggcaggaccgtgctgggcccgggtcacgtacaaa
 45 tggtag

SEC ID N°: 6 secuencia polipeptídica de la Orf3

50 MRARPSAATRALHSSSRPRRLIPALLGALACLGTGVQAAPIDVDIPPQNLAQALHQLGRQ
 ANLQVLYSQDLVDGQRSPAVQGRMEPAEALERLLKGRNIRYSIQHNTVTLTPMPLTATLP
 AISVVGALPDSPTYVATGTTAGTKTDTPLIEIPQISVVTAAQIREQNPQTLGDVRYTTP
 GIVVQEGFNRTDDPFIIRGFDVRTNPGVMFRDGLKIPLPHYSAMSEPYALERIEVVKGPA
 55 SVLYGQASPGGIVNVVSKRPTDSPLRQLSGGSHSNRQLAGDFGGRIDDEGRILTYRLTG
 LARNADTMIDHVPDDRYLLAPALTWRI SPDTSLTLLASYMKNKTINNAGYPLEGTVKYNP
 NGRI PRHRFTGEPDWSKWDQEVANVGYPFAHRFNDTWQFKQNLGYAQRNRNVNHAYWWT
 VPGSDFSTAERGAYRRDDAHGVSIDNQFEATWQSGFRHNTLFGLDYTTETSFTRKQYAG
 YNNLAPIDFFDPAYGSDVLLPAKPDYTTNEKRSQGLYLQDQIKFDDKLVVVLSGRYDNA
 60 DGSITLNKLSGVNTRTGDNAFTWRITGLLYLADNGLAPYTSYSTSFQPPAGTTPARGTTTF
 DPTKGKQWEAGVKYQPNGSNSFITASVFELTRTNVPTTDPANPVYSVQEGEVRSRGLLS
 ATANLASGWNLIAAYTYTDAEITKSNSTLGNTPAVPRNMASLWSDYTVPSGALAGLNI
 GAGVRYMGSTYNNITNAKVGDYTVFDAALRYDFGARSPSLKGWTADLTVRNLFDKDYVAS
 65 CTYACFYGEGRITVLGRVITYKW

ES 2 346 314 T3

SEC ID Nº: 7 secuencia polinucleotídica de la Orf4

5 Atgacaggetttcatgcacgcaagccgggtggcggtggccatggccggcccgcgacggc
 Aggcgcttgcgtggcgcgcatccccctacggacaaccaccatgaagccattaccgctc
 Gcttatctcgccgctgctgccctggtacgcaggcgtcatccaggcgcaatccgcgccc
 gccgcggcgacgatgectcgatcaccctggaagccgtcagggtcgaggccagcgccgac
 gcctccgcggcgccctggcgccggccttcgcgggcgccaggtcgccacggggcggaag
 10 gtcggcattctcggcacgcgcgacaacctggaaaccccgctctccatcaccgcctacacc
 aacgaactgatccaggacggccaggccaagggggtggcgacgtcctgcagaacgacccc
 ggcgctgcgggtggcgcggggttcggcaacttcaggagtcgtatttcacccgcgcttc
 atcctcagctcggacgacatcgcgtaaacggcctctatggcctgttgccgcgccaagtac
 atctcgaccagctgttcgagcgcgctcgagggtgctgcgcgggtgcctcggcgcttctcacc
 15 ggcgcgccgcgctcgggcgggcggtatcgcggggtgatcaacctggttcccaagcgcgcg
 cccaacgagccgctgacgcgcttttcggccggctacggcagcgacagcggtgctcgaggct
 tcggcgacatcgccggcgcttcggcccggaagacagcgctcgggatccgcatcaacgcc
 gccagcgcgggcgagacggccatcgacggcgagcgccaccgcaccaagggtgttcgog
 ctgggcctggactggcgcgggcgagcgcgcgccgttcggcgcatatcggtaccaggac
 20 aaccgcctgaagcgggcgcccccaatgtcacgctggcgcggaagcgcccaagggtgcc
 ggcgcgccgacggcggctccaactatgcccagccctggtcgtactccaacgaacgcgac
 gtgttcggcacccctgcgcggcggaatacgacttcaacggcgcgataacgggctgggtcgcc
 tatggcatgcgccagagcaaggaggagaactcgctggccaacctcaataacgtcaacggc
 gcgggcgagggaagttctaccgcttcgacaacgcgccgaggtatccgtcaacacgggc
 25 gagatcgccctgcgcgccaaggcgcgacccggcccggtgggccaagaaactggctcgccctcg
 gcgctcgtatttcgacctcgagaagaagaacgcctatgtcatggacttcttcaaccagttc
 gacaccagcatctacgaccccgctcagctacgccaagcgggccatcagcagcaccgcgttc
 cgcggaacgacatggaagatcccgccaagcagggcgctcatccggctggccagctatcg
 ctggcgacacacatgtcgttcttcgacgacaagggtgctgctgacgcggcgcatccgccac
 30 cagcgctctaccagcgcgactacagctacgacacgggcacatcgcgggcaccacctacgag
 caaagccacaactcgcccgccgcccgtggtggtgcgcgtgacgccccagggtgtcgtc
 tacgccaactacatcgaggccctgtcgcgggcgacaccgcgcccagacggccaacggc
 ctgcccgtggtcaaccaaggcggaatcgctggcgccctatgtgtccaagcagaaggaagt
 ggctcgaagttcgagcacgacggcctggcgggcgccctggcgctcttttccaccgacaag
 35 ccgcgcggttcgtggggcgatgaccaggtcttcgcgcttcgggcaaggacggcaccgc
 ggggtcgaactgacgacttacggcgagctcacgcgcagcgctgcgcgtgctggcggggtg
 acctgggtggagcccaagcagctcagcaccggcaacgcggccaccgacggcaagcgcgct
 atcggcgtgccccgcttcacaggccaacctcggcgtggagtgggacatccccggcggtgac
 40 ggctgacggtggacggcggtgtggtctatcggggtcgtcctatcgggatgcccgaac
 acctcgagggtgcccgggtggacgcgcctggacgcggcgctgcttacatgaccgatatc

 ggcgggccatctggtgacctggcgcgcccgctcgagaacatcgccaaccgcgactactgg
 45 tctccgtggcggtaccccggaatggctacctggtgctggcgggcccgcgaccttc
 acgctgtcgccatcgatggagttctga

SEC ID Nº: 8 secuencia polipeptídica de la Orf4

50 MTGFHARKPVGGGHRPAHGRPLAWPRIPLRTTTMKPLPLAYLAALLPWYAGVIOQASAP
 AAGDDASITLEAVRVEASADASAGGLAPAFAGGQVATGAKVGILGTRDNLETFFSITAYT
 NELIQDRQAKGVGDVLQNDPGVRVARGFGNFQESYFIRGFISSDDIAYNGLYGLLPRQY
 55 ISTQLFERVEVLRGASAFITGAPPSGGGIGGVINLVKRAPNEPLTRFSAGYGSDSVLEA
 SADIGRRFGPDSSVGIRINAAQRGGETAIDGERTRTTVFALGLDWRGERARLSADIGYQD
 NRLKRARPNTLAGDAAKVPGAPDAGSNYAQPWSYSNERDVFGTLRGEYDFNGRITGWVA
 YGMRQSKEENSLANLNNVNGAGQGKFYRFDNAREDTVNTGEIGLRAKARTGVPVHELVAS
 ASYFDLEKKNAYVMDFFNQFDTSIYDPVSYAKPAISSSTAFRGNDMDPAKQGVIRLASA
 60 LGDTMSFFDDKVLITAGIRHQRLYQRDYSYDTGIGGTPYEQSHNSPAAGLVVRVTPQVSL
 YANYIEALSAGDTAPQTANGLPVVNHGESLAPVYSKQKEVGKFEHDLGGGLALFSTDK
 PRGFVGGDDQVFRASGKDRHRGVELTTYGELTRSVRVLGGLTWLDAKQLSTGNAATDGKRV
 IGVPRFQANLGVWDIPGVQGLTVDGRVVYTGSSYADAANTLEVPGWTRLDAGLRYMTDI
 65 GGHLVTWRARVENIANRDYWSSVGGYPNGYLVGGPRTFTLSASMEF

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 9 secuencia polinucleotídica de la Orf5

5 Gtgccctcgtcctacttcccgcggtacgcgcgcctgcgcgcggcagggcgcagcccgccctt
Gtgcccgcgctcttcatgcttgccctgggcgcgcgttgccgcgcggcgcgcgcgcgcagccc
Gctgcggcggggtgtcccggtacgcaaggcgtggcgcaaatgcgggcgcgtcacggtcaac
Gccgcgcgggtggacgacacgctggagcatctggaggcgcgcggtcgataccggcgcgctg
Ggacggcgcaaccagctggagacgcctttttccaccacgggtggtgactgcccgcgacatg
10 Gaggagcgccaggtcaacaagctgggagacgtgttcgcgctggatgcctcggtgacggac
Aacagcgcgctcctatggcgcggtgggacagctacctgacgggtgcgcgcgcctgcgcgtggat
Tggcagaattcgtaccgcatcgatggccgcgcgttcctgagctacgtcacgacgctgcgc
Ttcgagcacttcgagcagatcgacctgctcaaggggcgctcggtctcatgtacgggttc
Ggctgcggggcgccctggtcaactatgtaccaagaagccgaccgacgaagcgggtgcgc
15 Agcgctcgagctgggctacgtgtccaagggttgctgcgcgagcacgtggacctgggcggc
Aggggtgggcccagagcggcgcgcttggtatcggtgaatgccacgcacgaggagggaat
Acctacaacgggtggatcgctgtaccgcgattcggtgtcgctggcgctggatgcgcgcctg
Agcgaccgggtgacctgggacttccaatccatctaccaggaccgcaaggccatcgggcag
Gagcccacgatctatgcgggcacatggccgcgcagcaggttgccatgcgcgggtgcgcaac
Gacaatgacaggtggtcgggcagggacgctatgcggacaatgcgttcgctattactcg
20 Accggcttgaagtaccaattggcggacgaatggacgctgagcaccgaattacagctacagc
Tccacgcgtaccgcgcgcaacgagtcggtgctgttcctgcgcgaccaggcgggcgactat
Gacgattaccgctcggactatggcgaggcctatggctacaaccagtggcaggccatgctg
Gagggcaagttcgctaccgggtcccttgaagcaccacgtggtggccggcgcgctcggtggcag
Aagcagaagaacgactacagcgccaaacggggtctatcaattgcagggcaacgggcaacctg
25 Cgcgcgcgcaataccaacacgtactacagcgaaggccagctgcacctgtaccgcgcggcc
Gagatcacgcagaaggcgctgttcgccagcgacacggctcgacctgaccggcggtggtcg
Gtgcgtgggcgggctgcgtatacgaattatgcgcgcaaggattcgatgccacgggcgcg
Cgaacatcgcgctacgacaagaacggcgctgctgacgcgcgaccttgccctgatgtacaag
Ctgacgcgcgcgaccatggcctatgccagctacatcgatccttgaggccgggctcgctcg
30 Gtgggcgcgcgctacgccaacttcggcgcatgctcgatccgttgaagagcaagcagtac
Gagctgggcatcaagaccgaacaggacggctgggcgcgcacggcgcgctgttccgcatc
Gagaagaaggcggaatacgcgaatgccgccaacgagctggtgcaggacggcaagacgctc
Tatcaggggttggaactgggcgcctccacgcgtatcgcccgcgactggaaacgtgggagggc
Agcctgatgttgctggattcggaatacaagaaggctcggtttcaccggcaaccgcgctg
35 Gcgggagcgccgaagtccgtggcgccgcgcaactggcgctactcggtgcgcgaggtgccg
Gggctgaagctgcgcgcgcatgtgaagtacaccggcaacacgatgctgggcgcgcaaac
Cgggtgcaggtggacgactacgccatcgctcaatatcggcgccacctacgacacgcagatc
Cacggctacgaggcgaccttcaccgcgcggcatcaacaacgtggccaacaagcgctactgg
Ctctaccagctcgctgactacgtgaaggcgggcgaccccgcgacctatggcctgacgctc
40 atatccagatatccgatatactggatataa

SEC ID N°: 10 secuencia polipeptídica de la Orf5

45 VPRPTSRRTRPARRQAQPAFVPALFMLALGAVAAGARAQPAAGVDPDTQGVAQMPAVTVN
AAPVDDTLEHLEAPVDTGALGRRRTQLETFFSTTVVTARDMEERQVNKLGDVFDASVTD
NSASYGAWASYLTVRGLPLDWQNSYRIDGRPFSLSYVTTLPFEHFEQIDLLKGASGFMYGF
50 GSPGGLVNYVTKKPTDEAVRSVELGYVSKGLLREHVDLGGRVQSGAFGYRLNATHEEGN
TYNGGSLYRDSVSLALDARLSDRLTWDFQSIYQDRKAIGQEPTIYAGTMAGSELPSVVRN
DNDRLVGQGPYADNAFRYYSTGLKYQLADEWTLSTNYSYSSTRTRRNESVLFRLDQAGDY
DDYRSDYGEAYGYNQWQAMLEGKFATGPLKHHVVAGASWQKQKNDYSANGVYQLQGTGNL
RARNNTNTYYSEGQLHLHYRAAEITQKALFASDTVDTLGGWSVLGGLRYTNYAQQGFDTGA
55 RTSRYDKNGVLTPTTFALMYKLTPTMAYASYIESLEPGSSVGAAAYANFGALLDPLKSKQY
ELGIKTEQDGAATAALFRIEKKAEYANAANELVQDGKTLYQGLELGASTRIARDWNVGG
SLMLLDSEYKKGSDFTGNRVAGAPKFVAAAQLAYSVPQVPLKLRADVKTGNTMLGASN
RVQVDDYAI VNIGATYDTQIHGYEATFTAGINNANKRYWLYQSSDYVKAGDPRTYGLTS
60 ISRYPDIWI

ES 2 346 314 T3

SEC ID Nº: 11 secuencia polinucleotídica de la Orf6

5 Ttgccegccataagcggtcacgggtcgtgagatttccgacctcaccgaggggtacaaacgcc
 Tacacaaccgagggccatgagcacggccacgggctgacactctcgccacgcgaaacacca
 Caatccgtcagtggtggtcaccgcagacagatcgaggatcagggcctcaccgacacccggc
 Gccatcctggcgaccgcgcagggatttccgtcacgcgcagcgacagcaaccgctattca
 Ttctcgcccgcggttcacccatcgacaacttccagtttgacggcctggtatcgcccatc
 Ctgagccaatggaactatggttcgaccgatatggacgcgcgcctctacgatcacgtggaa
 10 Atcgtagctggcgccacaggcctgatgacaggctcgggcaatccttcagccgcccgtgaac
 Ttcgtgcgcaagcgtcccttgctgagttcgcggtacgttcaatgagagtgctcgccagc
 Tgggactatgtgcggcgcgatgcccagatctccgtgcccacacggaagacggcagaata
 Cggtcacgcttggggcgccctacagtacgggcgacagctatgtgcacttttagatacg
 Cgcggcgccacattctatggcggtggtcagcgcgcgatctgacgcgggatacgggtgctgacg
 15 Accagcgtggagtaccagcacaccacagcaatgggtttggcagcggcctttccgctgttc
 Tatagcgacgggttcgcgccaccgatttcaaccgctcgggtggccaaacacgctccctgggccc
 Cggcaggataccgaagccaccacctatttctgtagcctcagcaccgcttcaccaatgac
 Tggaagctgcgcgcggcctatagccacactgatggcgcctatctcatgaaacatgtgtac
 Cggggcggtaccccgatcgccatctggcatcatcgctgccccccctgcattttccaac
 Tacgacggcaacctcgatcgggatgacatccatttttcccttgctccgctcctttcgaggcc
 20 Ttcggcctgcgccacgaagtgccttgggtggatgagcatcgacaaccatagcgacatc
 Cagcgatacgcaatgggtcggaccggccccagccatcggcagcttcttcgactggcgccgc
 Gccacatccaagagcccagctgggcccagacgctgtcgcccgccgacgagctgcccacc
 Aagcagaccggcgctatctgggtcgccgggttgactagccgaacccctgcacctcatc
 25 Gtgggcgacctggagcgactggaaaaccaaacagatgtattttggctcgcgccgcgaa
 Tacaggatcaagaatcagttcaccctatgcccgtctgacctacgacatcaacgacacc
 Tacacggcgtacgccagctatcggagatcttcagccgcagaaacgcgcgcgacaccagc
 Ggcggcattcttccctcccatcaaaagcaagagctatgagctgggtctgaaggcagcctat
 Ctggagggacggctcaatacctccgcccgcctcttcagacggcgaggataacctggcc
 30 Caggctcatccggggtcatccattccgggctttccgaacatgcaggcctcacgtgcccgc
 Tccggcgcccaaggctcgaggggatagacctggaggccagcggccagatcctgcccactgg
 Aacatcggcgcgcagctatacacacttaccaccaaggacgcccagcggaaccccatcaac
 Accaatcatccgcgcagcctgttcaagctctacaccacgtaccgcctgcggggcgccctg
 Caccggcttacgtgggcggcgcgcttgactggcaaagtgcgatgtaccaggccgcagcc
 35 Agtcgcgcgcgcaatgtcgaagtgcgaacaggacagctacgcactcgtgagcctcatggcg
 Cgcttcgactttaacaaaaaactgtcggaacactgaacgtgaacaatctgttcgacaaa
 Aagtactacgatcagatcggtctctacagccaggggtgggtggggtgcgccacgcaatgta
 atgctcaacttcggggcgccagattga

SEC ID Nº: 12 secuencia polipeptídica de la Orf6

45 LPAISVTGREISDLTEGTNAYTTEAMSTATGLTSLPRETPQSVSVVTROQIEDQGLTDTG
 AILATAPGISVTRSDSNRYSFSARGFTIDNFQFDGLVSPILSQWNYGSTMDAAIYDHVE
 IVRGATGLMTGSGNPSAAVNFVRKRPLREFAATFNASVGSWDYVRGDADISVPITEDGRI
 50 RSRLVAAYSQGDSYVHFLDTRRRTFYGVVSADLTPTVLTTSVEYQHNHNSNGFGSGFPLF
 YSDGSRDTFNRSVANNAPWARQDTEATTYFVDLTHRFTNDWKLRAAYSHTDGRYLMKHVY
 RGGYPDRHTGIIAAPPAFSNYDGNLDRDDIHFSLSAPFEAFGLRHEVALGWMSIDNHSDI
 QRYAMVGPAIPAIGSFFDWRRRAHIQEPSWADTLSPADDVRTKQTGAYLVGRFALAEPLHLI
 VGDRWSDWKTQMYFGSRREYRIKNQFTPYAGLTYDINDTYTAYASYTEIFQPQNARDTS
 55 GGILPPIKSKSYELGLKAAYLEGRNLNTSAALFQTRQDNLAQVIPGSSIPGFPMQASRAA
 SGAKVEGIDLEASGQILPDWNI GASYTHFTTKDASGNPINTNHPRSLFKLYTTYRLPGAL
 HRLTVGGGVWDQSRMYQAAASPRGNVEVEQDSYALVSLMARFDFNKKLSATLNVNNLFDK
 KYDQIGFYSGQWWGAPRNVMLNLRAQY

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 13 secuencia polinucleotídica de la Orf7

5 Atgaagttctactcttcccatccgatgcccgagtcgctcgcggtcgcatcgagtgcc
 Ctggtgggctgctgcccggcgccagggcgctccacggcggtccagctgccatccgtc
 Acggtcgagggcgagtagctcctcctatcaaccggaaagcgccagtcgcccagttcacc
 Gcgccctggcgacacgcgcgcacggtgcaggtcatccctgagcggtcatccaggac
 Cagggggccagcgacctcgaagcggtagctgcgcaatgcgccagggatatcgatgaccgcc
 Ggcgaaggcgccgctccggccagcgacctgcttcatccgcggccagaattcggccagc
 10 Agcctttttgtcgacggcctgcgcgatccagcagcgaatcgcgcgataccttcaacctg
 Gaacaggtcgacgtcgtcaaggggcccgtatcggtattttccgggcgcggcgccggc
 Ggaagcatcaacctcgtcaccaagacgcccaggaaccaggatttcaccgaagtccaggcc
 Gggtcgggacggccgagacctaccgagggcccatagacggcaactgggtgctgggagag
 Aacacggcgctgcgcctcaacctgctgggacaccagggaaccggtgccgggcgcgcacaag
 15 Gcggtcgagttcagccgcgtgggtatcgcgccatcgctgcgcctgggctgagcgggccc
 Acccgctgacgtgggctgtaccactatcgccacggcggggttcccgattattcgatt
 Ccgtacgatccgcgcacggcgacgcgatcaccgagaccatcgcgctcagccgcgcgaac
 Ttctacggcctggtagcgcgcgactccggcgataccgaggactacgcccaccgctcaaa
 Tgggagcacgacctcgccaatggcttcaagtgagaaacctggcgcgctactcgcgctgcc
 20 Acggtaggagcagatcaccacatgccgaactgaaaaccgcccgtctggccaaggggctg
 Gtgtaccgcaatctgcgcgcagctaccagggtcaacgacagtttcgccaaccgcaccgac
 Ctgcgcggtagattcgacacggggcgagtgcgccatccttcgatctgggcggggagttc
 Gccaccagccggcgagtcgcgacgcgtacaagcaagaaatcccgcacgcgcgcagtcct
 Tgctcgcccgtagcggaaggcaacaatcccgccctgtgcgcctcgctccgggatccgat
 25 Cgcacgtggatttcccggaacggtagcgcgcaaccataaccggcccgctaccacacc
 Gacatcctgtccctgtacggtttcgacacccatcgcttcgacgagcagtggcagctgaat
 Ctggcctgcgtgggaccactacaagaccagcggaacacctgccggtacgaggcgcc
 Aagccgcccgtctacgagcgtgcgcgcgcacccgacaacctgttcaactaccagctcggc
 Ctgggtctacaagcctcgtccggacggctcggtgtatgcgagttacggcacggcgctccacg
 30 Ccgtcgcccggtgcgactacgccccggcggaacagcatctccggcacaagccagcagctc
 Aagccggagcgagcgaggcgatcgagatcgggaccaagtggcaggtgctggacggcggg
 Ctgtgggtgacggcgccatgttccgcgagacgcgaagaacaccagcatcgagtcgcc
 Gaaggcctgcgcgacaccagccggcaagagccgctcacccggcatggagctgggctggcg
 Ggcagcctgacgcgcgcgtgggagctctacggcggtacgcgctgctcgacagcaagctg
 35 Gtcaggggccagccataagagcggggcgcaaggccagccgctgcccagcgcgccccggcac
 Gcattcagcatctggagcacctacaagctgctgccggaactgacccgtggggcgccggcg
 Ttctatcgacagcaaggtctatggcaacgcagatgccggctacaacaaggacggcacgccc
 Aaggcgcgctgggtgccggcgtagtggcgcttcgacgccatggcgcgctaccagctaac
 Aagcaccttacggcccagttgaacgtctacaacctgctcgacaagacctattacgccaag
 40 Acctaccgcagccattacggcgcgctgggccccggggcggtccgcatgctgacgttcaag
 ctgagctactga

SEC ID N°: 14 secuencia polipeptídica de la Orf7

45 MKFYSSHMPESLAAAIAPLLGLLPAAQAASTAVQLPSVTVEGEYSSYQPESAQSPKFT
 APLADTPRTVQVI PERLIQDQGASDLEAVLRNAPGISMTAGEGGRPASDLPIRGQNSAS
 50 SLFVDGLRDPSTQSRDTFNLEQVDVVKGPDSVFSGRGGAGGSINLVTKTPRNQDFTVQA
 GIGTAETRYGTIDGNWVLGENTALRLNLLGTRDTPVGRDKAVEFSRVGIAPSLRLGLSGP
 TRVTGLGLYHRRVDPDISIPYDPRTGTPI TETIGVSRRNFYGLVRRDSGDTEDYAATVK
 WEHDLANGFKVENLARYSRATVEQITMPELKTADLAKGLVYRNLRASYQVNDSFANRTD
 55
 60 LRGTFTGQWRHTFDLGGEFATSRRSRDYKQEI PDAASPCSPVTDGNNPALCASLRDPD
 PHVDFPGTVRRNHNPARYHTDILSLYGFDTIAFDEQWQLNLGLRWDHYKTSGRNLPVRGA
 KPPVYERAARTDNLFNQQLGLVYKPRPDGSVYASYGTASTPSAVSDYAPADISGTSQQL
 KPERSEAEIETKWQVLDRLVLVTGAMFRETRKNTSIEVAEGLRAPAGKSRVTGMELGVA
 GSLTPRWDVYGGYALLDSKLVRASHKSGAQGQPLPSAPRHAFSIWSTYKLLPELTVGAGA
 65 FYRSKVYGNADAGYNKDGTPKARWVPAYWRFDAMAAYQLNKHLLTAQLNVYNLLDKTYAK
 TYRSHYAALGPGRSAMLTFKLSY

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 15 secuencia polinucleotídica de la Orf8

5 Atggagaagccgttgaaatccctggactcgtattcagcagacacgctcgccaactcgetg
 Gccgcgcccatcgcggtgccggccctgtgcctgatgcccggtgctcaggcacagaccagc
 Gcgggcggttacccaattggcgccggtgcaggtagagggcgaaagcgtccccctatcaggcc
 Accaccgtccagtcgtccaagatgacggcgcccttgctggatcgcccaggaccgtgcag
 Gtcgtgccgcagcaggtcatccaggaccaggccgccaccaatctgcaggacgtgctgcgc
 Aactcgccgggcatcaccatggcgccggtgcagggcgggcgccggcgccgacctgcc
 10 Atcatccggggccagaatgcggcgggcagcatcttcgtcgacggcggtgcgcgacccagc
 Accagatacgcgatacgttcaacctggagcaggtcgagatcatcaaggggcctgattcg
 Gtctactccggccggtgcggagccggcgagcatcaacctggtcagcaagacgccgaag
 Gcgcgcgacttcgcgaggggtcggtgcagatcggcaccgacagcaattaccgcgccacc
 Gccgacggcaactggctgctggcgacaacgcgcgcttcgcctgaacctgatgggcaac
 Aaggcgacgtgccggcgcgacccatgcggtcgatttcagccgctggggcggtggcgccc
 15 Accctgcaactggcggtgggcacgccccaccgcatcaccctggggtaactaccactaccag
 Gatgacagcatgcccgttacgcgataccgtacgatccgaagtcggggcagccggtcacc
 Gagaccagggcggtcagccgcaagaatttctacggggtgaccggccgagcttcatgaag
 Tcgcgcgacgagcgtggccacgctggccatcgatcacgatttcagcagcaagtcgcgctg
 Cgcaacgtcaccgcgtacggcggtcggtgaccgactacgcccaccaccaatccggatgac
 20 Agcaagggcaacgtgcccaacgggctgggtgtacggcggtgaaggcggtactacacc
 Aacaagacgttcaccaaccagaccgacctgagcggcgcaattcgagacgggcagcctgcag
 Cactcgttcgacgtgggcttcgagtacagcaacatcaagcaggacaaggactcgtatacc
 Cagactatcgccaaggcgcgatgccttgcaaggtggcgcccaacgatgccagcaatccg
 25 Gccttgtgcacctcgctgtgggatccggatccgcatgactattatcccgccacctgtcg
 Cgcaacgacaacccggcccgctattccaccgacacgatcgcgctctacggcttcgacacg
 Atcaagttcaacgagcaatggcaggccagcgtcgactgcgttgggacaattaccgcgta
 Agcggcagcaatatcgcccgcgccgcaacgatcccgccagcagcgcggcggttcctacagc
 Accagccgcgaagacaatctgttcaattaccagctgggctggcctacaagccggtgccc
 Aacggcacgatctacgctcgatggcacctcgtcgacgcgctcgccgctcgccgctcg
 30 Aacgtgagcgacgcgcgtgacggtgagcaacgagtcgctggcgccggagaaaagccgacc
 Gtcgaggtcgccaccaagtggcaattgttcgacgaccgctgacctgtcgggcgcgcttg
 Ttcaggacatccgcaagaacaccagcgtggcgtgtcgggcagccgaaacgggagcagatc
 Ggcaaggccaaggtgcgcggcatcgaaactgggcttctcgggcagcatcacgcccgaagtgg
 Aacgtctacggcggtatacctcatggacagcgaactggtcgagggcgctacaacagc
 35 Gcgcggtgggcccagacctgcccacacgcgcgcaatgccttcagcctgtggaccacc
 Tacaagctggtgcctcagctgaccgtggcgcgccgctattacgtggacaaggtatat
 Ggcaacgcggacaacggctcgcaatgccgacggcacgcggaaggcgcgctgggtaccgtcg
 Tactggcgcttcgacgccatggccgctacgagttcaacgaccacctgaccgcgcagctc
 40 Aacgtgatgaacatcttcgacaagacgtactacaccaaggcctacggcgcgactacgcg
 gcgctgggcacgggcccgcgcggcggtgctgtcgttcaatatcaagtattga

SEC ID N°: 16 secuencia polipeptídica de la Orf8

45 MEKPLKSLDSYSASTLANSLAAAIAPALCLMPGAQAQTSAGVTQLAPVQVEGEASPYQA
 TTVQSSKMTAPLLDTPRTVQVVPQQVIQDQAATNLQDVLNRNSPGITMGAGEGGRAGGDLF
 50 IIRGQNAAGSIFVDGVRDPSTQIRDTFNLEQVEIIKGPDSVYSGRGGAGGSINLVSKTPK
 ARDFAEGSVQIGTDSNYRATADGNWLLGDNAAFRLNLMGNKGDVPGRDHAVDFSRWGVAP
 TLQLGVGTPTRITLGYHYHQDDSMYPDYAIYPDPKSGQPVTTETQGVSRKNFYGLTGRDFMK
 SRDDVATLAIDHDFSSKLRLNRNTRYGRSVTDYAATNPDDSKGNVPNGLVYRALKAGYYT
 NKTFTNQTDLSGEFETGSLQHSFDVGFYSNIIKQDKDSYTTQTIKAGAMPCKVGANDASNP
 55 ALCTSLWDPDPHDYYPGHLNRNDNPARYSTDTIALYGFDTIKFNEQWQASVGLRWDNYRV
 SGSNIARGRNDPASTPAFYSTSREDNLFNYYQLGLAYKVPVNGTIYASYGTSSTPSAVAGS
 NVSDAVTVSNESLAPEKSRTVEVGTKWQLFDDRLTLGALFQDIRKNTSVAVSATETEQI
 GKAKVRGIELGFSGSITPKWNVYGGYTFMDSSELVEGAYNSGAVGQDLNTPRNFSLWTT
 60 YKLVPLQTLVGGGAYYVDKVGYNADNGRNADGTPKARWVPSYWRFDAMAAYEFNDHLTAQL
 NWMNIFDKTYTAYAAHYAALGTGRAAVLSFNIKY

