



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 278 382**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/19 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

C12N 15/26 (2006.01)

C12N 15/27 (2006.01)

C12N 15/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **95930814 .9**

86 Fecha de presentación : **09.08.1995**

87 Número de publicación de la solicitud: **0776361**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.1997**

54 Título: **Herpesvirus recombinante de pavos y sus usos.**

30 Prioridad: **09.08.1994 US 288065**
22.12.1994 US 362240

73 Titular/es: **Schering-Plough Ltd.**
Weyrstrasse 20, P.O. Box
6000 Lucerne 6, CH

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2007

72 Inventor/es: **Cochran, Mark D.;**
Junker, David E.;
Wild, Martha A. y
Singer, Philip A.

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2007

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Herpesvirus recombinante de pavos y sus usos.

5 A lo largo de esta solicitud se mencionan varias publicaciones con números arábigos entre paréntesis. Las citas completas para estas publicaciones se encuentran al final de la descripción, inmediatamente antes de las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

10 La capacidad de aislar DNA y clonar tal DNA aislado en plásmidos bacterianos ha expandido grandemente los métodos disponibles para preparar vacunas virales. Los métodos usados para conseguir la presente invención implican modificar las secuencias de DNA clonadas de varios agentes patógenos virales de animales, mediante inserciones, supresiones (delaciones), cambios de bases únicos o múltiples e inserciones subsiguientes de estas secuencias modificadas en el genoma del virus. Una utilidad de la adición de una secuencia extraña se logra cuando la secuencia extraña
15 codifica una proteína extraña que es expresada durante la infección viral del animal. El virus vivo resultante puede usarse luego en una vacuna para producir una respuesta inmune en un animal hospedante y proporcionar protección al animal contra la enfermedad. Un virus con estas características se denomina un vector viral, debido a que se convierte en un vector vivo que llevará y expresará la proteína extraña en el animal hospedante. En efecto, llega a ser un sistema
20 de administración elaborado para la(s) proteína(s) extraña(s).

El documento EP-A1-0431668 describe herpesvirus recombinantes de pavos (abreviadamente en lo sucesivo HVT por la expresión inglesa *Herpesvirus of Turkey*) y vacunas de vectores vivos derivadas de los mismos. En particular, el documento EP-A1-0431668 describe HVT que contiene un gen heterólogo incorporado en una región de inserción
25 del HVT. El documento WO 93/25665 también describe herpesvirus recombinantes de pavos que comprenden un gen extraño insertado en el DNA genómico del HVT.

El grupo de herpesvirus (familia *Herpesviridae*) comprende diversos agentes patógenos que infectan y provocan enfermedades en un número de especies dianas: cerdos, ganado, pollos, caballos, perros, gatos, etcétera. Cada herpes-
30 virus es específico para su especie hospedante, pero todos estos están relacionados en la estructura de sus genomas, su modo de replicación, y en alguna extensión en la patología que causan en el animal hospedante y en el mecanismo de respuesta inmune del hospedante a la infección por el virus.

La aplicación de las técnicas de DNA recombinante a los virus animales tiene una historia relativamente reciente. Los primeros virus que se manipularon por ingeniería genética han sido los que poseían los genomas más peque-
35 ños. En el caso de los parvovirus, debido a que estos virus son tan pequeños y no pueden acomodar mucho DNA extra, su uso en ingeniería genética ha sido como replicones defectuosos. La expresión del gen extraño de estos virus requiere un virus auxiliar de tipo natural y se limita a sistemas de cultivos de células. Para los adenovirus, hay una pequeña cantidad de DNA no esencial que puede reemplazarse por secuencias extrañas. Los único DNA extra-
40 ños que parece que se han expresado en adenovirus son los de los genes del antígeno T de papovavirus (Mansour *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985; Thummel *et al.*, *Cell*, 1983; Scolnick, *et al.*, *Cell*, 1981; Thummel *et al.*, *Cell* 1981), y el gen de la timidina-quinasa del virus del herpes simplex (abreviadamente en lo sucesivo HSV por la expresión inglesa *Herpes Simplex Virus*) (Haj-Ahmed y Graham, *J. of Virology*, 1986). Estas publicaciones no identi-
45 fican las regiones no esenciales del HVT, en donde puede injertarse el DNA extraño, ni muestran cómo se logra la expresión de los genes extraños en el HVT, por ejemplo que secuencia de promotor y secuencia de terminación debe usarse.

Otro grupo de virus que se ha manipulado por ingeniería genética son los poxvirus. Un miembro de este grupo, el virus de la viruela de las vacas (denominado en lo sucesivo "virus vaccinia"), ha sido el objeto de mucha investi-
50 gación sobre la expresión de genes extraños. Los poxvirus son virus que contiene DNA grandes que se replican en el citoplasma de la célula infectada. Estos tienen una estructura que es única en el sentido de que no contienen ninguna cápsida que esté basada en simetría icosaédrica o simetría helicoidal. Los poxvirus son los que más probablemente han evolucionado de los microorganismos similares a bacterias a través de la pérdida de función y degeneración. En parte debido a esta singularidad, los avances hechos en ingeniería genética de los poxvirus no pueden extrapolarse
55 directamente a otros sistemas virales, incluyendo los herpesvirus y el HVT. Las construcciones de virus recombinante del virus vaccinia se han hecho en un número de laboratorios que expresan los siguientes genes extraños insertados: gen de la timidina-quinasa del HSV (Mackett *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982; Panicali y Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (Paoletti *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984; Smith *et al.*, *Nature*, 1983), gen de la glicoproteína D del HSV, gen de hemaglutinina del virus de la gripe (Panicali *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983; Smith *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983), gen del antígeno del virus de la malaria (Smith *et al.*, *Science*, 1984, y gen de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (Mackett *et al.*, *Science*, 1986). Las características globales generales del DNA recombinante del virus vaccinia son similares a las técnicas usadas para todos los virus, especialmente en lo que se refieren a las técnicas de referencia (Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning*, 1982). Sin embargo en detalle, las técnicas del virus vaccinia no son aplicables al herpesvirus y al
65 HVT. La utilidad del virus vaccinia como vector de vacunas es un problema, debido a su relación cercana al virus de la viruela humana y su patogenicidad respecto a los seres humanos. Por tanto, el uso del herpesvirus HVT específico de hospedante es una mejor solución para la vacunación de las aves de corral.

Entre los herpesvirus de primate, solo el HSV de los seres humanos y, en una extensión limitada, el virus de herpes *saimiri* de los simios se ha manipulado por ingeniería genética para contener secuencias de DNA extraño. El primer uso de DNA recombinante para manipular el HSV implicó clonar un trozo de DNA de la región de Unión L-S en la región grande única de DNA del HSV, específicamente en el gen de timidina-quinasa (Mocarski *et al.*,
 5 *Cell*, 1980). Este inserto no fue un trozo extraño de DNA, más bien fue un trozo que se presenta naturalmente de DNA de herpesvirus que se duplicó en otro lugar en el genoma. Este trozo de DNA no se manipuló para expresar específicamente una proteína, y por tanto este trabajo no implica la expresión de proteínas en herpesvirus. La siguiente manipulación del HSV implicó la creación de deleciones en el genoma de virus mediante una combinación de técnicas de DNA recombinantes y de selección por timidina-quinasa. Usando este método se ha suprimido el gen alfa-22 del
 10 HSV (Post *et al.*, *Cell*, 1981), y se ha suprimido una secuencia de 15.000 pares de bases de DNA de la región de repetición interna del HSV (Poffenberger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981).

Los siguientes casos implican la inserción de genes que codifican proteínas en los herpesvirus: la inserción de la glicoproteína C del HSV en un mutante de deleción que ocurre naturalmente de este gen en HSV (Gibson y Spear,
 15 *J. of Virology*, 1983); la inserción de la glicoproteína D del HSV de tipo 2 en HSV de tipo 1 (Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982) sin manipulación de secuencias de promotor ya que el gen no es "extraño"; la inserción de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en el HSV bajo el control del promotor ICP4 del HSV (Shih *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984); y la inserción de la hormona de crecimiento bovino en el herpesvirus *saimiri* con un promotor de SV40 (el promotor no funcionó en este sistema y un promotor situado aguas arriba (es decir, la región
 20 que se extiende en dirección 5') endógeno sirvió para transcribir el gen) (Desrosiers *et al.*, 1984). Dos genes extraños adicionales (gen de ovalbúmina de pollo y el antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr) se han insertado en el HSV (Arsenakis y Roizman, 1984), y la glicoproteína X del virus de la pseudo-rabia se han insertado en el HSV (Post *et al.*, 1985).

Estos casos de deleción o de inserción de genes en herpesvirus demuestran que es posible manipular genéticamente genomas de herpesvirus mediante técnicas de DNA recombinantes. Los métodos que se han usado para insertar genes implican la recombinación homóloga entre el DNA viral clonado en plásmidos y el DNA viral purificado transfectedo en la misma célula animal. Sin embargo, la extensión a la cual se puede generalizar la ubicación de la deleción y los
 25 sitios para inserción de los genes extraños no se conoce de estos estudios previos.

Un objeto de la presente invención es una vacuna para la enfermedad de Marek. El virus de la enfermedad de Marek (abreviadamente en lo sucesivo MDV por la expresión inglesa *Marek's Disease Virus*) es el agente causante de la enfermedad de Marek la cual abarca la parálisis de aves de corral, una enfermedad linfoproliferante común de los pollos. La enfermedad ocurre más comúnmente en los pollos jóvenes entre una edad de 2 y 5 meses. Los signos
 30 clínicos sobresalientes son una parálisis progresiva de una o más de las extremidades, la falta de coordinación debida a la parálisis de las patas, la caída del miembro debido a la implicación del ala, y una posición de cabeza descendida debido a la implicación de los músculos del cuello. En casos agudos, da como resultado una depresión grave. En el caso de cepas altamente oncogénicas, hay una atrofia tímica y bursal característica. Además hay tumores linfáticos que afectan a las gónadas, los pulmones, el hígado, el bazo, los riñones y el timo (Mohanty y Dutta, 1981).

La mayoría de los pollos son vacunados contra el MDV el primer día de vida para proteger por vida al ave contra el MDV. Antes de la presente invención, el método de vacunación principal para el MDV implicó usar cepas que se presentan naturalmente del herpesvirus de pavos (HVT). Sería ventajoso incorporar otros antígenos en esta vacuna del
 35 primer día de vida, pero los esfuerzos para combinar las vacunas convencionales no han demostrado ser satisfactorios debido a la competencia e inmunosupresión entre los agentes patógenos. Las vacunas multivalentes a base de HVT obtenidas por manipulación genética en esta invención representan una forma nueva para vacunar simultáneamente contra un número de agentes patógenos diferentes. Por primera vez, se describe un HVT recombinante con un gen extraño insertado en una región no esencial del genoma del HVT.

Los tipos de ingeniería genética que se han realizado sobre estos herpesvirus consisten en clonar partes del DNA del virus en plásmidos de bacterias, reconstruyendo los virus de DNA mientras que están en el estado clonado de manera que el DNA contenga deleciones (supresiones) de ciertas secuencias, y añadiendo además secuencias de DNA extraño bien sea en el lugar de las deleciones o bien sea en sitios separados de las deleciones.

Un gen extraño de interés señalado como diana para la inserción en el genoma del HVT puede obtenerse de un organismo patógeno de interés. Típicamente, el gen de interés procederá de agentes patógenos que en las aves de corral provocan la enfermedad que tiene un impacto económico sobre la industria aviar. Los genes pueden proceder de organismos para los cuales existen vacunas, y debido a las nuevas ventajas de la tecnología de vectores las vacunas procedentes del HVT serán superiores. También, el gen de interés puede proceder de agentes patógenos para los
 40 cuales actualmente no hay vacuna, pero hay un requerimiento para el control de la enfermedad. Típicamente, el gen de interés codifica polipéptidos inmunogénicos del agente patógeno, y puede representar proteínas de superficie, proteínas segregadas y proteínas estructurales.

Un agente patógeno aviar relevante que es una diana para el vector del HVT es el virus de la laringotraqueitis infecciosa (en lo sucesivo abreviado como ILTV por la expresión inglesa *Infectious LaryngoTracheitis Virus*). El ILTV es un miembro de la familia de los herpesviridae, y este agente patógeno provoca una enfermedad aguda en pollos que se caracteriza por una depresión respiratoria, jadeo y expectoración de exudados sanguinolentos. La replicación viral está limitada a las células del tracto respiratorio, en donde en la tráquea la infección da lugar a una erosión del tejido

y a hemorragia. En pollos, ningún fármaco ha sido eficaz en reducir el grado de formación de lesión o en disminuir los signos clínicos. La vacunación de aves con varias formas modificadas del ILTV derivado del pase por células y/o regímenes tediosos de administración ha conferido una protección aceptable en los pollos susceptibles. Debido al grado de atenuación de las vacunas del ILTV actuales debe tenerse cuidado de asegurarse que se mantiene el nivel correcto de virus; suficiente para proporcionar la protección pero no para causar la enfermedad en la bandada.

Una diana adicional para el método de vectorización del HVT es la enfermedad de Newcastle, una enfermedad altamente contagiosa y debilitante e infecciosa que se causa por el virus de la enfermedad de Newcastle (abreviadamente en lo sucesivo NDV por la expresión inglesa *Newcastle Disease Virus*). El NDV es un virus de RNA monocatenario de la familia de los *paramyxovirus*. Los varios patógenos del NDV (velogénico, mesogénico, lentogénico) difieren con relación a la gravedad de la enfermedad, la especificidad y los síntomas, pero la mayoría de los tipos parecen infectar el sistema respiratorio y el sistema nervioso. El NDV infecta primariamente a los pollos, los pavos y otras especies aviares. Históricamente la vacunación se ha usado para evitar la enfermedad, pero debido a las interferencias de los anticuerpos maternos, el período de vida del ave y la ruta de administración, el productor necesita adaptar los protocolos de inmunización para ajustarse a necesidades específicas.

El agente terapéutico que ha de ser administrado mediante un vector viral de la presente invención debe ser una molécula biológica que es un subproducto de la reproducción del virus de la viruela de los cerdos. Esto limita el agente terapéutico en el primer análisis a bien sea DNA, RNA o bien sea proteínas. Hay ejemplos de agentes terapéuticos de cada una de estas clases de compuestos en la forma de un DNA antisentido, RNA anti-sentido (S. Joshi *et al.*, *J. of Virology*, 1991), ribozimas (M. Wachsman *et al.*, *J. of General Virology*, 1989), tRNA supresores (R.A. Bhat, *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1989), RNA bicatenario inductor de interferón y numerosos ejemplos de agentes terapéuticos proteicos, hormonales, por ejemplo, insulina a linfoquinas, por ejemplo, interferones e interleuquinas, a opiáceos naturales. El descubrimiento de estos agentes terapéuticos y la elucidación de su estructura y función no hacen obvia la capacidad para usarlos en un sistema de administración de vector viral.

Síntesis de la invención

Esta invención proporciona un herpesvirus recombinante de pavos que comprende una secuencia de DNA extraño que codifica una citoquina insertada en una región de inserción la cual comprende un sitio *XhoI* en el fragmento *EcoRI* nº 9 de un herpesvirus de un genoma viral de pavo, y la secuencia de DNA extraño que codifica una citoquina la cual es capaz de ser expresada en una célula hospedante infectada con el herpesvirus de pavos.

Por último, esta invención proporciona vectores de homología para producir herpesvirus recombinantes de pavos, células hospedantes, y vacunas.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-1C

Detalles de la construcción del HVT y datos del mapa

La Figura 1A muestra un mapa de fragmentos de restricción por *BamHI* del genoma del HVT. Los fragmentos están numerados en orden de tamaño descendiente; las letras se refieren a los fragmentos pequeños cuyo tamaño comparativo no se ha determinado.

La Figura 1B muestra el fragmento *BamHI* nº 16 del genoma del HVT mostrando la ubicación de la inserción del gen de β -galactosidasa en S-HVT-001.

La Figura 1C muestra el fragmento *BamHI* nº 19 del genoma del HVT mostrando la ubicación de la inserción del gen de β -galactosidasa.

Leyenda: B = *BamHI*; X = *XhoI*; H = *HindIII*; P = *PstI*; S = *SalI*; N = *NdeI*; R = *EcoRI*.

Figuras 2A-2D

Inserción en el plásmido 191-47

La Figura 2A contiene un diagrama que muestra la orientación de los fragmentos de DNA ensamblados en el plásmido 191-47. Las Figuras 2A a 2D muestran las secuencias localizadas en cada una de las uniones entre los fragmentos de DNA en el plásmido 191-47. (SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, y 27).

Figuras 3A-3B

Detalles de la construcción S-HVT-003

La Figura 3A muestra un mapa de restricción de DNA del HVT en la región del fragmento *BamHI* nº 16. Este fragmento está contenido en un fragmento grande *HindIII*.

La Figura 3A también muestra el sitio *XhoI* el cual fue primero cambiado al sitio *EcoRI* (R) mediante el uso de un “enlazador” y procedimientos estándares de clonación. La Figura 3A también muestra detalles de la construcción del gen beta-gal y del gen del virus de la bursitis infecciosa (abreviadamente en lo sucesivo IBDV por la expresión inglesa Infectious Bursal Disease Virus) en el fragmento BamHI n° 16 para el uso en una recombinación de homólogos. Ambos genes estuvieron bajo el control del promotor del gen gX del virus de la pseudo-rabia (abreviadamente PRV por la expresión inglesa *Pseudorabies Virus*) (gX).

La Figura 3B muestra el genoma del S-HVT-003, incluyendo la ubicación de dos genes extraños insertados, β -gal e IBDV.

En la Figura 3: H = *HindIII*; B = *BamHI*; X = *XhoI*; R = *EcoRI*; Xb = *XbaI*; Hp = *HpaI*; S = *SmaI*; UL = región larga única (*unique long*); US = región corta única (*unique short*); IR = región de repetición interna (*internal repeat*); TR = región de repetición terminal (*terminal repeat*).

Figura 4

La transferencia Western que indica la expresión diferencial del antígeno del IBDV de 32 kD en lisados celulares de células infectadas con S-HVT-003 (32 kD presente) y células infectadas con S-HVT-001 (32 kD negativo). Los polipéptidos específicos del IBV se identificaron mediante sondeo de la transferencia con antisuero de rata hiperinmune dirigido contra los viriones del IBDV desnaturalizados. Este suero reacciona primariamente con el antígeno de 32 kD inmunodominante (VP3 del IBDV). Las pistas de las manchas contienen: 1) patrones de peso molecular de proteínas, 2) células fibroblastos de embrión de pollo (abreviadamente en lo sucesivo CEF *Chick Embryo Fibroblasts*) no infectadas, 3) células CEF infectadas con S-HVT-001, 4) 5) y 6) S-HVT-003 y 7) polipéptidos de viriones del IBDV.

Figura 5

La transferencia Western que indica la expresión diferencial del antígeno VP2 de 42 kD en lisados celulares de células infectadas con S-HVT-003 (42 kD presente) y células infectadas con S-HVT-001 (42 kD negativo). Los polipéptidos específicos del IBDV se identificaron mediante el uso de un antisuero específico antipéptido de conejo VP2. Las pistas contienen: 1) patrones de pesos moleculares de proteínas, 2) células CEF infectadas con HVT de tipo natural, 3) células CEF infectadas con S-HVT-001, 4) células infectadas con S-HVT-003, 5) células CEF infectadas con S-HVT-003 y 6) polipéptidos de viriones de IBDV.

Figuras 6A-6C

Detalles de la construcción de S-HVT-004

La Figura 6A muestra un mapa de restricción de DNA del HVT en la región del fragmento *BamHI* n° 16. Este fragmento está contenido en un fragmento *HindIII* grande. También se muestra el sitio *XhoI* (X) en donde los solicitantes han hecho su inserción. Antes de la inserción, el *XhoI* se cambió primeramente al sitio *EcoRI* (R) mediante el uso de un “enlazador” y de procedimientos estándares de clonación.

La Figura 6B proporciona detalles de la construcción del gen β -gal y el gen gA del MDV en el fragmento *BamHI* n° 16 para usarse en la recombinación de homólogos. El gen beta-gal estaba bajo el control del promotor del gen gX del PRV (gX), mientras que el gen gA del MDV estaba bajo el control de su promotor.

La Figura 6C es el genoma del S-HVT-004, mostrando la ubicación de dos genes extraños insertados, β -gal y gA del MDV.

En la Figura 6: H = *HindIII*; B = *BamHI*; X = *XhoI*; R = *EcoRI*; Xb = *XbaI*; UL = región larga única; US = región corta única; IR = región de repetición interna; TR = región de repetición terminal.

Figuras 7A-7B

La descripción detallada de la inserción de gen marcador de β -galactosidasa (*lacZ*) en un vector de homología 467-22.A12. La Figura 7A muestra un diagrama indicando la orientación de los fragmentos DNA ensamblados en el gen marcador. El origen de cada fragmento está descrito en el apartado de materiales y métodos. Las Figuras 7A y 7B muestran las secuencias de DNA localizadas en las uniones entre los fragmentos de DNA y en los extremos del gen marcador (SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32, y 33). Las Figuras 7A y 7B muestran además los sitios de restricción usados para generar cada fragmento de DNA en la unión apropiada y la ubicación de la región de codificación del gen *lacZ*. Los números entre paréntesis () se refieren a los aminoácidos, y los sitios de restricción entre corchetes [] indican los restantes sitios que se destruyen durante la construcción. Se usan las siguientes abreviaturas: virus de la pseudo-rabia (PRV por la expresión inglesa *Pseudorabies Virus*), gen del operón de lactosa Z (*lacZ*), *Escherichia coli* (*E. coli*), señal de poliadenilación (pA), y glicoproteína X (gpX).

Figura 8

Mapa de restricción con *Bam*HI y *Not*I del genoma del HVT. Se muestran las regiones larga única (UL) y única corta (US). Las repeticiones de regiones largas y cortas están indicadas por las cajas o marcos. Los fragmentos *Bam*HI están numerados en orden decreciente. La localización de las sondas P1-P4 están indicadas. El origen de cada sonda es como sigue: P1 - *Bam*HI nº 6, P2 - *Bam*HI nº 2, P3 - *Bam*HI nº 3, y P4 -4,0 KB sub-fragmento *Bg*III a *Stu*I del HVT genómico, fragmento *Xba*I nº 5 (8,0 KB).

Figura 9

Muestra el procedimiento para la construcción del plásmido pSY229.

Figuras 10A-10B

Descripción detallada del inserto del casete del gen MDV en los vectores de homología 456-18.18 y 456-17.22. Las Figuras 10A y 10-B muestran un diagrama que indica la orientación de los fragmentos de DNA ensamblados en el casete y la ubicación de los genes gA y gB del MDV. El origen de cada fragmento está descrito en el apartado titulado Materiales y Métodos. Las secuencias localizadas en las uniones entre cada fragmento y en los extremos del gen marcador se muestran en las Figuras 10A y 10B, incluyendo la Unión A (SEQ ID NO: 34), Unión B (SEQ ID NO: 35), y la Unión C (SEQ ID NO: 36). Los sitios de restricción usados para generar cada fragmento están indicados en la unión apropiada. Los números entre paréntesis () se refieren a los aminoácidos y los sitios de restricción entre corchetes [] indican los restantes sitios que se destruyeron durante la construcción.

Figuras 11A-11B

La descripción detallada del inserto del fragmento *Hind*III en el vector de homología 556-41.5. El diagrama de las Figuras 11A y 11B muestra la orientación de los fragmentos de DNA ensamblados en el casete. El origen de cada fragmento está descrito en el apartado titulado Materiales y Métodos. Las Figuras 11A y 11B muestran además las secuencias de DNA localizadas en las uniones entre cada fragmento de DNA del plásmido y en los extremos del gen marcador, incluyendo la Unión A (SEQ ID NO: 37), Unión B (SEQ ID NO: 38) y la Unión C (SEQ ID NO: 39). Los sitios de restricción usados para generar cada fragmento están indicados en la unión apropiada. También se da la localización del gen gD del MDV y una parte del gen gI. Los números entre paréntesis () se refieren a aminoácidos, y los sitios de restricción entre corchetes [] indican los restantes sitios que se destruyeron durante la construcción.

Figuras 12A-12C

Descripción detallada del inserto del fragmento *Sal*I en el vector de homología 255-18.B16. La Figura 12A muestra un diagrama que indica la orientación de los fragmentos de DNA ensamblados en el casete. El origen de cada fragmento está descrito en el apartado titulado Materiales y Métodos. Las Figuras 12A a 12C muestran además las secuencias de DNA localizadas en las uniones entre cada fragmento y en los extremos del gen marcador, incluyendo la Unión A (SEQ ID NO: 40), Unión B (SEQ ID NO: 41), la Unión C (SEQ ID NO: 42), la Unión D (SEQ ID NO: 43), la Unión E (SEQ ID NO: 44), la Unión F (SEQ ID NO: 45), la Unión G (SEQ ID NO: 46), y la unión H (SEQ ID NO: 47). Los sitios de restricción usados para generar cada fragmento están indicados en la unión apropiada. Se muestra la localización del gen híbrido F del NDV y *lacZ*-HN del NDV. Los números entre paréntesis () se refieren a aminoácidos, y los sitios de restricción entre corchetes [] indican los restantes sitios que se destruyeron durante la construcción.

Figuras 13A-13B

Muestran como el sitio *Xho*I único del fragmento *Bam*HI nº 10 del genoma del HVT se convirtió en un sitio *Pac*I y un sitio *Not*I mediante la inserción de la secuencia de DNA sintético en el sitio *Xho*I (Nucleótidos nº 1333-1338; SEQ ID NO: 48). La Figura 13A muestra el sitio *Xho*I convertido en el sitio *Pac*I para generar el plásmido 654-45.1 (SEQ ID NO: 55) y la Figura 13B muestra el sitio *Xho*I convertido en un sitio *Not*I para generar el plásmido 686-63.A1 (SEQ ID NO: 56).

Figura 14

Mapa de restricción y marcos de lectura abiertos (abreviadamente en lo sucesivo OFR por la expresión inglesa *Open Reading Frame*) de la secuencia que rodea el sitio de inserción en el tramo largo único del HVT (SEQ ID NO: 48). Este mapa muestra el sitio de restricción *Xho*I (SEQ ID NO: 48; nucleótidos 1333-1338) usado para la inserción de genes extraños. También se muestran cuatro marcos de lectura abiertos en esta secuencia. El ORF A está interrumpido por la inserción del DNA en el sitio *Xho*I. La secuencia de aminoácidos del ORF A (SEQ ID NO: 50; nucleótidos 402 a 602; 267 aminoácidos) no muestra una identidad de secuencia significativa para cualquier secuencia de aminoácidos conocida en las bases de datos de proteínas. El UL 54 (SEQ ID NO: 49; nucleótidos 146 a 481; 112 aminoácidos) y UL 55 (SEQ ID NO: 51; nucleótidos 1599 a 2135; 179 aminoácidos) muestra una identidad de secuencia significativa para las proteínas UL 54 y UL 55 del tipo I de herpesvirus simplex, respectivamente. El ORF B (SEQ ID NO: 52; nucleótidos 2634 a 2308; 109 aminoácidos) no muestra una identidad de secuencia significativa para cualquier secuencia de aminoácidos conocida en las bases de datos de proteínas. Las investigaciones se llevaron a

cabo sobre bases de datos del *National Center for Biotechnological Information* (NCBI) del *National Health Institute* (NHI) de EE.UU. usando el programa de ordenador Blast.

Figura 15

Mapa de restricción de cósmidos 407-32.1C1, 67101.A40, 672-07.C40, y 654-45.1. Está ilustrado el solapamiento de los fragmentos *EcoRI* nº 9 y *BamHI* nº 10 de DNA genómico del HVT. Un sitio *XhoI* único en los fragmentos *EcoRI* nº 9 y *BamHI* nº 10 se ha convertido en un sitio *PacI* único en el plásmido 654-45.1 o un sitio *NotI* en el plásmido 686-63.A1.

Descripción detallada de la invención

Esta invención proporciona un herpesvirus recombinante de pavos (HVT) que comprende una secuencia de DNA extraño insertada en un sitio no esencial en el genoma del HVT. La secuencia de DNA extraño es capaz de ser expresada en una célula hospedante infectada con el HVT recombinante y su expresión está bajo el control del promotor localizado aguas arriba (es decir, la región que se extiende en dirección 5') de la secuencia de DNA extraño.

Como se define en la presente memoria, "un sitio no esencial del genoma del HVT" significa una región en el genoma viral del HVT el cual no es necesario para la infección viral o la reproducción.

Como se define en la presente memoria, "genoma viral" o "DNA genómico" significa el DNA completo natural que contiene el herpesvirus de pavos. Como se define en la presente memoria, la "secuencia de DNA extraño" o el "gen" significa cualquier DNA o gen que es exógeno al DNA genómico.

Como se define en la presente memoria, un "marco de lectura abierto" (abreviadamente en lo sucesivo ORF por la expresión inglesa *Open Reading Frame*) es un segmento de DNA que contiene codones que pueden ser transcritos en RNA que a su vez puede ser traducido a una secuencia de aminoácidos y que no contiene un codón de terminación.

La invención proporciona además varios sitios de inserción apropiados en el genoma del HVT útiles para la construcción del herpesvirus recombinante de la presente invención. Los sitios de inserción incluyen el fragmento *EcoRI* nº 9 y el fragmento *BamHI* nº 10 del genoma del HVT, siendo un sitio de inserción preferido en ambos de aquellos fragmentos una endonucleasa de restricción *XhoI*.

Otro de tales sitios es el fragmento *BamHI* nº 16 del genoma del HVT. Un sitio de inserción preferido en el fragmento *BamHI* nº 16 cae dentro de un marco de lectura abierto que codifica una proteína UL43 y un sitio de inserción preferido en ese marco de lectura abierto en un sitio de endonucleasa de restricción *XhoI*.

Aún otro sitio de inserción es el gen US2 del HVT, siendo un sitio de inserción preferido en éste un sitio de endonucleasa *StuI*.

Esta invención proporciona un herpesvirus recombinante de pavos que comprende un herpesvirus del genoma viral de pavos que contiene una secuencia de DNA extraño insertada en el fragmento *EcoRI* nº 9 del herpesvirus del genoma viral de pavos, y la secuencia de DNA extraño es capaz de ser expresada en la célula hospedante infectada con el herpesvirus de pavos.

En una realización, la secuencia de DNA extraño está insertada en el marco de lectura abierto A (ORF A) del fragmento *EcoRI* nº 9. La inserción de las secuencias de DNA extraño en el sitio *XhoI* del fragmento *EcoRI* nº 9 interrumpe el ORFA lo que indica que la región ORFA completa no es esencial para la replicación del virus recombinante.

Para los fines de esta invención, "un herpesvirus recombinante de pavos" es un herpesvirus vivo de pavos que ha sido generado, por los métodos recombinantes muy conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, los métodos establecidos en Transfección de DNA para generar herpesvirus recombinantes en el apartado *Materiales y Métodos*, y el virus no ha tenido suprimido material genético esencial para la reproducción del herpesvirus de pavos. El herpesvirus de pavos purificado dio como resultado una inserción estable de las secuencias de DNA extraño o de un gen en el fragmento *EcoRI* nº 9 o el fragmento *BamHI* nº 10.

La invención proporciona además herpesvirus recombinantes de pavos en donde la secuencia de DNA extraño codifica un polipéptido el cual es antigénico en un animal en el cual está introducido el herpesvirus recombinante.

En una realización el polipéptido es un marcador detectable. Para los fines de la invención, un "polipéptido que es un marcador detectable" incluye la forma de dímero, trímero y tetrámero del polipéptido. La β -galactosidasa de *E. coli* es un compuesto tetrámero de cuatro polipéptidos o subunidades de monómero. En una realización el polipéptido es una β -galactosidasa de *E. coli*. Preferiblemente, este herpesvirus recombinante de pavos se denomina S-HVT-001, S-HVT-014 ó S-HVT-012.

El S-HVT-012 ha sido depositado el 15 de octubre de 1992 de acuerdo con el Tratado de Budapest en el *International Depository of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure with the Patent Culture Depository of*

the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA bajo el número de acceso ATTC VR. 238.2.

El S-HVT-014 ha sido depositado el 7 de diciembre de 1993 de acuerdo con el Tratado de Budapest en el *International Depository of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure with the Patent Culture Depository of the American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA bajo el número de acceso ATTC VR. 2440.

En otra realización la secuencia de DNA extraño codifica una citoquina. En otra realización la citoquina es un factor de crecimiento mielomonocítico de pollos (abreviadamente en lo sucesivo cMGF por la expresión inglesa *chicken myelomonocytic growth factor*) o interferón de pollos (cIFN). En una realización preferida, el herpesvirus recombinante de pavos se denomina S-HVT-144.

La invención proporciona además un herpesvirus recombinante de pavos cuyo genoma viral contiene DNA extraño que codifica un polipéptido antigénico el cual es del virus de la enfermedad de Marek (MDV), el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV), el virus de la bronquitis infecciosa (IBV) o el virus de la enfermedad bursal infecciosa (IBDV).

Esta invención proporciona un herpesvirus recombinante de pavos con una inserción de secuencia de DNA extraño en el fragmento *EcoRI* nº 9 el cual comprende además una secuencia de DNA extraño que codifica el polipéptido antigénico seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos del virus de la enfermedad de Marek, del virus de la enfermedad de Newcastle, del virus de la laringotraqueitis infecciosa, del virus de la bronquitis infecciosa y del virus de la enfermedad bursal infecciosa.

En una realización de la secuencia de DNA extraño que codifica el polipéptido antigénico es del virus de la enfermedad de Marek y codifica la glicoproteína gA del virus de la enfermedad de Marek, la glicoproteína gB del virus de la enfermedad de Marek o la glicoproteína gD del virus de la enfermedad de Marek. En otra realización las secuencias de DNA extraño que codifican la glicoproteína gA, la glicoproteína gB o la glicoproteína gD del virus de la enfermedad de Marek están insertadas en el sitio *StuI* único de la región codificadora del gen US2 del herpesvirus de pavo.

La invención proporciona además herpesvirus recombinantes de pavos cuyo DNA genómico contiene DNA extraño que codifica el polipéptido antigénico del virus de la enfermedad de Marek. Preferiblemente, el polipéptido antigénico es la glicoproteína gB, gA o gD del virus de la enfermedad de Marek.

En una realización un HVT recombinante que contiene una secuencia de DNA extraño codifica el gen VP2 del IBDV, el gen gA del MDV y el gen gB del MDV. Preferiblemente, tal virus recombinante se denomina S-HVT-137 y S-HVT-143.

La invención proporciona además herpesvirus recombinantes de pavos cuyo DNA genómico contiene DNA extraño que codifica la glicoproteína gA del virus de la enfermedad de Marek y además comprende DNA extraño que codifica un polipéptido el cual es un marcador detectable. Preferiblemente, este herpesvirus recombinante de pavos se denomina S-HVT-004.

La invención proporciona además herpesvirus recombinantes de pavos cuyo DNA genómico contiene el DNA extraño que codifica la glicoproteína gB del virus de la enfermedad de Marek. Preferiblemente, este herpesvirus recombinante de pavos se denomina S-HVT-045.

También se proporciona una realización de un HVT recombinante que contiene una secuencia de DNA extraño que codifica el gen gB del MDV y este HVT recombinante se denomina S-HVT-045. El S-HVT-045 se ha depositado el 15 de octubre de 1992 de acuerdo con el Tratado de Budapest en el *International Depository of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure with the Patent Culture Depository of the American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, bajo el número de acceso ATCC VR. 2383.

La presente invención también proporciona HVT recombinantes diseñados para contener más de una secuencia de DNA que codifica un antígeno del MDV. Por ejemplo, una secuencia de DNA extraño que codifica los genes gA y gB del MDV pueden ser ambos vectorizados en el genoma del HVT. Además, puede construirse un HVT recombinante para incluir una secuencia de DNA extraño que codifica los genes gA, gB y gD del MDV.

Los HVT recombinantes denominados S-HVT-046 y S-HVT-C47 proporcionan realizaciones de un HVT recombinante que contiene la secuencia de DNA extraño que codifica los genes gA y gB del MDV; los virus recombinantes denominados S-HVT-048 y S-HVT-062 proporcionan realizaciones de un HVT recombinante que contiene la secuencia de DNA extraño que codifica los genes gA, gB y gD del MDV.

El S-HVT-062 ha sido depositado el 23 de febrero de 1993 de acuerdo con el Tratado de Budapest en el *International Depository of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure with the Patent Culture Depository of the American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, bajo el número de acceso ATCC VR. 2401.

La presente invención proporciona un HVT recombinante que contiene una secuencia de DNA extraño que codifica un polipéptido antigénico del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). En tal caso, se prefiere que el polipéptido antigénico sea una proteína de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle o una hemaglutinina-neuraminidasa (HN) del virus de la enfermedad de Newcastle, o una proteína recombinante que comprende β -galactosidasa de *E. coli* fusionada a una hemaglutinina-neuraminidasa (HN) del virus de la enfermedad de Newcastle. Un ejemplo de tal virus es el denominado S-HVT-007.

La presente invención también proporciona HVT recombinantes manipulados por ingeniería genética para contener uno o más secuencias de DNA extraño que codifica(n) una forma de polipéptido antigénico del MDV, así como una o más secuencias de DNA extraño que codifica(n) un polipéptido antigénico del NDV. Preferiblemente, el polipéptido antigénico es gB, gD o gA del MDV y el F ó HN del NDV.

En una realización de la invención, el HVT recombinante contiene secuencias de DNA extraño que codifican los genes gB del MDV, gA del MDV y F del NDV. Preferiblemente, este HVT se denomina S-HVT-048.

En una realización de la invención, el HVT recombinante contiene secuencias de DNA extraño que codifican el gen gB del MDV, el gen gA del MDV y el gen HN del MDV. Preferiblemente este HVT se denomina S-HVT-049.

Por ejemplo, una secuencia de DNA extraño que codifica los genes gA y gB del MDV pueden ambos ser vectorizados en el genoma del HVT. Además, puede construirse un HVT recombinante que incluya una secuencia de DNA extraño que codifica los genes gA, gB y gD del MDV.

Además, en otra realización la secuencia de DNA extraño que codifica el polipéptido antigénico es un virus de la enfermedad de Newcastle y codifica la proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle o la hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle. En otra realización las secuencias de DNA extraño que codifican la proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle o la hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle están insertados en el sitio *Xho*I en *Eco*RI nº 9 de la región larga única del herpesvirus de pavos. En una realización preferida, el herpesvirus recombinante de pavos se denomina S-HVT-136.

La invención proporciona además un herpesvirus recombinante de pavos cuyo DNA genómico contiene un DNA extraño que codifica un polipéptido antigénico del virus de la enfermedad de Marek y que comprende además un DNA extraño que codifica un polipéptido antigénico del virus de la enfermedad de Newcastle.

La presente invención proporciona además un HVT recombinante que contiene una secuencia de DNA extraño que codifica un polipéptido antigénico de la glicoproteína gB del virus de la enfermedad de Marek y la glicoproteína gA del virus de la enfermedad de Marek y comprende además un DNA extraño que codifica una proteína de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle. Preferiblemente, el herpesvirus recombinante de pavos se denomina S-HVT-048.

La invención proporciona además un herpesvirus recombinante de pavos cuyo DNA genómico contiene DNA extraño que codifica la glicoproteína gB del virus de la enfermedad de Marek y la glicoproteína gA del virus de la enfermedad de Marek y que comprende además DNA que codifica la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) del virus de la enfermedad de Newcastle. Preferiblemente, este herpesvirus recombinante de pavos se denomina S-HVT-049.

La invención proporciona además un herpesvirus recombinante de pavos cuyo DNA genómico contiene el DNA extraño que codifica la glicoproteína gB de virus de la enfermedad de Marek y la glicoproteína gA del virus de la enfermedad de Marek y que comprende además la proteína de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle y la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) del virus de la enfermedad de Newcastle. Preferiblemente, este herpesvirus recombinante de pavos se denomina S-HVT-050.

El S-HVT-050 ha sido depositado el 23 de febrero de 1993 de acuerdo con el Tratado de Budapest en el *International Depository of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure with the Patent Culture Depository of the American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, bajo el número de acceso ATCC VR. 2400.

En aún otra realización de la invención, el HVT recombinante contiene la secuencia de DNA extraño que codifica el gen gB del MDV, el gen gA del MDV, el gen gD del MDV, el gen F del NDV F y el gen HN del NDV. Preferiblemente, tal HVT recombinante se denomina S-HVT-106 ó S-HVT-128.

La invención proporciona además un herpesvirus recombinante. Además, en una realización, la secuencia de DNA extraño codifica el polipéptido antigénico de un virus de la laringotraqueitis infecciosa y codifica una glicoproteína gB del virus de la laringotraqueitis infecciosa, la glicoproteína gI del virus de la laringotraqueitis infecciosa o la glicoproteína gD del virus de la laringotraqueitis infecciosa.

En otra realización, la secuencia de DNA extraño codifica un polipéptido antigénico el cual es derivado o derivable de un grupo que consiste de: gA del MDV, gB del MDV, gD del MDV, HN del NDV, F del NDV, gB del ILTV, gI del ILTV, gD del ILTV, VP2 del IBV, VP3 del IBDV, VP4 del IBDV, virus de la encefalomyelitis aviar, reovirus aviar, paramixovirus aviar, virus de la gripe de las aves de corral, adenovirus aviar, virus de viruela de los pollitos,

coronavirus aviar, rotavirus aviar, virus de la anemia del pollo (agente), *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Pasteurella spp.*, *Bordetella spp.*, *Eimeria spp.*, *Histomonas spp.*, *Trichomonas spp.*, nemátodos de aves de corral, céstodos, tremátodos, ácaros/piojos de aves de corral, protozoos de aves de corral.

5 La invención proporciona además un herpesvirus recombinante de pavos que contiene una secuencia de DNA extraño que codifica un polipéptido antigénico del virus de la laringotraqueitis infecciosa. Se prefiere que el polipéptido antigénico sea la glicoproteína gB del ILTV, gD del LTV o gI del ILTV.

10 También se proporcionan HVT recombinantes que están manipulados por ingeniería genética para contener más de una secuencia de DNA extraño que codifica un antígeno del ILTV. Por ejemplo, los genes gB y gD del ILTV pueden ser vectorizados juntos en el genoma del HVT, de manera que se obtengan gD y gI del ILTV, y gB, gD y gI del ILTV. El HVT recombinante denominado SHVT-051, S-HVT-052, y S-HVT-038 son realizaciones de tal virus recombinante.

15 La presente invención también proporciona un HVT recombinante que contiene más de una secuencia de DNA extraño que codifica un polipéptido antigénico del MDV, así como una o más secuencias de DNA extraño que codifica (n) un polipéptido antigénico del ILTV. Preferiblemente, el polipéptido antigénico del MDV es gB, gD o gA del MDV, y el polipéptido antigénico del ILTV es gB, gD o gI del ILTV.

20 En una realización de la invención, el HVT recombinante contiene las secuencias de DNA extraño que codifica gB del MDV, gA del MDV, gD del MDV, gD del ILTV y gB del ILTV. Preferiblemente, este recombinante HVT se denomina S-HVT-123.

25 En otra realización de esta invención, el HVT recombinante contiene secuencias de DNA extraño que codifican gB del MDV, gA del MDV, gD del MDV, gI del ILTV y gD del ILTV. Preferiblemente, este HVT recombinante se denomina S-HVT-139 o S-HVT-140.

30 La invención proporciona además un herpesvirus recombinante de pavos cuyo DNA genómico contiene DNA extraño que codifica la glicoproteína gB del virus de la enfermedad de Marek, la glicoproteína gA del virus de la enfermedad de Marek, y la glicoproteína gD del virus de la enfermedad de Marek y comprende además DNA extraño que codifica una glicoproteína gD del virus de la laringotraqueitis infecciosa, la glicoproteína gB del virus de la laringotraqueitis infecciosa y la β -galactosidasa de *E. coli*. Preferiblemente, este herpesvirus recombinante de pavos se denomina S-HVT-104.

35 Esta invención proporciona además un herpesvirus recombinante de pavos cuyo DNA genómico contiene DNA extraño que codifica proteínas del virus de la bronquitis infecciosa o una proteína matriz del virus de la bronquitis infecciosa.

40 La presente invención proporciona además un HVT recombinante que contiene una secuencia de DNA extraño que codifica un polipéptido antigénico de un virus de la bronquitis infecciosa (IBV). Preferiblemente, el polipéptido antigénico es una proteína clavo (*spike*) del IBV o una proteína matriz del IBV.

45 La presente invención también proporciona un HVT recombinante que contiene una o más secuencias de DNA extraño que codifica(n) un polipéptido antigénico del IBV, así como una o más secuencias de DNA extraño que codifica(n) un polipéptido antigénico del MDV. Preferiblemente, el polipéptido antigénico del IBV es una proteína clavo del IBV o una proteína matriz del IBV, y el polipéptido antigénico del MDV es gB, gD o gA del MDV. Una realización de tal virus recombinante se denomina S-HVT-066.

50 La invención proporciona además un herpesvirus recombinante de pavos cuyo DNA genómico contiene DNA extraño que codifica un polipéptido antigénico del virus de la enfermedad bursal infecciosa y que comprende además DNA extraño que codifica un polipéptido que es un marcador detectable.

55 Además, en una realización una secuencia de DNA extraño que codifica el polipéptido antigénico es de un virus de la enfermedad bursal infecciosa. En otra realización la secuencia de DNA extraño codifica un gen VP2 del virus de la enfermedad bursal infecciosa. En otra realización la secuencia de DNA codifica un gen VP3 del virus de la enfermedad bursal infecciosa. En otra realización la secuencia de DNA extraño codifica un gen VP4 del virus de la enfermedad bursal infecciosa. Preferiblemente, este herpesvirus recombinante de pavos se denomina S-HVT-003 o S-HVT-096.

60 El HVT recombinante denominado S-HVT-003 o SHVT-096 es una realización de un HVT recombinante que comprende la secuencia de DNA extraño que codifica el polipéptido antigénico del IBDV y que codifica un marcador detectable. El SHVT-003 ha sido depositado el 21 de julio de 1987 de acuerdo con el Tratado de Budapest en el *International Depository of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure with the Patent Culture Depository of the American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, bajo el número de acceso ATCC VR. 2178.

65 Esta invención proporciona un herpesvirus recombinante de pavos que contiene una secuencia de DNA extraño insertada en el fragmento *EcoRI* nº 9 del genoma viral de herpesvirus de pavos, en donde la secuencia de DNA es de un virus de la laringotraqueitis infecciosa y codifica la glicoproteína gB del virus de la laringotraqueitis infecciosa o la glicoproteína gD del virus de la laringotraqueitis infecciosa.

En una realización, la secuencia de DNA extraño es de un virus de la laringotraqueitis infecciosa y codifica una glicoproteína gD del virus de la laringotraqueitis infecciosa o una glicoproteína gI del virus de la laringotraqueitis.

Esta invención proporciona un herpesvirus recombinante de pavos que contiene una secuencia de DNA extraño insertada en el fragmento *EcoRI* nº 9 de herpesvirus del genoma viral de pavos en donde la secuencia de DNA extraño es de un virus de la enfermedad de Newcastle y codifica una HN del virus de la enfermedad de Newcastle o una proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle.

Esta invención proporciona un herpesvirus recombinante de pavos que contiene una secuencia de DNA extraño insertada en el fragmento *EcoRI* nº 9 del genoma viral del herpesvirus de pavos, en donde la secuencia de DNA extraño es de un virus de la bronquitis bursal infecciosa y codifica un VP2, VP3, VP4 del virus de la enfermedad bursal infecciosa.

Esta invención proporciona un herpesvirus recombinante de pavos que contiene una secuencia de DNA extraño insertada en el fragmento *EcoRI* nº 9 del genoma viral de herpesvirus de pavos, en donde la secuencia de DNA extraño es de un virus de la bronquitis infecciosa y codifica una proteína matriz del virus de la bronquitis infecciosa.

En otra realización una secuencia de DNA extraño codifica un polipéptido antigénico que se deriva o es derivable de un grupo que consiste de: gA del MDV, gB del MDV, gD del MDV, HN del NDV, F del NDV, gB del ILTV, gI del ILTV, gD del ILTV, VP2 del IBDV, VP3 del IBDV, VP4 del IBDV, virus de la encefalomiелitis aviar, reovirus aviar, paramixovirus aviar, virus de la gripe aviar, adenovirus aviar, virus de la viruela aviar, coronavirus aviar, rotavirus aviar, virus de la anemia de pollitos (agente), *Salmonella spp.*, *E. coli.*, *Pasteurella spp.*, *Bordetella spp.*, *Eimeria spp.*, *Histomonas spp.*, *Trichomonas spp.*; nemátodos de aves de corral, céstodos, tremátodos, ácaros/piojos, protozoos de aves de corral. En una realización preferida el herpesvirus recombinante de pavos se denomina S-HVT-136.

Tal polipéptido antigénico puede ser derivado o derivable de lo siguiente: agente patógeno felino, agente patógeno canino, agente patógeno equino, agente patógeno bovino, agente patógeno aviar, agente patógeno porcino o agente patógeno humano.

En otra realización, el polipéptido antigénico de un agente patógeno humano procede de un herpesvirus humano de virus de herpes simplex 1, virus de herpes simplex 2, de citomegalovirus humano, de virus Epstein-Barr, de virus de varicela zóster, de herpesvirus-6 humano, de herpesvirus-7 humano, de virus de la gripe humana, de virus de la inmunodeficiencia humana, de virus de la rabia, de virus de sarampión, de virus de la hepatitis B y de virus de la hepatitis C. Además, el polipéptido antigénico de un agente patógeno humano puede ser asociado con malaria o un tumor maligno del grupo que consiste en *Plasmodium falciparum*, *Bordetella pertusis*, y tumor maligno.

La invención proporciona además un herpesvirus recombinante de pavos cuyo DNA genómico contiene el DNA extraño que codifica la proteína de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle y que comprende además DNA extraño que codifica una proteína recombinante, en donde el gen de la β -galactosidasa de *E. coli* está fusionado al gen de la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) del virus de la enfermedad de Newcastle.

La invención proporciona además un herpesvirus recombinante de pavos cuyo DNA genómico contiene DNA extraño que codifica la glicoproteína gB del virus de la enfermedad de Marek y la glicoproteína gA del virus de la enfermedad de Marek y que comprende además DNA extraño que codifica la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) del virus de la enfermedad de Newcastle.

Esta invención proporciona un herpesvirus recombinante del virus quimérico de la enfermedad de Marek en pavos que comprende una región genómica viral larga única de herpesvirus de pavos y una región corta única del virus de la enfermedad de Marek. En una realización, el herpesvirus recombinante del virus quimérico de la enfermedad de Marek en pavos contiene una secuencia de DNA extraño insertada en el fragmento *EcoRI* nº 9 del genoma viral del herpesvirus de pavos, y la secuencia de DNA extraño capaz de ser expresada en una célula hospedante infectada con el herpesvirus de pavos.

En una realización el herpesvirus recombinante de pavos contiene una secuencia de DNA extraño que codifica un polipéptido. El polipéptido puede ser antigénico en un animal en el cual se introduce el herpesvirus recombinante.

En otra realización el polipéptido es β -galactosidasa de *E. coli*. En otra realización la secuencia de DNA extraño codifica una citoquina. En otra realización, la citoquina es un factor de crecimiento mielomonocítico de pollo (cMGF) o un interferón de pollos (cIFN).

La invención proporciona además un herpesvirus recombinante de pavos en donde la secuencia de DNA extraño codifica un polipéptido que es antigénico en un animal en el cual se introduce el herpesvirus recombinante.

Además, el herpesvirus recombinante de pavos comprende también una secuencia de DNA extraño que codifica el polipéptido antigénico seleccionado del grupo que consiste en el virus de la enfermedad de Marek, el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de la laringotraqueitis infecciosa, el virus de la bronquitis infecciosa y el virus de la enfermedad bursal infecciosa.

Esta invención proporciona un virus de herpes recombinante de pavos en donde la secuencia de DNA extraño está bajo el control de un promotor de herpesvirus situado aguas arriba (es decir, la región que se extiende en dirección 5') endógeno. En una realización, la secuencia de DNA extraño está bajo el control de un promotor heterólogo situado aguas arriba. En otra realización, el promotor se selecciona de gX del PRV, alfa 4 del HSV-1, promotor temprano inmediato del HCMV, gA del MDV, gB del MDV, gD de MDV, gB del ILTV, VP8 del BHV-1.1 y gD del ILTV.

Esta invención proporciona un vector de homología para producir un herpesvirus recombinante de pavos insertando DNA extraño en el genoma viral de un herpesvirus de pavos que comprende una molécula de DNA bicatenario que consiste esencialmente en: a) DNA bicatenario extraño no usualmente presente en el genoma viral del herpesvirus de pavos; b) en un extremo el DNA extraño, el DNA bicatenario de herpesvirus de pavos homólogo al genoma viral localizado en un lado del sitio *EcoRI* nº 9 de la región codificadora del genoma viral del herpesvirus de pavos; y c) en el otro extremo del DNA extraño, el DNA bicatenario del herpesvirus de pavos homólogo al genoma viral localizado en el otro lado del fragmento *EcoRI* nº 9 de la región codificadora del genoma viral del herpesvirus de pavos. Los ejemplos de los vectores de homología se denominan 751.87.A8 y 761-7.A1.

En una realización, el polipéptido es antigénico en el animal en el que está introducido el herpesvirus recombinante de pavos. En otra realización, el polipéptido antigénico es de una citoquina, virus de la enfermedad de Marek, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la laringotraqueitis infecciosa, o el virus de la bronquitis infecciosa. En una realización preferida, el polipéptido antigénico es un factor de crecimiento mielomonocítico de pollos (cMFG) o un interferón de pollos (cIFN), una poliproteína del virus de la enfermedad bursal infecciosa, una proteína VP2 del virus de la enfermedad bursal infecciosa, la glicoproteína gB del virus de la enfermedad de Marek, la glicoproteína gA del virus de la enfermedad de Marek, la glicoproteína gD del virus de la enfermedad de Marek, una proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle, la hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle, la glicoproteína gB del virus de la laringotraqueitis infecciosa, la glicoproteína gD del virus de la laringotraqueitis infecciosa, una proteína clavo del virus de la bronquitis infecciosa, o la proteína matriz del virus de la bronquitis infecciosa.

En otra realización, la secuencia de DNA bicatenario extraño en el vector de homología codifica un polipéptido antigénico derivado de un agente patógeno equino. El polipéptido antigénico de un agente patógeno equino puede proceder del virus de la gripe equina o un herpesvirus equino. Los ejemplos de tal polipéptido antigénico son la neuraminidasa del virus de la gripe equina tipo A/Alaska 91, la neuraminidasa del virus de la gripe equina tipo A/Praga 56, la neuraminidasa del virus de la gripe equina tipo A/Miami 63, la neuraminidasa del virus de la gripe equina tipo A/Kentucky 81, la glicoproteína B del herpesvirus de tipo 1, y la glicoproteína D de herpesvirus equino de tipo 1.

En otra realización, la secuencia de DNA bicatenario extraño del vector de homología codifica un polipéptido antigénico derivado del virus sincitial respiratorio bovino o el virus de la parainfluenza bovina. El polipéptido antigénico del agente patógeno equino del virus sincitial respiratorio bovino que puede proceder del virus de la gripe bovina es una proteína de unión del virus sincitial respiratorio bovino (G del BRSV), una proteína de fusión del virus sincitial respiratorio bovino (abreviadamente BRSV por la expresión inglesa *bovine respiratory syncytial virus*) (F del BRSV), la proteína de la nucleocápsida del virus sincitial respiratorio bovino (N del BRSV), la proteína de fusión del virus de la parainfluenza bovina tipo 3, y la hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la parainfluenza bovina de tipo 3.

En otra realización, la secuencia de DNA bicatenario extraño en el vector de homología codifica una citoquina capaz de estimular la respuesta inmune humana. Por ejemplo, la citoquina puede ser, pero sin limitación: interleuquina-2, interleuquina-6, interleuquina-12, interferones, factores estimulantes colonias de granulocitos-macrófagos y receptores de interleuquina.

En una realización de la invención, el DNA bicatenario de herpesvirus de pavos es homólogo a las secuencias de DNA presentes en el fragmento *BamHI* nº 16 del genoma del herpesvirus de pavos. Preferiblemente, el DNA bicatenario de herpesvirus de pavos es homólogo a las secuencias de DNA presentes en el marco de lectura abierto que codifica la proteína UL 43 del genoma del herpesvirus de pavos. Preferiblemente, este vector de homología se denomina 172-29.31.

Para los fines de esta invención un "vector de homología" es un plásmido construido para insertar DNA extraño en un sitio específico en el genoma de un herpesvirus de pavos.

En una realización de la invención, el DNA bicatenario de herpesvirus de pavos es homólogo a las secuencias de DNA presentes en el fragmento *EcoRI* nº 9 del genoma del herpesvirus de pavos. Preferiblemente, este vector de homología se designa 172-63.1.

En una realización de la invención, el DNA bicatenario del herpesvirus de pavos es homólogo a las secuencias de DNA presentes en la región codificadora del gen US2 del genoma del herpesvirus de pavos. Preferiblemente, este vector de homología se denomina 435-47.1.

En otra realización, la secuencia de DNA extraño codifica un marcador detectable. Los ejemplos de los marcadores detectables incluyen pero sin limitación β -galactosidasa de *E. coli* y β -glucuronidasa de *E. coli*.

La invención proporciona además una vacuna que comprende una cantidad de agente inmunizante eficaz de un herpesvirus recombinante de pavos de la presente invención y un vehículo adecuado.

Esta invención proporciona una vacuna útil para inmunizar un ave contra el virus de la enfermedad de Marek, que comprende una cantidad de agente inmunizante eficaz del herpesvirus recombinante de pavos y un vehículo adecuado.

Esta invención proporciona una vacuna útil para inmunizar un ave contra el virus de la enfermedad de Newcastle, que comprende una cantidad de inmunizante eficaz del herpesvirus recombinante de pavos y un vehículo adecuado.

Esta invención proporciona una vacuna útil para inmunizar un ave contra el virus de la laringotraqueitis infecciosa, que comprende una cantidad de inmunizante eficaz del herpesvirus recombinante de pavos y un vehículo adecuado.

Esta invención proporciona una vacuna útil para inmunizar un ave contra el virus de la bronquitis infecciosa, que comprende una cantidad de agente inmunizante eficaz del herpesvirus recombinante de pavos y un vehículo adecuado.

Esta invención proporciona una vacuna útil para inmunizar un ave contra el virus de la enfermedad bursal infecciosa, que comprende una cantidad de agente inmunizante eficaz del herpesvirus recombinante de pavos y un vehículo adecuado.

Esta invención proporciona una vacuna multivalente útil para inmunizar un ave contra el virus de la enfermedad de Marek y el virus de la enfermedad de Newcastle, que comprende una cantidad de agente inmunizante eficaz del herpesvirus recombinante de pavos.

Esta invención proporciona una vacuna multivalente útil para inmunizar un ave contra el virus de la enfermedad de Marek y el virus de la laringotraqueitis infecciosa, que comprende una cantidad de agente inmunizante eficaz del herpesvirus recombinante de pavos y un vehículo adecuado.

Esta invención proporciona una vacuna multivalente útil para inmunizar un ave contra el virus de la enfermedad de Marek y el virus de la bronquitis infecciosa, que comprende una cantidad de agente inmunizante eficaz del herpesvirus recombinante de pavos y un vehículo adecuado.

Esta invención proporciona una vacuna multivalente útil para inmunizar un ave contra el virus de la enfermedad de Marek y el virus de la enfermedad bursal infecciosa, que comprende una cantidad de agente inmunizante eficaz del herpesvirus recombinante de pavos y un vehículo adecuado.

Esta invención proporciona una célula hospedante infectada con el herpesvirus recombinante de pavos. En una realización, la célula hospedante es una célula aviar.

Para los fines de esta invención, una "célula hospedante" es una célula usada para propagar un vector y su inserto. La infección de la célula se logró por los métodos muy conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se establece en Transfección de DNA para, generar herpesvirus recombinantes en Materiales y Métodos. Los métodos para construir, seleccionar y purificar el herpesvirus recombinante de los pavos se detallan más adelante.

Esta invención proporciona un método para distinguir los pollos u otras aves que están vacunadas de las que están infectadas con la vacuna antes indicada de las que están infectadas con un virus de la enfermedad de Marek que se presenta de modo natural, que comprende analizar muestras de los fluidos del cuerpo de los pollos u otras aves de corral respecto a la presencia de glicoproteína gG y por lo menos otro antígeno normalmente expresado en pollos u otras aves infectadas por un virus de la enfermedad de Marek que se presenta de modo natural, pero siendo indicativa la presencia de esos antígenos normalmente expresados en los pollos infectados pero la ausencia de la glicoproteína gG indicativa de la vacunación con la vacuna antes mencionada y no infección con el virus de la enfermedad de Marek que se presenta de modo natural.

Esta invención proporciona un herpesvirus recombinante de pavos que expresa secuencias de DNA extraño que es útil como vacuna en especies mamíferas o aviares incluyendo, pero sin limitación: pollos, pavos, patos, felinos, caninos, vacas, equinos y primates incluyendo el ser humano. Esta vacuna puede contener bien sea un virus recombinante vivo o bien sea inactivado.

Para los fines de esta invención, una "cantidad inmunizante eficaz" del herpesvirus felino recombinante de la presente invención está en el intervalo de una dosis de 10^3 a 10^9 UFP/dosis. En otra realización, la cantidad inmunizante es 10^5 a 10^7 UFP/dosis. En una realización preferida, la cantidad inmunizante es de 10^6 UFP/dosis.

El método comprende administrar al animal una dosis inmunizante eficaz de la vacuna de la presente invención. La vacuna puede ser administrada por cualesquiera de los métodos muy conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante inyección intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa. Alternativamente, la vacuna puede ser administrada intranasalmente u oralmente.

Los vehículos adecuados para el virus recombinante son muy conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero sin limitación proteínas, azúcares, etc. Un ejemplo de tal vehículo adecuado es un medio cultivado equilibrado

fisiológicamente que contiene uno o más agentes estabilizantes, tal como proteínas hidrolizadas, lactosa, etc. Preferiblemente, la vacuna viva se crea tomando fluidos de cultivo de tejidos y añadiendo agentes estabilizantes, tal como proteínas hidrolizadas estabilizantes. Preferiblemente, las vacunas inactivadas usan fluidos de cultivo de tejido directamente después de la inactivación del virus.

Esta invención se ilustra además en el apartado de Detalles Experimentales que sigue. Este apartado se facilita para ayudar a un entendimiento de la invención pero no se intenta, y no debe considerarse que limite de ninguna manera la invención como se establece en las reivindicaciones que constituyen la parte final de esta memoria descriptiva.

