



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 298**

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)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06026820 .8**

96 Fecha de presentación : **09.08.1995**

97 Número de publicación de la solicitud: **1801204**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

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

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.06.2011

73 Titular/es: **SCHERING-PLOUGH Ltd.**
Weyrstrasse 20, P.O. Box
6000 Lucerne, CH

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

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 recombinantes de pavos y sus usos.

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 INVENCION

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, deleciones, 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 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 inmunitaria en un animal hospedante y proporcionar protección al animal contra la enfermedad. Un virus con estas características se denomina un vector viral, porque se convierte en un vector vivo que llevará y expresará la proteína extraña en el animal hospedante. En efecto, llega a ser un sistema de administración elaborado para la(s) proteína(s) extraña(s).

Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de herpesvirus de pavos (abreviadamente en lo sucesivo HVT por la expresión inglesa *Herpesvirus of Turkey*) como un vector viral para la vacunación de aves contra enfermedades. El grupo de herpesvirus comprende diversos agentes patógenos que infectan y causan enfermedades en cierto número de especies dianas: cerdos, ganado vacuno, pollos, caballos, perros, gatos etc. Cada herpesvirus es específico para su especie hospedante, pero todos ellos están relacionados en la estructura de sus genomas, su modo de replicación y en cierta extensión, en la patología que causan en el animal hospedante y en el mecanismo de la respuesta inmunitaria 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 pequeños. En el caso de los papovavirus, 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 está limitada a sistemas de cultivos de células. Para los adenovirus, hay una pequeña cantidad de DNA no esencial que puede reemplazarse por secuencias extrañas. Los únicos DNA extraños 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 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 identifican las regiones no esenciales del HVT, en donde puede insertarse 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 investigación sobre la expresión de genes extraños. Los poxvirus son virus que contiene DNA grandes que se replican en el citoplasma de la célula infectada. Dichos virus 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 por la pérdida de función y degeneración. En parte debido a esta singularidad, los avances hechos en ingeniería genética de los poxvirus no pueden extrapolarse 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 ni al 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 la 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 herpesvirus saimiri de los simios ha sido 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., *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 genéticamente 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 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 por delección que ocurre naturalmente de este gen en HSV (Gibson y Spear, *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 bovina 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 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 delección 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 delección y los sitios para inserción de los genes extraños no se conoce de estos estudios previos.

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 pollos jóvenes entre una edad de 2 y 5 meses. Los signos 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 agachada 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 implicaba usar cepas que se presentan naturalmente del herpesvirus de pavo (HVT). Sería ventajoso incorporar otros antígenos en esta vacuna del primer día de vida, pero los esfuerzos para combinar las vacunas convencionales no han demostrado hasta la fecha 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 plásmido bacterianos, reconstruyendo el DNA del virus mientras está en estado clonado de manera que el DNA contenga deleciones 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 adecuado 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 enfermedades que tienen 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 vectorización las vacunas procedentes del HVT serán superiores. También, el gen de interés puede proceder de agentes patógenos para los cuales actualmente no hay vacuna, pero que cumplen el requisito de 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 la vectorización 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 de las vías respiratorias, 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 lesiones 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 sensibles. 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.

- 5 Una diana adicional para el método de vectorización del HVT es la enfermedad de Newcastle, una enfermedad infecciosa altamente contagiosa y debilitante que es causada 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 tipos de 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 principalmente 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 periodo de vida del ave y la vía de administración, el productor necesita adaptar los protocolos de inmunización para ajustarse a necesidades específicas.

- 15 El agente terapéutico que ha de ser administrado mediante un vector viral de la presente invención debe ser una molécula biológica que sea un subproducto de la replicación del virus de la viruela de los cerdos. Esto limita el agente terapéutico en el primer análisis a bien sea DNA, RNA o proteínas. Hay ejemplos de agentes terapéuticos de cada una de estas clases de compuestos en la forma de un DNA anti-sentido, 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, desde hormonas, por ejemplo, insulina hasta linfoquinas, por ejemplo, interferones e interleuquinas, hasta 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.

- 20 El documento EP-A431668 se refiere a HVT, que contienen un gen heterólogo incorporado en una región de inserción del genoma del HVT, así como a vacunas de vectores que comprenden dicho HVT recombinante que expresa un polipéptido antigénico heterólogo y que induce una respuesta inmunitaria adecuada sobre la infección de un animal hospedante apropiado. El documento WO 93/25665 describe HVT recombinantes para la expresión de genes extraños insertados en el sitio Stul único del gen US2 que codifica polipéptidos antigénicos procedentes de diversos virus aviares, y, además, que más de una secuencia codificadora de antígenos puede ser insertada en la región codificadora del antígeno del herpesvirus, es decir, en el sitio XhoI de la región EcoRI nº 9.

30 SUMARIO DE LA INVENCION

- Esta invención proporciona un herpesvirus recombinante de pavos que comprende una secuencia de DNA extraño que codifica la glicoproteína I del virus de la laringotraqueitis infecciosa y la glicoproteína D del virus de la laringotraqueitis infecciosa dentro del fragmento EcoRI nº 9 de un genoma viral de herpesvirus de pavos, y la secuencia de DNA extraño que codifica dichas glicoproteínas 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 un herpesvirus recombinante de pavos, células hospedantes y vacunas para uso en inmunización..

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Figuras 1A-1C: Detalles de la construcción del HVT y datos del mapa.