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 17 secuencia polinucleotídica de la Orf9

5 Ttgcataactcgacgccacagcggcagcgcccggtcgcgccgcgcctgctgcatctatcg
 Ctggccgcctcgctggcggccggcgccgccagggcgagaccgccaccgaagccaccacc
 Ctggccaccgtgcaggtcaccggcagggggcgagaccgccaccggcccggtcgacggctat
 gccgccacgcgcagcggccaccgccaccaagaccgataccccgctgtcggaaccggcgag
 gccgtcacgggtgatccgcgcgagcagatcatcgaccagggcgcgagaaactgcaggac
 10 accatgaactacgcgcgggggtgcgccccaaacgcctatggcggtggacaaccgcggcgac
 tacgtgcgggtgcgcggggtggagcgggtccagtatctcgacggcctgaagcagttcttc
 aactacaacaatccgcgcaccgaggtctacgggctcgagcgcgtcgaagtcctgcgggc
 ccggcctcgatgctgtacggccagggcagcaccggcgcggtggtcaacctcgtcagcaag
 cggccgcagcccagggccatgcgcgagatcggcgtgaccgtgggcaaccacaaccgcaag
 15 gagatccaggccgatctcaccggcccgtgaccgaggacggcacctggctgtaccaggtg
 gtggccctcggagcgcagcagcagcaggtccagtaaccaaggacgacccgatgatg
 ctgcgcgcgtcgtgacctggcagcccagcgcgccacctcgtgacgctgcaggcctac
 tggcagaaggacaagtgcggcacgacccaggccttctgcctggagcggcacggtcagc
 ggcaaccccaacggccgcacccccacccgcgccttcaccagcgaaaccggcttcgacccgc
 tacgacaccgagcaattcagcgtgggctggcagttcgagcacaagttcaacgacaactgg
 20 aaagtgcgccagaacctgcgccacacatccagcaaggtcgactacagcacgctgtatccg
 gcggtctacgggaacccccgacaatcccttcacgcgcgcgaccagcgcgtggtcaatcgc
 tacctgtacatcaagaaccgcgcacatgcgttccttgcctggccgaccagaacctcgaaggc
 aaggtgaactggggccgcgcgaacataccctgctgatggcggtggactacagccgctat
 cgcgagaccggcgagaccggcagcgggttcggcgccgcgcctggacctgtaccagccggctc
 25 tacggcacccctgcccgactatgccatgtcgagcgtgcccagaacaagcagcagcagatc
 ggcgctctacctgcaggaccagatcaagttcgaccgcaactggatcgtggtggcgggcctg
 cgccacgaccgcgtcgcccaacagcgtcgaggggcgccgacaaggaaaccgacaaccgccacc
 accaagcggctgggcctgatgtacgcgcgcgacaacggctggtcgccctacctcagctac
 agcgagtcgttcacccccatcgccggcaccgacaacagcggcaaccgctgggtgccgatg
 30 cgcggcaagcaatgggaagcagcgctgaagtacatgccgcaggacaccggctatgaggcc
 accctggcggcctacgacctgcgcgagcgcgaaccgcgacaccaacgaccgctccgatccc
 accaaccaggtgcagaccggcaagaccaagacgcgcggcatcgaactggaattccgcggc
 cgcgtcacgcccgcagatggatgtgatcgcccaactacaactacaccgacatcgaccgcgag
 ctggaaggcctgcccgaagcacacgttctcgctgtggagcaataaccggttcagcgtgggc
 35 gatgtgatggctttgccgcgcgcgcggcggtgcgtacctgaacgcgttcgcgacggg
 tccgcgcgcgagaccggctcggtggccctggtcgaacccatgctcagctacgacaccgggt
 tcgtggcgctatgcgctgaacgtcgccaacatcgccgacaagaacctacgaggtggtgtgc
 ctgcccgcgcgcgattgcttctacggccagcgcgcgacggtcacctgagcgcacatgtac
 cgcttctag

SEC ID N°: 18 secuencia polipeptídica de la Orf9

45 LHTRTPQRQRPVAPRLHLHLSLAASLAAGAAQAQTATEATTLPTVQVTGRGETATGPVDGY
 AATRSATATKTDTPLETPQAVTVIPREQIIDQGAQNVQDTMNYAAGVRPNAYGVDNRGD
 YVRVRGVEPVQYLDGLKQFFNYNNPRTEVYGLERVEVLRGPASMLYGQSGTGGVNVLVSK
 50 RPQPEAMREIGVTVGNHNRKEIQADLTGPLTEDGTWLYQVVALGRSDTQVQYTKDDRRM
 LAPSLTWQPSAATSLTLQAYWQDKSGTTQAFLPWSGTVSGNPNGRIPTRRFTSEPGFDR
 YDTEQFSVGWQFEHKFNDNWKVRQNLRHTSSKVDYSTLYPAVYGNPDNPFIDADQRVVNR
 YLYIKNPRMRSLLADQNLQKVNWGRAEHTLLMGVDYSRYRETGETSGSGFAPLDLYQPV
 YGTLDPYAMSDVPKNKQQQIGVYLQDQIKFDRNWIIVAGLRHDRVANSVEGADKETDNAT
 55 TKRLGLMYAADNGWSPYLSYSESFTPIAGTDNSGNRWVPMRGKQWEAGLKYMPQDTGYEA
 TLAAYDLRERNRQTNDPSDPTNQVQTGKTKTRGIELEFRGRVTPQMDVIANYNITDIDPQ
 LEGLPKHTFSLWSKYRFSVGDVHGFAAGAGVRYLNAFRDGSAPETGSVALFDAMLSYDTG
 SWRYALNVANIADKTYEVVCLRRGDCFYGQRRRTVTLAMYRF

ES 2 346 314 T3

SEC ID Nº: 19 secuencia polinucleotídica de la Orf10

5 Atgggtttacgotttgegatcagggcgcccgccggtcccgcgccgccaaggcgcccc
 Caaacggcactggccatgcgcggcgcgctggcgccatgcgcactggccggtacgctggcg
 Gccgctcccgccgcccgcgcagccgaaggcgcccgcatcgccggcgccgcccctgg
 cacatcgacgcggcccccctggcgagggccctggcgcgctttgccgaccagggccgcat
 accctgctgtacgaccccgccgggtgcgcggcccgccagcgccggccctgcaaggcggtg
 tactcggtgcccgcagggcctggcgcgccctgctcgatggcagcgccctggacgcgcgcag
 10 cgcgccgcccggcacctacgtgctgcaggcgctgcccgcggcccggtcgcccagctggcg
 ccggtcaccatcgaggctgacggcggtgcgcggccgatccgcctgggcccgcaccgcccag
 cgcccgagctcgacgcgcgcaggtgctcgactggagcgatatacgcaagcgcgctcgat
 ccggcgctcaactacaaccgcccgcaccaagagcatcaacatccgcggcctggacgaaaac
 cgctgggtcagcgccatcgacggcatccgcctgcccctggctcgacgacggcgcgcgcgcc
 15 atccaggcggggtgaacgcgggtggacttcaacaccctgtcgcgccctggacgtcgcgcg
 ggcccgactccagcgcgccggctccggcgcgctggcgccgctggccgacctgcccagc
 ctcgaaaccgcccagctgtgcgcgacggcgccgcttcggcgcgctggccaaagtcgac
 tatgactcgcccgacggccagctggggcctgaacgcggccctggccggcgaggtccacgac
 gacaccagctgggtgttgaggcgggccaccgcaatgggcacgacctggacaaccgcgcc
 gacacggcgggctacggcagcaagcgccagccagcccagcccaggaactacgcccagaac
 20 aacttcctgctcaagctgcagcagcgcatcgacggcgcccatcgccctcgccctgacgggc
 gaatacttcaagcgccgcccagacctcgaccagatgtaccagcagggcgccggcaccagc
 taccagtagcgcccaaccgcaaccacgaggaaaccacgcgcaagcgcgctctcgctggac
 taccagtaaacgcccgcagggccggcgcccgatcgacagcgcccgggccatgggtgtat
 tggcagcggtgcccgtggacagctcgaggacgcccgcgcacgcgcgacggcgcgcc
 25 tacgcccgcggcgccgctacttctacggctaccccgagggccctacggggcgagc
 aactcgatccaggaatcgatcctcggcgtcaacggcgagctctccagccgcttcgaaggc
 atgggtgcgcagcgctgacgataggcgccgaatggtagcgcaaccgcaaccgagcagtag
 tcggagcggtacgacaactgcccgcctatccgcggcgccagcccgcgccgatggggccg
 cgctgtgogacatgctgcataccaaccagggccgacatgcccgggtcaaggcgagccag
 30 tgggcccctctggggcgaggaacaaatcgcccttcgcccagggcgctacatcctgacccc
 tcaactgcgctacgaccattacgagcagaagccgcagaaaggcgccggtaccagaacaac
 cccaacgcggcgcgctgcccgcgtcgctcgctggggggccgcttctcgcccagctgctg
 ggcaactggaagcgcgcgagcgctgacgctgtatgcgaatacggcttcggctaccgg
 35 ggcgcgtcgccaccgagctgtacaccaactacggcgcccgggaaacctatctgcgctg
 ggcaatccctccttgaagcccgagaccagcaagggtgggaactggcgcccgccgctgggc
 gacgaccagttgggagggcgccgtatcgctgttcgacaaccgctaccagaacttcatcgac
 aagaacgtgcccgtgggcaagggttcgcccgaatggcagccggcctgggacggccagtag
 ccgctgggcgtcaccgggtggccaaccggcgcgcgctgcccgtatctatggcgccgaagcc
 40 tcggcgcaactggcggttcgcccgaactggcgccctggggctcgctggcctggcgcgctg
 ggcaaggacgaaaacacggcgccagcactgaattcggtgcccgcgctcaaggccatcctc
 ggccctgggctaccagcgcgacgaatggggcatcgacgcccgtgctgacggccgcccagcgc
 cgcgacgacgtgcaataccccgaggcctccgcccagcgcgctacgcccatttccaggcc
 ccgggctacggcggtgggtgatctgtccgcctactggcgcccgccgctcaagggcctg
 45 cagctgcagggcgccgctgttcaacctgttcgacaagaaatactgggaagccatcaacgtg
 cccaaggcggggtgccattcgcatccgcgacggcttagactggtacaacgagccaggccgc
 agcgtagcgctatcgtagcctaccagtagtga

SEC ID Nº: 20 secuencia polipeptídica de la Orf10

50 M V Y A C D Q G A R R A R P A P P R R P Q T A L A M R G A L A A C A L A G T L A A A P A A A Q P T A A P A S A G A R A W
 H I D A G P L G E A L A R F A D Q A G I T L L Y D P A A V R G R A S A G L Q G V Y S V P D G L A R L L D G S G L D A R Q
 R G A G T Y V L Q A L P A G P V A Q L A P V T I E A D G V R A D P A W A R T A T R R E L D A R Q V L D W S D I G K R V D
 P G V N Y N R R T K S I N I R G L D E N R V V T R I D G I R L P W L D D G A R G I Q G G L N A V D F N T L S R L D V V R
 55 G A D S S A A G S G A L G G L A D L R T L E P A D L L R D G R R F G A L A K S D Y S A D A S W G L N A A L A G Q V H D
 D T S W L L Q A G T R N G H D L D N R A D T G G Y G S K R S Q P S P E D Y A Q N N F L L K L Q Q R I D G G H R L G L T G
 E Y F K R R A D L D Q M Y Q Q G A G T S Y Q Y G A N R T H E E T T R K R V S L D Y Q Y N A P Q A G A A I D S A R A M V Y
 W Q R L R L D S S Q D A R R T R D G R A Y A R P G D P Y F Y G Y P S G P Y G R S N S I Q E S I L G V N G E L S S R F E G
 M V S Q R V T I G G E W Y G N R T E Q Y S D G Y D N C P A I P P G T P A P M G P R L C D M L H T N Q A D M P R V K G S Q
 60 W A I W A Q D E I A F A D G R Y I L T P S L R Y D H Y E Q K P Q Q G G G Y Q N N P N A G A L P P S S G G R F S P K L L
 G T W K A R E A L T L Y A Q Y G F G Y R A P S A T E L Y T N Y G G P G T Y L R V G N P S L K P E T S K G W E L G A R L G
 D D Q L G G A V S L F D N R Y Q N F I D K N V P L K G S P Q W Q P A W D G Q Y P L G V T G L A N R A R V R I Y G A E A
 S A H W R F A P N W R T W G S L A W A V G K D E N T G Q H L N S V P P L K A I L G L G Y Q R D E W G I D A M L T A A T R
 65 R D D V Q Y P E A S A R Y A D F Q A P G Y G V V D L S A Y W R P A A V K G L Q L Q A G V F N L F D K K Y W E A I N V
 P T A G A I A I P R P L D W Y N E P G R S V R V S L T Y Q Y

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 21 secuencia polinucleotídica de la Orf11

5 Ttggggccggggcggggcggcgcgccgcgcgctgcccgctcatcgacatgcccgcgggctgcc
 Ggcgcgggcgccacaacgtgtgatcatgaaacagacttccctttactacgccaccctggggc
 Ctggtcgggaactggcgctggccgcgcccgcgcgcgcgaggaagcaatcgcttcccgtccaa
 ctcgcgccgggtgggtcgatggcgcgcccgaaggccaacggcccgctgaatctcgacgcg
 gtcgacagcaccggcagccgctgggctgacctgacgagacgcccgcctcggtgacc
 gtcatcaaccgcgagcagatcgaggcgcgggcgcgctcgacacgcaggaaatcgccgc
 10 ggcacgtcgggcggtggacaatgcctcgccgcccggctcgggccggctcggtgagctaccgc
 gggttctcggggttcgcaggtcagccagttggtcaacggcatttcgggtgcagtagcagctg
 gtcgccgcgcgctcgatcgacagctggatctacgaccgctcgaagccatcgggcgggcg
 tccagcttccgttcggcgcgggcgggcgggcgccatcaactacgtgaccaagggtg
 gcgcagcgcgatacgttctacgacggccagctgcgctgggttcgtacggcgcgccag
 15 gcatccgtgggcttaaccgccaattggccggcgagccggggcgggcgcgccagtagctg
 cgcatcgacgccaacgccaacgcgagcgagcgggtgggtcgacggccaatcgctcgacgc
 gagcaggtggcgccctcgctgctgtcggaacctggcggaacgcgtagcccatacgctggcg
 ctggagtagcagcagagatggtagccggccttactggggtagcccgctgaccaccgac
 ggcgacggcggtgggtgcgcgcggaaggccacatcgcgcgcgggacgcgctggaagaactac
 20 aacgtcgacgacggcgcggtacgagcaatcggtgtgggtggctgcgttcgctgacggcaatgg
 caggccagcgacggcctgagtttcgcgaatcgctgtactactatcgcgccgtagcgat
 ttccagaacctcgagacctaccgctacaaccgggcaacagccaggtgctgcgctcgggc
 gcgctgctgcagcgccacgagcagcgccctgctgggcaaccgcgtagcgaaggctgtaccac
 ggcagcctggggcgccctgcgcagcgactgggtcggttcggcgccgactacagcgctcaaccgc
 25 cagacgcgctacccaccagcggtggccggggcaagtgcgtagcggtggaccgtagcaggttc
 gaccggggcgagttctacgacattccgggcatgcggcgcgccacgtgcccgaaccgagc
 aacaaggtagcgacgctggccttcgctggaaaaccgcacccaagtagggcgcggggtc
 gcgctggtagcggtctgcggcacgacatcatcgacctggacctgaccaaccggcgcgcg
 gccagcgcggttcgcccgggacgcctcgcgccgctacaaccgaccacggggcgcgctc
 30 gccgtcaattggggaggtcagtcggcgcgacacctgtacgcgcaatcgccaccggcgcc
 gaccgccttcggcgctactgtcgacggcgaccttcgcccgtgtgctgaacaacgacaag
 ctgaccaccggcaccaggtcgaggccggcggaagttcgcggttcgggacggcgcgcg
 acggcgacgctggcggtctacgagatcaagcgcaagaacctcgccacggcgatcccctc
 35 aaccggcgagcagcctgcgggtgggcagcagctctgcccggggctggagctggcgggc
 ggattgcagttgacgcgcgcttgcgctgcagggcaacctggcgctggtagaccccg
 tatgacgatttctcgagaaacgtcgggcggggtggcggtctcgcgcaacggcaaggtgccc
 gtcaacacgcgcgcggctggccaacgtgtggctggactacgcttcgcgcccgactgg
 cggcgccagcctggcgcgcgccagctgggcaagacctatgcggacgcggccaatcggtg
 40 tggggcgccggcctataccgtgttcgacgcggcgctgtcgcatcgatcgacggcatttc
 agcgtagcggcgcggtgcgcaacctgaccgacaaggtctatgcggccagcgtagccggc
 gcgcccattgtattacctggggcgcgccgagcgtagcactcgcgctgcaggcgcgcttc
 tga

SEC ID N°: 22 secuencia polipeptídica de la Orf11

50 LRPGRRAARCPSSSTCPPAAGAAPQRVIMKQTSLYYATLGLVGLALAAPARAQEQSLFVQ
 LAPVVVHGAPEANGPLNLDAVDSTGSRLGLTLRETPASVTVINREQIEARGALDQEIAR
 GIVGVNDASPPGSAGSVSYRGFSQSQVSLFNGLISVQYDVVAARPIDSWIYDRVEAIGGP
 SSFLFGAGAVGGAINYVTKVAQRDTFYDGLRLGSGYARQASVGLNRQLAGEPGGRGQYL
 RIDANANASDGWVDGNRSHAEQVAASLLSDLGERVTHTLALEYQHENVHRPYWGTPLTDD
 55 GDGVVRGEGHIRGGTRWKNYNVDDGRYEQSVWWLRSLTEWQASDRLSFRNTLYYRADRD
 FQNLETYRYPGNSQVLRSGALLQRHEQRLGNRIEGLYHGSLGGLRSDWSFGADYSVNR
 QTRYPTSVAGQVDSVDPYEFDPGEFYDI PGMRRGHVPRDNKVRTLAFMLENRTEVGGGV
 ALVTALRHDIIDLDTNRRASAASPGHASRRYNPTTGRVAVNWEVSPGATLYAQYATAA
 DPPSGVLSTATFADVLNNDKLTGTQVEAGGKFAFDWGRGTATVAVYEIKRKNLATPDPL
 60 NPGSSLPVGSQSARGLELAGGLQLTRALSLQANLALVDPYDDFSQNVGGVAVSRNGKVP
 VNTPRRLANVWLDYAFAPDWRASLAARHVGTKYADAANTVWAPAYTVFDAALSHRIDRHF
 SVTARVRNLTDKVYAASVTGAPMYLGA PRSVELALQARF

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 23 secuencia polinucleotídica de la Orf12

5 Atgaaatcccgctcactccggcgctgcgccgggtgtcctggcctgtgtcgctccgttggcc
 Ggccacgcccaggccggcgccgcgcggcccaacccatccccgaactcgatccggtcgtc
 Gtcacgcgcgcgcgatcgccccagctgctcaagaatgtgctggccgacgcccagcgtgatc
 gagcgcgatacgcctggcgcgcgccggccagtcagcctggccgaaagtgtctggcgagcag
 caccggcatcgaattcgccgacagcggcgcccgcaaagcgtcaccagcctgttcatgcgc
 10 ggcgccaacagcaaccagaccctggctcctgctcaacggccagcgcatcaacaacgccaac
 ggcgggcgcatctgcgctcaacgcgctgcccgcggaagccatcgaaacgcatcgagatcatg
 cgtggcgcgccagcagcctgtacggggccgacgcgatcgggcgcggtgatcaacatcatt
 acccgcgagccggggcgacaaggcgctgtcggcctatgccaacgcccgttacggcacctac
 ggcaaccgctacgacgcccgcgtctcgggcgcgccgacggcttcagctacagcctg
 tccaccggctatggccagagccatggcttcaacgccaccaaccgcccgtcgttctcgtac
 15 aaccgggacaaggacagctactaccagaactacgccaccggcacgctgggctacgaatgg
 cggcccgagcagaaagtggcgcgaggtctaccgcagccgcatcaacggcggtacgac
 gcctcggcctcgtacgactacaacgaccgctacatccaggacctgcaggcctattcgctg
 gccagcgaaaaccgctgaccgctactggaagacacgctgcgcgccggctatgtggaa
 gacaagaacgattcgcgcgccgaaggcatgttcgaagacaacaacacgcgcttcggacc
 20 cgccagatgcagtaacctgtggcagaaacgacttcacccctggccgcccggccagacgctgacg
 ctggcctacgagcacctggaccagcgcgccgacggccagatgagcaccgcccaccggcatc
 ggcaactacaccgagacgcgccgcccacgtgaactcgtacaccggcgctctacctgggcgat
 ttcggcgcccaccatgtgcaggccagcctgcgcaacgacaacaactcgagttcggcagc
 cacaccacggcgccctggcctacgggttcgacctgacgcccacccctgcgcgccaccgtg
 25 gccgccaacacgggcttcgggcgcgctcgttcaacgatctgtacacgcccagaccagcg
 ttcggtctatcgcggaaccccgacctcaagccggaagagtgcgcaacgcccagatcggc
 ctgaaataaccaggacgaggacagcgaactggcgctgggtgtattaccagaccgcatcaag
 aacctgatccaggtgaccgaggacttcagcacggtcgagaacgtcgggcgcgcccgccctg
 caaggttcacccatcagcgcgcgccaccgcttcggcaacacgcgcctgcgcgccagcctg
 30 gacctgagcaaccgcgcaacgaagacaccggcaagcaattgctgcccgcgcccgcacg
 gtgctgcgcgccggcatcgacctcgcttcgaccgcctgctgggtggcgccgagtggtac
 gcctcggaacgagcgtacgactacggcttcccgcaggaaaagcgccctggcgcgctacggc
 ctggtcaacctgaccgcgccctacgacctgagccgcaacatgcaggtgcaggtgcgctgg
 35 aacaacgtgctcgccagcgctacaccttggccgacggctacaacacggccggctcgaac
 gccttcgtcaaccgctcgtggcgcatgtag

40 SEC ID N°: 24 secuencia polipeptídica de la Orf12

45 MKSRSLRRACVLAQVAPLAGHAQAGAAAGQPIPELDPVVVTAARSPQLLKNVLADASVI
 ERDTLARAGQSSLAQVLAQQHGI EFADSGGPQSVTSLFMRGANSNQTLVLLNGQRINNAN
 GGGIALNALPPEAIERIEIMRGAASSLYGADAIGGVINIITREPGDKALSAYANAGYGT
 GTSRYDAGVSGAADGFSYSLSTGYGQSHGFNATNRRSFSYNPDKDSYYQNYATGTLGYEW
 RPEQKVVAQVYRSRINGGYDASASYDYNDRIYIQDLQAYSLASENRLTRYWKSTLRAGYVE
 DKNDSRAEGMFEDNNTFRTRQMQLWQNDFTLAAGQTLTLAYEHLQDQADQGMSTATGI
 50 GNYTETRRHVNSYTGYYLGDFGRHHVQASLRNDNNSQFGSHTTGGLAYGFDLTPNLRATV
 AANTGFRAPSFNDLYTPTSAFGYRGNPDLKPEESRNAEIGLKYQDEDESELGVVYYQTRIK
 NLIQVTEDFSTVENVGRARLQGFITSGAHRFGNTRLRASLDLSNPRNEDTGKQLLRART
 VLRAGIDHRFDRLLVGAEWYASDERYDYGFPEEKRLGGYGLVNLTAAYDLNRNMQVQVRW
 55 NNVLGQRYTLADGYNTAGSNAFVNPSWRM

60

65

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 25 secuencia polinucleotídica de la Orf13

5 Atgattccaccttgccgcttatccctgatcccgccgctggccgccatggcgctggcaggc
 Gcctttcccgccgagcggggcccgccgctgaattggcgcccatcgcggtcatcggc
 Gacgatcccgacgatccgcggttattcgaaggcagcaccgccaccgtaccgccacacgc
 ctgggggaggtgccgcagacgggtcgacaccgtgaagggtgccggacgcccgaactatggc
 gcgcgcacgctggcgagggcgctggccggcgctgcccaatgtcaccgacgcccagcgatacc
 cgcttcgacggcttgccgcatacgcggttcgacgcccggcagcgacttctacctggcggg
 10 gtggcgcatgacagccagtagctgcccgcacctgcacaacatcgagcgcatcgaggtgctc
 aaggggcccggccggcgcttctgtacggccgcccagccagggcgccatcgtaactcggtg

 agcaaggcgcccggggcgggcgcgcttccaccctcgaagtcgggctggggcgcgaggac
 tttcgagcctgtacgcccacctgagcgcggacccttcgacacggtcagcctgcgccctg
 15 aacgtggggcgcgagaatgcgggcagtttcaggcacggggtcagctcgcgccgcccgcctg
 gcgtcgcccgcttgccgtggcgcatcagccacggctcgattggctggcgagtagcaa
 cacagccgctacgacccgctgcccagccgcccgcattccctcggtggcggccggcccgcg
 ccggtcgggcgctcgaccgtctacggcgaccccgggcgcgacaatatcgacgatcggtc
 caggtgctgcgctcgccgctgcgctaccggcgcccaatggatgggagctgcccataacc
 20 ctgtcgacgttcggctgcatagcgatttcgacaacacctatctgtccggctggcgcgcc
 gagaccgggctggtgcaacgcccagcgctggcagcagcacctgcccggccgcatcttac
 aacgtcttcgagggccgagggcacgttcgccaccggctggctcgaacaccgcttgctggcc
 ggctcgagctggcgagccagcatcgcgatccgacgctgcaccgcccggccaccaaaggc
 cccggcgcgccagccggtgcccgggctggcgctgcaccaccccgacttgagccagcagcac
 25 cacggccgcatggagcgccagcgatgcccgtcaccgctgctgacgaaggctactac
 ttgcaggatcaactgcgattgagcgagtcctggcaggtggtggcgggcgcgccctggac
 cggttcgggggtgcgcacgcgcaatcgccctgctgggctggaaggcagccgtggcgaccgc
 agtgtgagtcgcccctgggagtggtctggacgcccctggccggcgccagcgcttctacgcg
 tcgtacagcaagacttctcgccaccggcgccggcaccataggcatcacgcccggcgcg
 30 cggggcaacgccaatgatctgcccggcggaacatacgcgccagtagcaagccggggtcaag
 agcgactggctggagggcgccctgagcaccatgctggcgtctaccagctcgaactctac
 aaccgcccgcagcgcgcccccacgatcccacgcggaatactctgacgggctgagcgcc
 tcgcccggccctggaaatgagcggggcgggcggttagctgtgaagattcaatag

 35

SEC ID N°: 26 secuencia polipeptídica de la Orf13

40 MIPPCRLSLIPALAAALAGAFPAPSGAAPAEAPAVIGDDPDDPRVFEGLSTATRTATP
 LREVPQTVDTVKVPDALNYGARTLGEALAGVPNVTDASDTRFDGLRIRGFDAGSDFYLDG
 VRDSSQYVRDLHNIERIEVLKGPAGVLYGRGSQGGIVNRVSKAPGPGRASTLEVRLGGED
 FRSLYADLSADPSDTVSLRLNVGGENAGSFRHGVSSRRRLASPALAWRITPRLDWLAQYE
 45 HSRYDRVPDRGIPSDGRPAFVGRSTVYGDPRDNIDDRVQVLRSLRYRAANGWELRHT
 LSTFRLHSDFDNTYLSGWRAETGLVQRQRWQHLRARHLYNVFEAEGTFATGWLEHRLLA
 GVELGSQHRDPTLHRAATKGPAGQPVPGALHHPDLSSQHHGRMERASDARHRVRTQGY
 LQDQLRLSESWQVAGARLDRFGVRTRNRLLGLESGRSDRSVSPRLGVVWTPWPAHAFYA
 50 SYSKTFSPTEGGTIGITPDARGNANDLPPEHTRQYEAGVKSDWLDGRLSTMLAVYQLELY
 NRRTRAPHDPTRILLTGLQRSRGLEMSGAGRLAVKIQ

 55

 60

 65

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 27 secuencia polinucleotídica de la Orf14

5 Atgaacacgctgcgacgcctgcgcatcctgggcgcgcgcgcacgctgggcccgcgcgc
 Gccgcgcaggagcgcccgccatgctggagccggtgcgcatcagcggcacgcgcaccggc
 Acctcggtgctcgatacgcgcgcctccgtggacgtggtcgatggccacgagctgcgcgcg
 Cgcaacctgcaggtcaacctgtccgaaggcttggcggcgctgcccggaactgcagctgcag
 Aaccgcgcagaattacgcgcaggacctgcagctgtcgatacgcggcttcggcgcgcgcctcg
 Accttcggcgctgcgcggcgctgcggctgtacgtggacggcatcccgccaccatgcccgac
 10 Ggccagggccagacctcgaacatcgacatcggtcggcggcgccgcgtggaagtgtgcgc
 Ggcccgttctcgccctgtacggcaattcgtcgggcggcggtggtgcaggtgttcaccgaa
 Cagggcagcgatccgcgcgagggcgacgggcagcgcggcgcgggcagcttcggcacctgg
 Cgctacggcgccaagctgcgcggcgccagcgcggcgagacggcctggattacgtgctggac
 Ttcaatcgcttcacgaccgagggctatcgcgaccacagcgcgcgcgcaagaacctgggc
 15 Aacgcgcggctgggcctgcgcatggacgacggcagcgcgcctgacgctgagcgcgaaccac
 Gtggacctgaccgcgcaggatccgctgggcctgacgcgcgagcaattcgaggacgacctg
 Cgcagcgcgcgggtggccgagcgcttcgatacgcgcgaagacctgcgcgcagaccagggc
 Ggctgctgtacgagcgcgccttcgacacgcgcgaacgacctgcgcgtgatgctgtactac
 Ggacaacgcgcgcaccacgcaataccaatccatcccggtggcgtgcagcaaagccccacg
 20 Cagggcggcgcgctgatcgacctgggcgcgcactacggcgcgccgacctacgctggacc
 Tcgcgccagcaggtggccggcctgccgctgacctgatcgcgggactggcctatgacacc
 Atgaaggagcagcgcgcggctacgacaactacacggcgcccgccgctgcgcgccacggc
 Catgggcgtcaaggcgcgcttgcggcgcgacgagaccaacacgggtctacaacctggacc
 Gtacctgcaggcctcgtggcagtcgccgagcgcgtggacgctggacgcggggctgcgcta
 25 Cagcaggtgcgcttcgactcggacgattaccaggcgccgggcaacggcgacgacgacg
 Cggacgcgccacctatcgcaaggccttgccggtggcgcgctgcgctatgcggccaacga