Detalles experimentales

Materiales y métodos

Preparación de herpesvirus de muestras de raza de pavos

Los herpesvirus de muestras de raza de pavos se prepararon infectando células de cultivo de tejidos con una multiplicidad de infección (abreviadamente en lo sucesivo MOI por la expresión inglesa *Multiplicity of Infection*) de 0,01 UFP/célula en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 unidades/ml de estreptomycin (estos componentes se obtuvieron de Irvine Scientific o un proveedor equivalente, y en la presente memoria en adelante se mencionan como medio DME completo) más 1% de suero bovino fetal. Después de que se completó el efecto citopático, el medio y las células se cosecharon y las células se sedimentaron a 3000 rpm durante 5 minutos en una centrifuga clínica. Las células infectadas se volvieron a suspender en un medio completo que contenía 20% de suero bovino fetal, 10% de DMSO y se conservaron congeladas a -70°C.

Preparación del herpesvirus de DNA de pavos. Todas las manipulaciones del herpesvirus de pavos (HVT) se hicieron usando la raza FC-126 (ATCC n° 584-C) Para la preparación del DNA viral del HVT procedente del citoplasma de células infectadas, los fibroblastos de embrión de pollo primarios se infectaron a una MOI suficiente para provocar un efecto citopático extensivo antes del sobrecrecimiento de las células. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a 39°C en un incubador humidificado con 5% de CO₂ en aire. Los mejores rendimientos de DNA se obtuvieron cosechando monocapas que se infectaban máximamente, pero que mostraban lisis incompleta de células (típicamente 5-7 días). Las células infectadas se cosecharon rascando las células en el medio usando un rascador de células (marca Costar) La suspensión de células se centrifugó a 300 rpm durante 10 minutos a 5°C en un rotor GS-3 (Sorvall Instruments). El sedimento resultante se resuspendió en PBS frío (20 ml/matraz rodante) y se sometió a otra centrifugación durante 10 minutos a 3000 rpm en frío. Después de decantar el PBS, el sedimento celular se volvió a suspender en un matraz rodante de 4 ml de un tampón RSB (Tris pH 7,5 10 mM, EDTA 1 mM, y Cl₂Mg 1,5 mM). Se añadió NP40 (Nonidet P = 40; Sigma) a la muestra a una concentración final de 0,5% con un mezclamiento ocasional. La muestra se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm en frío para sedimentar los núcleos y separar los residuos celulares. El líquido sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un tubo de centrifuga Corex de 15 ml. Tanto el EDTA (0,5 M pH 8,0) como el SDS (dodecilsulfato sódico; mezcla madre 20%) se añadieron a la muestra a las concentraciones finales de 5 mM y 1% respectivamente. Se añadieron 100 µl de proteinasa-K (10 mg/ml; Boehringer Mannheim) por cada 4 ml de muestra, se mezclaron y se incubaron a 45°C durante 1-2 horas. Después de este periodo, se añadió a la muestra un volumen igual de fenol saturado con agua y se agitó suavemente a mano. La muestra se centrifugó en una centrifuga clínica durante 5 minutos a 3000 rpm para separar las fases. El NaAc se añadió a la fase acuosa a una concentración final de 0,3 M (solución madre, 3 M pH 5,2), y el ácido nucleico se precipitó a -70°C durante 30 minutos después de la adición de 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. El DNA en la muestra se sedimentó mediante centrifugación durante 20 minutos a 8000 rpm en un rotor HV-4 a 5°C. El líquido sobrenadante se retiró cuidadosamente y el sedimento de DNA se lavó una vez con 25 ml de etanol al 80%. El sedimento de DNA se secó brevemente a vacío (2-3 minutos) y se volvió a suspender en un matraz rodante de 50 µl de células infectadas, con tampón TE (10 mM Tris pH 7,5, EDTA 1 mM). Típicamente, los rendimientos de DNA viral variaron de 5-10 µg/matraz rodante de células infectadas. Todo el DNA viral se conservó a aproximadamente 10°C.

Reacción de relleno con polimerasa. El DNA se volvió a suspender en tampón que contenía Tris 50 mM pH 7,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, y 400 micromoles de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos. Se añadieron diez unidades de DNA-polimerasa Klenow (BRL) y la reacción se dejó transcurrir durante 15 minutos a temperatura ambiente. El DNA se extrajo luego con fenol y se precipitó con etanol como antes.

Secuenciación de DNA. La secuenciación se llevó a cabo usando el kit USB Sequenase y ³⁵S-dATP (NEN). Las reacciones que usan tanto las mezclas como dGTP y las mezclas dTTP se llevaron a cabo para clarificar áreas de compresión. Alternativamente, las áreas comprimidas se resolvieron sobre geles de formamida. Los moldes eran subclones de plásmidos bicatenarios o subclones M13 monocatenarios, y se prepararon los cebadores bien sea para el vector justo fuera del inserto que va a ser secuenciado o para la secuencia previamente obtenida. La secuencia obtenida se ensambló y comparó usando el programa de ordenador *Dnastar*. La manipulación y comparación de las secuencias obtenidas se llevó a cabo con los programas de ordenador *Superclone* y *Supersee* de Coral Software.

Técnicas de biología molecular. Las técnicas para la manipulación de bacterias y el DNA, incluyendo procedimientos tales como la digestión con endonucleasas de restricción, electroforesis en gel, extracción de DNA de geles, ligamiento, fosforilación con quinasa, tratamiento con fosfatasa, crecimiento de cultivos bacterianos, transformación

de bacterias con DNA y otros métodos de biología molecular, descritos por Maniatis *et al.*, (1982) y Sambrook *et al.*, (1989). La reacción en cadena la polimerasa (PCR) se usó para introducir sitios de restricción convenientes para la manipulación de varios DNA. Los métodos usados están descritos por Innis *et al.*, (1990). En general los fragmentos amplificados eran menores de 500 pares de bases en tamaño y se confirmaron regiones críticas de fragmentos amplificados mediante la secuenciación de DNA. Excepto cuando se indica, estas técnicas se usaron con pequeñas variaciones.

Transferencia southern de DNA. El método general para la transferencia Southern se tomó de Maniatis *et al.*, (1982). El DNA se transfirió a filtros de nitrocelulosa (S&S BA85) en 20X de SSC (1X ssc = NaCl 0,15 M, citrato sódico 0,015K, pH 7,0) y se prehibridó en una solución de hibridación que consistía en formamida al 30%, solución de Denhardt 1X (0,02% de polivinilpirrolidona (PVP), 0,02% de seroalbúmina bobina (BSA), 0,02% de Ficoll), 6X SSC, NaH₂PO₄ 50 mM, pH 6,8, DNA de esperma de salmón 200 µg/ml durante 4-24 horas a 55°C. Se añadió el DNA sonda marcado que se habla marcado mediante traslado de muesca usando un kit de Bethesda Research Laboratories (BRL) y un nucleótido marcado con ³²P. El DNA sonda se separó de los nucleótidos no incorporados mediante una columna NACS (BRL) o una columna Sephadex G50 (Pharmacia). Después de hibridación durante la noche a 55°C, el filtro se lavó una vez con 2X SSC a la temperatura ambiente seguido por dos lavados con SSC 0,1X, dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1% durante 30 minutos a 55°C. El filtro se secó y auto-radiografió.

Método de clonación de DNA. La clonación de cDNA se refiere a los métodos usados para convertir las moléculas de RNA en moléculas de DNA siguiendo el estado de los métodos de la técnica. Los métodos de los inventores están descritos (Gubler y Hoffman, 1983). La firma Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, Maryland) ha diseñado un kit de clonación de cDNA que es muy similar a los procedimientos usados por los inventores y contiene un conjunto de reactivos y protocolos que pueden usarse para duplicar nuestros resultados.

Para clonar especies de mRNA de virus, una línea de células hospedantes sensible a la infección por el virus se infectó en 5-10 unidades formadoras de placas por célula. Cuando el efecto citopático fue evidente, pero antes de la destrucción total, se separó el medio y las células se lisaron en 10 ml de tampón de lisis (tiocianato de guanidina 4 M, antiespumante A al 0,1%, citrato sódico 25 mM pH 7,0, N-lauroil-sarcosina al 0,5%, beta-mercaptoetanol 1 M). El lisado de células se virtió en un homogeneizador Dounce esterilizado y se homogeneizó sobre hielo 8-10 veces hasta que la solución fue homogénea. Para la purificación del RNA, 8 ml de lisado de células se pusieron en capas cuidadosamente sobre 3,5 ml de solución de CsCl (CsCl 5,7 M, citrato sódico 25 mM, pH 7,0) en un tubo de centrifuga Beckman SW41. Las muestras se centrifugaron durante 18 horas a 20°C a 36.000 rpm en un rotor Beckman SW41. Los tubos se pusieron sobre hielo y los líquidos sobrenadantes de los tubos se retiraron cuidadosamente mediante aspiración para dejar el sedimento de RNA sin perturbación. El sedimento se volvió a suspender en un vaso de agua destilada de 400 µl y se añadieron 2,6 ml de solución guanidina (guanidina HCl 7,5 M, citrato de sodio 25 mM, pH 7,0 ditiotreitil 5 mM). Se añadieron 0,37 volúmenes de ácido acético 1 M, seguidos por 0,75 volúmenes de etanol frío y la muestra se puso a -20°C durante 18 horas para precipitar el RNA. El precipitado se recogió mediante centrifugación en una centrifuga Sorvall durante 10 minutos a 4°C a 10.000 rpm en un rotor SS34. El sedimento se disolvió en 1,0 ml de agua destilada, se volvió a centrifugar a 13.000 rpm y se guardó el líquido sobrenadante. El RNA se volvió a extraer del sedimento dos veces más como se indicó antes con 0,5 ml de agua destilada, y se reunieron los líquidos sobrenadantes. Se añadió a la muestra un volumen de 0,1 de solución de acetato de potasio 2 M seguido por 2 volúmenes de etanol frío y la muestra se puso a -20°C durante 18 horas. El RNA precipitado se recogió mediante centrifugación en el rotor SS34 a 4°C durante 10 minutos a 10000 rpm. El sedimento se disolvió en 1 ml de agua destilada y la concentración se tomó por lectura de la absorción a A260/280. El RNA se conservó a -70°C.

Se seleccionó mRNA que contiene colas de poliadenilato (poli A) usando celulosa oligo-dT (Pharmacia n° 27-5543-0). El RNA de poli A retenido se eluyó de la columna con tampón de elución (Tris 5 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM dodecilsulfato sódico al 0,1%) Tres mg de RNA total se hirvieron y se enfriaron y se aplicaron a 100 mg de columna de celulosa oligo-dT en un tampón aglutinante (Tris 0,1 M, pH 7,5, LiCl 0,5 M, EDTA 5 mM, pH 8,0, dodecilsulfato de litio al 0,1%). El RNA poli-A retenido se eluyó de la columna con un tampón de elución (Tris 5 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, pH 8,0, dodecilsulfato de litio al 0,1%). Este mRNA se volvió a aplicar a una columna de oligo-dT en un tampón aglutinante y se eluyó contra un tampón de elución. La muestra se precipitó con acetato sódico 200 mM y 2 volúmenes de etanol frío a -20°C durante 18 horas. El RNA se volvió a suspender en 50 µl de agua destilada.

Diez µg de RNA de poli-A se desnaturalizaron en hidróxido de metil-mercurio 20 mM durante 6 minutos a 22°C. Se añadió β-mercaptoetanol hasta 75 mM y la muestra se incubó durante 5 minutos a 22°C. La mezcla de reacción para la síntesis de la primera cadena de cDNA en 0,25 ml contenía 1 µg de cebador de oligo-dT (P-L Bio-Chemicals) o 1 µg de cebador sintético, 28 unidades de inhibidor de ribonucleasa placentaria (Bethesda Research Laboratories n° 5518SA), Tris 100 mM, pH 8,3, KCl 140 mM, MgCl₂ 10 mM, dATP, dCTP, dGTP y dTTP 0,8 mM (Pharmacia), 100 microcurios de dCTP marcado con ³²P (New England Nuclear n° NEG-013H), y 180 unidades de transcriptasa inversa del AMV (Molecular Genetics Resources n° MG 101). La mezcla de reacción se incubó a 42°C durante 90 minutos, y luego se terminó con EDTA 20 mM, pH 8,0. La muestra se extrajo con un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1) y se precipitó con acetato de amonio 2 M y 2 volúmenes de etanol frío a -20°C durante 3 horas. Después de la precipitación y centrifugación, el sedimento se disolvió en 100 ml de agua destilada. La muestra se cargó en una columna Sephadex de 15 ml de G-100 (Pharmacia) en un tampón (Tris 100 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM). El borde delantero de las fracciones de DNA eluidas se reunió, y el DNA se concentró mediante liofilización hasta que el volumen fue alrededor de 100 µl, luego el DNA se precipitó con acetato de amonio más etanol como se indica antes.

La muestra de la primera cadena completa se usó para la reacción de la segunda cadena que siguió el método de Gubler y Hoffman (1983) excepto que se usaron 50 µg/ml de los dNTP, 5,4 unidades DNA-polimerasa I (Boehringer Mannheim n° 642-711), y 100 unidades/ml de DNA-ligasa de *E. coli* (New England Biolabs n° 205) en un volumen total de 50 microlitros. Después de la síntesis de la segunda cadena, el cDNA se extrajo y precipitó con fenol/cloroformo. El DNA se resuspendió en 10 µl de agua destilada, se trató con 1 µg de RNasa A durante 10 minutos a 22°C y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Agarosa de Tipo II de Sigma) en Tris-acetato 40 mM, pH 6,85. El gel se tiñó con bromuro etidio, y el DNA del intervalo de tamaño esperado se retiró del gel y electroeluyó en Tris-acetato 8 mM, pH 6,85. El DNA electroeluido se liofilizó hasta alrededor de 100 microlitros y se precipitó con acetato de amonio y etanol como se indicó antes. El DNA se volvió a suspender en 20 µl de agua.

Las colas de oligo-dC se añadieron al DNA para facilitar la clonación. La mezcla de reacción contenía DNA, cacodilato potásico 100 mM, pH 7,2, ditiotretitol 0,2 mM, CaCl₂ 2 mM, 80 µmoles de dCTP, y 25 unidades de desoxinucleotidil-transferasa terminal (Molecular Genetic Resources n° S1001) en 50 µl. Después de 30 minutos a 37°C la reacción se terminó con EDTA 10 mM, y la muestra se extrajo con fenol/cloroformo y se precipitó como se indicó antes.

La muestra de DNA provista de colas de dC se asoció a 200 ng del vectorplasmídico pBR322 que contenía colas de oligo-dG (Bethesda Research Laboratories n° 5355 SA/SB) en 200 µl de Tris 0,01 M pH 7,5, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 8,0 a 65°C durante 2 minutos y luego a 57°C durante 2 horas. Se prepararon células de *E. coli* DH-I competentes frescas y se transformaron como se describió por Hanahan (1983) usando la mitad de la muestra de cDNA asociado en veinte partes alícuotas de 200 µl de células. Las células transformadas se cultivaron en placas de agar de caldo de Luria (LB = *Luria broth*), más 10 µg/ml de tetraciclina. Las colonias se escrutaron respecto de la presencia de insertos en el gen de ampicilina usando Ampscreen (Bethesda Research Labs n° 5537 UA) y se tomaron para análisis las colonias positivas.

Transfección de DNA para generar herpesvirus recombinantes. El método está basado en el procedimiento de polibreno-DMSO de Kawai y Nishizawa (1984) con las siguientes modificaciones. La generación del virus HVT recombinante depende de la recombinación de homólogos entre el DNA viral del HVT y el vector de homología plasmídico que contiene el DNA extraño deseado flanqueado por las secuencias clonadas de herpesvirus apropiadas. Las transfecciones se llevaron a cabo en placas Petri de 6 centímetros (plástico Corning) de células primarias fibroblastos de embrión de pollo (abreviadamente CEF por la expresión inglesa *chick embryo fibroblast*) confluentes al 50%. Las células se cultivaron en placas el día anterior en un medio de crecimiento de CEF (1X F10/199, suero de ternero fetal al 5%, glutamina al 2%, aminoácidos no esenciales al 1%, y penicilina/estreptomicina al 2%) que contenía 4 µg/ml de polibreno (solución madre 4 mg/ml en 1X HBSS). Para las co-transfecciones en la células de CEF se usaron 5 µg de DNA del HVT intacto y suspendido en 1 mililitro de un medio de CEF contenía 30 µg/ml de polibreno (solución madre 4 mg/ml en 1X HBSS). La suspensión de polibreno-DNA (1 ml) se añadió luego a una placa Petri de 6 cm de células de CEF desde la cual el medio se había aspirado, y se incubó a 39°C durante 30 minutos. Las placas se hicieron balancear periódicamente durante este tiempo para redistribuir el inóculo. Después de este periodo, se añadieron 4 ml del medio de crecimiento de CEF directamente para lavar la placa Petri, y se incubaron durante 2,5 horas adicionales a 39°C. En este momento, el medio se retiró de cada placa Petri, y las células se agitaron por sacudidas con 2 ml de DMSO al 30% (Dimetilsulfóxido, J.T. Baker Chemical Co.) en 1X HBSS durante 4 minutos a la temperatura ambiente. El DMSO al 30% se retiró cuidadosamente y las monocapas se lavaron 1 vez con 1X HBSS a la temperatura ambiente. Las células se incubaron luego a 39°C después de la adición de 5 ml de medio de crecimiento de CEF. El siguiente día, el medio se cambió para retirar cualesquier indicios últimos de DMSO y para estimular el crecimiento de las células. El efecto citopático del virus se hace evidente en 6 días. La generación de una solución madre de alta concentración (80%-90% de CPE) puede usualmente hacerse en una semana desde esta fecha. Las muestras de reserva de HVT se prepararon volviendo a poner en suspensión las células infectadas en el medio de crecimiento de CEF que contenía 20% de suero de ternero fetal, DMSO al 10% y conservación a -70°C.

Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos de DNA subgenómicos. Para el virus de la pseudo-rabia se ha demostrado la capacidad para generar herpesvirus mediante la co-transfección de fragmentos subgenómicos solapantes (Zijl *et al.*, 1988). Si se realizan por ingeniería genética delecciones y/o inserciones directamente en los fragmentos subgenómicos antes de la co-transfección, este procedimiento da como resultado una frecuencia alta de virus que contiene la alteración genómica, reduciendo grandemente la cantidad de escrutinio requerido para purificar el virus recombinante. Este método se usó para construir el HVT recombinante.

Una genoteca de subclones que contiene fragmentos subgenómicos solapantes del HVT se generó como sigue. El DNA de HVT se obtuvo de la *American Type Culture Collection* (FC126 ("Calnek")). Dichos fragmentos se cizallaron y luego se seleccionaron por tamaños sobre un gradiente de glicerol como se describió por Van Zijl *et al.*, (1988) con fragmentos de 40-50 KB escogidos como la población de inserto. Las fracciones reunidas se diluyeron dos veces con TE, se añadieron un décimo de volumen de NaAc 3 M y 2,5 volúmenes de etanol, y el DNA se precipitó a 30K rpm en un rotor Beckman SW41 durante 1 hora. A los fragmentos cizallados se les dio extremos romos mediante el tratamiento inicial con DNA-polimerasa de T4, usando concentraciones de DNTP bajas para promover la retirada de los extremos colgantes de 3' seguido por el tratamiento con polimerasa de Klenow para rellenar los extremos 3' rebajados (adherentes). Estos fragmentos de inserto se ligaron luego al vector cósmido pWE15 (Stratagene) el cual se digirió con *Bam*HI, se trató con fosfatasa intestinal de ternero, y se hizo romo mediante el tratamiento con polimerasa de Klenow. La mezcla ligada se empaquetó luego usando extractos de empaquetamiento Gigapack XL (Stratagene). La ligación y empaquetamiento se recomendaron por el fabricante.

Los mapas de restricción publicados para las enzimas *Bam*HI, *Hind*III, y *Xho*I permitieron el uso de fragmentos subclonados como sondas específicas para escrutar la genoteca cosmídica respecto a los subclones que abarca el genoma. Las sondas se generaron a partir de fragmentos de restricción subclonados. Los fragmentos se marcaron luego usando un sistema no radiactivo (Genius, Boehringer Mannheim). El escrutinio se facilitó escogiendo las colonias
 5 seguido de los medios por crecimiento durante la noche. Los conjuntos de 5 filtros y de una placa Petri maestra se estamparon con una placa Petri de microtitulación y de nuevo se dejaron crecer durante la noche. El glicerol se añadió a los pocillos a 15% y las placas se congelaron a -20°C para proporcionar cultivos de reserva (*stock*) de cada colonia. Los filtros fueron del tipo *BioRad Colony Lift Membranes* y se trataron e hibridaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se lavaron en 0,1X SSC, SDS al 0,1%, 65°C. Los clones que se hibridaron con la sonda no radioactiva
 10 se detectaron de acuerdo con las instrucciones del kit de Genius.

Las colonias se seleccionaron para un análisis adicional sobre la base de su hibridación para dos o más de las sondas específicas. Estas se digirieron luego con *Bam*HI, y se compararon con los mapas publicados del HVT (Buckmaster *et al.*, 1988). Los tres cósmidos (407-32.2C3, 407-32.IG7, y 407-32.5G6) se obtuvieron esta manera. Una descripción
 15 detallada de cada clon se da más adelante. Se encontró que la amplificación en cloranfenicol (Maniatis *et al.*, 1982) fue necesaria para lograr rendimientos razonables de DNA de estos clones. Además, un clon cósmido (407-32.5G6) fue inestable y tuvo que ser cultivado de la reserva (*stock*) congelada original con el fin de obtener preparaciones de DNA satisfactorias.

El vector pWE15 permitió que los insertos fueran escindidos con *Not*I. Sin embargo, están presentes cuatro sitios *Not*I en el genoma del HVT, de manera que los insertos que abarcan estos sitios no pueden ser escindidos con *Not*I. Dos de los sitios *Not*I están presentes en el fragmento *Bam*HI n° 2 del HVT, este fragmento se clonó directamente en pSP64. Los otros dos sitios están presentes en la región corta única en el fragmento *Bam*HI n° 1. Este fragmento se clonó directamente en el vector pWE15. Los tres cósmidos cizallados y los dos fragmentos *Bam*HI cubren todo salvo
 25 una parte pequeña de los extremos del genoma del HVT. Debido a que estas regiones están repetidas en las porciones internas del genoma, está disponible toda la información genética.

Un sitio *Stu*I en el gen US2 del HVT se estableció como un sitio útil para la inserción del DNA extraño utilizando el Método de recombinación de homólogos para generar herpesvirus recombinantes (véase el Ejemplo 6). El gen US2
 30 del HVT está localizado en el fragmento *Bam*HI n° 1 el cual contiene cinco sitios *Stu*I. Para facilitar el uso de este sitio para la inserción del DNA extraño por el sitio *Stu*I dentro del gen US2 se convirtió en un sitio único *Hind*III. Esto se logró digiriendo parcialmente el subclon *Bam*HI n° 1 con *Stu*I e insertando luego un fragmento de 10 KB que confiere resistencia a kanomicina (Neo^R) en el sitio usando enlazadores *Hind*III. El gen de resistencia a kanomicina permitió la selección positiva de los clones recombinantes. El fragmento Neo^R se retiró por digestión con *Hind*III seguido por
 35 el religamiento del clon generador 430-84.215.

El DNA se preparó por experimentos de reconstrucción mediante la digestión por restricción con enzimas las cuales cortaron los subclones fuera o flanqueando las inserciones del HVT. En algunos casos, se usó un cósmido no digerido en una reconstrucción. Los DNA digeridos se extrajeron una vez con fenol y se precipitaron con etanol. El DNA se volvió a suspender a una concentración de 0,5 a 1 µg/ml. Los experimentos de reconstrucción viral se llevaron a cabo usando Lipofectina (BRL) para mediar la transfección. Se añadieron dos a tres microgramos de cada uno del subclon a 0,5 ml de medio MEM (sales de Earle) complementados con aminoácidos no esenciales al 1% y de penicilina/estreptomicina al 2%/(MEM+). Los controles consistieron en MEM+ sin DNA, con varios µg de DNA del HVT, o con 4 de 5 de los subclones. Separadamente, se añadieron 30 µl de Lipofectina a otros 0,5 ml de MEM+. Estas dos mezclas se combinaron luego y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos.
 45

Las células fibroblastos de embrión de pollo (CEF) se prepararon para transfección en la siguiente manera. Los CEF (Spafas) se cultivaron en placas Petri de 6 pocillos a 39°C en un medio F10/M199 (1:1) que contenía aminoácidos no esenciales al 1%, penicilina/estreptomicina al 2%, y suero de ternero fetal al 5% (CEF+). Las células se transfectaron hasta una confluencia de 90-95%. Para la transfección, los pocillos se aspiraron y lavaron tres veces con MEM+, y luego se incubaron cuatro horas a 39°C con la mezcla de 1 ml de Lipofectina/DNA antes indicada. Luego se añadió un ml de más de CEF+ a los pocillos, y las células se incubaron durante la noche y se alimentaron con CEF+. Las placas Petri se examinaron luego diariamente respecto de la aparición de placas.
 55

La lipofectina con el DNA del HVT de control dio como resultado la aparición de placas en cinco días. Cuando se usaron solo cuatro de los cinco subclones, no se obtuvieron placas. Cuando los cinco fragmentos genómicos solapantes del HVT se usaron para reconstruir el virus, las placas aparecieron desde 5 a 19 días después de la lipofección inicial. En el caso de las placas que aparecieron tardías, las placas no se vieron inicialmente sobre la monocapa infectada, y fue solo después del pase de la monocapa y el cultivo en placas Petri sobre una superficie más grande cuando aparecieron las placas. Después del pase, las placas generalmente aparecieron en 3 días. Los virus recombinantes se purificaron en placas Petri aproximadamente tres veces, y luego se analizaron para la inserción de DNA extraños.
 60

Escrutinio bluogal para herpesvirus recombinantes. Cuando el gen extraño codificó la enzima β-galactosidasa, las placas que contenían el gen se visualizaron más fácilmente. El compuesto químico Bluogal® (Bethesda Research Laboratories) se incorporó al nivel de 200-300 µg/ml en agarosa durante el ensayo de placas, y las placas que expresaron β-galactosidasa activa se volvieron azules. Luego se tomaron las placas azules y se purificaron mediante aislamientos de placas azules adicionales. Otros genes extraños se insertaron mediante recombinación de homólogos de manera
 65

que éstos reemplazaron al gen de β -galactosidasa. En este caso no se tomaron las placas no azules para purificación del virus recombinante.

Escrutinio para la expresión de genes extraños en HVT recombinantes usando ensayos de placas negras. Para analizar la expresión de antígenos extraños expresados por virus HVT recombinantes, las monocapas de células CEF se infectaron con HVT recombinante, se recubrieron con medio de agarosa nutriente y se incubaron durante 4-5 días a 39°C. Una vez que se desarrollaron las placas, la capa de agarosa se separó de la cápsula, la monocapa se lavó con PBS, se fijó con metanol al 100% durante 10 minutos a la temperatura ambiente y las células se secaron al aire.

Después de rehidratar la placa Petri con PBS, el anticuerpo primario se diluye a la dilución apropiada con PBS y se incuba con la monocapa de células durante 2 horas a la temperatura ambiente durante la noche. Luego se separó el anticuerpo no unido de las células lavando tres veces con PBS a la temperatura ambiente. Un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina se diluye con PBS y se incuba con las células durante dos horas a la temperatura ambiente. El anticuerpo secundario no unido se separa luego lavando las células tres veces con PBS a la temperatura ambiente. Después, la monocapa se lava en un tampón de desarrollo de color (Tris 100 mM, pH 9,5/NaCl 100 mM/MgCl₂ 5 mM), y luego se incuba 10 minutos a toda la noche a la temperatura ambiente con una solución de sustrato recientemente preparada (0,3 mg/ml de Azul Nitro tetrazolio + 0,15 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfatasa en un tampón de desarrollo de color). Finalmente, la reacción se obtuvo reemplazando la solución de sustrato con TE (Tris 10 mM, pH 7,5/EDTA 1 mM). Las placas que expresan el antígeno correcto se tiñeron de negro.

Método para la hibridación en placas para valorar la pureza de las cepas (stocks) de HVT recombinantes. Cuando no existe un reactivo inmunológico adecuado para detectar la presencia de un antígeno particular en un virus de HVT recombinante, la hibridación de placas puede usarse para valorar la pureza de una cepa de virus. Inicialmente, las monocapas de células CEF se infectan con varias diluciones de las cepas virales para dar 50-100 placas/10 cm. La placa de Petri, se cubre con agarosa nutriente y se incuba durante 4-5 días a 39°C. Una vez que ocurre el crecimiento de las placas, la posición de cada placa se marca sobre el fondo de la placa de Petri. La cubierta de agarosa se retira luego, la placa de Petri se lava con PBS y la monocapa de CEF restante se transfiere a una membrana de nitrocelulosa (NC) o a una membrana de nilón BioRad pre-humedecida con PBS (tomando nota de la posición de membrana respecto a la placa de Petri). Las células contenidas sobre las membranas de NC se lisan luego colocando las membranas en 1,5 ml de NaCl 3 M y NaOH 0,5 M durante 5 minutos. Las membranas se neutralizan colocándolas en 1,5 ml de acetato sódico 3 M (pH 5,2) durante cinco minutos. El DNA de las células lisadas se une luego a las membranas de NC mediante tratamiento en horno a 80°C durante 1 hora. Después de este periodo las membranas se pre-hibridan en una solución que contiene 6X SSC, leche descremada al 3%, SDS al 0,5%, ($\pm$) DNA de esperma de salmón (50 μ g/ml) durante 1 hora a 65°C. Se añade luego DNA sonda radiomarcado (alfa ³²P-dCTP) y las membranas se incuban a 65°C durante la noche (~12 horas). Después de la hibridación las membranas NC se lavan dos veces (30 minutos cada vez) con 2X de SSC a 65°C, seguido por dos lavados adicionales a 65°C con 0,5X de SSC. Las membranas NC se secan luego y se exponen a una película de rayos X (Kodak XOMATAR) a -70°C durante 12 horas. Las señales positivas se alinean luego con la posición de las placas sobre la placa de Petri y la pureza de la cepa se registra como el porcentaje de placas positivas sobre el total.

Construcción del vector de homología para la inserción, del gen de beta-galactosidasa en el gen US2 del HVT. El gen de β galactosidasa (*lacZ*) se insertó en el fragmento *EcoRI* n° 7 del HVT en el sitio *StuI* único. El gen marcador está orientado en la misma dirección que el gen US2. Una descripción detallada del gen marcador se da en las Figuras 7A y 7B. Este se construye utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook *et al.*, 1989) mediante la unión de fragmentos de restricción de las siguientes fuentes con las secuencias de DNA sintéticas indicadas en las Figuras 7A y 7B. El fragmento 1 es un subfragmento de restricción de aproximadamente 413 de pares de bases *Sall* a *BamHI* del fragmento de restricción *BamHI* n° 10 del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984). El fragmento 2 es un fragmento de restricción de aproximadamente 3010 pares de bases *BamHI* a *PvuII* del plásmido pJF751 (Ferrari *et al.*, 1985). El fragmento 3 es un subfragmento de restricción de aproximadamente 754 pares de bases *NdeI* a *Sall* del fragmento de restricción *BamHI* n° 7 del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984).

RNA aislado de células de bazo de pollo estimuladas con concavalina A. Se diseccionaron bazos de pollo de 3 semanas de SPAFAS, Inc., se lavaron y se fragmentaron a través de una jeringa/aguja para liberar las células. Después de permitir que sedimenten el estroma y los residuos, las células se sedimentaron y se lavaron dos veces con PBS. El sedimento de células se trató con un tampón hipotónico de lisis para lisar los glóbulos rojos (eritrocitos), y los esplenocitos se recuperaron y se lavaron dos veces con PBS. Los esplenocitos se resuspendieron a 5 x 10⁶ células/ml en RPMI que contenía FBS al 5% y 5 μ g/ml de concanavalina A y se incubaron a 39°C durante 48 horas. El RNA total se aisló de las células usando reactivo de lisis de isetonato guanidina y protocolos del kit de aislamiento de RNA Promega (Promega Corporation, Madison, Wisconsin). Se usaron 4 μ g de RNA total en cada primera cadena que contenga los cebadores antisentido apropiados y la transcriptasa inversa del AMV (Promega Corporation, Madison, Wisconsin). La síntesis de cDNA se llevó a cabo en el mismo tubo siguiendo la reacción de transcriptasa inversa, usando los cebadores con sentido apropiado y DNA-polimerasa Vent® (Life Technologies, Inc., Bethesda, Maryland).

Clon subgenómico 172-07.BA2. El plásmido 172-07.BA2 se construyó con el fin de generar HVT recombinante. Este contiene una región de aproximadamente 25.000 pares de bases de DNA del HVT genómico. Este puede ser usado junto con otros clones subgenómicos de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes para la construcción del HVT recombinante. Este plásmido puede construirse utilizando técnicas estándares de DNA recombinantes (Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook *et al.*, 1989).

mediante la unión de dos fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El primer fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 2.999 pares de bases *Bam*HI a *Bam*HI de pSP64 (Promega). El segundo fragmento es de aproximadamente 25.000 pares de bases, el fragmento *Bam*HI n° 2 de HVT (Buckmaster *et al.*, 1988).

- 5 *Vector de homología 172-29.31.* El plásmido 172-29.31 se construyó con el fin de insertar DNA extraño en el HVT. Este contiene un sitio de enzima de restricción *Xho*I único en el cual puede ser insertado el DNA extraño. Cuando un plásmido que contiene un inserto de DNA extraño en el sitio *Xho*I se usa de acuerdo con la Cotransfección de DNA para generar herpesvirus recombinantes o el método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes resultará un virus que contiene el DNA extraño. Este plásmido puede construirse utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook *et al.*, 1989), uniendo dos fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El primer fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 2999 pares de bases *Bam*HI a *Bam*HI de pSP64 (Promega). El segundo fragmento es el fragmento de aproximadamente 3300 pares de bases *Bam*HI n° 16 del HVT (Buckmaster *et al.*, 1988). La secuencia completa del fragmento *Bam*HI n° 16 se da en la SEQ ID NO: 3. Advuértase que el fragmento se clonó de tal manera que el ORF del UL43 está en la orientación transcripcional opuesta al gen de β -lactamasa del pSP64.

- Vector de homología 172-63.1.* El plásmido 172-63.1 se construyó con el fin de insertar DNA extraño en el HVT. Este contiene un sitio de enzima de restricción *Xho*I único en el cual puede ser insertado el DNA extraño. Cuando un plásmido que contiene un inserto de DNA extraño en el sitio *Xho*I se usa de acuerdo con la Cotransfección de DNA para generar herpesvirus recombinantes o el método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes resultará un virus que contiene el DNA extraño. Este plásmido puede construirse utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook *et al.*, 1989), uniendo dos fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El primer fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 2999 pares de bases *Eco*RI a *Eco*RI del pSP64 (Promega). El segundo fragmento es el fragmento de aproximadamente 5500 pares de bases *Eco*RI n° 9 del HVT. Advuértase que el fragmento *Eco*RI se clonó de manera que el sitio *Xho*I único está más cerca del sitio *Hind*III único en el vector pSP64.

- Vectores de homología 255-18.B16.* El plásmido 255-18.B16 se construyó con el fin de insertar los genes HN y F del NDV en el HVT. Los genes HN y F del NDV se insertaron como un fragmento *Sal*I en el vector de homología 172-29.31 en el sitio *Xho*I. Los genes HN y F del NDV se insertaron en la misma orientación transcripcional que el ORF de UL43 en el vector de homología parental. Una descripción detallada del fragmento *Sal*I se muestra en las Figuras 12A-12C. El fragmento *Sal*I insertado puede construirse utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook *et al.*, 1989), uniendo fragmentos de restricción de las siguientes fuentes con las secuencias de DNA sintético indicadas en las Figuras 12A, 12B y 12C. El fragmento 1 es un subfragmento de restricción de aproximadamente 416 pares de bases *Sal*I a *Bam*HI del fragmento 10 de restricción *Bam*HI del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984). El fragmento 2 es el fragmento de aproximadamente 3009 pares de bases de *Bam*HI a *Pvu*II del plásmido pJF751 (Ferrari *et al.*, 1985). El fragmento 3 es un fragmento de restricción de aproximadamente 1200 pares de bases *Ava*II a *Eco*RI de cDNA del gen HN del NDV de longitud completa. El fragmento 4 es un fragmento de restricción de aproximadamente 179 pares de bases *Eco*RI a *Pvu*II del plásmido pSP64 (Promega). El fragmento 5 es un subfragmento de restricción de aproximadamente 357 pares de bases *Sma*I a *Bam*HI del fragmento de restricción N del *Bam*HI del HSV-1. El fragmento 6 es un fragmento de restricción de aproximadamente 1812 pares de bases *Bam*HI a *Pst*I del cDNA del gen F del de longitud completa. El fragmento 7 es un fragmento de restricción de aproximadamente 235 pares de bases *Pst*I a *Sac*I del plásmido pBR322.

- 45 *Clon subgenómico 378-50.BA1.* El cósmido 378-50.BA1 se construyó con el fin de generar un HVT recombinante. Este contiene una región de aproximadamente 29.500 pares de bases de DNA genómico del HVT. Este puede ser usado junto con otros clones subgenómicos de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes para la construcción del HVT recombinante. Este cósmido puede construirse uniendo dos fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El primer fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 8164 pares de bases *Bam*HI a *Bam*HI del pWE15 (Stratagene) El segundo fragmento es el fragmento de aproximadamente 29.500 pares de bases *Bam*HI n° 1 del HVT (Buckmaster *et al.*, 1988).

- Clon subgenómico 407-32.1C1.* El cósmido 407-32.1C1 se construyó con el fin de generar el HVT recombinante. Este contiene una región de aproximadamente 38.850 pares de bases del DNA del HVT genómico (véase la Figura 8). Esta región incluye los fragmentos *Bam*HI 11, 7, 8, 21, 6, 18, aproximadamente 1250 pares de bases del fragmento 13, y aproximadamente 6.700 pares de bases del fragmento 1. Este puede ser usado junto con otros clones subgenómicos de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes para la construcción de HVT recombinantes. Este cósmido puede construirse como se describió antes en el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Este se aisló de la genoteca de DNA cizallada mediante escrutinio con las sondas P1 y P4 (descritas en la Figura 8). Una cepa bacteriana que contiene el cósmido se ha depositado el 3 de marzo de 1993 de acuerdo con el Tratado de Budapest en el *International Depository of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure with the Patent Culture Depository of the American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, bajo el número de acceso ATCC 75428.

- 65 *Clon subgenómico 407-32.2C3.* El cósmido 407-32.2C3 se construyó con el fin de generar un HVT recombinante. Este contiene una región de aproximadamente 40.170 pares de bases del DNA del HVT genómico (véase la Figura 8). Esta región incluye los fragmentos *Bam*HI n° 10, 14, 19, 17, 5 y aproximadamente 2.100 pares de bases del fragmento

2. Este puede ser usado junto con otros clones subgenómicos de acuerdo con el Método Para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes para la construcción de HVT recombinantes. Este cósmido puede construirse como se describió antes en el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Este se aisló de la genoteca DNA compartida mediante el cribado con las sondas P1 y P2 (descritas en la Figura 8). Una cepa bacteriana que contiene el cósmido se ha depositado de acuerdo con el Tratado de Budapest en el *International Depository of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure with the Patent Culture Depository of the American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, bajo el número de Acceso ATCC 75430.

10 *Clon subgenómico 407-32.5G6*. El cósmido 407-32.5G6 se construyó con el fin de generar el HVT recombinante. Este contiene una región de aproximadamente 40.000 pares de bases del DNA del HVT genómico (véase la Figura 8). Esta región incluye los fragmentos *Bam*HI nº 9, 3, 20, 12, 16, 13 de aproximadamente 1.650 pares de bases del fragmento 2, y aproximadamente 4.000 pares de bases del fragmento 11. Este se puede usar junto con otros clones subgenómicos de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes para la construcción de HVT recombinantes. Este cósmido puede construirse como se describió antes en el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Este se aisló de la genoteca de DNA cizallada mediante escrutinio con las sondas P2 y P3 (descritas en la Figura 8). Una cepa bacteriana que contiene el cósmido se ha depositado el 3 de Marzo de 1993 de acuerdo con el Tratado de Budapest en el *International Depository of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure with the Patent Culture Depository of the American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, bajo el número de acceso ATCC 75427.

Vector de homología 435-47.1. El plásmido 415-47.1 se construyó con el fin de insertar DNA extraño en el HVT. Este contiene un sitio de enzima de restricción *Hind*III único en el cual puede insertarse el DNA extraño. Cuando se usa un plásmido que contiene un inserto de DNA extraño en el sitio *Hind*III de acuerdo con la Cotransfección de DNA para generar herpesvirus recombinantes o el método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes resultará un virus que contiene el DNA extraño. Este plásmido puede construirse utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982, y Sambrook *et al.*, 1989), uniendo los dos fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El primer fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 2999 pares de bases *Eco*RI a *Eco*RI del pSP64 (Promega). El segundo fragmento es un fragmento de aproximadamente 7300 pares de bases de *Eco*RI nº 7 del HVT. Adviértase que el sitio *Hind*III del vector pSP64 se separó digiriendo el subclon con *Hind*III seguido por un relleno con polimerasa de Klenow en reacción y religamiento. Luego se insertó un enlazador *Hind*III sintético (CAAGCTTG) en el sitio *Stu*I único del fragmento *Eco*RI nº 7.

35 *Clon subgenómico 437-26.24*. El plásmido 437-26.24 se construyó con el fin de generar el HVT recombinante. Este contenía una región de aproximadamente 13.600 pares de bases del DNA de HVT genómico. Este puede ser usado junto con otros clones subgenómicos de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes para la construcción de HVT recombinantes. Este plásmido se construyó utilizando las técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook *et al.*, 1989), uniendo dos fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El primer fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 2970 pares de bases *Hind*III a *Bam*HI del pSP64 (Promega). El segundo fragmento es el subfragmento de aproximadamente 13.600 pares de bases *Bam*HI a *Stu*I del fragmento *Bam*HI nº 2 del HVT (Buckmaster *et al.*, 1988). Adviértase que el fragmento *Bam*HI nº 2 contiene cinco sitios *Stu*I, el sitio utilizado en esta subclonación se convirtió en un sitio *Hind*III como se describió en el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes.

50 *Clon subgenómico 437-26.26*. El plásmido 437-26.26 se construyó con el fin del generar HVT recombinante. Este contiene una región de aproximadamente 15300 pares de bases del DNA del HVT genómico. Este puede ser usado junto con otros clones subgenómicos de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes para la construcción de HVT recombinantes. Este plásmido se construyó utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook *et al.*, 1989), uniendo dos fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El primer fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 2.970 pares de bases *Hind*III a *Bam*HI del pSP64 (Promega). El segundo fragmento es el subfragmento de aproximadamente 15.300 pares de bases *Bam*HI a *Stu*I del fragmento *Bam*HI nº 2 del HVT (Buckmaster *et al.*, 1988). Adviértase que el fragmento *Bam*HI nº 2 contiene cinco sitios *Stu*I, el sitio utilizado en esta subclonación se convirtió en un sitio *Hind*III como se describió en el Método para generar herpesvirus recombinante de fragmentos subgenómicos solapantes.

60 *Vectores de homología 456-18.18 y 456-17.22*. Los plásmidos 45618.18 y 456-17.22 se construyeron con el fin de insertar los genes gA y gB del MDV en el HVT. Los genes del MDV se insertaron como un casete en el vector de homología 435-47.1 en el sitio *Hind*III único. Los genes del MDV se insertaron en el sitio *Hind*III como un fragmento *Pst*I a *Eco*RI de extremos romos (véanse las Figuras 10A y 10B). Los sitios *Hind*III y *Eco*RI se hicieron romos mediante llenado con polimerasa de Klenow en reacción. El sitio *Pst*I se hizo romo mediante la reacción con DNA-polimerasa de T4. Adviértase que el casete del MDV se insertó en ambas orientaciones. El plásmido 456-18.18 contiene los genes del MDV insertados en la orientación transcripcional opuesta al gen US2 en el vector de homología parental. El plásmido 456-17.22 contiene los genes del MDV insertados en la misma orientación transcripcional que el gen US2 en el vector de homología parental. Una descripción detallada del casete del MDV se da en las Figuras 10A y 10B. Este puede construirse utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook

et al., 1989) uniendo los fragmentos de restricción de las siguientes fuentes con las secuencias de DNA sintético indicadas en las Figuras 10A y 10B. El fragmento 1 es un subfragmento de restricción de aproximadamente 2178 pares de bases *PvuII* a *EcoRV* del fragmento de restricción *EcoRI* del MDV genómico de 6,9 KB (Ihara *et al.*, 1989). El fragmento 2 es un fragmento genómico del MDV de aproximadamente 3898 pares de bases *Sall* a *EcoRI* (Ross *et al.*, 1989).

Vector de homología 528-03.37. El plásmido 528-03.37 se construyó con el fin de insertar el gen gD del virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILTV) en el HVT. El gen gD seguido por la señal de poliadenilación de gX del PRV se insertó como un casete en el vector de homología 435-47.1 en el sitio *HindIII* único. El casete se construyó utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1989 y Sambrook *et al.*, 1989) uniendo los fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El primer fragmento es un sub-fragmento de restricción de aproximadamente 2.060 pares de bases *EcoRI* a *BclI* del fragmento de restricción genómico *KpnI* nº 8 del ILTV (10,6 KB). El segundo fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 754 pares de bases *NdeI* a *Sall* del fragmento de restricción *BamHI* nº 7 del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984). Adviértase que los fragmentos están orientados de manera que los sitios *BclI* y *NdeI* están contiguos.

Vector de homología 528-11.43. El plásmido 528-11.43 se construyó con el fin de insertar el gen gB del virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILTV) (A. M. Griffin, 1991) en el HVT. El gen gB se insertó como un fragmento *EcoRI* en el vector de homología 435-47.1 en el sitio *HindIII* único. El gen gB se insertó en el sitio *HindIII* de extremos romos como un fragmento *EcoRI* de extremos romos. Los sitios *HindIII* y *EcoRI* se hicieron romos por llenado con la polimerasa de Klenow en reacción. El gen gB se insertó en la misma orientación transcripcional que el gen US2 en el vector de homología parental. El fragmento *EcoRI* puede obtenerse como un fragmento genómico del virus del ILTV de 3,0 KB.

Vector de homología 518-46.B3. El plásmido 518-46.B3 se construyó con el fin de insertar un DNA extraño en el HVT. Este contiene un sitio de enzima de restricción *HindIII* único en el cual puede insertarse el DNA extraño. Cuando un plásmido que contiene un inserto de DNA extraño en el sitio *HindIII* se usó de acuerdo con la Cotransfección de DNA para generar herpesvirus recombinantes o con el método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes resultará un virus que contiene el DNA extraño. Este plásmido puede construirse utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook *et al.*, 1989) uniendo tres fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El primer fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 1649 pares de bases *PvuI* a *Sall* del pSP64 (Promega). El segundo fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 1368 pares de bases *PvuI* a *Sall* del PSP65 (Promega). El tercer fragmento es el fragmento *XhoI* a *XhoI* del plásmido 437-47.1 de aproximadamente 3400 pares de bases.

Vector de homología 535-70.3. El plásmido 535-70.3 se construyó con el fin de insertar los genes gB y gA del MDV y el gen F del MDV en el HVT. El gen F se insertó como un casete en el vector de homología 456-17.22 en el sitio *HindIII* entre los genes gA y gB del MDV (véase la Unión B, Figura 10A) El gen F está bajo el control del promotor del HCMV temprano inmediato y seguido por la señal de poliadenilación de TK del HSV-1. El gen F se insertó en la misma orientación transcripcional que el gen US2 en el vector de homología parental. El casete puede construirse utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook *et al.*, 1989), uniendo los fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El primer fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 1191 pares de bases *PstI* a *AvaII* del sub-fragmento *XbaI* E genómico del HCMV (D.R. Thomsen *et al.*, 1991). El segundo fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 1812 pares de bases *BamHI* a *PstI* del clon de cDNA del gen F del NDV de longitud completa (cepa B1). El último fragmento es un sub-fragmento de restricción de aproximadamente 784 pares de bases *SmaI* a *SmaI* del fragmento de restricción Q del HSV-1 (McGeoch *et al.*, 1985).

Vector de homología 549-24.15. El plásmido 549-24.15 se construyó con el fin de insertar los genes gB y gA del NDV y los genes F y HN del NDV en el HVT. Los genes HN y F se insertan como un casete en el vector de homología 456-17.22 en el sitio *HindIII* localizado entre los genes gA y gB del MDV (véase la Unión B, Figura 10A). Los genes HN y F están bajo el control de los promotores gpX del PRV y temprano inmediato del HCMV respectivamente. Los genes HN y F van seguidos por las señales de poliadenilación gX de PRV y TK de HSV-1 respectivamente. El casete puede construirse utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook *et al.*, 1989), uniendo los fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El primer fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 413 pares de bases *Sall* a *BamHI* del fragmento *BamHI* nº 10 del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984). El segundo fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 1.811 pares de bases *SmaII* a *Sall* del clon de cDNA del gen HN del NDV de longitud completa (cepa B1). El tercer fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 754 pares de bases *NdeI* a *Sall* del fragmento *BamHI* nº 7 de restricción del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984). El cuarto fragmento es un subfragmento de restricción *PstI* a *AvaII* de aproximadamente 1191 pares de bases del sub-fragmento *XbaI* E genómico del HCMV (D.R. Thomsen *et al.*, 1981). El quinto fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 1812 pares de bases de *BamHI* a *PstI* del clon de cDNA del gen F del NDV de longitud completa (cepa B1) El último fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 784 pares de bases *SmaI* a *SmaI* del fragmento Q de restricción *BamHI*-1 del HSV (McGeoch *et al.*, 1985).

Vector de homología 549-62.10. El plásmido 549-62.10 se construyó con el fin de insertar los genes de gB y gA del NDV y el gen HN del NDV en el HVT. El gen HN se insertó como un casete en un vector de homología 456-17.22 en el sitio *HindIII* entre los genes gA y gB del MDV (véase la Unión B, Figura 10A). El gen HN está bajo el

control del promotor gpX del PRV y seguido por la señal de poliadenilación gX del PRV. El gen HN se insertó en la misma orientación transcripcional que el gen US2 en el vector de homología parental. El casete se construyó utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982, y Sambrook *et al.*, 1989) uniendo los fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El primer fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 413 pares de bases *Sall* a *Bam*HI del fragmento *Bam*HI nº 10 del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984). El segundo fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 1811 pares de bases *Ava*II a *Nde*I del clon de cDNA del gen HN del NDV de longitud completa (cepa B1). El último fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 754 pares de bases *Nde*I a *Sall* del fragmento de restricción *Bam*HI nº 7 del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984).

10 *Clon subgenómico 550-60.6.* El plásmido 550-60.6 se construyó con el fin de generar HVT recombinantes. Este contiene una región de aproximadamente 12.300 pares de bases del DNA del HVT genómico. Puede usarse junto con otros clones subgenómicos de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes para la construcción de un HVT recombinante. Este plásmido se construyó utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982, y Sambrook *et al.*, 1989), uniendo dos fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El primer fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 4176 pares de bases *Eco*RV a *Bam*HI de pBR622. El segundo fragmento es el subfragmento de aproximadamente 12.300 pares de bases del fragmento *Bam*HI nº 2 del HVT (Buckmaster *et al.*, 1988). Este fragmento se generó de la siguiente manera. El plásmido 437-26.26 se linealizó con *Hind*III y luego se recortó con el *Exo*III *Mung Bean Deletion Kit* (Stratagene). Las muestras de las reacciones de 3 y 4 minutos se reunieron y se digirieron con *Bam*HI dando como resultado una población de fragmentos que contiene el subfragmento deseado de 12300 pares de bases. Esta población se clonó en el fragmento pBR322 y los clones resultantes se escrutaron para el tamaño y mapa de restricción apropiado. Afortunadamente, el subfragmento recortado que se generó del clon 550-60.6 terminó en los nucleótidos GG los cuales generaron un segundo sitio *Bam*HI cuando se ligaron al sitio *Eco*RV (ATCC) de pBR322. Una cepa bacteriana que contiene este plásmido se ha depositado el 3 de marzo de 1993 de acuerdo con el Tratado de Budapest en el *International Depository of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure with the Patent Culture Depository of the American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, bajo el número de acceso ATCC Nº 75429.

30 *Vectores de homología 566-41.5.* El plásmido 566-41.5 se construyó con el fin de insertar los genes gA, gB y gD del MDV en el HVT. El gen gD del MDV se insertó como un fragmento *Hind*III en el vector de homología 456-17.22 en el sitio *Hind*III localizado entre gA y gB del MDV (véanse las Figuras 10A y 10B). El gen gD del MDV se insertó en la misma orientación transcripcional que los genes gA y gB en el vector de homología parental. Una descripción detallada del fragmento *Hind*III que contiene el gen gD del MDV se muestra en las Figuras 11A y 11B. Advuértase que la señal de poliadenilación de herpesvirus se añadió al casete del gen gD. El fragmento *Hind*III insertado puede construirse utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook *et al.*, 1989) uniendo los fragmentos de restricción de las siguientes fuentes con las secuencias de DNA sintético indicadas en las Figuras 11A y 11B. El fragmento 1 es un subfragmento de restricción de aproximadamente 784 pares de bases *Sma*I a *Sma*I del fragmento Q de restricción *Bam*HI del HSV-1 (McGeoch *et al.*, 1988). Advuértase que este fragmento está orientado de manera que la secuencia de poliadenilación (AATAAA) está localizado lo más cerca a la Unión B. El fragmento 2 es un sub-fragmento de aproximadamente 2177 pares de bases *Sall* a *Nco*I del fragmento de restricción genómico *Bgl*II de 4,2 KB del MDV (Ross *et al.*, 1991).

45 *Vector de homología 567-72.1D.* El plásmido 567-72.1D se construyó para los fines de insertar los genes gB, gA, y gD del MDV y los genes clavo y matriz del virus de la bronquitis infecciosa (IBV) en el HVT. Los genes del IBV están insertados en forma de un casete en el vector de homología 566-41.5 en el sitio *Not*I único localizado aguas arriba (es decir, hacia el extremo 5') del gen gD de MDV (véase la Unión C, Figura 11B). Los genes de las proteínas matriz y clavo del IBV están bajo el control de los promotores temprano inmediato del HSV-1 y gpX del PRV, respectivamente. Los genes clavo y matriz del IBV van seguidos por las señales de poliadenilación TK del HSV-1 y gX del PRV respectivamente. Los genes del IBV están insertados en la misma orientación transcripcional que el gen US2 en el vector de homología parental. El casete puede construirse utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook *et al.*, 1989), uniendo los fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El primer fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 413 pares de bases *Sall* a *Bam*HI del fragmento *Bam*HI nº 10 del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984). El segundo fragmento contiene los aminoácidos 1 a 223 del gen matriz del IBV. La región codificante se obtuvo del clon de cDNA de la cepa Arkansas del IBV. El tercer fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 754 pares de bases *Nde*I a *Sall* del fragmento de restricción *Bam*HI nº 7 del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984). El cuarto fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 1191 pares de bases *Pst*I a *Ava*II del fragmento genómico *Xba*I E del HCMV (D.R. Thomsen *et al.*, 1981). El quinto fragmento contiene los aminoácidos 4 a 1162 aminoácidos del gen clavo del IBV. La región codificante se obtuvo del clon de cDNA de la cepa Arkansas del IBV. El último fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 784 pares de bases *Sma*I a *Sma*I del fragmento de restricción Q de *Bam*HI del HSV1 (McGeoch *et al.*, 1985).

65 *Vector de homología 603-57.F1.* El plásmido 603-57.F1 se construyó con el fin de insertar el gen VP2 del IBDV en el HVT. El gen VP2 del IBDV se insertó como un casete en el vector de homología 435-47.1 en un sitio *Hind*III único. El gen VP2 está bajo el control del promotor temprano inmediato del HCMV y va seguido por la señal de poliadenilación de TK del HSV-1. El gen VP2 se insertó en la misma orientación transcripcional que el US2 en el vector de homología parental. El casete puede construirse utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook *et al.*, 1989), uniendo los fragmentos de restricción de las siguientes fuentes.

El primer fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 1191 pares de bases *Pst*I a *Ava*II del fragmento genómico de *Xba*I E del HCMV (D.R. Thomsen *et al.*, 1981). El segundo fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 1081 pares de bases *Bcl*I a *Bam*HI del clon de cDNA de longitud completa del IBDV (véase la SEQ ID NO: 1). Adviértase que el sitio *Bcl*I se introdujo en el clon de cDNA directamente aguas arriba de la metionina del iniciador VP2 convirtiendo la secuencia CGCAGC en TGATCA. Los fragmentos primero y segundo están orientados de manera que los sitios *Ava*II y *Bcl*I estén contiguos. El tercer fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 784 pares de bases *Sma*I a *Sma*I del fragmento de restricción Q de *Bam*HI de HSV-1 (McGeoch *et al.*, 1985).

Vector de homología 633-13.27. El plásmido 633-13.27 se construyó con el fin de insertar los genes gB, gA y gD del MDV y los genes HN y F del NDV en el HVT. Los genes HN y F están bajo el control de los promotores tempranos inmediatos gpX del PRV y de HCMV respectivamente. Los genes HN y F van seguidos por las señales de poliadenilación del gX del PRV y de TK del HSV-1, respectivamente. Todos los cinco genes estaban insertados en la misma orientación transcripcional que el gen US2 en el vector de homología parental. Los genes estaban insertados en el siguiente orden: gen gA del MDV, gen HN del NDV, gen F del NDV, gen gD del MDV y gen gB del MDV.

Vector de homología 634-29.16. El plásmido 634-29.16 se construyó con el fin de insertar los genes gB y gD del ILTV en el HVT. El gen marcador *lacZ* va seguido por los genes gB y gD del ILTV insertados como un casete en el vector de homología 172-29.31 en el sitio *Xho*I único. El casete se construyó utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Maniatis *et al.*, 1982 y Sambrook *et al.*, 1989), uniendo los fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El primer fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 4229 pares de bases *Sal*I a *Sal*I derivado del gen marcador *lacZ* antes descrito y mostrado en las Figuras 7A y 7B. El segundo fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 2060 pares de bases *Eco*RI a *Bcl*I del fragmento de restricción genómico n° 8 de *Kpn*I de ILTV (10,6 KB). El tercer fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 754 pares de bases *Nde*I a *Sal*I del fragmento de restricción *Bam*HI n° 7 del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984). Adviértase que los fragmentos segundo y tercero están orientados de manera que los sitios *Bcl*I a *Nde*I estén contiguos. El cuarto fragmento es el fragmento *Eco*RI genómico de 3,0 KB del ILTV que contiene el gen gB. Todos los tres genes están en la misma orientación transcripcional que el gen UL43.

Clon subgenómico 415-09.BA1. El cósmido 415-09.BA1 se construyó con el fin de regenerar HVT recombinantes. Contiene un fragmento *Bam*HI n° 1 de aproximadamente 29.500 pares de bases de DNA del HVT genómico. Este se usó junto con otros clones subgenómicos de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes para la construcción de HVT recombinantes. Este cósmido se construyó uniendo dos fragmentos de restricción (Sambrook *et al.*, 1989) de las siguientes fuentes. El vector es un fragmento de restricción de aproximadamente 4430 pares de bases *Bam*HI a *Bam*HI de pSY1005 derivado de pHC79. (Bethesda Research Laboratories, Inc.) y pWE15 (Stratagene, Inc.). El primer fragmento es el fragmento *Bam*HI n° 1 de aproximadamente 29.500 pares de bases del genoma del HVT (Buckmaster *et al.*, 1988).

Clon subgenómico 672-01.A40. El cósmido 672-01.A40 se construyó con el fin de generar HVT recombinantes. Este se aisló como un subclon del cósmido 407-32.1C1 (véanse la Figuras 8 y 15). El cósmido 672-01.A40 contiene un subfragmento de aproximadamente 14.000 pares de bases *Not*I a *Asc*I y aproximadamente un subfragmento de aproximadamente 1300 pares de bases *Asc*I a *Bam*HI del cósmido 407-32.1C1. El cósmido se construyó uniendo los fragmentos de restricción (Sambrook *et al.*, 1989) de las siguientes fuentes. El vector es un fragmento de aproximadamente 2700 pares de bases *Not*I a *Bam*HI construido a partir de pNEB193 (New England Biolabs, Inc.) el cual contiene el enlazador *Not*I insertado en el sitio *Sma*I. El fragmento I es una región de aproximadamente 15.300 pares de bases del DNA del HVT genómico. Esta región incluye los fragmentos *Bam*HI 11 y 7, y aproximadamente 1250 pares de bases del fragmento 13. Se usó junto con otros clones subgenómicos de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes para la construcción del HVT recombinantes.

Clon subgenómico 654-45.1. El plásmido 654-45.1 se construyó con el fin de generar HVT recombinantes. Se aisló como un subclon *Asc*I del cósmido 407-32.1C1 (véanse las Figuras 8 y 15). El cósmido se construyó uniendo los fragmentos de restricción (Sambrook *et al.*, 1989) de las siguientes fuentes. El vector es un fragmento *Asc*I de aproximadamente 2.000 pares de bases construido a partir de un fragmento *Aat*II a *Pvu*II de 2.000 pares de bases de pNEB 193 (New England Biolabs, Inc.) con los extremos hechos romos con DNA-polimerasa de Klenow y enlazadores *Asc*I insertados. El fragmento 1 es un fragmento de aproximadamente 8.600 pares de bases *Asc*I a *Asc*I de DNA del HVT genómico. Esta región incluye los fragmentos 10 y 21 de *Bam*HI y aproximadamente 1.100 pares de bases del fragmento n° 6 y aproximadamente 1.300 pares de bases del fragmento 7. El sitio *Xho*I (nucleótidos n° 1339-1344; SEQ ID NO: 48) se ha convertido en un sitio *Pac*I único usando enlazadores de DNA sintéticos. El sitio *Pac*I se usó en la inserción y expresión de genes extraños en HVT. (Véase la Figura 13A). Se usó junto con otros clones subgenómicos de acuerdo con el Método para la generación de herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes para la construcción del HVT recombinante.