- 40 La Figura 1A muestra un mapa de fragmentos de restricción por BamHI del genoma del HVT. Los fragmentos están numerados en orden de tamaño decreciente; 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.

- 45 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 = Sall; N = NdeI; R = EcoRI.

Figuras 2A-2D: Inserción en el plásmido 191-47.

- 50 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).

Nota.- Las Figuras 3-7 se refieren a ejemplos útiles para la comprensión de la invención.

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*) insertado en el fragmento BamHI nº 16 para 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 los 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.

Transferencia Western que indica la expresión diferencial del antígeno del IBDV de 32kD en lisados celulares de células infectadas con S-HVT-003 (32kD presente) y células infectadas con S-HVT-001 (32kD negativo). Los polipéptidos específicos del IBDV se identificaron mediante sondeo de la transferencia con antisuero de rata hiperinmunitario dirigido contra los viriones del IBDV desnaturalizados. Este suero reacciona principalmente con el antígeno de 32kD 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 por la expresión inglesa *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:

Transferencia Western que indica la expresión diferencial del antígeno VP2 de 42kD en lisados celulares de células infectadas con S-HVT-003 (42kD presente) y células infectadas con S-HVT-001 (42kD 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 CEF 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 es un mapa de restricción de DNA del HVT en la región del fragmento BamHI nº 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 nº 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 propio promotor.

La Figura 6C es el genoma del S-HVT-004, mostrando la ubicación de los 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:

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 que indica la orientación de los fragmentos DNA ensamblados en el gen marcador. El origen de cada fragmento está descrito en el apartado 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 BamHI y NotI 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 BamHI están numerados en orden decreciente de tamaño. Está indicada la localización de las sondas P1-P4. El origen de cada sonda es como sigue: P1 - BamHI nº 6, P2 - BamHI nº 2, P3 - BamHI nº 13, y P4 - sub-fragmento BglII a StuI de 4,0 KB del fragmento XbaI nº 5 genómico del HVT (8,0 KB).

Figura 9: Muestra el procedimiento para la construcción del plásmido pSY229.

Nota.- Las Figuras 10-12 se refieren a ejemplos útiles para la comprensión de la invención.

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 10B 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 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), la 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:

Descripción detallada del inserto del fragmento HindIII 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 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), la 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 gl. 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 Sall 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 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), la 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 XhoI único del fragmento BamHI nº 10 del genoma del HVT se convirtió en un sitio PacI y un sitio NotI mediante la inserción de la secuencia de DNA sintético en el sitio XhoI (Nucleótidos nº 1333-1338; SEQ ID NO: 48). La Figura 13A muestra el sitio XhoI convertido en un sitio PacI para generar el plásmido 654-45.1 (SEQ ID NO: 55) y la Figura 13B muestra el sitio XhoI convertido en un sitio NotI 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 ORF 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 XhoI (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 XhoI. La secuencia de aminoácidos del ORF A (SEQ ID NO: 50; nucleótidos 1402 a 602; 267 aminoácidos) no muestra una identidad de secuencia significativa con 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) muestran una identidad de secuencia significativa

con 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 con ninguna 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, 672-01.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 PaeI único en el plásmido 654-45.1 o un sitio NotI en el plásmido 686-63.A1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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 replicación.

Como se define en la presente memoria, "genoma viral" o "DNA genómico" significa el DNA completo que contiene el herpesvirus de pavos natural. 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" 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 como sitio de inserción apropiado en el genoma del HVT, útil para la construcción del herpesvirus recombinante de la presente invención, el fragmento EcoRI nº 9 del genoma del HVT, siendo un sitio de inserción preferido dentro de este fragmento una endonucleasa de restricción XhoI.

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 un 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 ORF A 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 al virus no se le ha delecionado material genético esencial para la replicación 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.

El herpesvirus recombinante de pavos de la invención comprende una secuencia de DNA extraño que codifica la glicoproteína I del virus de la laringotraqueitis infecciosa y la glicoproteína D del virus de la laringotraqueitis infecciosa que son antigénicas en un animal en el que se introduce el herpesvirus recombinante.

La siguiente descripción explica 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.

La secuencia de DNA extraño puede codificar el polipéptido antigénico 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 Stul único de la región codificadora del gen US2 del herpesvirus de pavos.

La secuencia de DNA extraño puede codificar también 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, IBV, 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 viruela aviar, 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.

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 gD del LTV o gI del ILTV.

Los HVT recombinantes proporcionados están manipulados por ingeniería genética para que contengan más de una secuencia de DNA extraño que codifica un antígeno del ILTV. Además de los genes gI y gD del ILTV, los genes gB, gD y gI pueden ser vectorizados juntos en el genoma del HVT. El HVT recombinante denominado S-HVT-138 es una realización de tal virus recombinante.

La descripción 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.

Además, el HVT recombinante puede contener las 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.

En un herpesvirus recombinante de pavos la secuencia de DNA extraño puede estar bajo el control de un promotor de herpes virus endógeno situado aguas arriba (es decir, en la región que se extiende en dirección 5').

Además, la secuencia de DNA extraño puede estar bajo el control de un promotor heterólogo situado aguas arriba, por ejemplo, seleccionado de gX de PRV, alfa-4 de HSV-1, HCMV temprano inmediato, gA de MDV, gB de MDV, gD de MDV, gB de ILT, VP8 de BHV-1.1 y gD de ILT.