30
 gaacctgagcctgtacgcctcgtacggacgcggcttcgagacgcccacgctcaatga

35

SEC ID N°: 28 secuencia polipeptídica de la Orf14

40 MNTLRRLRILGAAATLGGPAAAEAPAMLEPVRI SGTRTGTSLDTPASVDVVDGHELRA
 RNLQVNLSEGLAGVPGQLQNRQNYAQDLQLSIRGFGARSTFGVRGVRLYVDGIPATMPD
 GQGQTSNIDIGSAGRVEVLRGPFSAFYGNSSGGVVQVFTEQGSPPPEATGSAAAGSFGTW
 RYGAKLRGASAADGLDYVLDNFRTTEGYRDHSAARKNLGNARLGLRMDGSRLLTSANH
 VDLTAQDPLGLTREQFEDDPRSAFVAERFDTRKTVRQTQGGLLYERAFDTRNDLRVMLYY
 45 GQRRTTQYQSI PVAVQQSPTQAGGVIDLGRDYGGADLRWTSRQQVAGLPLTLIGGLAYDT
 MKEQRRGYDNYTGPPAAPTGHGRQGRVAARRDQHGLQPGVPVAGLVAVRRALDAGRGAL
 QHGALRLGRSLPGAGQRRRQTRHLSQGLAGGGAALCGQREPEPVRLVRLRLDAHAQ

50

55

60

65

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 29 secuencia polinucleotídica de la Orf15

5 Atgaacatgtctctgtcacgcatttgtcaaggcggcgccctgcgccgcaccacgctggcc
 Atggcgctggcgcgctggcgcgccgcccggcgcgcatgccgactggaacaaccagtc
 Atcgtcaagaccggtgagcgccagcatggcatccatccagggtccgaccggcggc
 gtacggaccgcaagcgaaccacatcaaggttaagcggcgtcaggcccaggcatcctg
 ctagaaaatcccgcgccgagctgcagttccggaacggcagtgtaacgtcgtcgggacag
 ttgtccgacgatggcatccggcgctttctgggcaccgtcacgtcaaggcggcgaagctg
 10 gtcccgatcacgccacgctggccaacgttggcgacacctgggacgacgacggcatcgcg
 ctctatgtggcggcggaacaggccaggccagcatcgccgacagcaccctgcaggcgct
 ggcggcgtgcagatcgagcgcgccgaatgtcacggtccaacgcagcgccatcgtcgac
 gggggcttgcataccggcgccctgcagtcattgcagcgggaagacctccgcccagcgg
 gtggtgctgcgcgacaccaacgtgacccgctgcccggcagcgcgcgcccgcgcggtg
 15 tctgtgtggggggcagtgagcttacgtcgacggcgggcacatcacggcgggcgggca
 gcgggggtggcgccatgcaaggggcggtcgtgcattcgcagcgcgcgacgatacggcgc
 ggggacgcgctgcccggcggtcggttcccgcggtgcggttcccggtggtgcggttcc
 ggcggcttcggtcccggcggttcggtcccgctcctcgacggctggtatggcgtggaagta
 tcgggctccagcgtggagctcgccagtcgatcgtcgaggcgccggagctggcgccgca
 20 atccgggtggcgcgcgccaggggtgaagggtgcggcgcgagcttgcgcgacccgac
 ggcaatgtcatcgagaccggcgcgcgcgctcgtttgcgcctcaagcgcgcccctgtcg
 atcacctgcaggccggcgcgcatgcccaggggaaagcgctgctgtaccgggtcctgccg
 gagcccgtgaagctgacgctgacggggggcgcgatgcgagggcgacatcgtcgcgacg
 gagctgccctccattcccggcagctcgatcgggcgctcgacgtggcgctggccagccag
 25 gccgatggagggcgctaccgcgcggtcgactcgctgcatcgacaacgccacctgg
 gtcattgacgggacaactcgaacgtcggtgcgctacggctggccagcgacggcagcgtcgat
 ttccagcagccggccgaagctggcggttcaaggtcctgacggtcaatacgtggcggtt
 tcggggctgttcgcgatgaatgtcttcggcgacctggggctgagcgacaagctggtcgtc
 atgcaggacgcagcgccagcagcggtgtgggtccgcaacagcgcgagcgagccggcc
 30 agcgccaacacctgctgctggtgcagacgcccactaggcagcgcgcgacaccttaccctt
 gccacaaggaaggcaaggtcgatatcggtacctatcgctatcgattggccgccaaaggc
 aatgggcagtgagcctggtgggcgcgaaggcgccgcccggcgcccaaggccgcgcgag
 ccgggtcccagcgcgcgagcgcgcgagccgagccggaagcgccggcgccgcaaccg
 ccggcgggcagggagttgtccgcgcgcgcaacgcggcggtcaacacgggtggggtgggc
 35 ctggccagcagctctggtacgcgcgaagcaatgcgttgtccaagcgctggcgagttg
 cgctgaatccggacgcgcgcgcgctggggcgcggttcgcgcgaacgcagcagctg
 gacaaccgcgcggcgcgcttcgaccagaaggtggccggcttcgagctggcgccgac
 cagcggtggcggtggcgcgcgagctggcacctggcgggctggccggctatagcgcg
 40 ggcgaccgcggttcacggcgacggcgggcgccacaccgacagcgtgcattgcggggc
 tatgccacatatatcgccgacagcggtttctacctggacgcgagctgcgcgcagccgc
 ctggagaatgaactcaaggtggcgggcagcgagcggtacgggtcaagggaagtaaccgc
 acccatgggtggcgccctcgctcgaggcgggcgcgctttaccatgccgacggctgg
 ttctctgagccgcagggcgagctggcggtattccggcgcgcgcggtgcgtaccgcgcg
 45 gccaacggcctgggggtgcgcgacgaaggcgcgagctcggtgctgggtcgctgggctg
 gaggtcggaagcgcatcgaactggcagggcgagcaggtgcagccatacatcaaggcc
 agcgtgctgcaggagttcgacggcggggtacggtacacaccaacggcatcgcgacccgc
 accgaactgcgcggcagcgcgccgaactggcgctgggcatggcgcgcgctggcgcg
 ggccacagcctgtatgcctgtacgagtaactcaaggggccgaagctggccatgccgtgg
 50 accctccacgcgggctaccggtaacagctggtaa

SEC ID N°: 30 secuencia polipeptídica de la Orf15

20

25

65

ES 2 346 314 T3

gcgacgctcgccgctatgtctcctacctgaatgattcgggctcgtatgtggatggcggtg
gtcaagtacaaccgcttctcgcatgggttcgacattcgacgacgacacctaagcggggtc
gatgccaagcaccgcagccacggcctggcgcggttgcgcggcgggcgccgcatcgat
atcgatggcggttggtatgtcgagccgaggttcggtggcggtggttccacgcggcggg
agccgctatgagccagcaatggcctgcgcgtgcgcgcgacggcgcgcatcatgggtg
ttgcgcgcggggcgaggcgggcggcagatgaggttggccaatggcaatatcggtgaa
ccctatgcgcgcttgggctgggcccaggagctgggggcccgaataacgcggtctacaccaac
ggcatcaggcatgtcacgcgttcgcgtggcggttcgcccaggcccgctgggggtgggc
gccttgcgggcaagcgcatgccttgtacgccgactacgagatgccaagggcgcgcg
ttcgaggcgccctggaccttgcagctggggtatcgctacagctggtga

SEC ID N°: 32 secuencia polipeptídica de la Orf16

MAGQARGWYGAGGRHPIHFQISAGAALMLGLLDVAGAAVTAQRIDGGAFLGDVAIAT
TKASEHGINVTGRTAIEVRVTGGTIRTSNQAQGLRVGTENAPDNTALGASVFLQNLIIET
SGTGALGVSVHEPQGGGTRLSMSGTTVRTRGDDSFALQLSGPASATLNDVALETAGQQA
PAVVLWQGAQLNAQGLVVQVNGAGVSAIHAQDAGSFTLSGSDITARGLEVAGIYVQEGMQ
GTLTGTRVTTQGDTPALQVEDAGTHVSMNGGALSTGANSPPAAWLLAGGSAQFRDVTVLR
TVGEASHGVDVAHSEVELAHQVRADQGAGHLVVTRSSAMVRAGSLVESTGDGAAALL
ESGHLTVDGSVVHGHGAAGLEVDGESNVSLNGARLSSDQPTAIRLIDPRSVLNLIDKDR
AQLLGDIAPEAQQPDGSPQARVRVALADGGTWAGRTDGAHVTVRLDRGVWTVTGDSDRV
AEVKLEGGTLAFAPPAQPKGAFKTLVATQGISGTGTIVMNAHLPSGTADVLVAPQGFGDR
QVLVVNNTDDGTESGATKVPLIEDEQGHATAFTLGNMGGRVDAGARQYBLTASEAQADKAR
TWQLTPTNELSTTATAAVNAMAIAASQRIWQAEMDVLLRHMSGLHSIGSPGGFWARGLSQ
RQRLDTGYGPWQKQTVSGIELGLDRRVAGGATTAWSVGMLAGYSETRRDGGAYRAGHVHS
AHVGAYVSYLNDSGSYVDGVVKNRFRHGFDIRTDLKRVDAKHRSHGLGALLRGRRID
IDGGWYVEPQASVAVFHAGGSRYEASNGLRVRADGAHSWVLRAGAEAGRMRLANGNIVE
PYARLWQALGADNAVYTNIRHVTRSRGGFAEARVGVGALLGKRHALYADYEYAKGAR
FEAPWTLQLGYRYSW

SEC ID N°: 33 secuencia polinucleotídica de la Orf17

Atgtatctcgatagattccgtcaatgtccgtcttccctgcagatcccgcgttccgcgtgg
Cgcctgcattgcgtggccgcagctctggcgctggccggcatggcccggttggcgcccgcg
Gcgccgcagggcgccgcagccgcccggtggccggcgccgcagatgcccaggagccggcgag
Gaaggagagtgcgaccacgggacaacacgctcattgcagctcttgacgacggcgctcgcc
Atcaatctcgacgacgatcccgcagagctcgccgagacggcgccccccacgctcaaggac
Atccacatctcggtggagcacaagaaccgatgagcaagccggccatcggggtgcgtgtc
Agcgccgcggcgccgcgcgtgacgctggccggctcgaccatcgatgccaccgagggcggc
Atcccgcagtggtacggcgccggcgacgctggagctggatggcgctcaccgtggcgggc
Ggggaagggtggagccgatgacggtctctgacgcccgcagccgcctgagcgtgcccggc
Ggcgtgctggcgccgaagcgccggcgctcgccctggccggccgcgcaagcgccgacag
Gcgagcatcatcgacgcgacgctgcagagcatcctcgggcccgcgctcattgcccagcggc
Ggctccatttccgtcgccggcggttcgatcgacatggacatgggcccgggattcccgcgc
Cgcctccaccgcttcccggggcgccgctggccgcgcatccgcccgtcgatcgcggtgccc
Gcggtgcaacgcggccaggacggcaaggtgacactgcgggaggtggcgctcggggctcac
Gggccgcagggcagggcgctctatcgctatcgctggcagcgaaatcaccctgcaggga
Ggcacagtgcgctgcaggcgatgacggggcgccgctggctcgccggcgccggcgctgctc
Gacgcttgcgcgccggcgccaggtgcggctggacggaaaccaaggtgtcgaccgatggc
Gccaacaccgatgcccgtgctggttcggggcgacggcgcgccgaggtcgtcaacacc
Gtgetgcgcaaccgccaagagcctggccgcccggctatcgcccagcatggaggccgcgtc
Acgctgcggcgagaccgcatcgagaccggcgccggggccgagggcatctccgtgctg
Ggcttcgagccgcagtcggctccggcccgccagcgtcgacatgaggcgccgagcatc
Accacgaccggcaaccgcgcgcggcggcatcgcgctcaccacggcgagcggccgctggaa
Gcggtggcggtgcgcgccgagggcagcggtcgagcgccgcgagctggccaacggcagc
Ctggctgcgagcagggctcgctggcctcgggccagtcggggcgcatcagcgtgaccgac
Acggcgctgaagctgatgcggggcgccctggccagcagcaggtctcggtccgggtgacc
Gacggcgccacggcgcaacgcggcaatggcggtgtcctccagcagcattccaccattccg
Gtggcggttgcctcgagagcgccgctggctcgccggcatatcgctcgccgacggcaac
Aagccctcgatgcccgggatctccctcagcgtggccagcgccgcgcctggcagcgccgc

ES 2 346 314 T3

Acccaggtgctccagtcggccacgctgggcaagggcggaacctgggtcgtgaacgccgac
 Tcccgggtgcaggacatgtcgatgcgcggcgggcggtcgaattccaggcgcccgccgccc
 Gaggcctctacaagacctgacctgcaaacctggacggcaacggcggtgttcgtgctg
 5 Aacaccaacgtcgccgcccgggcagaaacgaccagttgcgggtcacccggccgcccgtatggc
 Cagcaccgctgctggtgcgcaatgccggaggcgaggccgacagccggggcgcccgcctg
 Ggctggtgcataccaggggcagggaacgccaccttccggctggccaacgtcggaag
 Gcggttgacctgggcacgtggcgctacagcctggcgaggatccgaagacgcatgtctgg
 Agcttgacgcgcgggccaggccctgtcgggggcgggccaatgccgcgctgaacgcggcg
 10 Gatcttccagcatcgccctggccgagtccaacgcgctggacaagcgccctgggcgagctc
 Cgcctgcgcgcccagcgcggcgccatgggcgcgtacgttcagcgagcgccagcagatc
 Agcaaccgccaagccgcgcctacgaccagaggtcagcgggctggagatcggcctggac
 Cgtggctggagcgctcgggcgggcgctggtacgcggcgccgctgctcggtacacctat
 Gccgaccgacctatcccggcgacggtggcggaaggtcaaggccctgcacgtcgcgggc
 15 Tacgcgcctatgtcgcgatggcggtactatctcgacacgctgctgcggctgggccc
 Tacgatcagcaatacaacattgccggcaccgatggcgcccgctcaccgcccactaccgc
 Acaagcggcgccgcatggtcgctcgaaggcgggcgccggttcgagctgcccacgactgg
 Ttcgcggaacgcagggcgaggtcatgctgtggcgacgtcaggcaagcgctatcgcgcc
 Agcaatggcctgcgcgtcaaggtggacgccaacaccgcccagctgggcccctgggcttg
 20 Cgcttcggccgcccgcctcgccctggcgggcggaacatcgtgcagccctacgccaggtc
 Ggctggacgaggttcaaaagcacggcgatgtgcgcaccaatggcattggccatgcc
 Ggcgcagggcgccacggcgcggtggaactgggcgcgggcgctcgacgcccgttgggcaag
 Gggcacaacctctatgcttcgtacgagtacgcggcgggcgaccggatcaacattccgtgg
 tcgttccacgcggctaccgctacagctctctga

SEC ID N°: 34 secuencia polipeptídica de la Orf17

MYLDRFRQCPSSLQIPRSARWLHALAAALALAGMARLAPAAAQAPQPPVAGAPHAQDAGQ
 EGEFDRDNTLIAVFDDGVGINLDDDPDELGETAPPTLKDIHISVEHKNPMSKPAIGVRV
 SGAGRALTLAGSTIDATEGGIPAVVRRGGTLELDGVTVAGGEGMEPMTVSDAGSRLSVRG
 GVLGGEAPGVGLVRAAQGGQASIIDATLQSIILGPALIDGGSISVAGGSIDMDMGPFPP
 35 PPPPLPGAPLAHPPLDRVAHVHAGQDGKVTLEVALRAHGPQATGVYAYMPGSEITLQG
 GTVSVDGAGVAVAGALLDALPPGGTVRLDGTTVSTDGANTDAVLVRGDAARAEVNT
 VLRATAKSLAAGVSAQHGGRTLRQTRIEAGAGAEGISVLGFEPQSGSGPASVDMQGGSI
 TTTGNRAAGIALTHGSARLEGVAVRAEGSGSSAAQLANGTLVVSAGSLASAQSGAISVTD
 TPLKLMPGALASSTVSVRLTDGATAQGGNGVFLQGHSTIPVAVALESGALARGDIVADGN
 40 KPLDAGISLSVASGAAWHGATQVLQSATLGKGGTWVVDNRVQDMSMRGGRVEFQAPAP
 EASYKTLTLQTLGNGVFLVNTNVAAGQNDQLRVTGRADGQHRVLRNAGGEADSRGRL
 GLVHTQGGNATFRLANVGKAVDLGTWRYSLAEDPKTHVWSLQRAQALSGAANAAVNAA
 DLSSIALAESNALDKRLGELRLRADAGGPWARTFSEERQISNRHARAYDQTVSGLBGLD
 RGWSASGGRWYAGLLGYTYADRTYPGDGGKVKGLHVGGYAAVVDGGYYLDTVLRLGR
 45 YDQQYNIAGTDGGRVTADYRTSGAAWSLEGRRFELPNDWPAEPQAEVMLWRTSGKRYRA
 SNGLRVKVDANTATLGLRLGFRRIALAGGNIQPYARLQWTQEFKSTGDVRTNGIGHA
 GAGRHRVRELGAAGVDAALGKGNLYASYEYAAGDRINIPWSFHAGYRYSF

SEC ID N°: 35 secuencia polinucleotídica de la Orf18

Atgcacatttacggaaatatgaatcgagcaaacaccttgcgcgggtgcgggtgcgtgccctt
 55 Gcgttgccttgcgtgggagcggtatgtggacacttctcctccctcggcattggcgctt
 Aagctcccgtcgctgctgacggacgacgagctgaagctggttctgccgactggcatgtct
 ctggaggattcaagcgcagccttcaggagtcgcgcgagcgctggcaacgcgcgcg
 tcgtcttcgctccggttcggaagccaggtccgggctccgttcgcgaggtccgtcgggg
 tcggggccacaaggacaacccatccctccgctcgtcggcgtcggtccaggtatggcgag
 60 tcgtctggcgacataaccccgcgctgggggggggacgcgatgaaaatgggttgcccggt
 ataggaaaggtcgccgggtctgcgcccggaccggataccagtcacgggctcggtcccga
 gccggcatggcgtcgggagcggttcgacgtcgcccggcgcacgtgggtggggcgggcaag
 gatgcgatgcgcctcggaaggcgagagggcgactccggtatgtccgattcggggcg
 ggtggcggaatcgtcgctggaggttcgaatccggacggcgctggcaagccaacgcgggag
 65 gaaggcgagccgggttccaagtctcctgcggacggtggccaggacgggcgcgcgccc
 cgggacggcgcgatgcggatccgcaacctccgcgggacgatggcaatggggaacagcag
 ccgcccgaaggcgggcggtatgaggggcagcgcccgccgctgcccgccggaacgggtggc

ES 2 346 314 T3

aacggtggcaacgggaacgcgcagcttccgagcgcggcgacgacgcgggtccgaagcct
cccagggagagggcgccgatgaaggtccgcaaccgcccagggcgccggcgagcaggac
gcgccggaggttcctcccgctcgccggcgccgcccggcggaacgggtgtctatgaccg
5 ggcacgcataacctgaccacgcggccctctcgccgggtgagcctggccagcagttcgcat
ggcgtatggcagggccgagatgaacgcgttgagcaagcgcagtgccgagttgcgcctgacg
ccggttgcggggcgccgtatggggccgcgcttttggccggcgccaggacgtcgacaacgcg
gtgtcgccgcagttccgccagaccatcagcgggttcgaactggcgcccgataccgccttg
ccggtggccgaacggcgctggcacgtggcgccgggtggctggctacaccaacggccgcac
10 aagttcgaccggggcgccacgggcgatgacgacagcgtgcacgtggcgcttacgctacc
taccatcgaggacggcggtttctatatggatggcatcgctcgccgtcagccgattcgccac
gcgttcaaggtggacgacgccaagggcgccgcgtgcgcggccagtaccgcggcaatggc
gtggggcgctcgctggaactgggcaagcgcttcacgtggcccgccgctggtacgtggag
ccgcagctggaggtggccgccttccatgcgcaagggggccgactacaccgccagcaacggc
15 ctgcgcatacaaggacgacggcacgaactccatgctggggcgccctgggcctgcacgtgggg
cggcagttcgacctggcgcatggccgcgtggtgcagccctacatgaagctgagctgggtg
caggagttcgacggcaagggcacgggtgcgtaccaacgacatccggcacaaaggtgcggctc
gatggcgcccgccagcaactggccgtagggggtggcttcgcaactgggcaagcagcgagc
ctgttcggctcgtagcagtagcgaagggcagccgcccagaccatgccgtggaccttccac
20 gtccgctatcgctacgcctggtag

SEC ID N°: 36 secuencia polipeptídica de la Orf18

MHIYGNMNRATPCRGAVRALALALLGAGMWTLSPPSAWALKLPSLLTDELKLVLP TGMS
LEDFKRS LQESAPSALATPPSSSPVAKPGPGSVARAPSGSGHKDNPSPPVVGVP GMAE
25 SSGGHNPGVGGGTHENGLPGIGKVGGSA PGPDSTGSGPDAGMASGAGSTSPGASGGAGK
DAMPPEGERPDSGMSDSGRGGESSAGGLNPDGAGKPPREEGEPGSKSPADGGQDGP PPP
30 RDGGDADPQPPRDDGNGEQQPPKGGGDEGQRPPAAGNGGNGGNGNAQLPERGDDAGPKP
PEGEGGDEGPQPPQGGGEQDAPEVPPVAPAPPAGNGVYDPGTHLTTPASAAVSLASSSH
GVWQAEMNALSKRMGELRLTPVAGGVWGRAFGRRQDVDNRVSREFRQTI SGFELGADTAL
PVADGRWHVGA VAGYTNGRIKFDRGGTGDDDSVHV GAYATYIEDGGFYMDGIVRVSIRH
35 AFKVDDAKGRRVRGQYRGNVGASLELGKRF TWPGAWYVEPQLEVA AFHAQGADYTASNG
LRIKDDGTNSMLGRLGLHVGRQFDLGDGRVVQPYMKLSWVQEFDGKGTVRTNDIRHKVRL
DGGRT ELAVGVASQLGKHGSLFGSYEYAKGSRQTMPWTFHVGYRYAW

SEC ID N°: 37 secuencia polinucleotídica de la Orf19

Atgaaaccgacttccatcctggcacgtttgccccgctatctcgccgcctgcgcgctggcc
Gcgtggccgcgctggtgtgcgcgcgctgcgcgcggcgagccacagactccgctgccc
45 Gcgggactcggcgcccgaggtgcccagatattgtccggcctgcgctccgatgccctg
cgccagcagcgctcgtggtggcgccgctgttgcccccctatctgtcaggcctgacg
gatgcgcaattgcggcaatatgtgcaggcgctgacaccgggcagatcacgcaggggctg
gcggcgcttgacgcctgcgcagcgtgcgcggctgcagcgcgaattcgaacggcgagcgcg
50 cggcaggtgcagcagcggtacggggcgaggtgcgcgcgcagcgcgcggcggtggcg
atggggcagagcgcatcgatgctgctgctgcagcgcgagatgggaacctggcgcaacgc
cagggcgatctgcgcgcggccacgacgagggcgcccttctggcgcgcgccagcgcgcaac
cgcttcaaggtcgatacgccggacacaccggcgctcgacctgcgcgtggagtacctgacg
ctggcgcccgaccatggctggcgccctggacacggggcggtctatctggcgccctacgc
55 ggcgtctcgccgcgcccgcatggatgacaacgacatcatgcacggccggatcgaaagcgg
ttcctgggcacgtacctgacttatgtggacaacggcggttctacgtcgatgcggtcagc
aagctggggcgatcgacgagtcggtgtcggttcgacctgccgctggggctggggcgactac
gacgacgatatatcgcatacaacgtatcggggcagtgccgagggccggctatcaactcaag
60 ttgcccgaacgctggttcgtcgagccgcagggcgaggtgatctactgcgcgagcagccag
acgtcggtgcagggcgggcggtgcgcgcggcgccgggatttaccctggccggcgccg
gcgaccttgcgctccttatgtcagcgccctcgtaacctgcacgagttctgcgcacgagctcg
gtcgatttcggcggaagtcgtacgatgccgaactgcccggcagccgctggcagctgggt
gccggcgccgctggacgtggggcgcatcgccgctacgcggatctgcgctatgggcac
65 ggcgccaacatcagccaggacctgtcgctgaacatcggtacgcgtaccgcttctag

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 38 secuencia polipeptídica de la Orf19

MKPTSLARLPYLGACALAALAVAPLAPAQAQTPLPAGLGAAEVRQYLSGLPSDAL
RQQASWLAPALLRPYLSGLTDAQLRQYVQALTPGQITQGLAALTPAQRARLQREFERQAR
RQVQQAVRAEVAARSARAVAMQSASMLLLDAEMGTLAQRQGLRRGHDEGAFWARGSAN
RPFKVDTPDTPAFDLRVEYLTGLADHGWRLDTGRLYLGAAYAGVSRARMDDNDIMHGRIESR
FLGTYLTYVDNGGFYVDAVSKLGRIDESVSFDLPLGLGDYDDISHTTYTGSAEAGYHPK
LPQRWFVEPQAQVIYSRSSQTSVQGRAGVRAGRDFTLAGGATLRPYVSASYLHEFSHDDS
VDFGGKSYDAELPGSRWQLGAGAAALDVGAHAYADLRYGHGANISQDLSLNIGYAYRF

SEC ID N°: 39 secuencia polinucleotídica de la Orf20

Atgggtcggcaggagttgtcatcgtgcagggtggttataccgggacacctctcttataac
GccgcaaaactgtgcttatcccggaacgcccaatcggtttctggttccggtcagGtgctcg
Aacggggccgatcacgtcacgcactgggtggtggcggggaactgatcgtcggggatacgc
Ggcggccgggaccttgcctcatcgaggccggcggtaccgtgctcaacgactgggcctatatac
Ggcagtgacaatggcgctgtgggcacacctgacggtgtcgggccgcgacggcgccggggcc
Gcgtcgacctggacgactgtcgacgatgtgtcgatcggcgttgcggcgggcagcagggggc
Acgctcgagggtgctcggcggggccaggggcgaaagcggtatggggcaccatcggcgtcgct
Gcaggcagcgtcggaagcgtgaccgtgtcgggcccggtcggtgtggaatatcgccacg
Gtcaattcggtccagatcggtcgggcggcagcggaacgctgtggatcgaccagggcggc
Gcagtgatagcgggcaggcgctcatcggttggaaccccggcagcgacgggcacgtcacg
Gtattgggtccggcaacggtatggaacccgctgaacaatatctatgtcggtctcggcggg
Actggtgaactggatatccgggacggcgcgccgcttgcgactgcagggtcgagcccgccg
Ggcggcgccgatcgatctacatcgggacgagcgagggagcgccggcagcgtaacggtg
Tcgagcgcgacggcgctcacctcgacgctcacgtcgaccgaccgtatcgaaatcggtcg
Gccggcgccgggtgctgactgtcgccaaaggcggtatgggtggcgctcgccagcgacgcc
Tgggatgccatcacggcgacgtcctccggaacgctgaacctgaccggcgatgccagcggc
Cgaggcggtgctggaacgggtcggtcatcaaggcgccgggaacgcgacctcaacctg
Gatggcggggtcctgcgcgccaatcgtgacgaggccaatttctcaatgggtttctccacg
Caggcggtgggaagcggcgcgcctggttcgatacgaatgccatgacgtgggcgttctc
Accgccttctcggtacgtccagcttcaacaagctgggagccggcagctgacgtgtca
Ggcaacagcgcccggttcacggggaacacggatatacaggccgggaacgctgcaggtggac
Ggcgttcttggcgggccggtggatgtgctggcgggggcgcggttgaccggtaccggcggc
Gtcggtgcgacggccaacaaggccaccattgcgcggggcccgcgacggcttgggcacc
Ctgacgatcgccggggatatacgggcccgaggcggaacctggaaatccgtacgcagctt
Ggcgcgacgactcgccgacgcagcgatgggtgatcacgggcgcccagcgctggcgtagaca
Cgggtcacggtcgagaatatcggcggcagcgccgctcgaccagcggggcatacaggtc
Gtgacggtcaatggcgcttcggcaggccggttcaacctcgccaacggcgatatactcatc
Gagggcgctccggcgctggtggccggcgccctatggctatgtgctgcagcaggacggcgcc
Gacggcgatgggtatctgaaatcgctcgctgccgacccctggggctccccaggcgggggc
Ggtctgccggggcgccggggagcccggtgcttatcagcccgcggtgcccgtctatgaagcc
Tatgccaacacgctgctgcatctgagccggcttccaccttgogccaacgggtcgggcaat
Cgcctttatgatccggcgatgtcggcggcaacggcggtatggagcccgctcgagggtcc
Gcgagccagctcgatccttcgcgctccacgactggcgaaacggcaggacgtcgatagctgg
Aaagtgcagttcggtgtcgaccgtatcctggccggcgggcaagagggtccgcctggtg
Ggcggattggcgctgcagtacggcaaggccgacacgcgcgtgtcgtcgatatacggcaat
Ggcactgtcgacgccacggcctatggcctgaccccgacgctgacctggtacggcagggaac
Ggcgcctatgtcgatgccaggcccaggcgatctggttcgacagcgacctgagttcacgg
Ctggccgggcaagctcaaggatggccggaaagcgcatggctatgggctgggtatcgaaagc
Ggcaaggccttcggattcggggaggggctggccctgatccgcaggcgcaattgtcgtac
Gcatcgaccgcttcgacagcttcgacgacagattcgccgcccgcgtcgaaagcagataag
Ggcgacagcctgcaggggcgtctcgccatcgcgctggactacaagagcagctggcaagcg
Ggcggcgcgaaacgggagtcgagtgcttcggcatcgtcaatgtgaagcatgagttcctg
Gatggcacgcgcgtgctgcttgcggcggtgcccgttaagcagccgcatggcgcgacctgg
Ggcagcgctgggagtgggggcgattacggttggggagaaacgctacgccatttacggccag
Gtgagcgccgatgcagatttcgcggcgacgtacatcgtcacccgacccgggggtcagg
atgatgttctag

SEC ID N°: 40 secuencia polipeptídica de la Orf20

5

10

25

30

55

60

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 43 secuencia polinucleotídica de la Orf22

Atgtgcgacacctgcagagatgatgatggcacctcgccttcgattcggtccaaggcggg
Gttgttcagggcggcatgggtgcaaataacgtcgctgtggtggcaacagggtctggaaag