Clon subgenómico 686-63.A1. El plásmido 686-63.A1 se construyó con el fin de generar HVT recombinante. Se aisló como un subclon *Asc*I del cósmido 407-32.1C1 (véanse las Figuras 8 y 15). El cósmido se construyó uniendo los fragmentos de restricción (Sambrook *et al.*, 1989) de las siguientes fuentes. El vector es un fragmento de aproximadamente 2.000 pares de bases *Asc*I construido del fragmento *Aat*II a *Pvu*II de 2000 pares de bases de pNEB193 (New England Biolabs, Inc) hecho de extremos romos con los enlazadores DNA-polimerasa de Klenow y *Asc*I insertados. El fragmento 1 es un fragmento de aproximadamente 8.600 pares de bases *Asc*I a *Asc*I del DNA del HVT genómico. Esta

ES 2 278 382 T3

región incluye los fragmentos *Bam*HI 10 y 21 y aproximadamente 1.100 pares del fragmento 6 y aproximadamente 1.300 pares de bases del fragmento 7. El sitio *Xho*I (Nucleótidos nº 1339-1344; SEQ ID NO: 48) se ha convertido en un sitio *Not*I único usando enlazadores de DNA sintético. El sitio *Not*I se usó para la inserción y expresión de genes extraños en el HVT (véase la Figura 13B). Se usó junto con otros clones subgenómicos de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes para la construcción del HVT recombinantes.

Clon subgenómico 672-07.C40. El cósmido 672-07.C40 se construyó con el fin de generar HVT recombinante. Se aisló como un subclon del cósmido 407-32.1C1 (véanse las Figuras 8 y 15). El cósmido 672-07.C40 contiene un subfragmento *Bam*HI a *Asc*I de aproximadamente 1.100 pares de bases y un subfragmento *Asc*I a *Not*I de aproximadamente 13.000 pares de bases del cósmido 407-32.11. El cósmido se construyó uniendo los fragmentos de restricción (Sambrook *et al.*, 1989) de las siguientes fuentes. El vector es un fragmento *Not*I a *Bam*HI de aproximadamente 2700 pares de bases construido a partir de pNEB193 (New England Biolabs, Inc.) que contenía un enlazador *Not*I insertado en el sitio *Sma*I. El fragmento 1 es una región de aproximadamente 14.100 pares de bases de DNA del HVT genómico. Esta región incluye los fragmentos *Bam*HI nº 6 y 18 y un fragmento *Bam*HI a *Not*I de aproximadamente 2.600 pares de bases en el fragmento *Bam*HI nº 1. Se usó junto con otros clones subgenómicos de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes para la construcción del HVT recombinante.

Clon subgenómico 706-57.A3. El plásmido 706-57.A3 se construyó con el fin de generar HVT recombinante. El plásmido 706-57.A3 contenía el gen VP2 de IBDV insertado en el sitio *Pac*I del plásmido 654-45.1. El gen VP2 del IBDV usó el promotor VP8 del IBRV y la señal de poliadenilación US3 del ILTV. El cósmido se construyó utilizando técnicas estándares de DNA recombinante Sambrook *et al.*, 1989). El primer fragmento es un fragmento de 208 pares de bases *Hind*III a *Bam*HI codificado para el promotor VP8 del IBRV (Carpenter *et al.*, 1991). El segundo fragmento es un fragmento de aproximadamente 1626 pares de bases que codifica el gen VP2 del IBDV derivado por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (Sambrook *et al.*, 1989) de RNA genómico (USDA) de la cepa de inoculación estándar del IBDV (Kibenge *et al.*, 1990). El cebador antisentido usado para la transcripción inversa y el PCR fue 5'-CTGGTTCGGCCCATGATCAGATGACAAACCTGCAAGATC-3' (SEQ ID NO: 53). El cebador con sentido usado para PCR fue 5'-CTGGTTCGGCCCATGATCAGATGACAAACCTGCAAGATC-3' (SEQ ID NO: 54). El fragmento de DNA generado mediante PCR se clonó en el vector PCR-Direct® (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, California). El fragmento VP2 del IBDV se subclonó después a continuación para el promotor VP8 usando los sitios *Bcl*I generados por los cebadores de PCR. La secuencia de DNA en esta unión añade los aminoácidos metionina, aspartato y glutamina antes de la metionina iniciadora natural de VP2. El fragmento de DNA contiene la secuencia codificadora del aminoácido 1 hasta el aminoácido 536 de la poliproteína del IBDV (SEQ ID NO: 2) la cual incluye la secuencia de codificación completa de la proteína VP2. El tercer fragmento es un fragmento de aproximadamente 494 pares de bases que codifica la señal de poliadenilación US3 del ILTV.

Clon subgenómico 711-92.1A. El plásmido 711-92.1A se construyó con el fin de generar HVT recombinantes. El plásmido 711-92.1A contiene los genes gD y gI del ILTV insertados en el sitio *Pac*I del plásmido 654-45.1. Los genes gD y gI del ILTV usan sus promotores del ILTV endógenos respectivos y la señal de poliadenilación endógena compartida única. El plásmido se construyó utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Sambrook *et al.*, 1989). El primer fragmento es un subfragmento de restricción *Sal*I a *Hind*III de aproximadamente 3556 pares de bases del fragmento nº 8 genómico Asp 718I (10,6 kb).

Clon subgenómico 717-38.12. El plásmido 717-38.12 se construyó con el fin de generar HVT recombinantes. El plásmido 717-38.12 contiene los genes HN y F del NDV insertados en el sitio *Pac*I del plásmido 654-45.1. El gen HN del NDV usa el promotor temprano inmediato del HCMV y la señal de poliadenilación de gX del PRV. El gen F del NDV usa el promotor temprano inmediato del HCMV y la señal de poliadenilación TK de HSV. El plásmido se construyó utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Sambrook *et al.*, 1989). El primer fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 413 pares de bases *Sal*I a *Bam*HI del fragmento *Bam*HI nº 10 del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984). El segundo fragmento es un fragmento de restricción *Ava*II a *Nde*I de aproximadamente 1.811 pares de bases del clon de cDNA del gen HN del NDV (cepa B1). El tercer fragmento es un subfragmento de restricción *Nde*I a *Sal*I de aproximadamente 754 pares de bases del fragmento de restricción nº 7 de *Bam*HI del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984). El cuarto fragmento es un subfragmento de restricción *Pst*I a *Ava*II de aproximadamente 1191 pares de bases del fragmento *Xba*I E genómico del HCMV (D.R. Thomsen *et al.*, 1981). El quinto fragmento es un fragmento de restricción *Bam*HI a *Pst*I de aproximadamente 1.812 pares de bases del clon de cDNA del gen F del NDV de longitud completa (cepa B1; SEQ ID NO: 12). El sexto fragmento es un subfragmento de restricción *Sma*I a *Sma*I de aproximadamente 784 pares de bases del fragmento de restricción Q de *Bam*HI del HSV-1 (McGeoch *et al.*, 1985).

Clon subgenómico 721-38.1J. El cósmido 721-38.1J se construyó con el fin de insertar los genes gA, gD, y gB del MDV en la región corta única del HVT y con el fin de generar HVT recombinante. El cósmido 721-38.1J contenía los genes gA, gD, y gB del MDV insertados en el sitio *Stu*I en el gen US2 del HVT convertido en un sitio *Hind*III único dentro del fragmento *Bam*HI nº 1 de la región corta única del HVT. Esta región del fragmento *Bam*HI nº 1 del HVT que contiene los genes del MDV se obtuvo de S-HVT-062. El cósmido 721-38.1J se construyó mediante una restricción parcial digerida con *Bam*HI de DNA de S-HVT-062 y aislamiento de un fragmento de aproximadamente 39.300 pares de bases. El cósmido se construyó utilizando técnicas de estándares de DNA recombinante (Sambrook *et al.*, 1989), uniendo fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El vector es un fragmento *Bam*HI de aproximadamente

8.200 pares de bases del vector cósmido pWE15. El primer fragmento es un fragmento *Bam*HI de aproximadamente 900 pares de bases de la región de repetición del genoma del HVT. El segundo fragmento es un subfragmento *Bam*HI a *Stu*I de aproximadamente 15.500 pares de bases del *Bam*HI nº 1 del HVT. El tercer fragmento es un casete de aproximadamente 8.400 pares de bases que contiene los genes gA, gD y gB del MDV (véanse las Figuras 10 y 11). El cuarto fragmento es un subfragmento *Hind*III a *Bam*HI de aproximadamente 14.500 pares de bases de *Bam*HI nº 1 del HVT.

Clon subgenómico 722-60.E2. El cósmido 722-60.E2 se construyó con el fin de insertar los genes gA, gD y gB del MDV y los genes HN y F del NDV en la región corta única del HVT y con el fin de generar HVT recombinantes. El cósmido 722-60.E2 contiene los genes gA, gD y gB del MDV y los genes HN y F del NDV insertados en el sitio *Stu*I en el gen US2 del HVT convertido en un sitio *Hind*III dentro del fragmento *Bam*HI nº 1 de la región corta única del HVT. Todos los cinco genes están insertados en la misma orientación transcripcional que el gen US2 del HVT. Esta región del fragmento *Bam*HI nº 1 del HVT que contiene los genes del MDV y NDV se derivó de S-HVT-106. El cósmido 722-60.E2 se construyó mediante una restricción parcial digerida con *Bam*HI de S-HVT-106 y el aislamiento de un fragmento de aproximadamente 46.300 pares de bases. El cósmido se construyó utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Sambrook *et al.*, 1989) uniendo los fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El vector es un fragmento *Bam*HI de aproximadamente 6100 pares de bases del vector cósmido pSY1626 derivado de pH79 (Bethesda Research Labs, Inc.) y pWE15 (Stratagene, Inc.). El primer fragmento es un fragmento *Bam*HI de aproximadamente 900 pares de bases de la región de repetición del genoma del HVT. El segundo fragmento es un subfragmento *Bam*HI nº 1 de aproximadamente 15.500 pares de bases *Bam*HI a *Stu*I del HVT. El tercer fragmento es un casete de aproximadamente 15.400 pares de bases que contiene el gen gA del MDV (Figuras 10A y 10B, SEQ ID NO: 8), el promotor gX del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984). El gen HN del NDV (SEQ ID NO: 10), el sitio de poliadenilación gX del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984), el promotor temprano inmediato del HCMV (D.R. Thomsen *et al.*, 1981), el gen F del NDV (SEQ ID NO: 12), el sitio de poliadenilación de TK del HSV (McGeoch *et al.*, 1985), el gen gD del MDV (Figuras 11A y 11B), el sitio de poliadenilación US3 del ILTV de aproximadamente 450 pares de bases y el gen gB del MDV (Figuras 10A y 10B). El cuarto fragmento es un subfragmento *Stu*I a *Bam*HI de aproximadamente 14.500 pares de bases del *Bam*HI nº 1 del HVT.

Clon subgenómico 729-37.1. El plásmido 729-37.1 se construyó con el fin de generar HVT recombinante. El plásmido 729-37.1 contiene los genes gD y gB del ILTV insertados en el sitio *Nor*I del plásmido 686-63.A1. Los genes gD y gB del ILTV usan sus promotores del ILTV endógenos respectivos y los genes gD y gB del ILTV van cada uno seguido por unas señales de poliadenilación gX del PRV. El casete de genes gD y gB del ILTV se construyó utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Sambrook *et al.*, 1989). El primer fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 2.052 pares de bases *Sal*I a *Xba*I del fragmento nº 8 del ILTV Asp 7181 genómico (10,6 KB). El segundo fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 572 pares de bases *Xba*I a Asp 7181 del fragmento de restricción *Bam*HI nº 7 del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984). El tercer fragmento es un fragmento de restricción de restricción *Eco*RI a *Eco*RI de aproximadamente 3059 pares de bases de DNA genómico del ILTV. El cuarto fragmento es un subfragmento de restricción *Eco*RI a *Sal*I de aproximadamente 222 pares de bases del fragmento de restricción *Bam*HI nº 7 del PRV (Lomniczi *et al.*, 1984).

Clon subgenómico 739-27.16. El cósmido 739-27.16 se construyó con el fin de construir un virus HVT/MDV aquimérico que contiene genes del HVT de la región larga única y genes del MDV de tipo 1 de la región corta única. El cósmido 739-27-16 contiene la región corta única completa del MDV tipo 1. Esta región contiene el fragmento completo *Sma*I B y dos fragmentos *Sma*I K. El cósmido 739-27.16 se construyó mediante una restricción parcial digerida con *Sma*I de DNA del MDV y el aislamiento de un fragmento de aproximadamente 29.000 a 33.000 pares de bases. El cósmido se construyó utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Sambrook *et al.*, 1989), uniendo los fragmentos de restricción de las siguientes fuentes. El vector es un fragmento *Bam*HI de aproximadamente 8200 pares de bases (hecho de extremos romos con DNA-polimerasa de Klenow) del vector cósmido pWE15. El primer fragmento es un fragmento *Sma*I K de aproximadamente 4.050 pares de bases de la región de repetición interna corta del genoma del MDV. El segundo fragmento es un fragmento *Sma*I B de aproximadamente 21.000 pares de bases del MDV. El tercer fragmento es un fragmento *Sma*I K de aproximadamente 3.650 pares de bases de la región de repetición terminal corta del genoma del MDV (Fukuchi *et al.*, 1984, 1985).

Clon subgenómico 751-87.A8. El plásmido 751-87.A8 se construyó con el fin de generar HVT recombinante. El plásmido 75-187.A8 contiene el gen del factor de crecimiento mielomonocítico de pollo (cGMF) insertado en el sitio *Pac*I del plásmido 654-45.1. El gen del cGMF usó el promotor temprano inmediato del HCMV y la señal de poliadenilación de TK del HSV-1. El cósmido se construyó utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Sambrook *et al.*, 1989). Se insertaron los siguientes fragmentos en el sitio *Pac*I del clon subgenómico 654-45.1 del HVT. El primer fragmento es un subfragmento de restricción *Pst*I a *Ava*II de aproximadamente 1.191 pares de bases del fragmento *Xba*I E del HCMV genómico (D.R. Thomsen *et al.*, 1981). El segundo fragmento es un fragmento de aproximadamente 640 pares de bases que codifica el gen cGMF (58) derivado por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Sambrook *et al.*, 1989) de RNA de pollos estimulado con concanavalina A. El cebador antisentido usado para la transcripción inversa y la PCR fue 5'-CGCAGGATCCGGGCGTCAGAGGCGGGCGAGGTG-3' (SEQ ID NO: 57). El cebador con sentido usado para la PCR fue 5'-GAGCGGATCCTGCAGGAGGAGACACAGAGCTG-3' (SEQ ID NO: 58). El fragmento de cGMF se subclonó después al promotor IE del HCMV usando los sitios *Bam*HI generados por los cebadores de PCR. El fragmento de DNA contenía la secuencia codificadora del aminoácido 1 hasta el aminoácido 201 de la proteína cGMF (58) que incluyó una secuencia delantera de 23 aminoácidos en el extremo amino terminal y 178 aminoácidos en la proteína cGMF madura. El tercer fragmento es un subfragmento

ES 2 278 382 T3

de restricción *Sma*I a *Sma*I de aproximadamente 784 pares de bases del fragmento de restricción *Bam*HI Q del HSV-1 (McGeoch *et al.*, 1985).

5 *Clon subgenómico 761-07.A1.* El plásmido 761-07.A1 se construyó con el fin de generar HVT recombinante. El plásmido 761-07.A1 contiene el gen de interferón de pollo insertado en el sitio *Pac*I del plásmido 654-45.1. El gen del interferón de pollo usa el promotor de HCMV temprano inmediato y la señal de poliadenilación de TK del HSV-1. El cósmido se construyó utilizando técnicas estándares de DNA recombinante (Sambrook *et al.*, 1989). Se insertaron los siguientes fragmentos en el sitio *Pac*I del clon subgenómico 654-45.1 del HVT. El primer fragmento es un subfragmento de restricción *Pst*I a *Ava*II de aproximadamente 1191 pares de bases del fragmento *Xba*I E del HCMV genómico (D.R. Thomsen *et al.*, 1981). El segundo fragmento es un fragmento de aproximadamente 577 pares de bases que codifica el gen de interferón de pollo (59) obtenido mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Sambrook *et al.*, 1989) de RNA aislado de esplenocitos de pollo estimulados con concanavalina A. El cebador antisentido usado para la transcripción inversa y la PCR fue 5'-TGTAGAGATCTGGC TAAGTGCGCGTGTTCCTG-3' (SEQ ID NO: 59). El cebador con sentido usado para la PCR fue 5'-TGACAGATCTCACCATGGCTGTGCCTGCAAGC-3' (SEQ ID NO: 60). El fragmento del gen del interferón de pollo se subclonó después al promotor IE del HCMV usando los sitios *Bg*III generados por los cebadores de la PCR. El fragmento de DNA contiene la secuencia que codifica los aminoácidos 1 al aminoácido 193 de la proteína interferón de pollo (59) que incluye una secuencia de señal de 31 aminoácidos en el extremo amino terminal y 162 aminoácidos de la proteína madura interferón de pollo. El tercer fragmento es un subfragmento de restricción *Sma*I a *Sma*I de aproximadamente 784 pares de bases del fragmento de restricción *Bam*HI Q del HSV-1 (McGeoch *et al.*, 1985).

Ejemplo 1

25 *S-HVT-001*

El S-HVT-001 es un herpesvirus de pavos (HVT) que contiene el gen de la β -galactosidasa de *E. coli* insertado en la región larga única del genoma del HVT. El mapa obtenido por enzimas de restricción del HVT ha sido publicado (T. Igarashi *et al.*, 1985). Esta información se usó como un punto de partida para diseñar la inserción de los genes extraños en el HVT. El mapa de restricción por *Bam*HI del HVT se muestra en la Figura 1A. De estos datos, se identificaron como dianas diferentes regiones del DNA de HVT en las cuales pueden hacerse las inserciones de genes extraños. El gen extraño escogido para la inserción fue el gen de la β -galactosidasa de *E. coli* (*lacZ*), que se usó en el PRV. El promotor fue un promotor gpX del PRV. El gen *lacZ* se insertó en la región larga única del HVT, específicamente en el sitio *Xho*I en el fragmento *Bam*HI n° 16 (de 3329 pb) y se mostró que se expresaba en el HVT recombinante por formación de placas azules usando el sustrato Bluogal® (Bethesda Research Laboratories). Similarmente el gen *lacZ* se había insertado en el sitio *Sal*I en la región de repetición contenida en el fragmento *Bam*HI n° 19 (de 900 pb).

40 Estos experimentos muestran que el HVT es susceptible de experimentar los procedimientos descritos en esta solicitud para la inserción y expresión de genes extraños en los herpesvirus. En particular, se han identificado dos sitios para la inserción del DNA extraño (Figuras 1B y 1C).

45 Ejemplo 2

S-HVT-003

El S-HVT-003 es un herpesvirus de pavos (HVT) que contiene el gen de la β -galactosidasa de *E. coli* y el segmento grande de la cepa S40747 de virus de la enfermedad bursal infecciosa (IBDV) (como una copia de cDNA) (SEQ ID NO: 1) insertado en la región larga única del genoma del HVT. Este DNA del IBDV contiene un marco de lectura abierto que codifica tres proteínas (5'VP2-VP4-VP3 3') (SEQ ID NO: 2), dos de las cuales son antígenos para proporcionar protección contra las infecciones del virus de la enfermedad bursal infecciosa de los pollos. La expresión de los genes tanto para β -galactosidasa como para la proteína del IBDV están bajo el control del promotor del gen gpX del virus de la pseudo-rabia (PRV). El S-HVT-003 se obtuvo mediante una recombinación de homólogos. El S-HVT-003 se depositó el 21 de julio de 1987 de acuerdo con el Tratado de Budapest en el *International Depository of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure with the Patent Culture Depository of the American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, bajo el número de acceso ATCC VR 2178.

60 Los genes DEL IBDV se clonaron por el Método de clonación de cDNA. Los clones que representan el genoma del IBDV se escrutaron mediante el procedimiento de Transferencia southern del DNA frente a manchas que contienen el RNA del IBDV auténtico. Los clones positivos se caracterizaron luego por cartografía de restricción para identificar los grupos de clones. Se identificaron dos de tales clones que se encontraron juntos y que representan la región de codificación completa del segmento grande del RNA del IBDV (RNA bicatenario de 3,3 KB). Un clon de cDNA (2-84) contenía un fragmento de aproximadamente 2500 pares de bases que representa la primera mitad del gen del IBDV. El segundo clon (2-40) contenía un fragmento de aproximadamente 2000 pares de bases que representa la mitad distal del gen del IBDV. El plásmido 2-84/2-40 que representa el gen del IBDV completo se construyó uniendo el clon 2-84

y 2-40 en un sitio *PvuII* único presente en las secuencias solapantes. El genoma del IBDV se obtuvo del plásmido de 2-84/2-40 como un fragmento *SmaI* a *HpaI* de aproximadamente 3400 pares de bases. La confirmación de la naturaleza de las proteínas codificadas por el gen del IBDV se obtuvo expresando el clon (2-84/2-40) en *E. coli* y detectando el antígeno VP3 usando el antisuero preparado contra las proteínas purificadas del IBDV en transferencias Western.

- 5 El cDNA del segmento grande del RNA del IBDV que codifica los antígenos del IBDV muestra un marco de lectura abierto que en la presente memoria en adelante será denominado el gen del IBDV. La secuencia de la cepa Australiana del IBDV se ha publicado la cual lleva la homología cercana a la secuencia de la firma solicitante (Hudson *et al.*, 1986). La comparación de las diferencias de aminoácidos entre los dos virus reveló 29 cambios de aminoácidos en la región que codifica 1012 aminoácidos. Hubo solo tres diferencias de aminoácidos deducidas para el VP4 y solo 8
10 en el VP3. En contraste el VP2 contenía 18 cambios de aminoácidos, 14 de los cuales estaban agrupados entre los aminoácidos 139 a 332.

- Para la inserción en el genoma del HVT, la región de codificación para el gen del IBDV se clonó entre el promotor gpX del PRV y la secuencia de la señal de poli-A de TK del HSV, creando el plásmido 191-23. Para ayudar en la
15 identificación de los HVT recombinantes obtenidos mediante la recombinación de homólogos que contienen el gen del IBDV, el fragmento del IBDV promovido por gpX del plásmido 191-23 se insertó detrás (en tandem a) el gen *lacZ* controlado por el promotor de gpX. El plásmido resultante, 191-47 contiene el gen *lacZ* de *E. coli* y el gen I del BDV bajo el control de los promotores gpX individuales del PRV. En la construcción del plásmido 191-47, se unieron varios fragmentos de DNA mediante técnicas de DNA recombinante usando bien sea los sitios de restricción
20 que ocurren naturalmente o bien sea el enlazador de DNA sintético. Los detalles relativos a la construcción de estos genes contenidos en el plásmido 191-47 pueden verse en las Figuras 2A, 2B, 2C, y 2D.

- El primer segmento de DNA (segmento 1, Figura 2A) contiene la región de promotor gpX que incluye los residuos que codifican los primeros siete aminoácidos del gen gpX y se derivó del subclon del fragmento *BamHI* n° 10 del PRV
25 como un fragmento *SalI* a *BamHI* de aproximadamente 800 pares de bases. El segundo segmento de DNA (Segmento 2, Figura 2A) contiene la región que codifica β -galactosidasa de *E. coli* del aminoácido 10 al aminoácido 1024 y se derivó del plásmido pJF751 (obtenido de Jim Hoch, Scripps Clinic and Research Foundation) como un fragmento *BamHI* a *BalI* de aproximadamente 3300 pares de bases seguido por un fragmento *AvaI* a *SmaI* de aproximadamente 40 pares de bases. El tercer segmento de DNA (Segmento 3, Figura 2A) contiene la secuencia de señal poli A de
30 gpX y se derivó del subclon del fragmento *BamHI* n° 7 del PRV como un fragmento de aproximadamente *NdeI* a *StuI* de 700 pares de bases. El segmento tres se unió al segmento dos mediante ligamiento del extremo *NdeI* el cual se había llenado de acuerdo con La reacción de llenado por polimerasa, al sitio *SmaI*. El cuarto segmento de DNA (Segmento 4, Figura 2A) contiene el promotor gpX (caja TATA y sitio *cap*) y se derivó del subclon del fragmento *BamHI* n° 10 del PRV como un fragmento de aproximadamente 330 pares de bases *NdeI* a *AluI*. Adicionalmente,
35 el segmento cuatro contiene aproximadamente 36 pares de bases de la secuencia delantera no traducida de TK 5' del HSV como un fragmento *PstI* a *BglIII* en el cual el sitio *PstI* se había unido al sitio *AluI* a través del uso del enlazador de DNA sintético (McKnight y Kingbury, 1982) Los segmentos DNA cuatro a seis se insertaron como una unidad en el sitio *KpnI* único del segmento tres el cual estaba localizado 3' de la secuencia de señal poli A de gpX. El quinto segmento de DNA (Segmento 5, Figura 2A) contiene la región de codificación completa del segmento
40 grande IBDV de RNA (clon de cDNA) como un fragmento de aproximadamente 3400 pares de bases *SmaI* a *HpaI*. El sitio *SmaI* del segmento cinco fue fundido al sitio *BglIII* del segmento cuatro el cual se había llenado de acuerdo con La reacción de llenado por polimerasa. La expresión del gen IBDV (5'VP2-VP4-VP3 3') está bajo el control del promotor gpX (segmento 4) el cual utiliza sus codones propios natural de inicio y de detención. El sexto segmento de DNA (Segmento 6, Figura 2a) contiene la secuencia de señal de poli-A de TK del HSV como un fragmento
45 *SmaI* a *HpaI* de aproximadamente 800 pares de bases (obtenido de Bernard Roizman, Universidad de Chicago). El sitio *HpaI* del segmento cinco se fusionó al sitio *SmaI* del segmento seis por el uso de un enlazador de DNA sintético.

- En resumen, la construcción usada para crear HVT-003 (plásmido 191-47) contiene (5' a 3') el promotor del
50 PRV, la caja TATA del gpX, el sitio *cap* del gpX, los primeros siete aminoácidos de gpX, el gen de β -galactosidasa de *E. coli* (*lacZ*), la secuencia de señal poli-A del PRV, el promotor gpX del PRV, y la caja TATA de gpX, el sitio *cap* de gpX, una fusión dentro de la secuencia delantera 5' no traducida para el gen gpX del IBDV, el codón de iniciación del IBDV, una fusión en el extremo 3' no traducido del IBDV para el extremo 3' no traducida para TK del HSV, y la secuencia de señal poli-A de TK. El casete que contiene estos genes se manipuló por ingeniería genética
55 de manera que estuviera franqueado por dos sitios de endonucleasa de restricción de *EcoRI*. Como resultado puede obtenerse un fragmento de aproximadamente 9100 pares de bases que contiene tanto el gen *lacZ* como el gen del IBDV mediante la digestión con *EcoRI*. De aquí en adelante, el fragmento *EcoRI* de 9161 pares de bases que se denominará casete IBDV/*lacZ*. Los siguientes procedimientos se usaron para construir el S-HVT003 mediante la combinación de homólogo. El casete IBDV/*lacZ* se insertó en el sitio *XhoI* único presente dentro de un subclon del
60 fragmento *BamHI* n° 16 del HVT. Para lograr esto, el sitio *XhoI* se cambió primeramente al sitio *EcoRI* por uso de un enlazador de *EcoRI*. Se había mostrado previamente que el sitio no esencial en el HVT mediante la inserción del *lacZ* (S-HVT-001). También se mostró que las regiones de homología flanqueantes en el *BamHI* n° 16 se eficaces en una recombinación de homólogos. En las Figuras 3A y 3B se muestra la ubicación genómica de los mapas del fragmento *BamHI* n° 16 en la región larga única del HVT. El fragmento *BamHI* n° 16 es de una longitud de aproximadamente 3329
65 pares de bases (SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, y 7). El DNA del HVT se preparó mediante el procedimiento de Preparación de DNA de herpesvirus. Las co-transfecciones del DNA del HVT y del plásmido de DNA en células fibroblastos de embrión de pollo (CEF) se hicieron de acuerdo con la Transfección de DNA para generar herpesvirus recombinantes. El virus recombinante resultante de la reserva (*stock*) de co-transfección se purificó mediante tres rondas sucesivas de

purificación de placas usando el procedimiento Escrutinio bluogal para herpesvirus recombinantes. Cuando 100% de las placas eran azules, el DNA se analizó respecto a la presencia del gen del IBDV por el Método de transferencia Southern DE DNA. Las transferencias Southern del DNA de S-HVT-003 digerido con *EcoRI* con la sonda traducida específica del IBDV (plásmido 2-84/240) se confirmaron por la presencia del fragmento *EcoRI* de 9100 pares de bases. Este resultado confirmó que el S-HVT-003 contenía tanto el gen *lacZ* como el gen del IBDV incorporado en su genoma. Las transferencias Southern adicionales, usando una sonda específica para el *BamHI* n° 16, confirmaron que la recombinación de homólogos ocurrió en la posición apropiada en el *BamHI* n° 16 y que no se crearon delecciones. No se observaron diferencias *in vitro* en el crecimiento del S-HVT-003 en comparación al virus tipo natural (S-HVT-000).

La expresión de las proteínas específicas del IBDV del S-HVT-003 se analizó *in vitro* usando el Método de transferencia western de DNA. Los lisados celulares se prepararon como se describió en Preparación de lisados de célula de herpesvirus. Explicado en pocas palabras consiste en lo siguiente: las proteínas contenidas en los lisados celulares de S-HVT-003 se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida, se transfirió a nitrocelulosa, y se sondó con bien sea un antisuero producido contra las proteínas de la cápsida del IBDV desnaturalizadas o bien sea un antisuero producido contra un péptido sintético correspondiente a una región dominante inmunoprecipitada de la proteína cápsida (VP2) del IBDV de 40 KD. Los filtros se lavaron y trataron con proteína A marcada con [¹²⁵I] para detectar la posición de los anticuerpos unidos.

La Figura 4 muestra los resultados obtenidos usando el antisuero preparado contra las proteínas de la cápsida del IBDV purificadas desnaturalizadas, las cuales han demostrado los solicitantes que reaccionan principalmente con VP3 (proteína de 32 kd). Como se ve, el S-HVT-003 produce una proteína la cual es inmunológicamente indistinguible de la proteína VP3 auténtica de los viriones de IBDV intactos. Además, la poliproteína parece ser procesada correctamente, produciendo la especie VP3 que co-emigra con la proteína VP3 auténtica. La evidencia reciente usando la cepa de IBDV Australiana indica que la VP4 está implicada en el procesamiento de la poliproteína del precursor de las especies de proteína VP2 y VP3 maduras (Jagadish *et al.*, 1988). La Figura 5 muestra los resultados obtenidos usando un antisuero de conejo producido contra un péptido sintético que es homólogo a una región de 14 aminoácidos de la proteína VP2 (40 kd) de la cápsida del IBDV. Como se ve, el S-HVT-003 produce una proteína que es inmunológicamente indistinguible de la proteína VP2 viral auténtica. Además, la proteína VP2 producida del SHVT-003 co-emigra con las especies de 40 KD del VP2 aislado de los viriones del IBDV intactos. Esta especie representa un componente principal de las partículas virales infecciosas (completas).

En resumen, el análisis de la expresión de las proteínas específicas del IBDV de S-HVT-003 ha mostrado que la poliproteína es procesada en el cultivo de células CEF, produciendo proteínas del tamaño apropiado para reaccionar con los agentes inmunológicos específicos para las proteínas bien sea VP2 o bien sea VP3 en las transferencias Western.

El siguiente conjunto de experimentos se llevó a cabo en pollos para analizar la expresión *in vivo* de los genes del IBDV contenidos en el S-HVT-003 como se determinó mediante los datos de seroconversión, los resultados de neutralización de suero, y protección frente a la inoculación con IBDV.

El primer experimento se diseñó para mostrar la seroconversión de pollos para el IBDV al ser vacunados con S-HVT-003. Once pollos de once semanas de edad, seronegativos al HVT y al IBDV se obtuvieron de SPAFAS Inc. Se vacunaron seis aves subcutáneamente en la región abdominal con 0,5 ml de una suspensión celular de células de CEF que contenía el S-HVT-003 (40.000 UFP/ml). Las muestras de suero se obtuvieron cada siete días durante ocho semanas para todas las aves en este estudio. En el día 28 (cuarta semana), tres de estas aves recibieron un inóculo de recuerdo de S-HVT-003, mientras que las otras 3 aves recibieron 0,5 ml de una vacuna del IBDV inactivada inoculada subcutáneamente en la región cervical. A tres aves adicionales se les administró solo la vacuna inactivada el día 28. Dos aves sirvieron como controles de contacto y no recibieron vacunación. En el día 56, todas las aves se sacrificaron y se les hizo la autopsia. La Tabla 1 muestra los resultados del ensayo de neutralización de suero contra el IBDV. No se observó ninguna actividad de SN detectable en las aves a las que se les administró solo S-HVT-003. Adicionalmente, solo una de las tres aves a las que se les administró solo la vacuna inactivada demostró una actividad de SN baja pero detectable. Los títulos de SN también se detectaron en una de las tres aves que recibió el S-HVT-003 seguido por el inóculo de recuerdo de vacuna de IBDV inactivado; estos títulos tenían un valor mucho más alto que con la vacuna de IBDV inactivada sola. Estos resultados sugieren que el S-HVT-003 está cebando al pollo para una respuesta secundaria contra el IBDV. El análisis *in vitro* de las muestras de suero por TRANSFERENCIA WESTERN confirmó la seroconversión de los pollos para el IBDV con la vacunación con el S-HVT-003 tanto antes como después de los inóculos de recuerdo administrados el día 28.

TABLA 1

Grupo de vacuna	Ave nº	DÍA				
		28 - 31	35	38	42	49
HVT-003	265	<2	<2	<2	<2	<2
HVT-003	266	<2	<2	<2	<2	<2
	267	<2	<2	<2	<2	<2
HVT-003	260	<2	<2	<2	<2	<2
IBDV	264	<2	<2	1:64	1:256	1:512
	269	<2	<2	<2	<2	<2
C	261	<2	<2	<2	<2	<2
IBDV	262	<2	<2	<2	1:4	1:4
	263	<2	<2	<2	<2	<2
C	270	<2	<2	<2	<2	<2
	271	<2	<2	<2	<2	<2
A Comercial						

En el segundo experimento, veinticinco pollitos SPF de 1 día se vacunaron con el S-HVT-003 (20 con 0,2 ml subcutáneamente, y 5 con gotas bilaterales para ojos). Veinte pollos se mantuvieron como controles. En los días 4 y 7 de la post-infección, dos aves de control y 5 aves vacunadas se sangraron, se sacrificaron y sus bazos se extirparon para aislamiento del virus. Las suspensiones de esplenocitos (células del bazo) se hicieron mediante el método estándar, y las células $\sim 1 \times 10^6$ en 3 ml del medio de cultivo de fibroblasto de embrión de pollo (CEF) se inocularon directamente sobre células secundarias. Los cultivos se incubaron durante 6-7 días y luego se calificaron respecto a los efectos citopáticos (CPE) como se determinó observando la morfología de las células. Los cultivos se sometieron a pase una segunda vez y de nuevo se calificaron para el CPE. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Todas las aves de control no vacunadas permanecieron negativas para el HVT respecto a los aislamientos de esplenocitos tanto para el día 4 como para el día 7. Cuatro de cinco aves vacunadas con el S-HVT-003 fueron positivas para el HVT el cuarto día tanto para los pases primero como segundo. Un ave no produjo virus, esto puede representar un fallo de la vacunación. Cinco de cinco aves fueron positivas para el HVT el día séptimo en ambos pases 1 y 2. Globalmente, el experimento de recuperación de vector demuestra que el S-HVT-003 se replica, así como el virus HVT de tipo natural *in vivo* y que la inserción del casete IBDV/*lacZ* en el sitio *XhoI* de *BamHI* nº 16 no da como resultado una atenuación detectable del virus. Los experimentos subsecuentes que examinan el virus recuperado del Escrutinio bluogal para herpesvirus recombinantes confirmaron que la estabilidad *in vivo* del S-HVT-003, demostrando la expresión β -galactosidasa en 100% de los virus.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 278 382 T3

TABLA 2

Fecha de la cosecha				
	Día 4		Día 7	
Muestra	P1	P2	P1	P2
Nº1	-	-		
Nº 2	-	-		
Nº 3			-	-
Nº 4			-	-
T 1	-	-		
T 2	2 +	2 +		
T 3	2 +	2 +		
T 4	+	4+		
T 5	3 +	3 +		
T 6			2 + contaminados	
T 7			+	5 +
T 8			+	5 +
T 8			+	5 +
T 9			+	5 +
T 10			+	5 +
N= control, T = vacunado				
CPE varió de negativo (-) a 5+				

En los días 0, 4, 7, 14, 21 y 27 después de la infección, se obtuvieron muestras de sangre del resto de los pollos para determinar los títulos de ELISA en suero contra de antígenos del BDV y HVT, así como respecto a ensayos neutralizantes del virus contra el IBDV. Adicionalmente, 21 días después de la post-infección cinco pollos de control y 14 pollos vacunados se inoculaban con el IBDV virulento mediante una gota bilateral para ojos ($10^{3.8}$ DIH₅₀) (DIH₅₀ = dosis que infecta e 50% de los huevos). Todas las aves se sacrificaron seis días después de la inoculación y se calcularon las relaciones peso de bolsa aviar/peso corporal. Un resumen de los resultados se muestra en las Tablas 3 y 4, respectivamente. Como se presenta en la Tabla 3, no se detectaron anticuerpos contra los antígenos del HVT por ELISA antes de los días 21-27 después de la vacunación. En los pollos, la respuesta inmune durante las primeras dos semanas después de la puesta es tanto inmadura como suprimida parentalmente y, por tanto, estos resultados no son totalmente inesperados. En contraste, los ensayos ELISA del IBDV eran negativos hasta 21 días después de la vacunación, y fueron solo detectables después de la inoculación el día 27. Los niveles de ELISA vistos el día 27 después de la vacunación indican una respuesta primaria al IBDV. La Tabla 4 que compara las relaciones aves se sacrificaron seis días después de la inoculación y se calcularon las relaciones peso de bolsa aviar/peso corporal para los controles inoculados y los grupos vacunados/inoculados no mostró diferencias significativas. La vacunación con S-HVT-003 bajo estas condiciones no evitó la infección de las aves vacunadas mediante la inoculación del IBDV como se indicó por la muerte de cuatro aves vacunadas después de la inoculación.

Tabla 3				
Grupo de muestra		ELISA VN		
		HVT	IBDV	IBDV
C-0	(n = 3)	0	0	<100
C-4	(n = 2)	0	0	n.d.
T-4	(n = 5)	0	0	n.d.
C-7	(n = 2)	0	0	<100
T-7	(n = 5)	0	0	<100
C-14	(n = 5)	0	0	n.d.
T-14	(n = 14)	0	0	<100
C-21	(n = 5)	0	0	n.d.
T-21	(n = 14)	1	0	<100
C-27	(n = 5)	0	0	n.d.
CC-27	(n = 5)	0	5	n.d.
CT-27	(n = 10)	3,2	2	n.d.
C = control T= vacunados CC = control de inoculados CT = inoculados y vacunados				

Los títulos de ELISA son valores de la media geométrica (abreviadamente en lo sucesivo GMT por la expresión inglesa *Geometric Mean Titer*) y varían de 0-9.

TABLA 4			
Grupo de muestra	Peso corporal	Peso bursal	BBR
Control (n=5)	258,8	1,5088	0,0058
Inoculado	209	0,6502	0.0031
Control (n=5)			
Inoculado	215,5	0,5944	0,027
Tratado (n=10)			

Los valores son valores medios. Los pesos corporales son diferentes en el grupo de control debido a que las aves inoculadas no se alimentaron bien. Murieron cuatro aves tratadas e inoculadas.

Se llevó a cabo un tercer experimento repitiendo el experimento 2 pero usando pollos inmunológicamente sensibles (3 semanas de edad). Seis pollos de tres semanas se vacunaron intraperitonealmente con 0,2 ml de S-HVT-003 (una gota en cada ojo). Las muestras de suero se obtuvieron cada siete días durante seis semanas y las aves se inocularon con el virus IBDV de inóculo estándar USDA virulento en el día 43 después de la vacunación. Seis días después de la inoculación, los grupos de control, vacunado-inoculado, e inoculado se sacrificaron y las bolsas se recogieron para sondear con anticuerpos monoclonales (MAB) anti-IBDV (proporcionados por el Dr. David Snyder, del Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine). Los homogeneizados bursales se prepararon mezclando 1 mL de NP40 al 0,5% con una bolsa aviar. Las bolsas aviares se molieron luego y se trataron con ultrasonidos brevemente. Los líquidos sobrenadantes de los homogeneizados se hicieron reaccionar con el MAB R63 que se había fijado a las placas de Petri ELISA de 96 pocillos a través de una unión por proteína A. Después de la incubación se añadió una preparación marcada con biotina del MAB R63se. Después del lavado se añadió un conjugado de avidina-peroxidasa de rábano silvestre y se incubaron. Los ensayos se desarrollaron con tampón Tris-maleato (TMB) + sustrato H₂O₂. Los resultados de los ensayos se recogen en la Tabla 5. Los datos muestran la presencia de niveles altos de antígeno de IBDV en toda la bolsa aviar en el grupo vacunado/inoculado y en el grupo inoculado. No se detectó un antígeno IBDV en los controles. El antígeno específico de IBDV no pudo ser detectado en las diluciones de más de 1/1000, y no parece haber diferencias entre los grupos vacunados y no vacunados inoculados. Los títulos de HVT como se determinaron mediante ELISA fueron primeramente detectables en el día 7 en cuatro de seis aves vacunadas. En el día 14, seis de seis aves vacunadas mostraron títulos de HVT. Todas las seis aves continuaron mostrando títulos de HVT a través del experimento. No se apreciaron título de IBDV antes de la inoculación. En contraste, el análisis de estas mismas muestras de suero por el procedimiento de transferencia Western demostró la seroconversión de los pollos vacunados

con S-HVT-003 a IBDV antes de la administración del inóculo de virus. El nivel de respuesta, sin embargo, sigue siendo pequeño por la inoculación. La comparación entre los grupos vacunados/inoculados e inoculados solamente demuestra claramente el nivel de reacción mediante las transferencias Western que es mucho mayor en el grupo vacunado/inoculado. Estos resultados muestran que el S-HVT-003 está seroconvertido en aves vacunadas con IBDV, y sugiere que el nivel de expresión específica del IBDV no es suficientemente alto para inducir una respuesta de neutralización en las aves.

El S-HVT-003 muestra el mérito del método de vacunación que los solicitantes han inventado. El HVT se ha diseñado para expresar simultáneamente los antígenos extraños (de β -galactosidasa y los antígenos de IBDV) que son reconocidos por el hospedante por una respuesta inmune dirigida a estas proteínas.

TABLA 5								
Serología: Título por ELISA de herpes/ IBDV								
Fecha de sangrado								
Ave nº	11/1	11/10	11/14	11/24	12/1	12/8	12/15	12/22
Vacunadas e inoculadas								
221	0/0	7/0	5/0	6/0	5/0	5/0	5/0	3/3
41	0/0	4/0	4/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/3
42	0/0	3/0	2/0	1/0	5/0	5/0	5/0	3/2
43	0/0	0/0	5/0	5/0	5/0	5/0	3/0	3/2
44	0/0	1/0	5/0	1/0	2/0	1/0	1/0	2/4
45	0/0	0/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/3
Control								
28	0/0							0/0
38	0/0							0/0
73	0/0							0/0
75	0/0							0/0
Inoculadas solamente								
40	0/0							0/3
74	0/0							0/5
39	0/0							0/3
72	0/0							0/3
El nivel máximo del título es 9								

Ejemplo 3

S-HVT-004

El S-HVT-004 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene el gen de la glicoproteína (gA) del virus de enfermedad de Marek (MDV) insertado en la región única larga, y el gen de β -galactosidasa *lacZ* de *E. coli* también insertado en la región única larga. Es más probable que el antígeno del MDV desencadene la respuesta antigénica adecuada que el antígeno equivalente del HVT.

El gen gA del MDV (SEQ ID NO: 8 y 9) se clonó mediante procedimientos estándares de clonación del gen gA de DNA. Se ha descrito un fragmento de restricción *EcoRI* que contiene el gen gA del MDV (Isfort *et al.*, 1984) y este fragmento se identificó por tamaños en los clones de DNA. La región del DNA descrita que contiene el gen gA se secuenció por los solicitantes y se encontró que como se esperaba contenía un gen de glicoproteína. El DNA de este gen se usó para encontrar el gen correspondiente en el HVT por el Método de transferencia de southern de DNA, y en el HVT se identificó un gen que contenía una secuencia muy similar. Este gen es el mismo gen previamente llamado gA (Isfort *et al.*, 1984).

Para la inserción en el genoma del HVT, el gen gA del MDV se usó intacto debido a que tendría ya buenas secuencias de señal de herpesvirus. El gen *lacZ* se insertó en el fragmento *XhoI* en el fragmento *BamHI* nº 16, y el gen gA del MDV se insertó detrás del *lacZ* como se muestra en las Figuras 6A y 6B. Las regiones flanqueantes en el *BamHI* nº 16 se usaron para la recombinación de homólogos. El DNA del HVT y el DNA plasmídico se co-transfectaron de acuerdo con el Método de transfección de DNA para generar herpesvirus recombinantes en células fibroblastos primarios de embrión de pollo (CEF). El virus de la reserva (stock) de transfección se purificó mediante purificaciones sucesivas de placas usando el Método de escrutinio bluogal para herpesvirus recombinantes. Al final de este procedimiento cuando 100% de las placas eran azules, el DNA se analizó respecto a la presencia del gen gA

del MDV. El S-HVT-004 es un virus recombinante que contiene tanto el gen de β -galactosidasa y el gen gA del MDV incorporados en su genoma.

La Figura 6C muestra la estructura de S-HV0-004.

Ejemplo 4

Virus de la enfermedad de Newcastle

El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) está estrechamente relacionado con PI-3 en la estructura global. Los genes de hemaglutinina (HN) y los genes de fusión (F) de PI-3 se manipularon por ingeniería genética para la expresión en el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (abreviadamente en lo sucesivo IBR por la expresión inglesa *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (ref)). Similarmente los genes de hemaglutinina (HN) y de fusión (F) se clonaron en el NDV para usarse en el sistema de administración de herpesvirus (herpesvirus de pavos, HVT).

El método que se utilizó para la construcción de las secuencias de control de herpesvirus se ha aplicado al NDV.

Virus de la bronquitis infecciosa

El virus de la bronquitis infecciosa (IBV) es un virus de pollos relacionado estrechamente con la estructura global del virus de la gastroenteritis transmisible (abreviadamente en lo sucesivo TGE por la expresión inglesa *Transmissible GastroEnteritis*). El antígeno neutralizante principal del virus de la TGE se manipuló por ingeniería genética para la expresión en el PRV (ref). Similarmente los antígenos neutralizantes principales se clonaron a partir de tres cepas del IBV: Massachusetts (SEQ ID NO: 14 y 15), Connecticut (SEQ ID NO: 18 y 18) y Arkansas-99 (SEQ ID NO: 16 y 17) para usarse en el sistema de administración de herpesvirus (HVT).

Los procedimientos que se utilizaron para la construcción de las secuencias de control de herpesvirus para la expresión se han aplicado al IBV.

Ejemplo 5

S-HVT-045

S-HVT-045 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene el gen (gB) de la glicoproteína gB del virus de la enfermedad de Marek (MDV) insertado en una región única corta. Es más probable que el antígeno del MDV desencadene la respuesta antigénica apropiada que el antígeno equivalente del HVT. El S-HVT-045 ha sido depositado el 15 de octubre de 1992 de acuerdo con el Tratado de Budapest en el *International Depository of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure with the Patent Culture Depository of the American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA bajo el número de acceso ATTC VR. 2383.

El gen gB del MDV se clonó por técnicas estándares de DNA recombinantes. El gen del MDV se localizó a 3,9 KB del fragmento *EcoRI-SalI* usando una sonda oligonucleotídica basada en la secuencia gB del HSV en una región que se encontró conservada entre los genes gB conocidos de herpesvirus. El mapa de restricción del fragmento de restricción *EcoRI-SalI* de 3,9 KB es similar al mapa publicado (Ross *et al.*, 1989).

Para la inserción en el genoma del HVT, el gen gB del MDV se usó intacto porque ya tendría buenas secuencias de señas de herpesvirus. El gen gB del MDV gB se insertó en un fragmento *BamHI-EcoRI* de 17,15 KB derivado del fragmento *BamHI* n° 1 del HVT. El sitio usado para la inserción fue el sitio *StuI* en el gen US2 del HVT, previamente utilizado para la construcción del S-HVT-012. El sitio se alteró inicialmente mediante la inserción de un enlazador *HindIII* único, y el gen gB del MDV se insertó mediante métodos estándares de clonación de DNA. Las regiones flanqueantes en el fragmento *BamHI-EcoRI* de 17,15 KB se usaron, junto con los fragmentos del HVT clonados restantes usando el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. El virus obtenido de la reserva (*stock*) de transfección se purificó en placas y el DNA se analizó respecto a la presencia del gen gB del MDV. El S-HVT-045 es un virus recombinante que contiene el gen gB del MDV incorporado en el genoma en el sitio *StuI* del gen US2 del HVT.

Ensayo de S-HVT-045 recombinante

Se llevaron a cabo dos estudios para demostrar la eficacia de estos virus HVT/MDV recombinantes para proteger contra la inoculación con virus virulento de la enfermedad de Marek. En el estudio A, los pollos libres de agentes patógenos específicos (abreviadamente SPF por la expresión inglesa *specific pathogen free*) se vacunaron bien sea con el S-HVT-045 ó bien sea el S-HVT-046. Siete días después de la vacunación, los pollos vacunados y los pollos de control se inocularon con una cepa MD-5 altamente virulenta del virus de la enfermedad de Marek. Después de un periodo de observación después de 6 semanas de la inoculación respecto a signos clínicos típicos de la enfermedad de Marek, a todos los pollos se les realizó la autopsia y se examinaron respecto a un diagnóstico de lesiones de la enfermedad de Marek. Los resultados de la Tabla 6, muestran que ambos virus recombinantes dieron una protección completa contra la inoculación que causaba la enfermedad de Marek en 90% de los pollos de control no vacunados.

En un segundo estudio, los pollos de un día se vacunaron bien sea con S-HVT-045 o bien sea con S-HVT-047. Un tercer grupo de pollos se vacunó con la vacuna convencional con licencia de USDA compuesta de virus HVT y SB-1. Cinco días después de la vacunación, los pollos vacunados y un grupo de pollos de control no vacunados se inocularon con el virus virulento de Marek, cepa RB1B. Los pollos se observaron durante 8 semanas respecto a signos clínicos de la enfermedad de Marek, después se les hizo la autopsia y se observaron las lesiones de Marek. Este estudio demostró la capacidad del HVT-045 y del HVT-047 de proporcionar 100% de protección contra la inoculación (Tabla 1). La vacuna comercial dio una protección de 96%, y 79% de los pollos no vacunados desarrollaron la enfermedad de Marek.

TABLA 6

Eficacia de los virus HVT/MDV recombinantes para proteger pollos susceptibles contra el virus virulento de la enfermedad de Marek

Protección de Marek		
Grupo de vacuna	Inoculación con MD-5	Inoculación con RB1B
S-HVT-045	20/20	24/24
S-HVT-046	20/20	No ensayado
S-HVT-047	No ensayado	24/24
HVT ^a	No ensayado	24/25
Controles	2/20	5/24
^a Comercial		

Ejemplo 6

D-HVT-012

El S-HVT-012 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene el gen de la β -galactosidasa (*lacZ*) insertado en la región única corta. El gen *lacZ* se usó para determinar la viabilidad de este sitio de inserción en el HVT [ATCC F-126 ("Calnek")]. El S-HVT-012 ha sido depositado el 15 de octubre de 1992 de acuerdo con el Tratado de Budapest en el *International Depository of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure with the Patent Culture Depository of the American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA bajo el número de acceso ATTC VR. 2382.

Para la inserción en el genoma del HVT, el gen de β -galactosidasa se introdujo en el sitio *StuI* único del fragmento clonado *EcoRI* n° 7 del HVT, es decir, el fragmento que contenía el sitio *StuI* dentro del gen US2 del HVT (como se describe en el apartado Materiales y Métodos). Las regiones flanqueantes del fragmento *EcoRI* n° 7 se usaron para la recombinación homóloga. El DNA del HVT y el DNA del plásmido se co-transfectaron de acuerdo con el Método de transfección de DNA para generar virus combinantes en células fibroblastos primarias de embriones de pollos (CEF). Se obtuvo un virus azul obtenido de la reserva (*stock*) de transfección por sucesivas etapas de purificaciones en placas usando el método de Escrutinio blugal para herpesvirus recombinantes. Al final de este método, cuando el 100% de las placas eran azules, el DNA se analizó en cuanto a la presencia del gen *lacZ*. El S-HVT-012 es un virus recombinante que contiene el gen *lacZ* incorporado en su genoma en el sitio *StuI* dentro del gen US2 del HVT.

El S-HVT-012 se puede formular como una vacuna del mismo modo que el S-HVT-045. Cuando se administra a pollos, y dicha vacuna proporciona protección contra el virus de la enfermedad de Marek.

Ejemplo 7

Sitios para la inserción de DNA extraño en el HVT

Para definir los sitios de inserción apropiados, se generó una genoteca de fragmentos de restricción *BamHI* y *EcoRI* del HVT. Varios de estos fragmentos de restricción (fragmentos *BamHI* n° 16 y n° 13, y los fragmentos *EcoRI* n° 6, n° 7, y n° 9 (véase la Figura 1)) se sometieron a análisis por cartografía de restricción. Se identificó un sitio de restricción único en cada fragmento como un sitio de inserción potencial. Estos sitios incluían *XhoII* en los fragmentos *BamHI* n° 13 y n° 16, y el fragmento *EcoRI* n° 9 y *SalI* en el fragmento *EcoRI* n° 6 y *StuI* en el fragmento *EcoRI* n° 7. Se insertó un gen marcador de β -galactosidasa (*lacZ*) en cada uno de los sitios potenciales. Puede usarse un plásmido que contenía dicho inserto de DNA extraño de acuerdo con Cotransfección de DNA para generar herpesvirus

ES 2 278 382 T3

recombinantes para construir un HVT que contiene el DNA extraño. Para que este método sea útil es importante que el sitio de inserción esté en una región no esencial para la replicación del HVT y que el sitio esté flanqueado por DNA del HVT apropiado para mediar la recombinación homóloga entre DNA de virus y plásmidos. Se utilizarán plásmidos que contienen el gen marcador *lacZ* en la Cotransfección de DNA para generar herpesvirus recombinantes. La generación de virus recombinantes se determinó por Esrutinio bluogal para herpesvirus recombinantes. Tres de los cinco sitios activos se usaron satisfactoriamente para generar un virus recombinante. En cada caso el virus resultante se purificó esencialmente hasta 100%, definiendo claramente un sitio apropiado para la inserción de DNA extraño. Los tres vectores de homología usados para definir estos sitios se describen más adelante.

Ejemplo 7A

Vector de homología 172-29.31

El vector de homología 172-29.31 contiene el fragmento *Bam*HI nº 16 del HVT y es útil para la inserción de DNA extraño en el HVT. El plásmido 172-29.31 contiene un sitio de restricción *Xho*I único en el cual puede clonarse el DNA extraño. El sitio *Xho*I en el vector de homología 172-29.31 se puede usar para insertar DNA extraño en el HVT por la construcción de al menos tres HTV recombinantes (véanse los Ejemplos 1-3).

El vector de homología 172-29.31 se caracterizó además por análisis de secuenciación de DNA. Se determinaron las secuencias completas del fragmento *Bam*HI nº 16. También se determinaron aproximadamente 2092 pares de bases del fragmento adyacente *Bam*HI nº 13 (véase la SEQ ID NO: 3). Esta secuencia indica que el marco de lectura abierto que codifica la glicoproteína A (gA) del HVT se extiende a la unión *Bam*HI nº 16 - *Bam*HI nº 13. El gen gA del HVT es el homólogo a la glicoproteína C (gC) del HSV-1. Este sitio *Xho*I interrumpe un ORF que está directamente aguas arriba (hacia el extremo 5') del gen gA del HVT. Este ORF muestra la homología de secuencia de aminoácidos con el p43 del PRV y el gen 15 del virus de la varicela-zoster (abreviadamente en lo sucesivo VZV por la expresión inglesa *Varicella-Zoster Virus*) Los genes del PRV y del VZV son los homólogos de UL43 del HSV-1. Por tanto este ORF se denominó UL43 del HVT (SEQ ID NO: 5). Deberá advertirse que el UL43 del HVT no exhibe una homología directa con el UL43 del HSV-1. Aún cuando el UL43 del HVT está localizado aguas arriba (hacia el extremo 5') del gC homólogo del HVT está codificado en la misma cadena de DNA que el gA del HVT, en donde como el UL43 del HSV-1 está en la cadena opuesta respecto a gC del HSV-1. El sitio *Xho*I interrumpe el UL43 en aproximadamente el aminoácido 6 lo que sugiere que el gen UL43 no es esencial para la replicación del HVT.

Ejemplo 7B

Vector de homología 435-47.R17

El vector de homología 435-47.R17 contiene el fragmento *Eco*RI de HVT nº 7 y es útil para la inserción del DNA extraño en el HVT. El plásmido 435-47.R17 contiene un sitio de restricción *Hind*III único en el cual puede ser clonado el DNA extraño. El sitio de restricción *Hind*III en el plásmido resulta de la inserción del enlazador *Hind*III en el sitio *Stu*I que ocurre naturalmente del fragmento *Eco*RI nº 7. El sitio *Hind*III en el vector de homología 435-47.R17 puede ser usado para insertar el DNA extraño en el HVT mediante la construcción de por lo menos 25 recombinantes del HVT.

El análisis de secuencias de DNA en el *Stu*I indicó que este fragmento contiene marcos de lectura abiertos que codifican US10, US2 y US3. El sitio *Stu*I interrumpe el US2 en aproximadamente el aminoácido 124, lo que sugiere que el gen US2 no es esencial para la replicación del HVT.

Ejemplo 7C

Vector de homología 172-63.1

El vector de homología 172-63.1 contiene el fragmento *Eco*RI nº 9 del HVT y es útil para la inserción del DNA extraño en el HVT. El plásmido 172-63.1 contiene un sitio de restricción *Xho*I único en el cual puede ser clonado el DNA extraño. El sitio *Xho*I de un vector de homología 172-63.1 puede ser usado para insertar el DNA extraño en el HVT mediante la construcción del S-HVT-014 (Véase el Ejemplo 8).

Ejemplo 8

S-HVT-014

El S-HVT-014 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene el gen de β -galactosidasa de *E. coli* (*lacZ*) insertado en la región única larga. El gen *lacZ* se usó para determinar la viabilidad de este sitio de inserción en el HVT [ATCC F-126 ("Calnek")].

Para la inserción en el genoma del HVT, el gen de β -galactosidasa se introdujo en el sitio *Xho*I único del fragmento *Eco*RI nº 9 clonado (como se describió en el apartado Materiales y Métodos). El sitio *Xho*I en el fragmento *Eco*RI nº 9 del genoma del HVT es el mismo sitio que el sitio *Xho*I en el fragmento *Bam*HI nº 10 usado para la construcción de herpesvirus recombinante de pavos descrito en los Ejemplos 16 a 19. Las regiones flanqueantes del fragmento *Eco*RI

ES 2 278 382 T3

nº 9 se usaron para la recombinación de homólogo. El DNA del HVT y el DNA de plásmido se co-transfectaron de acuerdo con el procedimiento de Transfección de DNA para generar virus recombinantes en células fibroblastos de embrión de pollo primarios (CEF). Se purificó un virus azul obtenido de la reserva (*stock*) de transfección mediante sucesivas purificaciones en placas usando el procedimiento de Escrutinio bluogal para herpesvirus recombinantes. Al final de este procedimiento 100% de las placas eran azules. El S-HVT-014 es un virus recombinante que contiene el gen *lacZ* incorporado en su genoma en el sitio *XhoI* en el fragmento *EcoRI* nº 9 del HVT.

El S-HVT-014 puede ser formulado como una vacuna de la misma manera que el S-HVT-045. Cuando se administra a pollos, dicha vacuna proporciona protección contra el virus de la enfermedad de Marek.

Ejemplo 9

S-HVT-005

El S-HVT-005 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene el gen de β -galactosidasa de *E. coli* (*lacZ*) insertado en la región única larga. El gen *lacZ* se usó para determinar la viabilidad de este sitio de inserción en el HVT [ATCC F-126 ("Calnek")].

Para la inserción en el genoma del HVT, el gen de β -galactosidasa se introdujo en una delección (supresión) de aproximadamente 1300 pares de bases del fragmento nº 9 *XhoI* del HVT. La delección que cae entre los sitios *MluI* y *EcoRI* únicos retira la región codificadora completa del gen gA del HVT (véase la SEQ ID NO: 3). Las regiones flanqueantes *XhoI* del fragmento *EcoRI* nº 9 se usaron para la recombinación de homólogos. El DNA del HVT y el DNA del plásmido se co-transfectaron de acuerdo con el Método de transfección de DNA para generar virus recombinantes en células fibroblastos de embrión de pollo primarios (CEF). Se purificó mediante purificaciones sucesivas en placas un virus azul obtenido de la reserva (*stock*) de transfección usando el Escrutinio bluogal para herpesvirus recombinantes. Al final de este procedimiento, cuando 100% de las placas eran azules, se analizó el DNA respecto a la presencia del gen *lacZ*. El S-HVT-005 es un virus recombinante que contiene el gen *lacZ* incorporado en el genoma en el lugar de la delección del gen gA delecionado (suprimido) del HVT.

El S-HVT-005 puede ser formulado como una vacuna en la misma forma que el S-HVT-045. Cuando se administra a pollos, dicha vacuna proporciona protección contra de la enfermedad de Marek.

Ejemplo 10

Vacunas para la enfermedad de Marek

El HVT recombinante que expresa glicoproteínas del virus de la enfermedad de Marek proporciona vacunas superiores para la enfermedad de Marek. Nosotros hemos construido varios HVT recombinantes que expresan glicoproteínas del MDV: S-HVT-0:4 (Ejemplo 3), S-HVT-045 (Ejemplo 5), S-HVT-046 (Ejemplo 10A), S-HVT-047 (Ejemplo 10B), S-HVT-062 (Ejemplo 10C).

Ejemplo 10A

S-HVT-046

El S-HVT-046 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene los genes de la glicoproteína B (gB) del virus de la enfermedad de Marek (MDV) y de la glicoproteína A (gA) insertados en la región única corta. Los genes del MDV están insertados en la misma orientación transcripcional que el gen US2. Es más probable que los antígenos del MDV desencadenen la respuesta antigénica adecuada que el antígeno equivalente del HVT.