Esta invención proporciona un vector de homología para producir un herpesvirus recombinante de pavos insertando DNA extraño que codifica la glicoproteína I del virus de la laringotraqueitis infecciosa y la glicoproteína D del virus de la laringotraqueitis infecciosa en el genoma viral de un herpesvirus de pavo, que comprende una molécula de DNA bicatenario que consiste en: a) el DNA extraño bicatenario de acuerdo con la reivindicación 1; b) en un extremo del DNA extraño, el DNA bicatenario de herpesvirus de pavos homólogo al genoma viral localizado en un lado la región codificadora 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 de herpesvirus de pavos homólogo al genoma viral localizado en el otro lado del fragmento EcoRI nº 9 de la región codificadora del genoma viral de herpesvirus de pavos. Los ejemplos de vectores de homología se denominan 751-87.A8 y 761-7.A1

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 denomina 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*.

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

La presente invención también proporciona una vacuna que comprende el herpesvirus recombinante de pavos de la invención para inmunizar un ave de corral contra el virus de la laringotraqueitis infecciosa. El uso comprende administrar al ave de corral 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.

Esta invención proporciona una célula hospedante infectada con el herpesvirus recombinante de pavo. 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 pavos se detallan más adelante.

Para los fines de esta invención, una "cantidad inmunizante eficaz" del herpesvirus recombinante de pavos de la presente invención está en el intervalo 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 10^6 UFP/dosis.

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 de cultivo 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, tales como proteínas hidrolizadas estabilizantes. Preferiblemente, la vacuna inactivada usa fluidos de cultivo de tejido directamente después de la inactivación del virus.

Esta invención se ilustra además en el apartado Detalles Experimentales que sigue. Este apartado se facilita para ayudar a un entendimiento de la invención.

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 lo sucesivo 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 centrífuga 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 .

PREPARACION 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 CO_2 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 Cl_2Mg 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 centrífuga clínica durante 5 minutos a 3000 rpm para separar las fases. El NaAc se añadió a la fase acuosa a una concentración final de 0,3M (solución madre, 3M 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, MgCl_2 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 ^{35}S -dATP (NEN). Las reacciones que usan tanto las mezclas como dGTP y las mezclas dITP 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 0,15M, 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 bovina (BSA), 0,02% de Ficoll), 6X SSC, NaH_2PO_4 50 mM, pH 6,8, DNA de esperma de salmón 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 ^{32}P . El DNA sonda se separó de los nucleótidos no incorporados mediante una columna NACS (BRL) o una columna Sephadex G50 (Farmacia). 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 4M, antiespumante A al 0,1%, citrato sódico 25 mM pH 7,0, N-lauril-sarcosina al 0,5%, beta-mercaptoetanol 1M). El lisado de células se vertió 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 ditiotretitol 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 2M 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 (Farmacia 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 1µg 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 nº 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 nº NEG-013H), y 180 unidades de transcriptasa inversa del AMV (Molecular Genetics Resources nº 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 2M y 2 volúmenes de etanol frío a -20°C durante 3 horas. Después de la precipitación y centrifugación, el sedimento se disolvió en 100 µl 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 nº 642-711), y 100 unidades/ml de DNA-ligasa de E. coli (New England Biolabs nº 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 8mM, pH 6,85. El DNA electroeluido se liofilizó hasta alrededor de 100 microlitos 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, ditiotritol 0,2 mM, CaCl₂ 2 mM, 80 µmoles de dCTP, y 25 unidades de desoxinucleotidil-transferasa terminal (Molecular Genetic Resources nº 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 vector plasmídico pBR322 que contenía colas de oligo-dG (Bethesda Research Laboratories nº 5355 SA/SB) en 200 µl de Tris 0,01 M pH 7,5, NaCl 0,1M, 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 nº 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 SUB-GENÓMICOS. 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 3M 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 BamHI, 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 BamHI, HindIII, y XhoI permitieron el uso de fragmentos subclonados como sondas específicas para escrutar la genoteca cósmica 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 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 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 BamHI, 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 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 NotI. Sin embargo, están presentes cuatro sitios NotI en el genoma del HVT, de manera que los insertos que abarcan estos sitios no pueden ser escindidos con NotI. Dos de los sitios NotI están presentes en el fragmento BamHI nº 2 del HVT, este fragmento se clonó directamente en pSP64. Los otros dos sitios están presentes en la región corta única en el fragmento BamHI nº1. Este fragmento se clonó directamente en el vector pWE15. Los tres cósmidos cizallados y los dos fragmentos BamHI cubren todo salvo 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 Stul en el gen US2 del HVT se estableció como un sitio útil para la inserción del DNA extraño utilizando el MÉTODO DE RECOMBINACION DE HOMOLOGOS PARA GENERAR HERPESVIRUS RECOMBINANTES (véase el Ejemplo 6). El gen US2 del HVT está localizado en el fragmento BamHI nº1 el cual contiene cinco sitios Stul. Para facilitar el uso de este sitio para la inserción del DNA extraño por el sitio Stul dentro del gen US2 se convirtió en un sitio único HindIII. Esto se logró digiriendo parcialmente el subclon BamHI nº 1 con Stul e insertando luego un fragmento de 10 KB que confiere resistencia a kanomicina (Neo^R) en el sitio usando enlazadores HindIII. El gen de resistencia a kanomicina permitió la selección positiva de los clones recombinantes. El fragmento Neo^R se retiró por digestión con HindIII seguido por 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.

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.

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.