Gtcgcgatcgagaatgcggaactgctcggagccagcggcatgtacgccacgttcggcgcg
caggtcgatatgaaaggcgggcgcattctggcgcaaacaccaatatcctgggaagccag
ggttacgccgatggtccctatggcgccgtggtcgtgacagaggacggtcaagtcacactg
gagggcgccaaggtcagtgcaactggcctggggccgcggcttggtggttgctggcgac
aaggacaccagcccgcgagccagcctgcgcaacaccgacgtccacggagaggtcgccgcc
attgcgctgggggttcaatggcgaggcgaacatctcggcgccagcttgagcgtagaggat
ggggccggtgctcaccacctgacgccgatgcagtcgagttactacgactacgccttg
tccatggagcatctgccagctgatgcgcggttgacgcgggtccggtcagctgtccgat
ggcgcgccgcagcggagaaacgttgatcgcgcatggcggggttggtgcccatagcctg
cgcttgagcagcggggtcgacgcggcgccgacatcgtcacgctgccgccttcggcgccg
cccgattccgcggagcaaccggatgcccagcgggaaccggatgcccagctggaaaccggac
gccgcggcgagtcggacgcgaaggcgaatgcgcgggtcatggcgaggttagatggcggg
gaacctgttgcggtgccgatcccggcccttcgcatcccgatgcccgatcgacgtgttc
atcgacagcgggtgcccataggcggggcatgaccaagaccgtcaatgcgttgccgcatcgag
gacggcacctggaccgtcacgggtcgtccacggtgaacagcctgcacctgcaggcaggc
aagggtggcgtagcgaacgcctgcccgaagcgacggagaaatcacaacacctgcccgtcaag
acctctcggaagcggtcgttcgagatgaacgccagcgcggacctgagcgatggcgac
ctgctggtcgtgctcgacgagggccagcgggcagcacaagggtgctggtgagggagccggc
acggaacccaccggttggaaggcctgacgctggtcgagctgcccagggcagccagacg
aagttcacgcttgcgaacccggggcggtggtcgacgcggcggttcgctatcgcttg
acgcgggacaacggtgtctggggcctggaacggaccagccagcttcggccgtcgccaac
gcggccttgaataccggggcggtggcgcgccagcagcatctggtatgcccgaaggcaat
gcgctctccaagcgcttggcgaggttgcggtcgatcccggcgcgggcggttctggggg
cgacggttcgcccagaagcagcagctcgacaacaaggctggccgaogcttcgaccagaag
gtgtacgggttcgagctggggcgccgacctgccatcgaggacagcaaggcgctggcac
gtggcgggcctgctgggtatacccgcgcaaggcgagcttcacgagtgacggcgccggg
cataccgacagcgcgcatatcgggcctacgcggcgtacgtggcggaacacggcttctat
tcgattcgacctgcccgcagccgcttcgagaacgacttcacggtaacggccaccgac
gcccgttccgtaggggcaagtagccggccaatggggtaggcgccaccttgaggccggc
aaacgtttcacgttgcaogacggctggttcgctgaacctcagtcgaggtgtcgctgttc
catgcccagcggcggaacctaccgtgcccgaacaacctgtcggtcaaggacgaaggcggc
acctccgctgctgcgctgggttgcgcgccggcgagcgcacgacctgggcaaggac
cgctgtagccagccctatgccacctgagctggctgcaggaattcaaaggcgtcacgacc
gttcgaccaaaccgggtacgggctgcgcaccgacctgagcgggtggccgggctgaattggcg
ctgggcctggccgcccgttggggcgcgccaccagctctacacttcgtacgagtagcc
aagggaacaagctgaccttgccctggacgttccacctgggtatcgctacacctggtag

SEC ID N°: 44 secuencia polipeptídica de la Orf22

MCDTRCDDDTSPSIRVQGGVVQGGMGANNVAVVATGSGKVAIENAELLGASGMATFGA
QVDMKGGRI LAHNTNILGSQGYADGPYGGVVVTEGQVNLEGAKVSATGLGAAGLWLLGD
KDTSPRASLRNTDVHGEVAAIALGFNGEANI SGGSLSVEDGAVLTTLTPDAVEYYYDYAL
SMEHLPADAPLTPVRVTLSDGARASGETLIAHGGLLPMTLRLSSGVDARGDIVTLPPSAP
PDSAEQPDAPPEPDAAEPDAAAQSDAKANARVMAQVDGGEPAVAPI PAPSHPDAPIDVF
IDSGAQWRGMTKTVNALRIEDGTWTVTGSSTVNSLHLQAGKVAYATPAESDGEFKHLRVK
TLSGSGLFEMNASADLSDGDLVVSDASGQHKVLRGAGTEPTGVESLTLVELPEGSQT
KFTLANRGGVVDAAGAFRYRLTPDNGVWGLERTSQLSAVANAALNTGGVGAASSI WYAEQN
ALSKRLGELRLDPGAGGFWRFTFAQKQQLDNKAGRRFDQKVYGFELGADHA IAGQQRWH
VGGLLG YTRARRSFIDGAGHTDSAHI GAYAA YVADNGFYFDSTLRASRFENDFTVTATD
AVSVRGKYRANGVGATLEAGKRFTLHDGWFVEPQSEVSLFHASGGTYRAANNLSVKDEGG
TSAVLRRLGLAAGRRIDLKDRVIQPYATLSWLQEFKGVTTVRTNGYGLRTDLSGGRAELA
LGLAAALGRGHQLYTSYEYAKGNKLTLPWTFHLGYRTW

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 45 secuencia polinucleotídica de la Orf23

```

5      Ttgcgccagaccacgcgggtgccggtgcggtcgtcctgcgcggcgcgggcggtcgcgag
      Ggcgatgtcgtgcgcgcgcccagagacggcgccggagaaagatgggttcggcacgcccgtg
      Cggccgggttgcgcgtcgggtggaccaggcgccgctcgagctcgatgtggccgacggc
      gcgcagtggcatggcgcgactcagtgccttgacaggctggccctgggcgcgggcggccaa
      tggcgcatgagcgcgccatccagcgtgggcgaactgagcatggagcctggcgcgccgtc
10
15      gtgttcggcgatgcggccggaccgggttttcaaacgctgacggtgcgcaccctggcgggc
      gccggttcgttcgagatgcgtgcggacgcgcgctggagcatgccgatcaactggtggtg
      accgaccaggccgaaggcgccatcgctgtggttgcgcgcgcggccggcgccgagccg
      tcgaaggcacaggccgtgctggtgcgcgcgcccgcagacggcaaggccagtctcgaactc
      gacggcagcgacggcaggccgacttcggcaoctatcgctacgggctggcgacgagccg
20      ggcggcgccctggggcctagtccaggacggggtattcgtccaccgcgcgcggcgctggat
      accggcggaactgggcgcggtgcaggggttgcgtggtatgccgaatccaacgcgttgggcaag
      cgcattgggcgaattgcgcctgaaccggacgcgcggcgccgctggggccgggcttcagc
      cagcgccagcgcatcagtcgcgcgcgggcccggcatttcagcaaggcgtcagcggcatc
      gagctgggcgcgcgaccgggctggccgtggcgggcgccgttggcatgcgggctggttgc
25      ctgggctacacgcgcgcgtcacgcgggttttcggccagggaaggggcacaccgacagc
      gtgcacgtgggcggctatgccacctatcgcgcgcaatggcgtgtacgccgatgccacg
      ctgcgcgccagccgcttcgagaattcgttcgacgcacctggctgggcggggcgccacctg
      tccggcagctaccgcgccaatggcgtggcggtgacgctggaggccggccggcgctcggcg
      ctggaccggcactggttcgtcgagccgcagccgaactggcgtggttcgtgccggcgcg
30      ggtaogtacacggccagcaatggcctgcgtatcgaggatgacggcgccagctcgctgcag
      gcgcgggtaggcgcgcaagccggccgcccgttcgaactgcgcggcgcgcggtggtgcag
      ccctacgcgcagctgagtgggtgcaggaactcaaggcggtgagcacggtgcgcaccaac
      ggcattcgcgccacctaccgacctgggcgcgggcccgcgtcgaactgggactggcgctggcg
      gccgcgctgggcaagggccacaatctgtacgcgtcgtacgagtagcgccacgggcccagg
35      ctcagcctgccgtggaccgtgcagctgggttaccgctacgcttggttaa

```

SEC ID N°: 46 secuencia polipeptídica de la Orf23

```

45      LRQTFVPVRLVLRGAAVAQGDVVRAPETAPEKDGFGTFVRPGLRVGLDQAPLELDVADG
      AQWHGATQSLDRLALGAGGQWRMSAASSVGELSMEPGAAVVFGDAAGPGFQTLTVRTLGA
      AGSFEMRADAALHADQLVVTDAQEGRHRVWLRAPAGAEPSKAQAVLVRAPADGKASFEL
      DGSDGRADFGTYRYGLAQPPGGAWGLVRTGYSSTAAALDTGGLGAVQGLWYAESNALGK
      RMGELRLNPDAGGAWGRAFSQRQRI SPRAGRHFQOGVSGIELGADRAWPVAGGRWHAGWL
50      LGYTRASRGFSGQKGHTDSVHVGGYATYIGANGVYADATLRASRFENSFDAPGWAGRTV
      SGSYRANGVGVTLEAGRRLALDRHWFVEPQAE LAWFRAGGGTYTASNGLRI EDDGGTSLQ
      ARVGAQAGRRFDLRGGAVVQPYAQLSWVQELKGVSTVVRTNGIAHRTDLGAGRVELGLGVA
      AALGKGHNLYASYEYAHGPRLSLPWTVQLGYRYAW

```

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 47 secuencia polinucleotídica de la Orf24

5 Ttgccttcgcccgaagaggcgctcaggcggggcccgacgcgtccaagcagcggccg
 Gagggcctgcccgccccgatgccaatccccaccgatgcaaagcccggagctgagatg
 Aaaccggcctgggggtggaaccggacctgaggcggaaacctggtccgcaggggcagcct
 ggccccagcctggagcccgccgaggacgagccgcacgcgcagccgctgccgcccgc
 ggcaaccggcgctgggatttacctgccccgcagcggcatcttgaccgcaccggttctg
 10 gccgtgctgggcacggccagtgcgcgcgaaggtatctggcaggcagagatgaacggcctg
 agcaagcgcatgggtgaattgcggcttacgccggcagccggcgggcggtgtgggcacgctcg
 ttgcgcgaacgccaacgcctggacaatcaggtggtggacaggttcaccagaccgtgggc
 gggatcgagattggcgccgacacggccttgccggcgcccgagggggcgctggcatgtaggc
 15 gcggtggcggtacagccgtgcgcgcgcgaagctggcgacagcgcccggtggcaacagc
 gacagcctgcatgtgggcgcctatgcgacgtatatcggcgacggcggttctacctcgac
 gggattgtgcggtgaaccgctacgagcacgatttcagggtgacggccagcgcgggcgcg
 cgctgacgggcaagtatcgcccaatggcatcgggctgtcgctggagaccggcagggcg
 ttacacatgggcggcgactggttcgtggaaccgcaggtcgaagtggcgctgttccgttcg
 20 ggcgggcagactacacggccagcaatggcgctgcgcgtcgacgtggcaagcaccagtcg
 ttgctgggcggcgagcctgcaggtgggacgcaagctggatctgggcaacggcaactg
 gtgcagccgtacgccaagctgagctggttgcaggagttcgatggcggtgggcaaggtgcgc
 accaacgatatcgcccatgacgtcaaactgcggggcgggcgccgaactcgacttgggc
 gtggcccgggcgcttggcaggcacagcagcctgtttgcttcgtacgagtacagcaagggc
 25 agccgcttgaccattccgtggagctttcacgtcggtatcgatacgccctggttaa

30 SEC ID N°: 48 secuencia polipeptídica de la Orf24

35 LPSPPEEAPQAGPDASKQRPEGLPAPDANPQPDAPGAEMKPRPGVEPGPEAEFGPQGQP
 GPQPGARPQDEPHAQPLPPAGNPGAGIYMPRSGILTAPVLAVLGTASAPQGIWQAEMNAL
 SKRMGELRLTPAAGGVWARSFAQRQLDNQVVDRTQTVGGIEIGADTALPAAEGRWHVG
 AVAGYSRARRKLAHSARGNSDSLHVGAYATYIGDGGFYLDGIVRVNRYEHDFRADQQRGA
 RVTGKYRANGIGLSLETGRRFTWAGDWFVEPQVEVALPRSGGADYTASNGVRVDVASTKS
 40 LLGRAGLQVGRKLDLGNGKLVQPYAKLSWLQBFDGVGKVRTNDIGHDVKLRGGRAELDLG
 VAAALGRHSSLFASYEYSKGSRLTIPWSFHVGYRYAW

45

50

55

60

65

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 49 secuencia polinucleotídica de la Orf25

Atgagacgggttaaaggccaggtttcgagggcagccgcagcaggccggcaggacatggg
 Gtggcgccctaccttgctggcgctggccctgggggtccaggggggcgccggcggtgggccaat
 Tgcacgacgtcaaacggtgctaccacttgacccaacgccaaacggctctcataccaacaag
 Gtggcgagtgaccgagcgggatgaacgaacgcgtcacctgaatcagggggcgcgcatc
 GAgacaaacgccagcgcggcgatcagtggtgggaacgagcgggcaggtacgaatcgaggggc
 Ggtgcagtagtgcaaagcacgggtcaatactgctgcgtccggccagtagcgcacaaacgctg
 Gaagcagcaagcaataacaatatctccatccaagtaaacgcgcagctcctggccaaggggc
 Agcgcttcgcagtcacgcgcgttgggattgtcaggcgcgcggcaataccgtcaccaaccat
 Ggcacgatccgggcccagataatgcgcggcaatctgggtcactgccaataccgccaatgcg
 Gccaataccatcgataactacgggactatcgaaacagtgtcaatggcggtacgcacaac
 Gccatcggcagcagcgggaacaacagtgccacgggcgctggcgtagcggtacgcaatcat
 Gccaacggagcgcctcgtcggaacgtgaagttcgagggtggcgacgacagcgtcatactc
 Gcggcggtctctaccatcacgggatccttgaaacgggtggcagcggcaacaacagcctgacg
 Ctgaaagccggcgagcagcgtgggcgcgcgaatccgcaacttcggcacgatacacaag
 Caggaggttgaacctggacctgaatggccaggtcgggccgaacgacacaacacctcaag
 tccacgggtcaaggtggaggcggcacgctggtcttgccggcgataaacggcgcgccacc
 caggcgcggtgttgacggtgtccgcggcgctacggcgagcgtaacgtccgcccagcgcc
 atgcagtcctcagcaacgcgcggcacgggttcagttcacgcaggacagcaatggcgccctac
 gccggcggtgctgagcgggacggcgagcatcgtcaagcgcggcgcgcgagcctgacgttg
 acgggcaacaacaccataccggcaaggtggtggtggaggcgggcagcctcagcgtatcg
 gcggcaacaacacctgggtggcgcgaggtagltcggtacagctcaaggcgggcgccctcgcc
 ctcaagaaaaccatcgtcgtcaatcgcgccctgacgctcgattccggggcgagacgttg
 atcatcgagccgggaacaacacacgacctggcaaggccaggttagcggcgccggcaaacgtg
 gtgacccaggcgcgacgctggtgctggagcacgcgtccaatacgtatagcgggcggtacg
 gagatcaacaacggaacgctgcgggcggcgcatgatgccagcctgggttccggcacgttg
 gcgctcaagaacagccagctggcgccacggacagcttcacggccacgcgtgcattgacg
 ctgcgtggaaacgaaagcatagacgtcgacgccaccaagataactcagttggaacggcgaa
 atcagcgcgccggcaccctgggtgaaggaaggccaggggaccttgctgctgcgcggaacc
 aatcagcaaaatggcggcacgacgctcaatgccggtacgctgcagatatcccgcgacgcc
 aatcttggccgagggcgctggcgctgaacgacggcacgctgcagagcacggcgagcttc
 gcgacctcgcgcgcgccaccttgccggcgccaggccaccatggaggtcgacgcttcgcat
 accgtgacctggaatggcgagctgagcggcgcgcgcatggtgcgcaagtcaaggccaggc
 acgctggtcctggccggcgccaaacgctactcgggtggcacggtggtcgaggccggcgcg
 cttcgggcaggacacgaagacaacctgggacggggcgcaataacctgcaggggcgagat
 ctgcttgccggcggcagtttttcgagcaacgcgcgatctcacgcttgtccgggttccttg
 gacgtggtcgcgacgctacctgacctggagcggcgcgatccggcgccggcgatctg
 gtcaagaaaggggacgggcgctgacactcacgggcgtcaacgagtagcggggccagacc
 gtgctccggggcggaagctgcgtgtggccagggaagcaaaacctggcgccgggagcactg
 gtgctggaagacaataccgtgttcgagagcatgggtcgcatgccgccacgcggcaggtc
 acgctcaaggcgcgcccaaggtagagacgcttgacggcactacgctcgaaatggcgcggc
 acggtcgacggcgacggcaagctgtacaagcaaggcgggcgacgctcgtgctgagcggc
 aacaatacctacgccaaaggcgctcgaggtctggggcggggtcgtgcaagtctctcgcgac
 cagaacctggggcgggccaatggcgcggtcacgctcaacggcgcggggttggcgcgcaac
 ggggatttcaccagcaatcgccagctggagctgacgcgcggggccaaggccatcgacgtc
 gcggccggcaaggacgtgacgtggcgcggtgtcgtcaacggcgccggcgcgctgaccaag
 gccggcgacggtagcgtggcgctggcgggcgccaaacacctacacggcgggcacgcgcttg
 caggggcgacacgtgcaggtatcgcgcgacaacaacctcgggcaggcgcgcgcgcggtc
 acgttcgacggcgggcggtggccaacacggcgagcttgcgacgcgcgcacggccacg
 ctcaacaaggctggccagatcgataccgacggggcaccacgctgacatggaacggcgcc
 atcggcggaaggcgagctgcgcaagcaaggggcgggcacctgggtgctggcgagacc

ES 2 346 314 T3

aacacttaccagggcgacacccggtcgaggccggcacgctgcaagtgtcgggccgacgcc
 aatctggggccagggcgccgtgcatctgcacgacagccggctggcgacgacccgtacgttc
 ggcagcctcgccgctctggagttgaccggacgtggcgccgtgcaagcggctgcccggcc
 5 acgctggattggcgccgggacggctcgctggcgccggcacgctggtaaggaggcgccagggc
 acgctgggtgctggccgggtgacaaccagcatgcccggcgccacggaggtcagggccggcacg
 ctgcaggtatcgccgcccacacactggggcccgccgctggcgctggagaaacggcg
 ctggccacgacccagcttcacggccacgacggcagccaccctgactggcaacggccg
 atcgacacggccggccgacacgctgggtggggagggggccatcgccggaaacggcgagc
 10 ctgcacaaaaagggcgagggcaagctgggtgctggtcaaggacaaccacccatgacggcgcc
 accacgatccacggccgtaccctgcaggtgtcgccgacgcccacactgggctcgggacag
 agcgccgtgacgtggatggcgccgcccctggcggtttctgcgggttctccagcgccg
 gagatcgtcgtggcgccggcgccgcttctgggtgacggcgccacacccctgcaa
 tggcgagggcgaggtcgccggggcgggggcggttgaccaagacggcgacggcacgctcgtg
 15 ctggagcacgacaataccacgcggcggtaccgggttaccggcggggtgctgcgcgtc
 tccgcgcatgagaacctggcgagggcgcatggcatgctgacgctcgacggcgccacgctg
 tcgaccacggccgggttcgagagccggcgcaacgccacccgtgggcaacggcgccggccgg
 atcgtcgtcgccgacggccgacgctggatttgcaggcgacgttgcggcgccggcgccgg
 ctgggtcaaagagggcgccggcgacgctggccttggcgccgacgaacacccatcgccggcgcc
 20 accgtggtcgagggcgccgacgctgggggtcgccgcccagccacactggggggcgccg
 ctgacctgaacaacagccgctgcatgacgacggcggtttgccacggcgccgcatgacg
 accctctccggcgccgctcgatcgacacggcgacggcgccgacgctgcaatggcgccg
 acggtcaatggcgccggcgaggtggtaagcagggccctgggacccctggtactggagggc
 gacaacgggtacggggagggcagggaggtcaatgcccggcagctgcaggtcgccgcccagc
 25 gccaacotggcgccggcgacgctcaatggcgagcagccctggcgccgacggcgccg
 ttcgccacggcgccgacggccacgctgagcgccgcccggccatcgacaacggcgccgacggc
 gccaccttggactggaatggcctgctcgacgggtgacggcgccctggtcaagcagggcaac
 ggacccctggcgctggccggcgcccaacgctatggcgccggcaccatcgtcaaggcgggc
 gccgtgcccgtcgcccgcgacgccaacctggggcgggcgccgacccggcgtaacgctggac
 30 ggcgccgctggccacacggcggtctcgccgacggcgccgcccggcgacccctggcgccg
 gccaacggcgacgctggacgtggcgccggcaccggcctggactggaacggcgccgcatcgcc
 ggcgccggcgccgctgaccaagacggcgccggcaccctggcgctcaaccacgacaaccag
 catgcccggcgccacccctggtccatggcgccagctgcccgtcgcccgcgacgccaacctg
 ggcgccggcgccgacggcggtgacgctggacggcgccagctggccacacggcgctcgttg
 35 gcgcgcgagcgccgctgcccgtcgggcgccgcaacggcgctatgctgcccggcgccggc
 acgacccctggattggcgggcggtggtcgccggcgccggcgaagctgaccaaggcggtcg
 ggacgctggtgctcagcgccgataaacggccatggcgccggcagggcagtcacggcggt
 acgctgcaagatttcgcccgacgccaacctggcgccggcgccggcgccctgacgctggac
 ggcgccacccctgctgagcaccggcagctttgcccggcgctgcccacccctcgatgcc
 40 gcggcgccgacccctgctcaccggcgacggcaccggcgctggattgggacggcgccgataggc
 gggcggggtggcctggtcaagggaaggcgccggcgagctggcgcttggcaatgccaatacc
 taccagggcgccgacccgcatcgccggcgccggcctggccgtcaacggcgacatcgccagc
 ccggtcacggtcgagcagggcgccgctgctggcgccgacggcgccgcatcgtcggggagt
 45 gccaacotggcgctggtcgccggcgcccaactcgatcgccggcttgacgggtggcgccgcaat
 tacgctggtacggcgccgacgctggaagtggagggcggtgcttggcgccgacgcccggccg
 gccgatcggtggtgctcgacggcgccgcccagcgccgctcacggcggtcgtagtcaag
 ccgagggcggggtggcgccgctgacctgcccggcattccgggtggtcgggccaggggt
 ggcgccacgacggcgccggggccttcggcctggcgccgagcgctggtcgccggcgccctac
 50 gagtaccagttgctgcccggcgccggcgacggcgccggcgccgagggcgcaagactggtac
 ctgctgacctcccgctcgagcgccgacaagcgccgagggatcgtcaaggtcgtgccccttc
 taccggcgccgaggtggcgctgctatgcccggcagcccatgctgatgcccaggtcgccacg
 gaagcgctgggcagctacggcgacggcgccggccagccggcgccggcgcccgagggca
 ggcgccgacggcgccgctggcgcttggggcagctacccctcgggcgctcggttcgagggcctcc
 55 gcggcgacgcaagcgccgcccgtcttcaacggcagccctggccggcagtcagctggcgccg
 gacctctacacgctcgctcgcccaacggcgatgcccagccttcggcgctgttcggcgga
 tacgccacggcgccggcgatgctgcccggcctggcgccggcgagatccagggcggtggc
 acgtccacgctggggcgcccgacgctggcgccctactggacgacactggtccgagggc
 tggtagctcgacacggtgctggcgggcagcgctacaagcagcagaccagctcgtcgcc
 60 catgctggcgccgacagcgccgctggggcatgatggcctgggtggagggcgccctaccg
 tggcagctcaatccgctgggcaaatcgagcccgagggccagttggtgctatcagcagctt
 ggcatcgccaatggcgccgacggcgctgcttcgggtgctcgtacaagacggccgagtcgctg

ES 2 346 314 T3

acggggcggtgggcaagcgccctggcgggccagtagcgcatacgggaaggcgagttgcgg
ccgttcatggcggtatcgctgctgcacgatttcaccggcgccgacacgggtcacgttcgcg
ggcggtgcacagcgtagcgccagccgccaagacacggccggtggatctgaaggcgggcggtg
gacacgcagctgggcaagagcgtaggcctgtggggcgaggtcggtacggcaagtcggtc
ggcagcgcgacggcagcgaccgtggctggagcgccaacctggggctgcgctggcggtat
tga

SEC ID N°: 50 secuencia polipeptídica de la Orf25

MRRLKAQAFEGSRSRPAGHGVAPTLALALGFQGAANCTTSNGATTCTNANGSHTNK
VSGSPSGMNERVTVNQGARIETNASAAISVGTSQVRIEGGAVVQSTVNTAASQYAKTL
EASNNNISIQVNAQLLAKGSASOSSALGLSGAGNTVTNHGTIRADNAAIWVTANTANA
ANTIDNYGTIETVLNGGYANAIGSTRNNSATGAGVTVRNHANGRI VGNVXFEAGDDSVIL
DGGSTITGSLNGSGNNSLTLKAGDGLTGRAIRNFGTITKQEAGTWTNLNGQVGRNDNNLK
STVKVEGGTLVLRGDNAGATQGGVLQVSAGATADVTAAASAMQSI SNAGTVQFTQDSNAAY
AGVLSGTGSI VKRGGGDLTLTGNNTHTGKVVVEAGSLSVSAANNLGGAGSSVQLKGGALA
LKKTI VVNRGLTLDGSAOTLIIEPGTTTTWOGQVSGAGKLVTOGGTLVLEHASNTYSGGT
EINNGTLRAAHDA SLGSGTLALKNSQLAATDSFTATRALTLAGNESIDVAATKILSWNGE
ISGAGTLVKEGQGTLLRGTNOQNGGTTVNAGTLQISRANLGRGALALNDGTLQSTGFSF
ATSRATLRGQATMEVDASHTVTWNGELSGGMLRKSGQGTLLVLAGANTYSGGTVVEAGA
LRAGHEDNLGRGAITLQGGDLLAGGSFSSNRDLTLVRGSLDVAR DATLTWSGAISGAGDL
VKKG DGRLTLTGVNEYAGQTVLRGGKLRVARDENLGRGALVLEDNTVFESMGSHAATRQV
TLKGAPKVETLDGTTLEWRGTVDGDGKLYKQGGTLLVLSGNNTYAKGVEVWGGVVQVSRD
QNLGAANGAVTLNGGGLAANGDFTSNRQLELTAGAKAIDVAAGKDVTRG VVNGAGALTK
AGDGTLLALAGANTYTGCTRLQGGTVQVSRDNNLQQAAGAVTFDGGRLANTGSFATARTAT
LNKAGQIDTDRGTTLTWNGAIGGKGLRKQAGTLVLGGANTYQGDTRVEAGTLQVSADA
NLGQGA VHLHDSRLATTGTFATSRRLTLTGRGAVQAAAAATLDWRGTVAGAGTLVKEGAG
TLVLAGDNQHAGGTEVRAGTLQVSRATNLGPGALALENAALATTASPTATQAATLTGNAA
IDTAAGTTLGWEGAIGGTGSLHKKGEGKLVLVKDNHHDGGTTIHAGTLQVSRDANLGSQ
SAVTL DGGALAVSAGFSSGREIVVGAGHGALSVTGGHTLQWQGVGAGALTKTG DGTTLV
LEHDNTHAGGTRITGGVLRVSRDENLGEAHGMLTLDGGTLSTTAGFASRRNATVGNCGGR
IVVADAATL DLQGDVAGAGRLVKEGAGTLALGGTNTYAGGTVVEAGTLRVARDANLGGGA
LTLNNSRLHATAGFATGRDATLSGRASIDTDDRATLQWRGT VNGAGRLVKQGLGTLVL D
DNRYAGGTEVNAGTLQVARDANL GAGDVALNGSSLAATASFATARTATLSGAAIDTADG
ATLDWNGLLDGDGALVKQNGTLALAAANRYGGGTIVKAGAVRIARDANLGRAGTGVTL D
GGALATTADLATGRAATLGAANGTLDVAAGTRLDWNGAIGGAGALTKTGAGTLALNH DQ
HAGTLVHCGTLRIARDANLGAAGTAVTL DGGTLATTASLAPERALRVGARNGVLLPDAG
TTLDWRGVVAGAGKLT KAGPGTLVLSADNRHGGGTAVTGGTLQVSRDANLGAAGALTL D
GGTLLSTASFASARVATLDAAGGTFVTRDGTRLDWDGAI GGAGGLVKEGAGELRLGNANT
YQGPTRI AAGRLAVNGSIASPVTVQAGVLGGTGRI VGDVANRGVVA PGNSIGALT VAGN
YAGTGGSL EAVEVLGGDAAPDRLLVLDGGAASGVT PVVVKPQGGVGGTLRLGI PVVVAQ
GATTAPGAPRLAQPLVAGAYEYQLLRGAGDGAQAQDWYLR TSVRERDKAGRIVKVVPF
YRPEVALYAGT PMLMRMVGT EALGSYRERAGQPGAAPEAGAAARRGVWARTFGRRFERS
AGSEAAPSPFNGSLAGMQLGADLYTRRSATRHADAFGVFGGYATARGDVRLARGEIQAVG
TSTLRAAQLGAYWHTGPGSWYVDTVLAGTRYKQQTSSSAHVGATSRGWGMASVEAGYP
WQLNPRWQIEPQAQLVYQQLGIANGADRVSSVSYKTPDALTGRLGTRLAGQYAYGKAQLR
PFMGVSL LHDTGADTVTFAGVHSVRASRQNTAVDLKAGVDTQLCKSVGLWGQVGYGKSV
GSGDGS DRGWSANLGLRVAY

SEC ID N°: 51 secuencia polinucleotídica de la Orf26

Atgttgcgaaactggagccccgatgcgtagcgcccgcccgctacccagcagcacttgcc
Ccggttgccggccatgctggcgccgcccggcctgctgcaatccttgggcgcgacgcccgcg
Gccgcggcctgtgcgcccacgctggcgccagccagcgggcagagcgtgcaatgcgacggc
Gccgtggtcaaccagtcggtcgaggcggcggccggcagccagaacgtaaccatcacggtg
Ggcggcgccgctggtctcgaccaacgcgacgcccggcgctgtcggtcgatgaccgcagc
Cgtatcgctcaacgaggcgacgtagcagatggcgggcgccggcgccctcgcgccggcgc
Atggtgggtttcgcgcaacaacacagttgatcaaccgcggatcgatcacgacatcgggc
Agcggcgtgcgcgccatctcggtgcccaacgtagcgagtagccgggagcgtggtcgacaac
Agcggcagcatccgacccagggcgccagcgcgacggcatcgccatcaacggcccgggc