El S-HVT-046 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos de DNA subgenómicos. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 407-32.1C1 con *NotI*, 437-26.24 con *BamHI* y *HindIII*, 437-26.26 con *BamHI* y *HindIII*, y 456-17.22 sin corte. La inserción del DNA apropiado se confirmó mediante un análisis de transferencia Southern.

Ejemplo 10B

S-HVT-047

El S-HVT-047 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene los genes gB y gA del MDV insertados en la región única corta. Los genes del MDV están insertados en la orientación transcripcional opuesta como el gen US2. Es más probable que los antígenos del MDV desencadenen la respuesta antigénica adecuada que el antígeno equivalente del HVT.

El S-HVT-047 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos de DNA subgenómicos. Se uso la siguiente combinación de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 407-32.1C1 con *NotI*, 437-26.24 con *BamHI* y *HindIII*, 437-

26.26 con *Bam*HI y *Hind*III, y 456-17.18 sin corte. La inserción del DNA apropiado se confirmó mediante un análisis de transferencia Southern.

Ejemplo 10C

S-HVT-062

El S-HVT-062 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene el gen gB del MDV, los genes de las glicoproteínas D (gD) y gA insertados en la región única corta. Los genes del MDV están insertados en la orientación transcripcional como el gen US2. Es más probable que los antígenos del MDV desencadenen la respuesta antigénica adecuada que el antígeno equivalente del HVT. El S-HVT-062 ha sido depositado el 23 de Febrero de 1993 de acuerdo con el Tratado de Budapest en el *International Depository of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure with the Patent Culture Depository of the American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA bajo el número de acceso ATTC VR. 2401.

El S-HVT-062 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos de DNA subgenómicos. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *Not*I, 172-07.BA2 con *Bam*HI, 40732.5G6 con *Not*I, 407-32.1C1 con *Not*I, 437-26.24 con *Bam*HI y *Hind*III, 556-60.6 con *Bam*HI y *Hind*III, y 456-17.22 sin corte. La inserción del DNA apropiado se confirmó mediante análisis por transferencia Southern.

Ensayo de HVT recombinantes que expresan antígenos del MDV

Se llevaron a cabo dos estudios para demostrar la eficacia de los virus HVT/MDV recombinantes para proteger contra la inoculación con un virus virulento de la enfermedad de Marek. En el Estudio 1, los polluelos libres de agentes patógenos específico (SPF) de un día se vacunaron con bien sea el S-HVT-045, el S-HVT-046 o el S-HVT-047. Cinco días después de la vacunación, los polluelos vacunados y los polluelos de control no vacunados se inocularon con el MDV. Después de 6 semanas de la inoculación de periodo de observación para signos clínicos típicos de la enfermedad de Marek, todos los pollos se sometieron a autopsia y se examinaron para el diagnóstico de lesiones de la enfermedad de Marek. Los resultados recogidos en la Tabla 7 muestran que estos virus recombinantes dan una protección completa contra la inoculación del virus que causa la enfermedad de Marek en 84% de los pollos de control no vacunados.

En el segundo estudio, los pollos de un día se vacunaron con el S-HVT-062. Dos grupos más de pollos se vacunaron con las vacunas convencionales adquiridas con licencia de USDA compuestas de HVT y una combinación de los virus HVT y SB-1. Cinco días después de la vacunación, los pollos vacunados y el grupo de pollos de control no vacunados se inocularon con el MDV. Los pollos se observaron durante 8 semanas respecto a signos clínicos de la enfermedad de Marek, y luego se sometieron a autopsia y se observaron respecto a lesiones de la enfermedad de Marek. Este estudio demostró la capacidad del S-HVT-062 para proporcionar 100% de protección contra la inoculación (Tabla 7). Las vacunas comerciales dieron 81% y 95% de protección, respectivamente y 100% de los pollos no vacunados desarrollaron la enfermedad de Marek.

TABLA 7

Eficacia de los virus HVT/MDV recombinantes contra la inoculación de virus virulento de Marek

Estudio	Grupo de vacuna	Dosis ^a	Protección ^b
1	S-HVT-045	2,2 X 10 ³	24/24 (100%)
1	S-HVT-046	2,2 X 10 ³	20/20 (100%)
1	S-HVT-047	2,2 X 10 ³	24/24 (100%)
1	Controles		7/44 (16%)
1	HVT/SB-1		24/25 (96%)
2	S-HVT-062	7,5 X 10 ²	32/32 (100%)
2	S-HVT-062	1,5 X 10 ¹	22/22 (100%)
2	Controles		0/20 (0%)
2	EVT ^c	7,5 X 10 ²	17/21 (81%)
2	HVT/SB-1 ^c	7,5 X 10 ²	22/21 (95%)

^aUFP/0,2 ml.

^bNº de protegidos/total; Inoculación 5 días después de la vacunación

^cVacuna comercial

Ejemplo 11

Vacunas bivalentes contra la enfermedad de Newcastle y la enfermedad de Marek

5 Un HVT recombinante que expresa las proteínas del NDV produce vacunas bivalentes que protegen tanto contra la enfermedad de Marek como la enfermedad de Newcastle. Se construyeron varios HVT recombinantes que expresan las proteínas del NDV, a saber: S-HVT-007 (Ejemplo 11A), S-HVT-048 (Ejemplo 11B), SI-IVT-049 (Ejemplo 11C), S-HVT-050 (Ejemplo 11D), y S-HVT-106 (Ejemplo. 11E).

10 Ejemplo 11A

S-HVT-007

15 El S-HVT-007 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene un gen de proteína híbrida *lacZ* de *E. coli*-HN del NDV bajo el control del promotor gX del PRV gX y el gen F del NDV bajo el control del promotor HSV-1 a4 insertado en la región única larga. Los genes del NDV están insertados en la misma orientación transcripcional que el gen UL43.

20 Para construir el S-HVT-007, el DNA del HVT y el plásmido 255-18.B16 se cotransfectaron de acuerdo con el procedimiento de Transfección de DNA para generar virus recombinantes en células fibroblastos de embrión de pollos primarios (CEF). Por sucesivas purificaciones de placas se purificó un virus azul obtenido de la reserva (*stock*) de transfección usando el método de Escrutinio bluogal para herpesvirus recombinantes. Al final de este procedimiento el 100% de las placas eran azules.

25 Ejemplo 11B

S-HVT-048

30 El S-HVT-048 es un herpesvirus recombinante de pavos que contienen los genes gB y gA del MDV y el gen F del MDV bajo el control promotor temprano inmediato del HCMV insertado en la región única corta. Los genes de MDV y NDV están insertados en la misma orientación transcripcional que el gen US2.

35 El S-HVT-048 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos de DNA subgenómicos. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 407-32.1C1 con *NotI*, 437-26.24 con *BamHI* y *HindIII*, 437-26.26 con *BamHI* y *HindIII*, y 535-70.3 sin corte. La inserción del DNA apropiado se confirmó por análisis de transferencia Southern.

40 Ejemplo 11C

S-HVT-049

45 El S-HVT-049 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene los genes gB y gA del MDV y el gen HN del NDV bajo el control del promotor gX del PRV insertado en la región única corta. Los genes de MDV y NDV están insertados en la misma orientación transcripcional que el gen US2.

50 El S-HVT-049 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos de DNA subgenómicos. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 407-32.1C1 con *NotI*, 437-26.24 con *BamHI* y *HindIII*, 437-26.26 con *BamHI* y *HindIII* y 54.9-62.10 sin corte. La inserción del DNA apropiado se confirmó por análisis de transferencia Southern.

Ejemplo 11D

55 *S-HVT-050*

El S-HVT-050 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene los genes gB y gA del MDV y el gen HN (SEQ ID NO: 10 y 11) y los genes F (SEQ ID NO: 12 y 13) del NDV. Los genes de NDV están bajo el control de los promotores gX de PRV y le inmediato del HCMV respectivamente. Todos los cuatro genes están insertados en la 60 región única corta en la misma orientación transcripcional que el gen US2.

65 El S-HVT-050 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos de DNA. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 407-32.1C1 con *NotI*, 437-26.24 con *BamHI* y *HindIII*, 437-26.26 con *BamHI* y *HindIII*, y 549-24.15 sin corte. La inserción del DNA apropiado se confirmó mediante análisis de transferencia Southern. El S-HVT-050 ha sido depositado el 23 de febrero de 1993 de acuerdo con el Tratado de Budapest en el *International Depository of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure with the Patent Culture*

Depository of the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA bajo el número de acceso ATTC VR. 2400.

Ejemplo 11E

S-HVT-106

El S-HVT-106 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene los genes gA, gB, gD del MDV y los genes HN y F del NDV. Los genes de NDV están bajo el control de los promotores gX del PRV e inmediato del HCMV respectivamente. Todos los cinco genes están insertados en la región única corta en la misma orientación transcripcional que el gen US2.

El S-HVT-106 se construyó de acuerdo con el Método para generar el herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos de DNA subgenómicos. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 407-32.1C1 con *NotI*, 437-26.24 con *BamHI* y *HindIII*, 437-26.26 con *BamHI* y *HindIII* y 633-13.27 sin corte.

Ensayo de HVT recombinantes que expresan antígenos del NDV

Se llevaron a cabo dos estudios para demostrar la eficacia de estos virus HVT/MDV/NDV recombinantes para proteger contra la inoculación con virus virulentos de la enfermedad de Marek y Newcastle. En el Estudio 1, los pollos libres de agente patógeno específico (SPF) de un día se vacunaron con bien sea el S-HVT-048, el S-HVT-049, el S-HVT-050 o una vacuna convencional con licencia de USDA compuesta de virus NZV B1/B1. Tres semanas después de la vacunación, los pollos vacunados y los pollos de control no vacunados se inocularon con NDV. Las aves se observaron luego respecto a signos clínicos de la enfermedad. Los resultados, de la Tabla 8, muestran que esto virus recombinantes (S-HVT-048 y S-HVT-050) dieron una protección completa contra la inoculación que causó la enfermedad de Newcastle en 100% de los pollos de control no vacunados. El virus recombinante S-HVT-049 dio una protección parcial contra de la enfermedad de Newcastle.

En el segundo estudio, los pollos de un día se vacunaron con S-HVT-050. Dos grupos más de pollos se vacunaron con las vacunas convencionales con licencia de USDA compuesta de HVT y una combinación de virus de HVT y SB-1. Cinco días después de la vacunación, los pollos vacunados y un grupo de pollos de control no vacunados se inocularon con el MDV. Los pollos se observaron durante ocho semanas respecto a signos clínicos de la enfermedad de Marek, y luego se les hizo la autopsia y se observaron las lesiones de Marek. Este estudio demostró la capacidad del S-HVT-050 para proporcionar una protección mayor que las vacunas comerciales de la enfermedad de Marek.

TABLA 8

Eficacia de los virus HVT/MDV/NDV recombinantes contra los virus virulentos de la enfermedad de Marek y Newcastle

		% de protección		
Estudio		Dosis ^a	NDV ^b	MDV ^c
1	S-HVT-048	4,0 X 10 ⁴	219/19 (100)	
1	S-HVT-049	3,0 X 10 ⁴	4/20 (20)	
1	S-HVT-050	1,5 X 10 ⁴	20/20 (100)	
1	Controles		0/2 (0)	
1	NDV BI/BI ^d		18/18 (100)	
2	S-HVT-050	7,5 X 10 ²		13/14 (93)
2	S-HVT-050	1,5 X 10 ³		16/74 (94)
2	Controles			5/23 (22)
2	HVT ^d			20/26 (77)
2	HVT/SB-I ^d			10/12 (83)
^a UFP/ 0,2 ml.				
^b Nº de protegidos/Total; Inoculación 3 semanas después de la vacunación				
^c Nº de protegidos /Total; Inoculación 3 semanas después de la vacunación				
^d Vacuna comercial				

Ejemplo 12

Vacunas bivalentes contra la laringotraqueitis infecciosa y la enfermedad de Marek

5 Un HVT recombinante que expresa glicoproteínas del virus ILT produjo vacunas bivalentes que protegen contra tanto la enfermedad de Marek como la laringotraqueitis infecciosa. Se obtuvieron varios HVT recombinantes que expresan glicoproteínas de S-HVT-051 del ILTV (Ejemplo 12A), S-HVT-052 (Ejemplo 12B) y S-HVT-104 (Ejemplo 11C).

10 Ejemplo 12A

S-HVT-051

15 El S-HVT-051 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene el gen gB del ILTV insertado en la región única corta. El gen del ILTV está insertado en la misma orientación transcripcional que el gen US2.

El S-HVT-051 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos de DNA subgenómicos. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 407-32.1C1 con *NotI*, 437-26.24 con *BamHI* y *HindIII*, 437-26.26 con *BamHI* y *HindIII*, y 528-11.34 sin corte. La inserción del DNA apropiado se confirmó mediante el análisis de transferencia Southern.

Ejemplo 12B

25 *S-HVT-052*

El S-HVT-052 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene el gen gD de ILTV insertado en la región única corta. El gen del ILTV está insertado en la orientación transcripcional opuesta al gen US2.

30 El S-HVT-052 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos de DNA subgenómicos. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 407-32.1C1 con *NotI*, 437-26.24 con *BamHI* y *HindIII*, 437-26.26 con *BamHI* y *HindIII*, y 528-03.37 sin corte. La inserción del DNA apropiado se confirmó mediante análisis de transferencia Southern.

35 Ejemplo 12C

S-HVT-104

40 El S-HVT-104 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene seis genes extraños. Los genes gA, gB y gD del MDV están insertados en la región corta única en la misma orientación transcripcional que el gen US2. Un gen marcador *lacZ* de *E. coli* y los genes gB y gD del ILTV están insertados en la región *BamHI* n° 16 en la misma orientación transcripcional que el gen U14 3.

45 Para construir el S-HVT-104, el DNA del S-HVT-062 y el plásmido 634-29.16 se co-transfectaron de acuerdo con el método de Transfección de DNA para generar virus recombinantes en células fibroblastos de embrión de pollo primarios (CEF).

Ensayo de HVT recombinantes que expresan antígenos del ILTV

50 El siguiente estudio se llevó a cabo para demostrar la eficacia de estos HVT/ILTV recombinantes para proteger contra la inoculación con el virus virulento de laringotraqueitis infecciosa. Los pollos libres de agente patógeno específico (SPF) de un día se vacunaron con bien sea el S-HVT-051, el S-HVT-052, una combinación del S-HVT-051 o bien sea el S-HVT-052, o una vacuna convencional con licencia de USDA compuesta de ILTV. Dos a tres semanas después de la vacunación, los pollos vacunados y los pollos de control no vacunados se inocularon con el ILTV. Las aves se observaron luego con respecto a los signos clínicos de la enfermedad. Los resultados recogidos en la Tabla 9, muestran que estos virus recombinantes (S-HVT-051 y S-HVT-052) dieron una protección contra el ILTV comparable con la vacuna ILTV comercial.

60 Los animales vacunados con las vacunas descritas en la presente memoria pueden diferenciarse fácilmente de los animales infectados con el ILTV virulento. Esto se logra mediante analizando las aves sospechosas respecto a anticuerpos para cualesquiera antígenos de ILTV distinto de gB o gD. Los ejemplos de tales antígenos son las glicoproteínas C, E y G de ILTV. Las aves no infectadas vacunadas serán negativas para estos antígenos mientras que las aves infectadas serán positivas.

65

TABLA 9

Eficacia de los virus HVT/ILTV recombinantes contra la inoculación de virus virulento de laringotraqueitis infeccioso

Grupo de vacuna	Dosis ^a	Protección ^b
S-HVT-051		28/30 (93%)
	2,1 X 10 ³	
S-HVT-052	1,7 X 10 ³	29/29 (100%)
S-HVT-051+	2,1 X 10 ³	24/24 (100%)
S-HVT-052	1,7 X 10 ³	
Controles		2/30 (7%)
ILTC ^c		29/30 (97%)
^a UFP/0,2 ml.		
^b Nº de protegidos/Total; Inoculación 2-3 semanas después de la vacunación		
^c Vacuna comercial.		

Ejemplo 13

Vacunas bivalentes contra de la enfermedad de Marek y la enfermedad bursal infecciosa

El HVT recombinante que expresa proteínas del IBDV produce vacunas bivalentes que protegen contra tanto la enfermedad de Marek como la enfermedad bursal infecciosa. Se construyeron diversos HVT recombinantes que expresan proteínas del IBDV. Estos virus incluyen el S-HVT-003 (ejemplo 2) y el S-HVT-096.

El S-HVT-096 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene el gen VP2 del IBDV, bajo el control del promotor temprano inmediato del HCMV, insertado en la región única corta. El gen de IBDV está insertado en la misma orientación transcripcional que el gen US2.

El S-HVT-096 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos de DNA subgenómicos. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 407-32.1C1 con *NotI*, 437-26.24 con *BamHI* y *HindIII*, 556-60.6 con *BamHI* y 602-57.F1 sin corte. La inserción del DNA apropiado se confirmó mediante análisis de transferencia Southern.

El S-HVT-096 se analizó para la expresión de VP2 mediante placas negras y análisis de transferencia Western. Ambos ensayos indicaron que el virus estaba expresando niveles altos de proteína que reaccionan específicamente con un anticuerpo monoclonal neutralizante del IBDV. Este virus será útil como una vacuna contra la enfermedad bursal infecciosa.

Ejemplo 14

Vacunas bivalentes contra la bronquitis infecciosa y la enfermedad de Marek

El S-HVT-066 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene los genes gB, gD y gA del MDV y los genes clavo y matriz del IBV. Los genes clavo y matriz IBV están bajo el control de los promotores temprano inmediato y del HCMV y gX del PRV respectivamente. Todos los cinco genes están insertados en la región única corta. Los genes del MDV e IBV están insertados en la misma orientación transcripcional que el gen US2.

El S-HVT-066 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos de DNA subgenómicos. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 17207.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 407-32.1C1 con *NotI*, 43726.24 con *BamHI* y *HindIII*, 556-60.6 con *BamHI*, y 567-72.1D sin corte. La inserción del DNA apropiado se confirmó mediante análisis de transferencia Southern.

El S-HVT-066 se analizó para la expresión de la proteína clavo del IBV mediante placas negras y análisis de transferencia Western. Ambos análisis indicaron que el virus estaba expresando altos niveles de proteína que reaccionaron específicamente con el anticuerpo monoclonal neutralizante del IBV. Estos virus serán útiles como vacuna contra la bronquitis infecciosa.

Ejemplo 15

Vacunas que utilizan HVT para expresar antígenos de varios agentes patógenos

5 Se anticipa que los antígenos de los siguientes patógenos pueden ser utilizados para desarrollar vacunas para aves: Virus de la anemia de pollos (agente), virus de la encefalomiелitis aviar, Reovirus aviar, Paramixovirus aviar, virus de la gripe aviar, Adenovirus aviar, Virus de la viruela aviar, Coronavirus aviar, Rotavirus aviar, *Salmonella spp*, *E. coli*, *Pasteurella spp*, *Haemophilus spp*, *Chlamidia spp*, *Mycoplasma spp*, *Campilobacter spp*, *Bordetella spp*, Nemátodos de aves, Céstodos, Trematodos, ácaros de aves/piojos Protozoos de aves (*Eimeria spp*, *Histomonas spp*, *Trichomonas spp*).

Ejemplo 16

15 Se describen vacunas trivalentes contra la laringotraqueitis infecciosa, la enfermedad de Marek y la enfermedad de Newcastle y vacunas bivalentes contra laringotraqueitis infecciosa y la enfermedad de Marek. La protección superior contra la laringotraqueitis infecciosa se logra con una vacuna que combina el S-HVT-123 (que expresa gB y gD de ILTV) con el S-HVT-138, 139 o 143 (que expresan gD y gI del ILTV).

Ejemplo 16A

20 *S-HVT-123*

25 El S-HVT-123 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene los genes gB y gD del ILTV insertados en un sitio *XhoI* convertidos en un sitio *NotI* en el fragmento *EcoRI* n° 9 (*BamHI* n° 10) del genoma del HVT (Figuras 13B y 15; (SEQ ID NO: 48). El S-HVT-123 contiene además los genes gA, gD y gB del MDV insertados en el sitio *StuII* único convertido en el sitio *HindIII* en el gen HVT-US2. Los genes del ILTV y los genes del MDV usan cada uno sus propios promotores respectivos. El S-HVT123 es útil como vacuna en aves en contra la laringotraqueitis infecciosa y la enfermedad de Marek.

30 El S-HVT-123 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 672-07.C40 con *NotI*, 672-01.A40 con *NotI*, 721-38.1J sin corte, 729-37.1 con *AscI*.

Ejemplo 16B

S-HVT-138

40 El S-HVT-138 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene los genes gD y gI del ILTV insertado en un sitio *XhoI* único convertido en el sitio *PacI* en el fragmento *EcoRI* n° 9 (*BamHI* n° 10) del genoma del HVT (Figuras 13A y 15). Los genes gD y gI de ILTV están en la orientación transcripcional opuesta al marco de lectura abierto (ORF A) en el fragmento *EcoRI* n° 9 (*BamHI* n° 10) del genoma del HVT (Figura 14, (SEQ ID NO: 48, 58). Los genes gD y gI del ILTV están expresados como transcritos solapantes de promotores del ILTV endógenos y comparten su señal de poliadenilación endógena propia.

45 El S-HVT-138 es útil como vacuna de pollos contra la laringotraqueitis infecciosa y la enfermedad de Marek.

50 El S-HVT-138 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 672-07.C40 con *NotI*, 672-01.A40 con *NotI*, 711-92.1A sin corte, 415-09.BA1 con *BamHI*.

55 Los sueros de pollos vacunados con S-HVT-138 reaccionan con las transferencias Western con la proteína gI de ILTV lo que indica que la vacuna de S-HVT-138 expresó la proteína de ILTV y produce una respuesta inmune en las aves. Los pollos vacunados con S-HVT-138 estuvieron protegidos contra la inoculación del virus de la virulento laringotraqueitis infecciosa.

Ejemplo 16C

60 *S-HVT-139*

65 El S-HVT-139 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene los genes gD y gI del ILTV insertados en un sitio *XhoI* único convertido en un sitio *PacI* en el fragmento *EcoRI* n° 9 (*BamHI* n° 10) del genoma del HVT. Los genes gD y gI de ILTV están en la orientación transcripcional opuesta al marco de lectura abierto (ORF A) en el fragmento *EcoRI* n° 9 (*BamHI* n° 10) del genoma del HVT (Figuras 13A y 15; Secuencia ID NO: 48, 50). El S-HVT-139 contiene además los genes gA, gD y gB del MDV insertados en el sitio *StuI* único convertido en un sitio *HindIII* en el gen US2 del HVT. Los genes gD y gI del ILTV se expresan como transcritos solapantes de sus propios promotores de ILTV endógenos respectivos, y los genes del MDV también se expresan desde sus propios promotores endóge-

nos. El S-HVT-139 es útil como vacuna en aves en contra la enfermedad de Marek y la laringotraqueitis infecciosa.

El S-HVT-139 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 672-07.C40 con *NotI*, 672-01.A40 con *NotI*, 711-92.1A sin corte, 721-38.1J sin corte.

Ejemplo 16D

S-HVT-140

El S-HVT-140 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene los genes gD y gI del ILTV insertados en un sitio *XhoI* único convertido en un sitio *PacI* en el fragmento *EcoRI* n° 9 (*BamHI* n° 10) del genoma del HTV (Figuras 13A y 15). Los genes gD y gI del ILTV están en la orientación transcripcional opuesta al marco de lectura abierto (ORF A) dentro del fragmento *EcoRI* n° 9 (*BamHI* n° 10) del genoma del HVT (Figura 14; Secuencia ID NO: 48, 50). El S-HVT-140 contiene además los genes gA, gD y gB del MDV y los genes F y HN del NDV insertados en el sitio *StuI* único convertido en un sitio *HindIII* en el gen US2 de HVT. Los genes gD y gI del ILTV se expresan como transcritos solapantes de sus propios promotores del ILTV endógenos respectivos, y los genes del IMDV también se expresan desde sus propios promotores de MDV endógenos respectivos. El gen F del NDV es transcrito desde el promotor temprano inmediato del HCMV, y el gen HN del NDV es transcrito desde el promotor gX del PRV. El S-HVT-140 es útil como vacuna en aves contra la laringotraqueitis infecciosa, la enfermedad de Marek y la enfermedad de Newcastle.

El S-HVT-140 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 672-07.C40 con *NotI*, 672-01.A40 con *NotI*, 711-92.1A sin corte, 722-60.E2 sin corte.

Ejemplo 17

Se describen vacunas trivalentes contra la enfermedad bursal infecciosa, la enfermedad de Marek y la enfermedad de Newcastle y vacunas bivalentes contra la enfermedad bursal infecciosa y la enfermedad de Marek.

Ejemplo 17A

HVT-126

El S-HVT-126 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene el gen VP2 del IBDV insertado en el sitio *XhoI* convertido en un sitio *PacI* en el fragmento *EcoRI* n° 9 (*BamHI* n° 10) en el genoma del HVT (Figuras 13A y 15). El gen del IBDV está en la misma orientación transcripcional que el marco de lectura abierto (ORF A) en el fragmento *EcoRI* n° 9 (*BamHI* n° 10) del genoma del HVT (Figura 14, SEQ ID NO: 48, 50). El gen VP2 del IBDV se expresa desde un promotor de VP8 del IBRV. El S-HVT-126 es útil como vacuna para pollos contra la enfermedad bursal infecciosa y la enfermedad de Marek.

El S-HVT-126 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 672-07.C40 con *NotI*, 672-01.A.40 con *NotI*, 706-57.A3 sin corte, 415-09.BA1 con *BamHI*.

Ejemplo 17B

HVT-137

El S-HVT-137 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene el gen VP2 del IBDV insertado en un sitio *XhoI* único convertido en un sitio *PacI* en el fragmento *EcoRI* n° 9 (*BamHI* n° 10) en el genoma del HVT (Figuras 13A y 15). El gen del IBDV está en la misma orientación transcripcional que el marco de lectura abierto (ORF A) dentro del fragmento *EcoRI* n° 9 (*BamHI* n° 10) del genoma del HVT (Figura 14; SEQ ID NO: 48, 50). El S-HVT137 contiene además los genes gA, gD y gB del MDV insertados en el sitio *StuI* único convertido en el sitio *HindIII* en el gen US2 del HVT. El gen VP2 del IBDV se expresa desde un promotor VP8 del IBRV. Los genes del MDV se expresan desde sus propios promotores del MDV endógenos respectivos. El S-HVT-137 es útil como vacuna en pollos contra la enfermedad bursal infecciosa y la enfermedad de Marek.

El S-HVT-137 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 672-07.40 con *NotI*, 672-01.A40 con *NotI*, 706-57.A3 sin corte, 721-38.1J sin corte.

Ejemplo 17C

HVT-143

5 El S-HVT-143 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene el gen VP2 del IBDV insertado en el sitio *XhoI* único convertido en un sitio *PacI* en el fragmento *EcoRI* nº 9 (*BamHI* nº 10) del genoma del HVT (Figuras 13A y 15). El IBDV está en la misma orientación transcripcional que el marco de lectura abierto (ORF A) en el fragmento *EcoRI* nº 9 (*BamHI* nº 10) del genoma del HVT (Figura 14; SEQ ID NO: 48, 50). El S-HVT-113 contiene además los genes gA, gD y gB del MDV y los genes F y HN del NDV insertados en el sitio *StuI* único convertido en el sitio *HindIII* en el gen US2 del HVT. El gen VP2 de IBDV se expresa desde un promotor VP8 del IBRV. Los genes del MDV se expresan desde sus propios promotores del MDV endógenos respectivos. El gen F del NDV se transcribe desde el promotor temprano inmediato del HCMV y el gen HN del NDV se transcribe desde el promotor gX del PRV. El S-HVT-143 es útil como vacuna en pollos contra la enfermedad bursal infecciosa, la enfermedad de Marek y la enfermedad de Newcastle.

15 El S-HVT-143 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 672-07.C40 con *NotI*, 672-01.A40 con *NotI*, 606-57.A3 sin corte, 722-60.E2 sin corte.

Ejemplo 18

HVT-128

25 El S-HVT-128 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene los genes HN y F del NDV insertados en un sitio *XhoI* único convertido en un sitio *PacI* en el fragmento *EcoRI* nº 9 (*BamHI* nº 10) del genoma del HVT (Figuras 13A y 15). El S-HVT-128 además contiene los genes gA, gD y gB del MDV insertados en un sitio *StuI* único convertido en el sitio *HindIII* en el gen US2 del HVT. El gen HN se expresa desde el promotor gX del PRV y el gen F del NDV se expresa desde el promotor temprano inmediato del HCMV. Los genes del MDV se expresan desde los promotores del MDV endógenos. El S-HVT-128 es útil como vacuna en pollos contra la enfermedad de Newcastle y la enfermedad de Marek.

35 El S-HVT-128 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 672-07.C40 con *NotI*, 672-01.A40 con *NotI* y 717-38.12 sin corte. A una mezcla de estos seis cósmidos se añadió una dilución limitante de un virus del HVT recombinante que contiene los genes gA, gD y gB del MDV insertados en la región corta única (véase el HVT-062) y el gen *lacZ* con el promotor gX del PRV insertado en el sitio *XhoI* convertido a un sitio *NotI* en el fragmento *EcoRI* nº 9 (*BamHI* nº 10) en la región larga única del HVT. Se seleccionó un virus recombinante S-HVT-128 que fue *lacZ* negativo.

Ejemplo 18B

HVT-136

45 El S-HVT-136 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene los genes HN y F del NDV insertados en el sitio *XhoI* convertido en el sitio *PacI* en el fragmento *EcoRI* nº 9 (*BamHI* nº 10) en la región larga única del HVT. (Figura 14; SEQ ID NO: 48 y 50). El gen HN del NDV se expresa desde el promotor gX del PRV y el gen F del NDV se expresa desde el promotor temprano inmediato del HCMV. El S-HVT-136 es útil como vacuna para pollos contra la enfermedad de Newcastle y la enfermedad de Marek.

50 El S-HVT-136 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 672-07.C40 con *NotI*, 672-01.A40 con *NotI* y 717-38.12 sin corte, y 415-09.BA1 BA1 con *BamHI*.

Ejemplo 19

*S-HVT-145*60 *Vacuna de virus HVT/MDV recombinantes*

El S-HVT-145 es una vacuna de virus recombinante, que contiene las secuencias genómicas del MDV y del HVT, que protege contra la enfermedad de Marek; dicho virus se produce combinando cósmidos de DNA genómico del MDV que contiene los genes que codifican los antígenos protectores relevantes del serotipo 1 y cósmidos de DNA genómico del HVT de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. El virus resultante es una vacuna que tiene la respuesta inmunoprotectora para el serotipo 1 virulento del MDV y características de crecimiento atenuadas del HVT. En una realización, una vacuna de virus quimérico que contiene los genes del MDV de los genes del fragmento corto único y los genes del HVT del fragmento

largo único es útil como vacuna contra la enfermedad de Marek en pollos. Los antígenos protectores del MDV en la región corta única (gD, gE y gI) producen una respuesta inmunoprotectora frente al MDV mientras que los elementos virulentos presentes en el fragmento largo único del MDV (55, 56, 57) están reemplazados por las secuencias largas únicas atenuantes de HVT. El resultado es una vacuna de virus atenuado que protege contra la enfermedad de Marek.

5 La protección multivalente contra la enfermedad de Marek, la laringotraqueitis infecciosa, la enfermedad bursal infecciosa, la enfermedad de Newcastle u otro agente patógeno de pollo se logra insertando los genes gB, gD y gI de ILTV, el gen VP2 del IBDV, los genes HN y F del NDV o un gen antígeno de agente patógeno de aves en el sitio *XhoI* convertido en un sitio *PacI* o el sitio *NotI* en el fragmento *EcoRI* nº 9 (*BamHI* nº 10) en la región larga única del virus recombinante HVT/MDV (Figuras 13 y 15).

10 Se construyó un cósmido que contenía la región corta única completa del MDV. El DNA genómico del MDV contiene varios sitios *SmaI* en las repeticiones largas únicas e internas y terminales del virus, pero no en los sitios *SmaI* en el fragmento corto único del virus. La región corta única completa del MDV se aisló por digestión por restricción parcial del DNA genómico del MDV con *SmaI*. Se aisló un fragmento de DNA de aproximadamente 15 29.000 a 33.000 pares de bases y se clonó en un sitio terminado en extremos romos del vector cósmido pWE15. Para generar un HVT-145, un virus quimérico HVT/MDV recombinante, el cósmido que contiene la región corta única del MDV se combinó con cósmidos que contienen la región larga única del HVT de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07-BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 407-32.1C1 20 con *NotI*, y 739-27.16 con *NotI*.

La vacuna vírica resultante proporciona una protección superior contra la enfermedad de Marek o como vacuna multivalente contra la enfermedad de Marek y la laringotraqueitis infecciosa, la enfermedad bursal infecciosa, la enfermedad de Newcastle u otro agente patógeno aviar. Esta vacuna es superior debido a la expresión de los genes 25 del MDV en la vacuna quimérica del HVT/MDV, que es más segura y proporciona una mejor protección contra la enfermedad de Marek que las vacunas actualmente disponibles que contienen HVT y 2(SB-1) del tipo MVD o HVT solo. En segundo lugar se puede demostrar la expresión de los genes de glicoproteínas del MDV en ausencia de genes de HVT homólogos tanto para fines de diagnóstico como reguladores. Esto es útil ya que los anticuerpos para una glicoproteína del MDV reaccionarán de forma cruzada con las glicoproteínas homólogas del HVT. Finalmente, un 30 virus recombinante de HVT/MDV que contiene una sola copia de cada gen de glicoproteína es más estable que un virus recombinante que contiene dos copias de un gen de glicoproteína homóloga de HVT y de MDV el cual puede delecionarse (suprimirse) mediante recombinación de homólogos.

En una realización alternativa, los cósmidos que contienen genes de antígenos protectores del MDV del fragmento 35 largo único (gB y gC del MDV) se combinan con cósmidos que contiene secuencias de gen de HVT de la región corta única y de la región larga única, evitando eficazmente los genes virulentos del MDV en la unión de repetición única y en la unión de repetición terminal/larga única (55, 56 y 57).

La cepa SB-1 es un serotipo 2 del MDV con una patogenicidad atenuada. La vacunación con una combinación del 40 HVT y de virus vivos SB-1 protege contra la inoculación del MDV virulento mejor que la vacunación con cualquier virus solo. En una realización alternativa de la presente invención, una vacuna de virus recombinante comprende genes de antígenos protectores de los serotipos 1 del MDV virulentos combinados con genes atenuantes de los serotipos 2 y 3 de MDV no virulentos, tal como el SB-1 y el HVT. El DNA genómico correspondiente a la región larga única es contribuido por el serotipo SB-1. El DNA genómico correspondiente a la región corta única es contribuido por el 45 serotipo SB-1. Tres antígenos de las glicoproteínas principales (gB, gA y gD) del serotipo MDV 2 están insertados en la región corta única del virus.

El virus recombinante se construye utilizando los clones subgenómicos del HVT 672-01.A40, 672-07.C40 y 721-38.1J para reconstruir la región corta única. El clon subgenómico 721-38.1J contiene una inserción de los genes gB, 50 gA y gD del MDV. Un exceso molar grande de estos clones se co-transfeccionó con una dosis sub-infecciosa de DNA genómico de SB-1. Para determinar la dosis sub-infecciosa apropiada, la transfección del SB-1 se titula hasta una dosis que ya no da placas de virus en un cultivo de células. Tal dosis contiene fragmentos subgenómicos que se extienden a la región larga única del SB-1 que se recombina con los clones subgenómicos cortos únicos del HVT. Por tanto, un virus resultante de la combinación entre las regiones de homólogos solapantes de los fragmentos subgenómicos SB-1 y HVT está altamente favorecido. Alternativamente, los fragmentos genómicos de SB-1 de la región larga única se 55 subclonan en vectores cósmidos. Se produjo un virus recombinante que contiene la región única larga de SB-1, la corta única del HVT con los genes gB, gA y gD del MDV usando el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Este método también se usó con el clon subgenómico del HVT para insertar los genes de antígenos de otros agentes patógenos aviares incluyendo, pero sin limitación: el virus de laringotraqueitis infecciosa, el virus de la enfermedad de Newcastle y el virus de la enfermedad bursal infecciosa. 60

Ejemplo 20

El HVT recombinante que expresa un factor de crecimiento mielomonocítico de pollo (cMGF) o un interferón de 65 pollo (cIFN) son útiles como vacunas contra el virus de la enfermedad de Marek y también son útiles para mejorar la respuesta inmune frente a otras enfermedades de las aves. El factor de crecimiento mielomonocítico de pollos (cMGF) está relacionado con la proteína de mamífero G-CSF e interleuquina-6 (58) y el interferón de pollo (cIFN) es homólogo al interferón de mamífero de tipo 1 (59). Cuando se usa en combinación con las vacunas descritas en los ejemplos

previos, el S-HVT-144 o el HVT que expresan el cIFN son útiles para proporcionar la inmunidad mucosal, humoral o mediada por células mejorada contra los virus que provocan la enfermedad aviar incluyendo, pero sin limitación: virus de la enfermedad de Marek, el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de la laringotraqueitis infecciosa, el virus de la bronquitis infecciosa, el virus de la enfermedad bursal infecciosa. El HVT recombinante que expresa el cMGF o el cIFN son útiles para proporcionar una inmunidad mejorada contra la enfermedad aviar causada por los organismos descritos en el Ejemplo 15.

Ejemplo 20A

S-HVT-144

El S-HVT-144 es un herpesvirus recombinante de pavos que contiene el gen de factor de crecimiento mielomonocítico de pollos (cMGF) en un sitio *XhoI* convertido en un sitio *PacI* en el fragmento *EcoRI* nº 9 en la región larga única del HVT. El gen cMGF está en la orientación transcripcional opuesta al marco de lectura abierto (ORF A) en el fragmento *EcoRI* nº 9 del genoma del HVT (Figura 14; SEQ ID NO: 48 y 50). El gen cMGF se expresa desde un promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano. El S-HVT-144 es útil como vacuna para pollos contra la enfermedad de Marek.

El S-HVT-144 se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 672-07.C40 con *NotI*, 672-01.A40 con *NotI*, 751-87.A8 con *AscI*, 415-09.BA1 con *BamHI*.

Ejemplo 20B

HVT recombinante que expresa interferón de pollo

Un herpesvirus recombinante de pavos que contiene el gen de interferón de pollos (cIFN) insertado en un sitio *XhoI* se convirtió en un sitio *PacI* en el fragmento *EcoRI* nº 9 dentro de la región larga única del HVT. El gen del cIFN se expresa desde un promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano. El HVT recombinante que expresa cIFN es útil como vacuna para pollos contra la enfermedad de Marek.

El HVT recombinante que expresa el cIFN se construye de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 672-07.C40 con *NotI*, 672-01.A40 con *NotI*, 761-07.A1 con *AscI*, 415-09.BA1 con *BamHI*.

El HVT recombinante que expresa citoquinas aviares se combinó con HVT que expresa genes de antígenos de la enfermedad aviar para mejorar la respuesta inmune. Las citoquinas adicionales que se expresan en el HVT y tienen efectos estimulantes inmunológicos incluyen, pero sin limitación: el factor beta de crecimiento transformante, la familia de factores de crecimiento epidérmico, los factores de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento de hepatocitos, los factores de crecimiento de tipo insulina, el factor de crecimiento de nervios de tipo B, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento endotelial vascular, interleuquina 1, antagonista del receptor de IL-1, interleuquina 2, interleuquina 3, interleuquina 4, interleuquina, interleuquina 6, receptor soluble de IL-6, interleuquina 7, interleuquina 8, interleuquina 9, interleuquina 10, interleuquina 11, interleuquina 12, interleuquina 13, angiogenina, quimoquinas, factores de estimulación de colonias, factores de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos, eritropoyetina, interferón, gamma-interferón, factor inhibidor de leucemia, oncostatina M, pleiotrofina, inhibidor de proteasa de leucocitos secretores, factor de células madres, factores de necrosis tumoral, y receptores del TNF solubles. Estas citoquinas son de especies aviares u otros animales incluyendo seres humanos, bovinos, equinos, felinos, caninos o porcinos.

Ejemplo 20C

HVT recombinante que expresa genes del virus de la enfermedad de Marek y el gen del interferón de pollo

Un herpesvirus recombinante de pavos contiene el gen de interferón de pollos (cIFN) insertado en un sitio *XhoI* convertido en un sitio *PacI* en el fragmento *EcoRI* nº 9 dentro de la región larga única del HVT y además contiene los genes gA, gD y gB del MDV insertados en un sitio *StuI* único convertido en un sitio *HindIII* en el gen US2 del HVT. El gen del cIFN se expresa desde un promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano. Los genes del MDV se expresan desde los promotores del MDV endógenos. El HVT recombinante que expresa el cIFN y los genes gA, gB y gD del MDV es útil como vacuna con una respuesta inmune mejorada para pollos contra la enfermedad de Marek.

El HVT recombinante que expresa los genes del MDV y el gen del cIFN se construye de acuerdo con el Método de la generación de herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usó la combinación siguiente de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.Ba2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 672-07.C40 con *NotI*, 672-01.A40 con *NotI*, 761-07.A1 con *AscI*, 721-38.1J sin corte.

Ejemplo 20D

HVT recombinante que expresa los genes del virus de la enfermedad de Marek, los genes del virus de la enfermedad de Newcastle y el gen del interferón de pollos

Un herpesvirus recombinante de pavos contiene el gen de interferón de pollos (cIFN) insertado en un sitio *XhoI* convertido en un sitio *PacI* en el fragmento *EcoRI* nº 9 en la región larga única de HVT y contiene además los genes gA, gD y gB del MDV, y los genes HN y F NDV insertados en el sitio *StuI* único convertido en el sitio *HindIII* en el gen US2 del HVT. El gen del cIFN se expresa desde un promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano. Los genes del MDV se expresan desde los promotores del MDV endógenos. El gen HN del NDV está bajo el control del promotor gX del PRV y el gen F del NDV está bajo el control del promotor temprano inmediato del HCMV. El HVT recombinante que expresa el gen del cIFN y los genes gA, gB y gD del MDV es útil como vacuna con una respuesta inmune mejorada para pollos contra la enfermedad de Marek y la enfermedad de Newcastle.

El HVT recombinante que expresa los genes del MDV, los genes del NDV y el gen del cIFN se construye de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y de enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 672-07.C40 con *NotI*, 672-01.A40 con *NotI*, 761-07.A1 con *AscI*, 722-60.E2 sin corte.

Ejemplo 20E

HVT recombinante que expresa los genes del virus de la enfermedad de Marek y el gen del factor de crecimiento mielomonocítico de pollos

Un herpesvirus recombinante de pavos contiene el gen del factor de crecimiento mielomonocítico de pollos (cMGF) insertado en el sitio *XhoI* convertido en el sitio *PacI* en el fragmento *EcoRI* nº 9 en la región larga única del HVT y contiene además los genes gA, gD y gB del MDV insertados en el sitio *StuI* único convertido en un sitio *HindIII* en el gen US2 del HVT. El gen cMGF se expresa desde un promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano. Los genes del MDV se expresan desde los promotores del MDV endógenos. El HVT recombinante que expresa cMGF y gA, gB y gD del MDV es útil como vacuna para pollos con una respuesta inmune mejorada contra la enfermedad de Marek.

El HVT recombinante que expresa el gen cMGF y los genes del MDV se construyó de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 672-07.C40 con *NotI*, 672-91.A40 con *NotI*, 751-87.A8 con *AscI*, 721-38.J sin corte.

Ejemplo 20F

HVT recombinante que expresa los genes del virus de la enfermedad de Marek, los genes de virus de la enfermedad de Newcastle y el gen del factor de crecimiento mielomonocítico de pollos

Un herpesvirus recombinante de pavos contiene el gen del factor de crecimiento mielomonocítico de pollos (cMGF) insertado en el sitio *XhoI* convertido en un sitio *PacI* en el fragmento *EcoRI* nº 9 en la región larga única del sitio *StuI* y contiene además los genes gA, gD y gB del MDV y los genes HN y F del NDV insertados en el sitio *StuI* único convertido en el sitio *HindIII* en el gen US2 del HVT. El gen de cMGF se expresa desde un promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano. Los genes del MDV se expresan desde los promotores del MDV endógenos. El gen HN del NDV está bajo el control del promotor gX del PRV y el gen F del NDV está bajo el control del promotor temprano inmediato del HCMV. El HVT recombinante que expresa el cIFN y los genes gA, gB y gD del MDV es útil como vacuna con una respuesta inmune mejorada en pollos contra la enfermedad de Marek y la enfermedad de Newcastle.

El HVT recombinante que expresa los genes del MDV, los genes del NDV y el gen del cMGF se construye de acuerdo con el Método para generar herpesvirus recombinantes a partir de fragmentos subgenómicos solapantes. Se usaron las siguientes combinaciones de clones subgenómicos y enzimas: 407-32.2C3 con *NotI*, 172-07.BA2 con *BamHI*, 407-32.5G6 con *NotI*, 672-07.C40 con *NotI*, 672-01.A40 con *NotI*, 751-87.A8 sin corte, 722-60.E2 sin corte.

Ejemplo 21

Herpesvirus recombinante de pavos que expresa antígenos de microorganismos que causan enfermedad

El herpesvirus recombinante de pavos (HVT) es útil para expresar antígenos de microorganismos que causan enfermedad en animales además de a las especies avícolas. El HVT recombinante es útil como vacuna en animales incluyendo, pero limitación humanos, equinos, bovinos, porcinos, caninos y felinos.

El HVT recombinante es útil como vacuna contra las enfermedades equinas cuando los antígenos extraños de las enfermedades o los organismos de las enfermedades se expresan en el vector del HVT, incluyendo pero sin limitación: la gripe equina, el herpesvirus-1 equino y el herpesvirus-4 equino. El HVT recombinante es útil como vacuna contra las

enfermedades bovinas cuando los antígenos extraños de las siguientes enfermedades u organismos de enfermedades se expresan en el vector del HVT, incluyendo pero sin limitación: el herpesvirus de tipo 1 bovino, el virus de la diarrea viral bovina, el virus sincitial respiratorio bovino, el virus de la parainfluenza bovina. El HVT recombinante es útil como vacuna contra las enfermedades de los cerdos cuando los antígenos extraños de las siguientes enfermedades u organismos de enfermedades se expresan en el vector HVT, incluyendo pero sin limitación: el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS/SIRS), el virus del cólera de cerdo, el virus de la gripe de cerdos, el parvovirus de cerdos, el rotavirus de cerdo. El HVT recombinante es útil como vacuna contra las enfermedades felinas o caninas cuando los antígenos extraños de las siguientes enfermedades u organismos de la enfermedad se expresan en el vector del HVT, incluyendo pero sin limitación: el herpesvirus felino, el virus de la leucemia felina, el virus de la inmunodeficiencia felina y la *Dirofilaria immitis* (gusano del corazón). Los microorganismos que causan enfermedad en perros incluyen, pero sin limitación: el herpesvirus canino, el virus del moquillo canino, el adenovirus canino de tipo 1 (hepatitis), el adenovirus de tipo 2 (enfermedad respiratoria), la parainfluenza, la *Leptospira canicola*, la icterohemorragia, el parvovirus, el coronavirus, el *Borrelia burgdorferi*, el herpesvirus canino, la *Bordetella bronchiseptica*, la *Dirofilaria immitis* (gusano del corazón) y virus de la rabia.

Ejemplo 22

Vacunas humanas que usan herpesvirus recombinante de pavos como vector

El herpesvirus recombinante de pavos (HVT) es útil como vacuna contra enfermedades humanas. Por ejemplo, el agente patógeno de la gripe humana es un virus de rápida evolución cuyos epítomos virales neutralizantes están cambiando rápidamente. Una vacuna del HVT recombinante útil es una en la cual los epítomos neutralizantes del virus de la gripe se cambian rápidamente para proteger contra nuevas cepas de virus de la gripe. Los genes HA y NA de la gripe humana se clonan usando una reacción en cadena de la polimerasa en el HVT recombinante. El HVT recombinante es útil como vacuna contra otras enfermedades humanas cuando los antígenos extraños de las siguientes enfermedades u organismos enfermos se expresan en el vector del HVT: virus de superficie y antígenos de núcleo de la hepatitis B; virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana, virus-1 de herpes simplex, virus-2 de herpes simplex, citomegalovirus humano, virus de Epstein-Barr, virus de varicela-zóster, herpesvirus humano-6, herpesvirus humano-7, virus de la gripe humana, virus de anginas, virus *hantaan*, virus de neumonía, rinovirus, poliovirus, virus sincitial respiratorio humano, retrovirus, virus de leucemia de células T humanas, virus de la rabia, virus de paperas, malaria (*Plasmodium falciparum*), *Bordetella pertussis*, Difteria, *Rickettsia prowazekii*, *Borrelia burgdorferi*, toxoide del tétano y antígenos de tumores malignos.

El HVT recombinante que expresa citoquinas humanas se combina con HVT que expresa genes para de los antígenos de la enfermedad humana para mejorar la respuesta inmune. Las citoquinas adicionales incluyen, pero sin limitación: factor beta del crecimiento transformante, la familia de factores de crecimiento epidérmico, los factores de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento de hepatocitos, los factores de crecimiento análogo a insulina, el factor de crecimiento nervioso B, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, un factor de crecimiento endotelial vascular, interleuquina 1, antagonista del receptor de IL-1, interleuquina 2, interleuquina 3, interleuquina 4, interleuquina 5, interleuquina 6, receptor soluble de IL-6, interleuquina 7, interleuquina 8, interleuquina 9, interleuquina 10, interleuquina 11, interleuquina 12, interleuquina 13, angiogenina, quimioquinas, factores estimulantes de colonias, factores estimulantes de colonias de granulocitos-macrófagos, eritropoyetina, interferón, gamma-interferón, factor inhibidor de leucemia, oncostatina M, pleiotrofina, inhibidor de proteasa de leucocitos, factor de células madres, factores de necrosis tumoral, y receptores de TNF solubles de seres humanos y animales se expresan en el HVT y tienen efectos estimulantes de la inmunidad.

Ejemplo 23

Producción mejorada de un herpesvirus recombinante para vacuna de pavos

Las citoquinas, tal como los interferones y las interleuquinas inhiben la replicación o reproducción de los virus en cultivo de células y en animales. La inhibición de la producción del interferón celular o de la interleuquina mejora el crecimiento del HVT recombinante en el cultivo de células. El interferón de pollos (cIFN) expresado en un vector recombinante de viruela de cerdo se añadió a cultivos de células de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) e infectados con SHVT-012 que expresa β -galactosidasa. El cIFN añadido al medio de cultivo de células reduce tanto la expresión de la β -galactosidasa como el título del S-HVT-012 en una manera dependiente de la dosis. Este resultado indica que el crecimiento del HVT está limitado por la adición exógena de interferón de pollo. Se utilizan varias estrategias para mejorar el crecimiento del HVT en las células de CEF mediante la separación o inactivación de la actividad de interferón de pollo en las células de CEF.

En una realización, un anticuerpo neutralizante de interferón de pollo se añade al medio de cultivo para inhibir la actividad de interferón de pollo y mejorar el crecimiento del HVT recombinante en el cultivo de células de CEF. El anticuerpo anti-cIFN se derivó del suero de ratón o de conejo de animales inyectados con la proteína interferón de pollo, preferiblemente el cIFN procede de un virus recombinante de viruela de cerdo que expresa el interferón de pollo.

Los virus de la viruela segregan proteínas inhibitoras de citoquinas como una estrategia de evasión inmune. Un tipo de mecanismo de evasión inmune del virus de la viruela implica receptores solubles de virus de viruela para

interleuquinas, interferón o factores de necrosis tumoral que inactivan las citoquinas y permiten la replicación viral (60). En una realización de la invención, el virus de la viruela de las aves es útil como fuente de proteínas de inhibición de interferón de pollo y otras proteínas de evasión inmune. El medio acondicionado de los cultivos de célula CEF infectadas con FPV se añade a las células de CEF infectadas con HVT para inhibir la actividad del interferón y
 5 aumentar el título del HVT. En una realización adicional, la proteína recombinante inhibidora de interferón de pollo u otra proteína de evasión inmune del virus de la viruela se expresa en un vector en combinación con una composición de vacuna del HVT para aumentar el título del HVT.

Las células de fibroblastos de embrión de pollo se manipularon por ingeniería genética para expresar genes extraños (61). En una realización adicional, una línea de células de CEF negativas al interferón se construye mediante la
 10 introducción de un vector que expresa un gen que codifica RNA antisentido para interferón de pollo en la línea de célula CEF. El HVT recombinante crecido en una línea de células de CEF negativas al interferón demostró títulos de virus mejorados en comparación con el HVT crecido en una línea de células de CEF que producen interferón. En una realización adicional, una línea de células CEF positiva al factor de crecimiento mielomonocítico (cMGF) de pollo se
 15 construye mediante la introducción de un vector que expresa el gen cMGF en las células de CEF. El HVT recombinante crecido en la línea de células de CEF positivas al cMGF demuestra títulos de virus mejorados en comparación con el cultivo del HVT en línea de células de CEF negativas al cMGF.

El HVT recombinante de la presente invención es útil como vacuna contra la enfermedad de Marek y contra
 20 otras enfermedades como se indicó en los ejemplos previos. Un aumento de la eficacia en el crecimiento del HVT recombinante en las células CEF es útil en la producción de la vacuna.

Referencias

- 25 1. **Buckmaster et al.**, *J. Gen Virol.* **69**:2033, 1988.
2. F.A. **Ferrari et al.**, *J. of Bacteriology*, **161**, 556-562, 1985.
3. U. **Gubler** and B. J. **Hoffman**, *Gene* **25**, 263-269.
- 30 4. D. **Hanahan**, *Molecular Biology* **166**, 557-580, 1983.
5. P.J. **Hudson et al.**, *Nucleic Acid Research* **14**, 5001-5012, 1986.
- 35 6. T. **Igarashi et al.**, *10th International Herpesvirus Wookshop. Abstract No. 17*, Ann Arbor, Michigan, August 1985.
7. T. **Ihara et al.**, *Virus Genes* **3**, 127-140, 1989.
- 40 8. M.A. **Innis et al.**, *PCR Protocols A Guide to Methods an Aplications*, 84-91, Academic Press, Inc., San Diego, 1990.
9. R.J. **Isfort et al.**, *9th International Herpesvirus Workshoo, Abstract 146*, Seattle, Washington, Agosto de 1984.
- 45 10. M.N. **Jagadish et al.**, *J. of Virol.* **62**, 10841087, 1988.
11. **Kawai y Nishizawa**, *Mol. and Cell Biol.* **4**, 1172-1174, 1984.
12. B. **Lomnící et al.**, *Journal of Virology* **49**, 970-979, 1984.
- 50 13. **Maniatis et al.**, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
14. D. J. **McGeoch et al.**, *Journal of Molecular Biology*, **181**, 1-13, 1985.
- 55 15. S.L. **McKnight** and R. **Kingsbury**, *Science* **217**, 316-324, 1982.
16. L.J.N. **Ross et al.**, *Journal of General Virology* **70**, 1789-1804, 1989.
17. L.J.N. **Ross et al.**, *Journal of General Virology* **72**, 949-954, 1991.
- 60 18. J. **Sambrook et al.**, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual Second Edition* Cold Spring Harbor Press, 1989.
19. M. **Zijil et al.**, *Journal of Virology* **62**, 2191-2195, 1988.
- 65 20. **Maniatis et al.**, *Intervirology* **16**, 201-217, 1981.
21. S.L. **Mansour et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1359-1363, 1985.

22. C. Thummell *et al.*, *Cell* **33**, 455-464, 1983.

23. D. Scolnick, *Cell* **24**, 135-143, 1981.

24. C. Thummel *et al.*, *Cell* **23**, 825-836, 1981.

25. Y. Haj-Ahmed and F. L. Graham, *Journal of Virology* **57**, 264-274, 1986.

26. M. Mackett *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7415-7419, 1982.

27. D. Panicali and E. Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4927-4931, 1982.

28. E. Paoletti *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 193-197, 1984.

29. G.L. Smith *et al.*, *Nature* **302**, 490-495, 1983.

30. J.H. Gillespie *et al.*, *J. Clin. Microbiology* **23**, 283-288, 1986.

31. D. Panicali *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5364-5368, 1983.

32. G.L. Smith *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 7155-7159, 1983.

33. G.L. Smith *et al.*, *Science* **224**, 397-399, 1984.

34. M. Mackett *et al.*, *Science* **227**, 433-435, 1985.

35. E.S. Mocarski *et al.*, *Cell* **22**, 243-255, 1980.

40. L.E. Post y B. Roizman, *Cell* **25**, 227-232, 1981.

41. K.L. Poffenberger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2690-2694, 1981.

42. M.G. Gibson y P.G. Spear, *Journal of Virology* **48**, 396-404, 1983.

43. G.T.-Y Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6612-6616, 1982.

44. M.F Shih *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5867-5870, 1984.

45. R. Desrosiers *et al.*, *Ninth Annual Herpesvirus Meeting, Seattle, Abstract No. 280*, 1984.

46. M. Arsenakis and B. Roizman, en "The High Technology Route to Virus Vaccines", *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 1985 (*Proceedings of the First Annual Southwest Foundation for Biomedical Research International Symposium*, Houston, Texas, 8-10 de Noviembre de 1984).

47. L.E. Post *et al.*, *Tenth International Herpesvirus Workshop*, Ann Arbor, August 1985.

48. S.B. Mohanty and S.K Dutta, *Veterinary Virology* Lea y Febiger, pubs, Philadelphia, 1981.

49. A.M: Griffin, *Journal of General Virology* **72**, 393-398, 1991.

50. D.R. Thomsen *et al.*, *Gene* **16**, 207-217, 1981.

51. Carpenter, D.E. and Misra, V. *Journal of General Virology* **72**, 3077-3084 (1991).

52. Kibenge, F. S., Jackwood, D. J., Mercado, C.C., *Journal of General Virology* **71**, 569-577 (1990).

53. Fukuchi *et al.*, *J. Virology* **51**, 102-109, 1984.

54. Fukuchi *et al.*, *J. Virology* **53**, 994-997, 1985.

55. Ross, N., *et al.*, *Virus Genes* **7**, 33-51, 1993.

56. Maotani, K.A., *et al.*, *J. Virology* **58**: 657-659, 1986.

57. Ross, L.J.N., *et al.*, *J. General Virology* **64**: 2785-2790, 1983.

58. A. Leutz *et al.*, *EMBO Journal* **8**: 175-182 (1989).

ES 2 278 382 T3

59. M.J. **Sekellick** *et al.*, *Journal of Interferon Research* **14**: 71-79 (1994).

60. G.L. **Smith**, *Journal of General Virology* **74**, 1725-1740 (1993).

5 61. B. **Scgumacher**, *et al.*, *Virology* **203**, 144-148 (1994).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un virus quimérico recombinante que comprende una región genómica viral larga única que existe de forma natural en un herpesvirus de pavos y una región genómica viral corta única que existe de forma natural en un herpesvirus de la enfermedad de Marek.
2. El virus quimérico recombinante de la reivindicación 1, en donde un DNA extraño está insertado en una región del virus quimérico con la capacidad de ser expresado en una célula hospedante.
- 10 3. El virus quimérico recombinante de la reivindicación 2, en donde el DNA extraño codifica un polipéptido antigénico,
4. El virus quimérico recombinante de la reivindicación 2, en donde el DNA extraño codifica una citoquina.
- 15 5. El virus quimérico recombinante de la reivindicación 4, en donde la citoquina es factor de crecimiento mielo-monocítico de pollos (cMGF).
6. El virus quimérico recombinante de la reivindicación 2, en donde el DNA extraño codifica β -galactosidasa.
- 20 7. El virus quimérico recombinante de la reivindicación 3, en donde el DNA extraño codifica un polipéptido antigénico que está naturalmente presente en el virus de la enfermedad de Marek, el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de la laringotraqueitis infecciosa, el virus de la bronquitis infecciosa o el virus de la enfermedad bursal infecciosa.
- 25 8. El virus quimérico recombinante de la reivindicación 7, en donde el polipéptido antigénico es la glicoproteína A o la glicoproteína B del virus de la enfermedad de Marek.
9. El virus quimérico recombinante de la reivindicación 7, en donde el polipéptido antigénico es la proteína de fusión o la hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle.
- 30 10. El virus quimérico recombinante de la reivindicación 7, en donde el polipéptido antigénico es la glicoproteína B, la glicoproteína I o la glicoproteína D del virus de la laringotraqueitis infecciosa.
- 35 11. El virus quimérico recombinante de la reivindicación 7, en donde el polipéptido antigénico es la proteína clavo o la proteína matriz del virus de la bronquitis infecciosa.
12. El virus quimérico recombinante de la reivindicación 7, en donde el polipéptido antigénico es la proteína VP2, VP3 o VP4 del virus de la enfermedad bursal infecciosa.
- 40 13. El virus quimérico recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde el DNA extraño está bajo el control de un promotor de herpesvirus.
14. El virus quimérico recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde el DNA extraño está bajo el control de un promotor heterólogo.
- 45 15. El virus quimérico recombinante de la reivindicación 14, en donde el promotor es un promotor naturalmente asociado con gX de HSV, alfa-4 de HCMV, el promotor temprano inmediato de HCMV, gA de MDV, gB de MDV, gB de ILTV, VP8 de BHV-1.1 o gD de ILTV.
- 50 16. Una vacuna que comprende un virus de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un vehículo adecuado.