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 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 incubaba 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 incubaba 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 5mM), y luego se incubaba 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 10mM, pH 7,5/ EDTA1 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 incubaba 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 3M y NaOH 0,5 M durante 5 minutos. Las membranas se neutralizan colocándolas en 1,5 ml de acetato sódico 3M (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%, (±) DNA de esperma de salmón (50 µg/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 HOMOLOGIA 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 nº 7 del HVT en el sitio Stul 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 nº 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 nº 7 del PRV (Lomniczi et al., 1984).

RNA AISLADO DE CÉLULAS DE BAZO DE POLLO ESTIMULADAS CON CONCAVALINA A. Se diseccionaron bazo 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 5×10^6 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 contenía los cebadores anti-sentido 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 BamHI a BamHI de pSP64 (Promega). El segundo fragmento es de aproximadamente 25.000 pares de bases, el fragmento BamHI nº 2 de HVT (Buckmaster et al., 1988).

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 XhoI único en el cual puede ser insertado el DNA extraño. Cuando un plásmido que contiene un inserto de DNA extraño en el sitio XhoI 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 BamHI a BamHI de pSP64 (Promega). El segundo fragmento es el fragmento de aproximadamente 3300 pares de bases BamHI nº 16 del HVT (Buckmaster et al., 1988). La secuencia completa del fragmento BamHI nº 16 se da en la SEQ ID NO: 3. Advértase 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 XhoI único en el cual puede ser insertado el DNA extraño. Cuando un plásmido que contiene un inserto de DNA extraño en el sitio XhoI 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 EcoRI a EcoRI del pSP64 (Promega). El segundo fragmento es el fragmento de aproximadamente 5500 pares de bases EcoRI nº 9 del HVT. Advértase que el fragmento EcoRI se clonó de manera que el sitio XhoI único está más cerca del sitio HindIII único en el vector pSP64.

Ejemplo comparativo:

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 Sall en el vector de homología 172-29.31 en el sitio XhoI. 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 Sall se muestra en las

Figuras 12A-12C. El fragmento Sall 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 Sall a BamHI del fragmento 10 de restricción BamHI del PRV (Lomniczi et al., 1984). El fragmento 2 es el fragmento de aproximadamente 3009 pares de bases de BamHI a PvuII del plásmido pJF751 (Ferrari et al., 1985). El fragmento 3 es un fragmento de restricción de aproximadamente 1200 pares de bases Avall a EcoRI de cDNA del gen HN del NDV de longitud completa. El fragmento 4 es un fragmento de restricción de aproximadamente 179 pares de bases EcoRI a PvuII del plásmido pSP64 (Promega). El fragmento 5 es un subfragmento de restricción de aproximadamente 357 pares de bases SmaI a BamHI del fragmento de restricción N del BamHI del HSV-1. El fragmento 6 es un fragmento de restricción de aproximadamente 1812 pares de bases BamHI a PstI del cDNA del gen F del de longitud completa. El fragmento 7 es un fragmento de restricción de aproximadamente 235 pares de bases PstI a ScaI del plásmido pBR322.

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 BamHI a BamHI del pWE15 (Stratagene) El segundo fragmento es el fragmento de aproximadamente 29.500 pares de bases BamHI 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 BamHI 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.

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 BamHI 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 CONSTRUCCION 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.

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 BamHI n° 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 HindIII único en el cual puede insertarse el DNA extraño. Cuando se usa un plásmido que contiene un inserto de DNA extraño en el sitio HindIII de acuerdo con la COTRANSFECTACION 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 EcoRI a EcoRI del pSP64 (Promega). El segundo fragmento es un fragmento de aproximadamente 7300 pares de bases de EcoRI nº 7 del HVT. Adviértase que el sitio HindIII del vector pSP64 se separó digiriendo el subclon con HindIII seguido por un relleno con polimerasa de Klenow en reacción y religamiento. Luego se insertó un enlazador HindIII sintético (CA-AGCTTG) en el sitio Stul único del fragmento EcoRI nº 7.

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 CONSTRUCCION 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 HindIII a BamHI del pSP64 (Promega). El segundo fragmento es el subfragmento de aproximadamente 13.600 pares de bases BamHI a Stul del fragmento BamHI nº 2 del HVT (Buckmaster et al., 1988). Adviértase que el fragmento BamHI nº 2 contiene cinco sitios Stul, el sitio utilizado en esta subclonación se convirtió en un sitio HindIII como se describió en el MÉTODO PARA GENERAR HERPESVIRUS RECOMBINANTES A PARTIR DE FRAGMENTOS SUBGENÓMICOS SOLAPANTES.

CLON SUBGENÓMICO 437-26.26. El plásmido 437-26.26 se construyó con el fin de 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 CONSTRUCCION 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 HindIII a BamHI del pSP64 (Promega). El segundo fragmento es el subfragmento de aproximadamente 15.300 pares de bases BamHI a Stul del fragmento BamHI nº 2 del HVT (Buckmaster et al., 1988). Adviértase que el fragmento BamHI nº 2 contiene cinco sitios Stul, el sitio utilizado en esta subclonación se convirtió en un sitio HindIII como se describió en el MÉTODO PARA GENERAR HERPESVIRUS RECOMBINANTE DE FRAGMENTOS SUBGENÓMICOS SOLAPANTES.

Ejemplo comparativo:

VECTORES DE HOMOLOGÍA 456-18.18 y 456-17.22. Los plásmidos 456-18.18 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 HindIII único. Los genes del MDV se insertaron en el sitio HindIII como un fragmento PstI a EcoRI de extremos romos (véanse las Figuras 10A y 10B). Los sitios HindIII y EcoRI se hicieron romos mediante llenado con polimerasa de Klenow en reacción. El sitio PstI 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).