ES 2 346 314 T3

Aaccgcgtccagaacagcggcgccatcacgcgtcaacggcaccgacgccaagggcggtgat
 Ctgcaggcgccagcccccgcggccaacgtactggtcaacggcgccacccatccatgcgcgc
 Ggcgccagcagcaacggcatattcgccccgcagcggtgcatgtgaacaccaccaacgcc
 5 Aacggctttcatgccgcgctcgagaacctgcccggcgggcgcatcctcagcgatcactcg
 Tatgcgctgcgcgggcagaaacggaacgataccttcatcaacggcggtacctgcaaggg
 Caccggcgggcgccggcgacacggcgctctacatgggccccagggcacgggcacgctg
 Atcctgcgcaccggctcgcccatcgccggcctggcgacggcgggcgggcgccagccat
 Gcgtatctggagggcagcggcacgggtggacaaccggttcgccaacttccgcacctgacc
 10 Atgcgcggcgccgactggcgctggacctcggaacggcggttcaccgaanagcggtggacctg
 Cgcaccggcacattcttcttgcgggcacgctcgccagcccgcccaaccgctggcgcc
 Ggcgggtgctggccggcaccggcacgctggccggcgcattgcgcaacggcggaatc
 Cggcccgcccggaacgacggcgagcggtacggcgcgctgacgggtgcgcggcgattacac
 Ggcgcggcgggcgcgctgcgcgtcaacacgggtgctggcgggcgacggggcgccctcgga
 15 Aggctgggtcatcgatggcgggcagcgcgggcggaacccccgggtcacgggtgggtcaacgg
 Ggcggggcagggcgcgctgacgcggcgacggcatcctgggtgggtccaggccatcaatggc
 Gcaagctcggaacggcgcgctctcgctggcgccccctcaacggcgcgcatacgag
 Tacaggctgtaccgcggcgggcgccacggggcgccgcggcgacagctggtacctgogctcg
 Cgggcctatctggtcgaggaccaactggcgggcgaccttgccgaagccgaggcgatcgcc
 20 Gacgacatcgcccgggcgaccggcgagcgccgagcatcgaggacacgcgctgtaccgg
 Cccgaggtggcgctgtacagcagcatcccatgctggcgggcgcatgggcctggccag
 Ctgggcaaccttccacgaacggcagggcaaccaggcgctgctggcgcgcgacggcgaaacgc
 Gtcgcgccctggcgcgcgcttatggcggaacagcaagcaggcgctcgacggcgatgcg
 Caacccggcatcgacgcccgcctggcgggcggtgcaactggggcaggacctctacagcagc
 25 Gtcgccccggacggcggaacgacacgcttcgggctgttcggcggtatggccaggcgcg
 Ggcgacacccacggctcgccggcgggcgagcggaacggcgctaccggcgcggtgacctc
 Gacggctacagcgctcgcggtactggacctatgtcgggcccgcgcggtggtacgtggat
 Gccgtgctggccaacacctggatggacatcgacacgactccaaggccggcgcgacgcc
 Gatacgcgcgccaggcgcttcacggcttcgctggaaagtggctaccgctggcgctgtcc
 30 Gacgctggacgctggagccgagcgagctcatctaccagcacacgcgctcgacgggt
 Ttctcggaacggcggtcgaggtgagcatcgcgacgacaacggcgctgacggcccgctg
 Ggcggccgggtgagggcgagtacggcgccgcgcgcaggtgtggcgccccctacggcgcg
 Ctgaatttctggcgaccttcagcgcgagaaacacggctcgctgctggcggaagacagcatc
 Galaccggcgcgcgcgacctcgctcgaaclgcyggcgggcgccagcggtgacgctggcc
 35 Cgcagcctggccctctacggcaggtggcctatgccaccagcatcgacagccagtatctg
 Cgcggcgcttcggcgcaqctgggqatgcqctacacctggtaa

SEC ID N°: 52 secuencia polipeptídica de la Orf26

MLRTGAPMRSARRRTPARLAPLPAMLAAGLLQSLGATPAAAACAPTLAPASGQSVQCDG
 AVVNQSVAAAAGSQNVITVAPGALFSTNATRALSVDDRSRI VNEGTIQMAGGAGASRGA
 MVGFGDNNQLINRGSITTSGSGVIRGISVPNVGSTGTLVDNSGSI RTQGASAHGIAINGPG
 45 NRVQNSGAI TVNGTDAKGVYLQGGSPAANVLVNGGTI HARGASSNGI FGPDPGVHVNTTNA
 NGF HARVENLPGGRILSDHSYALRGQNGDTFI NAGYLQGHGGAGRDTAVYMGPGQTGTL
 50 ILRTGSAIAGLADGGGAASHAYLESGTVDNRFANFRTL TMRGADWRWTS DAAFTESVDL
 RTGTFFLAGTLAS PANRLAAGAVLAGTGTLAGALRNAGEIRPGPNDGSGYGALTVRGDT
 GAGGALRVNTVL AGDGAASDRLVIDGGHAGGSTFVTVVNRGGQALTAADGILVVQAIN
 ASSDAGAFSLAAPLNAGAYEYRLYRGGATGAAPDSWYLR SRAYLVEDQLAGSLAEAEIA
 55 DDIGRRTGERPSIEDTPLYRPEVALYSSI PMLARRMGLAQLGTFHERQGNQALLARDGER
 VAAWARAYGGNSKQALDGAQPCIDARLAGVQLGQDLYSSVRPDGGQHRFGLFGGYGQAR
 GDTHGSAGGERDAATGRLTIDGYSVGGYWTYVGERGWYVDAVLANTWMDIDTDSKAGRDA
 DTRGQAFTASLESGYPLALSERWTLPEQAQLIYQHTRVDGFSDAVSEVRI RDDNAL TARL
 GARLQGEYAAAAQVWRPYAALNFWRTFSGENTVVLGEDSIDTRRGATSL ELAAGASVTLA
 60 RSLALYGRLAYATSIDSQYL RGASAQLGMRYTW

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 53 secuencia polinucleotídica de la Orf27

5 ATGCCTGCTCAACGCACTCCTCGCACCGCGGTTTGTGAGGCCACCGTCCGTTTCATCGCCA
 CGTTGGATCCATTGCACCGGATTCTGTGCTGTGCGCGCTGTGCGGGCATGCGGAGGCGGT
 GCGGCGGAGGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGCAGCCGGGCGGCGCGTGCGCCATCGGCG
 CCGCAACCGCCCTTTCGCCACGCCCGAACCTGCACCCGAGCGCGGCACCCAATCTGCG
 CCCAGGCTGCTCCGCAACCGCCGCGCCCGCGCTGGAGCGCCCGTCTCCCGCGCG
 10 CCACCGGAGGCTCCCCCGCCGTGATGCCGCGCGCGCGCTGCCGCTCAGCTGCCCGAA
 GTGCCGCGCGCAGACCTGCCCGCGTGCAGCGCGCGCTGTGACATAACGGCGCGCGCAA
 CGCACCGACTTCGTACGCCACCGCGCGCGCTTCTTCGCCAAGCAGGACAAAGCCCTC
 AACACCATCGACCTGAAGATGGCGCACGACCTGAAGCTGCGGGCTACCGCGTCAAAGTC
 15 GCGGTCTGCGACGAAGGCGTGGCGAGCGACCATCCGCTCCTGAACGTGAGAAGAAATAC
 GGTGGCGATTACATGGCCGACGGCACCGCACCTACCCGACCCCAAGCGCCAGGGCAGG
 CACGGAACCTCGGTGCGCCCTGGTACTGCGCGGACAGGACACCGACACGTATCGCGCGCGC
 GTTGCGCCCAATGCCGACCTCTATTGCGCCAACATCGGCACGCGGGCGGGCCAGCTCTCC
 GACGAAGCCGCTATCCACGCTTGAACGACCTGCTCGGSCACGGCATCAAGATCTTCAAC
 20 AACAGTTTCGCCACCGAAGGTCCGGAAGCGAGCAGCGCGTCAAGGAGGACCGCAACGAA
 TACCATAGCGCCGCCAACAAGCAGAACACCTACATCGGACCGCTCGATCGCCTGGTGGCG
 GACGCGCGCTCCTCATTTTCGCCCGCGGCAACGGCAGGCCATCGGGTCGCGCCTACAGT
 GAGGTGCGCTCGGTGCGACGCACCCCTCGCGTGGAGCGCACCTGCAACGCGGCCTGATC
 GTGGTCACCGCGGTGGACGAAAACGGCAGGCTCGAAACATGGGCCAACCGCTGCGGGCAA
 25 GCGCAGCAATGGTGCTGCGCGCGCGCCAGCACCGCTTACCTGCCCGGCTCGACAAGGAC
 AACCCCGCAGCATCCACGTGCAACAGGGCACGTGCTATCCGCGCGCTGGTCCCGCGC
 GCGCGCTACTGGTGACGAGTCTTTTCGCTGGATGGACAACGACAACCTGCGCACCCACC
 TTGCTGACCACGGCGCAGGACAAGGGCCCGTACGGCGTGCACCCGAGTACGGCTGGGGC
 GTGCTCGACGTGGGCGCGCGCGTGCAGGCGCGCGCAGTTTCGCTTCGCGGACCTCGTC
 30 GCGCGGTTACCGGATACCTTCACGTTTCGCAACGACATCTCCGGCGCGCGCGGGCTGGTC
 GTCGACGCGCGCGCGCGCTGGTCTTGCGCGGCTCCAATACCTATGCGCGCGCGCACCCACC
 ATCAAGCGCGCACCCCTCGACGTCTTTGGCAGCGTCACGTCCGCGCTACCGTCCGAGCTC
 GCGCGACGCTGACCGGCATCGGCACCGTCCGCGACGGTGACCAACGAGGCGACGGTCTC
 35 AACAAGGAGGCGCGCTGCACGTCAAGGAGATTACTCACAGACCGCGCAGGGCCTGCTG
 GTCACCGACATCGGCTCGCTGCTGACGTATCCGGCAGGGCCAGCCTGGCCGGCGCGCTG
 CATGTGGACGACATCCGCGCGCGGTACGTGCGCGCGGACGGGAAAAGCGTCCCGGTCTATC
 AAGGCGCGCGCGGTGTCCGGCGTCTTCGCCACGCTGACGCGCAGTCCGGGCTGCTGCTC
 40 AACGCCGCGCTGGACTACCGGCGCCAGGCGCTTACCTGACCATGCGGCGCGCGAGCGC
 GTCCATGCGCGCGCGCAGCGGGCGCGACGAGCGGCGTCCGCGTGGTGTGGCGGTG
 GCGGAGCGGCTCGACGCGCGGATGCGCGAACTCGATGCCCTGCCCGAGTCCGAGCGCGAC
 GCGCGCGCGCGCGCGCGCCCATCGGACGCATCCAGCGCGTGCAAGCCGCAAGGTGCTG
 45 CAGGACAACCTGTATTCTGCTGGCGCGCGCACCTACGCCAACGCCCGCGCGGTCAACACG
 CTGGAGCAGAACCGCTGGATGGACCGCTCGAGAACCACCTGGCCAGGCGCGCGCGGAG
 CGGTGGCGGCGCATCGCCGAGTATCGCCACGGCCAGTTGCGCTGGCGCGCGCGATGGCCTG
 CAAGGCCCGCAGCGCGGCAACGGCATCATGCTGGGCTGGCGCGCGAAGTCTCGGCCGCGC
 CTGAGCCTGGCGCGCGCTGACCCACAGCGCACGCACTGGGACGAGTCTCGGGCGCG
 50 CCGGCCCGGACAAACGCCCGCATGACCACGCCGGCGTACTGCTGGGCGCGCGCGCGCGC
 TGGGAGGACGGCTGGTTCTGTGACGGGCGCACTGGGCTATAGCCGCTACCGCAACAGGCC
 ACGCGCCACATCTCGCTCGGCGATGCCGCGCACACCGTGGCGCGCACCGCCGGGGCCAC
 GTCTGGCAGGCGGACGCGCGCGCTGGGACGCCAGTGGACGCTCGCCCGCGACACAGCTG
 55 GCGCTCGGGCGGGCGCTGCAACTACGCATCTGCGCGCAGCAAGGTTTCAGCGAGAGCGCG
 GCGCAAGGACTGGGCTGCGCGCGCCACGCCITGACGCGCACCGTGGCCACGCTGTGGCG
 CAACTGCAAGCCGCCATGCCITCATGCTGGGAGCCACGCCCATGACGCGCGAGCTGCAA
 CTGGGCGTCTGGCATGACCTGCGCGCGCGCGCTACGCCGCTCCGGCGGTTTCGCCCGC
 60 CTGGCGCAGGACAGGGCGCGAGCGGCTACTGGCCCGTGGCGCGCACACGCTACAGGGC
 GCGCTCGGCTGCGCGCGGAGTTTCGCCAGGCGCTCGTGTGGGCTGGGCTACACGGGC
 CAGCTTGGCACGCACTGGGTGATCACAGCTCAGCGCGAGCCTCACTTACCGCTACTGA

ES 2 346 314 T3

SEC ID Nº: 54 secuencia polipeptídica de la Orf27

MPAQRTPRTAVCEATVRSSPRWIHCTGFVLCALLAACGGGGGGGGGGGGGGSPGGRAPSA
 5 PQPAPSPRPEPAPEPAPNPAPRPAPQPPAPAPGAPRPPAPPPEAPPPVMPPPAVPPQLPE
 VPAADLPRVRAPLSTYRRPQRTDFVTPTGGPFFAKQDKALNTIDLKMAHDLKLRGYRVKV
 AVVDEGVRSDHPLLNVEKKYGGDYMDGTRTYDPKQGRHGTSVALVLAGQDQDTYRGG
 VAPNADLYSANIGTRAGHVSDEAAFHAWNLLGHGKIKIFNNSFATEGPEGEQVRKEDRNE
 10 YHSAANKQNTYIGRLDRLVRDGLLI FAAGNGRPSGRAYSEVGSVGRTPRVEPHLQRLGI
 VVTAVDENGRLETWANRCGQAQQWCLAAPSTAYLPGLDKDNPDSEIHVEQGTSLAPLVTG
 AAVLVQDRFRWMDNDNLRTLLTTAQDKGPYGVDPQYGWGVLDVGRAVQGPQFAFGDFV
 ARVTDSTSTFGNDISGAGGLVVDGPGALVLAGSNTYAGRRTTIKRGTLDFVGSVTSAVTVEP
 GGTLTGIGTVGTVTNQGTVVNKEAGLHVKGDISQTAQGLLVTDIGSLLDVSGRASLAGRL
 15 HVDDIRPGYVGGDGKSVFVIKAGAVSGVFATLTRSPGLLLNARLDYRPQAVYLTMRRAER
 VHAAQORGADDGRRASVLAVERLDAAMRELDALPESQORDAAAPAAAI GRIQRVQSRKVL
 QDNLYSLAGATYANAAVNTLEQNRWMDRLNHLAQAGGERVAAIAEYRHGQLRWRPDGL
 QGRQGRNGIMLGLAREVSAGLSLAAALTHSRTHWDESSGAPARDNAAMTTPGVLLGARRA
 WEDGWVQGALGYSRYRNQATRHISLGDAGHTVGATARGHVWQADAGLGRQWTLAPGHTL
 20 APRAGLQLTHLRQQGFSESGAQGLGLRAHALTRTVPTLWAOQLQSRHAFMLGATPMTAQLQ
 LGVWHDLRARRYAASGGFAGLAQDQAGSYWVPRTRVQGALGLRAEFAPGLVLGLGYTG
 QLATHWVDHQLSASLTTRY

SEC ID Nº: 55 secuencia polinucleotídica de la Orf28

Atgtcggtcccccggtcccccgcaaccttggcgcgcaaccgctcgcgcttgcggcgctgtcg
 30 Cttgggttgcgctgccggcgcaatacggcgcgcccgcgccggcacaacacgtcgctcacctcg
 Ccccgcgcaagaggtcatcgcgcgacagcgctcgcgcgcccgcccggtccgtgctgcgctgcg
 gagatcgagcgcgcgcgagggcgcaaaccttcgctccctggctcgatcagctgccgggcatc
 tcsatggcgcggtctcgcgcgcccgcgcggaagcctgaacatctggggcatggcgcat
 accgagcgctgaaaatcgctcctcgatggcgcgcccaagggttctcgagaagtaccgacag
 35 ggctcggtcttcatcgaaacccgaactgatccggcgcatcgaggtcgacaagggcgccgac
 aacctggctcgacggcaatggcggggttcggcgcgcaaccgtcaagatcgataccaaggatgcg
 gccgacctgttgcggcgggcgcgcgcttcggcgcgctggccaagtaccggcgccattcg
 aacgacggcgccagacatctacagcggtggcgctgtacggcgcgcccgcgcgccgagggg
 gacggcctgctgtatgccaaacggcgcgacggcggggatctgcggcgcccgacggcacc
 40 cgcttcgcatactcgcgcaaacacagcgctcgctgctcgccaaggtaaacctctatccg
 gacgacggccagaccatcacctgtcgggcatgcggttcgaatcgcgcggggtggcaaccc
 ttcgcgggccaagcgcgacgatcttcggcgcgcttcgcagggcgatctcgaccgctacggc
 ctgaccgaagcatggcgcgcaagctgggtccatcgcgaccagctcgaccagaactacagc
 gcgaaatggaacatcgccccatcgccccatccctgggtgaacctcacgctggcctatgcc
 45 cgctcggaacacccggcgagcgcgacggcgcgctcgctcccgggcgctcgagtcggccttctc
 ggcagcgctgggcaacaagagttgggtcgactaccgcgacgacgggttcgacctcagcaac
 gaaagcgacgtggcctgggcaagggcgagcatgtcgtgctggcgggcgctcgcgctggc
 cgcatcgcgcgacacgctcatgtactaccgccccggcgcgggcgagcccgattacaac
 cacgggtacttccagcgcgactacatgccttcgggcaagcagaccgtgcgcgagcctgtac
 50 ctgcaggacggcgctcacgctcgggcgcccttaccgtcacgccccggcggtgcggtacgacat
 gtgcgcaataccggcgaggccaaacgacgcccccgctacaacaaccccgcccccggtggcc
 gggcatgactaccgccccgctctcgtagcggggtggaccccgacctggggcggtgtcg
 aaggcgggcgcgagcggtggcgctgttcgcccagcgccggcgccacctggcgcgacccgct
 55 atcgacgaacagtagcaagtgaatatacgaaagtcgaatgtgtcgggcagcagccggcg
 ctggggcccgagcgcatcggtggcgctgcgccccggcgcgctactggattacaacgatatac
 ggcagcgcgcgcgacagcggtgcagatacggaccacgctgttctgcaatcgcgggcaagcac
 gagatcttccagcgcggtggcggtggcatgcgccccggcgagggcgggcgcgcccgctcg
 gactgccccaaagcccttgcctcaactaccgcaacctgcccggctacaccatcgaaggcgctg
 60 gaactggagacctactacgacagcccgcgatgttcgcccagcgctgtcgcttccggccatg
 cgcgggcaccgcgacgcctcgcgcgcgatccatggggcgcgcgacacctggatcgcgcgag
 atcccgccggcttcggcgcgcgcgatgtggcggtgaaactgcgcgcgctggacatggctc
 ctggggtggcgcgcggaattcgtagcgcgccagggaccgctcgcgacggcgacggcgacccg
 ctggcgggctactggcgcttgcctaaagaccgccccggtacgcgctgcacggcgctgttcgca
 65 agctggcaaccccgcgatgtcaaaggcctggacgtgcgctggcccccgacaacctcttc
 aaccggccctatcatccctacgtggcggaagcggtatcgggcagggcgcgcaacatcaag
 ctcaacatcagcccaacgcttctaa

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 56 secuencia polipeptídica de la Orf28

5 MSSPRPPAPWRAPLALAGLSLGCAAGAYGAPAPAQTVVTLPAQEVIGDSVAAARSVLRLP
 EIERAQADNFASLVDQLPGISMAGSPRPGQSLNIWGMGDTEDVKIVLDGAPKGFEKYRQ
 GSVFIEPELIRRIEVDKGPBNLVDGNGGFGGTVKIDTKDAADLLPPGARFGALAKYGRHS
 NDGQDIYSVALYGRTRADGADGLLYANRRDGGDLRRPDGTRFAYSRRNNQRSLLAKVNLYP
 DDAQTITLSAMRSNAAGWQPPAAKRDDLPAQSQADIDRYGLTEAWRRKLVHRDQLDQNY
 10 AKWNIAPSAHPWVNLTLAYARSDTRQDRRSSRASQSAFLGTLGNKSWVDYRDDRFDLN
 ESHVALGTAEHVLLAGLRWHRHRRDTLMYYPPGRGEPDYNHGYFQPHYMPSTGTQTVRS
 LYLQDAVTVGGLTVTPGVRYDHVANTGRPNDAFRYNNPAPVAGHDYRRVSYAGWTPHLGVVW
 KAARGVALFADAGRTWRAPVIDEQYEVQYAKSNVSGSSRALRPERIVGLRAGAVLDYNDI

15

20 ATRGDSVQIRTTLFRNRGKHEIFQRRGVACRGQAEGGAASDCPKPLSNYRNLPGYTI EGL
 ELETYYDSFAMFASLSLSAMRGHRDASPRDPWGPRTWIAEIPVVSARAMLGVKLPRLD
 MV LGWRGEFVRRQDRSPTDGDPLAGYWALPKTAGYALHGLFASWQPRHVKGLDVRLAADN
 LFRPYHPYLGAEVSGTGRNIKLSIAQRF

25

SEC ID N°: 57 secuencia polinucleotídica de la Orf29

30 Atgaaggcgcgccgctggccatggcgggctctgtcgctggcgctcgccgctgctcgctg
 Tcgagcagatgcaggccatgcgcgacgcgcgacgtccctgcgcgcacgcctgctcgaa
 Gggcagcaggccgtggcgccggcgccgagcggcgccgagcgcgaagccgcccaggacgtc
 gcgcggccctggctggcgggcgccgagcgcgtggcagcgcaggtgctgctgcccgcg
 gcgctgcgcgcgagatgtcgatgcgacccctgctgttcgcgggcaaggccacgctgcccgtg
 35 ctggccgagcgcctgcatgcgcgccacggcgcgcgtgcgcgtgcatcccgacgcgcgtg
 ctgcgcgcgcgcgccttcctgcgcgcgcctggcggggagggccgagctggcgccgagcct
 cccgcccagggcgaactgcgggcccggcgccgctccgctggccgacacgctcgacgcgcgtg
 gccgcgcagctgtacgtgcactggcgctaccatgcgcgcgcgcacatcgagtctaccgcacc
 gaaacgcgggtcttcgatgtgcgcacgcctggcgctggccgagcgcgcaggtcggtg
 40 ggccgcgcggcgagcggcgagcgggcaggttcgaccatgcctcgagcagcgtgctcagc
 gccgacgcggcgaaggcgctgcaggccgtgcgggacgcgcgtgcgcgcttcctgacgcgc
 gccggcgctcatgcgcgagatcgaggcgggcggaagcagcgtgcgcgtcacggatagccg
 gaggcgctgcgcgcgcgcgaaaatacctgcaaggcgagaaccgcgcgcctgacgcgcgcg
 gtacgcctggtgttcgaagagctcacgggtgcgcaccacggccgcgcgcgaaggcgcatc
 45 gatggcagggcggtctacgccagcgcgcgcgcgcgcgcgcgtcgtagccatgccggcggg
 gccggcgcgagcggcggcgtcgggcccgcgctgctggccgggcccctggcgcgacgcgcgc
 gccctgatgcgcgcgcgtgagcaccatgggagcggtactgcgcacatgcgcgcataccatg
 ctgacgcgtgaaccggcgcgccgtcacccacgcgcgtgcgcaccacgttttcctacgtggac
 caggtgcagcgcctgagcccgcgcgcggcgcccggtggcgcgatgccgtgccggg
 50 ctggcggtgcagcagaagcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgttcctcacgcgtgtgcccgaggcg
 cgcgatgacggcgccatcctgctctccatttcctatgacaacaccatgccagccgcgtg
 cgcaccctgaccttcggcgaggcgccagcaagtgctgcgcagcagatgccatcgac
 ggcagcgccatcgtagcagcaggtcgagctgctgccggccagcccgctcatcctgtcgggc
 55 ttgcaccacagcgaagaccaatacgaacgccaccgcctgtttcccgatgcgcgcgtgcgc
 gccggcgggcacgaccgcagcgcgagcgggtcacgaccgtggtcatggtcaccgcg
 cagatcgacgagggttga

60

65

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 58 secuencia polipeptídica de la Orf29

5 MKARRLAMAGLSLALGGCSLSQQMQAMRDAATSLRARLLEGQQA VGRAGERPAREAAQDV
 ARPWLAGRAQPLAREVLLPPALRADVDTTLLFAGKATLPVLAERLHRATGIAVRVHPDAL
 LPRAAFLPRLAGQAELAAEPPAQAE LRAGPRPLADTLDALAAQLYVHWRYHRGAIEFYRT
 ETRVFDVRTLALAASAQARLGRAGSGETGSFDHASSTVLSADAGKALQAVRDRVA AFLTR
 10 AGVIAEIEAGGSTLAVTDTPEALARI EKYLQGENRALTRRVRLVFEELTVRTTAAAEGGI
 DWQAVYASARAAA SYAMPGGAGAAGALGARVLAGPWRDARALIAALSTMGAVLRHRSIPM
 LTLNRRAVTHAVRTTFSYVDQVQRLSPTAAAPGGRDAVPGLAVQQKRETVGTFTLLPEA
 RDDGRILLISYDNTIAQPLRTLTFGEGGQVSLQQIAIDGSGIVQQVELLPQGPVILSG
 FDHSEDQYERHRLFDPAPLAAGGHDR TARERVTTVMVMTAQIDEG

SEC ID N°: 59 secuencia polinucleotídica de la Orf30

20 Gtgaccatgttcatccgctggetcattctctccgcctgectgctgctggccgcctgcagc
 Cgcgctcccgataccgagatcctgcagcgcgatgtcgccagaccctggccgccacgtac
 Ggcccggacctgttcgacatcgtcgcgctgcgcgcgatgggctcggccaccgacagcacg
 gccccgcgggcccagacgcgcgggtggtctattacgatgtggtgctgggctgaagaag
 gacctcaccctgggcgctgggaccagcccggcgcgcgcgctggtcagcctgctgggc
 25 gccgggcccgcgcgatctcgggggtgaaatccagcggcaatgccgccggcgaccagatc
 gtgcgccacgcgcagcgcctctaccagcgcgcagcagagcaatgggtgcacgtcgccccg
 gccagcttcacggccaccgaagcgcctcgtggacaccggcgcgcgcgcgcgggtgacg
 cgccagctgctccagacgctggagcagatcacgcgttcctgcccacacgcgcctccagc
 accgcccagcagctggtgcaacaggagctggagcgcctcggtggcgcgcgatcaatggccgg
 30 cttgccgcctgcaaaagggtaccgcgtggcgaccggccccgacaaggcgagtagctg
 gcgttcggccaggcgcgtggccgcgatcgggcgcaacgagcaggtgcgcgtcattccctc
 attaccggcggcagcgcggacaacatggccatgctgcgcagcggcgcgcgggtggccgc
 35
 ctgtcgcagggccgacatcgcgcgaactggcctacgagggcaaggggcccgttcgaaagccag
 ggacgcttctccgggtgcgcgcgctgggcagcctgtatccggagctggtgcacatcgtg
 gtgcgccagggcgatggcatcgccacgggtgggcgcgctgcgcggcaagaagattgccctg
 40 ggcccgctgggctcggcggtacgcaaccagctggagaccgtgctggcagcccatgggctg
 cagccggggcgcgactatgcagtcacgcacgcgcggccgcgcggccctgccgcagctg
 agcgaaggacgggtcgacgcggtggcgaggtcatcggtacgcggccgcgcgccttgccg
 gggcgctgacccaggcgcgcctggcgctgctgccgctggaccgggctgcgatcgacaag
 ctggtgcaggccgatccgaccctgatggcgctggacatcccggccaacacctacccagc
 45 caggccgcggccatcccacgggtggcatggcggcgctgctggtcaccacggccgatctg
 acgcgcgacgaggccgcgcgatatggtggacgtggtataccgggcccggcaggacctgctg
 gccgcggggtccgcgcaggcgcgaggtatccgcggccaacgcggggcgcggattgagc
 attccctgcacgacggcgccgtggaagccttcgagaaactgggcgcgcgcgcctgcc
 gaggcgaggtag

SEC ID N°: 60 secuencia polipeptídica de la Orf30

55 VTMFIRWLILSACLLLAACSRAPDTEILQRDVGQTLAATYGPDLFDI VALRRMGSATDST
 APPGQTRRVVY YDVVLGLKKDLTLGAWDQPGAALVSLLGAGPRSISGVKSSGNAAGDQI
 VAHASAIYQRDAEQWVHVAPASFTATEAPSLDTGAPPPVTRQLLQTLQITRSVPYSASS
 TAQHVVQQEELERSVARINGRLARLQKGYPLATGPDKGEYLA FGQALAAIGRNEQVRV IPL
 60 ITGGSADNMAMLRSGAAVAALSQADIAQLAYEGKGPFPESQGPFSGLRALGSLYPELVHIV
 VRQGDGIATVGALRGKIALGPSGS AVRTTLETVLAHGLQPRDYAVIDTPAAAALPQL
 SEGRVDAVAQVIGTPAAPLRAALTQARLALLPLDRAAIDKL VQADPTLMALDIPANTYPS
 QAAAIPTVGMAALLVTADLTRDEAAHMDVVYRAGQDLLAAGSAQGAQVSAANAGRGLS
 IPLHDGAVEAFEKLGAPPLPEGR

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 61 secuencia polinucleotídica de la Orf31