55

60

65

FIGURA 1A

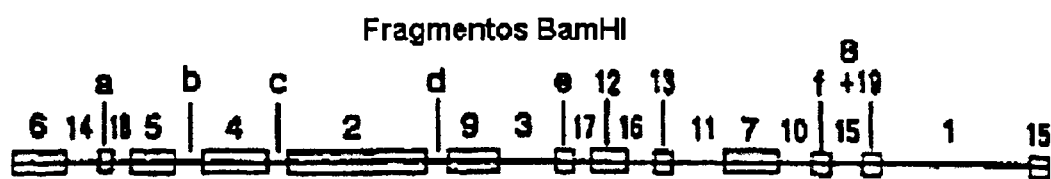


FIGURA 1B

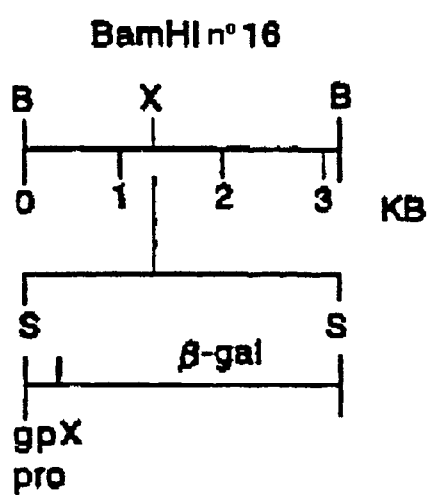
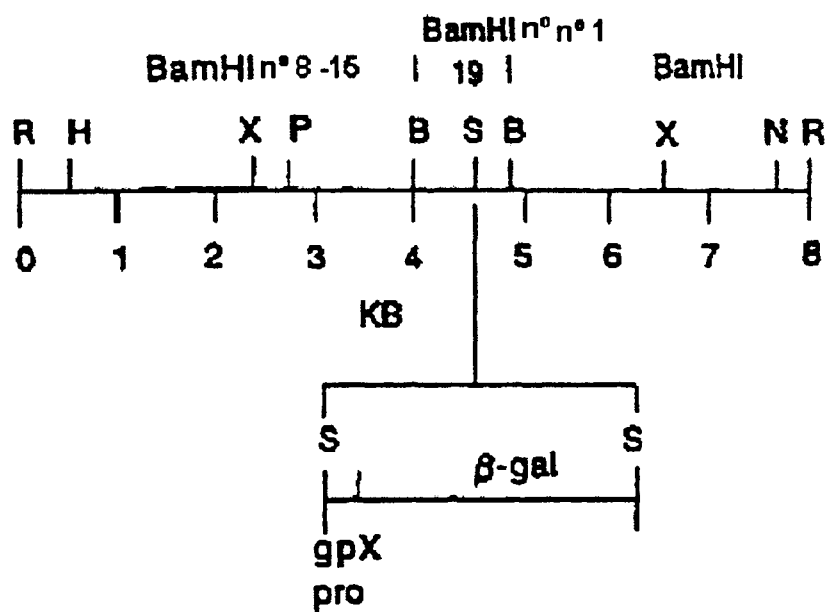


FIGURA 1C



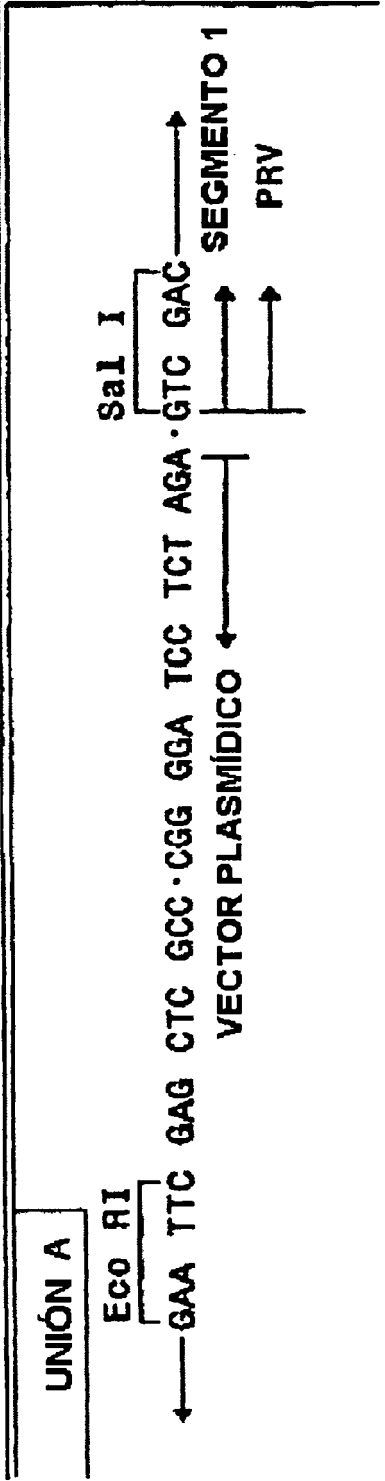
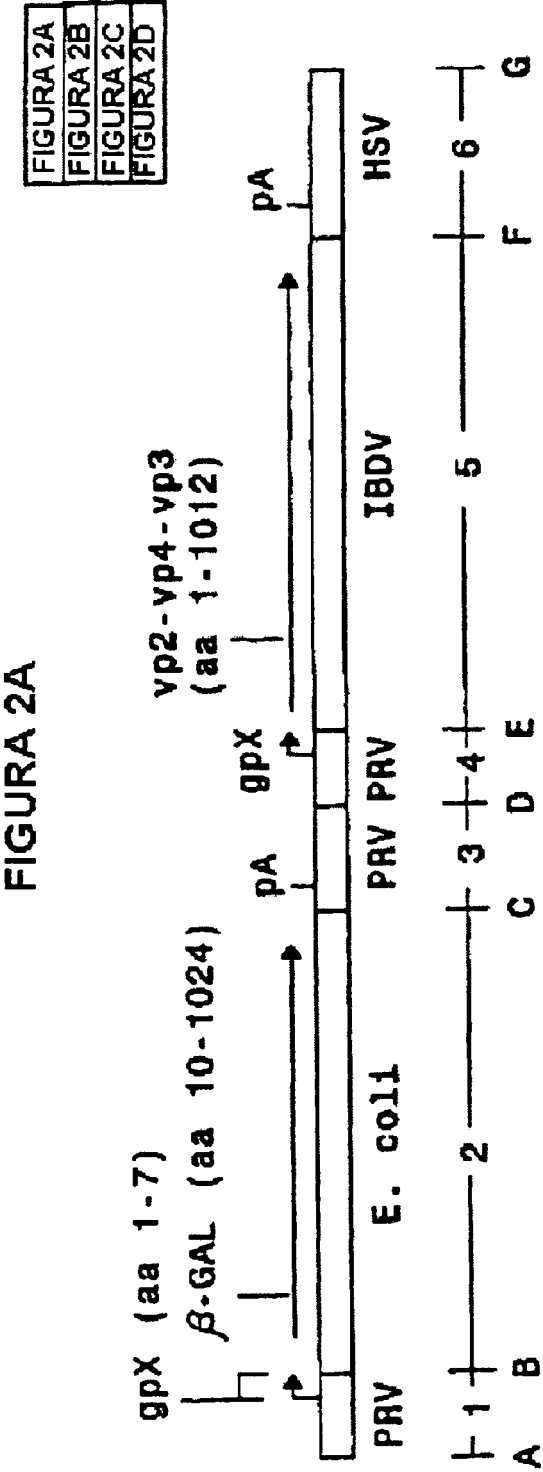


FIGURA 2B

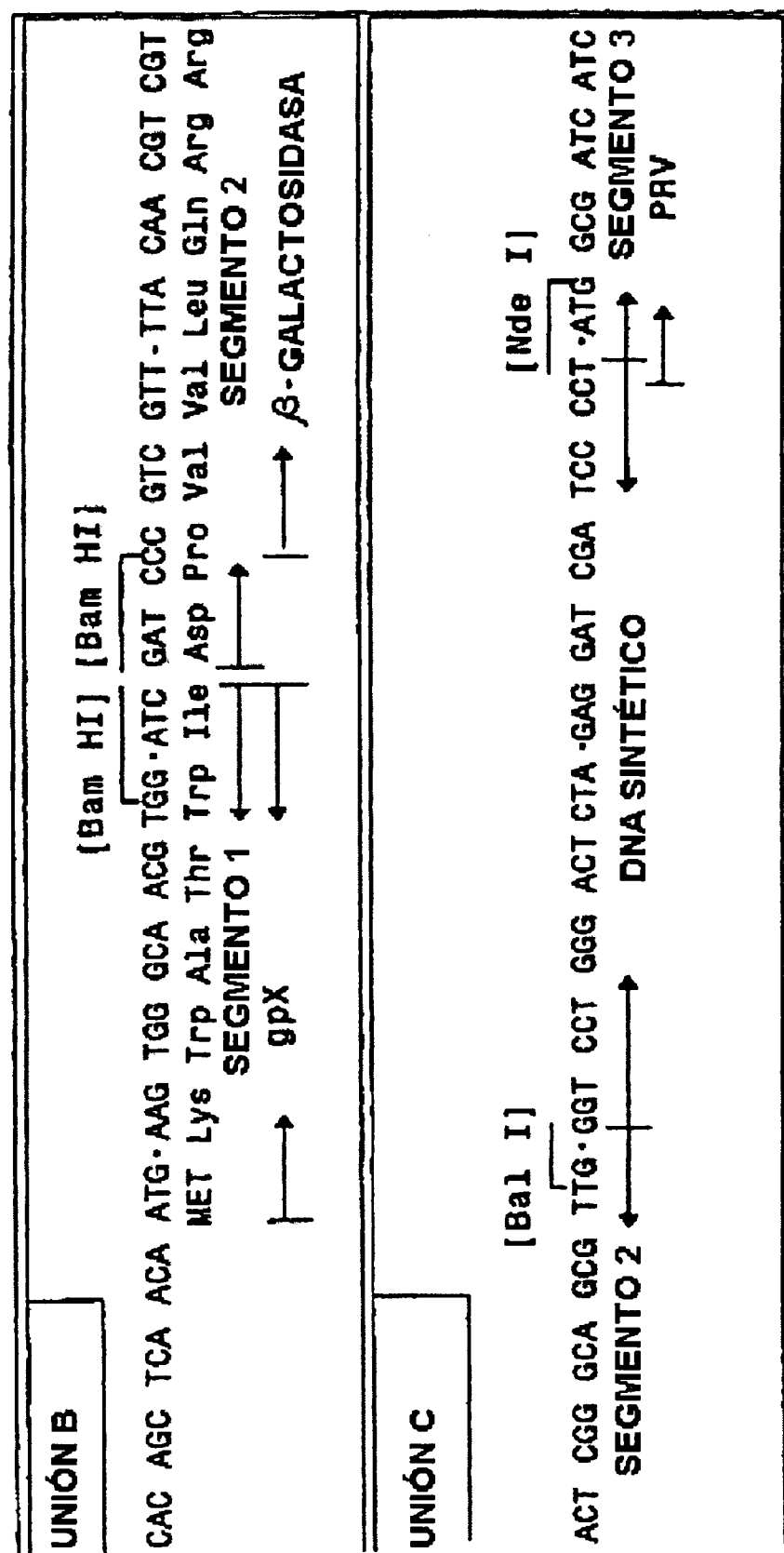


FIGURA 2C

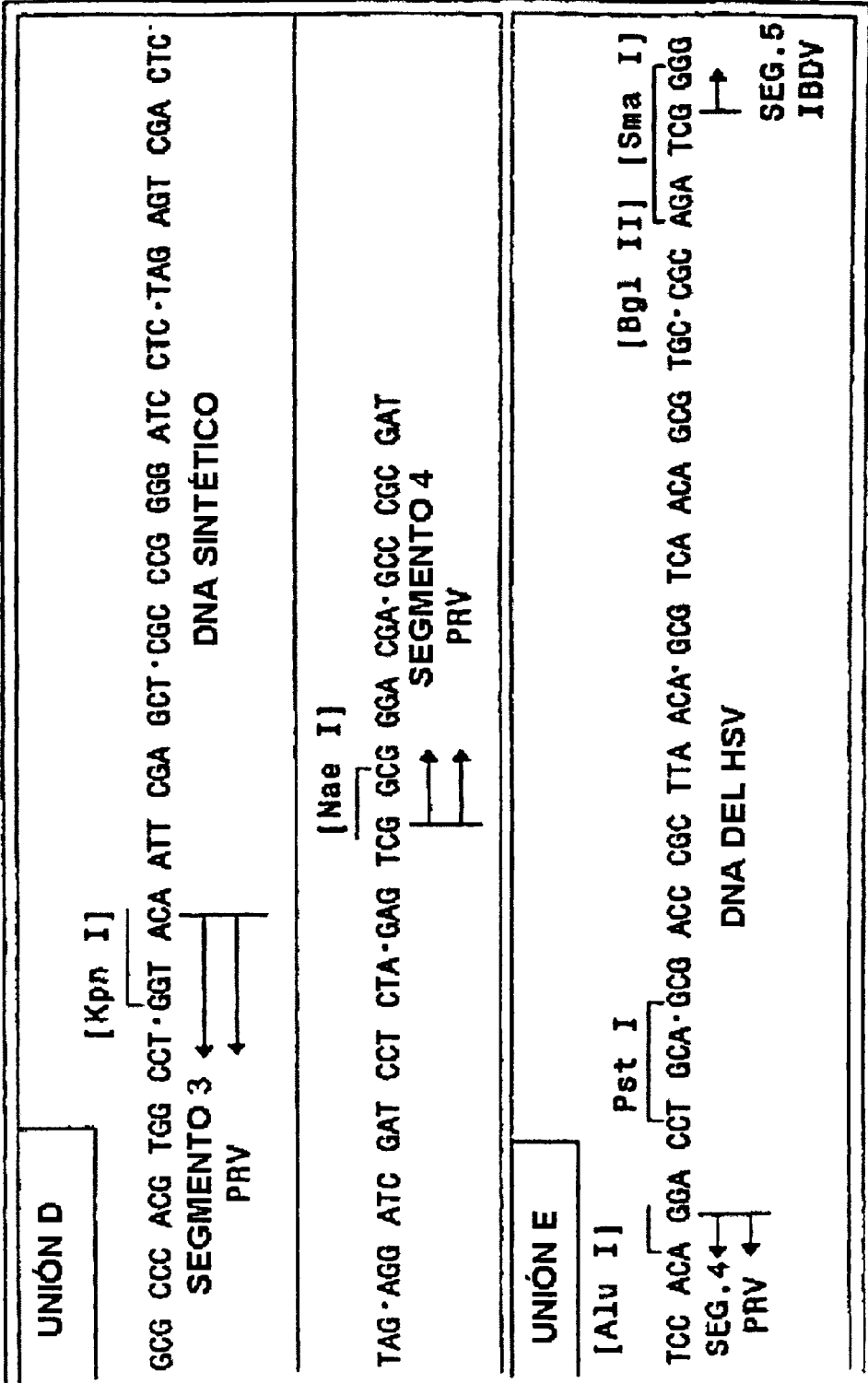


FIGURA 2D

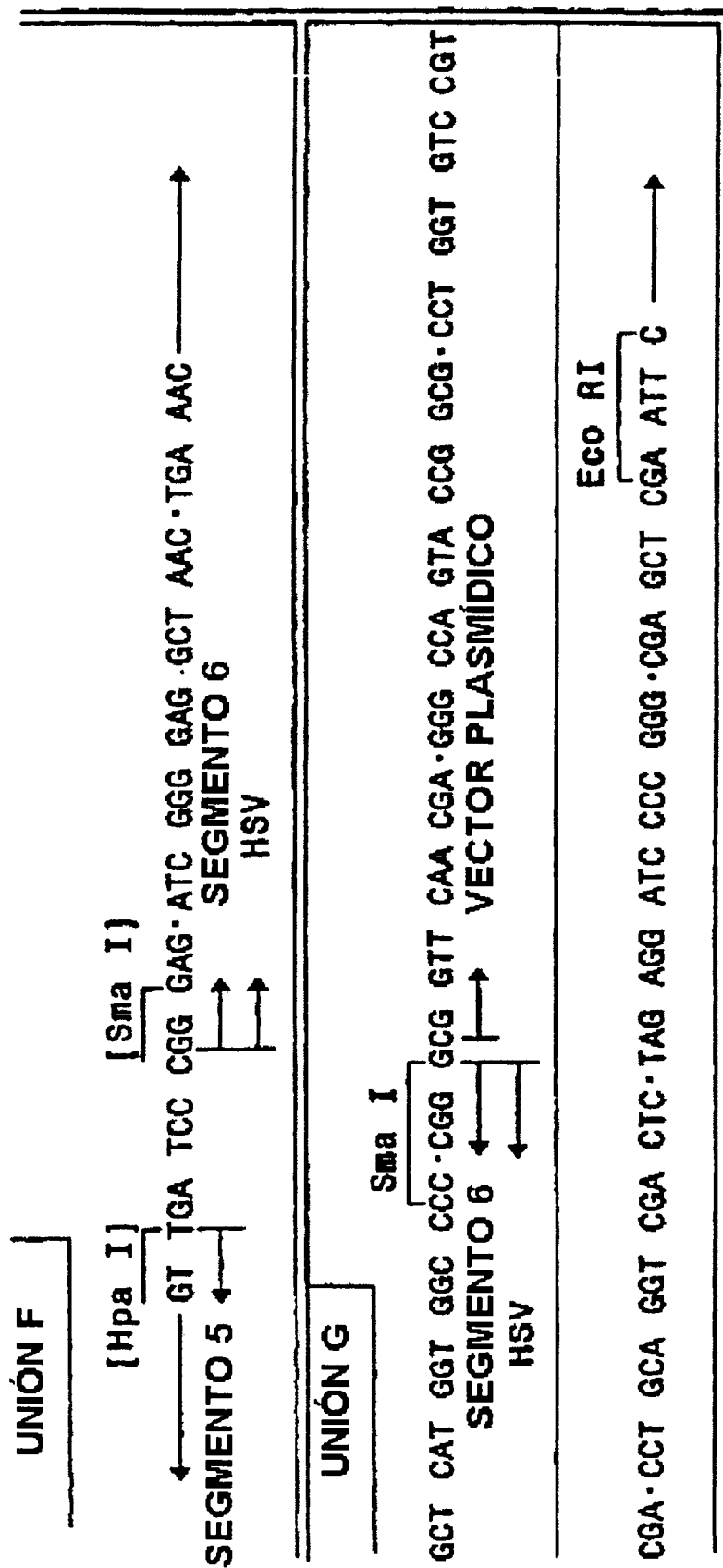


FIGURA 3A

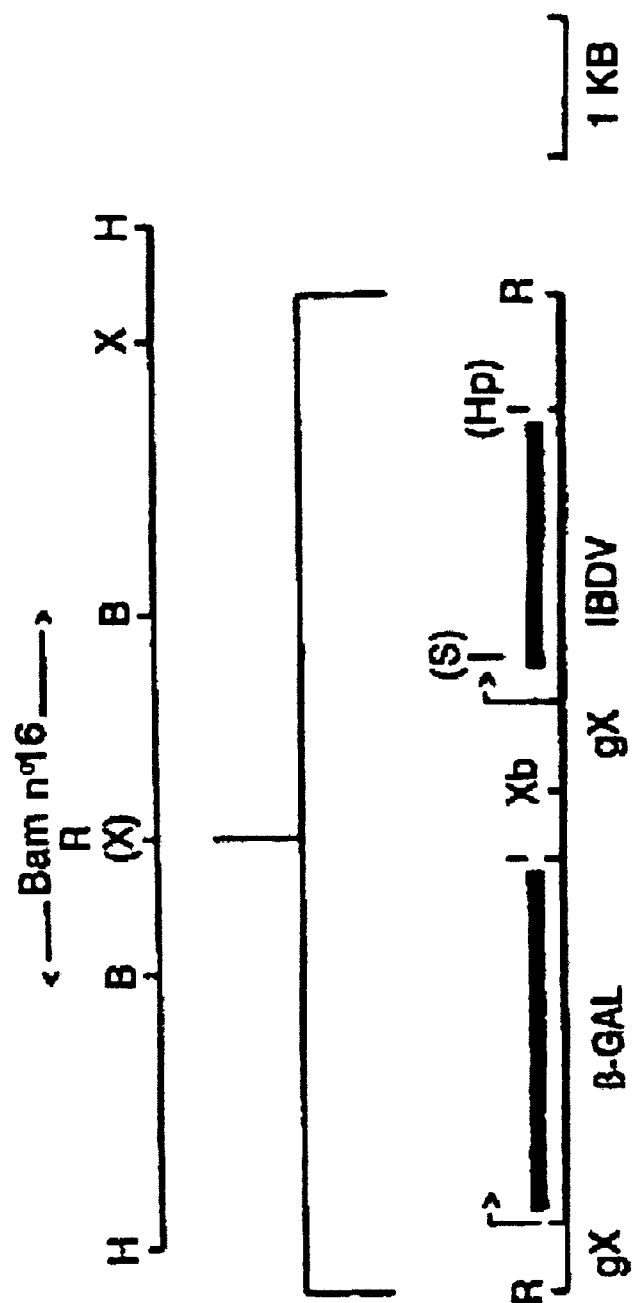


FIGURA 3B

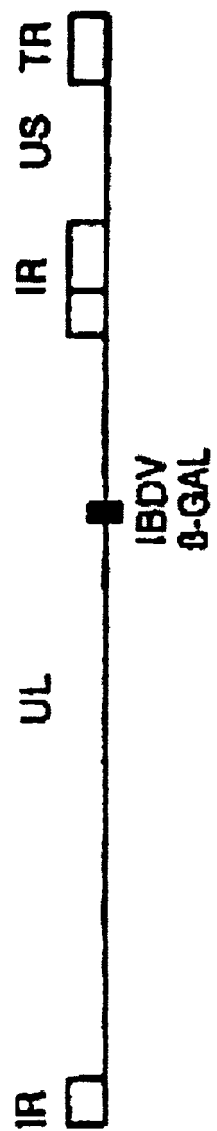


FIGURA 4

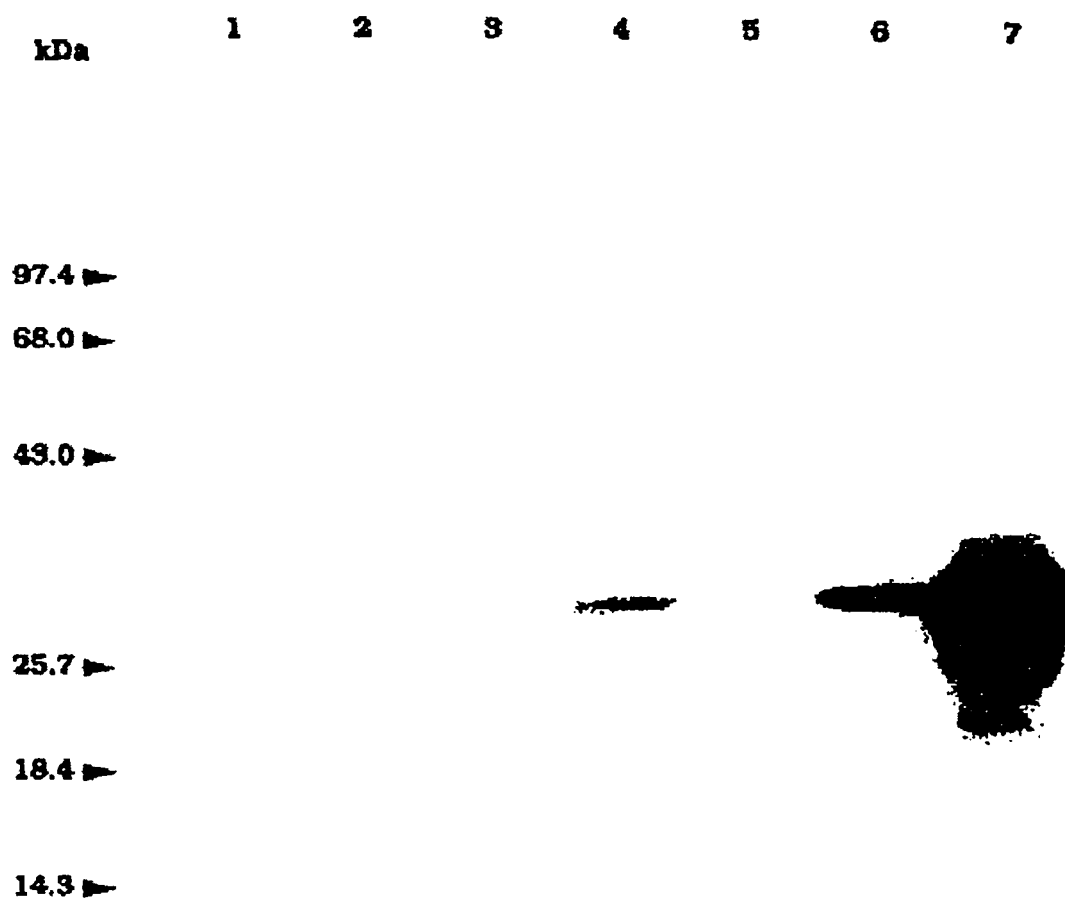


FIGURA 5

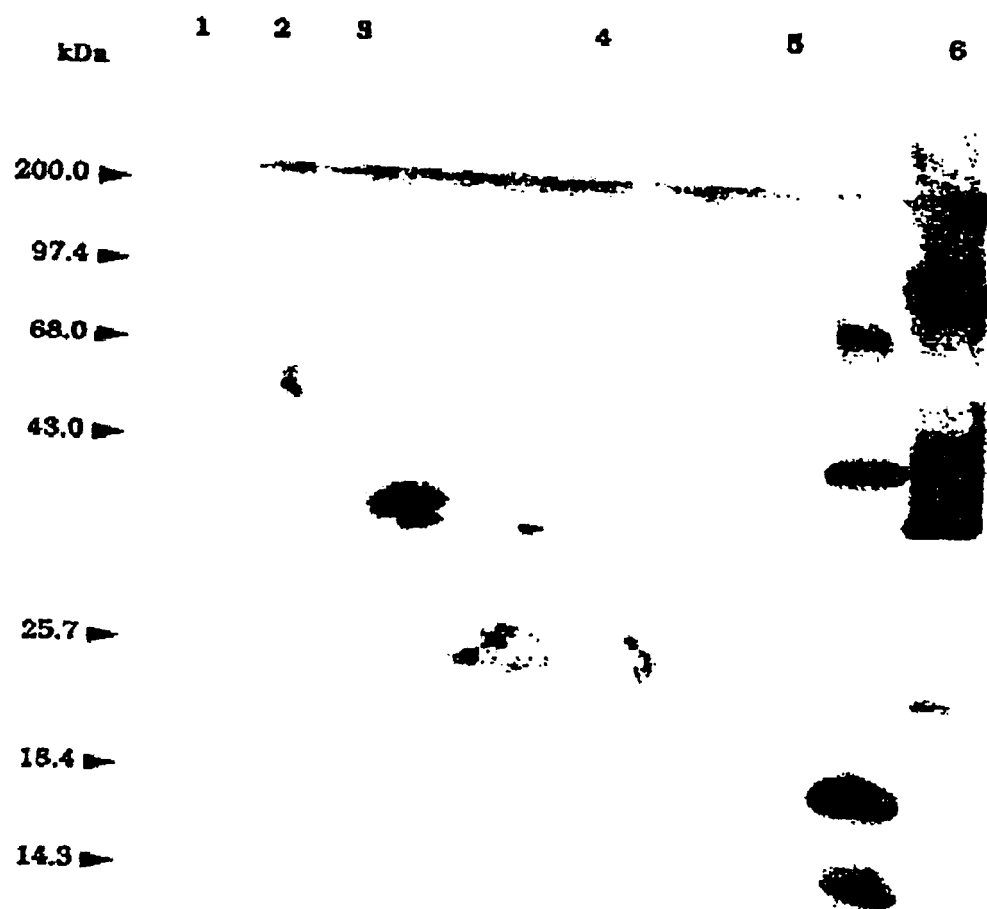


FIGURA 6A

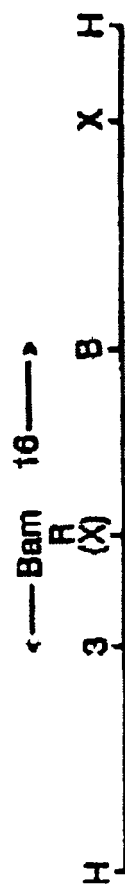


FIGURA 6B

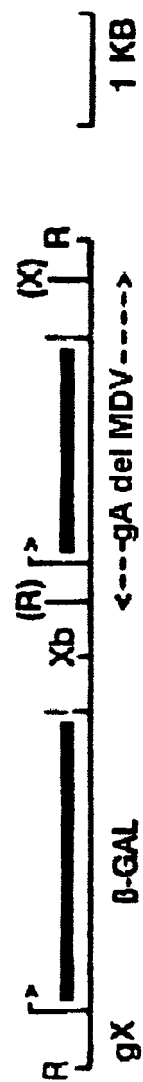


FIGURA 6C

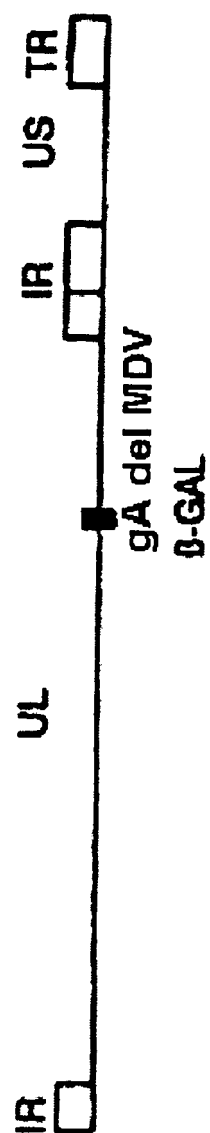


FIGURA 7A

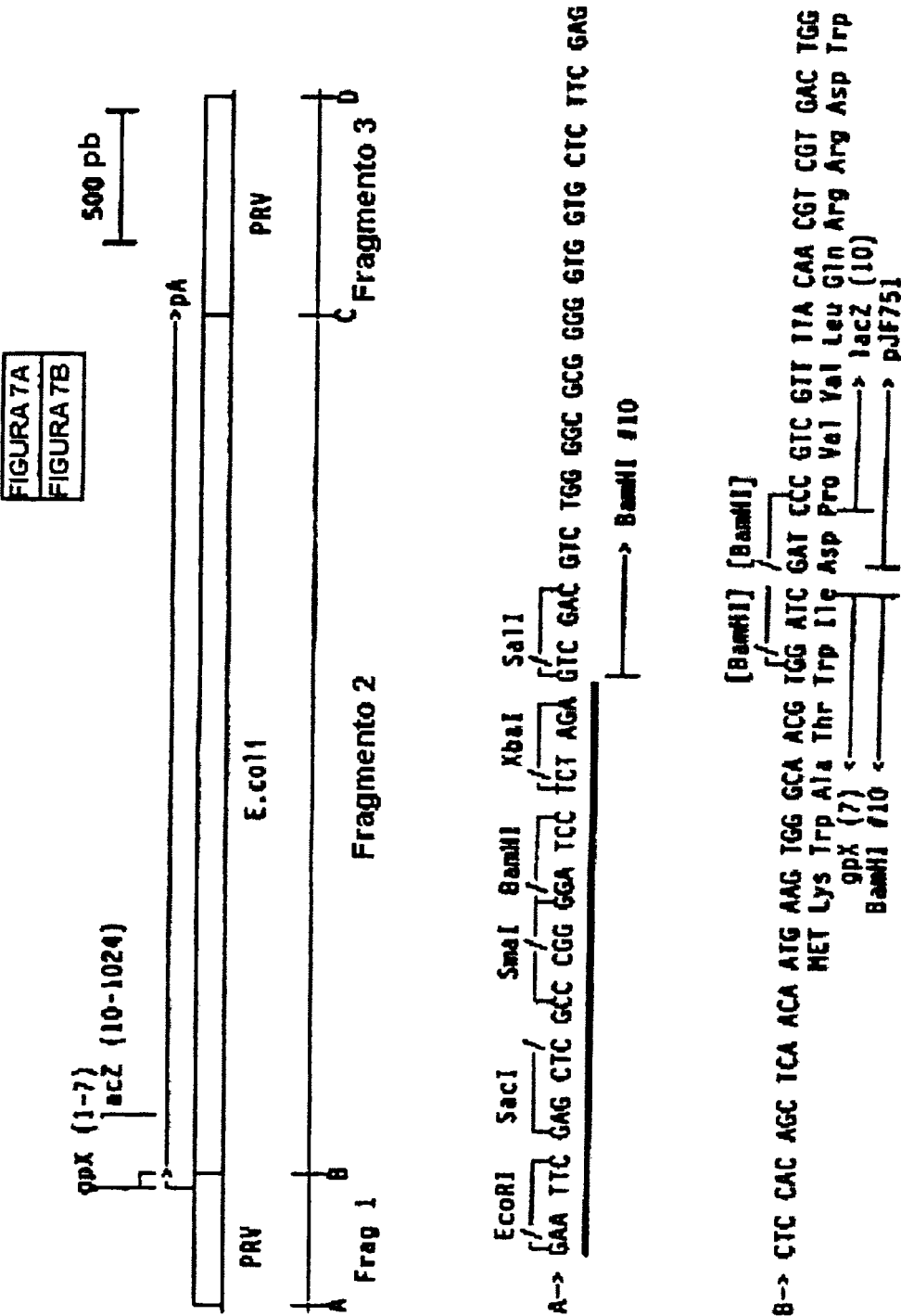


FIGURA 8

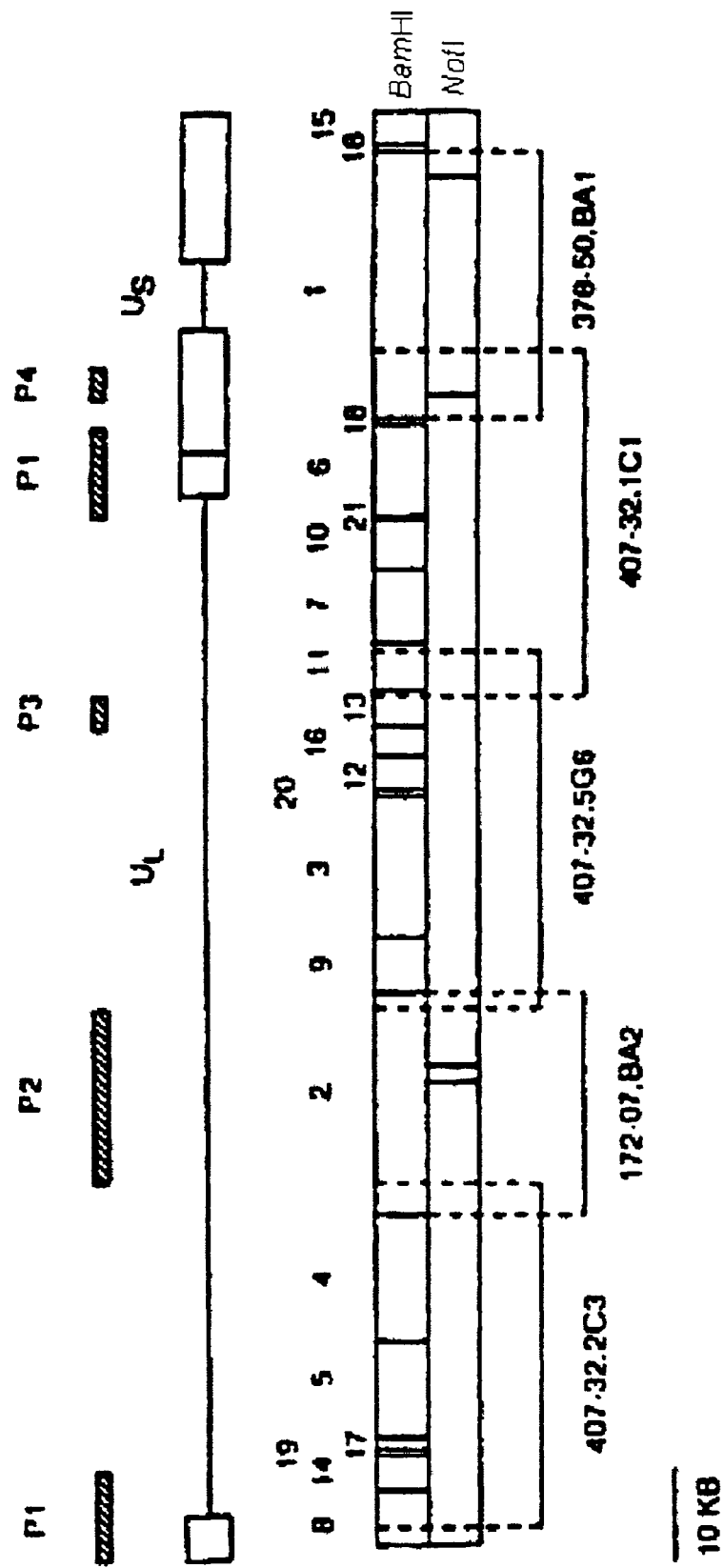


FIGURA 9

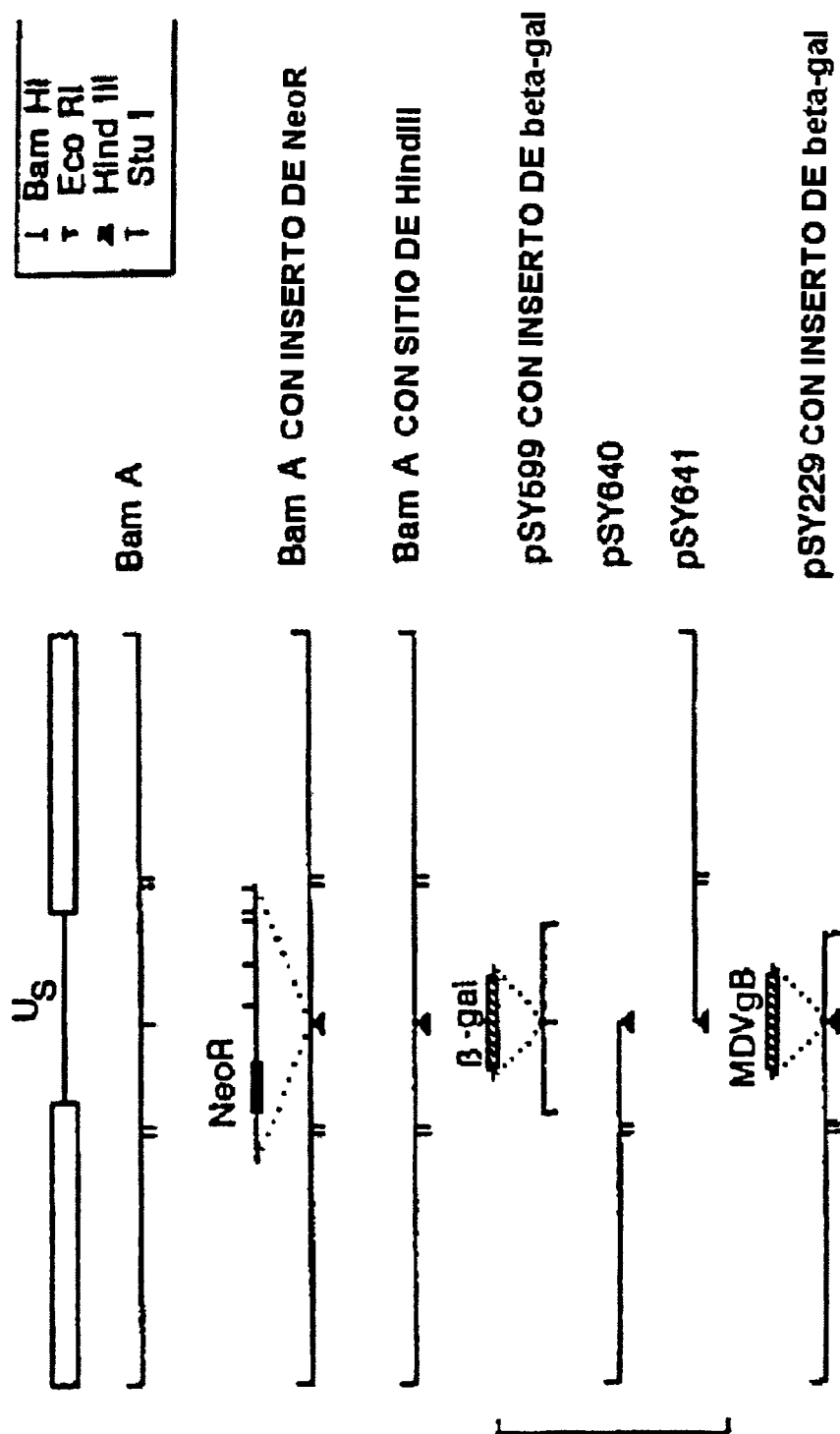
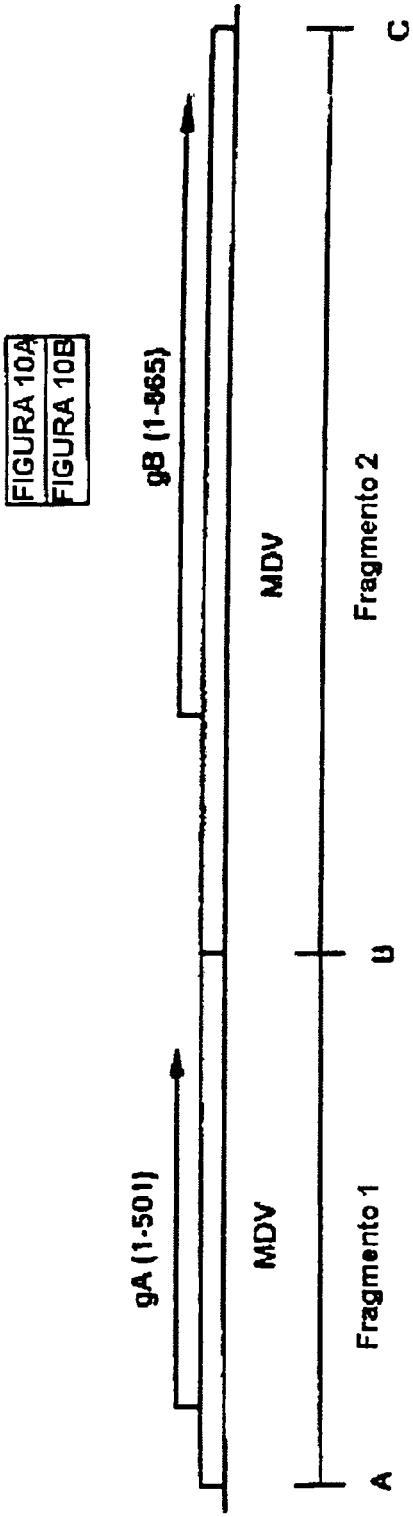


FIGURA 10A



Unión A *Pst*I *Pvu*II

CAGGICGGAAGCCTTGGGCGCCTGGCTATGTAGTGAAATCTATACTGGGATTTCATAACTAGTTTA

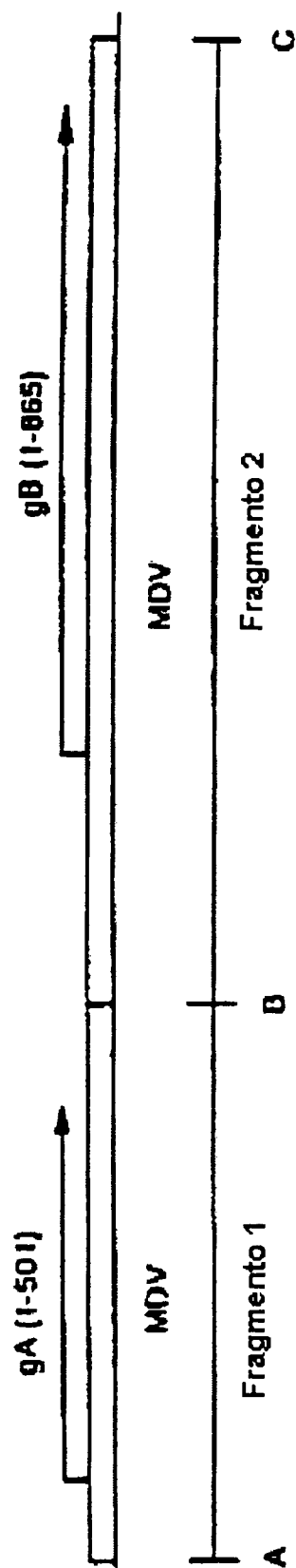
Enlazador Fragmento 1 MDV

Unión B *Eco*RV *Sal*I

AATAATCTAICACITTTGTCATGGAGATGCCCAAGCTTCGACCGACTCCCTTGGCCATGATGAATGG

Fragmento 1 Enlazador Fragmento 2 MDV

FIGURA 10B



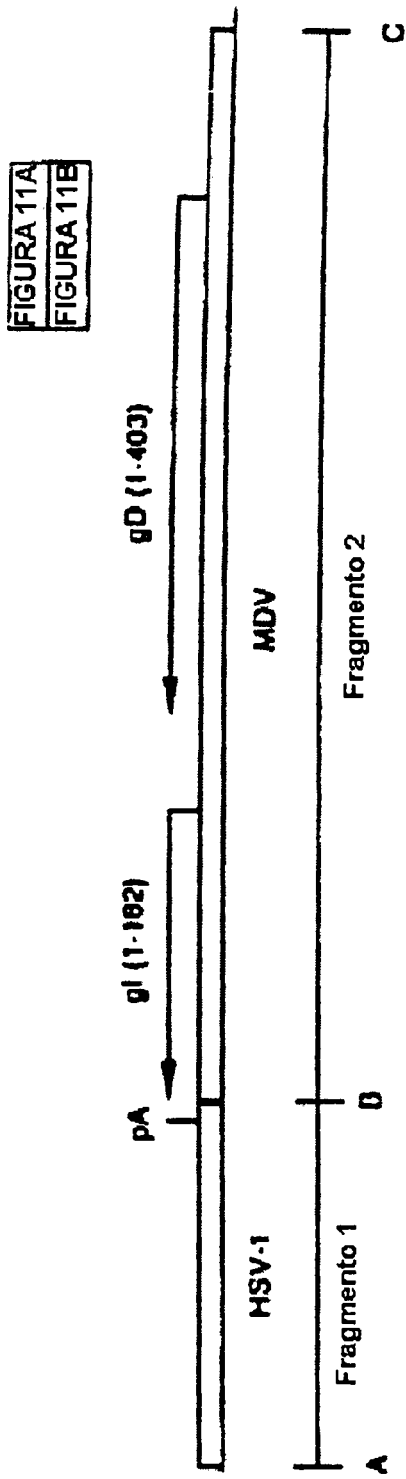
Unión C 1ATACCAGCTACGGCGGTAGCATTGATGGTATCCCGTGATTGCTCGATTCTTCTCTGAAATTC

EcoRI

Fragmento 2

MDV

FIGURA 11A



Unión A

HindIII

AAGCTTGGCCTCGTCGTTAATTAAACCCCAATTCGAGCTCGCCGAGCTTGGGCTGCAGGTCGGGAAC

[SmaI]

Enlazador

Fragmento 1

HSV 1

Unión B

TGTTTCAGTTAGCCCTCCCCCAATCTCCCGACTCTACAGGATCTCGACATAGCGAAATCAATTATGG

[SmaI]

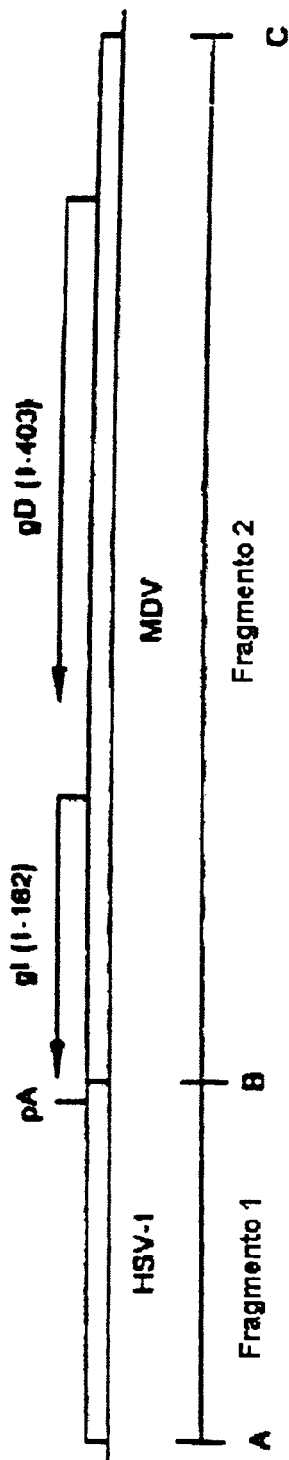
Fragmento 1

HSV 1

Fragmento 2

MDV

FIGURA 11B



Unión C AACGTAATATTTTTCACGACGAGACCACTATTGCCATGGGACTCTAGAGGATCGGGTACCGAGC

Need

Fragmento 2

MDV

Enlazador

Unión C
cont. **TCGAATTGGCAAGCTTGTGCGACTTAATTAAGCGCGGCTTAAACGCCCTTCGAGGCCAAGCCTT** *f: hinc III*

11/12/2011

FIGURA 12A

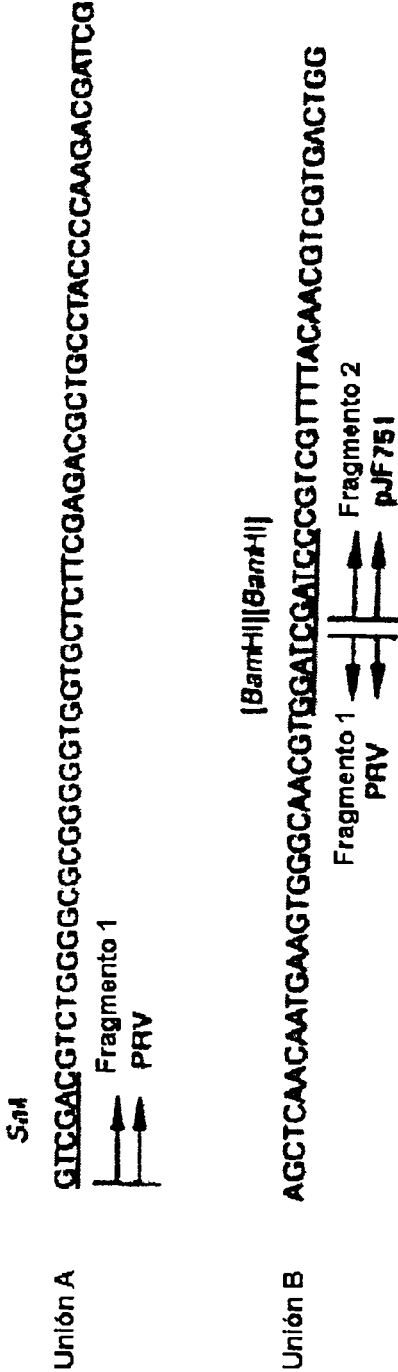
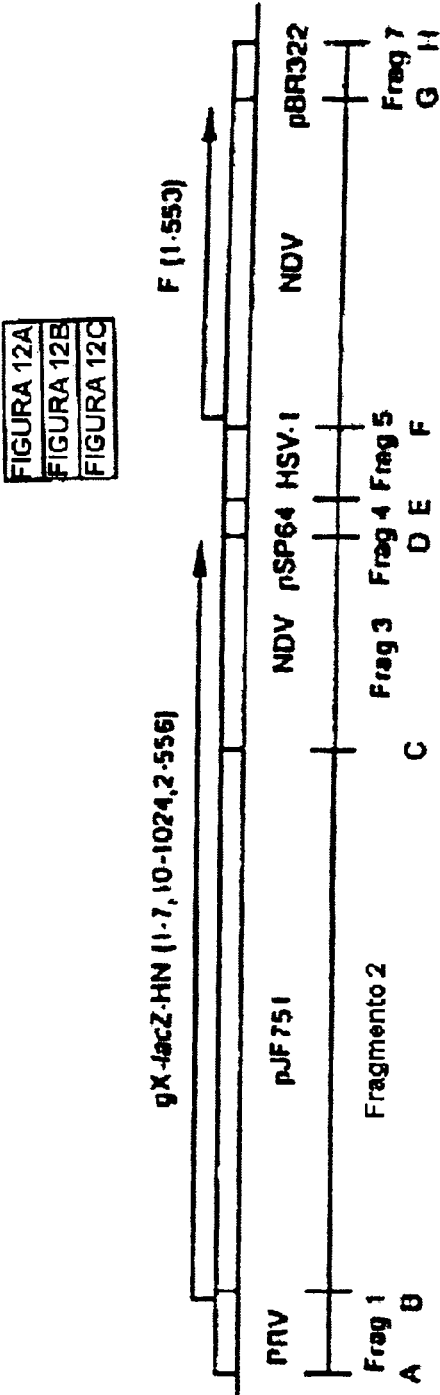


FIGURA 12B

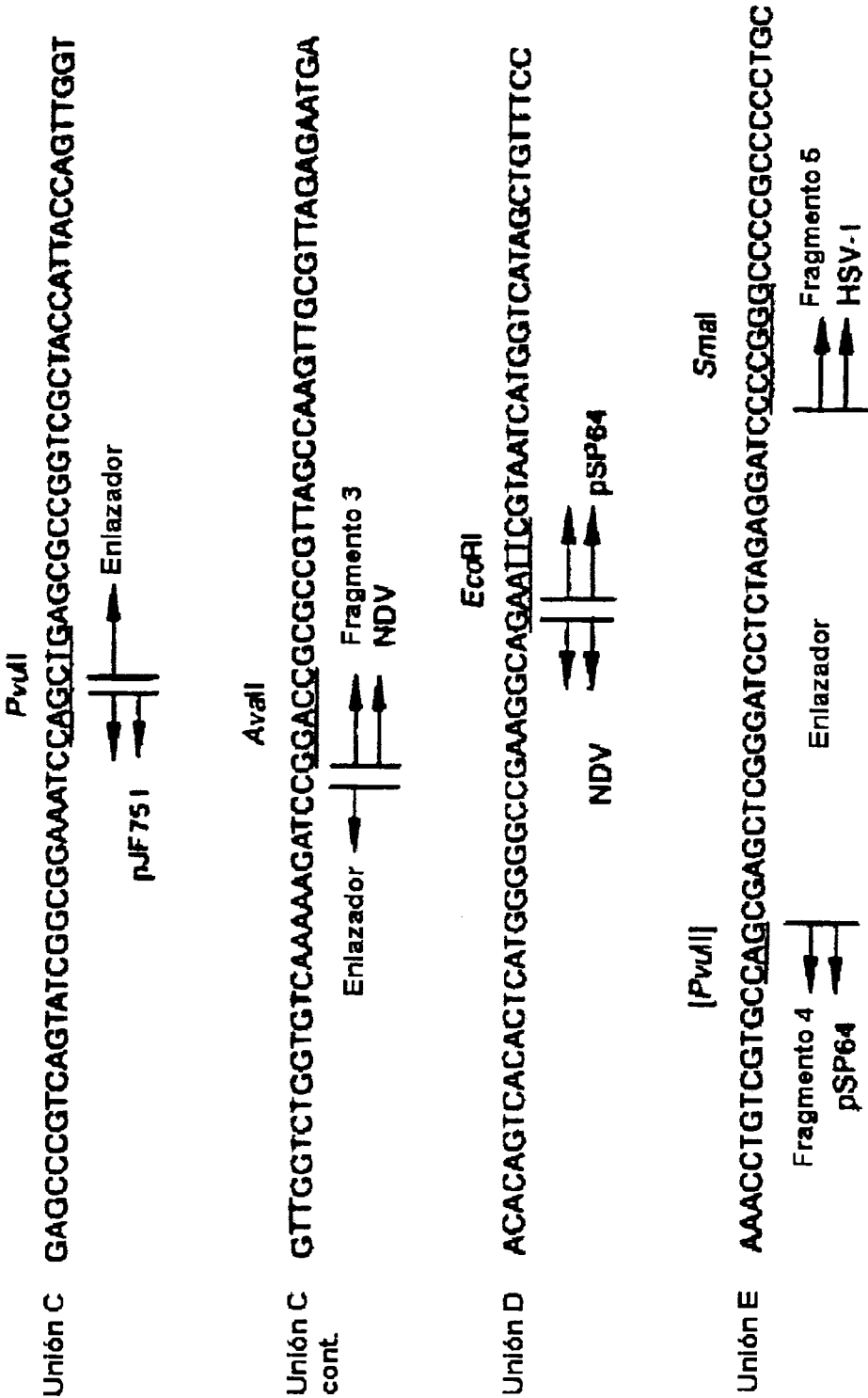


FIGURA 12C

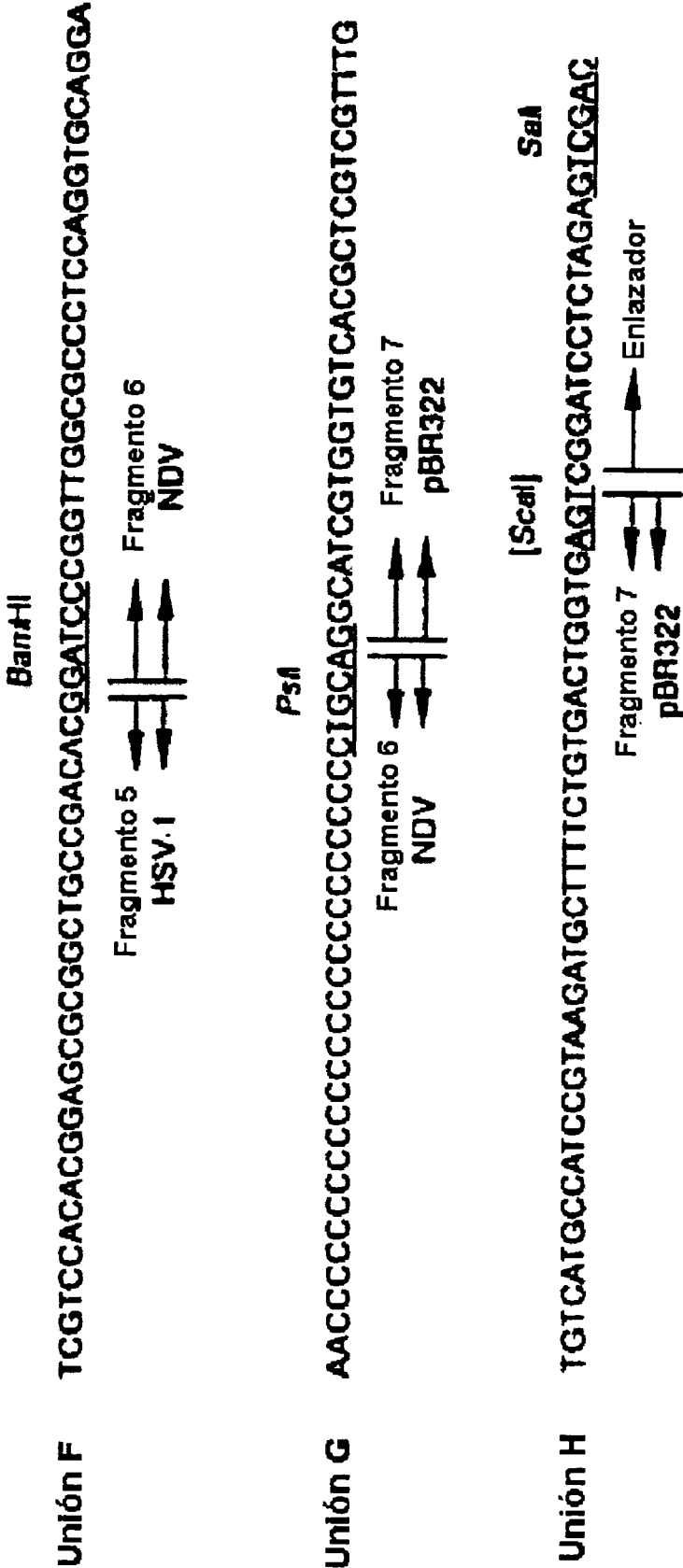


FIGURA 13A

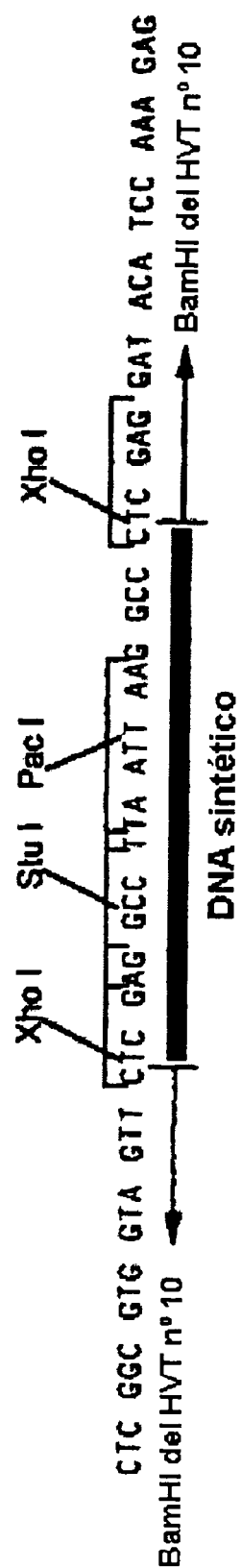


FIGURA 13B

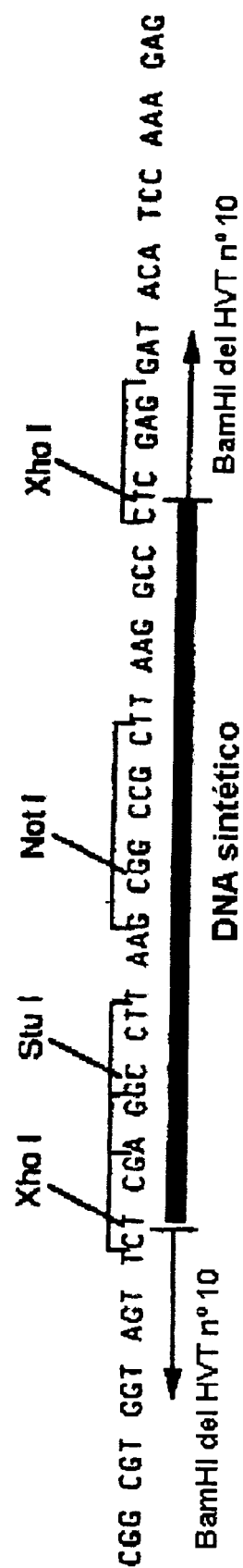


FIGURA 14

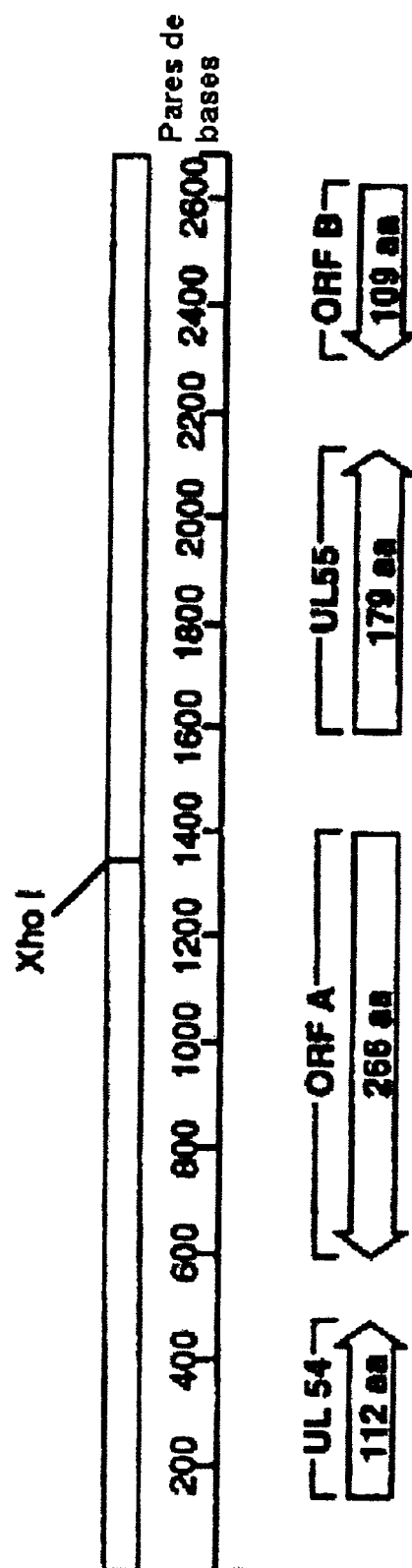
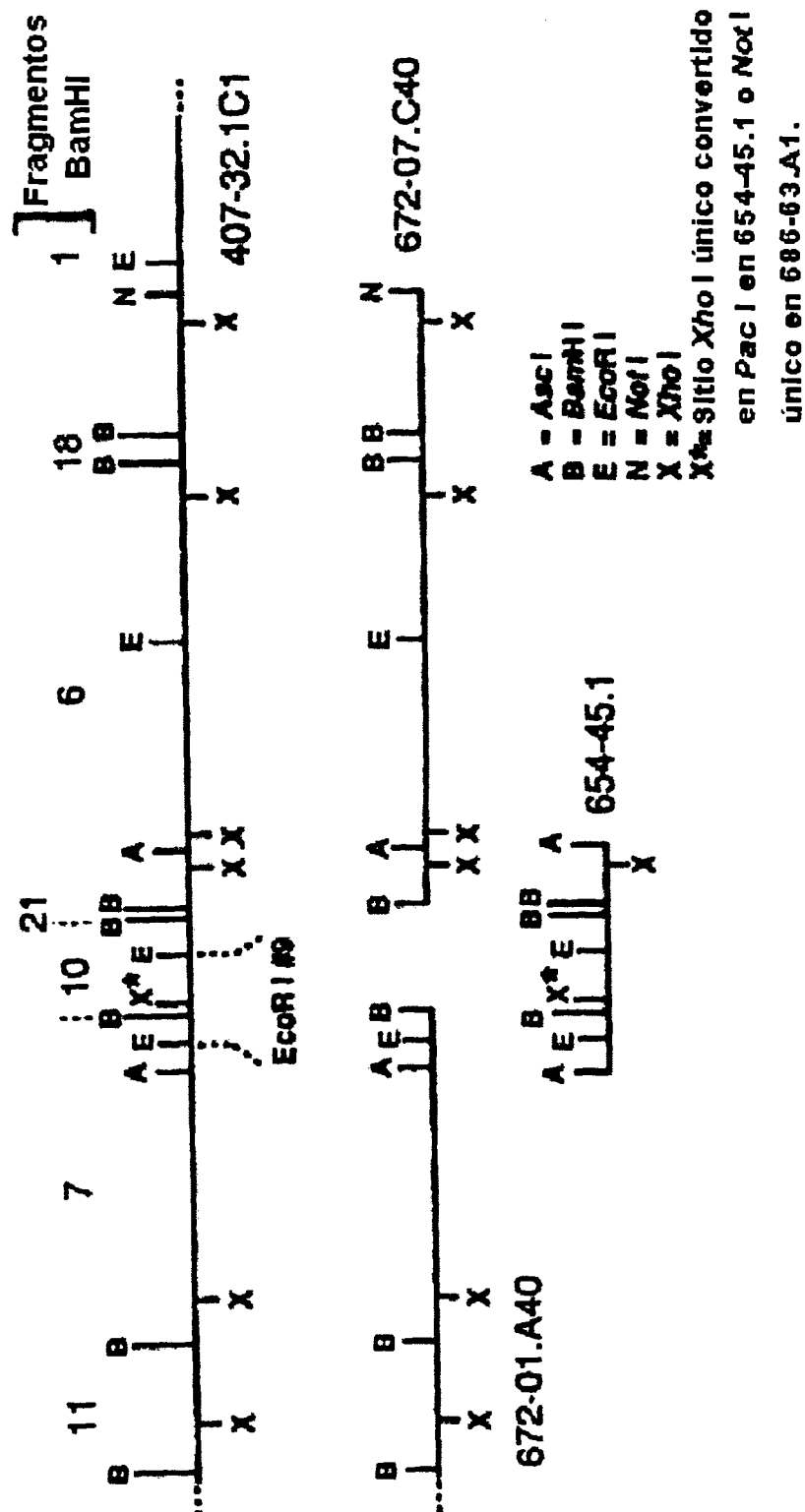