Ejemplo comparativo:

VECTOR DE HOMOLOGÍA 528-0.3.37. 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.

Ejemplo comparativo:

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 Eco-

RI 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 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 CO-TRANSFECCION 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.

Ejemplo comparativo:

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 Avall 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 subfragmento de restricción de aproximadamente 784 pares de bases SmaI a SmaI del fragmento de restricción Q del HSV-1 (McGeoch et al., 1985).

Ejemplo comparativo:

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 SmaI 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 nº7 de restricción del PRV (Lomniczi et al., 1984). El cuarto fragmento es un subfragmento de restricción PstI a Avall 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).

Ejemplo comparativo:

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 BamHI del fragmento BamHI nº 10 del PRV (Lomniczi et al., 1984). El segundo fragmento es un fragmento de restricción de aproximadamente 1811 pares de bases Avall a NaeI 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 NdeI a Sall del fragmento de restricción BamHI nº7 del PRV (Lomniczi et al., 1984).

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 CONSTRUCCION 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 EcoRV a BamHI de pBR622. El segundo fragmento es el subfragmento de aproximadamente 12.300 pares de bases del fragmento BamHI nº 2 del HVT (Buckmaster et al., 1988). Este fragmento se generó de la siguiente manera. El plásmido 437-26.26 se linealizó con HindIII y luego se recortó con el ExoIII Mung Bean Deletion Kit (Stratagene). Las muestras de las reacciones de 3 y 4 minutos se reunieron y se digirieron con BamHI 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 BamHI cuando se ligaron al sitio EcoRV (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 N° 75429.

Ejemplo comparativo:

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 HindIII en el vector de homología 456-17.22 en el sitio HindIII 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 HindIII que contiene el gen gD del MDV se muestra en las Figuras 11A y 11B. Advuértase que la señal de poliadenación de herpesvirus se añadió al casete del gen gD. El fragmento HindIII 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 SmaI a SmaI del fragmento Q de restricción BamHI 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 NcoI del fragmento de restricción genómico BglII de 4,2 KB del MDV (Ross et al., 1991).

Ejemplo comparativo

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 NotI 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 BamHI del fragmento BamHI 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 NdeI a Sall del fragmento de restricción BamHI nº 7 del PRV (Lomniczi et al., 1984). El cuarto fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 1191 pares de bases PstI a Avall del fragmento genómico XbaI 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 SmaI a SmaI del fragmento de restricción Q de BamHI del HSV1 (McGeoch et al., 1985).

Ejemplo comparativo:

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 HindIII 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 PstI a Avall del

fragmento genómico de XbaI E del HCMV (D.R. Thomsen et al., 1981). El segundo fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 1081 pares de bases BclI a BamHI del clon de cDNA de longitud completa del IBDV (véase la SEQ ID NO:1). Adviértase que el sitio BclI 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 Avall y BclI estén contiguos. El tercer fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 784 pares de bases SmaI a SmaI del fragmento de restricción Q de BamHI de HSV-1 (McGeoch et al., 1985).

Ejemplo comparativo:

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.

Ejemplo comparativo:

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 XhoI 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 Sall a Sall 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 EcoRI a BclI del fragmento de restricción genómico nº 8 de KpnI de ILTV (10,6 KB). El tercer fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 754 pares de bases NdeI a Sall del fragmento de restricción BamHI nº7 del PRV (Lomniczi et al., 1984). Adviértase que los fragmentos segundo y tercero están orientados de manera que los sitios BclI a NdeI estén contiguos. El cuarto fragmento es el fragmento EcoRI 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 BamHI nº 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 BamHI a BamHI de pSY1005 derivado de pHCT9. (Bethesda Research Laboratories, Inc.) y pWE15 (Stratagene, Inc.). El primer fragmento es el fragmento BamHI nº 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 las Figuras 8 y 15). El cósmido 672-01.A40 contiene un subfragmento de aproximadamente 14.000 pares de bases NotI a AscI y aproximadamente un subfragmento de aproximadamente 1300 pares de bases AscI a BamHI 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 NotI a BamHI construido a partir de pNEB193 (New England Biolabs, Inc.) el cual contiene el enlazador NotI insertado en el sitio SmaI. El fragmento I es una región de aproximadamente 15.300 pares de bases del DNA del HVT genómico. Esta región incluye los fragmentos BamHI 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 AscI 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 AscI de aproximadamente 2.000 pares de bases construido a partir de un fragmento AatII a PvuII 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 AscI insertados. El fragmento 1 es un fragmento de aproximadamente 8.600 pares de bases AscI a AscI de DNA del HVT genómico. Esta región incluye los fragmentos 10 y 21 de BamHI y aproximadamente 1.100 pares de bases del fragmento nº 6 y aproximadamente 1.300 pares de bases del fragmento 7. El sitio XhoI (nucleótidos nº 1339-1344; SEQ ID NO: 48) se ha convertido en un sitio PacI único usando enlazadores de DNA sintéticos. El sitio PacI 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 GENERACION 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 Ascl 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 Ascl construido del fragmento AatII a PvuII de 2000 pares de bases de pNEB193 (New England Biolabs, Inc) hecho de extremos romos con los enlazadores DNA-polimerasa de Klenow y Ascl insertados. El fragmento 1 es un fragmento de aproximadamente 8.600 pares de bases Ascl a Ascl del DNA del HVT genómico. Esta región incluye los fragmentos BamHI 10 y 21 y aproximadamente 1.100 pares del fragmento 6 y aproximadamente 1.300 pares de bases del fragmento 7. El sitio XhoI (Nucleótidos nº 1339-1344; SEQ ID NO: 48) se ha convertido en un sitio NotI único usando enlazadores de DNA sintético. El sitio NotI 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 BamHI a Ascl de aproximadamente 1.100 pares de bases y un subfragmento Ascl a NotI 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 NotI a BamHI de aproximadamente 2700 pares de bases construido a partir de pNEB193 (New England Biolabs, Inc.) que contenía un enlazador NotI insertado en el sitio SmaI. El fragmento 1 es una región de aproximadamente 14.100 pares de bases de DNA del HVT genómico. Esta región incluye los fragmentos BmaHI nº 6 y 18 y un fragmento BamHI a NotI de aproximadamente 2.600 pares de bases en el fragmento BamHI 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.