5 Atgatcagtatgcttgggtttccgattctccggttcgcgcgcgcgcgcgggtggccgtcgcg
Gcgtgtgcgcggcgctgggaggctgtgcggtcgggcccgaactaccagcgacccgccatc
Gacgtggggggccgctacaaggaggccgcgcgcgcgcagcccggctggacgcgcgcgcag
cccagcgacgagagcgcgcgcgggcaatggtggcaggtgtatggcgaccgggtgctcgac
10 ggcttgggtgcagcaattgaaccagggcaactactcgtggcgaggccgaggccaattat
cgccaggcccgagcgctgggtgcgcaatgcgcgcgcgcggcttcttccccaccataggcgcg
ggcgccgacgtgacgcgggtccgggtcggggcggcggcagcggcgcgggtcgaacggcagc
tcggtcggcaaccagtaactcgctcagtggtcgggtcagctgggaagtcgatgtgtggggc
cgggtgcgcgcgcgaagtcgagtcagccgcgcgcgaggcgaggccagcgcgcggaactg
15 gccgtcaccgcctgagcgcgagggccgccctggtgcgaactacctgcaattgcgcgtg
ctcgacgagcagaaaacgctgctcgacgccacggtgctggcctacgagcgctcgctgcgc
ctgacgcgagaaccgtacgaagccgcgctggtgggcaagtccgacgtggcggtggcgcg
accagctggagaaacacgcggggccagtcctcgacctggaactggcagcgcgccagtc
gagcaagccatcgcggtgctgatggggcaggcgcttcgcgcttcgcccgcgcgcgcag
20 ccgttcgcgcagcaactgcccggacatcccggcgggcctgccctcgcaactgctggagcgc
cggcccgacgtggcggcgcgcgagcggcgcgcgggccgcgccaatgcgcagatcggcggtg
gcgcaggcggcctggttccggacctgaacttgtcgccagcgcggttttcgcagcggc
cagttcgccgagtggtgacgcgcgcgcgcgctcttgacctcgcccgcgcgctggcc
atgacgtgttcgacggcgcgcgcttcggcgcgctcgagcaggcccgcgccgctat
25 gacgcgcaggcgccgctaccgccagagcggtgctgacggcgctgcgcgaggtggaggat
tacctggtgcagctgcgcgtgatggagcacgagcagcaggtgcagcgcaatgcgctcgag
tcgcgcgcgaatcgctgcgcctggcgcgcaaccagtcagagcagggggtgatcgactac
ctgagcgtggcggtgctggaaaccaccgcgctgaacaccgagcgcgcaacgccatcagcctg
ctgggcagccgctcaacgcagcgtgcagctgatcgcgcgctggcgcgcggtggcag
30 ggcttgccggccgagggcgggccagcgcgcgcgccgagccgt7ccgcccctag

35 SEC ID N°: 62 secuencia polipeptídica de la Orf31

40 MIRMPPGRFRFSVPPRRRLAVAALCAALGGCAVGPDPYQRPADVGAAYKEAAAPQPGWTPAQ
PSDESARGQWWQVYGDPLVDGLVQQLNQGNYSVAQAEANYRQAQALVRNARAGFFPTIGA
GADVTRSGSGGGSGAGSNGSSVGNQYSLSGSVSWEVDVWGRVRREVESSRAEAQASAADL
AVTRLAQAALVQNYLQLRVLDEQKRLLDATVLAAYSLRLTQNRYEAGVVGKSDVAVAR
TQLENTAQSIDLWDWQRGQFEHAIIVLMGQAPSRFALPAQPPAQQLPDI PAGLPSQLLER
45 RPDVAAAEERRAAAAANAQIGVAQAAWFPDLTSLASGGFRSGQFAEWLTAPARFWTLGPALA

50 MTLFDGGARSARVEQARAAYDAQAAAYRQSVLTALREVEDYLVQLRMEHEQQVQRNALE
SARESRLARNQYEQGLIDYLSVAVLETTALNTERNAISLLGSRLNASVQLIAALGGGWQ
GLPAFAAASAAAEPSAP

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 63 secuencia polinucleotídica de la Orf32

5 Atgaagcatcccgtccgaagacctttgcacgtaccgcggcgcgctgcttgccgcgctg
 Gcgtggccggctgcgccgtggggccgcagtagaccggcgccacgcccgcgcggggaag
 Ctggccagccccgaacaggcgctgttctcgccgacgggtgcaacgcgaatggtggcgc
 cagttgcaggatgcccggctggacgcgtgatcgccctggcgctggcgcgcaacctcgat
 10 atcgccctggcgctggcgcgcaacctcgatccgcccaggcgaggcgcgctgcgcgaa
 gcgcgcgcgcgctcgacgaaaaggaactggaccgctggccgacgtgaccgcggccggc
 ggctacacgcgcagcctgtcgagatcaacccggccccgaccagcgcaacctcgcgcaa
 agctaccgcgcgggctcgacgcgacctgggaaatcgatttgttcggccgcctgcagcga
 cgggccgaggccgcggccgcgcgcgaccaggccgcgcgcgcgacctggcccagacgcgc
 ctggtggtggtggccgagctggcacgcaactatctcgagatgcgcggcgccgagcaacgg
 15 ctggccgtggcgcgcgccaacctcgccaccagcaggagacgctgcgcgtcacgcggcg
 ctggtggaacccggccgcggctatgccggcgacctggccagcgacggccgagctggcc
 ggcacgcggcgctgctcgcgccgctggagacgcaacggcgccctggcccagtagcacatc
 gccgtcctggcgcccatgcggccggccgagctggcgagctgcggcaggagcagccgctg
 gcgcgcgtggccgcgcaattgcccatcggcgacgtggccatgctgctgcaacgcgcgcgc
 20 gacgtgcgcgcgcgcgagcgctgctggccgcccacacgcgcgacgtcgcgcccatcac
 gccgaactgtatcgcgcatcgacctggcggggttcctcggttcatgacctgcgcggc
 ggcgacctgggcccaggccagcagcaaggccttcgcgctggcgccgacgatcagctggccg
 gcgttgccacctgggcagcgtccaggcgagctgcgcgcggccaggcccgccagcagcg
 gcgcggcgcgctacgaacagggtggcgctgcaggccatcgaggaaagtggaaggcgcttg
 25 acgcgctatggacagaaccagcagcggtgcgcgacctgcttgacagcgccacgcagagc
 cagcgcgccgcgcgacctggcgcaaacgcgctatcgtagaggggccgcgcgctattgacg
 gtgctggacgcgcagcgtactctttgcgcgcacaggatgccgtggcgcaatccgagtcg
 gagtccataccagcctggtcgcgctctacaaggccctggcgaggagctggaataccgac
 gcgcgcgcgcgcgcgcgttcgcgcgcgaccgcgcgcctgcgcggccagcccctga

35 SEC ID N°: 64 secuencia polipeptídica de la Orf32

40 MTHPVPTTFARTAGALLAALALAGCAVGPQYQAPTPAPVKLASPEQALFSADRLQREWWR
 QLQDARLDALIGLALARNLDIGLALARNLDIRQAQARLREARAALDEKELDRWPTVTAAG
 GYTRSLSQINPGPDQRNLAQSYRAGFDATWEIDLFGRLQRRAEAAAARDQAAAADLAQTR
 LVVVAELARNYFEMRGAEQRLAVARANLATQQETLRVTAALVETGRGYAGDLASARAELA
 GTRALLAPLETQRRLAQYHIAVLAAMRPAELGELRQEQPLAPLAAQLPIGDVAMLLQRRP
 DVRAAERLLAATNADVGAITAELYPRIDLGGFLGFIALRGGDLGQASSKAFALAPTISWP
 45 ALHLGSVQAQLRAGQARHDAARARYEQVALQAI EEVEGALTRYGQNQQRLRDLLDSATQS
 QRAADLAQTRYREGAAPYLTVLDAQRTLLRAQDAVAQSESESYTSLVALYKALGGGWNTD
 AAAPARSARTAALPAS P

50

55

60

65

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 65 secuencia polinucleotídica de la Orf33

5 Atgaaacctgtcgatcatgagaaccttgttgtcccttgccgtggccacggccctggccggc
Tgctcgctggcgccacctaagagcgcccgagggcgccggtcgacggcgccctatccgtcc
Ggcccggcctacggcgcgccgggacggcgcgccggcgccggcgccggcgccggcgacgtg
ggctggcgcgacttcttcggcgacccgctgctgcaggagctgctggcgctgtcgctggcc
aacaaccgagacctgcggggtcgccgctcaacgtggaggcgccgctcaaccggagc
10 ggacaggccggcatcagccgagctaccaggtcggtgccagcctgtcgacctgggagctg
gacctgttcggggcgatccgcagcctcagcgaacaggcgctgcagctctatctggcccag
gacgaaacgcgccctggccaccagctgacgctgggtggccgagaccccaacgcctaccgg
acctgcgcgccgaccaggaactgctggcgctgacgcgccagacgctggcgggcccagcag
gagtcgtacaagctgaccgcccagagctacgacctggcgctggcgaccgagctggacctg
15 agccaggccgagatttcgctgcgcaccgcccagcgcaatctgtcgagtagacgcgcatg
gcggcgaggacgcaacgcgctggtgctgctggtggccagccgctgcccggccggcatc
ggcgcgagctggaccaggccgtggcgctgcccagcgcgctggtcctggccgacctgccg
gcgggctgcccgtcggtatctgctcgcgcgccggcgatataccgcgcccggagcaccag
ctgcaagccgccaacgcccagcatcggcggcgcgcgcgcgcggttcttcccgcgcatcagc
20 ctgaccggctcggcggcacggccagcgcagcctggcgggcctgttcgtagccgggtcg

ggggcctggagtttcgcgccgcagatcagcgtgccgatcttcgcgggcgggcgctgcgc
gccagcctggacctggccaagatccagaaggacatcgccatcgcgcgctacgagcaggcc
25 atccagagcgggttcgcgaggtctccgacgcgctggccggccgcccacattgcaggag
cagatccggctcgaggaactgctggtgcaggccaaccagcgcgctacgacctgtcgag
cagcgttaccagcaggccatcgacaactatctcagcgtgctggatttcgagcgttcgctg
tatacgcgcgagcagcgtggtcgagacgcggtggcgcgctgtccaacctgatccag
ctctacaaggcgctggcgggcggtggtccgagcgacggtggcgggcgcgagccggcg
30 tga

35 SEC ID N°: 66 secuencia polipeptídica de la Orf33

40 MKPVVMRTLLSLAVATALAGCSLAPTYERPQAPVDAAYPSGPAYGAPGQAAAGAPAAADV
GWRDFFGDPLLQELLALSLANNRDLRVAALNVEAARLNPSGQAGISRSYQVGASLSTWEL
DLFGRIRSLSEQALQLYLAQDETRLATQLTLVAETANAYPTLRADQELLALTRQTLAAQQ
ESYKLTRQSYDLGVATELDLSQAEISLRTAERNLSQYTRMAAQDRNALVLLVGQPLPAGI
45 GAQLDQAVLALPDGVVLADLPAGLPSDLLARRPDIRAAEHQLQAANASIGAARAAFFPRIS
LTGSAGTASASLGGLFDAGSGAWSFAPQISVPIFAGGALRASLDLAKIQKDIGIARYEQA
IQSGFREVS DALAGRGTLEQIRSQELLVQANQRAYDLSQORYQQGIDNYLSVLDSQRSLS
YTAQQTLVETRLARLSNLIQLYKALGGGWSERTVAAAQAG

50

55

60

65

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 67 secuencia polinucleotídica de la Orf34

```

5      Atgaaacagcataaaggtcggcaggcactgggcaggatgggcgatggcgctggcgctgcctg
      Ggcgcggccgcgcgcgtggcgccgcagccggcgccaccagctggggccgcgcaggcgcgc
      Gaactgctgctggaggtcaagggccagcagccgttgcgccctggacgcgcgccatcgcg
      gtggcgatcgccgatccgcaggtcgccgacgtcaaggtgctggcgcccgcgctgggcccgc
      ccgggagaggtgctgctgatcgccggcaggccggcaccaccagagctgcccggctctggagc
10     cgcggctcgcgcgaccgcaggtctggaccgtgcgcgtgctgccgcaagtgcaggccgcg
      ctggcgccgcgcggcgctcgccggcgccgcgcaggtcgacatggctggcgacagcggcggtg
      gtccaccggcatggcgccctcgcccgaggcgcatcgccggcgccggccgaggctgccgcggcc
      gccgcgggcccgaacgacaaggtggtcgacatgtcgagatcaacaccagcgccgtggtg
      caggtggaagtgaagtggtcgagctggcgcgctcggtcatgaaggatgtcgggatcaat
15     ttccaggccgacagcggcccgctggcgccggcgctgctgctgctgccggacctggccagc
      ggcggcatgttcggcatgctgtcctataccagccgcgatttcagcgcgctcgctggcgctg
      ctgcaaaacaacggcatggcgcgcgctcctggccgagccgacgctgctggccatgtcgggc
      cagagcgccagcttcctggccggcgccgagattccgattccggtatcgccggccctgggt
      acgacctcggtgcagttcaagcccttcggcatcgccctgacggtcacgcccacggtcatc
20     tcgcgcgagcgcatcgcgctgaaggtggcgcccgaggccagcgagctggactacgccaac
      ggcatttcagcatcgacagcaacaatcgcatcacggtgatcccggcgcttgccaaccgcg
      aaggccgacaccatggtggagctggcgatggcgagacattcgatcatcagcggccctggtt
      tcgcgccagaccaaggccagcgtcaacaaggtgccgctgttgggcgacctgcccatcatc
      gggcgcttcctccgcaacgtgcagttatcccaggaggatcgcaattggtgatcgctggtc
25     acgcgcgcctggttcgcccctcgcgcgcggtgtcacgctgcccttgccgggcccgcgcg
      caggaggtcagcgacgctggcttcaacgcctggggctattacctgctgggtccgatgagc
      ggccagcagatgccgggctttcacagtga

```

SEC ID N°: 68 secuencia polipeptídica de la Orf34

```

35     MKQHKVGRHWAGWAMALACLGAAPLAAQPAAPAGAAQARELLLEVKGQQPLRLDAAPSR
      VAIADPQVADVAVLAPGVGRPGEVLLIGRQAGTTELRVWSRGSRDQPQVWTVRVLPQVQAA
      LARRGVGGGAQVDMAGDSGVVTGMAPSAEHRGAAEAAAAAGGNDKVVDMSQINTSGVV
40     QVEVKVVELARSVMKDVGINFRADSGPWSGGVSLIPDLASGGMFGMLSYTSRDFSASLAL
      LQNGMARVLAEPDLLAMSGQSASFLAGGEIPIPVSAAGLTTSVQFKPFGIGLTVTPTVI
      SRERIALKVAPEASELDYANGISSIDSNNRITVIPALRTRKADTMVELGDGETFVISGLV
      SRQTKASVNVKVPDLLGDLPIIGAFFRNVQYSQEDRELVIIVTPRLVRPIARGVTLPLPGAR
      QEVSDAGFNAWGYYLLGPMMSGQMPGFSQ

```

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 69 secuencia polinucleotídica de la Orf35

```

5      Atgaagcgacttctctgtctgtccctgctgtccgtattgctggcgggcgtgcacgacccca
      Tcgcagattccgcccagacggcgcccgggcggtgccgcccggcgccgaagggtccgctg
      Gtcgtgccgcccgtgtcggcgctgtccgacaccccgccgcgcgctggccggcgctac
      cagcgcgctgcctggaccgagctgcccactgggagagcgacgacctgtcgcgctggtgg

10

      ccgctgttctctgcgcaattgcaaaggcctgatgcggccgaccagcggtaacctggcgggc
      ccggcacgcgccacgcgcgcgcctggcagcccggtgctgcgcggcgggcggtcgacccgctcc
      aaggcgccggccgcggcgacagcgcgggcggtgcggcgcttctgcagacctggctgcag
      ccctggcgcatcgccggcgccgacggccgtcccgccaccaataccgtcaccggctactac
      gagccgctggtgcgcggtcgcgccgcccaggcgccgctaccagtggccgctgtatgcc
      gtccggccgacctgctcgtcgtcgacctgggctcggtctatcccgacctgaccggcaag
      cgctgcgcgccggctcgacggccgcccgggtcgtgccctacgacacgcgcgcgcgacatc
      gagcgggcgaccgcaagccgcccggccatcgtctgggtggacgatccggtcgacaatttc
      ttctgcaggtccaggggtcgggccgggtgcagctgacctatggccccgaccgcggcacc
      acgatccgcgtcgctacgcccaccataacggccagccctatgcctccatcgcccgctgg
      ctcatcgacaaggcgagctgcgcgcgcgaccagccatcgatgcagaacatccgtgcctgg
      gcccaacgcaatccctcgcgctgcaggaaatgctcaacgccaacccggcggtggtctctc
      ttccgcgaagaggcggtggtcgatccggagcaaggggcccaagggggcctatggcatcccg
      ttggcgccgcagcgctcgatcgcggtcgacgcgggtttcgtgcccgtgggcacgcgggtc
      tacctgtcgaccacgctgccggcctccgacggcccccctgcagcgcaccgtgttcgcgcag
      gacaccggcacggccattcgcgccgcccgcgcgcgcgacttctattggggctacggcgag
      gaagccggccagcaggccggcgcatgaagcagcgcgccagatgtggctgctgtggccc
      aagcaggccggggagccgtcggcgcgatga

```

SEC ID N°: 70 secuencia polipeptídica de la Orf35

```

40      MKRLLCLSLLSVLLAACTTPSQIPPETAPGGVPPAAEGPLVVPPLSALSDTPPRALAGRY
      QRVAWTELPNWESDDLSRWWPLFLRNCKGLMRPTSGNLAAPARATPRAWQPVCAAAYDPS
      KAPAAGDSAAVRRFLQTLQPWRIAGADGRPATNTVTGYEPLVRGSRRQGGRYQWPLYA
      VPADLLVVDLGSVYPDLTGKRVGRRLDGRRVVPYDTRAAIEAGDRKPPAIVWVDDPVDNF
      FLQVQSGSRVQLTDGPDRTTIRVAYADHNGQPYASIGRWLIDKGELRADQASMQNIRAW
45      AQRNPSRVQEMLNANPAVVFFREEAVVDPEQGPKGAYGIP LAPQRSIAVDAGFVPLGTPV
      YLSTTLPASDRPLQRTVFAQDTGTAIRGAARADFYWGYGEEAGQAGRMKQRGQMWWLLWP
      KQAGEPSAR

```

ES 2 346 314 T3

SEC ID Nº: 71 secuencia polinucleotídica de la Orf36

5 Atgttcaactgtcgggcattcctgcaaactcggcacgctgtcgccctgctggccggctgt
 Gccacctccagccaaacaccccaagccagcatcttcccgcgcagggccgacagggccag
 Gccgaccgctccgcatcgccccggacaaacccgtatcgagcgacgaaggccccgccacg
 ctgacgcccagccggcgaactgcccggcagctccgcgccttcgccgaacagctggcggcg
 cagcgcgagctgcccctgcccgaagtgtgtggccagcctggaaagcacgcgctacaacgcg
 accgtcgcccgcctcatcgcccgcctcgggcgctcgggcaagaaaatctggcgagctgg
 10 ctgacctatcgccggcgcttctgtcgaaccaagcgcctcgccggggcggtggaattctgg
 aacgccaaccagacctgctcaaccgcgcgcccagcgtacggcggtgcccgcctcgatc
 atcgccctccatcatcgccgtggaaacccgtgtatggccgcaacgtgggcaacttccgcgtg
 gtcgacgcccctggcgagctggcattcgactacctcgatcccgccaaagcccgagcgcgc
 gacatgttccgcggccagctcgccgacttcatcaccctggcgctgcaggacaagctggac
 15 cccgagacgcgcggtcgtagcccgcgccatcgccatgcccgaattcatgcccggcagc
 atcatgcgctatcgccgtcgatggcgatgacgacggccacatcgacctgaccaacagcgtc
 gggagcgcggtcatgtcggtgggcaacttctgtggaacatggctggcagcgcggcctg
 ccggtgttcgcgcgggtcgcgctgcccgcgcatccggcgccgctggtggcggcgccctt
 acgcccagcgtggactggaacggcctgcaggccgcccgcgcgcgccggcgggcgcc
 20 ggacgcccgcctggcaggagcaccctatgggcatcgtaggacctggtcgaggaagcgcgc
 ggcaccgtgcaataccgtaccgccacgccaatttctttgcctgacgcaatacaaccgc
 agctacttctatgccacggcggtggccgacctggcgccgaactgcaggcccgccacgggc
 tattga

25

SEC ID Nº: 72 secuencia polipeptídica de la Orf36

30 MFNCRRLQIGTLSALLAGCATSSQTPQAQHLPAQAATGQADRVIRIGPDKPVSSDEGPAT
 LTPTELRLPDVRAFAEQLAAQRELPLPQVLASLESTRYNATVARLIAPSGASGKKIWRSW
 LTYRGRFVEPKRIAWGVEFWNANQDLLNRAAQRYGVPASIIASIIGVETLYGRNVGNFRV
 VDALATLAFDYLDPAKPERADMFRQLGDFITLALQDKLDPETRGSYAGAIQMPQFMPGS
 35 IMRYAVDGGDDGHIDLTNSVADAVMSVGNFLVEHGWQRGLPVFAPVALPADPAPLVAGGL

35

40 TPTLDWNLQAAGARPAAGAGRGAWQEHPMGIVDLVEEARGTVQYRTATPNFFALTQYNR
 SYFYATAVADLAAELQARTGY

45

SEC ID Nº: 73 secuencia polinucleotídica de la Orf37

50 Atgaaccatagactcatacgttgccctgagcatcgcgctgctggccctgctgtcgggctgc
 Agcattctctccgggtcgggcccgacgcgcatcgcccatcatggacggcgggctgcaccgac
 Gcgaccggcgccaagctcggtcctacgacctggaggacctgcgcgcgacaccattgcg
 ccctatgtgctggtcaaggcggtgtccaaggatggcgccacctcggaaggctacgtgggc
 aatatgcgcgtgatgcccggcgatgtgctgcgcctcctggtagccgacagcatggagacc
 ggactgttcgcgcgcctggcgcccgccggcagcggtgttcgaagccgtcggggtcgccggc
 55 gacggcagcatctcgctgcccctatgcccggcgccctgaaagtgcagggaagtgcgtggcg
 cagatcgagcagctcgtaaggggcagcctgcgcaataccgcggcggtgcagccgcaggcc
 atggtggatctggccgacgacgcctccaattcggtgctggtggccggggcggtgcccgcgc
 ccgggacgcttcggcggaacaaggcccgctgacggcgctggatgcgatcacgcaggcg
 ggcggtcgaccctgcccgttaccaggccgacgtagtgcctggactggcagcaagggtg
 cagcgcatctcctaccagcaattgctcaacggccgcaacgtggcggtggagccgcgctcc
 60 gaactggtggtcgaaccgaacctgaagcgttctgtggcgatgggggccccttaccagccg
 ggctgacgaactgcctggaaccagaccaatctgctcgacgcctggcggtggccgga
 ggccgtgaacgaccgcgcggccgacgccaccggggtattcggttttcgcctggacggccgc
 aacgcgcgatggccgcccgcggccacgggtgttcaggctgaatatgcgcaatccggagtcc
 atgttctggccaagcaattcgagctgctgcccggaggacgtggtgtatgtcagtaatgcg
 65 ccatgtacgaatgggaaaagatcattacgcctatcgtagcaggtcctgatcgtagggccaa
 cgcgtgggtacttactaa

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 74 secuencia polipeptídica de la Orf37

5 MNHRLIRCLSIALLALLSGCSILSGSGPTRSAIMDGGSTDATGAKLGSYDLVDLRADTIA
 PYVLVKAIVSKDGATSDGYVGNMRVMPGDVLRILVADSMETGLFAPLAAGGTVFEAVRVAA
 DGSISLPYAGRLKVQKSLAQIEQLVKGSLRNTAAVQPQAMVDLADDRSNSVLVAGAVPR
 PGRFGGNKGPLTALDAITQAGGSTLPAYQADVIRTGSKVQRI PYQQLNGRNVAVEPRS
 10 ELVVEPNLKRFBVAMGALT KPGLHELPSNQTNLLDALGVAGGLNDRAADATGVFVFRLDGR
 NADGRPRPTVFRNLNMRNPESMFLAKQFELLPEDVVVVSNA PMYEWEKIITPIVQVLIVGQ
 RVGTY

15 SEC ID N°: 75 secuencia polinucleotídica de la Orf38

Atgcaacgtctcatgcccacccctggctcgactgctcgctcgctcctggccgctcctgtcttca
 Tgcgtcttctggtccgcgagcgcgactacgccctggtgttctcgctggcgaggtgcgc
 20 Caggtcatcagcgagcctggcctgtatttcaaggcgccgcgcgcgttccagaacgtcgtc
 acgctggacaagcgcatcctcaccatcgagtcagcgatgccgagcgcatccagacctcc
 gagaagaagaacctgctgatcgactcgtacgtcaagtggcgcatcgccgatccgcgcctg
 tactacgtgaccttcggcggaacgagcgcgcgcgcagagcgtctgcaggcgagatc
 cgcgacgcgctgaacgcggcggtcaacgtgcgcacggtcaaggacgtggtctcggccgag
 25 cgtgacaaggatcatggccgaaatcctcaccaacgtcgtcaagcgccgagcgcgtgggc
 gtgcaggtggtcgacgtgcgcctgcgcgcgcagtcgagtcgcgcgcgagatttccgagtcg
 gtctatcgccgcatggaagcgagcgaccccgctggccaacgagctgcgttcgatcggc
 gcggccgaaagcgagaagatccgcgcgcgagggccgaccgagcgcgaggtcatcgtggcc
 caggcctatgcgcgcgcgcagggcatcatgggcgagggcgacgccagggcggcagcatc
 30 tacgccagggccttcggccgcaataccgagttctacacctattacaagagcctggaagcc
 tatcgccgcgcttcggcaaaaccggtgacgtattggtggtcgatccgacgtcggagttc
 ttcagttcttcaagaaccccggaaggcgcgcgggcgcccgccagccggcggaattga

35 SEC ID N°: 76 secuencia polipeptídica de la Orf38

40 MQRLMPILVGLLVVLAVLSSCVFVVRERDYALVFSLGEVRQVISEPGLYFKAPPPQNVV
 TLDKRIITIESSDAERIQTSEKKNLLIDSYVKWRIADPRLYYVTFGGNERAAQERLQAQI
 RDALNAAVNVRTVKDVVSAERDKVMAEILTNVVKRAEPLGVQVVDVLRRIEFAPEISES
 VYRMEATERTRVANELRSIGAAESEKIRAEADRQREVIVAQAYARAQGIMGEGDAQAGSI
 45 YAQAFGRNTEFYTTYKSLEAYRAAFGKTGDVLVVDPTSEFFQFFKNPGKAAGAPAPAN

50 SEC ID N°: 77 secuencia polinucleotídica de la Orf39

Ttgccaggaggagcaaccatgaaacccgtcatccagactttcctgcgcgcgcgcgcgcgtg
 Gccggcctggcgtgctggccggctgcgcgcgcgtcagcacgacgcagtcggcgcgatc
 55 Ggcgtggaccgcacccaatacatgtcgagcctggtgccgagcaggcgctggtgcaggag
 gccgggcagcagatgcccagatcgtccaggaggccgcgcgaaggggctgcttgaccgc
 gaccggcgcaattgtcgcgctgcgcgccatttcccagcgctgatcgcgagaccggg
 gtgtttcgcgccgacgcggccaactggccatgggaagtgcagtgctgctggctgcagcag
 gtcaacgcctggtgcatgcccggcggaagattgcgctctacacgggcctgctcgcccat
 atcaagccgaccgacgagcaactggcgcggtgctgggcccagagatcgcgatgcgttg
 60 cgcgagcacgcgcgcgagcgctctcgagcagatggcgaccagcatcgccctgctgggtg
 ctgtccatggccaccggttcgcccggcgctccgacctggcggaagctgaccgaagtc
 atgttcaccttgcccaacagccgcacgcacgagaccgaggccgatcgcatggcgctcgaa
 ctggccgcgcgcgcgggttcgatccgcgcgcgcgcgtcacgctgtggcagaaaatgggc
 gcggccgagggcaatgcgcgcgcggagtccctgtccaccacccgtcgccagtagccgc
 65 atcggcgaattgcagcaggccttgcaagaggtattgcgctgtacgagcaggcgcgcgccg
 caggccgccaatag

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 78 secuencia polipeptídica de la Orf39

LPREATMKPVIQTFLRAAAVAGLALLAGCAGVSTTQSGAIGVDRTQYMSLVPEQALVQE
AGQOYAEIVQEARAKGLLDRDPAQLSRVRAISQRLIAQTGVFRADAANWPFWEVHLSVDE
VNAWCMPPGGKIAVYTGLLAHIKPTDDELA AVLGH EIAHALREHARERVSQOMATSIGLSV
LSMATGSPGASDLGGKLT EVMFTLPNSRTHET EADRMGV ELAARAGFDPRAAVTLWQKMG
AADGNAPPEFLSTHPSASTRIGELQQALQKVLPLYEQARGQAAK

SEC ID N°: 79 secuencia polinucleotídica de la Orf40

Gtgactcaacggtcccgtgcactctcgaagcccgctcccgcgcggggtggccctgcgc
Gcggcgatcgcgctgtcaaccattctgatcgtggccggctgcggctcgtcaagcaccaaa
Taccgacaagaccgcgggtggagcgccgaacagttgtacgcgacgccaagcaggaagt
gcggcgggcaactggaccgatgcccgggagcgctgaccgccatcgaaagccgctaccgc
ttcggcacgtacgccagcaggccctgatcgaactggcttacgtcaactggaaagacggc
gagaacgaacaggcgctggcgccatcgaccgcttcacagcagctctatcccaaccacccg
ggcacggactacgtgctgtacctgaaggggctggtcaacttcacgcccggccagcgcttc
atgagcaacctgaccggccaggacccccgcgagcgcgatcccaagggcctgcgcgcgtcc
tacgatgcgttcaacgaactgggtccagcgcttccccaacagcaagtacacgcccgatgcg
cagaagcgcatgacctgggtgggtcaacgccatcgccatgaacgaagtccacgtggcgcg
tactactacgagcggggcgccctacgtggcgccgccaaccgggscgagaccgtgatcacc
gatttcgagggggcccgccctcggaagaagcgctctatatcatgggtcgagtcgtatgac
aagctgggaatgaccgaactgaagggcgacgcgaacgcgtgctcgaccagaactatccc
aacagcaaattcaagacgcaaggcctgtcgggcgacaagagctggtggaaccgcttctcg
tggcgctga

SEC ID N°: 80 secuencia polipeptídica de la Orf40

VTHRPAALSKPASRRGVALRAAIALSTILIVAGCGSSSTKYDKTAGWSAEQLYADAKQEV
AAGNWTDAERLTAIESRYPFQTYAQQALI ELAYVNWK DGENEQALAAIDRFQQLYPNHP
GTDYVLYLKGLVNFTPASAFMSNLTGQDPAERDPKGLRAS YDAFNELVQRFPSKYTPDA
QKRMTWL VNAIAMNEVHVARYYYERGAYVAAANRAQTVIDFEGAPASEEALYIMVESYD
KLGMT ELKGDAERVL DQNYPN SKPKTQGLSADKSWWNPFSWR