FIGURA 15



ES 2 278 382 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: SYNTRO CORPORATION
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Herpesvirus recombinantes de pavos y sus usos.
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 60
- 10 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: John P. White
- (B) CALLE: 1185 Avenue of the Americas
- 15 (C) CIUDAD: New York
- (D) ESTADO: New York
- (E) PAIS: EE.UU. DE AMÉRICA
- 20 (F) CÓDIGO POSTAL: 10036
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR
- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
- (B) ORDENADOR: IBM, PC COMPATIBLE
- 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAMA: PatentIn Release nº 1.0 Versión nº 1.25
- (vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 09-agosto-1995
- (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (viii) AGENTE/INFORMACIÓN DEL AGENTE
- (A) NOMBRE: White, John P.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 28.678
- 40 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES
- (A) TELÉFONO: (212) 278-0400
- (B) TELEFAX: (212) 391-0526
- 45 (C) TÉLEX: 422523

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 50 (A) LONGITUD: 3350 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- 60 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (ix) ASPECTO:
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- 65 (B) LOCALIZACIÓN: 129..2522
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

ES 2 278 382 T3

	GGATACGATC GGTCTGACCC GGGGGAGTCA CCCGGGGACA GCCGTCAAGG CCTTGTTCCTA	60
	GGATAGAACT CCTCCTTCTA CAACGCTATC ATTGATGGTC AGTAGAGATC AGACAAACGA	120
5	TCGCAGCG ATG ACA AAC CTG CAA GAT CAA ACC CAA CAG ATT GTT CCG TTC Met Thr Asn Leu Gln Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe 1 5 10	170
10	ATA CGG AGC CTT CTG ATG CCA ACA ACC GGA CCG GCG TCC ATT CCG GAG Ile Arg Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Glu 15 20 25 30	210
15	ACA CCC TGG AGA AGC ACA CTC TCA GGT CAG AGA CTG ACC TAC AAT TTG Thr Pro Trp Arg Ser Thr Leu Ser Gly Gln Arg Leu Thr Tyr Asn Leu 35 40 45	266
	ACT GTG GGG GAC ACA GGG TCA GGG CTA ATT GTC TTT TTC CCT GGA TTC Thr Val Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe 50 55 60	314
20	CCT GGC TCA ATT GTG GGT GCT CAC TAC ACA CTG CAG AGC AAT GGG AAC Pro Gly Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Ser Asn Gly Asn 65 70 75	362
25	TAC AAG TTC GAT CGG ATG CTC CTG ACT GCC CAG AAC CTA CCG GCC AGT Tyr Lys Phe Asp Arg Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser 80 85 90	410
	TAC AAC TAC TGC AGG CTA GTG AGT CGG AGT CTC ACA GTG AGG TCA AGC Tyr Asn Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser 95 100 105 110	450
30	ACA CTT CCT GGT GGC GTT TAT GCA CTA AAC GGC ACC ATA AAC GCC GTG Thr Leu Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val 115 120 125	506
35	ACC TTC CAA GGA AGC CTG AGT GAA CTG ACA GAT GTT AGC TAC AAT GGG Thr Phe Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly 130 135 140	554
	TTG ATG TCT GCA ACA GCC AAC ATC AAC GAC AAA ATT GGG AAC GTC CTA Leu Met Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu 145 150 155	602
40	GTA GGG GAA GGG GTC ACC GTC CTC AGC TTA CCC ACA TCA TAT GAT CTT Val Gly Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu 160 165 170	650
45	GGG TAT GTG AGG CTT GGT GAC CCC ATT CCC GCA ATA GGG CTT GAC CCA Gly Tyr Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro 175 180 185 190	698
	AAA ATG GTA GCC ACA TGT GAC AGC AGT GAC AGG CCC AGA GTC TAC ACC Lys Met Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr 195 200 205	746
50	ATA ACT GCA GCC GAT GAT TAC CAA TTC TCA TCA CAG TAC CAA CCA GGT Ile Thr Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly 210 215 220	794
55	GGG GTA ACA ATC ACA CTG TTC TCA GCC AAC ATT GAT GCC ATC ACA AGC Gly Val Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser 225 230 235	842
	CTC AGC GTT GGG GGA GAG CTC GTG TTT CGA ACA AGC GTC CAC GGC CTT Leu Ser Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu 240 245 250	890
60	GTA CTG GGC GCC ACC ATC TAC CTC ATA GGC TTT GAT GGG ACA ACG GTA Val Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val 255 260 265 270	930
65	ATC ACC AGG GCT GTG GCC GCA AAC ACT GGG CTG ACG ACC GGC ACC GAC Ile Thr Arg Ala Val Ala Ala Asn Thr Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp 275 280 285	986

ES 2 278 382 T3

5	AAC CTT ATG CCA TTC AAT CTT GTG ATT CCA ACA AAC GAG ATA ACC CAG Asn Leu Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln 290 295 300	1034
10	CCA ATC ACA TCC ATC AAA CTG GAG ATA GTG ACC TCC AAA AGT GGT GGT Pro Ile Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly 305 310 315	1082
15	CAG GCA GGG GAT CAG ATG TTA TGG TCG GCA AGA GGG AGC CTA GCA GTG Gln Ala Gly Asp Gln Met Leu Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val 320 325 330	1130
20	ACG ATC CAT GGT GGC AAC TAT CCA GGG GCC CTC CGT CCC GTC ACG CTA Thr Ile His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu 335 340 345 350	1178
25	GTG GCC TAC GAA AGA GTG GCA ACA GGA TCC GTC GTT ACG GTC GCT GGG Val Ala Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly 355 360 365	1226
30	GTG AGC AAC TTC GAG CTG ATC CCA AAT CCT GAA CTA GCA AAG AAC CTG Val Ser Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu 370 375 380	1274
35	GTT ACA GAA TAC GGC CGA TTT GAC CCA GGA GCC ATG AAC TAC ACA AAA Val Thr Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys 385 390 395	1322
40	TTG ATA CTG AGT GAG AGG GAC CGT CTT GGC ATC AAG ACC GTC TGG CCA Leu Ile Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro 400 405 410	1370
45	ACA AGG GAG TAC ACT GAC TTT CGT GAA TAC TTC ATG GAG GTG GCC GAC Thr Arg Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp 415 420 425 430	1418
50	CTC AAC TCT CCC CTG AAG ATT GCA GGA GCA TTC GGC TTC AAA GAC ATA Leu Asn Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile 435 440 445	1466
55	ATC CGG GCC ATA AGG AGG ATA GCT GTG CCG GTG GTC TCC ACA TTG TTC Ile Arg Ala Ile Arg Arg Ile Ala Val Pro Val Val Ser Thr Leu Phe 450 455 460	1514
60	CCA CCT GCC GCT CCC CTA GCC CAT GCA ATT GGG GAA GGT GTA GAC TAC Pro Pro Ala Ala Pro Leu Ala His Ala Ile Gly Glu Gly Val Asp Tyr 465 470 475	1562
65	CTG CTG GGC GAT GAG GCA CAG GCT GCT TCA GGA ACT GCT CGA GCC GCG Leu Leu Gly Asp Glu Ala Gln Ala Ala Ser Gly Thr Ala Arg Ala Ala 480 485 490	1610
70	TCA GGA AAA GCA AGA GCT GCC TCA GGC CGC ATA AGG CAG CTG ACT CTC Ser Gly Lys Ala Arg Ala Ala Ser Gly Arg Ile Arg Gln Leu Thr Leu 495 500 505 510	1658
75	GCC GCC GAC AAG GGG TAC GAG GTA GTC GCG AAT CTA TTC CAG GTG CCC Ala Ala Asp Lys Gly Tyr Glu Val Val Ala Asn Leu Phe Gln Val Pro 515 520 525	1706
80	CAG AAT CCC GTA GTC GAC GGG ATT CTT GCT TCA CCT GGG GTA CTC CGC Gln Asn Pro Val Val Asp Gly Ile Leu Ala Ser Pro Gly Val Leu Arg 530 535 540	1754
85	GGT GCA CAC AAC CTC GAC TGC GTG TTA AGA GAG GGT GCC ACG CTA TTC Gly Ala His Asn Leu Asp Cys Val Leu Arg Glu Gly Ala Thr Leu Phe 545 550 555	1802

ES 2 278 382 T3

	CCT GTG GTT ATT ACG ACA GTG GAA GAC GCC ATG ACA CCC AAA GCA TTG	1850
	Pro Val Val Ile Thr Thr Val Glu Asp Ala Met Thr Pro Lys Ala Leu	
	560 565 570	
5	AAC AGC AAA ATG TTT GCT GTC ATT GAA GGC GTG CGA GAA GAC CTC CAA	1898
	Asn Ser Lys Met Phe Ala Val Ile Glu Gly Val Arg Glu Asp Leu Gln	
	575 580 585 590	
10	CCT CCA TCT CAA AGA GGA TCC TTC ATA CGA ACT CTC TCT GGA CAC AGA	1946
	Pro Pro Ser Gln Arg Gly Ser Phe Ile Arg Thr Leu Ser Gly His Arg	
	595 600 605	
15	GTC TAT GGA TAT GCT CCA GAT GGG GTA CTT CCA CTG GAG ACT GGG AGA	1994
	Val Tyr Gly Tyr Ala Pro Asp Gly Val Leu Pro Leu Glu Thr Gly Arg	
	610 615 620	
20	GAC TAC ACC GTT GTC CCA ATA GAT GAT GTC TGG GAC GAC AGC ATT ATG	2042
	Asp Tyr Thr Val Val Pro Ile Asp Asp Val Trp Asp Asp Ser Ile Met	
	625 630 635	
25	CTG TCC AAA GAT CCC ATA CCT CCT ATT GTG GGA AAC AGT GGA AAT CTA	2090
	Leu Ser Lys Asp Pro Ile Pro Pro Ile Val Gly Asn Ser Gly Asn Leu	
	640 645 650	
30	GCC ATA GCT TAC ATG GAT GTG TTT CGA CCC AAA GTC CCA ATC CAT GTG	2138
	Ala Ile Ala Tyr Met Asp Val Phe Arg Pro Lys Val Pro Ile His Val	
	655 660 665 670	
35	GCT ATG ACG GGA GCC CTC AAT GCT TGT GGC GAG ATT GAG AAA GTA AGC	2186
	Ala Met Thr Gly Ala Leu Asn Ala Cys Gly Glu Ile Glu Lys Val Ser	
	675 680 685	
40	TTT AGA AGC ACC AAG CTC GCC ACT GCA CAC CGA CTT GGC CTT AAG TTG	2234
	Phe Arg Ser Thr Lys Leu Ala Thr Ala His Arg Leu Gly Leu Lys Leu	
	690 695 700	
45	GCT GGT CCC GGA GCA TTC GAT GTA AAC ACC GGG CCC AAC TGG GCA ACG	2282
	Ala Gly Pro Gly Ala Phe Asp Val Asn Thr Gly Pro Asn Trp Ala Thr	
	705 710 715	
50	TTC ATC AAA CGT TTC CCT CAC AAT CCA CGC GAC TGG GAC AGG CTC CCC	2330
	Phe Ile Lys Arg Phe Pro His Asn Pro Arg Asp Trp Asp Arg Leu Pro	
	720 725 730	
55	TAC CTC AAC CTA CCA TAC CTT CCA CCC AAT GCA GGA CGC CAG TAC CAC	2378
	Tyr Leu Asn Leu Pro Tyr Leu Pro Pro Asn Ala Gly Arg Gln Tyr His	
	735 740 745 750	
60	CTT GCC ATG GCT GCA TCA GAG TTC AAG AGA CCC CGA ACT CGA GAG TGC	2426
	Leu Ala Met Ala Ala Ser Glu Phe Lys Arg Pro Arg Thr Arg Glu Cys	
	755 760 765	
65	CGT CAG AGC AAT GGA AGC AGC AGC CAA CGT GGA CCC ACT ATT CCA ATC	2474
	Arg Gln Ser Asn Gly Ser Ser Ser Gln Arg Gly Pro Thr Ile Pro Ile	
	770 775 780	
70	TGC ACT CAG TGT GTT CAT GTG GCT GGA AGA GAA TGG GAT TGT GAC TGA	2522
	Cys Thr Gln Cys Val His Val Ala Gly Arg Glu Trp Asp Cys Asp	
	785 790 795	
75	CATGGCCAAC TTCGCACTCA GCGACCCGAA CGCCCATCGG ATGCGAAATT TTTTTCGCAA	2582
80	CGACCACAAG CAGGCAGCAA GTCGCAAGG GCCAAGTACG GGACAGCAGG CTACGGAGTG	2642
85	GAGGCTCGGG GCCCCACAC CAGAGGAAGC ACAGAGGGAA AAAGACACAC GGATCTCAA	2702
90	GAAGATGGAG ACCATGGGCA TCTACTTTGC AACACCAGAA TGGGTAGCAC TCAATGGGCA	2762

ES 2 278 382 T3

```

CCGAGGGCCA AGCCCCGGCC AGCTAAAGTA CGGGCAGAAC ACACGAGAAA TACGGACCCA 2822
AACGAGGACT ATCTAGACTA CGTGCATGCA GAGAAGAGCC GGTGGGCATC AGAAGAACAA 2882
ATCCTAAGGG CAGCTACGTC AGATCTACGG GGCTCCAGGA CAGGCAGAGC ACCCCAAGCT 2942
TTCATAGACG AAGTTGCCAA AGTCTATGAA ATCAACCATG GACGTGGCCC AAACCAAGAA 3002
CAGATGAAAG ATCTGCTCTT GACTGCGATG GAGATGAAGC ATCGCAATCC CAGGCGGGCT 3062
CTACCAAGC CCAAGCCAAA ACCCAATGCT CCAACACAGA GACCCCTGG TCGGCTGGGG 3122
CTGGATCAGG ACCGTCTCTG ATGAGGACCT TGAGTGAGGC TCCTGGGAGT CTCCCGACAA 3182
CACCCGCGCA GGTGTGGACA CAATTCGGCC TTACAACATC CCAATTGGA TCCGTTCCGC 3242
GGTCCCCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 3302
AAGTACCTTC TGAGGCGGAA AGAACCAGCC GGATCCCTCG AGGGATCC 3350

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 797 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

```

Met Thr Asn Leu Gln Asp Gln Thr Gln Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Leu Met Pro Thr Thr Gly Pro Ala Ser Ile Pro Glu Thr Pro
          20           25           30
Trp Arg Ser Thr Leu Ser Gly Gln Arg Leu Thr Tyr Asn Leu Thr Val
          35           40           45
Gly Asp Thr Gly Ser Gly Leu Ile Val Phe Phe Pro Gly Phe Pro Gly
          50           55           60
Ser Ile Val Gly Ala His Tyr Thr Leu Gln Ser Asn Gly Asn Tyr Lys
          65           70           75           80
Phe Asp Arg Met Leu Leu Thr Ala Gln Asn Leu Pro Ala Ser Tyr Asn
          85           90           95
Tyr Cys Arg Leu Val Ser Arg Ser Leu Thr Val Arg Ser Ser Thr Leu
          100          105          110
Pro Gly Gly Val Tyr Ala Leu Asn Gly Thr Ile Asn Ala Val Thr Phe
          115          120          125
Gln Gly Ser Leu Ser Glu Leu Thr Asp Val Ser Tyr Asn Gly Leu Met
          130          135          140
Ser Ala Thr Ala Asn Ile Asn Asp Lys Ile Gly Asn Val Leu Val Gly
          145          150          155          160
Glu Gly Val Thr Val Leu Ser Leu Pro Thr Ser Tyr Asp Leu Gly Tyr
          165          170          175
Val Arg Leu Gly Asp Pro Ile Pro Ala Ile Gly Leu Asp Pro Lys Met

```

ES 2 278 382 T3

	180	185	190
5	Val Ala Thr Cys Asp Ser Ser Asp Arg Pro Arg Val Tyr Thr Ile Thr 195 200 205		
	Ala Ala Asp Asp Tyr Gln Phe Ser Ser Gln Tyr Gln Pro Gly Gly Val 210 215 220		
10	Thr Ile Thr Leu Phe Ser Ala Asn Ile Asp Ala Ile Thr Ser Leu Ser 225 230 235 240		
	Val Gly Gly Glu Leu Val Phe Arg Thr Ser Val His Gly Leu Val Leu 245 250 255		
15	Gly Ala Thr Ile Tyr Leu Ile Gly Phe Asp Gly Thr Thr Val Ile Thr 260 265 270		
	Arg Ala Val Ala Ala Asn Thr Gly Leu Thr Thr Gly Thr Asp Asn Leu 275 280 285		
20	Met Pro Phe Asn Leu Val Ile Pro Thr Asn Glu Ile Thr Gln Pro Ile 290 295 300		
	Thr Ser Ile Lys Leu Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Gly Gly Gln Ala 305 310 315 320		
25	Gly Asp Gln Met Leu Trp Ser Ala Arg Gly Ser Leu Ala Val Thr Ile 325 330 335		
	His Gly Gly Asn Tyr Pro Gly Ala Leu Arg Pro Val Thr Leu Val Ala 340 345 350		
30	Tyr Glu Arg Val Ala Thr Gly Ser Val Val Thr Val Ala Gly Val Ser 355 360 365		
	Asn Phe Glu Leu Ile Pro Asn Pro Glu Leu Ala Lys Asn Leu Val Thr 370 375 380		
35	Glu Tyr Gly Arg Phe Asp Pro Gly Ala Met Asn Tyr Thr Lys Leu Ile 385 390 395 400		
40	Leu Ser Glu Arg Asp Arg Leu Gly Ile Lys Thr Val Trp Pro Thr Arg 405 410 415		
	Glu Tyr Thr Asp Phe Arg Glu Tyr Phe Met Glu Val Ala Asp Leu Asn 420 425 430		
45	Ser Pro Leu Lys Ile Ala Gly Ala Phe Gly Phe Lys Asp Ile Ile Arg 435 440 445		
	Ala Ile Arg Arg Ile Ala Val Pro Val Val Ser Thr Leu Phe Pro Pro 450 455 460		
50	Ala Ala Pro Leu Ala His Ala Ile Gly Glu Gly Val Asp Tyr Leu Leu 465 470 475 480		
	Gly Asp Glu Ala Gln Ala Ala Ser Gly Thr Ala Arg Ala Ala Ser Gly 485 490 495		
55	Lys Ala Arg Ala Ala Ser Gly Arg Ile Arg Gln Leu Thr Leu Ala Ala 500 505 510		
60	Asp Lys Gly Tyr Glu Val Val Ala Asn Leu Phe Gln Val Pro Gln Asn 515 520 525		
65	Pro Val Val Asp Gly Ile Leu Ala Ser Pro Gly Val Leu Arg Gly Ala		

ES 2 278 382 T3

	530		535		540													
	His	Asn	Leu	Asp	Cys	Val	Leu	Arg	Glu	Gly	Ala	Thr	Leu	Phe	Pro	Val		
	545					550					555					560		
5	Val	Ile	Thr	Thr	Val	Glu	Asp	Ala	Met	Thr	Pro	Lys	Ala	Leu	Asn	Ser		
					565					570					575			
	Lys	Met	Phe	Ala	Val	Ile	Glu	Gly	Val	Arg	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Pro		
10				580					585					590				
	Ser	Gln	Arg	Gly	Ser	Phe	Ile	Arg	Thr	Leu	Ser	Gly	His	Arg	Val	Tyr		
			595					600					605					
15	Gly	Tyr	Ala	Pro	Asp	Gly	Val	Leu	Pro	Leu	Glu	Thr	Gly	Arg	Asp	Tyr		
	610					615						620						
	Thr	Val	Val	Pro	Ile	Asp	Asp	Val	Trp	Asp	Asp	Ser	Ile	Met	Leu	Ser		
	625				630						635					640		
20	Lys	Asp	Pro	Ile	Pro	Pro	Ile	Val	Gly	Asn	Ser	Gly	Asn	Leu	Ala	Ile		
				645						650					655			
	Ala	Tyr	Met	Asp	Val	Phe	Arg	Pro	Lys	Val	Pro	Ile	His	Val	Ala	Met		
25				660					665					670				
	Thr	Gly	Ala	Leu	Asn	Ala	Cys	Gly	Glu	Ile	Glu	Lys	Val	Ser	Phe	Arg		
			675					680					685					
30	Ser	Thr	Lys	Leu	Ala	Thr	Ala	His	Arg	Leu	Gly	Leu	Lys	Leu	Ala	Gly		
			690				695					700						
	Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Val	Asn	Thr	Gly	Pro	Asn	Trp	Ala	Thr	Phe	Ile		
	705					710					715					720		
35	Lys	Arg	Phe	Pro	His	Asn	Pro	Arg	Asp	Trp	Asp	Arg	Leu	Pro	Tyr	Leu		
					725					730					735			
	Asn	Leu	Pro	Tyr	Leu	Pro	Pro	Asn	Ala	Gly	Arg	Gln	Tyr	His	Leu	Ala		
40				740					745					750				
	Met	Ala	Ala	Ser	Glu	Phe	Lys	Arg	Pro	Arg	Thr	Arg	Glu	Cys	Arg	Gln		
			755					760					765					
45	Ser	Asn	Gly	Ser	Ser	Ser	Gln	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Pro	Ile	Cys	Thr		
		770					775					780						
	Gln	Cys	Val	His	Val	Ala	Gly	Arg	Glu	Trp	Asp	Cys	Asp					
	785					790					795							

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 5426 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(ix) ASPECTO:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS

ES 2 278 382 T3

(B) LOCALIZACIÓN: 73..1182

(D) OTRA INFORMACIÓN:/producto = "HVT UL42"

(ix) ASPECTO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1306..2574

(D) OTRA INFORMACIÓN:/producto = "HVT UL43"

(ix) ASPECTO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 2790..4259

(D) OTRA INFORMACIÓN:/producto = "gA de HVT"

(ix) ASPECTO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 4701..5339

(D) OTRA INFORMACIÓN:/producto = "HVT UL45"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

25	GGATCCGAGC TTCTACTATA CAACGCGGAC GATAATTTTG TCCACCCCAT CGGTGTTGGA	60
	GAAAGGGTTT TT ATG ATG GCA GGA ATA ACT GTC GCA TGT GAC CAC ACT	108
	Met Met Ala Gly Ile Thr Val Ala Cys Asp His Thr	
	1 5 10	
30	GCA GGA GAG GCT CAT ACA CCC GAG GAT ATG CAA AAG AAA TGG AGG ATT	156
	Ala Gly Glu Ala His Thr Pro Glu Asp Met Gln Lys Lys Trp Arg Ile	
	15 20 25	
35	ATA TTG GCA GGG GAA AAA TTC ATG ACT ATA TCG GCA TCG TTG AAA TCG	204
	Ile Leu Ala Gly Glu Lys Phe Met Thr Ile Ser Ala Ser Leu Lys Ser	
	30 35 40	
40	ATC GTC AGT TGT GTG AAA AAC CCC CTT CTC ACG TTT GGC GCA GAT GGG	252
	Ile Val Ser Cys Val Lys Asn Pro Leu Leu Thr Phe Gly Ala Asp Gly	
	45 50 55 60	
	CTC ATT GTA CAA GGT ACT GTC TGC GGA CAG CGC ATT TTT GTT CCA ATC	300
	Leu Ile Val Gln Gly Thr Val Cys Gly Gln Arg Ile Phe Val Pro Ile	
	65 70 75	
45	GAC CGT GAT TCC TTC AGC GAA TAT GAA TGG CAT GCG CCA ACT GCG ATG	348
	Asp Arg Asp Ser Phe Ser Glu Tyr Glu Trp His Gly Pro Thr Ala Met	
	80 85 90	
50	TTT CTA GCA TTA ACT GAT TCC AGA CGC ACT CTT TTA GAT GCA TTC AAA	396
	Phe Leu Ala Leu Thr Asp Ser Arg Arg Thr Leu Leu Asp Ala Phe Lys	
	95 100 105	
	TGT GAA AAG AGA AGG GCA ATT GAC GTC TCC TTT ACC TTC GCG GGA GAG	444
	Cys Glu Lys Arg Arg Ala Ile Asp Val Ser Phe Thr Phe Ala Gly Glu	
	110 115 120	
55	CCT CCA TGT AGG CAT TTA ATC CAA GCC GTC ACA TAC ATG ACC GAC GGT	492
	Pro Pro Cys Arg His Leu Ile Gln Ala Val Thr Tyr Met Thr Asp Gly	
	125 130 135 140	
60	GGT TCA GTA TCG AAT ACA ATC ATT AAA TAT GAG CTC TGG AAT GCG TCT	540
	Gly Ser Val Ser Asn Thr Ile Ile Lys Tyr Glu Leu Trp Asn Ala Ser	
	145 150 155	
65	ACA ATT TTC CCC CAA AAA ACT CCC GAT GTT ACC TTT TCT CTA AAC AAA	588
	Thr Ile Phe Pro Gln Lys Thr Pro Asp Val Thr Phe Ser Leu Asn Lys	
	160 165 170	

ES 2 278 382 T3

	CAA CAA TTG AAC AAA ATA TTG GCC GTC GCT TCA AAA CTG CAA CAC GAA	636
	Gln Gln Leu Asn Lys Ile Leu Ala Val Ala Ser Lys Leu Gln His Glu	
	175 180 185	
5	GAA CTT GTA TTC TCT TTA AAA CCT GAA GGA GGG TTC TAC GTA GGA ACG	684
	Glu Leu Val Phe Ser Leu Lys Pro Glu Gly Gly Phe Tyr Val Gly Thr	
	190 195 200	
10	GTT TGT ACT GTT ATA AGT TTC GAA GTA GAT GGG ACT GCC ATG ACT CAG	732
	Val Cys Thr Val Ile Ser Phe Glu Val Asp Gly Thr Ala Met Thr Gln	
	205 210 215 220	
15	TAT CCT TAC AAC CCT CCA ACC TCG GCT ACC CTA GCT CTC GTA GTA GCA	780
	Tyr Pro Tyr Asn Pro Pro Thr Ser Ala Thr Leu Ala Leu Val Val Ala	
	225 230 235	
	TGC AGA AAG AAG AAG GCG AAT AAA AAC ACT ATT TTA ACG GCC TAT GGA	828
	Cys Arg Lys Lys Lys Ala Asn Lys Asn Thr Ile Leu Thr Ala Tyr Gly	
	240 245 250	
20	AGT GGT AAA CCC TTT TGT GTT GCA TTG GAA GAT ACT AGT GCA TTT AGA	876
	Ser Gly Lys Pro Phe Cys Val Ala Leu Glu Asp Thr Ser Ala Phe Arg	
	255 260 265	
25	AAT ATC GTC AAT AAA ATC AAG GCG GGT ACG TCG GGA GTT GAT CTG GGG	924
	Asn Ile Val Asn Lys Ile Lys Ala Gly Thr Ser Gly Val Asp Leu Gly	
	270 275 280	
	TTT TAT ACA ACT TGC GAT CCG CCG ATG CTA TGT ATT CCG CCA CAC GCA	972
	Phe Tyr Thr Thr Cys Asp Pro Pro Met Leu Cys Ile Arg Pro His Ala	
	285 290 295 300	
30	TTT GGA AGT CCT ACC GCA TTC CTG TTT TGT AAC ACA GAC TGT ATG ACA	1020
	Phe Gly Ser Pro Thr Ala Phe Leu Phe Cys Asn Thr Asp Cys Met Thr	
	305 310 315	
35	ATA TAT GAA CTG GAA GAA GTA AGC GCC GTT GAT GGT GCA ATC CGA GCA	1068
	Ile Tyr Glu Leu Glu Glu Val Ser Ala Val Asp Gly Ala Ile Arg Ala	
	320 325 330	
40	AAA CGC ATC AAC GAA TAT TTC CCA ACA GTA TCG CAG GCT ACT TCC AAG	1116
	Lys Arg Ile Asn Glu Tyr Phe Pro Thr Val Ser Gln Ala Thr Ser Lys	
	335 340 345	
	AAG AGA AAA CAG TCG CCG CCC CCT ATC GAA AGA GAA AGG AAA ACC ACC	1164
	Lys Arg Lys Gln Ser Pro Pro Pro Ile Glu Arg Glu Arg Lys Thr Thr	
	350 355 360	
45	AGA GCG GAT ACC CAA TAAAATGCCA GACAAACCCG GCATCCTGGT TAGAGGGCAG	1219
	Arg Ala Asp Thr Gln	
	365 370	
	GTGGGCTGGG CCAACCTTCA CGGGCGTCCG ACAGATCGGT GACACTCATA CGTTAACTAA	1279
50	ACGCCCGCAG CTTTGCAGAA GAAAT ATG CCT TCC GGA GCC AGC TCG AGT CCT	1332
	Met Pro Ser Gly Ala Ser Ser Ser Pro	
	1 5	
55	CCA CCA GCT TAT ACA TCT GCA GCT CCG CTT GAG ACT TAT AAC AGC TGG	1380
	Pro Pro Ala Tyr Thr Ser Ala Ala Pro Leu Glu Thr Tyr Asn Ser Trp	
	10 15 20 25	
60	CTA AGT GCC TTT TCA TGC GCA TAT CCC CAA TGC ACT GCG GGA AGA GGA	1428
	Leu Ser Ala Phe Ser Cys Ala Tyr Pro Gln Cys Thr Ala Gly Arg Gly	
	30 35 40	
65		

ES 2 278 382 T3

	CAT CGA CAA AAT GGC AAG AAG TGT ATA CGG TGT ATA GTG ATC AGT GTA His Arg Gln Asn Gly Lys Lys Cys Ile Arg Cys Ile Val Ile Ser Val	1476
5	TGT TCC TTA GTG TGC ATC GCT GCA CAT TTA GCT GTT ACC GTG TCG GGA Cys Ser Leu Val Cys Ile Ala Ala His Leu Ala Val Thr Val Ser Gly	1524
10	GTG GCA TTA ATT CCG CTT ATC GAT CAA AAC AGA GCT TAC GGA AAC TGT Val Ala Leu Ile Pro Leu Ile Asp Gln Asn Arg Ala Tyr Gly Asn Cys	1572
15	ACG GTA TGT GTA ATT GCC GGA TTC ATC GCT ACG TTT GCT GCA CGA CTT Thr Val Cys Val Ile Ala Gly Phe Ile Ala Thr Phe Ala Ala Arg Leu	1620
20	ACG ATA AGA CTT TCG GAA ACG CTT ATG CTA GTG GGC AAG CCG GCG CAG Thr Ile Arg Leu Ser Glu Thr Leu Met Leu Val Gly Lys Pro Ala Gln	1668
25	TTT ATA TTT GCT ATA ATC GCT TCC GTT GCG GAA ACA CTG ATC AAT AAC Phe Ile Phe Ala Ile Ile Ala Ser Val Ala Glu Thr Leu Ile Asn Asn	1716
30	GAG GCG CTT GCC ATC AGT AAT ACT ACT TAC AAA ACT GCA TTG CGA ATA Glu Ala Leu Ala Ile Ser Asn Thr Thr Tyr Lys Thr Ala Leu Arg Ile	1764
35	ATC GAA GTA ACA TCT TTG GCG TGT TTT GTT ATG CTC GGG GCA ATA ATT Ile Glu Val Thr Ser Leu Ala Cys Phe Val Met Leu Gly Ala Ile Ile	1812
40	ACA TCC CAC AAC TAT GTC TGC ATT TCA ACG GCA GGG GAC TTG ACT TGG Thr Ser His Asn Tyr Val Cys Ile Ser Thr Thr Ala Gly Asp Leu Thr Trp	1860
45	AAG GGC GGG ATT TTT CAT GCT TAC CAC GGA ACA TTA CTC GGT ATA ACA Lys Gly Gly Ile Phe His Ala Tyr His Gly Thr Leu Leu Gly Ile Thr	1908
50	ATA CCA AAC ATA CAC CCA ATC CCT CTC GCG GGG TTT CTT GCA GTC TAT Ile Pro Asn Ile His Pro Ile Pro Leu Ala Gly Phe Leu Ala Val Tyr	1956
55	ACA ATA TTG GCT ATA AAT ATC GCT AGA GAT GCA AGC GCT ACA TTA TTA Thr Ile Leu Ala Ile Asn Ile Ala Arg Asp Ala Ser Ala Thr Leu Leu	2004
60	TCC ACT TGC TAT TAT CGC AAT TGC CGC GAG AGG ACT ATA CTT CGC CCT Ser Thr Cys Tyr Tyr Arg Asn Cys Arg Glu Arg Thr Ile Leu Arg Pro	2052
65	TCT CGT CTC GGA CAT GGT TAC ACA ATC CCT TCT CCC GGT GCC GAT ATG Ser Arg Leu Gly His Gly Tyr Thr Ile Pro Ser Pro Gly Ala Asp Met	2100
	CTT TAT GAA GAA GAC GTA TAT AGT TTT GAC GCA GCT AAA GGC CAT TAT Leu Tyr Glu Glu Asp Val Tyr Ser Phe Asp Ala Ala Lys Gly His Tyr	2148
	TCG TCA ATA TTT CTA TGT TAT GCC ATG GGG CTT ACA ACA CCG CTG ATT Ser Ser Ile Phe Leu Cys Tyr Ala Met Gly Leu Thr Thr Pro Leu Ile	2196
	ATT GCG CTC CAT AAA TAT ATG GCG GGC ATT AAA AAT TCG TCA GAT TGG Ile Ala Leu His Lys Tyr Met Ala Gly Ile Lys Asn Ser Ser Asp Trp	2244

ES 2 278 382 T3

	ACT GCT ACA TTA CAA GGC ATG TAC GGG CTT GTC TTG GGA TCG CTA TCG	2292
	Thr Ala Thr Leu Gln Gly Met Tyr Gly Leu Val Leu Gly Ser Leu Ser	
	315 320 325	
5	TCA CTA TGT ATT CCA TCC AGC AAC AAC GAT GCC CTA ATT CGT CCC ATT	2340
	Ser Leu Cys Ile Pro Ser Ser Asn Asn Asp Ala Leu Ile Arg Pro Ile	
	330 335 340 345	
10	CAA ATT TTG ATA TTG ATA ATC GGT GCA CTG GCC ATT GCA TTG GCT GGA	2388
	Gln Ile Leu Ile Leu Ile Ile Gly Ala Leu Ala Ile Ala Leu Ala Gly	
	350 355 360	
	TGT GGT CAA ATT ATA GGG CCT ACA TTA TTT GCC GCG AGT TCG GCT GCG	2436
	Cys Gly Gln Ile Ile Gly Pro Thr Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Ala	
	365 370 375	
15	ATG TCA TGT TTT ACA TGT ATC AAT ATT CGC GCT ACT AAT AAG GGT GTC	2484
	Met Ser Cys Phe Thr Cys Ile Asn Ile Arg Ala Thr Lys Gly Val	
	380 385 390	
20	AAC AAA TTG GCA GCA GCC AGT GTC GTG AAA TCT GTA CTG GGC TTC ATT	2532
	Asn Lys Leu Ala Ala Ala Ser Val Val Lys Ser Val Leu Gly Phe Ile	
	395 400 405	
	ATT TCC GGG ATG CTT ACT TGC GTG CTA TTA CCA CTA TCG TGATAGATCG	2581
	Ile Ser Gly Met Leu Thr Cys Val Leu Leu Pro Leu Ser	
	410 415 420	
25	TCGGTCTGCG CATCGCCCAT GCTGCGGAA CGCTCTTTTCG AACCGTGAAT AAAACTTTGT	2641
	ATCTACTAAA CAATAACTTT GTGTTTTATT GAGCGGTGCA AAACAATGAG GAGCTGCAAT	2701
	TTAAAGCTAA CCGCATACGC CGGGCGGGTA AAGACCATTT TATACCATAT TACGCATCTA	2761
30	TCGAAACTTG TTCGAGAACC GCAAGTAT ATG GTT TCC AAC ATG CGC GTT CTA	2813
	Met Val Ser Asn Met Arg Val Leu	
	1 5	
35	CGC GTA CTG CGC CTG ACG GGA TGG GTG GGC ATA TTT CTA GTT CTG TCT	2861
	Arg Val Leu Arg Leu Thr Gly Trp Val Gly Ile Phe Leu Val Leu Ser	
	10 15 20	
	TTA CAG CAA ACC TCT TGT GCC GGA TTG CCC CAT AAC GTC GAT ACC CAT	2909
	Leu Gln Gln Thr Ser Cys Ala Gly Leu Pro His Asn Val Asp Thr His	
	25 30 35 40	
40	CAT ATC CTA ACT TTC AAC CCT TCT CCC ATT TCG GCC GAT GGC GTT CCT	2957
	His Ile Leu Thr Phe Asn Pro Ser Pro Ile Ser Ala Asp Gly Val Pro	
	45 50 55	
45	TTG TCA GAG GTG CCC AAT TCG CCT ACG ACC GAA TTA TCT ACA ACT GTC	3005
	Leu Ser Glu Val Pro Asn Ser Pro Thr Thr Glu Leu Ser Thr Thr Val	
	60 65 70	
	GCC ACC AAG ACA GCT GTA CCG ACG ACT GAA AGC ACT AGT TCC TCC GAA	3053
	Ala Thr Lys Thr Ala Val Pro Thr Thr Glu Ser Thr Ser Ser Ser Glu	
	75 80 85	
50	GCG CAC CGC AAC TCT TCT CAC AAA ATA CCT GAT ATA ATC TGC GAC CGA	3101
	Ala His Arg Asn Ser Ser His Lys Ile Pro Asp Ile Ile Cys Asp Arg	
	90 95 100	
55	GAA GAA GTA TTC GTA TTC CTT AAC AAT ACA GGA AGA ATT TTG TGT GAC	3149
	Glu Glu Val Phe Val Phe Leu Asn Asn Thr Gly Arg Ile Leu Cys Asp	
	105 110 115 120	

ES 2 278 382 T3

	CTT	ATA	GTC	GAC	CCC	CCT	TCA	GAC	GAT	GAA	TGG	TCC	AAC	TTC	GCT	CTT	3197
	Leu	Ile	Val	Asp	Pro	Pro	Ser	Asp	Asp	Glu	Trp	Ser	Asn	Phe	Ala	Leu	
					125					130					135		
5	GAC	GTC	ACG	TTC	AAT	CCA	ATC	GAA	TAC	CAC	GCC	AAC	GAA	AAG	AAT	GTA	3245
	Asp	Val	Thr	Phe	Asn	Pro	Ile	Glu	Tyr	His	Ala	Asn	Glu	Lys	Asn	Val	
				140					145					150			
10	GAG	GTT	GCC	CGA	GTG	GCC	GGT	CTA	TAC	GGA	GTA	CCG	GGG	TCG	GAT	TAT	3293
	Glu	Val	Ala	Arg	Val	Ala	Gly	Leu	Tyr	Gly	Val	Pro	Gly	Ser	Asp	Tyr	
			155					160					165				
	GCA	TAC	CCT	AGG	AAA	TCG	GAA	TTA	ATA	TCC	TCC	ATT	CGA	CGG	GAT	CCC	3341
	Ala	Tyr	Pro	Arg	Lys	Ser	Glu	Leu	Ile	Ser	Ser	Ile	Arg	Arg	Asp	Pro	
		170					175					180					
15	CAG	GGT	TCT	TTC	TGG	ACT	AGT	CCT	ACA	CCC	CGT	GGA	AAT	AAA	TAT	TTC	3389
	Gln	Gly	Ser	Phe	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Pro	Arg	Gly	Asn	Lys	Tyr	Phe	
		185				190					195				200		
20	ATA	TGG	ATT	AAT	AAA	ACA	ATG	CAC	ACC	ATG	GGC	GTG	GAA	GTT	AGA	AAT	3437
	Ile	Trp	Ile	Asn	Lys	Thr	Met	His	Thr	Met	Gly	Val	Glu	Val	Arg	Asn	
				205						210					215		
	GTC	GAC	TAC	AAA	GAC	AAC	GGC	TAC	TTT	CAA	GTG	ATA	CTG	CGT	GAT	AGA	3485
	Val	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asn	Gly	Tyr	Phe	Gln	Val	Ile	Leu	Arg	Asp	Arg	
				220					225					230			
25	TTT	AAT	CGC	CCA	TTG	GTA	GAA	AAA	CAT	ATT	TAC	ATG	CGT	GTG	TGC	CAA	3533
	Phe	Asn	Arg	Pro	Leu	Val	Glu	Lys	His	Ile	Tyr	Met	Arg	Val	Cys	Gln	
			235					240					245				
30	CGA	CCC	GCA	TCC	GTG	GAT	GTA	TTG	GCC	CCT	CCA	GTT	CTC	AGC	GGA	GAA	3581
	Arg	Pro	Ala	Ser	Val	Asp	Val	Leu	Ala	Pro	Pro	Val	Leu	Ser	Gly	Glu	
		250					255					260					
	AAC	TAC	AAA	GCA	TCT	TGC	ATC	GTT	AGA	CAT	TTT	TAT	CCC	CCG	GGA	TCT	3629
	Asn	Tyr	Lys	Ala	Ser	Cys	Ile	Val	Arg	His	Phe	Tyr	Pro	Pro	Gly	Ser	
		265				270					275				280		
35	GTC	TAC	GTA	TCT	TGG	AGA	CGT	AAC	GGA	AAC	ATT	GCC	ACA	CCC	CGC	AAG	3677
	Val	Tyr	Val	Ser	Trp	Arg	Arg	Asn	Gly	Asn	Ile	Ala	Thr	Pro	Arg	Lys	
					285					290					295		
40	GAC	CGT	GAC	GGG	AGT	TTT	TGG	TGG	TTC	GAA	TCT	GGC	CGC	GGG	GCC	ACA	3725
	Asp	Arg	Asp	Gly	Ser	Phe	Trp	Trp	Phe	Glu	Ser	Gly	Arg	Gly	Ala	Thr	
				300					305					310			
	CTA	GTA	TCC	ACA	ATA	ACC	CTC	GGA	AAC	TCT	GGA	CTC	GAA	TCT	CCT	CCA	3773
	Leu	Val	Ser	Thr	Ile	Thr	Leu	Gly	Asn	Ser	Gly	Leu	Glu	Ser	Pro	Pro	
				315				320					325				
45	AAG	GTT	TCC	TGC	TTG	GTA	GCG	TGG	AGG	CAA	GGC	GAT	ATG	ATA	AGC	ACA	3821
	Lys	Val	Ser	Cys	Leu	Val	Ala	Trp	Arg	Gln	Gly	Asp	Met	Ile	Ser	Thr	
		330					335					340					
50	TCG	AAT	GCT	ACA	GCT	GTA	CCG	ACG	GTA	TAT	TAT	CAC	CCC	CGT	ATC	TCT	3869
	Ser	Asn	Ala	Thr	Ala	Val	Pro	Thr	Val	Tyr	Tyr	His	Pro	Arg	Ile	Ser	
		345				350					355				360		
	CTG	GCA	TTT	AAA	GAT	GGG	TAT	GCA	ATA	TGT	ACT	ATA	GAA	TGT	GTT	CCC	3917
	Leu	Ala	Phe	Lys	Asp	Gly	Tyr	Ala	Ile	Cys	Thr	Ile	Glu	Cys	Val	Pro	
				365					370					375			
55	TCT	GGG	ATT	ACT	GTG	AGG	TGG	TTA	GTT	CAT	GAT	GAA	CCC	CAG	CCT	AAC	3965
	Ser	Gly	Ile	Thr	Val	Arg	Trp	Leu	Val	His	Asp	Glu	Pro	Gln	Pro	Asn	
				380				385						390			

ES 2 278 382 T3

	ACA ACT TAT GAT ACT GTG GTT ACA GGT CTC TGC AGG ACC ATC GAT CGT	4013
	Thr Thr Tyr Asp Thr Val Val Thr Gly Leu Cys Arg Thr Ile Asp Arg	
	395 400 405	
5	TAT AGA AAT CTC GCC AGT CGG ATT CCA GTC CAG GAC AAC TGG GCG AAA	4061
	Tyr Arg Asn Leu Ala Ser Arg Ile Pro Val Gln Asp Asn Trp Ala Lys	
	410 415 420	
10	ACG AAG TAT ACG TGC AGA CTA ATT GGA TAT CCG TTC GAC GTG GAT AGA	4109
	Thr Lys Tyr Thr Cys Arg Leu Ile Gly Tyr Pro Phe Asp Val Asp Arg	
	425 430 435 440	
15	TTT CAA AAT TCC GAA TAT TAT GAT GCA ACG CCG TCG GCA AGA GGA ATG	4157
	Phe Gln Asn Ser Glu Tyr Tyr Asp Ala Thr Pro Ser Ala Arg Gly Met	
	445 450 455	
	CCG ATG ATT GTA ACA ATT ACG GCC GTT CTA GGA CTG GCC TTG TTT TTA	4205
	Pro Met Ile Val Thr Ile Thr Ala Val Leu Gly Leu Ala Leu Phe Leu	
	460 465 470	
20	GGT ATT GGT ATC ATT ATC ACA GCC CTA TGC TTT TAC CTA CCG GGG CGG	4253
	Gly Ile Gly Ile Ile Ile Thr Ala Leu Cys Phe Tyr Leu Pro Gly Arg	
	475 480 485	
25	AAT TAAGATTAA CATCGTATGT GATATAAAAA TTATTAGTG TTATAACCGA	4306
	Asn 490	
	TCGCATTCTT CTGTTTCGAT TCACAATAAA TAAATGGTA TTGTAATCAG CACCATCGCA	4366
	TTGTTTCGTA GATGACTCAT GTTCAGTCCG CGTGATGTCA AAAATACGTA TTTTTCGTAT	4426
30	CACGCAGCGG CCAAAATGCC CATTATOTTA TTTTFACTCC AAACGCGGTA TTTAAACAT	4486
	CGGGACGTAC ATCATGTGGC GCACGTTAAT CGTATACGGT GCCGCTACAT TAAAAATCGC	4546
	AAGTCTCCGA ATATCAAGCT CACGGCCAAA ACGTCGGTAA TAATCTTACG CATCGAATGT	4606
35	GATACGATA CCGTACAATC GCTGAGTAGA TTTCTATAT AGTTACTCAG TAGTGATACA	4666
	CAATCACAAA ATCGCTGGGG TATATCATAT AAGA ATG ATG TCG CCC ACC CCT	4718
	Met Met Ser Pro Thr Pro	
	1 5	
40	GAA GAT GAT CGC GAT CTC GTT GTG GTT CGT GGA CGT CTC CGA ATG ATG	4766
	Glu Asp Asp Arg Asp Leu Val Val Val Arg Gly Arg Leu Arg Met Met	
	10 15 20	
45	GAT AGC GGC ACG GAA ACA GAT AGA GAG CAA CGA CAT CCA CGT ACG ACT	4814
	Asp Ser Gly Thr Glu Thr Asp Arg Glu Gln Arg His Pro Arg Thr Thr	
	25 30 35	
	TGG CGA TCG ATC TGT TGT GGG TGT ACG ATA GGA ATG GTA TTT ACC ATA	4862
	Trp Arg Ser Ile Cys Cys Gly Cys Thr Ile Gly Met Val Phe Thr Ile	
	40 45 50	
50	TTC GTT CTC GTA GCG GCA GTA TTG TTG GGA TCA CTA TTC ACT GTT TCA	4910
	Phe Val Leu Val Ala Ala Val Leu Leu Gly Ser Leu Phe Thr Val Ser	
	55 60 65 70	
55	TAC ATG GCC ATG GAA TCG GGA ACA TGT CCC GAT GAA TGG ATT GGT TTG	4958
	Tyr Met Ala Met Glu Ser Gly Thr Cys Pro Asp Glu Trp Ile Gly Leu	
	75 80 85	
60	GGT TAT AGT TGC ATG CGC GTG GCC GGG AAA AAT GCA ACT GAT CTT GAG	5006
	Gly Tyr Ser Cys Met Arg Val Ala Gly Lys Asn Ala Thr Asp Leu Glu	
	90 95 100	

ES 2 278 382 T3

	GCG TTG GAT ACA TGT GCT CGG CAT AAC AGC AAA CTT ATT GAC TTC GCA	5054
	Ala Leu Asp Thr Cys Ala Arg His Asn Ser Lys Leu Ile Asp Phe Ala	
	105 110 115	
5	AAC GCC AAA GTT CTG GTT GAA GCT ATC GCC CCA TTC GGT GTG CCA AAT	5102
	Asn Ala Lys Val Leu Val Glu Ala Ile Ala Pro Phe Gly Val Pro Asn	
	120 125 130	
10	GCA GCA TAT GGG GAA GTC TTC CGG TTA AGG GAC AGC AAA ACC ACG TGT	5150
	Ala Ala Tyr Gly Glu Val Phe Arg Leu Arg Asp Ser Lys Thr Thr Cys	
	135 140 145 150	
	ATA CGA CCT ACC ATG GGA GGA CCC GTG TCG GCA GAC TGT CCT GTA ACA	5198
	Ile Arg Pro Thr Met Gly Gly Pro Val Ser Ala Asp Cys Pro Val Thr	
	155 160 165	
15	TGT ACC GTT ATA TGT CAG CGA CCC AGG CCT CTA AGT ACC ATG TCT TCC	5246
	Cys Thr Val Ile Cys Gln Arg Pro Arg Pro Leu Ser Thr Met Ser Ser	
	170 175 180	
20	ATC ATT AGA GAT GCC CGC GTG TAT CTT CAT TTA GAA CGA CGC GAT TAT	5294
	Ile Ile Arg Asp Ala Arg Val Tyr Leu His Leu Glu Arg Arg Asp Tyr	
	185 190 195	
	TAT GAA GTC TAC GCC TCT GTC CTC TCT AAT GCG ATG AGT AAA TAAAAACGCA	5346
	Tyr Glu Val Tyr Ala Ser Val Leu Ser Asn Ala Met Ser Lys	
	200 205 210	
25	CCTCTAACGG TTACTGTGTT TATTATCCAA TCACACCATA GACATTATTA CAATAATATG	5406
	GATCTTTATT TCATATAATG	5426

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 369 aminoácidos

35 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

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

65

ES 2 278 382 T3

	115	120	125
	His Leu Ile Gln Ala Val Thr Tyr Met Thr Asp Gly Gly Ser Val Ser		
5	130	135	140
	Asn Thr Ile Ile Lys Tyr Glu Leu Trp Asn Ala Ser Thr Ile Phe Pro		
	145	150	155
10	Gln Lys Thr Pro Asp Val Thr Phe Ser Leu Asn Lys Gln Gln Leu Asn		
	165	170	175
	Lys Ile Leu Ala Val Ala Ser Lys Leu Gln His Glu Glu Leu Val Phe		
	180	185	190
15	Ser Leu Lys Pro Glu Gly Gly Phe Tyr Val Gly Thr Val Cys Thr Val		
	195	200	205
	Ile Ser Phe Glu Val Asp Gly Thr Ala Met Thr Gln Tyr Pro Tyr Asn		
	210	215	220
20	Pro Pro Thr Ser Ala Thr Leu Ala Leu Val Val Ala Cys Arg Lys Lys		
	225	230	235
	Lys Ala Asn Lys Asn Thr Ile Leu Thr Ala Tyr Gly Ser Gly Lys Pro		
	245	250	255
25	Phe Cys Val Ala Leu Glu Asp Thr Ser Ala Phe Arg Asn Ile Val Asn		
	260	265	270
30	Lys Ile Lys Ala Gly Thr Ser Gly Val Asp Leu Gly Phe Tyr Thr Thr		
	275	280	285
	Cys Asp Pro Pro Met Leu Cys Ile Arg Pro His Ala Phe Gly Ser Pro		
	290	295	300
35	Thr Ala Phe Leu Phe Cys Asn Thr Asp Cys Met Thr Ile Tyr Glu Leu		
	305	310	315
	Glu Glu Val Ser Ala Val Asp Gly Ala Ile Arg Ala Lys Arg Ile Asn		
	325	330	335
40	Glu Tyr Phe Pro Thr Val Ser Gln Ala Thr Ser Lys Lys Arg Lys Gln		
	340	345	350
45	Ser Pro Pro Pro Ile Glu Arg Glu Arg Lys Thr Thr Arg Ala Asp Thr		
	355	360	365

Gln

50 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 422 aminoácidos

55 (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

Met	Pro	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Ser	Pro	Pro	Pro	Ala	Tyr	Thr	Ser	Ala
1				5				10						15	
Ala	Pro	Leu	Glu	Thr	Tyr	Asn	Ser	Trp	Leu	Ser	Ala	Phe	Ser	Cys	Ala
			20					25					30		

65

ES 2 278 382 T3

Tyr Pro Gln Cys Thr Ala Gly Arg Gly His Arg Gln Asn Gly Lys Lys
 35 40 45
 5 Cys Ile Arg Cys Ile Val Ile Ser Val Cys Ser Leu Val Cys Ile Ala
 50 55 60
 Ala His Leu Ala Val Thr Val Ser Gly Val Ala Leu Ile Pro Leu Ile
 65 70 75 80
 10 Asp Gln Asn Arg Ala Tyr Gly Asn Cys Thr Val Cys Val Ile Ala Gly
 85 90 95
 Phe Ile Ala Thr Phe Ala Ala Arg Leu Thr Ile Arg Leu Ser Glu Thr
 100 105 110
 15 Leu Met Leu Val Gly Lys Pro Ala Gln Phe Ile Phe Ala Ile Ile Ala
 115 120 125
 Ser Val Ala Glu Thr Leu Ile Asn Asn Glu Ala Leu Ala Ile Ser Asn
 130 135 140
 20 Thr Thr Tyr Lys Thr Ala Leu Arg Ile Ile Glu Val Thr Ser Leu Ala
 145 150 155 160
 Cys Phe Val Met Leu Gly Ala Ile Ile Thr Ser His Asn Tyr Val Cys
 165 170 175
 25 Ile Ser Thr Ala Gly Asp Leu Thr Trp Lys Gly Gly Ile Phe His Ala
 180 185 190
 Tyr His Gly Thr Leu Leu Gly Ile Thr Ile Pro Asn Ile His Pro Ile
 195 200 205
 30 Pro Leu Ala Gly Phe Leu Ala Val Tyr Thr Ile Leu Ala Ile Asn Ile
 210 215 220
 Ala Arg Asp Ala Ser Ala Thr Leu Leu Ser Thr Cys Tyr Tyr Arg Asn
 225 230 235 240
 35 Cys Arg Glu Arg Thr Ile Leu Arg Pro Ser Arg Leu Gly His Gly Tyr
 245 250 255
 Thr Ile Pro Ser Pro Gly Ala Asp Met Leu Tyr Glu Glu Asp Val Tyr
 260 265 270
 40 Ser Phe Asp Ala Ala Lys Gly His Tyr Ser Ser Ile Phe Leu Cys Tyr
 275 280 285
 Ala Met Gly Leu Thr Thr Pro Leu Ile Ile Ala Leu His Lys Tyr Met
 290 295 300
 45 Ala Gly Ile Lys Asn Ser Ser Asp Trp Thr Ala Thr Leu Gln Gly Met
 305 310 315 320
 Tyr Gly Leu Val Leu Gly Ser Leu Ser Ser Leu Cys Ile Pro Ser Ser
 325 330 335
 50 Asn Asn Asp Ala Leu Ile Arg Pro Ile Gln Ile Leu Ile Leu Ile Ile
 340 345 350
 Gly Ala Leu Ala Ile Ala Leu Ala Gly Cys Gly Gln Ile Ile Gly Pro
 355 360 365
 55 Thr Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Ala Met Ser Cys Phe Thr Cys Ile
 370 375 380
 60 Asn Ile Arg Ala Thr Asn Lys Gly Val Asn Lys Leu Ala Ala Ala Ser
 385 390 395 400
 Val Val Lys Ser Val Leu Gly Phe Ile Ile Ser Gly Met Leu Thr Cys
 405 410 415
 65 Val Leu Leu Pro Leu Ser
 420

ES 2 278 382 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 489 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