Ejemplo comparativo:

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 PacI 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 HindIII a BamHI 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 anti-sentido usado para la transcripción inversa y el PCR fue 5'-CTGGTTTCGGCCCATGATCAGATGACAAACCTGCAAGATC-3' (SEQ ID NO: 53). El cebador con sentido usado para PCR fue 5'-CTGGTTTCGGCCCATGATCAGATGACAAACCTGCAAGATC-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 BclI 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 PacI 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 Sall a HindIII de aproximadamente 3556 pares de bases del fragmento nº 8 genómico Asp 718I (10,6 kb).

Ejemplo comparativo:

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 PacI 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 Sall a BamHI del fragmento BamHI nº 10 del PRV (Lomniczi et al., 1984). El segundo fragmento es un fragmento de restricción Avall a NaeI 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 NdeI a Sall de aproximadamente 754 pares de bases del fragmento de restricción nº7 de BamHI del PRV (Lomniczi et al., 1984). El cuarto fragmento es un subfragmento de restricción PstI a Avall de aproximadamente 1191 pares de bases del fragmento XbaI E genómico del HCMV (D.R. Thomsen et al., 1981). El quinto fragmento es un fragmento de restricción BamHI a PstI 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 SmaI a SmaI de aproximadamente 784 pares de bases del fragmento de restricción Q de BamHI del HSV-1 (McGeoch et al., 1985).

Ejemplo comparativo:

- 5 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 Stul en el gen US2 del HVT convertido en un sitio HindIII único dentro del fragmento BamHI nº 1 de la región corta única del HVT. Esta región del fragmento BamHI 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 BamHI de DNA de S-HVT-062 y aislamiento de un fragmento de aproximadamente 39.300
- 10 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 BamHI de aproximadamente 8.200 pares de bases del vector cósmido pWE15. El primer fragmento es un fragmento BamHI de aproximadamente 900 pares de bases de la región de repetición del genoma del HVT. El segundo fragmento es un subfragmento BamHI a Stul de aproximadamente 15.500 pares de bases del BamHI 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 HindIII a BamHI de aproximadamente 14.500 pares de bases de BamHI nº 1 del HVT.

Ejemplo comparativo:

- 20 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 Stul en el gen US2 del HVT convertido en un sitio HindIII dentro del fragmento BamHI 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
- 25 región del fragmento BamHI 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 BamHI 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 BamHI de aproximadamente 6100 pares de bases del vector cósmido pSY1626 derivado de
- 30 pHC79 (Bethesda Research Labs, Inc.) y pWE15 (Stratagene, Inc.). El primer fragmento es un fragmento BamHI de aproximadamente 900 pares de bases de la región de repetición del genoma del HVT. El segundo fragmento es un subfragmento BamHI nº1 de aproximadamente 15.500 pares de bases BamHI a Stul 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 Stul a BamHI de aproximadamente 14.500 pares de bases del BamHI nº 1 del HVT.

- 40 Ejemplo comparativo:

- 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 NotI 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
- 45 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 Sall a XbaI del fragmento nº 8 del ILTV Asp 718I genómico (10,6 KB). El segundo fragmento es un subfragmento de restricción de aproximadamente 572 pares de bases XbaI a Asp 718I del fragmento de restricción BamHI nº7 del PRV (Lomniczi et al., 1984). El tercer fragmento es un fragmento de restricción de restricción EcoRI a EcoRI de aproximadamente 3059 pares de bases de DNA genómico del ILTV. El cuarto fragmento es un subfragmento de restricción EcoRI a Sall de aproximadamente 222 pares de bases del fragmento de restricción BamHI nº7 del PRV (Lomniczi et al., 1984).

Ejemplo comparativo:

- 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.
- 55 El cósmido 739-27-16 contiene la región corta única completa del MDV tipo 1. Esta región contiene el fragmento completo SmaI B y dos fragmentos SmaI K. El cósmido 739-27.16 se construyó mediante una restricción parcial digerida con SmaI 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 BmaHI de aproximada-

mente 8200 pares de bases (hecho de extremos romos con DNA-polimerasa de Klenow) del vector cósmido pWE15. El primer fragmento es un fragmento SmaI 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 SmaI B de aproximadamente 21.000 pares de bases del MDV. El tercer fragmento es un fragmento SmaI 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 PacI 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 PacI del clon subgenómico 654-45.1 del HVT. El primer fragmento es un subfragmento de restricción PstI a Avall de aproximadamente 1.191 pares de bases del fragmento XbaI 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 anti-sentido usado para la transcripción inversa y la PCR fue 5'-CGCAGGATCCGGGGCGTCAGAGGCGGGCGAGGTG-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 BamHI 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 de restricción SmaI a SmaI de aproximadamente 784 pares de bases del fragmento de restricción BmaHI Q del HSV-1 (McGeoch et al., 1985).