SEC ID N°: 81 secuencia polinucleotídica de la Orf41

Ttgcacccacaggttgaccttgccatgacgaagcactctgccgctcgaatcgccaccatc
Gccgcgcgaggcgctcctgctggccggctgcgcagcgcccaagaaccccgatccgcgcgat
Ccctgggaaggcttcaaccggggcgctctacaagttcaacgacacgggtcgaccgcgcgtg
ttcaagccgggtggcccaggcctataccttcgtcaccgcgcagccgggtgcgcagctgcgtg
cacaatatgttcagcaacgtggcgacctgtggtcgggccaccaacagcttcctgcaaggc
cgcgggcacgatttcgtcaacacgatcgcccgcttctgttcaataccaccatggggatc
ggcggtgcttcgacgtcgctcgaccacggggcgcgcaagatcccaacgacttcggc
gtgacgtggcgctctgggcttcggccagggaaccgtacctgggtgctgccgatctggggc
gccagcagcctgcgcgacggcgctcgccctgatcggcgactggaccggcaaccaggcgcg
accatcggcgcgatcgacaacgtgccgctgcgcaactcgctgtggggcctggaggccgtc

gacctgcgcgccagcctgctcgataccaccgacaccgtggaccgcgtggcgctggatccc
tacagcttcgtgcgcgacgcctacctgcagcgccgcgcgccatggtgcgcggcaccgaag
acggggcgacgacacgctgccacctatgaagacgagggcgatgacgacgcgcccccgcc
gcgcggcgcccgccagccggccgcccagccgcagtaa

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 82 secuencia polipeptídica de la Orf41

5 LPPQVDLMTKHSAAARIATIAAAGVLLAGCAAPKNPDPRDPWEGFNRGVYKFNDTVDRAL
FKPVAQAYTFTVPQPVRSVHNMFNVNVDLWSATNSFLQGRGHDFVNTIGRFLFNTTMGI
GGCFDVASTTGARKIPNDFGVTLGVWGFQGGPYLVLPWIGASSLRDGVGLIGDWTGNQGA
TIGAIIDNVPLRNSLWGLEAVDLRASLLDTTDTVDRLVALDPYSFVRDAYLQRRAMVRGTK
TGDDTLPTYEDEGDDDAAPAAPAAQPAAPQ

10

SEC ID N°: 83 secuencia polinucleotídica de la Orf42

[illegible]

SEC ID N°: 84 secuencia polipeptídica de la Orf42

35 MATKCLLQGSFPDASPIMPAMRSGAAWVLEGRFMRFGWGLPALAVVLALAGCVNREPEER
AAFIAYLEQVAAPQAGVVAAPPDPPTRKALGDYEAQYEPMEAHAHVREALAAQQAALQA
40 LRLHSVDEIVARQDGDWDLAERLAAARTGLEQARAAADAARAGMEQPPDLRNAYARAYEH
SVTAPAQALARISGLLEPLAGDARRVAGFVARHRDQGVDTGDLPTQVRDPSVRSELNVLLQ
ALNGRSDOVSOAOALLNGLAGPAROAP

SEC ID N°: 85 secuencia polinucleotídica de la Orf43

50 Gtgatgctgaagaccgtattgcgcctgccggtctgcgcgcgcgtgctggcgtggccgcg
Ggctgcgcgatgattccgcccgaaccggtggtgatctgtccgctgaccgcgcgcctccg
Tgcgcgcgcgaaccctcggcgcggcccaacggctcgatctaccagccttcggcctacggc
aactatccgctgttcgaggaccgcggccgcgcgaacgtgggcgacatcgtcaccatcgtg
ctggaggaaaagaccaacgcgcgccaaggcgctggccaccaataccagccgcgacggctcg
55 gccacgtggcgctggcggcgcgcgcgcttcattgacggcatcatcaacgacaagctg
gataccgatatctcggggcgcaataccgccaacggcaccggcaagagcagcgcgaacaac
accttcaccggcaccatcacgaccaccgtgatcggggtgctgcccacggcaatctgcag
atcgccgcgcgagaagcagatcgccatcaaccgcggcagcagtagctgcgcttctcgggc
gtggtcgaccgcgatcgatcaccggcagcaatacgggtgctcgacccgggtggccgac
gcgcgatcggaataccgcagcaaggcgctcatggacgaagtcagaccatgggctggctg
caacqctttcttgatccttcgcgctctga

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 86 secuencia polipeptídica de la Orf43

5 VMLKTVLRLPVCAALLALAAGCAMIPPEPVVICPLTAPPPSPPPQPSARPNGSIYQPSAYG
NYPLFEDRRPRNVGDI VTIVLEEKTNAAKG VATNTSRDGSATLGVAAPRFMDGIINDKL
D TDISGGNTANGTGKSSANNFTGTITTTTVIGVLEPNGLQIAGEKQIAINRGSEYVRFSG
VVDPRSITGSNTVSSTRVADARIEYRSKGVMDDEVQTMGWLQRFFLIASPF

10 SEC ID N°: 87 secuencia polinucleotídica de la Orf44

15 Atgaagt cgt ccctgt atcgaatcgcagcgctcagcgccgctgcctgttgctggccggc
Tgcgccaaccagcgcgctccgaaggagtcgggcttcctcggcgattactcgagttgcgc

20 Gaggagcaggtgcccgccgcccgcgcggctgatctaccgcgacgcccgcgctcaagccgcgc
cagtaacccgccatgtggctgtcgccggtcgagtactacccagcccgcaaccgtcggcg
caggtgtcgatggaaacgctgaccgaactgcagaactacctggaccagtgcgtgcgcgc
aagatcgccgcgagatccgcctggtcaacggccccggccggcgctggccaaggcggc
atcgcgatcacagcggtcggcagcgaaagcgaggcgctggcgccctaccagtaacatcccc
gtggcgctggcgtcaccggcgccagggcgctgctggaaggcgccggccgcagcagggc
accatcgcgatcgaaagcaaggtcacgcagccagacgggcccagctgctgtggcgctcg
25 gtgcgcggggccacggcgagcgctacgcgccatcgccagggccaggcctcggtgccg
gctcggcgctcaagcgctgatcgacgaatggaccgataacgtcgacgtgaaatacgc
aactacgtgcgcagcaataa

30 SEC ID N°: 88 secuencia polipeptídica de la Orf44

35 MKSSLYRIAALSAAALLLAGCANQRAPKESGFLGDYSQLREEQVPGGARLIYRDAALKPR
QYTAMWLSPV EYYPSPQPSAQVSMETLTQLNYLDQSLRRKIGREIRLVNPGPGVAKAR
IAITAVGSESEALAAAYQYIPVALAVTGARAVLEGGRPQOATIAIESKVTDSQTGQLLWAS
VRGGTGERVRAIAQGQASVPASALKPLIDEWTDNVAREIRNYVRSK

40 SEC ID N°: 89 secuencia polinucleotídica de la Orf45

45 Gtgaaccaacgtggggcccttttaccggttaacacgtgtgactctctttgcaaaggaact
Atcatgaagtgcgcattgccaaaagcctaaccatagctgcgctggccgccacgctggca
Gcctgcagttccgtccctctcgacgacaaggcaggtcaagctggaggctccggccagggg
tcggcctccggccagatcctggatcccttcaaccgcaaagcattctggcgcaacagcgc
50 tcggtgtactttgacttcgacagctatacgggtgtcggaacagtatcgcgccctggtcgaa
accacgcccgcctacctggcttcgaacaaccagcagcgcatcaagatcgaaggcaatacc
gacgaacgcggcgccgagtagaacctcgactgggccaacgcgctgccgacgctgtc
cgtcgcatgatgacctgctgggtgtgtcggaacaaccagatcgaaaccattagtttcggc
aaggaaaagccgaaggcgacgggttcgagcgaggctgatttcgccgagaaccgcgcgcgc
55 gatatcggttatcagcgctaa

60 SEC ID N°: 90 secuencia polipeptídica de la Orf45

65 VNQRGALLPVNTCDSLCKGTIMKSRIAKSLTIAALAATLAACSSVPLDDKAGQAGGSGQG
SASGQILDFFNPQSILAQQRSVYFDFDSYTVSEQYRGLVETHARYLASNNQQRRIKIEGNT
DERGGAEYNLALGQRRADAVRRMMTLLGVSDNQIETISFGKEKPKATGSSEADFAENRRA
DIVYQR

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 91 secuencia polinucleotídica de la Orf46

5 Gtgtccatgatcgacacgtatttccctgcgccctctgaaggggctcgcggtggctgtcctg
Gcagcctccgcccgtgaccgctgctcgtccggcaaatggggattcccctacaaggccggc
Gtccagcaaggcaactggatcaccaaagagcaggtcgccctgctgcagcaaggcatgtcg
cgcgaaacaggtgcgcttcgcccctgggcagcccccacgctgaccagcgtgctgcacgccgat
cgctgggattacccctactacttcaagcccggctacggcaaggcgcaggaacgccagttc
10 accgtgtggttcgagaacgaccacctggtagcgtggagcggggatgaacagcccacctc
cagccgttccagatcgagaaagtgaacgccaaacaggaagaaaaagccgacgcccaggtg
gatacggccgagaagcgccaggaaggcatcgacaaggctgaaaaagtccggcccatgtc
gatgtcacgacgcccggacaaccccacccctcgactacccgggcgagccgggccaaccttc
gaaccgctcaagtaa

15

SEC ID N°: 92 secuencia polipeptídica de la Orf46

20 VSMIARISLRPLKGLAVAVLAASALTACSSGKWGFPYKAGVQQGNWITKEQVALLQQGMS
REQVRFALGSPTLTSVLHADRWDPYYFKPGYGKAQERQFTVWFENDHLVRWSGDEQPD
QPFQIEKVNKQEEKADAQVDTAEKRQEGIDKAEKVRPHVDVTTDPNPTLDYPGEFGQTF
EPLK

25

SEC ID N°: 93 secuencia polinucleotídica de la Orf47

30 Atggcgaccatcctgtcgggccaacgttgctggcgccgctgacgctgcttgccgcctgc
Agcggttccatggcgcaagagccgccctacaagagcacgatactgggcttgaggcgacc
Atcctggacctgaagggttgccgtccgacaccgacggcgccatcggacctgagcgcc
caagtgggtgcgctggccgcgcgccatgaaggcgtgtcggtacggcagggcaaggatgcc
35 gtcaccatcgccatgatggcgacgtactcttcgatttcgacaaggccgacatactcgcc
gcgccgaaccactctgcgggacatcgcgagctgatcaaatcccccgccaccggcatc
gtcgccattgaaggtcacacggactccaagggtcggtattcctataacaagggcctgtca
ttgcgacgggcccaggcgttgcgagtggtggcgctcacggggtggatgcagcgaaa
40 ctgtcggtcaggggcctgggggctgccaggcccgtagagccaaccagctagctgtgaag
attcaatag

45

SEC ID N°: 94 secuencia polipeptídica de la Orf47

50 MATHPVGPTLLAALTLLAACSGSMAQEPPYKSTILGLQATILDLKGLPSDIDGGISDLSA
QVGALAARHEGVSVRQKDAVTIAMMGDVLFDKADILAAAEPTLRDIAELIKSPATGI
VAIEGHTDSKSDSYNKGSLRRAQAVQWLGAGVDAAKLSVRGLGAARPVQPNQLAVK
IQ

55

SEC ID N°: 95 secuencia polinucleotídica de la Orf48

60 Atgaactatatgcattccccctctgtagttgcggggcgcgcccgccgctgctggcggtg
Gcgggcgggttgccggtcggtggccggtctggccggtgcgccaatcccagcgcatcgagt
Ggggtgtacacgtacggccaggcgcagcgagcagatcgtgcgcaccggcacgggtcacc
ggcgtgctccgattaccatccagaacgacaagtccagcggcgtcggttggtggccggt
ggcgcgctggcggggtagcgggcaatgccgtcgggcgcgccaccggccgcaccatcgcc
acgggtggcgggcgtcatcctcggcgcgtggcgggcaacgccatcgagaaccgcgcgggc
65 aagtcctccggtacgaaatcacgggtgcgcctggacaacggcgaaacccgggtcgtggcg
caggaagccgacgtgcccatcagcgtgggcccagcgcggtgcagggtcatcagcggcgcgggc
ccgaccccgctgacaccgtattga

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 96 secuencia polipeptídica de la Orf48

5 MNYMHSPSVVAGRARLLAVAAVAGSVAVLAGCANPSASSGVYTYGQAQREQIVRTGTVT
GVRPITITQNDKSSGVGLVAGGALGGVAGNAVGGGTGRTIATVGGVILGALAGNAIENRAG
KSSGYEITVRLDNGETRVVAQEADVPISVGQRVQVISGAGPTRVTPY

10 SEC ID N°: 97 secuencia polinucleotídica de la Orf49

15 Ttggcgcttgatcagcaaaaaggagcgcatcttgaaaaccctgctaccgctattggcgctt
Gccgcccctgctgtcgccctgcaacgcgaacgccccctcgatacgcgcgagggcgcgccg
Ccgcgcgatcgcgcatacctcgcgcaattcgctggactggcaaggcagctaccagggcgctg
ctgcgctgcgcgcgaactgccccggcatccgcacgggtgctgaccctgcgcgcgcgacaacacc
taccagttgcagacccagtagctggagcgccagccccgcccggacacgggtgcaaggcaga
ttcggtgctgacgggacgacaacgcatcgagctcgacagcgccggcgatcactaccgt
20 taccaggtcggcgaaaaccggctgaccatgatgtcgcaagacggcaccctgcccagcggc
ccgttggccgagcactacgtgctcaagcgcagccagtga

25 SEC ID N°: 98 secuencia polipeptídica de la Orf49

30 LALISKKERILKTLPLVLAALLSACNANAPSDTPEGAPPPDHTSRNSLDWQGTYYQGV
LPCADCPGIRTVLTLRADNTYQLQTQYLERQPRPDTVQGRFGWLTGDNAIELDSAGDHYR
YQVGENRLTMSQDGTLPSPGLAEHYVLKRSQ

35 SEC ID N°: 99 secuencia polinucleotídica de la Orf50

40 ATGAGACGGTTAAAGGCCAGGCTTTTCAAGGCAGCCGCAGCAGGCCGGCAGGACATGGGGTGGCGCCTA
CCTTGCTGGCGCTGGCCCTGGGGTTCCAGGGGGCGGCGCGTGGGCCAATTGCACCACTTCGGGGTCCAA
CACCCTTGACCGCAGCCGGCGGAGCGCATCGCGCAAGGTAGGGGGCGGCTCTACCGGGAACAACCAA
CACGTCACGGTGCAGGCCGGTGCAGCGGATCGAGGCCGGACAGCGGGGCCATCAGCGTGGGCAATAACA
GCCGAGTCCAGATCCAGGACGGCGCGCTCGTGCAAAGCACGGTCAATACTGCTGCGTCCGGCCAGTACGC
CAAAACGCTGGAAGCAGCAAGCAATAACAATATTTCCATCCAAGTAGGCGCGCAGCTCCTGGCCAAGGGC
45 AGCGCTTCGCAGTCCAGCGCTTGGGATTGTGAGCGCGCGCAATACCGTCACCAACCATGGCAGGATCC
GGGCCGATAATGCCGCGGCAATCTGGATCACTGCCAATACCGCCAATGCGGCCAATACCATCGATAACTA
CGGGACTATCGAAACAGTGCTCAATGGCGGCTACGCCAACGCCATCGGCAGCAGCGGAACAACAGCGCC
ACGGGCGCTGGCGTGACGGTACGCAATCATGCCAACGGGCGCATCGTCCGCAACGTGAAGTTCGAGGCTG

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

ES 2 346 314 T3

TGGAGGCGGGCTATCCGTGGCAGCTCAACCCGCGCTGGCGCATCGAACCCGAGGCCAGGTGGTGTATCA
GCAACTGGGCATTGCCAATGGCGCCGACCGCGTGTCCACGGTGTCTACAAGACGCCCGATGCGCTGACC
GCTCGGTTAGGTACGCGCCTGTCCGGCCAGTACGCATACGGGAAGGCGCAGTTGCGGCCGTTTCATGGGCG
TATCGCTGCTGCACGATTTACCCGGCGCGACACCGTACGTTTCGCGGGCGCGCATGGCGTACGCGCCAG
CCGCCAGAACACGCGCGTGGATCTGAAGGCGGGCGTGGACACGCAGCTGGGCAAGAGCGTAGGCCGTGG
GGCAGGTAGGCTACGGCAAGTCGGTCCGCAGCGCGACGGCAGCGACCGTGGCTGGAGCGCCAACCTGG
GGCTGCGCGTGGCGTATTGA

SEC ID N°: 100 secuencia polipeptídica de la Orf50

MRRLKAQAFEGSRSRPAGHGVAPTLLALALGFQGAANCTTSGSNTTCTAAGGAHRAK
VGGGSGTGNQHVTVQAGARI EAGDSGAI SVGNNSRVQIQDGAVVQSTVNTAASGQYAKTL
EAASNNNISIQVGAQLLAKGSASQSSALGLSGAGNTVTNHGTIRADNAAAIWITANTANA
ANTIDNYGTIETVLNGGYANAIGSTRNNSATGAGVTVRNHANGRI VGNVKEAGDDSVIL
DGGSTITGSLNGSGNNSLTAKAGDGTLGRAIRNFGTITKQEAGTWTLNGQVGRNDNNPK
STVKVEGGTLVLRGDNNGATQGGVLQVSAGATADVTAASAMQSI SNAGTVQFTQDSNAA
AGVLSGTGSI VKRGGGDLTLTGNNHTGKVVVEAGSLSVSAANNLGGAGSSVQLKGGALA
LKKTI AVNRGLTLDGSAQTLI IEPGTTTTWQQQVSGAGKLVQGGTLVLEHASNTYSGGT
EINNGTLRAAHDA SLGSGTLALKNSQLAATDSFTATRALTLAGNESIDVAATKILSWNGE
ISGAGTLVKEGQGTLLLRGTNQNGGTTVNAGTLQISRDANLGRGALALNDGTLQSTGSF
ATSRAATLRQATMEVDASHTVTWNGELSGGMLRKSGQGTALALAGANTYSGGTVEAGA
LRAGHEDNLGRGAILQGGDLLAGGSFSSNRDLTLVRGSLDVARDATLTWNGAISGAGDL
VKTGDGTLALTGVNEYAGQTVLRQGKLRVAREESLGGAAALVLENTVFESAGSYAIGRRV
TLKGAPKVATPAGDTLEWRGTVGDGKLYKQGGGTLVLSGNNTYAKGVEVWGGVVQVSRD
QNLGAANGAVTLNGGGLAANGDFTSNRQLELTAGAKAIDVAAGKDVWRGVVNGAGALT
AGDGTLRLESVNTYTGGTRLQGGTVQVSRDNLGQAAGAVTFDGGRLASTGSFATARAAT
LNNAGQIDTAQGTTLTWNGAIGGKELRKQAGTLVLGGANTYQGDTRVEAGTLQVSADA
NLGQGAVIDLHDSRLATTGTFTSRRLELTGRGTVQAAAAATLDWRGTVAGAGTLVKEGAG
TLVLAGDNQHAGGTLVHGGTLRIARDANLGAAGTAVTLDGGTLATTASLALDRALRVGAR
NGVLLPDAGTTLDWRGVVAGAGKLTAKGPGMLVLSADNRHGGGTAVTGGTLQVSRDANLG
AAAGALTLDGGTLLSTASFASARAATLDAAGGTFVTRDGTRLDWDGAIGGAGGLVKEGAG
ELRLGNANTYQGPTRIAAGRLAVNGSIA SPVTVEQAGVLGGTGRI VGDVANRGVVPAGNS
IGALT VAGNYAGTGGSLVEAVLGGDAAPADRLVLDGGAASGVTVPVVVKPQGGVGGTLRL
GIPVVVAQGGATTAPGAFRLAQPLVAGAYEYQLLRGAGDGAQAQDWYLRTSRVERDKA
GRI VKVVPFYRPEVALYAGTPMLMRMTGTEMLGSYRERAGQTGAVSPEAGATAARGGWAR
TFGRREFERSAGGEAAPSPDGHLAGAQLGADLYARSSGTRHTDAFVFGGYATVRGDVHGL
ARGEIQAVGTSLRATQLGAYWHTGPGGWYIDTVLAGTRYRQQTSSAQVGAVSRGWM
TASVEAGYPWQLNPRWRIEPQAQVVYQQLGIANGADRVSTVSYKTPDALTLRLGTLRSQ
YAYGKAQLRPFMGSLLHDFTGADTVTFAGAHGVRASRQNTAVDLKAGVDTQLGKSVGLW
GQVGYGKSVSGDGS DRGWSANLGLRVAY

SEC ID N°: 101 secuencia polinucleotídica de la Orf51

ATGAACAAACCCTCCAAATTCGCTCTGGCGCTCGCCTTCGCCGCTGTTACGGCCTCTGGTGCAGCTTCCG
CGCAAACCGTGGACAACTGGCGCAATCCGTTTGGCGACGTTTGAAGAACGGCACCAATGAACGTGTGCTG
GCGCGATGCGTTCTGGACCCCGCTACCGGCATCCCGGTTGCGACGGCGTTCCGGTCTGCTCAGAAGGAA
AAGTCCGCTCCCATGGCCGCCAAGGTCGTGTTCAATGCTGACACCTTCTTCGACTTCGACAAGTCGACGC
TGAAGCCGGAAGGCCGCCAGCTGCTGGATCAAGTCGCCAGCAAGCCGGCACGATCGATCTGGAAACGAT
CATCGCCGTTGGCCACACGGA CTGATCGGCACCGAAGCCTACAACCAGAAGCTGTCCGAGCGCCGTGCC
GCTGCGGTCAAGACCTACCTGGTCAGCAAGGGTATCGACCCCAACCGTATCTACACGGAAGGCAAGGGCG
AACTGCAACCGATCGCTTCAACAAGACCGGTGAAGGCCGTGCCAGAACCGTCGCGTGGAAATCGAAAT
CGTCGGTAGCCGAAGAACTAA

SEC ID N°: 102 secuencia polipeptídica de la Orf51

MNKPSKFALALFAAVTASGAASAQTVDNWRNPFGDVWKNGTNELCWRDAFWTPATGIPG
CDGVVPAQKEKSAPMAAKVFNADTFFDFDKSTLKPEGRQLLDQVAQAGTIDLETIIAV
GHTDSIGTEAYNQKLSERRAAVKTYLVSKGIDPNRIYTEGKGELQPIASNKTREGRAQN
RRVEIEIVGSRKN

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 103 secuencia polinucleotídica de la Orf52

ATGAACAAACCCCTCCAAATTCGCTCTGGCGCTCGCCTTCGCCGCTGTTACGGCCTCTGGTGACGCTTCCG
CGCAAACCGTGGACAACCTGGCGCAATCCGTTTGGCGACGTTTGGAAAGAACGGCACCAATGAAGTGTGCTG
GCGCGATGCGTTCTGGACCCCGCTACCGGCATCCCGGTTGCGACGGCGTTCCGGTTCGCTCAGAAGGAA
AAGCCCGCTCCCATGGCCGCCAAGGTCGTGTTCAATGCTGACACCTTCTTCGACTTCGACAAGTCGACGC
TGAAGCCGGAAGGCCGCCAGCTGCTGGATCAAGTCGCCAGCAAGCCGGCACGATCGATCTGAAACGAT
CATCGCCGTTGGCCACACGGACTCGATCGGCACCGAAGCCTACAACCAGAAGCTGTCCGAGCGCCGTGCC
GCTGCGGTCAAGACCTACCTGGTCAGCAAGGGTATCGACCCCAACCGTATCTACACGGAAGGCAAGGGCG
AACTGCAACCGATCGCTTCGAACAAGACGCGTGAAGGCCGTGCCAGAACCGTTCGCGTGGAATCGAGAT
CGTCGGTAGCCCAAGAATAA

SEC ID N°: 104 secuencia polipeptídica de la Orf52

MNKPSKFLALAFAAVTASGAASAQTVDNWRNPFQDVWKNGTNELCWRDAFWTPATGIPG
CDGVFVAQKEKPAPMAAKVFNADTFDFDKSTLKPQGRQLLDQVAQAGTIDLETIIAV
GHTDSIGTEAYNQKLSERRAAVKTYLVSKGIDPNRIYTEGKGELQPIASNKTREGRAQN
RRVEIEIVGSRKN

SEC ID N°: 105 secuencia polinucleotídica de la Orf53

ATGAAGTTCTACCCCTCCCATCCGATGCCCGAGTCGCTCGCGGCTGCGATCGCAGTGCCTCTGTTGGGCC
TGCTGCCGGCGGCGCAGGCCGCGTCCACGGCGGTCCAGCTGCCATCCGTACGGTCGAGGGCGAGTACTC
GTCCTATCAACCGGAAAGCGCCAGTCCGCCAAGTTACCGCGCCCTGGCGGACACGCCGCGCACGGTG
CAGGTATCCCTGAGCGGCTCATCCAGGACCAAGGGGCCAGCGACCTCGAAGCGGTACTGCGCAATGCGC
CAGGGATATCGATGACCGCGCGCAAGGCGCCGTCCGGCCAGCGACCTGCCGTTTATCCGCGGCCAGAA
TTCGGCCAGCAGCCTGTTTGTGACGGCCGTGCGCGATCCAGCAACGCAATCGCGCGATACCTTCAACCTG
GAACAGGTCGACGTCGTCAAGGGGCCGATTCGGTATTTTCCGGGCGCGCGCGCGCGCGGAAGCATCA
ACCTCGTCACCAAGACGCCAGGAACAGGATTTACCGAAGTCCAGGCCGCGATCGGGACGGCCGAGAC
CTACCGAGGCAACCATAGACGCAACTGGGTGCTGGGCGGAGAACACGGCGCTGCCCTCAACCTGCTGGGC
ACCAGGGGCACCGTGCCGGGCCGCGACAAGGCGGTGAGTTACGCCGCGTGGGTATCGCGCCATCGCTGC
GCCTGGGCTGAGCGGCCCAACCGCGTGACGCTGGGCTGTACCTCTATCGCCACCGCGGGTTCGGA
TTATTGATTCGGTACGATCCGCGCACCGGCGACCGGATACCGGAGACCATCGGGTACGCGGCCGCAAC
TTCTACGGCCTGGTGACGCGGACTCCGGCGATACCGAGGACTACGCCGCCACCGTCAAATGGGAGCAGC
ACCTCCGCAATGGCTTCAAGGTGGAGAACCTGGCGCGTACTCGCGCGCCACGGTGGAGCAGATCACAC
CATCCCCGAAGTGAACCCGCGATCTGGCCAAAGGGCTGGTGTACCGCAATCTGCGCGCCAGCTACCAG
GTCAACGACAGTTTTCGCCAACCGCACCGACCTGCGCGGCACATTGACACGGGGCAGTGGCGCCATACCT
TCGATCTGGCGGGGAGTTGCCACACAGCCGCGCAGTCGCGACCGCTACAAGCAGGAAATCCCCGACGC
CGCCAGTCCCTTGGTCCGCCGTGACGGGCGGCAACAATCCCGCCTGTGCGCCTCGCTCCGGGATCCGGAT
CCGCACGTGGATTTCGCCGGAACGGTGCGGCGCAACCATAACCCGGCCCGCTACCACACCGACATCCTGT
CCCTGTACGGTTTCGACACCATCGCCTTCGACGAGCAGTGGCAGCTGAATCTCGGCCTCGCTGGGACCA
CTACAAGACCAGCGGACGCAACCTGCCGTACGAGGCGCCAAGCCGCCGCTCTACGAGAGCGCGCGCGT
ACCGACAACCTGTTCACTACAGCTCGGCTGGTCTACAAGCCTCGTCCGGACGGCTCGGTGTATGCGA
GCTACGGCACGGCGTCCACGCCGTGGGCGGTGTCGACTACGCCCGGCGGACAAATCTCCGGCACAAAG
CCAGCAGTTCAAGCCGGAGCGCAGCGAGGTGATCGAGGTGGGACCAAGTGGCAGGTGCTGGACCGGCGG
CTGCTGGTGACGGGCGCATGTTCCGCGAAACCGCGCAAGAACACACGACATCGAAGTCGCCGAAGGCTGC
GCGACCGGCGCGCAAGAGCCGCGTCAACGGCATGGAGCTGGGCGTGGCGGGCAGCTGACGCCGCGCTG
GGACGTCTACGGCGGCTACGCGCTGCTCGACAGCAAGCTGGTCAGGGCCAGCCATAACAGCGGGGCGCAA
GGCCAGCCGTGCCAGCGCGCCCGGCACGCAATTCAGCATCTGGAGCACCTACAAGCTGCTGCCGGAGC
TGACCGTGGGGCGGCGCGTTCTATCGCAGCAAGGTCTA

TGGCAACGCAGATGCCGGCCACAACAAGGACGGCAACGCCAAGGCGCGCTGGGTGCCGGCGTACTGGCGC
TTCGACGCCATGGCGGCGTACCAGCTCAACAAGCACCTTACGGCCAGTTGAACGCTTACAACCTGCTCG
ACAAGACCTATTACGCCAAGACCTACCGACGCAATACCGCGCGCTGGGTCCGGGGCGGTCCGCCATGCT
GACGTTCAAGCTGAGCTACTGA

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 106 secuencia polipeptídica de la Orf53

5 MKFYPSHMPESLAAAIAPVLLGLLPAAQAASTAVQLPSVTVGEYSSYQPESAQSPKFT
 APLADTPRTVQVPERLIQDQASDLEAVLRNAPGISMTAGEGGRPASDLPFIRGQNSAS
 SLFVDGLRDPSTQSRDTFNLEQVDVVKGPDSVFSGRGGAGGSINLVTKTPRNQDFTEVQA
 GIGTAETYRGTIDGNWVLGENTALRLNLLGTRGTVPGRDKAVEFSRVGIAPSLRLGLSGP
 TRVTLGLYLYRHRRVPDYSIPYDPRGTPTTETIGVSRNRYGLVQRDSGDTEYAATVK
 10 WEHDLANGFKVENLARYSRATVEQITTIPELKTADLAKGLVYRNLRASYQVNSDFANRTD
 LRGTFTDQWRHTFDLGEFATSRRSRDRYKQEIIPDAASPCSPVTGGNNPALCASLRDPD
 PHVDFPGTVRRNHNPARYHTDILSLYGFDITAFDEQWQLNLGLRWDHYKTSGRNLPVRGA
 KPPVYESAARTDNLFNQGLVYKPRPDGSVYASYGTASTPSAVSDYAPADNISGTSQQF
 KPERSEVIEVGTKWQVLDRLRLVTGAMFRETRKNTSIEVABGLRAPAGKSRVTGMELGVA
 15 GSLTPRWVDVYGGYALLDSKLVRASHNSGAQGOPLPSAPRHAFSIWSTYKLLPELTVGAGA
 FYRSKVYGNADAGHNKDGTPKARWVPAYWRFDAMAAYQLNKHLLTAQLNVYNLLDKTYAK
 TYRSHYAALGPGRSAMLTFKLSY