```

Met Val Ser Asn Met Arg Val Leu Arg Val Leu Arg Leu Thr Gly Trp
 1           5           10           15
Val Gly Ile Phe Leu Val Leu Ser Leu Gln Gln Thr Ser Cys Ala Gly
          20           25           30
Leu Pro His Asn Val Asp Thr His His Ile Leu Thr Phe Asn Pro Ser
          35           40           45
Pro Ile Ser Ala Asp Gly Val Pro Leu Ser Glu Val Pro Asn Ser Pro
          50           55           60
Thr Thr Glu Leu Ser Thr Thr Val Ala Thr Lys Thr Ala Val Pro Thr
          65           70           75           80
Thr Glu Ser Thr Ser Ser Ser Glu Ala His Arg Asn Ser Ser His Lys
          85           90           95
Ile Pro Asp Ile Ile Cys Asp Arg Glu Glu Val Phe Val Phe Leu Asn
          100          105          110
Asn Thr Gly Arg Ile Leu Cys Asp Leu Ile Val Asp Pro Pro Ser Asp
          115          120          125
Asp Glu Trp Ser Asn Phe Ala Leu Asp Val Thr Phe Asn Pro Ile Glu
          130          135          140
Tyr His Ala Asn Glu Lys Asn Val Glu Val Ala Arg Val Ala Gly Leu
          145          150          155          160
Tyr Gly Val Pro Gly Ser Asp Tyr Ala Tyr Pro Arg Lys Ser Glu Leu
          165          170          175
Ile Ser Ser Ile Arg Arg Asp Pro Gln Gly Ser Phe Trp Thr Ser Pro
          180          185          190
Thr Pro Arg Gly Asn Lys Tyr Phe Ile Trp Ile Asn Lys Thr Met His
          195          200          205
Thr Met Gly Val Glu Val Arg Asn Val Asp Tyr Lys Asp Asn Gly Tyr
          210          215          220
Phe Gln Val Ile Leu Arg Asp Arg Phe Asn Arg Pro Leu Val Glu Lys
          225          230          235          240

```

ES 2 278 382 T3

His Ile Tyr Met Arg Val Cys Gln Arg Pro Ala Ser Val Asp Val Leu
 245 250 255
 5 Ala Pro Pro Val Leu Ser Gly Glu Asn Tyr Lys Ala Ser Cys Ile Val
 260 265 270
 Arg His Phe Tyr Pro Pro Gly Ser Val Tyr Val Ser Trp Arg Arg Asn
 275 280 285
 10 Gly Asn Ile Ala Thr Pro Arg Lys Asp Arg Asp Gly Ser Phe Trp Trp
 290 295 300
 Phe Glu Ser Gly Arg Gly Ala Thr Leu Val Ser Thr Ile Thr Leu Gly
 305 310 315 320
 15 Asn Ser Gly Leu Glu Ser Pro Pro Lys Val Ser Cys Leu Val Ala Trp
 325 330 335
 Arg Gln Gly Asp Met Ile Ser Thr Ser Asn Ala Thr Ala Val Pro Thr
 340 345 350
 20 Val Tyr Tyr His Pro Arg Ile Ser Leu Ala Phe Lys Asp Gly Tyr Ala
 355 360 365
 Ile Cys Thr Ile Glu Cys Val Pro Ser Gly Ile Thr Val Arg Trp Leu
 370 375 380
 25 Val His Asp Glu Pro Gln Pro Asn Thr Thr Tyr Asp Thr Val Val Thr
 385 390 395 400
 Gly Leu Cys Arg Thr Ile Asp Arg Tyr Arg Asn Leu Ala Ser Arg Ile
 405 410 415
 30 Pro Val Gln Asp Asn Trp Ala Lys Thr Lys Tyr Thr Cys Arg Leu Ile
 420 425 430
 Gly Tyr Pro Phe Asp Val Asp Arg Phe Gln Asn Ser Glu Tyr Tyr Asp
 435 440 445
 35 Ala Thr Pro Ser Ala Arg Gly Met Pro Met Ile Val Thr Ile Thr Ala
 450 455 460
 Val Leu Gly Leu Ala Leu Phe Leu Gly Ile Gly Ile Ile Ile Thr Ala
 465 470 475 480
 40 Leu Cys Phe Tyr Leu Pro Gly Arg Asn
 485

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 212 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

Met Met Ser Pro Thr Pro Glu Asp Asp Arg Asp Leu Val Val Val Arg
 1 5 10 15
 Gly Arg Leu Arg Met Met Asp Ser Gly Thr Glu Thr Asp Arg Glu Gln
 20 25 30

ES 2 278 382 T3

Arg His Pro Arg Thr Thr Trp Arg Ser Ile Cys Cys Gly Cys Thr Ile
 35 40 45
 Gly Met Val Phe Thr Ile Phe Val Leu Val Ala Ala Val Leu Leu Gly
 5 50 55 60
 Ser Leu Phe Thr Val Ser Tyr Met Ala Met Glu Ser Gly Thr Cys Pro
 65 70 75 80
 Asp Glu Trp Ile Gly Leu Gly Tyr Ser Cys Met Arg Val Ala Gly Lys
 10 85 90 95
 Asn Ala Thr Asp Leu Glu Ala Leu Asp Thr Cys Ala Arg His Asn Ser
 100 105 110
 Lys Leu Ile Asp Phe Ala Asn Ala Lys Val Leu Val Glu Ala Ile Ala
 15 115 120 125
 Pro Phe Gly Val Pro Asn Ala Ala Tyr Gly Glu Val Phe Arg Leu Arg
 130 135 140
 Asp Ser Lys Thr Thr Cys Ile Arg Pro Thr Met Gly Gly Pro Val Ser
 20 145 150 155 160
 Ala Asp Cys Pro Val Thr Cys Thr Val Ile Cys Gln Arg Pro Arg Pro
 165 170 175
 Leu Ser Thr Met Ser Ser Ile Ile Arg Asp Ala Arg Val Tyr Leu His
 25 180 185 190
 Leu Glu Arg Arg Asp Tyr Tyr Glu Val Tyr Ala Ser Val Leu Ser Asn
 195 200 205
 Ala Met Ser Lys
 30 210

35 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1506 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

45 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

50 (ix) ASPECTO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..1506

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

ATG CTC ACG CCG CGT GTG TTA CGA GCT TTG GGG TGG ACT GGA CTC TTT	48
Met Leu Thr Pro Arg Val Leu Arg Ala Leu Gly Trp Thr Gly Leu Phe	
1 5 10 15	
TTT TTG CTT TTA TCT CCG AGC AAC GTC CTA GGA GCC AGC CTT AGC CGG	96
Phe Leu Leu Leu Ser Pro Ser Asn Val Leu Gly Ala Ser Leu Ser Arg	
20 25 30	
GAT CTC GAA ACA CCC CCA TTT CTA TCC TTT GAT CCA TCC AAC ATT TCA	144
Asp Leu Glu Thr Pro Pro Phe Leu Ser Phe Asp Pro Ser Asn Ile Ser	

ES 2 278 382 T3

	35	40	45	
5	ATT AAC GGC GCG CCT TTA ACT GAG GTA CCT CAT GCA CCT TCC ACA GAA Ile Asn Gly Ala Pro Leu Thr Glu Val Pro His Ala Pro Ser Thr Glu 50 55 60	192		
	AGT GTG TCA ACA AAT TCG GAA AGT ACC AAT GAA CAT ACC ATA ACA GAA Ser Val Ser Thr Asn Ser Glu Ser Thr Asn Glu His Thr Ile Thr Glu 65 70 75 80	240		
10	ACG ACG GGC AAG AAC GCA TAC ATC CAC AAC AAT GCG TCT ACG GAC AAG Thr Thr Gly Lys Asn Ala Tyr Ile His Asn Asn Ala Ser Thr Asp Lys 85 90 95	288		
15	CAA AAT GCG AAC GAC ACT CAT AAA ACG CCC AAT ATA CTC TGC GAT ACG Gln Asn Ala Asn Asp Thr His Lys Thr Pro Asn Ile Leu Cys Asp Thr 100 105 110	336		
	GAA GAA GTT TTT GTT TTC CTT AAC GAA ACG GGA AGA TTT GTT TGT ACT Glu Glu Val Phe Val Phe Leu Asn Glu Thr Gly Arg Phe Val Cys Thr 115 120 125	384		
20	CTC AAA GTC GAC CCC CCC TCG GAT AGT GAA TGG TCC AAC TTT GTT CTA Leu Lys Val Asp Pro Pro Ser Asp Ser Glu Trp Ser Asn Phe Val Leu 130 135 140	432		
25	GAT CTG ATC TTT AAC CCA ATT GAA TAC CAC GCC AAC GAA AAG AAT GTG Asp Leu Ile Phe Asn Pro Ile Glu Tyr His Ala Asn Glu Lys Asn Val 145 150 155 160	480		
	GAA GCG GCG CGT ATC GCT GGT CTC TAT GGA GTC CCC GGA TCA GAC TAT Glu Ala Ala Arg Ile Ala Gly Leu Tyr Gly Val Pro Gly Ser Asp Tyr 165 170 175	528		
30	GCA TAC CCA CGT CAA TCT GAA TTA ATT TCT TCG ATT CGA CGA GAT CCC Ala Tyr Pro Arg Gln Ser Glu Leu Ile Ser Ser Ile Arg Arg Asp Pro 180 185 190	576		
35	CAG GGC ACA TTT TGG ACG AGC CCA TCA CCT CAT GGA AAC AAG TAC TTC Gln Gly Thr Phe Trp Thr Ser Pro Ser Pro His Gly Asn Lys Tyr Phe 195 200 205	624		
	ATA TGG ATA AAC AAA ACA ACC AAT ACG ATG GGC GTG GAA ATT AGA AAT Ile Trp Ile Asn Lys Thr Thr Asn Thr Met Gly Val Glu Ile Arg Asn 210 215 220	672		
40	GTA GAT TAT GCT GAT AAT GGC TAC ATG CAA GTC ATT ATG CGT GAC CAT Val Asp Tyr Ala Asp Asn Gly Tyr Met Gln Val Ile Met Arg Asp His 225 230 235 240	720		
45	TTT AAT CGG CCT TTA ATA GAT AAA CAT ATT TAC ATA CGT GTG TGT CAA Phe Asn Arg Pro Leu Ile Asp Lys His Ile Tyr Ile Arg Val Cys Gln 245 250 255	768		
	CGA CCT GCA TCA GTG GAT GTA CTG GCC CCT CCA GTC CTC AGC GGA GAA Arg Pro Ala Ser Val Asp Val Leu Ala Pro Pro Val Leu Ser Gly Glu 260 265 270	816		
50	AAT TAC AAG GCA TCT TGT ATC GTT AGA CAC TTT TAT CCC CCT GGA TCT Asn Tyr Lys Ala Ser Cys Ile Val Arg His Phe Tyr Pro Pro Gly Ser 275 280 285	864		
55	GTC TAT GTA TCT TGG AGA CAG AAT GGA AAC ATT GCA ACT CCT CGG AAA Val Tyr Val Ser Trp Arg Gln Asn Gly Asn Ile Ala Thr Pro Arg Lys 290 295 300	912		
60	GAT CGC GAT GGA AGT TTT TGG TGG TTC GAA TCT GGT AGA GGA GCT ACG	960		
65				

ES 2 278 382 T3

	Asp	Arg	Asp	Gly	Ser	Phe	Trp	Trp	Phe	Glu	Ser	Gly	Arg	Gly	Ala	Thr	
	305					310				315						320	
5	TTG	GTT	TCT	ACA	ATA	ACA	TTG	GGA	AAT	TCA	GGA	ATT	GAT	TTC	CCC	CCC	1008
	Leu	Val	Ser	Thr	Ile	Thr	Leu	Gly	Asn	Ser	Gly	Ile	Asp	Phe	Pro	Pro	
					325				330						335		
	AAA	ATA	TCT	TGT	CTG	GTT	GCC	TGG	AAG	CAG	GGT	GAT	ATG	ATC	AGC	ACG	1056
	Lys	Ile	Ser	Cys	Leu	Val	Ala	Trp	Lys	Gln	Gly	Asp	Met	Ile	Ser	Thr	
10					340				345					350			
	ACG	AAT	GCC	ACA	GCT	ATC	CCG	ACG	GTA	TAT	CAT	CAT	CCC	CGT	TTA	TCC	1104
	Thr	Asn	Ala	Thr	Ala	Ile	Pro	Thr	Val	Tyr	His	His	Pro	Arg	Leu	Ser	
					355				360					365			
	CTG	GCT	TTT	AAA	GAT	GGG	TAT	GCA	ATA	TGT	ACT	ATA	GAA	TGT	GTC	CCC	1152
15	Leu	Ala	Phe	Lys	Asp	Gly	Tyr	Ala	Ile	Cys	Thr	Ile	Glu	Cys	Val	Pro	
					370				375					380			
	TCT	GAG	ATT	ACT	GTA	CGG	TOG	TTA	GTA	CAT	GAT	GAA	GCG	CAG	CCT	AAC	1200
	Ser	Glu	Ile	Thr	Val	Arg	Trp	Leu	Val	His	Asp	Glu	Ala	Gln	Pro	Asn	
20					385									395		400	
	ACA	ACT	TAT	AAT	ACT	GTG	GTT	ACA	GGT	CTC	TGC	CGG	ACC	ATC	GAT	CGC	1248
	Thr	Thr	Tyr	Asn	Thr	Val	Val	Thr	Gly	Leu	Cys	Arg	Thr	Ile	Asp	Arg	
					405					410					415		
	CAT	AGA	AAT	CTC	CTC	AGC	CGC	ATT	CCA	GTA	TGG	GAC	AAT	TGG	ACG	AAA	1296
25	His	Arg	Asn	Leu	Ser	Arg	Ile	Pro	Val	Trp	Asp	Asn	Trp	Thr	Lys		
					420				425					430			
	ACA	AAA	TAT	ACG	TGC	AGA	CTC	ATA	GGC	TAC	CCC	TTC	GAT	GAA	GAT	AAA	1344
	Thr	Lys	Tyr	Thr	Cys	Arg	Leu	Ile	Gly	Tyr	Pro	Phe	Asp	Glu	Asp	Lys	
					435				440					445			
	TTT	CAA	GAT	TCG	GAA	TAT	TAC	GAT	GCA	ACT	CCA	TCT	GCA	AGA	GGA	ACA	1392
30	Phe	Gln	Asp	Ser	Glu	Tyr	Tyr	Asp	Ala	Thr	Pro	Ser	Ala	Arg	Gly	Thr	
					450				455					460			
	CCC	ATG	GTT	ATT	ACG	GTT	ACG	GCA	GTT	TTG	GGA	TTG	GCT	GTA	ATT	TTA	1440
35	Pro	Met	Val	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Val	Leu	Gly	Leu	Ala	Val	Ile	Leu	
					465									475		480	
	GGG	ATG	GGG	ATA	ATC	ATG	ACT	GCC	CTA	TGT	TTA	TAC	AAC	TCC	ACA	CGA	1488
	Gly	Met	Gly	Ile	Ile	Met	Thr	Ala	Leu	Cys	Leu	Tyr	Asn	Ser	Thr	Arg	
					485					490					495		
40	AAA	AAT	ATT	CGA	TTA	TAA											1506
	Lys	Asn	Ile	Arg	Leu												
					500												

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 501 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

Met Leu Thr Pro Arg Val Leu Arg Ala Leu Gly Trp Thr Gly Leu Phe
1 5 10 15

Phe Leu Leu Leu Ser Pro Ser Asn Val Leu Gly Ala Ser Leu Ser Arg

ES 2 278 382 T3

	20	25	30
5	Asp Leu Glu Thr Pro Pro Phe Leu Ser Phe Asp Pro Ser Asn Ile Ser 35 40 45		
	Ile Asn Gly Ala Pro Leu Thr Glu Val Pro His Ala Pro Ser Thr Glu 50 55 60		
10	Ser Val Ser Thr Asn Ser Glu Ser Thr Asn Glu His Thr Ile Thr Glu 65 70 75 80		
	Thr Thr Gly Lys Asn Ala Tyr Ile His Asn Asn Ala Ser Thr Asp Lys 85 90 95		
15	Gln Asn Ala Asn Asp Thr His Lys Thr Pro Asn Ile Leu Cys Asp Thr 100 105 110		
	Glu Glu Val Phe Val Phe Leu Asn Glu Thr Gly Arg Phe Val Cys Thr 115 120 125		
20	Leu Lys Val Asp Pro Pro Ser Asp Ser Glu Trp Ser Asn Phe Val Leu 130 135 140		
	Asp Leu Ile Phe Asn Pro Ile Glu Tyr His Ala Asn Glu Lys Asn Val 145 150 155 160		
25	Glu Ala Ala Arg Ile Ala Gly Leu Tyr Gly Val Pro Gly Ser Asp Tyr 165 170 175		
	Ala Tyr Pro Arg Gln Ser Glu Leu Ile Ser Ser Ile Arg Arg Asp Pro 180 185 190		
30	Gln Gly Thr Phe Trp Thr Ser Pro Ser Pro His Gly Asn Lys Tyr Phe 195 200 205		
	Ile Trp Ile Asn Lys Thr Thr Asn Thr Met Gly Val Glu Ile Arg Asn 210 215 220		
35	Val Asp Tyr Ala Asp Asn Gly Tyr Met Gln Val Ile Met Arg Asp His 225 230 235 240		
	Phe Asn Arg Pro Leu Ile Asp Lys His Ile Tyr Ile Arg Val Cys Gln 245 250 255		
40	Arg Pro Ala Ser Val Asp Val Leu Ala Pro Pro Val Leu Ser Gly Glu 260 265 270		
	Asn Tyr Lys Ala Ser Cys Ile Val Arg His Phe Tyr Pro Pro Gly Ser 275 280 285		
45	Val Tyr Val Ser Trp Arg Gln Asn Gly Asn Ile Ala Thr Pro Arg Lys 290 295 300		
	Asp Arg Asp Gly Ser Phe Trp Trp Phe Glu Ser Gly Arg Gly Ala Thr 305 310 315 320		
50	Leu Val Ser Thr Ile Thr Leu Gly Asn Ser Gly Ile Asp Phe Pro Pro 325 330 335		
	Lys Ile Ser Cys Leu Val Ala Trp Lys Gln Gly Asp Met Ile Ser Thr 340 345 350		
55	Thr Asn Ala Thr Ala Ile Pro Thr Val Tyr His His Pro Arg Leu Ser 355 360 365		
	Leu Ala Phe Lys Asp Gly Tyr Ala Ile Cys Thr Ile Glu Cys Val Pro		

ES 2 278 382 T3

370 375 380
 Ser Glu Ile Thr Val Arg Trp Leu Val His Asp Glu Ala Gln Pro Asn
 385 390 395 400
 Thr Thr Tyr Asn Thr Val Val Thr Gly Leu Cys Arg Thr Ile Asp Arg
 405 410 415
 His Arg Asn Leu Leu Ser Arg Ile Pro Val Trp Asp Asn Trp Thr Lys
 420 425 430
 Thr Lys Tyr Thr Cys Arg Leu Ile Gly Tyr Pro Phe Asp Glu Asp Lys
 435 440 445
 Phe Gln Asp Ser Glu Tyr Tyr Asp Ala Thr Pro Ser Ala Arg Gly Thr
 450 455 460
 Pro Met Val Ile Thr Val Thr Ala Val Leu Gly Leu Ala Val Ile Leu
 465 470 475 480
 Gly Met Gly Ile Ile Met Thr Ala Leu Cys Leu Tyr Asn Ser Thr Arg
 485 490 495
 Lys Asn Ile Arg Leu
 500

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1734 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(ix) ASPECTO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..1734

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

ATG GAC CGC GCC GTT AGC CAA GTT GCG TTA GAG AAT GAT GAA AGA GAG 48
 Met Asp Arg Ala Val Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Asp Glu Arg Glu 15
 1 5 10
 GCA AAA AAT ACA TGG CGC TTG ATA TTC CGG ATT GCA ATC TTA TTC TTA 96
 Ala Lys Asn Thr Trp Arg Leu Ile Phe Arg Ile Ala Ile Leu Phe Leu 25 30
 20
 ACA GTA GTG ACC TTG GCT ATA TCT GTA GCC TCC CTT TTA TAT AGC ATG 144
 Thr Val Val Thr Leu Ala Ile Ser Val Ala Ser Leu Leu Tyr Ser Met 35 40 45
 GGG GCT AGC ACA CCT AGC GAT CTT GTA GGC ATA CCG ACT AGG ATT TCC 192
 Gly Ala Ser Thr Pro Ser Asp Leu Val Gly Ile Pro Thr Arg Ile Ser 50 55 60
 AGG GCA GAA GAA AAG ATT ACA TCT ACA CTT GGT TCC AAT CAA GAT GTA 240
 Arg Ala Glu Glu Lys Ile Thr Ser Thr Leu Gly Ser Asn Gln Asp Val 65 70 75 80

ES 2 278 382 T3

	GTA	GAT	AGG	ATA	TAT	AAG	CAA	GTG	GCC	CTT	GAG	TCT	CCA	TTG	GCA	TTG	288
	Val	Asp	Arg	Ile	Tyr	Lys	Gln	Val	Ala	Leu	Glu	Ser	Pro	Leu	Ala	Leu	
				85					90						95		
5	TTA	AAT	ACT	GAG	ACC	ACA	ATT	ATG	AAC	GCA	ATA	ACA	TCT	CTC	TCT	TAT	336
	Leu	Asn	Thr	Glu	Thr	Thr	Ile	Met	Asn	Ala	Ile	Thr	Ser	Leu	Ser	Tyr	
				100					105					110			
10	CAG	ATT	AAT	GGA	GCT	GCA	AAC	AAC	AGC	GGG	TGG	GGG	GCA	CCT	ATT	CAT	384
	Gln	Ile	Asn	Gly	Ala	Ala	Asn	Asn	Ser	Gly	Trp	Gly	Ala	Pro	Ile	His	
			115					120					125				
	GAC	CCA	GAT	TAT	ATA	GGG	GGG	ATA	GGC	AAA	GAA	CTC	ATT	GTA	GAT	GAT	432
	Asp	Pro	Asp	Tyr	Ile	Gly	Gly	Ile	Gly	Lys	Glu	Leu	Ile	Val	Asp	Asp	
			130				135					140					
15	GCT	AGT	GAT	GTC	ACA	TCA	TTC	TAT	CCC	TCT	GCA	TTT	CAA	GAA	CAT	CTG	480
	Ala	Ser	Asp	Val	Thr	Ser	Phe	Tyr	Pro	Ser	Ala	Phe	Gln	Glu	His	Leu	
	145					150					155					160	
20	AAT	TTT	ATC	CCG	GGG	CCT	ACT	ACA	GGA	TCA	GGT	TGC	ACT	CGA	ATA	CCC	528
	Asn	Phe	Ile	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Gly	Ser	Gly	Cys	Thr	Arg	Ile	Pro	
				165					170						175		
	TCA	TTT	GAC	ATG	AGT	GCT	ACC	CAT	TAC	TGC	TAC	ACC	CAT	AAT	GTA	ATA	576
	Ser	Phe	Asp	Met	Ser	Ala	Thr	His	Tyr	Cys	Tyr	Thr	His	Asn	Val	Ile	
			180					185						190			
25	TTG	TCT	GGA	TGC	AGA	GAT	CAC	TCA	CAC	TCA	CAT	CAG	TAT	TTA	GCA	CTT	624
	Leu	Ser	Gly	Cys	Arg	Asp	His	Ser	His	Ser	His	Gln	Tyr	Leu	Ala	Leu	
			195				200					205					
30	GGT	GTG	CTC	CCG	ACA	TCT	GCA	ACA	GGG	AGG	GTA	TTC	TTT	TCT	ACT	CTG	672
	Gly	Val	Leu	Arg	Thr	Ser	Ala	Thr	Gly	Arg	Val	Phe	Phe	Ser	Thr	Leu	
		210				215						220					
	CGT	TCC	ATC	AAC	CTG	GAC	GAC	ACC	CAA	AAT	CGG	AAG	TCT	TGC	AGT	GTG	720
	Arg	Ser	Ile	Asn	Leu	Asp	Asp	Thr	Gln	Asn	Arg	Lys	Ser	Cys	Ser	Val	
					230						235					240	
35	AGT	GCA	ACT	CCC	CTG	GGT	TGT	GAT	ATG	CTG	TGC	TCG	AAA	GCC	ACG	GAG	768
	Ser	Ala	Thr	Pro	Leu	Gly	Cys	Asp	Met	Leu	Cys	Ser	Lys	Ala	Thr	Glu	
				245					250					255			
40	ACA	GAG	GAA	GAA	GAT	TAT	AAC	TCA	GCT	GTC	CCT	ACG	CGG	ATG	GTA	CAT	816
	Thr	Glu	Glu	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Val	Pro	Thr	Arg	Met	Val	His	
			260					265						270			
	GGG	AGG	TTA	GGG	TTC	GAC	GGC	CAA	TAT	CAC	GAA	AAG	GAC	CTA	GAT	GTC	864
	Gly	Arg	Leu	Gly	Phe	Asp	Gly	Gln	Tyr	His	Glu	Lys	Asp	Leu	Asp	Val	
			275				280						285				
45	ACA	ACA	TTA	TTC	GGG	GAC	TGG	GTG	GCC	AAC	TAC	CCA	GGA	GTA	GCG	GGT	912
	Thr	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Trp	Val	Ala	Asn	Tyr	Pro	Gly	Val	Gly	Gly	
			290				295					300					
50	GGA	TCT	TTT	ATT	GAC	AGC	CGC	GTG	TGG	TTC	TCA	GTC	TAC	GGA	GGG	TTA	960
	Gly	Ser	Phe	Ile	Asp	Ser	Arg	Val	Trp	Phe	Ser	Val	Tyr	Gly	Gly	Leu	
			305			310					315					320	
	AAA	CCC	AAT	ACA	CCC	AGT	GAC	ACT	GTA	CAG	GAA	GGG	AAA	TAT	GTG	ATA	1008
	Lys	Pro	Asn	Thr	Pro	Ser	Asp	Thr	Val	Gln	Glu	Gly	Lys	Tyr	Val	Ile	
					325					330					335		
55	TAC	AAG	CGA	TAC	AAT	GAC	ACA	TGC	CCA	GAT	GAG	CAA	GAC	TAC	CAG	ATT	1056
	Tyr	Lys	Arg	Tyr	Asn	Asp	Thr	Cys	Pro	Asp	Glu	Gln	Asp	Tyr	Gln	Ile	
				340					345					350			

ES 2 278 382 T3

	CGA ATG GCC AAG TCT TCG TAT AAG CCT GGA CCG TTT GGT GGG AAA CGC	1104
	Arg Met Ala Lys Ser Ser Tyr Lys Pro Gly Arg Phe Gly Gly Lys Arg	
	355 360 365	
5	ATA CAG CAG GCT ATC TTA TCT ATC AAA GTG TCA ACA TCC TTA GGC GAA	1152
	Ile Gln Gln Ala Ile Leu Ser Ile Lys Val Ser Thr Ser Leu Gly Glu	
	370 375 380	
10	GAC CCG GTA CTG ACT GTA CCG CCC AAC ACA GTC ACA CTC ATG GGG GCC	1200
	Asp Pro Val Leu Thr Val Pro Pro Asn Thr Val Thr Leu Met Gly Ala	
	385 390 395 400	
	GAA GGC AGA ATT CTC ACA GTA GGG ACA TCC CAT TTC TTG TAT CAG CGA	1248
	Glu Gly Arg Ile Leu Thr Val Gly Thr Ser His Phe Leu Tyr Gln Arg	
	405 410 415	
15	GGG TCA TCA TAC TTC TCT CCC GCG TTA TTA TAT CCT ATG ACA GTC AGC	1296
	Gly Ser Ser Tyr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Tyr Pro Met Thr Val Ser	
	420 425 430	
20	AAC AAA ACA GCC ACT CTT CAT AGT CCT TAT ACA TTC AAT GCC TTC ACT	1344
	Asn Lys Thr Ala Thr Leu His Ser Pro Tyr Thr Phe Asn Ala Phe Thr	
	435 440 445	
	CGG CCA GGT AGT ATC CCT TGC CAG GCT TCA GCA AGA TGC CCC AAC TCA	1392
	Arg Pro Gly Ser Ile Pro Cys Gln Ala Ser Ala Arg Cys Pro Asn Ser	
	450 455 460	
25	TGT GTT ACT GGA GTC TAT ACA GAT CCA TAT CCC CTA ATC TTC TAT AGA	1440
	Cys Val Thr Gly Val Tyr Thr Asp Pro Tyr Pro Leu Ile Phe Tyr Arg	
	465 470 475 480	
30	AAC CAC ACC TTG CGA GGG GTA TTC GGG ACA ATG CTT GAT GGT GAA CAA	1488
	Asn His Thr Leu Arg Gly Val Phe Gly Thr Met Leu Asp Gly Glu Gln	
	485 490 495	
	GCA AGA CTT AAC CCT GCG TCT GCA GTA TTC GAT AGC ACA TCC CGC AGT	1536
	Ala Arg Leu Asn Pro Ala Ser Ala Val Phe Asp Ser Thr Ser Arg Ser	
	500 505 510	
35	CGC ATA ACT CGA GTG AGT TCA AGC AGC ATC AAA GCA GCA TAC ACA ACA	1584
	Arg Ile Thr Arg Val Ser Ser Ser Ile Lys Ala Ala Tyr Thr Thr	
	515 520 525	
40	TCA ACT TGT TTT AAA GTG GTC AAG ACC AAT AAG ACC TAT TGT CTC AGC	1632
	Ser Thr Cys Phe Lys Val Val Lys Thr Asn Lys Thr Tyr Cys Leu Ser	
	530 535 540	
	ATT GCT GAA ATA TCT AAT ACT CTC TTC GGA GAA TTC AGA ATC GTC CCG	1680
	Ile Ala Glu Ile Ser Asn Thr Leu Phe Gly Glu Phe Arg Ile Val Pro	
	545 550 555 560	
45	TTA CTA GTT GAG ATC CTC AAA GAT GAC GGG GTT AGA GAA GCC AGG TCT	1728
	Leu Leu Val Glu Ile Leu Lys Asp Asp Gly Val Arg Glu Ala Arg Ser	
	565 570 575	
50	GGC TAG	1734
	Gly	

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 577 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

ES 2 278 382 T3

	Met	Asp	Arg	Ala	Val	Ser	Gln	Val	Ala	Leu	Glu	Asn	Asp	Glu	Arg	Glu	
	1				5					10					15		
5	Ala	Lys	Asn	Thr	Trp	Arg	Leu	Ile	Phe	Arg	Ile	Ala	Ile	Leu	Phe	Leu	
				20					25					30			
	Thr	Val	Val	Thr	Leu	Ala	Ile	Ser	Val	Ala	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser	Met	
				35				40						45			
10	Gly	Ala	Ser	Thr	Pro	Ser	Asp	Leu	Val	Gly	Ile	Pro	Thr	Arg	Ile	Ser	
		50					55					60					
	Arg	Ala	Glu	Glu	Lys	Ile	Thr	Ser	Thr	Leu	Gly	Ser	Asn	Gln	Asp	Val	
		65				70					75					80	
15	Val	Asp	Arg	Ile	Tyr	Lys	Gln	Val	Ala	Leu	Glu	Ser	Pro	Leu	Ala	Leu	
					85					90					95		
	Leu	Asn	Thr	Glu	Thr	Thr	Ile	Met	Asn	Ala	Ile	Thr	Ser	Leu	Ser	Tyr	
				100					105					110			
20	Gln	Ile	Asn	Gly	Ala	Ala	Asn	Asn	Ser	Gly	Trp	Gly	Ala	Pro	Ile	His	
			115					120					125				
	Asp	Pro	Asp	Tyr	Ile	Gly	Gly	Ile	Gly	Lys	Glu	Leu	Ile	Val	Asp	Asp	
		130					135					140					
25	Ala	Ser	Asp	Val	Thr	Ser	Phe	Tyr	Pro	Ser	Ala	Phe	Gln	Glu	His	Leu	
		145				150					155					160	
	Asn	Phe	Ile	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Gly	Ser	Gly	Cys	Thr	Arg	Ile	Pro	
				165					170						175		
30	Ser	Phe	Asp	Met	Ser	Ala	Thr	His	Tyr	Cys	Tyr	Thr	His	Asn	Val	Ile	
			180						185					190			
	Leu	Ser	Gly	Cys	Arg	Asp	His	Ser	His	Ser	His	Gln	Tyr	Leu	Ala	Leu	
			195				200						205				
35	Gly	Val	Leu	Arg	Thr	Ser	Ala	Thr	Gly	Arg	Val	Phe	Phe	Ser	Thr	Leu	
		210					215					220					
	Arg	Ser	Ile	Asn	Leu	Asp	Asp	Thr	Gln	Asn	Arg	Lys	Ser	Cys	Ser	Val	
		225			230						235					240	
	Ser	Ala	Thr	Pro	Leu	Gly	Cys	Asp	Met	Leu	Cys	Ser	Lys	Ala	Thr	Glu	
				245					250					255			
45	Thr	Glu	Glu	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Val	Pro	Thr	Arg	Met	Val	His	
				260					265					270			
	Gly	Arg	Leu	Gly	Phe	Asp	Gly	Gln	Tyr	His	Glu	Lys	Asp	Leu	Asp	Val	
			275					280					285				
50	Thr	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Trp	Val	Ala	Asn	Tyr	Pro	Gly	Val	Gly	Gly	
		290				295						300					
	Gly	Ser	Phe	Ile	Asp	Ser	Arg	Val	Trp	Phe	Ser	Val	Tyr	Gly	Gly	Leu	
		305				310					315					320	
55	Lys	Pro	Asn	Thr	Pro	Ser	Asp	Thr	Val	Gln	Glu	Gly	Lys	Tyr	Val	Ile	
				325						330					335		

ES 2 278 382 T3

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

- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 12:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 1662 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: doble
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
 - (iii) HIPOTÉTICA: NO
 - (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 - (ix) ASPECTO:
 - (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1..1662
 - (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

ES 2 278 382 T3

	ATG GGC TCC AGA CCT TCT ACC AAG AAC CCA GCA CCT ATG ATG CTG ACT Met Gly Ser Arg Pro Ser Thr Lys Asn Pro Ala Pro Met Met Leu Thr 1 5 10 15	48
5	ATC CGG GTC GCG CTG GTA CTG AGT TGC ATC TGT CCG GCA AAC TCC ATT Ile Arg Val Ala Leu Val Leu Ser Cys Ile Cys Pro Ala Asn Ser Ile 20 25 30	96
10	GAT GGC AGG CCT CTT GCA GCT GCA GGA ATT GTG GTT ACA GGA GAC AAA Asp Gly Arg Pro Leu Ala Ala Ala Gly Ile Val Val Thr Gly Asp Lys 35 40 45	144
15	GCA GTC AAC ATA TAC ACC TCA TCC CAG ACA GGA TCA ATC ATA GTT AAG Ala Val Asn Ile Tyr Thr Ser Ser Gln Thr Gly Ser Ile Ile Val Lys 50 55 60	192
20	CTC CTC CCG AAT CTG CCA AAG GAT AAG GAG GCA TGT GCG AAA GCC CCC Leu Leu Pro Asn Leu Pro Lys Asp Lys Glu Ala Cys Ala Lys Ala Pro 65 70 75 80	240
25	TTG GAT GCA TAC AAC AGG ACA TTG ACC ACT TTG CTC ACC CCC CTT GGT Leu Asp Ala Tyr Asn Arg Thr Leu Thr Thr Leu Thr Pro Leu Gly 85 90 95	288
30	GAC TCT ATC CGT AGG ATA CAA GAG TCT GTG ACT ACA TCT GGA GGG GGG Asp Ser Ile Arg Arg Ile Gln Glu Ser Val Thr Thr Ser Gly Gly Gly 100 105 110	336
35	AGA CAG GGG CGC CTT ATA GGC GCC ATT ATT GGC GGT GTG GCT CTT GGG Arg Gln Gly Arg Leu Ile Gly Ala Ile Ile Gly Gly Val Ala Leu Gly 115 120 125	384
40	GTT GCA ACT GCC GCA CAA ATA ACA GCG GCC GCA GCT CTG ATA CAA GCC Val Ala Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Ala Ala Ala Leu Ile Gln Ala 130 135 140	432
45	AAA CAA AAT GCT GCC AAC ATC CTC CGA CTT AAA GAG AGC ATT GCC GCA Lys Gln Asn Ala Ala Asn Ile Leu Arg Leu Lys Glu Ser Ile Ala Ala 145 150 155 160	480
50	ACC AAT GAG GCT GTG CAT GAG GTC ACT GAC GGA TTA TCG CAA CTA GCA Thr Asn Glu Ala Val His Glu Val Thr Asp Gly Leu Ser Gln Leu Ala 165 170 175	528
55	GTG GCA GTT GGG AAG ATG CAG CAG TTC GTT AAT GAC CAA TTT AAT AAA Val Ala Val Gly Lys Met Gln Gln Phe Val Asn Asp Gln Phe Asn Lys 180 185 190	576
60	ACA GCT CAG GAA TTA GAC TGC ATC AAA ATT GCA CAG CAA GTT GGT GTA Thr Ala Gln Glu Leu Asp Cys Ile Lys Ile Ala Gln Gln Val Gly Val 195 200 205	624
65	GAG CTC AAC CTG TAC CTA ACC GAA TCG ACT ACA GTA TTC GGA CCA CAA Glu Leu Asn Leu Tyr Leu Thr Glu Ser Thr Thr Val Phe Gly Pro Gln 210 215 220	672
70	ATC ACT TCA CCT GCC TTA AAC AAG CTG ACT ATT CAG GCA CTT TAC AAT Ile Thr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Leu Thr Ile Gln Ala Leu Tyr Asn 225 230 235 240	720
75	CTA GCT GGT GGG AAT ATG GAT TAC TTA TTG ACT AAG TTA GGT ATA GGG Leu Ala Gly Gly Asn Met Asp Tyr Leu Leu Thr Lys Leu Gly Ile Gly 245 250 255	768
80	AAC AAT CAA CTC AGC TCA TTA ATC GGT AGC GGC TTA ATC ACC GGT AAC Asn Asn Gln Leu Ser Ser Leu Ile Gly Ser Gly Leu Ile Thr Gly Asn 260 265 270	816

ES 2 278 382 T3

	CCT	ATT	CTA	TAC	GAC	TCA	CAG	ACT	CAA	CTC	TTG	GGT	ATA	CAG	GTA	ACT	864
	Pro	Ile	Leu	Tyr	Asp	Ser	Gln	Thr	Gln	Leu	Leu	Gly	Ile	Gln	Val	Thr	
			275					280					285				
5	CTA	CCT	TCA	GTC	GGG	AAC	CTA	AAT	AAT	ATG	CGT	GCC	ACC	TAC	TTG	GAA	912
	Leu	Pro	Ser	Val	Gly	Asn	Leu	Asn	Asn	Met	Arg	Ala	Thr	Tyr	Leu	Glu	
			290				295					300					
10	ACC	TTA	TCC	GTA	AGC	ACA	ACC	AGG	GGA	TTT	GCC	TCG	GCA	CTT	GTC	CCA	960
	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Thr	Thr	Arg	Gly	Phe	Ala	Ser	Ala	Leu	Val	Pro	
						310					315					320	
	AAA	GTG	GTG	ACA	CGG	GTC	GGT	TCT	GTG	ATA	GAA	GAA	CTT	GAC	ACC	TCA	1008
	Lys	Val	Val	Thr	Arg	Val	Gly	Ser	Val	Ile	Glu	Glu	Leu	Asp	Thr	Ser	
					325					330					335		
15	TAC	TGT	ATA	GAA	ACT	GAC	TTA	GAT	TTA	TAT	TGT	ACA	AGA	ATA	GTA	ACG	1056
	Tyr	Cys	Ile	Glu	Thr	Asp	Leu	Asp	Leu	Tyr	Cys	Thr	Arg	Ile	Val	Thr	
				340				345						350			
20	TTC	CCT	ATG	TCC	CCT	GGT	ATT	TAC	TCC	TGC	TTG	AGC	GGC	AAT	ACA	TCG	1104
	Phe	Pro	Met	Ser	Pro	Gly	Ile	Tyr	Ser	Cys	Leu	Ser	Gly	Asn	Thr	Ser	
				355			360						365				
	GCC	TGT	ATG	TAC	TCA	AAG	ACC	GAA	GGC	GCA	CTT	ACT	ACA	CCA	TAT	ATG	1152
	Ala	Cys	Met	Tyr	Ser	Lys	Thr	Glu	Gly	Ala	Leu	Thr	Thr	Pro	Tyr	Met	
				370			375					380					
25	ACT	ATC	AAA	GGC	TCA	GTC	ATC	GCT	AAC	TGC	AAG	ATG	ACA	ACA	TGT	AGA	1200
	Thr	Ile	Lys	Gly	Ser	Val	Ile	Ala	Asn	Cys	Lys	Met	Thr	Thr	Cys	Arg	
						390					395					400	
	TGT	GTA	AAC	CCC	CCG	GGT	ATC	ATA	TCG	CAA	AAC	TAT	GGA	GAA	GCC	GTG	1248
	Cys	Val	Asn	Pro	Pro	Gly	Ile	Ile	Ser	Gln	Asn	Tyr	Gly	Glu	Ala	Val	
					405					410					415		
	TCT	CTA	ATA	GAT	AAA	CAA	TCA	TGC	AAT	GTT	TTA	TCC	TTA	GGC	GGG	ATA	1296
	Ser	Leu	Ile	Asp	Lys	Gln	Ser	Cys	Asn	Val	Leu	Ser	Leu	Gly	Gly	Ile	
				420					425					430			
35	ACT	TTA	AGG	CTC	AGT	GGG	GAA	TTC	GAT	GTA	ACT	TAT	CAG	AAG	AAT	ATC	1344
	Thr	Leu	Arg	Leu	Ser	Gly	Glu	Phe	Asp	Val	Thr	Tyr	Gln	Lys	Asn	Ile	
				435				440					445				
	TCA	ATA	CAA	GAT	TCT	CAA	GTA	ATA	ATA	ACA	GGC	AAT	CTT	GAT	ATC	TCA	1392
	Ser	Ile	Gln	Asp	Ser	Gln	Val	Ile	Ile	Thr	Gly	Asn	Leu	Asp	Ile	Ser	
				450			455					460					
	ACT	GAG	CTT	GGG	AAT	GTC	AAC	AAC	TCG	ATC	AGT	AAT	GCC	TTG	AAT	AAG	1440
	Thr	Glu	Leu	Gly	Asn	Val	Asn	Asn	Ser	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu	Asn	Lys	
						470					475					480	
45	TTA	GAG	GAA	AGC	AAC	AGA	AAA	CTA	GAC	AAA	GTC	AAT	GTC	AAA	CTG	ACC	1488
	Leu	Glu	Glu	Ser	Asn	Arg	Lys	Leu	Asp	Lys	Val	Asn	Val	Lys	Leu	Thr	
					485					490					495		
	AGC	ACA	TCT	GCT	CTC	ATT	ACC	TAT	ATC	GTT	TTG	ACT	ATC	ATA	TCT	CTT	1536
	Ser	Thr	Ser	Ala	Leu	Ile	Thr	Tyr	Ile	Val	Leu	Thr	Ile	Ile	Ser	Leu	
				500					505					510			
	GTT	TTT	GGT	ATA	CTT	AGC	CTG	ATT	CTA	GCA	TGC	TAC	CTA	ATG	TAC	AAG	1584
	Val	Phe	Gly	Ile	Leu	Ser	Leu	Ile	Leu	Ala	Cys	Tyr	Leu	Met	Tyr	Lys	
				515				520					525				
55	CAA	AAG	GCG	CAA	CAA	AAG	ACC	TTA	TTA	TGG	CTT	GGG	AAT	AAT	ACC	CTA	1632
	Gln	Lys	Ala	Gln	Gln	Lys	Thr	Leu	Leu	Trp	Leu	Gly	Asn	Asn	Thr	Leu	
				530			535					540					
60	GAT	CAG	ATG	AGA	GCC	ACT	ACA	AAA	ATG	TGA							1662
	Asp	Gln	Met	Arg	Ala	Thr	Thr	Lys	Met								
				545			550										

65 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 278 382 T3

(A) LONGITUD: 553 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13:

```

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

Ile Arg Val Ala Leu Val Leu Ser Cys Ile Cys Pro Ala Asn Ser Ile
          20           25           30

Asp Gly Arg Pro Leu Ala Ala Ala Gly Ile Val Val Thr Gly Asp Lys
          35           40           45

Ala Val Asn Ile Tyr Thr Ser Ser Gln Thr Gly Ser Ile Ile Val Lys
          50           55           60

Leu Leu Pro Asn Leu Pro Lys Asp Lys Glu Ala Cys Ala Lys Ala Pro
          65           70           75           80

Leu Asp Ala Tyr Asn Arg Thr Leu Thr Thr Leu Leu Thr Pro Leu Gly
          85           90           95

Asp Ser Ile Arg Arg Ile Gln Glu Ser Val Thr Thr Ser Gly Gly Gly
          100          105          110

Arg Gln Gly Arg Leu Ile Gly Ala Ile Ile Gly Gly Val Ala Leu Gly
          115          120          125

Val Ala Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Ala Ala Ala Leu Ile Gln Ala
          130          135          140

Lys Gln Asn Ala Ala Asn Ile Leu Arg Leu Lys Glu Ser Ile Ala Ala
          145          150          155          160

Thr Asn Glu Ala Val His Glu Val Thr Asp Gly Leu Ser Gln Leu Ala
          165          170          175

Val Ala Val Gly Lys Met Gln Gln Phe Val Asn Asp Gln Phe Asn Lys
          180          185          190

Thr Ala Gln Glu Leu Asp Cys Ile Lys Ile Ala Gln Gln Val Gly Val
          195          200          205

Glu Leu Asn Leu Tyr Leu Thr Glu Ser Thr Thr Val Phe Gly Pro Gln
          210          215          220

Ile Thr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Leu Thr Ile Gln Ala Leu Tyr Asn
          225          230          235          240

Leu Ala Gly Gly Asn Met Asp Tyr Leu Leu Thr Lys Leu Gly Ile Gly
          245          250          255