Ejemplo comparativo:

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 PacI 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 PacI del clon subgenómico 654-45.1 del HVT. El primer fragmento es un subfragmento de restricción PstI a Avall de aproximadamente 1191 pares de bases del fragmento XbaI 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 anti-sentido usado para la transcripción inversa y la PCR fue 5'-TG TAGAGATCTGGCTAAGTGCGCGTGTTCCTG-3' (SEQ ID NO: 59). El cebador con sentido usado para la PCR fue 5'-TG TACAGATCTCACCATGGCTGTGCCTGCAAGC-3' (SEQ ID NO: 60). El fragmento del gen del interferón de pollo se subclonó después al promotor IE del HCMV usando los sitios BglII 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 SmaI a SmaI de aproximadamente 784 pares de bases del fragmento de restricción BamHI Q del HSV-1 (McGeoch et al., 1985).

Los siguientes ejemplos, es decir, los ejemplos 1-16A y C, así como los ejemplos 17-22 se presentan como técnica anterior útil para la comprensión de la invención que se describe en el ejemplo 16B.

EJEMPLO 1

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 BamHI 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 XhoI en el fragmento BamHI nº 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 Sall en la región de repetición contenida en el fragmento BamHI nº 19 (de 900 pb).

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).

EJEMPLO 2S-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 está 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.

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. 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 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 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 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 nº 10 del PRV como un fragmento Sall 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 Ball de aproximadamente 3300 pares de bases seguido por un fragmento Aval 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 gpX y se derivó del subclon del fragmento BamHI nº7 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 nº 10 del PRV como un fragmento de aproximadamente 330 pares de bases NaeI a AluI. Adicionalmente, 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 BglII 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 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 BglII 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 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 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 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 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 pares de bases (SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, y 7). El DNA del HVT se preparó mediante el procedimiento de PREPARACION 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 TRANSFECCION 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 deleciones. 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 PREPARACION DE LISADOS DE CELULA 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 poliácridamida, 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 inculada 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 n°	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 ^a	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 n° 16 no da como resultado una atenuación detectable del virus. Los experimentos subsecuentes que examinan el virus recuperado del ES-CRUTINIO 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 2

Fecha de la cosecha				
Muestra	Día 4		Día 7	
	P1	P2	P1	P2
N°1	-	-		
N° 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 inocularon 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								

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 4VIRUS 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 5S-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-Sall 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-Sall 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 nº 1 del HVT. El sitio usado para la inserción fue el sitio Stul 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 flaqueantes 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 Stul 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

Grupo de vacuna	Protección de Marek	
	Inoculación con MD-5	Inoculación con
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 Stul único del fragmento clonado EcoRI nº 7 del HVT, es decir, el fragmento que contenía el sitio Stul dentro del gen US2 del HVT (como se describe en el apartado Materiales y Métodos). Las regiones flaqueantes del fragmento EcoRI nº 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 BLUOGAL PARA HERPESVIRUS RECOMBINAN-

TES. 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 Stul 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 nº 16 y nº 13, y los fragmentos EcoRI nº 6, nº 7, y nº 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 XolI en los fragmentos BamHI nº 13 y nº 16, y el fragmento EcoRI nº 9 y Sall en el fragmento EcoRI nº 6 y Stul en el fragmento EcoRI nº 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 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 BamHI 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 XhoI único en el cual puede clonarse el DNA extraño. El sitio XhoI 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 BamHI nº 16. También se determinaron aproximadamente 2092 pares de bases del fragmento adyacente BamHI 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 BamHI nº 16 - BamHI nº 13. El gen gA del HVT es el homólogo a la glicoproteína C (gC) del HSV-1. Este sitio XhoI 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 XhoI 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 EcoRI de HVT nº7 y es útil para la inserción del DNA extraño en el HVT. El plásmido 435-47.R17 contiene un sitio de restricción HindIII único en el cual puede ser clonado el DNA extraño. El sitio de restricción HindIII en el plásmido resulta de la inserción del enlazador HindIII en el sitio Stul que ocurre naturalmente del fragmento EcoRI nº7. El sitio HindIII 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 Stul indicó que este fragmento contiene marcos de lectura abiertos que codifican US10, US2 y US3. El sitio Stul 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 EcoRI 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 XhoI único en el cual puede ser clonado el DNA extraño. El sitio XhoI 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 8S-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 XhoI único del fragmento EcoRI nº 9 clonado (como se describió en el apartado Materiales y Métodos). El sitio XhoI en el fragmento EcoRI nº 9 del genoma del HVT es el mismo sitio que el sitio XhoI en el fragmento BamHI nº 10 usado para la construcción de herpesvirus recombinante de pavos descrito en los Ejemplos 16 a 19. Las regiones flanqueantes del fragmento EcoRI 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 TRANSFECCION 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 9S-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 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 10Vacunas 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 10AS-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 usó 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 BamHI y HindIII, 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 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 HindIII, 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	$2,2 \times 10^3$	24/24 (100%)
1	S-HVT-046	$2,2 \times 10^3$	20/20 (100%)
1	S-HVT-047	$2,2 \times 10^3$	24/24 (100%)
1	Controles		7/44 (16%)
1	HVT/SB-1		24/25 (96%)
2	S-HVT-062	$7,5 \times 10^2$	32/32 (100%)
2	S-HVT-062	$1,5 \times 10^1$	22/22 (100%)
2	Controles		0/20 (0%)
2	EVT ^c	$7,5 \times 10^2$	17/21 (81%)
2	HVT/SB-1 ^c	$7,5 \times 10^2$	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).