SEC ID N°: 107 secuencia polinucleotídica de la Orf54

25 ATGAAAAAGACTCTGCTCGCTGCCGCCCTGCTCGCCGGTTTCGCCGGTGCCGCTCAGGCAGAAACGTCGG
 TCACCCGTACGGTATCATCGACACGGGTATCGGCTACAACGATGTCGATTTCAAGGTGAAAGGCGCTAA
 CGCCGACGACAGCGACTTCAAGTACAACCAAGCCGCTTCGGCATGATCAACGGCGTGCAGAACGGTTTCG
 CGCTGGGGTCTGCGTGTACGGAAGATCTGGGTGACGGCCTGCAAGCTGTGTTCCTCAACTGGAATCGGGCT
 TCAACTCGGGCAACGGTAACCTCGGCCAAGACGGCCGCTTTCGGTTCGCCAAGCCACCATCGGTCTGCA
 AAGCGAAAGCTGGGGCCGTCTGGACTTCGGTCGCCAACAACATCGCCTCGAAGTACTTCGGCTCGATC
 30 GATCCGTTTCGGCGCTGGCTTCGGTCAAGCCAACATCGGCATGGGCATGAGCGCGATGAACACCGTTTCGCT
 ACGACAACATGGTATGTACAGACCCCGTCGTACAGCGGCTTCCAGTTCGGTATCGGCTACTTCGTTTCAG
 CGCGAACGACAAGGATGCTGACGCGCTCAACCGGTTGGCTTCGCCACCGCCGACAACTTCGTGCCATC
 ACGACCGGTCTGCGCTACGTGAACGGCCGCTGAACGTGCTCTGTGCTACGACCGCTGAACGCGCTCGA
 ACAACCAAGCCCAAGGCGAAGTTGACGCGACCCCGCGCAGCTACGGCCTCGGCGGTTTCGTATGACTTCGA
 35 AGTCGTGAAGCTGGCTCTGGCCTACGCTCGCACGACCGCGCTGGTTTCGGTGGCCAAGGTACCCGGTC
 GCCGTACCGCTGCCCTCGGGCGACAAGTTTCGGCGGCTTCGGCGTGAACACCTTCGCTGACGGCTTCAAGG
 CCAACTCGTACATGCTCGGCCTGTTCGGCCCCATCGGCGGCGCCAGCAACGTGTTTCGGTTCGTGGCAGAT
 GGTTCACCCCCAAGCTGACCGGCGGCGACGAGAAGATGAACGTCTTCTCGCTGGGCTACACCTACGACCTG
 40 TCCAAGCGCACCAACCTGTACGCCTACGGTTCGTACGCCAAGAAGTTCGCGTTCCTGGAAGATGCCAAGT
 CGACCGCTGTTCGGCGTTCGGTATCCGTACCGCTTCTAA

SEC ID N°: 108 secuencia polipeptídica de la Orf54

45 MKKTLAALLAGFAGAAQAETSVTLYGIIDTGIGYNDVDFKVKGANADDSDFKYNHSRF
 GMINGVQNGSRWGLRGTEDLGDGLQAVFQLESFNSGNGNSAQDGRLFGRQATIGLQSES
 WGRLDGFRQTNIAKYFGSIDPFGAGFGQANIGMMSAMNTVRYDNMVMYQTPSYSGFQF
 50 GIGYSFSANDKDADAVNRVGFATADNVAITTLRYVNGPLNVALSYDQLNASNNQAQGE
 VDATPRSYGLGGSYDFEVVKLALAYARTTDGWFGGQGYFVAVTLPSGDKFGGFGVNTFAD
 GFKANSYMVGLSAPIGGASNVFGSQMVDPKLTGGDEKMNVSLSGYTYDLSKRTNLYAYG
 SYAKNFAFLEDAKSTAVGVGIRHRF

ES 2 346 314 T3

SEC ID N°: 109 secuencia polinucleotídica de la Orf55

ATGAAAAAGACTCTGCTCGCTGCCGCCCTGCTCGCCGGTTTCGCCGGTGCCGCTCAGGCAGAAACGTCGG
TCACCCTGTACGGTATCATCGACACGGGTATCGGCTACAACGATGTCGATTTCAAGGTGAAAGCGCTAA

CGCCGACGGCAGCGACTTCAAGTACAACCACAGCCGCTTCGGCATGATCAACGGCGTGCAGAACGGTTTCG
CGCTGGGGTCTGCGTGGTACGGAAGATCTGGGTGACGGCCTGCAAGCTGTGTTCCAACTGGAATCGGGCT
TCAGCTCGGCCAACGGTAACCTCGGCCAACAGCGGTGCGCTGTTTCGGTTCGTCAGCCACCATCGGTCTGCA
AAGCGAAAGCTGGGGCCGTCTGGACTTTCGGTCGCCAAACCAACATCGCCTCGAAGTACTTCGGCTCGATC
GATCCGTTTCGGCGCTGGCTTCGGTCAAGCCAACATCGGCATGGGCATGAGCGCGATGAACACCGTTTCGCT
ACGACAACATGGTCATGTACCAGACCCCGTCGTACAGCGGCTTCCAGTTTCGGTATCGGCTACTCGTTTCAG
CGCGAACGACAAGGACGCTGACGCCGTCAACCGCGTTGGCTTCGCCACCGCCGACAACGTTTCGTGCCATC
ACGACCGGTCTGCGCTACGTGAACGCCCGCTGAACGTGCTCTGTGTCGTACGACCAGCTGAACGCCCTCGA
ACAACCAAGCCCAAGACGAAGTTGACGCCACCCCGCGCAGCTACGGCATCGGCGGTTTCGTATGACTTCGA
AGTCGTGAAGCTGGCTCTGGCCTACGCTCGCACGACCGACGGCTGGTTCGGTGGCCAAAGGCTACCGGTC
GCTGTACGCTGCCCTCGGGCGACAAGTTCGGCGGCTTCGGCGTGAACACCTTCGCTGACGGCTTCAAGG
CCAACCTCTACCTGTTGGGCCTGTTCGGCTCCGATCGGCGGCGCCAGCAACGTGTTTCGGTTTCGTGGCAGAT
GGTTGACCCAGCAACGACAAGCTGACCGGCGGCGACGAGAAGATGAACGTCTTCTCGCTGGGCTACACC
TACGACCTGTCCAGCGCACCAACCTGTACGCCTACGGTTCGTACGCCAAGAACCTTCGCGTTCCTGGAAG
ATGCCAAGTCGACCGCTGTTCGGCGTTCGGTATCCGTCACCGCTTCTAA

SEC ID N°: 110 secuencia polipeptídica de la Orf55

MKKTLAALLAGFAGAAQAETSVTLYGII DTGIGYNDVDFKVKGANADGSDFKYNHSRF
GMINGVQNGSRWGLRGTEDLGDGLQAVFQLES GFSSANGNSAQDGR LFGRQATIGLQSES
WRLDFGRQTNIA SKYFGSIDPFGAGFGQANIGMGMSAMNTVRYDNMVMYQTPSYSGFQF
GIGYSFSANDKDADAVNRVGFATADNVRAIT TGLRYVNGPLNVALSYDQLNASNNQAQDE
VDATPRSYGIGSYDFEVVKLALAYARTTDGWFGGQGY PVAVTLP SGDKFGGFGVNTFAD
GFKANSYLLGLSAPIGGASNVFGSWQMVDP SNDKLTGGDEKMNVFS LGYTYDLSKRTNLY
AYGSYAKNFAFLEDAKSTAVGVGIRHRF

BPP0452: Autotransportador

>BPP0452 *B. parapertussis* np_882803

>BPP0452_n

secuencia homóloga de *B. pertussis*: SECID50 en VB60452

BPP3135: OmpA

>BPP3135 *B. parapertussis* np_885310

>BPP3135_n

>BP0943 *B. pertussis*

>BP0943_n

ES 2 346 314 T3

BPP3376: Probable receptor dependiente de TonB para transporte de hierro

>BPP3376 *B. paraptussis* np_885539

>BPP3376_n

secuencia homóloga de *B. pertussis*: SECID14 en VB60452

BPP3392 Precursor de proteína porina de membrana externa

>BPP3392 *B. paraptussis* np_885555

>BPP3392_n

>BP0840 *B. pertussis*

>BP0840_n

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende FHA y toxina pertúsica y que comprende además un polipéptido que comprende

a) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 85% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 34, a lo largo de la longitud completa de la SEC ID N°: 34, o

b) un fragmento inmunogénico que tiene al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 34, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 95% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 34, a lo largo de la longitud completa de dicha secuencia de la SEC ID N°: 34, o un fragmento inmunogénico de la misma, en la que el fragmento inmunogénico tiene al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 34.

3. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 34, o un fragmento inmunogénico de la misma, en la que el fragmento inmunogénico tiene al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 34.

4. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-3, en la que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es un fragmento inmunogénico del polipéptido de la SEC ID N°: 34, en la que dicho fragmento inmunogénico tiene al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 34 y es capaz de generar una respuesta inmune que reconoce el polipéptido de la SEC ID N°: 34.

5. La composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho polipéptido es parte de una proteína de fusión de mayor tamaño.

6. Una composición inmunogénica que comprende

(i) una proteína BrkA que es un polipéptido que comparte una identidad de al menos el 70% con la SEC ID N°: 34, o que comprende un fragmento antigénico de al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 34;

(ii) FHA;

(iii) toxina pertúsica;

y al menos, o exactamente, un antígeno o antígenos de Bordetella diferentes, en la que el antígeno o antígenos se seleccionan de al menos un grupo o grupos de proteínas seleccionadas de las siguientes:

a) al menos una proteína de adquisición de hierro de Bordetella del grupo constituido por un polipéptido que comparte una identidad de al menos el 70% con la SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 ó 28, o que comprende un fragmento antigénico de al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 ó 28;

b) al menos una lipoproteína de Bordetella seleccionada del grupo constituido por un polipéptido que comparte una identidad de al menos el 70% con la SEC ID N°: 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96 ó 98, o que comprende un fragmento antigénico de al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96 ó 98;

c) al menos una adhesina de Bordetella seleccionada del grupo constituido por las fimbrias 2 y/o 3 o pertactina; y

d) al menos una toxina/invasina de Bordetella o antígenos implicados en la secreción de toxina/invasina seleccionados del grupo constituido por adenilato ciclasa, toxina dermonecrótica (Dnt), Tipo III ss o lipopolisacárido.

7. La composición inmunogénica de la reivindicación 6, que comprende una o más proteínas de adquisición de hierro de Bordetella seleccionadas del grupo constituido por los polipéptidos que comparten una identidad de al menos el 70% con la SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 ó 28, o que comprenden un fragmento antigénico de al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 ó 28.

ES 2 346 314 T3

8. La composición inmunogénica de la reivindicación 6 ó 7, que comprende una lipoproteína de *Bordetella* seleccionada del grupo constituido por BipA, compartiendo el polipéptido una identidad de al menos el 70% con la SEC ID N°: 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96 ó 98, o que comprenden un fragmento antigénico de al menos 15 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°:56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96 ó 98.
9. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 6-8, que comprende una adhesina de *Bordetella* seleccionada del grupo constituido por fimbrias y pertactina.
10. La composición inmunogénica de la reivindicación 9, en la que la adhesina de *Bordetella* es la fimbria 2 y/o 3.
11. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 6-10, que comprende una toxina/invasina de *Bordetella* o antígenos implicados en la secreción de toxina/invasina seleccionados del grupo constituido por adenilato ciclasa, toxina dermonecrótica (dnt), Tipo III ss o lipopolisacárido (LPS).
12. La composición inmunogénica de las reivindicación 11, en la que la toxina/invasina de *Bordetella* o el antígeno implicado en la secreción de toxina/invasina es LPS.
13. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 6-12, que comprende a) FHA, b) toxina pertúsica y c) adenilato ciclasa.
14. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-13 para la prevención o tratamiento de una infección por *Bordetella pertussis*.
15. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-14 para la prevención o tratamiento de una infección por *Bordetella parapertussis*.
16. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-15 para la prevención o tratamiento de una infección por *Bordetella bronchiseptica*.
17. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-16, que comprende un polipéptido que se expresa durante la fase Bvg+ temprana de la infección por *Bordetella*.
18. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-17, que comprende un polipéptido que se expresa durante la fase Bvg+ tardía de la infección por *Bordetella*.
19. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-18, que comprende un polipéptido que se expresa durante la fase Bvgi de la infección por *Bordetella*.
20. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-19, que comprende un antígeno que se expresa durante la fase Bvg- de la infección por *Bordetella*.
21. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-20, que comprende además toxoide diftérico y toxoide tetánico.
22. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-21, que comprende además oligosacárido o polisacárido capsular PRP de *Haemophilus influenzae* b.
23. La composición inmunogénica de la reivindicaciones 1-22, que comprende además antígeno superficial de hepatitis B (HbsAg).
24. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-23, que comprende además vacuna de la polio inactivada (IPV).
25. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-24, que comprende además uno o más de polisacáridos u oligosacáridos capsulares A, C, W o Y de seres humanos.
26. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-25, que comprende además una proteína de *N. meningitidis* serogrupo B.
27. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-26, que comprende además uno o más polisacáridos u oligosacáridos capsulares de *S. pneumoniae*.
28. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-27, que comprende además virus de la Hepatitis A atenuado muerto.
29. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la reivindicación 1-28.

ES 2 346 314 T3

30. La vacuna de la reivindicación 29, que comprende un adyuvante.

31. Uso de la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-28 en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad por Bordetella.

5

32. El uso de la reivindicación 31 en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento o la prevención tanto de una enfermedad por *B. pertussis* como por *B. parapertussis*.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

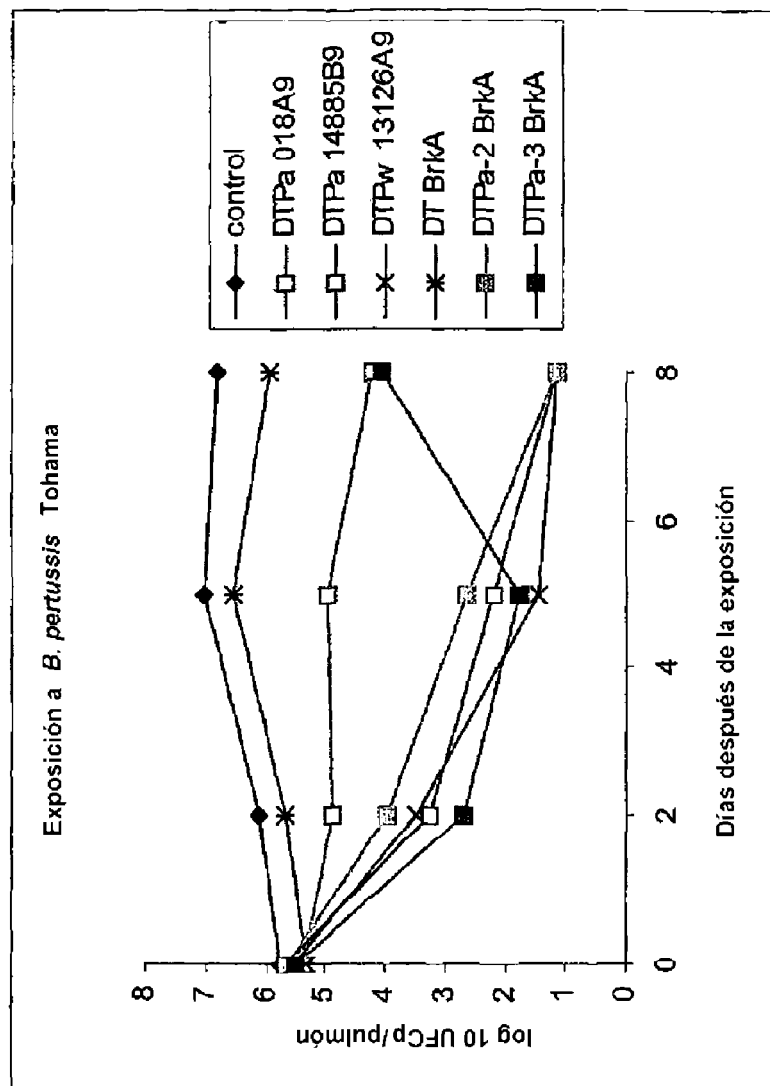


Figura 2

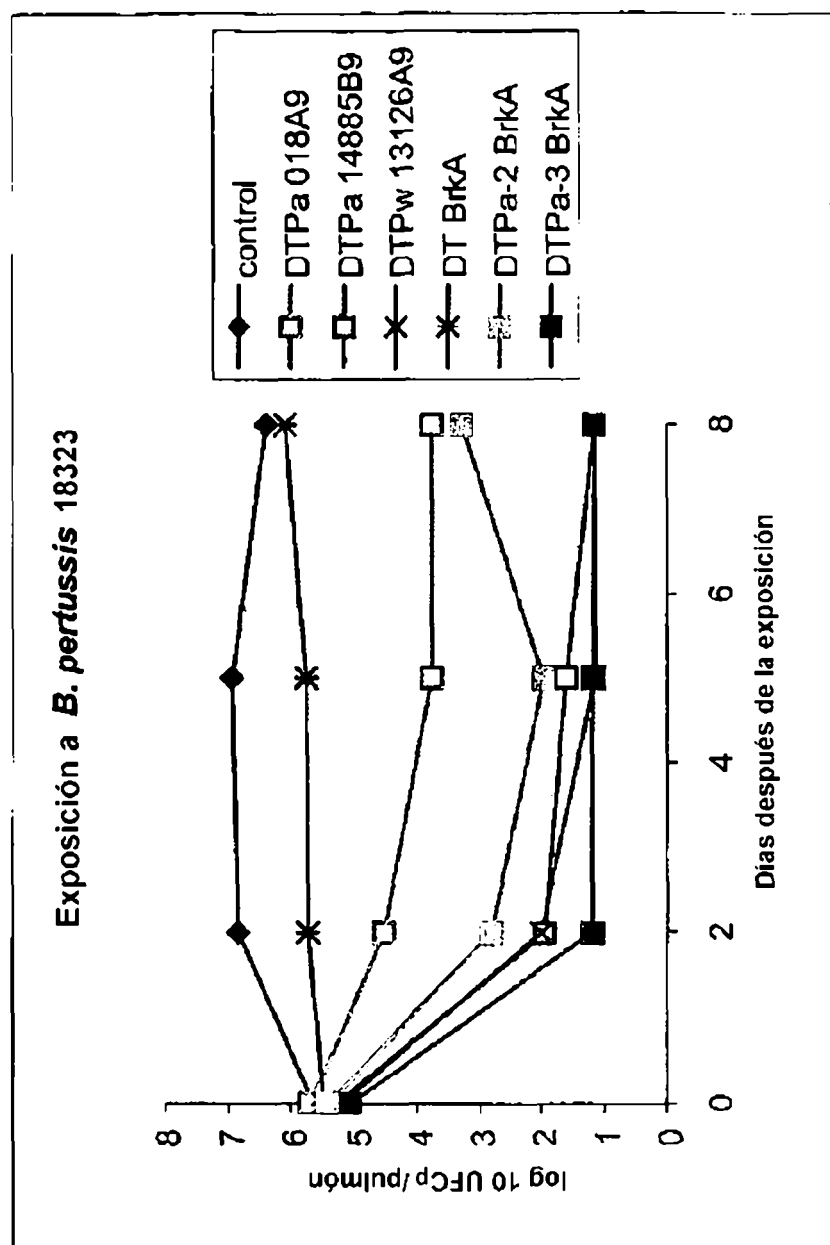
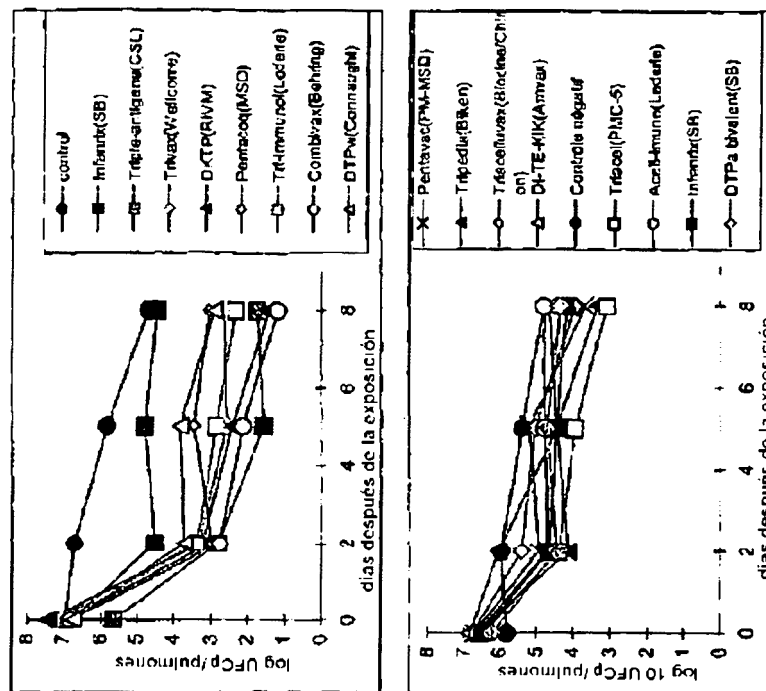
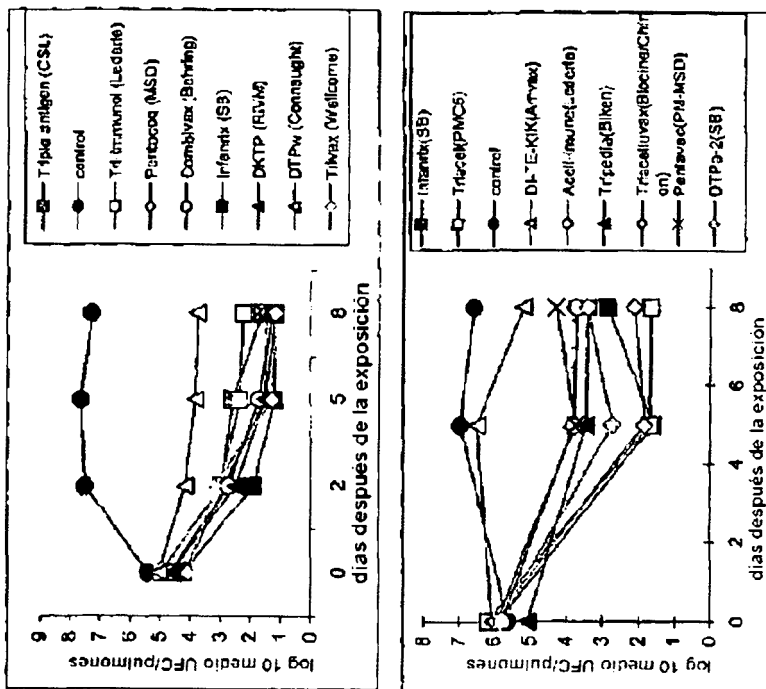


Figura 3

B. paraptussis



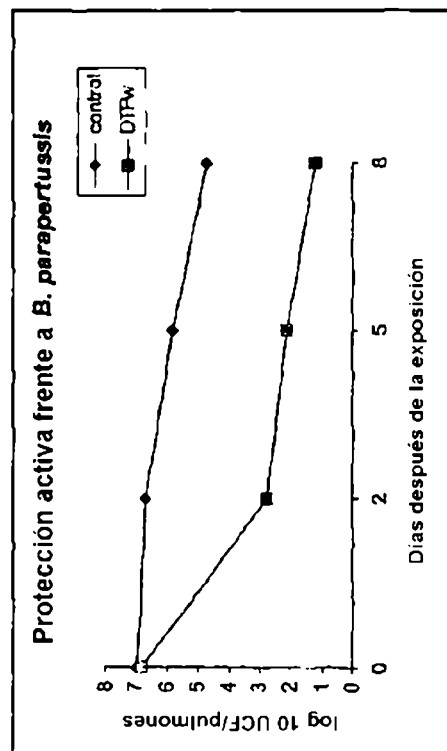
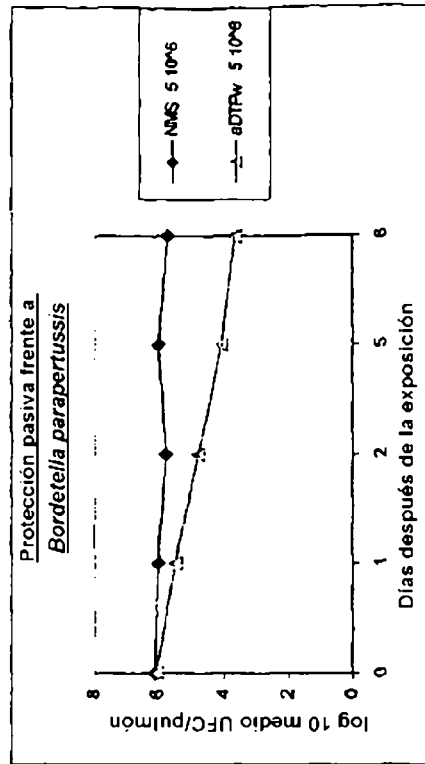
B. pertussis



DTPw

DTPa

Figura 4

A**B**

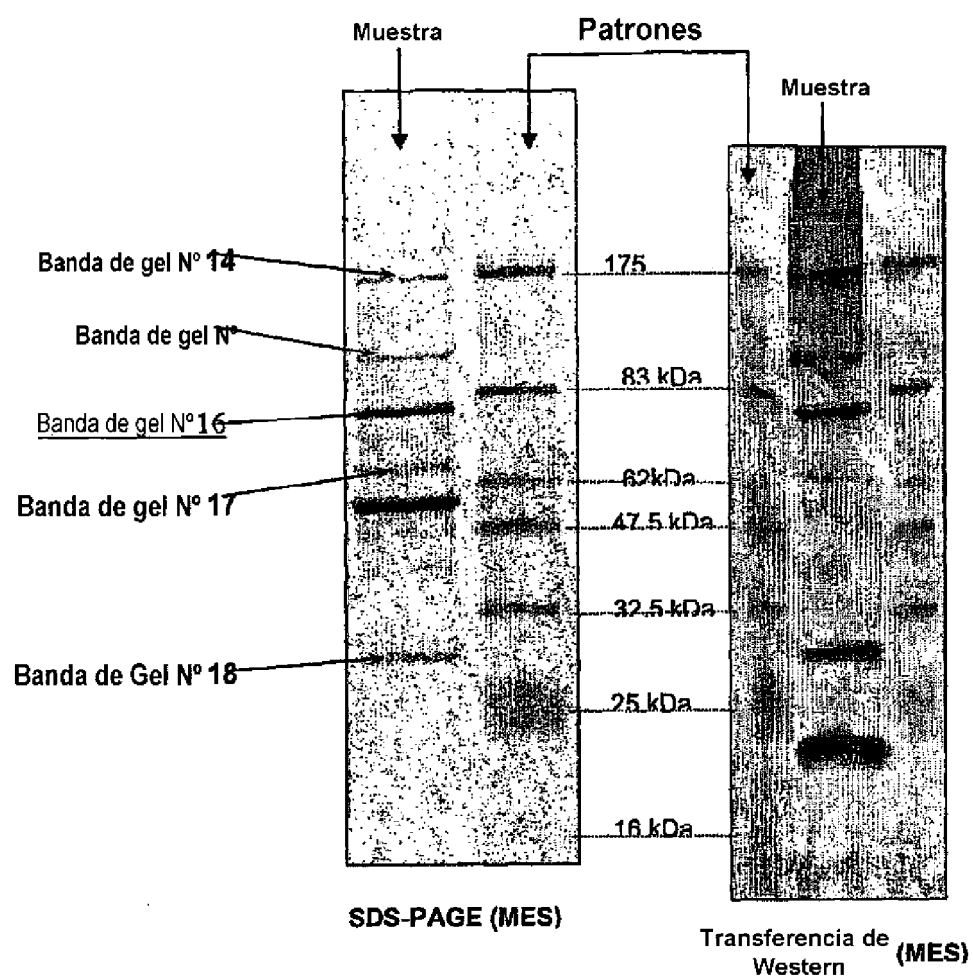


Figura 5

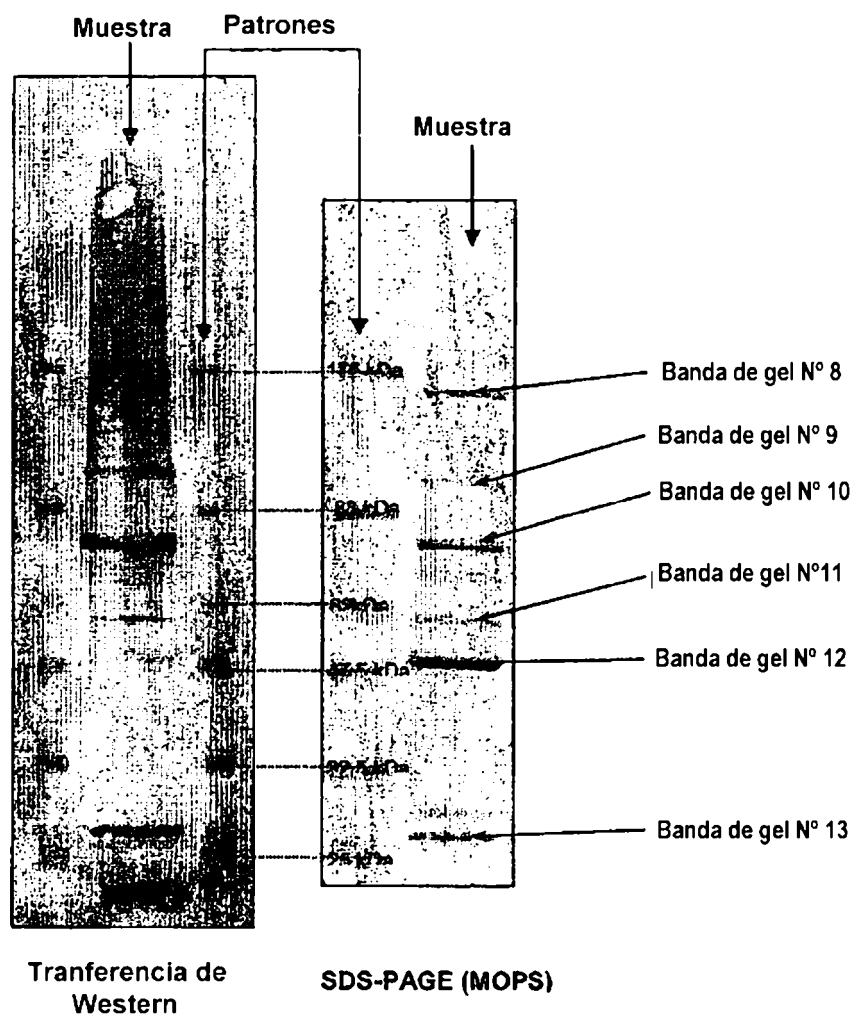


Figura 6