Asn Asn Gln Leu Ser Ser Leu Ile Gly Ser Gly Leu Ile Thr Gly Asn
          260          265          270

```

Pro Ile Leu Tyr Asp Ser Gln Thr Gln Leu Leu Gly Ile Gln Val Thr
 275 280 285
 5 Leu Pro Ser Val Gly Asn Leu Asn Asn Met Arg Ala Thr Tyr Leu Glu
 290 295 300
 10 Thr Leu Ser Val Ser Thr Thr Arg Gly Phe Ala Ser Ala Leu Val Pro
 305 310 315 320
 Lys Val Val Thr Arg Val Gly Ser Val Ile Glu Glu Leu Asp Thr Ser
 325 330 335
 15 Tyr Cys Ile Glu Thr Asp Leu Asp Leu Tyr Cys Thr Arg Ile Val Thr
 340 345 350
 Phe Pro Met Ser Pro Gly Ile Tyr Ser Cys Leu Ser Gly Asn Thr Ser
 355 360 365
 20 Ala Cys Met Tyr Ser Lys Thr Glu Gly Ala Leu Thr Thr Pro Tyr Met
 370 375 380
 Thr Ile Lys Gly Ser Val Ile Ala Asn Cys Lys Met Thr Thr Cys Arg
 385 390 395 400
 25 Cys Val Asn Pro Pro Gly Ile Ile Ser Gln Asn Tyr Gly Glu Ala Val
 405 410 415
 Ser Leu Ile Asp Lys Gln Ser Cys Asn Val Leu Ser Leu Gly Gly Ile
 420 425 430
 30 Thr Leu Arg Leu Ser Gly Glu Phe Asp Val Thr Tyr Gln Lys Asn Ile
 435 440 445
 35 Ser Ile Gln Asp Ser Gln Val Ile Ile Thr Gly Asn Leu Asp Ile Ser
 450 455 460
 Thr Glu Leu Gly Asn Val Asn Asn Ser Ile Ser Asn Ala Leu Asn Lys
 465 470 475 480
 40 Leu Glu Glu Ser Asn Arg Lys Leu Asp Lys Val Asn Val Lys Leu Thr
 485 490 495
 Ser Thr Ser Ala Leu Ile Thr Tyr Ile Val Leu Thr Ile Ile Ser Leu
 500 505 510
 Val Phe Gly Ile Leu Ser Leu Ile Leu Ala Cys Tyr Leu Met Tyr Lys
 515 520 525
 50 Gln Lys Ala Gln Gln Lys Thr Leu Leu Trp Leu Gly Asn Asn Thr Leu
 530 535 540
 Asp Gln Met Arg Ala Thr Thr Lys Met
 545 550

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 3469 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

ES 2 278 382 T3

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(ix) ASPECTO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..3489

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14:

	ATG TTG GTA ACA CCT CTT TTA CTA GTG ACT CTT TTG TGT GTA CTA TGT	48
	Met Leu Val Thr Pro Leu Leu Leu Val Thr Leu Leu Cys Val Leu Cys	
	1 5 10 15	
15	AGT GCT GCT TTT TAT GAC AGT AGT TCT TAC GTT TAC TAC TAC CAA AGT	96
	Ser Ala Ala Leu Tyr Asp Ser Ser Ser Tyr Val Tyr Tyr Tyr Gln Ser	
	20 25 30	
20	GCC TTT AGA CCA CCT AAT GGT TGG CAT TTA CAC GGG GGT GCT TAT GCG	144
	Ala Phe Arg Pro Pro Asn Gly Trp His Leu His Gly Gly Ala Tyr Ala	
	35 40 45	
25	GTA GTT AAT ATT TCT AGC GAA TCT AAT AAT GCA GGC TCT TCA CCT GGG	192
	Val Val Asn Ile Ser Ser Glu Ser Asn Asn Ala Gly Ser Ser Pro Gly	
	50 55 60	
25	TGT ATT GTT GGT ACT ATT CAT GGT GGT CGT GTT GTT AAT GCT TCT TCT	240
	Cys Ile Val Gly Thr Ile His Gly Gly Arg Val Val Asn Ala Ser Ser	
	65 70 75 80	
30	ATA GCT ATG ACG GCA CCG TCA TCA GGT ATG GCT TGG TCT AGC AGT CAG	288
	Ile Ala Met Thr Ala Pro Ser Ser Gly Met Ala Trp Ser Ser Ser Gln	
	85 90 95	
35	TTT TGT ACT GCA CAC TGT AAC TTT TCA GAT ACT ACA GTG TTT GTT ACA	336
	Phe Cys Thr Ala His Cys Asn Phe Ser Asp Thr Thr Val Phe Val Thr	
	100 105 110	
35	CAT TGT TAT AAA TAT GAT GGG TGT CCT ATA ACT GGC ATG CTT CAA AAG	384
	His Cys Tyr Lys Tyr Asp Gly Cys Pro Ile Thr Gly Met Leu Gln Lys	
	115 120 125	
40	AAT TTT TTA CGT GTT TCT GCT ATG AAA AAT GGC CAG CTT TTC TAT AAT	432
	Asn Phe Leu Arg Val Ser Ala Met Lys Asn Gly Gln Leu Phe Tyr Asn	
	130 135 140	
45	TTA ACA GTT AGT GTA GCT AAG TAC CCT ACT TTT AAA TCA TTT CAG TGT	480
	Leu Thr Val Ser Val Ala Lys Tyr Pro Thr Phe Lys Ser Phe Gln Cys	
	145 150 155 160	
45	GTT AAT AAT TTA ACA TCC GTA TAT TTA AAT GGT GAT CTT GTT TAC ACC	528
	Val Asn Asn Leu Thr Ser Val Tyr Leu Asn Gly Asp Leu Val Tyr Thr	
	165 170 175	
50	TCT AAT GAG ACC ACA GAT GTT ACA TCT GCA GGT GTT TAT TTT AAA GCT	576
	Ser Asn Glu Thr Thr Asp Val Thr Ser Ala Gly Val Tyr Phe Lys Ala	
	180 185 190	
50	GGT GGA CCT ATA ACT TAT AAA GTT ATG AGA AAA GTT AAA GCC CTG GCT	624
	Gly Gly Pro Ile Thr Tyr Lys Val Met Arg Lys Val Lys Ala Leu Ala	
	195 200 205	
55	TAT TTT GTT AAT GGT ACT GCA CAA GAT GTT ATT TTG TGT GAT GGA TCA	672
	Tyr Phe Val Asn Gly Thr Ala Gln Asp Val Ile Leu Cys Asp Gly Ser	
	210 215 220	
60	CCT AGA GGC TTG TTA GCA TGC CAG TAT AAT ACT GGC AAT TTT TCA GAT	720
	Pro Arg Gly Leu Leu Ala Cys Gln Tyr Asn Thr Gly Asn Phe Ser Asp	
	225 230 235 240	

ES 2 278 382 T3

	GGC TTT TAT CCT TTT ATT AAT AGT AGT TTA GTT AAG CAG AAG TTT ATT	768
	Gly Phe Tyr Pro Phe Ile Asn Ser Ser Leu Val Lys Gln Lys Phe Ile	
	245 250 255	
5	GTC TAT CGT GAA AAT AGT GTT AAT ACT ACT TTT ACG TTA CAC AAT TTC	816
	Val Tyr Arg Glu Asn Ser Val Asn Thr Thr Phe Thr Leu His Asn Phe	
	260 265 270	
10	ACT TTT CAT AAT GAG ACT GGC GCC AAC CCT AAT CCT AGT GGT GTT CAG	864
	Thr Phe His Asn Glu Thr Gly Ala Asn Pro Asn Pro Ser Gly Val Gln	
	275 280 285	
15	AAT ATT CTA ACT TAC CAA ACA CAA ACA GCT CAG AGT GGT TAT TAT AAT	912
	Asn Ile Leu Thr Tyr Gln Thr Gln Thr Ala Gln Ser Gly Tyr Tyr Asn	
	290 295 300	
20	TTT AAT TTT TCC TTT CTG AGT AGT TTT GTT TAT AAG GAG TCT AAT TTT	960
	Phe Asn Phe Ser Phe Leu Ser Ser Phe Val Tyr Lys Glu Ser Asn Phe	
	305 310 315 320	
25	ATG TAT GGA TCT TAT CAC CCA AGT TGT AAT TTT AGA CTA GAA ACT ATT	1008
	Met Tyr Gly Ser Tyr His Pro Ser Cys Asn Phe Arg Leu Glu Thr Ile	
	325 330 335	
30	AAT AAT GGC TTG TGG TTT AAT TCA CTT TCA GTT TCA ATT GCT TAC GGT	1056
	Asn Asn Gly Leu Trp Phe Asn Ser Leu Ser Val Ser Ile Ala Tyr Gly	
	340 345 350	
35	CCT CTT CAA GGT GGT TGC AAG CAA TCT GTC TTT AGT GGT AGA GCA ACT	1104
	Pro Leu Gln Gly Gly Cys Lys Gln Ser Val Phe Ser Gly Arg Ala Thr	
	355 360 365	
40	TGT TGT TAT GCT TAT TCA TAT GGA GGT CCT TCG CTG TGT AAA GGT GTT	1152
	Cys Cys Tyr Ala Tyr Ser Tyr Gly Gly Pro Ser Leu Cys Lys Gly Val	
	370 375 380	
45	TAT TCA GGT GAG TTA GAT CTT AAT TTT GAA TGT GGA CTG TTA GTT TAT	1200
	Tyr Ser Gly Glu Leu Asp Leu Asn Phe Glu Cys Gly Leu Leu Val Tyr	
	385 390 395 400	
50	GTT ACT AAG AGC GGT GGC TCT CGT ATA CAA ACA GCC ACT GAA CCG CCA	1248
	Val Thr Lys Ser Gly Gly Ser Arg Ile Gln Thr Ala Thr Glu Pro Pro	
	405 410 415	
55	GTT ATA ACT CGA CAC AAT TAT AAT AAT ATT ACT TTA AAT ACT TGT GTT	1296
	Val Ile Thr Arg His Asn Tyr Asn Asn Ile Thr Leu Asn Thr Cys Val	
	420 425 430	
60	GAT TAT AAT ATA TAT GGC AGA ACT GGC CAA GGT TTT ATT ACT AAT GTA	1344
	Asp Tyr Asn Ile Tyr Gly Arg Thr Gly Gln Gly Phe Ile Thr Asn Val	
	435 440 445	
65	ACC GAC TCA GCT GTT AGT TAT AAT TAT CTA GCA GAC GCA GGT TTG GCT	1392
	Thr Asp Ser Ala Val Ser Tyr Asn Tyr Leu Ala Asp Ala Gly Leu Ala	
	450 455 460	
70	ATT TTA GAT ACA TCT GGT TCC ATA GAC ATC TTT GTT GTA CAA GGT GAA	1440
	Ile Leu Asp Thr Ser Gly Ser Ile Asp Ile Phe Val Val Gln Gly Glu	
	465 470 475 480	
75	TAT GGT CTT ACT TAT TAT AAG GTT AAC CCT TGC GAA GAT GTC AAC CAG	1488
	Tyr Gly Leu Thr Tyr Tyr Lys Val Asn Pro Cys Glu Asp Val Asn Gln	
	485 490 495	
80	CAG TTT GTA GTT TCT GGT GGT AAA TTA GTA GGT ATT CTT ACT TCA CGT	1536
	Gln Phe Val Val Ser Gly Gly Lys Leu Val Gly Ile Leu Thr Ser Arg	
	500 505 510	

ES 2 278 382 T3

	AAT GAG ACT GGT TCT CAG CTT CTT GAG AAC CAG TTT TAC ATT AAA ATC	1584
	Asn Glu Thr Gly Ser Gln Leu Leu Glu Asn Gln Phe Tyr Ile Lys Ile	
	515 520 525	
5	ACT AAT GGA ACA CGT CGT TTT AGA CGT TCT ATT ACT GAA AAT GTT GCA	1632
	Thr Asn Gly Thr Arg Arg Phe Arg Arg Ser Ile Thr Glu Asn Val Ala	
	530 535 540	
10	AAT TGC CCT TAT GTT AGT TAT GGT AAG TTT TGT ATA AAA CCT GAT GGT	1680
	Asn Cys Pro Tyr Val Ser Tyr Gly Lys Phe Cys Ile Lys Pro Asp Gly	
	545 550 555 560	
	TCA ATT GCC ACA ATA GTA CCA AAA CAA TTG GAA CAG TTT GTG GCA CCT	1728
	Ser Ile Ala Thr Ile Val Pro Lys Gln Leu Glu Gln Phe Val Ala Pro	
	565 570 575	
15	TTA CTT AAT GTT ACT GAA AAT GTG CTC ATA CCT AAC AGT TTT AAT TTA	1776
	Leu Leu Asn Val Thr Glu Asn Val Leu Ile Pro Asn Ser Phe Asn Leu	
	580 585 590	
20	ACT GTT ACA GAT GAG TAC ATA CAA ACG CGT ATG GAT AAG GTC CAA ATT	1824
	Thr Val Thr Asp Glu Tyr Ile Gln Thr Arg Met Asp Lys Val Gln Ile	
	595 600 605	
	AAT TGT CTG CAG TAT GTT TGT GGC AAT TCT CTG GAT TGT AGA GAT TTG	1872
	Asn Cys Leu Gln Tyr Val Cys Gly Asn Ser Leu Asp Cys Arg Asp Leu	
	610 615 620	
25	TTT CAA CAA TAT GGG CCT GTT TGT GAC AAC ATA TTG TCT GTA GTA AAT	1920
	Phe Gln Gln Tyr Gly Pro Val Cys Asp Asn Ile Leu Ser Val Val Asn	
	625 630 635 640	
30	AGT ATT GGT CAA AAA GAA GAT ATG GAA CTT TTG AAT TTC TAT TCT TCT	1968
	Ser Ile Gly Gln Lys Glu Asp Met Glu Leu Leu Asn Phe Tyr Ser Ser	
	645 650 655	
	ACT AAA CCG GCT GGT TTT AAT ACA CCA TTT CTT AGT AAT GTT AGC ACT	2016
	Thr Lys Pro Ala Gly Phe Asn Thr Pro Phe Leu Ser Asn Val Ser Thr	
	660 665 670	
35	GGT GAG TTT AAT ATT TCT CTT CTG TTA ACA ACT CCT AGT AGT CCT AGA	2064
	Gly Glu Phe Asn Ile Ser Leu Leu Leu Thr Thr Pro Ser Ser Pro Arg	
	675 680 685	
40	AGG CGT TCT TTT ATT GAA GAC CTT CTA TTT ACA AGC GTT GAA TCT GTT	2112
	Arg Arg Ser Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Thr Ser Val Glu Ser Val	
	690 695 700	
	GGA TTA CCA ACA GAT GAC GCA TAC AAA AAT TGC ACT GCA GGA CCT TTA	2160
	Gly Leu Pro Thr Asp Asp Ala Tyr Lys Asn Cys Thr Ala Gly Pro Leu	
	705 710 715 720	
45	GGT TTT CTT AAG GAC CTT GCG TGT GCT CGT GAA TAT AAT GGT TTG CTT	2208
	Gly Phe Leu Lys Asp Leu Ala Cys Ala Arg Glu Tyr Asn Gly Leu Leu	
	725 730 735	
50	GTG TTG CCT CCC ATT ATA ACA GCA GAA ATG CAA ACT TTG TAT ACT AGT	2256
	Val Leu Pro Pro Ile Ile Thr Ala Glu Met Gln Thr Leu Tyr Thr Ser	
	740 745 750	
	TCT CTA GTA GCT TCT ATG GCT TTT GGT GGT ATT ACT GCA GCT GGT GCT	2304
	Ser Leu Val Ala Ser Met Ala Phe Gly Gly Ile Thr Ala Ala Gly Ala	
	755 760 765	
55	ATA CCT TTT GCC ACA CAA CTG CAG GCT AGA ATT AAT CAC TTG GGT ATT	2352
	Ile Pro Phe Ala Thr Gln Leu Gln Ala Arg Ile Asn His Leu Gly Ile	
	770 775 780	
60		
65		

ES 2 278 382 T3

	ACC	CAG	TCA	CTT	TTG	TTG	AAG	AAT	CAA	GAA	AAA	ATT	GCT	GCT	TCC	TTT	2400
	Thr	Gln	Ser	Leu	Leu	Leu	Lys	Asn	Gln	Glu	Lys	Ile	Ala	Ala	Ser	Phe	
	785					790					795					800	
5	AAT	AAG	GCC	ATT	GGT	CGT	ATG	CAG	GAA	GGT	TTT	AGA	AGT	ACA	TCT	CTA	2448
	Asn	Lys	Ala	Ile	Gly	Arg	Met	Gln	Glu	Gly	Phe	Arg	Ser	Thr	Ser	Leu	
					805					810					815		
10	GCA	TTA	CAA	CAA	ATT	CAA	GAT	GTT	GTT	AAT	AAG	CAG	AGT	GCT	ATT	CTT	2496
	Ala	Leu	Gln	Gln	Ile	Gln	Asp	Val	Val	Asn	Lys	Gln	Ser	Ala	Ile	Leu	
				820					825					830			
15	ACT	GAG	ACT	ATG	GCA	TCA	CTT	AAT	AAA	AAT	TTT	GGT	GCT	ATT	TCT	TCT	2544
	Thr	Glu	Thr	Met	Ala	Ser	Leu	Asn	Lys	Asn	Phe	Gly	Ala	Ile	Ser	Ser	
			835					840					845				
20	GTG	ATT	CAA	GAA	ATC	TAC	CAG	CAA	CTT	GAC	GCC	ATA	CAA	GCA	AAT	GCT	2592
	Val	Ile	Gln	Glu	Ile	Tyr	Gln	Gln	Leu	Asp	Ala	Ile	Gln	Ala	Asn	Ala	
		850					855					860					
25	CAA	GTG	GAT	CGT	CTT	ATA	ACT	GGT	AGA	TTG	TCA	TCA	CTT	TCT	GTT	TTA	2640
	Gln	Val	Asp	Arg	Leu	Ile	Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Leu	Ser	Val	Leu	
	865					870					875				880		
30	GCA	TCT	GCT	AAG	CAG	GCG	GAG	CAT	ATT	AGA	GTG	TCA	CAA	CAG	CGT	GAG	2688
	Ala	Ser	Ala	Lys	Gln	Ala	Glu	His	Ile	Arg	Val	Ser	Gln	Gln	Arg	Glu	
				885					890						895		
35	TTA	GCT	ACT	CAG	AAA	ATT	AAT	GAG	TGT	GTT	AAG	TCA	CAG	TCT	ATT	AGG	2736
	Leu	Ala	Thr	Gln	Lys	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Lys	Ser	Gln	Ser	Ile	Arg	
				900				905						910			
40	TAC	TCC	TTT	TGT	GGT	AAT	GGA	GGA	CAT	GTT	CTA	ACC	ATA	CCG	CAA	AAT	2784
	Tyr	Ser	Phe	Cys	Gly	Asn	Gly	Arg	His	Val	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Asn	
			915				920						925				
45	GCA	CCT	AAT	GGT	ATA	GTG	TTT	ATA	CAC	TTT	TCT	TAT	ACT	CCA	GAT	AGT	2832
	Ala	Pro	Asn	Gly	Ile	Val	Phe	Ile	His	Phe	Ser	Tyr	Thr	Pro	Asp	Ser	
		930				935						940					
50	TTT	GTT	AAT	GTT	ACT	GCA	ATA	GTG	GGT	TTT	TGT	GTA	AAG	CCA	GCT	AAT	2880
	Phe	Val	Asn	Val	Thr	Ala	Ile	Val	Gly	Phe	Cys	Val	Lys	Pro	Ala	Asn	
		945				950					955				960		
55	GCT	AGT	CAG	TAT	GCA	ATA	GTA	CCC	GCT	AAT	GGT	AGG	GGT	ATT	TTT	ATA	2928
	Ala	Ser	Gln	Tyr	Ala	Ile	Val	Pro	Ala	Asn	Gly	Arg	Gly	Ile	Phe	Ile	
				965					970						975		
60	CAA	GTT	AAT	GGT	AGT	TAC	TAC	ATC	ACA	GCA	GGA	GAT	ATG	TAT	ATG	CCA	2976
	Gln	Val	Asn	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Thr	Ala	Arg	Asp	Met	Tyr	Met	Pro	
				980					985					990			
65	AGA	GCT	ATT	ACT	GCA	GGA	GAT	ATA	GTT	ACG	CTT	ACT	TCT	TGT	CAA	GCA	3024
	Arg	Ala	Ile	Thr	Ala	Gly	Asp	Ile	Val	Thr	Leu	Thr	Ser	Cys	Gln	Ala	
			995					1000					1005				
70	AAT	TAT	GTA	AGT	GTA	AAT	AAG	ACC	GTC	ATT	ACT	ACA	TTC	GTA	GAC	AAT	3072
	Asn	Tyr	Val	Ser	Val	Asn	Lys	Thr	Val	Ile	Thr	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	
			1010				1015					1020					
75	GAT	GAT	TTT	GAT	TTT	AAT	GAC	GAA	TTG	TCA	AAA	TGG	TGG	AAT	GAC	ACT	3120
	Asp	Asp	Phe	Asp	Phe	Asn	Asp	Glu	Leu	Ser	Lys	Trp	Trp	Asn	Asp	Thr	
	1025					1030					1035					1040	
80	AAG	CAT	GAG	CTA	CCA	GAC	TTT	GAC	AAA	TTC	AAT	TAC	ACA	GTA	CCT	ATA	3168
	Lys	His	Glu	Leu	Pro	Asp	Phe	Asp	Lys	Phe	Asn	Tyr	Thr	Val	Pro	Ile	
				1045						1050					1055		

5	CTT GAC ATT GAT AGT GAA ATT GAT CGT ATT CAA GGC GTT ATA CAG GGT Leu Asp Ile Asp Ser Glu Ile Asp Arg Ile Gln Gly Val Ile Gln Gly 1060 1065 1070	3216
10	CTT AAT GAC TCT TTA ATA GAC CTT GAA AAA CTT TCA ATA CTC AAA ACT Leu Asn Asp Ser Leu Ile Asp Leu Glu Lys Leu Ser Ile Leu Lys Thr 1075 1080 1085	3264
15	TAT ATT AAG TGG CCT TGG TAT GTG TGG TTA GCC ATA GCT TTT GCC ACT Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Val Trp Leu Ala Ile Ala Phe Ala Thr 1090 1095 1100	3312
20	ATT ATC TTC ATC TTA ATA CTA GGA TGG GTT TTC TTC ATG ACT GGA TGT Ile Ile Phe Ile Leu Ile Leu Gly Trp Val Phe Phe Met Thr Gly Cys 1105 1110 1115 1120	3360
25	TGT GGT TGT TGT TGT GGA TGC TTT GGC ATT ATG CCT CTA ATG AGT AAG Cys Gly Cys Cys Cys Gly Cys Phe Gly Ile Met Pro Leu Met Ser Lys 1125 1130 1135	3408
30	TGT GGT AAG AAA TCT TCT TAT TAC ACG ACT TTT GAT AAC GAT GTG GTA Cys Gly Lys Lys Ser Ser Tyr Tyr Thr Thr Phe Asp Asn Asp Val Val 1140 1145 1150	3456
35	ACT GAA CAA AAC AGA CCT AAA AAG TCT GTT TAA Thr Glu Gln Asn Arg Pro Lys Lys Ser Val 1155 1160	3489

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1162 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15:

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

ES 2 278 382 T3

	Leu	Thr	Val	Ser	Val	Ala	Lys	Tyr	Pro	Thr	Phe	Lys	Ser	Phe	Gln	Cys	160
	145					150					155						
5	Val	Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Val	Tyr	Leu	Asn	Gly	Asp	Leu	Val	Tyr	Thr	
				165					170						175		
	Ser	Asn	Glu	Thr	Thr	Asp	Val	Thr	Ser	Ala	Gly	Val	Tyr	Phe	Lys	Ala	
				180					185					190			
10	Gly	Gly	Pro	Ile	Thr	Tyr	Lys	Val	Met	Arg	Lys	Val	Lys	Ala	Leu	Ala	
			195					200					205				
	Tyr	Phe	Val	Asn	Gly	Thr	Ala	Gln	Asp	Val	Ile	Leu	Cys	Asp	Gly	Ser	
	210						215					220					
15	Pro	Arg	Gly	Leu	Leu	Ala	Cys	Gln	Tyr	Asn	Thr	Gly	Asn	Phe	Ser	Asp	
	225					230					235					240	
	Gly	Phe	Tyr	Pro	Phe	Ile	Asn	Ser	Ser	Leu	Val	Lys	Gln	Lys	Phe	Ile	
					245					250					255		
20	Val	Tyr	Arg	Glu	Asn	Ser	Val	Asn	Thr	Thr	Phe	Thr	Leu	His	Asn	Phe	
				260					265					270			
	Thr	Phe	His	Asn	Glu	Thr	Gly	Ala	Asn	Pro	Asn	Pro	Ser	Gly	Val	Gln	
			275					280					285				
25	Asn	Ile	Leu	Thr	Tyr	Gln	Thr	Gln	Thr	Ala	Gln	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Asn	
		290					295					300					
	Phe	Asn	Phe	Ser	Phe	Leu	Ser	Ser	Phe	Val	Tyr	Lys	Glu	Ser	Asn	Phe	
	305					310					315					320	
30	Met	Tyr	Gly	Ser	Tyr	His	Pro	Ser	Cys	Asn	Phe	Arg	Leu	Glu	Thr	Ile	
					325				330						335		
	Asn	Asn	Gly	Leu	Trp	Phe	Asn	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Ile	Ala	Tyr	Gly	
				340					345					350			
35	Pro	Leu	Gln	Gly	Gly	Cys	Lys	Gln	Ser	Val	Phe	Ser	Gly	Arg	Ala	Thr	
			355					360					365				
	Cys	Cys	Tyr	Ala	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Gly	Pro	Ser	Leu	Cys	Lys	Gly	Val	
		370					375					380					
40	Tyr	Ser	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Asn	Phe	Glu	Cys	Gly	Leu	Leu	Val	Tyr	
	385					390					395					400	
	Val	Thr	Lys	Ser	Gly	Gly	Ser	Arg	Ile	Gln	Thr	Ala	Thr	Glu	Pro	Pro	
					405					410					415		
45	Val	Ile	Thr	Arg	His	Asn	Tyr	Asn	Asn	Ile	Thr	Leu	Asn	Thr	Cys	Val	
				420					425					430			
	Asp	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Gly	Arg	Thr	Gly	Gln	Gly	Phe	Ile	Thr	Asn	Val	
				435				440					445				
50	Thr	Asp	Ser	Ala	Val	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Ala	Asp	Ala	Gly	Leu	Ala	
		450					455										

ES 2 278 382 T3

Gln Phe Val Val Ser Gly Gly Lys Leu Val Gly Ile Leu Thr Ser Arg
 500 505 510
 Asn Glu Thr Gly Ser Gln Leu Leu Glu Asn Gln Phe Tyr Ile Lys Ile
 515 520 525
 Thr Asn Gly Thr Arg Arg Phe Arg Arg Ser Ile Thr Glu Asn Val Ala
 530 535 540
 Asn Cys Pro Tyr Val Ser Tyr Gly Lys Phe Cys Ile Lys Pro Asp Gly
 545 550 555 560
 Ser Ile Ala Thr Ile Val Pro Lys Gln Leu Glu Gln Phe Val Ala Pro
 565 570 575
 Leu Leu Asn Val Thr Glu Asn Val Leu Ile Pro Asn Ser Phe Asn Leu
 580 585 590
 Thr Val Thr Asp Glu Tyr Ile Gln Thr Arg Met Asp Lys Val Gln Ile
 595 600 605
 Asn Cys Leu Gln Tyr Val Cys Gly Asn Ser Leu Asp Cys Arg Asp Leu
 610 615 620
 Phe Gln Gln Tyr Gly Pro Val Cys Asp Asn Ile Leu Ser Val Val Asn
 625 630 635 640
 Ser Ile Gly Gln Lys Glu Asp Met Glu Leu Leu Asn Phe Tyr Ser Ser
 645 650 655
 Thr Lys Pro Ala Gly Phe Asn Thr Pro Phe Leu Ser Asn Val Ser Thr
 660 665 670
 Gly Glu Phe Asn Ile Ser Leu Leu Leu Thr Thr Pro Ser Ser Pro Arg
 675 680 685
 Arg Arg Ser Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Thr Ser Val Glu Ser Val
 690 695 700
 Gly Leu Pro Thr Asp Asp Ala Tyr Lys Asn Cys Thr Ala Gly Pro Leu
 705 710 715 720
 Gly Phe Leu Lys Asp Leu Ala Cys Ala Arg Glu Tyr Asn Gly Leu Leu
 725 730 735
 Val Leu Pro Pro Ile Ile Thr Ala Glu Met Gln Thr Leu Tyr Thr Ser
 740 745 750
 Ser Leu Val Ala Ser Met Ala Phe Gly Gly Ile Thr Ala Ala Gly Ala
 755 760 765
 Ile Pro Phe Ala Thr Gln Leu Gln Ala Arg Ile Asn His Leu Gly Ile
 770 775 780
 Thr Gln Ser Leu Leu Leu Lys Asn Gln Glu Lys Ile Ala Ala Ser Phe
 785 790 795 800
 Asn Lys Ala Ile Gly Arg Met Gln Glu Gly Phe Arg Ser Thr Ser Leu
 805 810 815
 Ala Leu Gln Gln Ile Gln Asp Val Val Asn Lys Gln Ser Ala Ile Leu
 820 825 830
 Thr Glu Thr Met Ala Ser Leu Asn Lys Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser
 835 840 845

Val Ile Gln Glu Ile Tyr Gln Gln Leu Asp Ala Ile Gln Ala Asn Ala
850 855 860

5 Gln Val Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Ser Ser Leu Ser Val Leu
865 870 875 880

Ala Ser Ala Lys Gln Ala Glu His Ile Arg Val Ser Gln Gln Arg Glu
885 890 895

10 Leu Ala Thr Gln Lys Ile Asn Glu Cys Val Lys Ser Gln Ser Ile Arg
900 905 910

15 Tyr Ser Phe Cys Gly Asn Gly Arg His Val Leu Thr Ile Pro Gln Asn
915 920 925

Ala Pro Asn Gly Ile Val Phe Ile His Phe Ser Tyr Thr Pro Asp Ser
930 935 940

20 Phe Val Asn Val Thr Ala Ile Val Gly Phe Cys Val Lys Pro Ala Asn
945 950 955 960

Ala Ser Gln Tyr Ala Ile Val Pro Ala Asn Gly Arg Gly Ile Phe Ile
965 970 975

25 Gln Val Asn Gly Ser Tyr Tyr Ile Thr Ala Arg Asp Met Tyr Met Pro
980 985 990

30 Arg Ala Ile Thr Ala Gly Asp Ile Val Thr Leu Thr Ser Cys Gln Ala
995 1000 1005

Asn Tyr Val Ser Val Asn Lys Thr Val Ile Thr Thr Phe Val Asp Asn
1010 1015 1020

35 Asp Asp Phe Asp Phe Asn Asp Glu Leu Ser Lys Trp Trp Asn Asp Thr
1025 1030 1035 1040

Lys His Glu Leu Pro Asp Phe Asp Lys Phe Asn Tyr Thr Val Pro Ile
1045 1050 1055

40 Leu Asp Ile Asp Ser Glu Ile Asp Arg Ile Gln Gly Val Ile Gln Gly
1060 1065 1070

Leu Asn Asp Ser Leu Ile Asp Leu Glu Lys Leu Ser Ile Leu Lys Thr
1075 1080 1085

45 Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Val Trp Leu Ala Ile Ala Phe Ala Thr
1090 1095 1100

50 Ile Ile Phe Ile Leu Ile Leu Gly Trp Val Phe Phe Met Thr Gly Cys
1105 1110 1115 1120

Cys Gly Cys Cys Cys Gly Cys Phe Gly Ile Met Pro Leu Met Ser Lys
1125 1130 1135

55 Cys Gly Lys Lys Ser Ser Tyr Tyr Thr Thr Phe Asp Asn Asp Val Val
1140 1145 1150

60 Thr Glu Gln Asn Arg Pro Lys Lys Ser Val
1155 1160

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1846 pares de bases

ES 2 278 382 T3

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(ix) ASPECTO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..1846

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16:

ATG TTG GTG AAG TCA CTG TTT CTA GTG ACC ATT TTG TTT GCA CTA TGT	48
Met Leu Val Lys Ser Leu Phe Leu Val Thr Ile Leu Phe Ala Leu Cys	
1 5 10 15	
AGT GCT AAT TTA TAT GAC AAC GAA TCT TTT GTG TAT TAC TAC CAG AGT	96
Ser Ala Asn Leu Tyr Asp Asn Glu Ser Phe Val Tyr Tyr Tyr Gln Ser	
20 25 30	
GCT TTT AGG CCA GGA CAT GGT TGG CAT TTA CAT GGA GGT GCT TAT GCA	144
Ala Phe Arg Pro Gly His Gly Trp His Leu His Gly Gly Ala Tyr Ala	
35 40 45	
GTA GTT AAT GTG TCT AGT GAA AAT AAT AAT GCA GGT ACT GCC CCA AGT	192
Val Val Asn Val Ser Ser Glu Asn Asn Asn Ala Gly Thr Ala Pro Ser	
50 55 60	
TGC ACT GCT GGT GCT ATT GGC TAC AGT AAG AAT TTC AGT GCG GCC TCA	240
Cys Thr Ala Gly Ala Ile Gly Tyr Ser Lys Asn Phe Ser Ala Ala Ser	
65 70 75 80	
GTA GCC ATG ACT GCA CCA CTA AGT GGT ATG TCA TGG TCT GCC TCA TCT	288
Val Ala Met Thr Ala Pro Leu Ser Gly Met Ser Trp Ser Ala Ser Ser	
85 90 95	
TTT TGT ACA GCT CAC TGT AAT TTT ACT TCT TAT ATA GTG TTT GTT ACA	336
Phe Cys Thr Ala His Cys Asn Phe Thr Ser Tyr Ile Val Phe Val Thr	
100 105 110	
CAT TGT TTT AAG AGC GGA TCT AAT AGT TGT CCT TTG ACA GGT CTT ATT	384
His Cys Phe Lys Ser Gly Ser Asn Ser Cys Pro Leu Thr Gly Leu Ile	
115 120 125	
CCA AGC GGT TAT ATT CGT ATT GCT GCT ATG AAA CAT GGA AGT CGT ACG	432
Pro Ser Gly Tyr Ile Arg Ile Ala Ala Met Lys His Gly Ser Arg Thr	
130 135 140	
CCT GGT CAC TTA TTT TAT AAC TTA ACA GTT TCT GTG ACT AAA TAT CCT	480
Pro Gly His Leu Phe Tyr Asn Leu Thr Val Ser Val Thr Lys Tyr Pro	
145 150 155 160	
AAG TTT AGA TCG CTA CAA TGT GTT AAT AAT CAT ACT TCT GTA TAT TTA	528
Lys Phe Arg Ser Leu Gln Cys Val Asn Asn His Thr Ser Val Tyr Leu	
165 170 175	
AAT GGT GAC CTT GTT TTC ACA TCT AAC TAT ACT GAA GAT GTT GTA GCT	576
Asn Gly Asp Leu Val Phe Thr Ser Asn Tyr Thr Glu Asp Val Val Ala	
180 185 190	
GCA GGT GTC CAT TTT AAA AGT GGT GGA CCT ATA ACT TAT AAA GTT ATG	624
Ala Gly Val His Phe Lys Ser Gly Gly Pro Ile Thr Tyr Lys Val Met	
195 200 205	

ES 2 278 382 T3

	AGA	GAG	GTT	AAA	GCC	TTG	GCT	TAT	TTT	GTC	AAT	GGT	ACT	GCA	CAT	GAT	672
	Arg	Glu	Val	Lys	Ala	Leu	Ala	Tyr	Phe	Val	Asn	Gly	Thr	Ala	His	Asp	
	210						215					220					
5	GTC	ATT	CTA	TGT	GAT	GAC	ACA	CCT	AGA	GGT	TTG	TTA	GCA	TGC	CAA	TAT	720
	Val	Ile	Leu	Cys	Asp	Asp	Thr	Pro	Arg	Gly	Leu	Leu	Ala	Cys	Gln	Tyr	
	225					230					235					240	
	AAT	ACT	GGC	AAT	TTT	TCA	GAT	GGC	TTC	TAT	CCT	TTT	ACT	AAT	ACT	AGT	768
10	Asn	Thr	Gly	Asn	Phe	Ser	Asp	Gly	Phe	Tyr	Pro	Phe	Thr	Asn	Thr	Ser	
					245					250					255		
	ATT	GTT	AAG	GAT	AAG	TTT	ATT	GTT	TAT	CGT	GAA	AGT	AGT	GTC	AAT	ACT	816
	Ile	Val	Lys	Asp	Lys	Phe	Ile	Val	Tyr	Arg	Glu	Ser	Ser	Val	Asn	Thr	
				260					265					270			
15	ACT	TTG	ACA	TTA	ACT	AAT	TTC	ACG	TTT	AGT	AAT	GAA	AGT	GGT	GCC	CCT	864
	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Asn	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Glu	Ser	Gly	Ala	Pro	
			275					280					285				
	CCT	AAT	ACA	GGT	GGT	GTT	GAC	AGT	TTT	ATT	TTA	TAC	CAG	ACA	CAA	ACA	912
20	Pro	Asn	Thr	Gly	Gly	Val	Asp	Ser	Phe	Ile	Leu	Tyr	Gln	Thr	Gln	Thr	
			290				295					300					
	GCT	CAG	AGT	GGT	TAT	TAT	AAT	TTT	AAT	TTT	TCA	TTT	CTG	AGT	AGT	TTT	960
	Ala	Gln	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Phe	Asn	Phe	Ser	Phe	Leu	Ser	Ser	Phe	
	305				310					315						320	
25	GTT	TAT	AGG	GAA	AGT	AAT	TAT	ATG	TAT	GGA	TCT	TAC	CAT	CCG	GCT	TGT	1008
	Val	Tyr	Arg	Glu	Ser	Asn	Tyr	Met	Tyr	Gly	Ser	Tyr	His	Pro	Ala	Cys	
					325					330					335		
	AGT	TTT	AGA	CCT	GAA	ACC	CTT	AAT	GGT	TTG	TGG	TCT	AAT	TCC	CTT	TCT	1056
30	Ser	Phe	Arg	Pro	Glu	Thr	Leu	Asn	Gly	Leu	Trp	Ser	Asn	Ser	Leu	Ser	
				340					345					350			
	GTT	TCA	TTA	ATA	TAC	GGT	CCC	ATT	CAA	GGT	GGT	TGT	AAG	CAA	TCT	GTA	1104
	Val	Ser	Leu	Ile	Tyr	Gly	Pro	Ile	Gln	Gly	Gly	Cys	Lys	Gln	Ser	Val	
			355				360						365				
35	TTT	AAT	GGT	AAA	GCA	ACT	TGT	TGT	TAT	GCT	TAT	TCA	TAC	GGA	GGA	CCT	1152
	Phe	Asn	Gly	Lys	Ala	Thr	Cys	Cys	Tyr	Ala	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Gly	Pro	
		370					375					380					
	CGT	GCT	TGT	AAA	GGT	GTC	TAT	AGA	GGT	GAG	CTA	ACA	CAG	CAT	TTT	GAA	1200
40	Arg	Ala	Cys	Lys	Gly	Val	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Thr	Gln	His	Phe	Glu	
		385				390					395					400	
	TGT	GGT	TTG	TTA	GTT	TAT	GTT	ACT	AAG	AGC	GAT	GGC	TCC	CGT	ATA	CAA	1248
	Cys	Gly	Leu	Leu	Val	Tyr	Val	Thr	Lys	Ser	Asp	Gly	Ser	Arg	Ile	Gln	
				405					410						415		
45	ACT	GCA	ACA	CAA	CCA	CCT	GTA	TTA	ACC	CAA	AAT	TTT	TAT	AAT	AAC	ATC	1296
	Thr	Ala	Thr	Gln	Pro	Pro	Val	Leu	Thr	Gln	Asn	Phe	Tyr	Asn	Asn	Ile	
				420					425					430			
	ACT	TTA	GGT	AAG	TGT	GTT	GAT	TAT	AAT	GTT	TAT	GGT	AGA	ACT	GGA	CAA	1344
50	Thr	Leu	Gly	Lys	Cys	Val	Asp	Tyr	Asn	Val	Tyr	Gly	Arg	Thr	Gly	Gln	
			435				440					445					
	GGT	TTT	ATT	ACT	AAT	GTA	ACT	GAT	TTA	GCT	ACT	TCC	CAT	AAT	TAC	TTA	1392
	Gly	Phe	Ile	Thr	Asn	Val	Thr	Asp	Leu	Ala	Thr	Ser	His	Asn	Tyr	Leu	
		450					455					460					
55	GCG	GAG	GGA	GGA	TTA	GCT	ATT	TTA	GAT	ACA	TCT	GGT	GCC	ATA	GAC	ATC	1440
	Ala	Glu	Gly	Gly	Leu	Ala	Ile	Leu	Asp	Thr	Ser	Gly	Ala	Ile	Asp	Ile	
		465				470					475					480	
60																	
65																	

ES 2 278 382 T3

	TTC	GTT	GTA	CAA	GGT	GAA	TAT	GGC	CCT	AAC	TAC	TAT	AAG	GTT	AAT	CTA	1488
	Phe	Val	Val	Gln	Gly	Glu	Tyr	Gly	Pro	Asn	Tyr	Tyr	Lys	Val	Asn	Leu	
				485					490						495		
5	TGT	GAA	GAT	GTT	AAC	CAA	CAG	TTT	GTA	GTT	TCT	GGT	GGT	AAA	TTA	GTA	1536
	Cys	Glu	Asp	Val	Asn	Gln	Gln	Phe	Val	Val	Ser	Gly	Gly	Lys	Leu	Val	
				500					505					510			
10	GGT	ATT	CTC	ACT	TCA	CGT	AAT	GAA	ACT	GGT	TCT	CAG	CCT	CTT	GAA	AAC	1584
	Gly	Ile	Leu	Thr	Ser	Arg	Asn	Glu	Thr	Gly	Ser	Gln	Pro	Leu	Glu	Asn	
			515					520					525				
	CAG	TTT	TAC	ATT	AAG	ATC	ACT	AAT	GGA	ACA	CAT	CGT	TCT	AGA	CGT	TCT	1632
	Gln	Phe	Tyr	Ile	Lys	Ile	Thr	Asn	Gly	Thr	His	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	
			530				535					540					
15	GTT	AAT	GAA	AAT	GTT	ACG	AAT	TGC	CCT	TAT	GTT	AGT	TAT	GGC	AAG	TTT	1680
	Val	Asn	Glu	Asn	Val	Thr	Asn	Cys	Pro	Tyr	Val	Ser	Tyr	Gly	Lys	Phe	
					550						555					560	
20	TGT	ATA	AAA	CCT	GAT	GGT	TCA	GTT	TCT	CCT	ATA	GTA	CCA	AAA	GAA	CTT	1728
	Cys	Ile	Lys	Pro	Asp	Gly	Ser	Val	Ser	Pro	Ile	Val	Pro	Lys	Glu	Leu	
				565						570					575		
	GAA	CAG	TTT	GTG	GCA	CCT	TTA	CTT	AAT	GTT	ACT	GAA	AAT	GTG	CTC	ATA	1776
	Glu	Gln	Phe	Val	Ala	Pro	Leu	Leu	Asn	Val	Thr	Glu	Asn	Val	Leu	Ile	
				580					585					590			
25	CCT	AAC	AGT	TTT	AAC	TTA	ACT	GTT	ACA	GAT	GAG	TAC	ATA	CAA	ACG	CGT	1824
	Pro	Asn	Ser	Phe	Asn	Leu	Thr	Val	Thr	Asp	Glu	Tyr	Ile	Gln	Thr	Arg	
			595				600						605				
30	ATG	GAT	AAG	GTC	CAA	ATT	AGG	A									1846
	Met	Asp	Lys	Val	Gln	Ile	Arg										
		610					615										

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 17:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 615 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- 40 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17:

45	Met	Leu	Val	Lys	Ser	Leu	Phe	Leu	Val	Thr	Ile	Leu	Phe	Ala	Leu	Cys
	1			5						10					15	
	Ser	Ala	Asn	Leu	Tyr	Asp	Asn	Glu	Ser	Phe	Val	Tyr	Tyr	Tyr	Gln	Ser
			20					25						30		
50	Ala	Phe	Arg	Pro	Gly	His	Gly	Trp	His	Leu	His	Gly	Gly	Ala	Tyr	Ala
			35				40						45			
	Val	Val	Asn	Val	Ser	Ser	Glu	Asn	Asn	Asn	Ala	Gly	Thr	Ala	Pro	Ser
		50					55					60				
55	Cys	Thr	Ala	Gly	Ala	Ile	Gly	Tyr	Ser	Lys	Asn	Phe	Ser	Ala	Ala	Ser
		65				70					75				80	
	Val	Ala	Met	Thr	Ala	Pro	Leu	Ser	Gly	Met	Ser	Trp	Ser	Ala	Ser	Ser
60					85					90					95	

65

ES 2 278 382 T3

Phe Cys Thr Ala His Cys Asn Phe Thr Ser Tyr Ile Val Phe Val Thr
 100 105 110
 5 His Cys Phe Lys Ser Gly Ser Asn Ser Cys Pro Leu Thr Gly Leu Ile
 115 120 125
 Pro Ser Gly Tyr Ile Arg Ile Ala Ala Met Lys His Gly Ser Arg Thr
 130 135 140
 10 Pro Gly His Leu Phe Tyr Asn Leu Thr Val Ser Val Thr Lys Tyr Pro
 145 150 155 160
 Lys Phe Arg Ser Leu Gln Cys Val Asn Asn His Thr Ser Val Tyr Leu
 165 170 175
 15 Asn Gly Asp Leu Val Phe Thr Ser Asn Tyr Thr Glu Asp Val Val Ala
 180 185 190
 Ala Gly Val His Phe Lys Ser Gly Gly Pro Ile Thr Tyr Lys Val Met
 195 200 205
 20 Arg Glu Val Lys Ala Leu Ala Tyr Phe Val Asn Gly Thr Ala His Asp
 210 215 220
 Val Ile Leu Cys Asp Asp Thr Pro Arg Gly Leu Leu Ala Cys Gln Tyr
 225 230 235 240
 25 Asn Thr Gly Asn Phe Ser Asp Gly Phe Tyr Pro Phe Thr Asn Thr Ser
 245 250 255
 Ile Val Lys Asp Lys Phe Ile Val Tyr Arg Glu Ser Ser Val Asn Thr
 260 265 270
 30 Thr Leu Thr Leu Thr Asn Phe Thr Phe Ser Asn Glu Ser Gly Ala Pro
 275 280 285
 Pro Asn Thr Gly Gly Val Asp Ser Phe Ile Leu Tyr Gln Thr Gln Thr
 290 295 300
 35 Ala Gln Ser Gly Tyr Tyr Asn Phe Asn Phe Ser Phe Leu Ser Ser Phe
 305 310 315 320
 Val Tyr Arg Glu Ser Asn Tyr Met Tyr Gly Ser Tyr His Pro Ala Cys
 325 330 335
 40 Ser Phe Arg Pro Glu Thr Leu Asn Gly Leu Trp Ser Asn Ser Leu Ser
 340 345 350
 Val Ser Leu Ile Tyr Gly Pro Ile Gln Gly Gly Cys Lys Gln Ser Val
 355 360 365
 45 Phe Asn Gly Lys Ala Thr Cys Cys Tyr Ala Tyr Ser Tyr Gly Gly Pro
 370 375 380
 Arg Ala Cys Lys Gly Val Tyr Arg Gly Glu Leu Thr Gln His Phe Glu
 385 390 395 400
 50 Cys Gly Leu Leu Val Tyr Val Thr Lys Ser Asp Gly Ser Arg Ile Gln
 405 410 415
 Thr Ala Thr Gln Pro Pro Val Leu Thr Gln Asn Phe Tyr Asn Asn Ile
 420 425 430
 55 Thr Leu Gly Lys Cys Val Asp Tyr Asn Val Tyr Gly Arg Thr Gly Gln
 435 440 445

ES 2 278 382 T3

Gly Phe Ile Thr Asn Val Thr Asp Leu Ala Thr Ser His Asn Tyr Leu
 450 455 460
 5 Ala Glu Gly Gly Leu Ala Ile Leu Asp Thr Ser Gly Ala Ile Asp Ile
 465 470 475 480
 Phe Val Val Gln Gly Glu Tyr Gly Pro Asn Tyr Tyr Lys Val Asn Leu
 485 490 495
 10 Cys Glu Asp Val Asn Gln Gln Phe Val Val Ser Gly Gly Lys Leu Val
 500 505 510
 Gly Ile Leu Thr Ser Arg Asn Glu Thr Gly Ser Gln Pro Leu Glu Asn
 515 520 525
 15 Gln Phe Tyr Ile Lys Ile Thr Asn Gly Thr His Arg Ser Arg Arg Ser
 530 535 540
 Val Asn Glu Asn Val Thr Asn Cys Pro Tyr Val Ser Tyr Gly Lys Phe
 545 550 555 560
 20 Cys Ile Lys Pro Asp Gly Ser Val Ser Pro Ile Val Pro Lys Glu Leu
 565 570 575
 Glu Gln Phe Val Ala Pro Leu Leu Asn Val Thr Glu Asn Val Leu Ile
 580 585 590
 25 Pro Asn Ser Phe Asn Leu Thr Val Thr Asp Glu Tyr Ile Gln Thr Arg
 595 600 605
 Met Asp Lys Val Gln Ile Arg
 610 615
 30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 18:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 2116 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 40 (C) TIPO DE CADENA: doble
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
 45 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18:

50 TATAATTATC TAGCAGACGC AGGTATGGCT ATTTTAGATA CATCTGGTTC CATAGACATC 60
 TTTGTTGCAC AAGGTGAATA TGGCCTTACT TATTATAAGG CTAACCCTTG CGAAGACGTC 120
 AACCAGCAGT TTGTAGTTTC TGGTGGTAAA TTAGTAGGTA TTCTTACTTC ACGTAATGAG 180
 55 ACTGGTTCTC AGCTTCTTGA GAACCAGTTT TACATTAAAA TCACTAATGG AACACGTCGT 240
 TCTAGACGTT CTATTACTGC AAATGTHACA AATYGCCCTT ATGTTAGCTA TGGCAAGTTT 300
 TGTCTAAAAC CTGATGGYTC AGYTTCTGYT ATAGCACCAC NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN 360
 60 NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN 420
 NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN 480
 GTTGTGGCA ATTCTCTGGA TTGTAGAAAG TTGYTTCAAC AATATGGGCC TGTGTGBGAC 540
 65

ES 2 278 382 T3

	AACATATTGT CTGTGGTAAA TAGTGTGGT CAAAAAGAAG ATATGGAACT TCURAAATCTC	600
	TATTCTTCTA CTAAACCATC TGGCTTTAAT ACACCAGTTT TTAGTAATCT YAGCACTGGC	660
5	GATTTYAATA TTTCTCTTFT GGTTGACACC TCCAGTAGTA CTACTGGGCG CTCTTTTATT	720
	GAAGATCTTT TATTTACAAG TGTTGAATCT GTTGGAATTAC CAACAGATGA AGCTTATAAA	780
	AAGTGCACTG CAGGACCTTT AGGCTTCCTT AAGGACCTBG CGTGTGCTCG TGAATATAAT	840
10	GGCTTGCTTG YNNNNNNCCC TATTATAACA GCAGAAATGC AAACCTTGTA TACTAGTTCT	900
	TTAGTAGCTT CTATGGCTTT TGGTGGGATT ACTGCAGCTG GTGCTATACC TTTTGCCACA	960
	CAACTGCAGG CTAGAATTAA TCACCTGGGT ATTACCCAGT CACTTTTGCA GAAAAATCAA	1020
15	GAAAAAATTG CTGCCTCCTT TAATAAGGCC ATTGGCCATA TGCAGGAAGG TTTTAGAAGT	1080
	ACATCTCTAG CATTACAACA AGTYCAMGAT GTTGTTAATA AGCAGAGTGC TATTCTTACT	1140
	GAGACTATGG CATCACTTAA TAAAAATTTK GGTGCTATTT CTTCTGTGAT TCAAGATATC	1200
20	TACCAGCAAC TTGACGCCAT ACAAGCAAT GCTCAAGTGG ATCGTCTTAT AACTGGTAGA	1260
	TTGTCATCAC TTTCTGTTTT AGCATCTGCT AAGCAGGCGG AGTATATTAG AGTGTACAA	1320
	CAGCGTGAGT TAGCTACTCA GAAAATTAAT GAGTGTGTTA AATCACAGTC TATTAGGTAC	1380
25	TCCTTTTGTG GTAATGGACG ACACGTTCTA ACTATACCGC AAAATGCACC TAATGGTATA	1440
	GTGTTTATAC ACTTTACTTA TACTCCAGAG AGTTTGTGTA ATGTTACTGC AATAGTGGGT	1500
	TTTTGTAAAG CCGCTAATGC TAGTCAGTAT GCAATAGTGC CTGCTAATGG CAGAGGTATT	1560
30	TCTATACAAG TTAATGGTAG TCACTACATC ACTGCACGAG ATATGTATAT GCCAAGAGAT	1620
	ATTACTGCAG GAGATATAGT TACGCTTACT TCTTGTCAAG CAAATTATGT AAGTGTAMMT	1680
	AAGACCGTCA TTACYACATT HGTAAGACAAT GATGATTTTG ATTTTGATGA CGAATTGTCA	1740
35	AAATGGTGGA ATGATACTAA GCATGAGCTA CCAGACTTTG ACGAATTCAA TTACACAGTA	1800
	CCTATACTTG ACATTGGTAG TGAAATTGAT CGTATTCAAG GCGTTATACA GGGCCTTAAT	1860
	GACTCTCTAA TAGACCTTGA AACACTATCA ATACTCAAAA CTTATATTAA GTGGCCTTGG	1920
40	TATGTGTGGT TAGCCATAGC TTTTGSCACT ATTATCTTCA TCCTAATATT AGGGTGGGTG	1980
	TTTTTCATGA CTGTTTGTG TGGTTGTTGT TGTGGATGCT TTGGCATTAT TCCTCTAATG	2040
	AGCAAGTGTG GTAAGAAATC TTCTTATTAC ACGACTTTGG ATAATGATGT GGTAAGTGAA	2100
45	CAAWACAGAC CYAAAA	2116

- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 19:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 705 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19:

ES 2 278 382 T3

	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Ala	Asp	Ala	Gly	Met	Ala	Ile	Leu	Asp	Thr	Ser	Gly	
	1				5					10					15		
5	Ser	Ile	Asp	Ile	Phe	Val	Ala	Gln	Gly	Glu	Tyr	Gly	Leu	Thr	Tyr	Tyr	
			20						25					30			
	Lys	Ala	Asn	Pro	Cys	Glu	Asp	Val	Asn	Gln	Gln	Phe	Val	Val	Ser	Gly	
			35					40					45				
10	Gly	Lys	Leu	Val	Gly	Ile	Leu	Thr	Ser	Arg	Asn	Glu	Thr	Gly	Ser	Gln	
		50					55					60					
	Leu	Leu	Glu	Asn	Gln	Phe	Tyr	Ile	Lys	Ile	Thr	Asn	Gly	Thr	Arg	Arg	
15	65				70						75					80	
	Ser	Arg	Arg	Ser	Ile	Thr	Ala	Asn	Val	Thr	Asn	Xaa	Pro	Tyr	Val	Ser	
					85					90					95		
20	Tyr	Gly	Lys	Phe	Cys	Leu	Lys	Pro	Asp	Gly	Ser	Xaa	Ser	Xaa	Ile	Ala	
				100					105						110		
	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
				115				120					125				
25	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
				130				135					140				
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
30	145				150						155					160	
	Val	Cys	Gly	Asn	Ser	Leu	Asp	Cys	Arg	Lys	Leu	Xaa	Gln	Gln	Tyr	Gly	
					165					170					175		
35	Pro	Val	Xaa	Asp	Asn	Ile	Leu	Ser	Val	Val	Asn	Ser	Val	Gly	Gln	Lys	
				180					185					190			
	Glu	Asp	Met	Glu	Leu	Leu	Asn	Leu	Tyr	Ser	Ser	Thr	Lys	Pro	Ser	Gly	
			195					200					205				
40	Phe	Asn	Thr	Pro	Val	Phe	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Gly	Asp	Phe	Asn	Ile	
		210					215					220					
	Ser	Leu	Leu	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Gly	Arg	Ser	Phe	Ile	
	225				230						235					240	
45	Glu	Asp	Leu	Leu	Phe	Thr	Ser	Val	Glu	Ser	Val	Gly	Leu	Pro	Thr	Asp	
					245					250					255		
	Glu	Ala	Tyr	Lys	Lys	Cys	Thr	Ala	Gly	Pro	Leu	Gly	Phe	Leu	Lys	Asp	
50				260					265					270			
	Leu	Ala	Cys	Ala	Arg	Glu	Tyr	Asn	Gly	Leu	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Ile	
			275					280					285				
55	Ile	Thr	Ala	Glu	Met	Gln	Thr	Leu	Tyr	Thr	Ser	Ser	Leu	Val	Ala	Ser	
		290					295					300					
	Met	Ala	Phe	Gly	Gly	Ile	Thr	Ala	Ala	Gly	Ala	Ile	Pro	Phe	Ala	Thr	
	305					310					315					320	
60	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Asn	His	Leu	Gly	Ile	Thr	Gln	Ser	Leu	Leu	
						325					330					335	
	Gln	Lys	Asn	Gln	Glu	Lys	Ile	Ala	Ala	Ser	Phe	Asn	Lys	Ala	Ile	Gly	
65				340					345					350			

ES 2 278 382 T3

His Met Gln Glu Gly Phe Arg Ser Thr Ser Leu Ala Leu Gln Gln Val
 355 360 365
 Xaa Asp Val Val Asn Lys Gln Ser Ala Ile Leu Thr Glu Thr Met Ala
 370 375 380
 Ser Leu Asn Lys Asn Xaa Gly Ala Ile Ser Ser Val Ile Gln Asp Ile
 385 390 395 400
 Tyr Gln Gln Leu Asp Ala Ile Gln Ala Asn Ala Gln Val Asp Arg Leu
 405 410 415
 Ile Thr Gly Arg Leu Ser Ser Leu Ser Val Leu Ala Ser Ala Lys Gln
 420 425 430
 Ala Glu Tyr Ile Arg Val Ser Gln Gln Arg Glu Leu Ala Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ile Asn Glu Cys Val Lys Ser Gln Ser Ile Arg Tyr Ser Phe Cys Gly
 450 455 460
 Asn Gly Arg His Val Leu Thr Ile Pro Gln Asn Ala Pro Asn Gly Ile
 465 470 475 480
 Val Phe Ile His Phe Thr Tyr Thr Pro Glu Ser Phe Xaa Asn Val Thr
 485 490 495
 Ala Ile Val Gly Phe Cys Lys Ala Ala Asn Ala Ser Gln Tyr Ala Ile
 500 505 510
 Val Pro Ala Asn Gly Arg Gly Ile Ser Ile Gln Val Asn Gly Ser His
 515 520 525
 Tyr Ile Thr Ala Arg Asp Met Tyr Met Pro Arg Asp Ile Thr Ala Gly
 530 535 540
 Asp Ile Val Thr Leu Thr Ser Cys Gln Ala Asn Tyr Val Ser Val Xaa
 545 550 555 560
 Lys Thr Val Ile Thr Thr Xaa Val Asp Asn Asp Asp Phe Asp Phe Asp
 565 570 575
 Asp Glu Leu Ser Lys Trp Trp Asn Asp Thr Lys His Glu Leu Pro Asp
 580 585 590
 Phe Asp Glu Phe Asn Tyr Thr Val Pro Ile Leu Asp Ile Gly Ser Glu
 595 600 605
 Ile Asp Arg Ile Gln Gly Val Ile Gln Gly Leu Asn Asp Ser Leu Ile
 610 615 620
 Asp Leu Glu Thr Leu Ser Ile Leu Lys Thr Tyr Ile Lys Trp Pro Trp
 625 630 635 640
 Tyr Val Trp Leu Ala Ile Ala Phe Xaa Thr Ile Ile Phe Ile Leu Ile
 645 650 655
 Leu Gly Trp Val Phe Phe Met Thr Gly Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly
 660 665 670
 Cys Phe Gly Ile Ile Pro Leu Met Ser Lys Cys Gly Lys Lys Ser Ser
 675 680 685
 Tyr Tyr Thr Thr Leu Asp Asn Asp Val Val Thr Glu Gln Xaa Arg Pro
 690 695 700
 Lys
 705

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 278 382 T3

- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: doble
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20:
- GAATTCGAGC TCGCCCGGGG ATCCTCTAGA GTCGAC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 21:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 57 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: doble
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
 (iii) HIPOTÉTICA: NO
 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
 (ix) ASPECTO:
 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 (B) LOCALIZACIÓN: 13..57
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| 40 | CACAGCTCAA | CA | ATG | AAG | TGG | GCA | ACG | TGG | ATC | GAT | CCC | GTC | GTT | TTA | 48 |
| | | | Met | Lys | Trp | Ala | Thr | Trp | Ile | Asp | Pro | Val | Val | Leu | |
| | | | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | |
| | CAA | CGT | CGT | | | | | | | | | | | | 57 |
| | Gln | Arg | Arg | | | | | | | | | | | | |
| | | | 15 | | | | | | | | | | | | |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 22:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 15 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 22:
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 60 | Met | Lys | Trp | Ala | Thr | Trp | Ile | Asp | Pro | Val | Val | Leu | Gln | Arg | Arg |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | 15 | |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 23:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 57 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 278 382 T3

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 23:

ACTCGGGCAG CGTTGGGTCC TGGGACTCTA GAGGATCGAT CCCCTATGGC GATCATC

57

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 99 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 24:

GCGCCACGT GGCCTGGTAC AATTCGAGCT CGCCCGGGGA TCCTCTAGAG TCGACTCTAG
AGGATCGATC CTCTAGAGTC GGCGGGACGA GCCCGCGAT

60

99

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 57 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 25:

TCCACAGGAC CTGCAGCGAC CCGCTTAACA GCGTCAACAG CGTGCCGCAG ATCGGGG

57

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

ES 2 278 382 T3

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 26:

5 GTTGATCCCG GGAGATGGGG GAGGCTAACT GAAAC 35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 27:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 103 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

20 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 27:

25 GCTCATGGTG GCCCCCGGGC GGTTCAACGA GGGCCAGTAC CGGCGCCTGG TGTCCGTCGA 60
CCTGCAGGTC GACTCTAGAG GATCCCCGGG CGAGCTCGAA TTC 103

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 28:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 66 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35 (C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

40 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 28:

45 GAATTCGAGC TCGCCCGGGG ATCCTCTAGA GTCGACGTCT GGGGCGCGGG GGTGGTGCTC 60
TTCGAG 66

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 29:

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 66 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

55 (C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

60 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

65 (ix) ASPECTO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 16..66

ES 2 278 382 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 29:

CTCCACAGCT CAACA ATG AAG TGG GCA ACG TGG ATC GAT CCC GTC GTT TTA 51
Met Lys Trp Ala Thr Trp Ile Asp Pro Val Val Leu
1 5 10

CNA CGT CGT GAC TGG
Gln Arg Arg Asp Trp
15

(2) INFORMACIÓN PARA SEO ID NO: 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 30:

Met Lys Trp Ala Thr Trp Ile Asp Pro Val Val Leu Gln Arg Arg Asp
1 5 10 15

Trp

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 132 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(ix) ASPECTO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..93

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 31:

GAC GAC TCC TGG AGC CCG TCA GTA TCG GCG GAA ATC CAG CTG AGC GCC 48
Asp Asp Ser Trp Ser Pro Ser Val Ser Ala Glu Ile Gln Leu Ser Ala
1 5 10 15

GGT CGC TAC CAT TAC CAG TTG GTC TGG TGT CAA AAA GAT CTA GAA 93
Gly Arg Tyr His Tyr Gln Leu Val Trp Cys Gln Lys Asp Leu Glu
20 25 30

TAAGCTAGAG GATCGATCCC CTATGGCGAT CATCAGGGC 132

(2) INFORMACIÓN PARA SEO ID NO: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 278 382 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 32:

5 Asp Asp Ser Trp Ser Pro Ser Val Ser Ala Glu Ile Gln Leu Ser Ala
 1 5 10 15
 Gly Arg Tyr His Tyr Gln Leu Val Trp Cys Gln Lys Asp Leu Glu
 20 25 30

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 66 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: doble
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 33:

AACGAGGGCC AGTACCGGCG CCTGGTGTCC GTCGACTCTA GAGGATCCCC GGGCGAGCTC 60
GAATTC 66

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 65 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: doble
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 34:

CAGGTCGAAG CTTGGGCGCT GCCTATGTAG TGAAATCTAT ACTGGGATTT ATCATAACTA 60
GTTTA 65

50 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 65 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: doble
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 35:

ES 2 278 382 T3

AATAATCTAT CACTTTGTCA TGGAGATGCC CAAGCTTCGA CGACTCCCTT GGCCATGATG 60
AATGG 65

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 65 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 36:

TATACCAGCT ACGGCGCTAG CATTATGGT ATCCCGTGAT TGCTCGATGC TTTCCTTCTG 60
AATTC 65

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 65 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 37:

AAGCTTGGCC TCGTCGTTAA TTAACCCAAT TCGAGCTCGC CCAGCTTGGG CTGCAGGTCG 60
GGAAC 65

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 38:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 65 pares de bases

50 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 38:

TGTTTCAGTT AGCCTCCCCC ATCTCCCGAC TCTAGAGGAT CTCGACATAG CGAATACATT 60
TATGG 65

65 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 278 382 T3

(A) LONGITUD: 130 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 39:

```
AACGTATATA TTTTTCACGA CGTAGACCAC TATTGCCATG GACTCTAGAG GATCGGGTAC 60
CGAGCTCGAA TTGGGAAGCT TGTCGACTTA ATTAAGCGGC CGCGTTTAA CGGCCCTCGA 120
GGCCAAGCTT 130
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 60 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 40:

```
GTCGACGTCT GGGGCGCGGG GGTGGTGCTC TTCGAGACGC TGCCTACCCC AAGACGATCG 60
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 41:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 60 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 41:

```
AGCTCAACAA TGAAGTGGGC AACGTGGATC GATCCCGTCG TTTTACAACG TCGTGACTGG 60
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 120 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 278 382 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 42:

GAGCCCGTCA GTATCGGCGG AAATCCAGCT GAGCGCCGGT CGCTACCATT ACCAGTTGGT 60
GTTGGTCTGG TGTCAAAAAG ATCCGGACCG CGCCGTTAGC CAAGTTGCGT TAGAGAATGA 120

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 43:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 60 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 43:

ACACAGTCAC ACTCATGGGG GCCGAAGGCA GAATTCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 44:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 60 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 44:

AAACCTGTCTG TGCCAGCGAG CTCGGGATCC TCTAGAGGAT CCCCAGGGCCC CGCCCCCTGC 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 45:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 60 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 45:

ES 2 278 382 T3

TCGTCCACAC GGAGCGCGGC TGCCGACACG GATCCCGGTT GGCGCCCTCC AGGTGCAGGA 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 46:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 60 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 10 (C) TIPO DE CADENA: doble
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- 15 (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 46:

20 AACCCCCCCC CCCCCCCCCC CCCCCCCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 47:

- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 60 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 30 (C) TIPO DE CADENA: doble
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- 35 (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 47:

40 TGTCATGCCA TCCGTAAGAT GCTTTTCTGT GACTGGTGAG TCGGATCCTC TAGAGTCGAC 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 48:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 2681 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 50 (C) TIPO DE CADENA: doble
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- 55 (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (ix) ASPECTO:
- 60 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 146..481
- (ix) ASPECTO:
- 65 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: complemento (602..1402)

ES 2 278 382 T3

(ix) ASPECTO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1599..2135

(ix) ASPECTO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: complemento (2308..2634)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 48:

TTTATCGGAC	CTTGGGTATT	CAGGGGAACC	CATCTGGTTG	AAATGCATCC	GACCCGCGAC	60
TTGATCCTGG	TTACCCCGAC	CCAANTTTTA	AGCCGGCTGG	CGCGGTCCCT	AGATAACCCG	120
CCGCTTAAAA	CTAGCCCCAA	TATTGATGTG	CAGATATAAC	ACAGGGAACC	GATCAATGGA	180
AGACATGCTA	CGGCGGTGAT	CTCCCGAAGA	CATCACCAGT	TCCCTAACAA	TGTGCGGTGAT	240
TATGTTATCG	CGCATTCGTC	GTACCATGCG	CACCGCAGGA	AATAAATATA	GCTATATGAT	300
AGATCCAATG	AATCGTATGT	CTAATTACAC	TCCAGGCGAA	TGTATGACAG	GTATATTGCG	360
ATATATTGAC	GAACATGCTA	GAAGGTGTCC	TGATCACATA	TGTAATTGTG	ATATCACATG	420
TACACTTATG	CCGATGTATG	TGCACGGGCG	ATATTTCTAT	TGTAATTGAT	TTTTTTGKTA	480
GTAAACTACC	ACAGGCTGTC	CGGAAATCTA	AGTTAATGAA	TAAAGTAGAT	GGTTAATACT	540
CATTGCTTAG	AATTGGACTA	CTTTTAATYC	TCTTTAATGT	TCGTATTAAA	TAAAAACATC	600
TTTAATAAAC	TTGAGCCTCT	TGCTTTATTG	TAGAAATTGA	GTATTCANAA	TCATGTTCAA	660
AGCCGCTCTC	GGAGAGTGTA	CTCGCCACGG	TGGTTGGAAC	ATCACTATGT	CTACACGTCA	720
AATTTAAGCA	CGTCAGGTCT	GTCGAGGACA	AGAAATGGTT	AACTAGTGTT	TCAATTATTC	780
TTATAAACGT	TAAGCATTGT	AAGCCCCCCG	GCCGTCCGCA	GCAACAATTT	ACTAGTATGC	840
CGTGGGCTCC	GGGACTATCA	CGGATGTCCA	ATTCGCACAT	GCATATAATT	TTTCTAGGGT	900
CTCTCATTTC	GAGAAATCTT	CGGGGATCCA	TCAGCAATGC	GGGCTGTAGT	CCCGATTCCC	960
GTTTCAAATG	AAGGTGCTCC	AACACGGTCT	TCAAAGCAAC	CGGCATACCA	GCAAACACAG	1020
ACTGCAACTC	CCCCTGCAAA	TGATTGGTTA	TAAACAGTAA	TCTGTCTTCT	GGAGGTATAT	1080
TTGCCCCGAC	AATCCACGGC	GCCCCCAAG	TTAAAAACCA	TCCATGTGTA	TTTGGCTCTT	1140
CTCTGTAAAA	AGAATATTGA	CTGGCATTCT	CCCGTTGACC	GCCAGATATC	CAAAGTACAG	1200
CACGATGTTG	CACGGACGAC	TTTGACGTCA	CCAGCCTTCC	TTTCCACCCC	CCCACCAACA	1260
AAATGTTTAT	CGTAGGACCC	ATATCCGTAA	TAAGGATGGG	TCTGGCAGCA	ACCCCATAGG	1320
CGCCTCGGCG	TGGTAGTTCT	CGAGGATACA	TCCAAAGAGG	TTGAGTATTC	TCTCTACACT	1380
TCTTGTTAAA	TGGAAAGTGC	ATTTGCTTGT	TCTTACAATC	GGCCCCGAGT	TCGTTACACG	1440
CGCCTCGTTC	ACACTTAAAC	CACAAATAGT	CTACAGGCTA	TATGGGAGCC	AGACTGAAAC	1500
TCACATATGA	CTAATATTG	GGGGTGTTAG	TCACGTGTAG	CCCATTTGTT	GCATATAACG	1560
ATGTTGGACG	CGTCCTTATT	CGCGGTGTAC	TTGATACTAT	GGCAGCGAGC	ATGGGATATT	1620
CATCCTCGTC	ATCGTTAACA	TCTCTACGGG	TTCAGAAATG	TTGGCATGTC	GTCGATCCTT	1680
TGCCCATCGT	TGCAAATTAC	AAGTCCGATC	GCCATGACCG	CGATAAGCCT	GTACCATGTG	1740

ES 2 278 382 T3

GCATTAGGGT GACATCTCGA TCATACATTA TAAGACCAAC GTGCGAGTCT TCCAAGACC 1800
 TGCACGCCCTT CTTCTTCGGA TTGTCAACGG GTTCTTCAGA ATCTATGCCC ATATCTGGCG 1860
 TTGAGACCAT TGTGCGTTTA ATGAACAATA AAGCGGCATG CCATGGAAAG GAGGGCTGCA 1920
 GATCTCCATT TTCTACGCC ACTATCCTGG ACGCTGTAGA CGATAATTAT ACCATGAATA 1980
 TAGAGGGGGT ATGTTTCCAC TGCCACTGTG ATGATAAGTT TTCTCCAGAT TGTGATAT 2040
 CTGCATTTTC TGCTGCCGAA CAACTTCAT CGCTATGCAA AGAGATGCGT GTGTACACGC 2100
 GCCGGTGGAG TATACGGGA ACTAAATGTT CATAGAGGTC TTTGGGCTAT ATGTTATTAA 2160
 ATAAATAAT TGACCACTGA ACAATTTGTT TAATGTTAGT TTATTCAATG CATTGGTTGC 2220
 AAATATTCAT TACTTCTCCA ATCCCAGGTC ATTCTTTAGC GAGATGATGT TATGACATTG 2280
 CTGTGAAAAT TACTACAGGA TATATTTTAA AGATGCAGGA GTAACAATGT GCATAGTAGG 2340
 CGTAGTTATC GCAGACGTGC AACGCTTCGC ATTTGAATTA CCGAAGTGCC CAACAGTGCT 2400
 GCGGTTATGG TTTATGCGCA CAGAATCCAT GCATGTCCTA ATTGAACCAT CCGATTTTTC 2460
 TTTTAATCGC GATCGATGT TGGGCAACTG CGTTATTCA GATCTAAAAA ATTTACCCCTY 2520
 TATGACCATC ACATCTCTCT GGYTCATACC CCGCTTGGG TAAGATATCA TGTAGATTCC 2580
 GCCCCTAAGA AATTGCAAC TAACATNATT GNCGGGTTCC ATATACAATC CCATCTGTTC 2640
 CNCTCGAAAT TACAACTCG CGCAATAGAC CCCCCTACAT T 2681

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 49:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 111 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 49:

Met Cys Arg Tyr Asn Thr Xaa Xaa Arg Ser Met Glu Asp Met Leu Arg
 1 5 10 15

Arg Ser Ser Pro Glu Asp Ile Thr Asp Ser Leu Thr Met Cys Leu Ile
 20 25 30

Met Leu Ser Arg Ile Arg Arg Thr Met Arg Thr Ala Gly Asn Lys Tyr
 35 40 45

Ser Tyr Met Ile Asp Pro Met Asn Arg Met Ser Asn Tyr Thr Pro Gly
 50 55 60

Glu Cys Met Thr Gly Ile Leu Arg Tyr Ile Asp Glu His Ala Arg Arg
 65 70 75 80

Cys Pro Asp His Ile Cys Asn Leu Tyr Ile Thr Cys Thr Leu Met Pro
 85 90 95

Met Tyr Val His Gly Arg Tyr Phe Tyr Cys Asn Ser Phe Phe Xaa
 100 105 110

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 50:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 266 aminoácidos

ES 2 278 382 T3

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 50:

```

Met His Phe Pro Phe Asn Lys Lys Cys Arg Glu Asn Thr Gln Pro Leu
1      5      10      15
Trp Met Tyr Pro Arg Glu Leu Pro Arg Arg Gly Ala Tyr Gly Val Ala
20      25      30
Ala Arg Pro Ile Leu Ile Thr Asp Met Gly Pro Thr Ile Asn Ile Leu
35      40      45
Leu Val Gly Gly Trp Lys Gly Arg Leu Val Thr Ala Lys Ser Ser Val
50      55      60
Gln His Arg Ala Val Leu Trp Ile Ser Gly Gly Gln Arg Glu Asn Ala
65      70      75      80
Ser Gln Tyr Ser Phe Asn Arg Glu Asp Ala Asn Thr His Gly Trp Phe
85      90      95
Leu Thr Leu Gly Ala Pro Trp Ile Val Gly Arg Asn Ile Leu Pro Glu
100     105     110
Asp Arg Leu Leu Phe Ile Thr Asn His Cys Ser Gly Glu Leu Gln Ser
115     120     125
Val Phe Ala Gly Met Pro Val Ala Leu Lys Thr Val Leu Glu His Leu
130     135     140
His Leu Lys Arg Glu Ser Gly Leu Gln Pro Ala Leu Leu Met Asp Pro
145     150     155     160
Arg Arg Phe Leu Glu Met Arg Asp Pro Arg Lys Ile Ile Cys Met Cys
165     170     175
Glu Leu Asp Ile Arg Asp Ser Pro Gly Ala His Gly Ile Leu Val Asn
180     185     190
Cys Cys Cys Gly Arg Pro Gly Gly Leu Gln Cys Leu Thr Phe Ile Arg
195     200     205
Ile Ile Glu Thr Leu Val Asn His Phe Leu Ser Ser Thr Asp Leu Thr
210     215     220
Cys Leu Asn Leu Thr Cys Arg His Ser Asp Val Pro Thr Thr Val Ala
225     230     235     240
Ser Thr Leu Ser Glu Asp Gly Phe Glu His Asp Xaa Glu Tyr Ser Ile
245     250     255

```

```

Ser Thr Ile Ser Glu Glu Ala Glu Val Tyr
260     265

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 51:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 178 aminoácidos

ES 2 278 382 T3

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 51:

```

Met Ala Ala Ser Met Gly Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Leu Thr Ser Leu
1      5      10      15
Arg Val Gln Asn Val Trp His Val Val Asp Pro Leu Pro Ile Val Ala
20      25      30
Asn Tyr Lys Ser Asp Arg His Asp Arg Asp Lys Pro Val Pro Cys Gly
35      40      45
Ile Arg Val Thr Ser Arg Ser Tyr Ile Ile Arg Pro Thr Cys Glu Ser
50      55      60
Ser Lys Asp Leu His Ala Phe Phe Phe Gly Leu Ser Thr Gly Ser Ser
65      70      75      80
Glu Ser Met Pro Ile Ser Gly Val Glu Thr Ile Val Arg Leu Met Asn
85      90      95
Asn Lys Ala Ala Cys His Gly Lys Glu Gly Cys Arg Ser Pro Phe Ser
100      105      110
His Ala Thr Ile Leu Asp Ala Val Asp Asp Asn Tyr Thr Met Asn Ile
115      120      125
Glu Gly Val Cys Phe His Cys His Cys Asp Asp Lys Phe Ser Pro Asp
130      135      140
Cys Trp Ile Ser Ala Phe Ser Ala Ala Glu Gln Thr Ser Ser Leu Cys
145      150      155      160
Lys Glu Met Arg Val Tyr Thr Arg Arg Trp Ser Ile Arg Glu Thr Lys
165      170      175
Cys Ser

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 52:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 108 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 52:

```

Met Gly Leu Tyr Met Glu Pro Xaa Asn Xaa Val Ser Leu Gln Phe Leu
1      5      10      15
Arg Gly Gly Ile Tyr Met Ile Ser Xaa Pro Lys Arg Gly Met Xaa Gln
20      25      30
Arg Asp Val Met Val Ile Xaa Gly Lys Phe Phe Arg Ser Glu Ile Thr
35      40      45
Gln Leu Pro Lys His Arg Ser Arg Leu Lys Glu Lys Ser Asp Gly Ser
50      55      60
Ile Arg Thr Cys Met Asp Ser Val Arg Ile Asn His Asn Arg Ser Thr
65      70      75      80
Val Gly His Phe Gly Asn Ser Asn Ala Lys Arg Cys Thr Ser Ala Ile
85      90      95
Thr Thr Pro Thr Met His Ile Val Thr Pro Ala Ser
100      105

```

ES 2 278 382 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 53:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Cebador oligonucleotídico de DNA

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 53:

CTCGCTCGCC CATGATCATT AAGCAAGAAT TCCGTCG

37

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 54:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Cebador oligonucleotídico de DNA

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 54:

CTGGTTTCGGC CCATGATCAG ATGACAAACC TGCAAGATC

39

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 55:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 57 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 55:

CTCGGCGTGG TAGTTCGA GGCCTTAATT AAGGCCCTCG AGGATACATC CAAAGAG

57

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 56:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 63 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

ES 2 278 382 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 56:

CGGCGTGGTA GTTCTCGAGG CCTTAAGCGG CCGCTTAAGG CCCTCGAGGA TACATCCAAA 60
GAG 63

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 57:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 34 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 57:

CGCAGGATCC GGGGCGTCAG AGGCGGGCGA GGTG 34

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 58:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 58:

GAGCGGATCC TGCAGGAGGA GACACAGAGC TG 32

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 59:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

ES 2 278 382 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 59:

TGTAGAGATC TGGCTAAGTG CGCGTGTTGC CTG

33

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 60:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

20

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 60:

TGTACAGATC TCACCATGGC TGTGCCTGCA AGC

33

25

30

35

40

45

50

55

60

65