Ejemplo 11A

S-HVT-007

- 10 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.
- 15 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.

Ejemplo 11B

S-HVT-048

- 20 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.
- 25 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.

Ejemplo 11C

S-HVT-049

- 30 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.
- 35 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

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 región única corta en la misma orientación transcripcional que el gen US2.

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 11ES-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
^a 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).

Ejemplo 12A

S-HVT-051

- 10 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.

- 15 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

S-HVT-052

- 20 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.

- 25 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.

Ejemplo 12C

S-HVT-104

- 30 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 insertados en la región BamHI nº 16 en la misma orientación transcripcional que el gen UL43.

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 TRANSFECCION DE DNA PARA GENERAR VIRUS RECOMBINANTES en células fibroblastos de embrión de pollo primarios (CEF).

35 ENSAYO DE HVT RECOMBINANTES QUE EXPRESAN ANTÍGENOS DEL ILTV

- 40 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.

- 45 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.

TABLA 9. EFICACIA DE LOS VIRUS HVT/ILTV RECOMBINANTES CONTRA LA INOCULACIÓN DE VIRUS VIRULENTE 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

5 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.

10 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.

15 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.

20 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

25 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.

30 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.

35 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

40 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

- 5 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

S-HVT-123

- 10 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 nº 9 (BamHI nº 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 StulI 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.

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 Ascl.

- 20 Ejemplo 16B

S-HVT-138

- 25 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 PaeI en el fragmento EcoRI nº 9 (BamHI nº 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 nº 9 (BamHI nº 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.

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

- 30 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.

- 35 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

S-HVT-139

- 40 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 PaeI en el fragmento EcoRI nº 9 (BamHI nº 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 nº 9 (BamHI nº 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 StulI 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 endógenos. El S-HVT-139 es útil como vacuna en aves en contra la enfermedad de Marek y la laringotraqueitis infecciosa.

- 50 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 PstI en el fragmento EcoRI nº 9 (BamHI nº 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 nº 9 (BamHI nº 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 17AHVT-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 PstI en el fragmento EcoRI nº 9 (BamHI nº 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 nº 9 (BamHI nº 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 17BHVT-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 PstI en el fragmento EcoRI nº 9 (BamHI nº 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 nº 9 (BamHI nº 10) del genoma del HVT (Figura 14; SEQ ID NO: 48, 50). El S-HVT-137 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 17CHVT-143

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 PstI 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 promo-

tor 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.

- 5 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

- 10 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 PstI 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 pro-
15 motores del MDV endógenos. El S-HVT-128 es útil como vacuna en pollos contra la enfermedad de Newcastle y la enfermedad de Marek.

- 20 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 limi-
tante 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 aun sitio NotI en el fragmento EcoRI nº 9 (BamHI nº 10) en la región larga única del HVT. Se seleccionó un virus recombinan-
te S-HVT-128 que fue lacZ negativo.

- 25 Ejemplo 18B

HVT-136

- 30 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 PstI 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.

- 35 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

Vacuna de virus HVT/MDV recombinantes

- 40 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
45 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. La protección multivalente contra la enfermedad de Marek, la laringotraqueitis infecciosa, la enfermedad bursal infecciosa, la enfermedad de Newcastle u otro agente patógeno de
50 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 PstI 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).

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 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 METODO 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 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 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 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 deletarse (suprimirse) mediante recombinación de homólogos.

En una realización alternativa, los cósmidos que contienen genes de antígenos protectores del MDV del fragmento largo único (gB y gC del MDV) se combinan con cósmidos que contienen 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 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 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, 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 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.

Ejemplo 20

El HVT recombinante que expresa un factor de crecimiento mielomonocítico de pollo (cMGF) o un interferón de 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 PaeI 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 Ascl, 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 PaeI 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 Ascl, 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 5, 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 PaeI 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 GENERACION 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 Ascl, 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 PaeI 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 Stul único convertido en un sitio HindIII en el gen US2 del HVT. El gene 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 Stul y contiene además los genes gA, gD y gB del MDV y los genes HN y F del NDV insertados en el sitio Stul 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 bergdorferi*, 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 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 inhibidoras 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 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 introducción de un vector que expresa un gen que codifica RNA anti-sentido 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 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 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

- 5 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.
4. D. Hanahan, Molecular Biology 166, 557-580, 1983.
5. P.J. Hudson et al., Nucleic Acid Research 14, 5001-5012, 1986.
- 10 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.
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.
- 15 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.
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.
- 20 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.
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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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. Moccarski 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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).
59. M.J. Sekellick et al., Journal of Interferon Research 14: 71-79 (1994).
- 25 60. G.L. Smith, Journal of General Virology 74, 1725-1740 (1993).
61. B. Scgumacher, et al., Virology 203, 144-148 (1994).

LISTADO 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
- (C) CIUDAD: New York
- (D) ESTADO: New York
- 15 (E) PAIS: EE.UU. DE AMÉRICA
- (F) CÓDIGO POSTAL: 10036
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR
- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
- 20 (B) ORDENADOR: IBM, PC COMPATIBLE
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAMA: PatentIn Release nº 1.0 Versión nº 1.25
- (vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD
- 25 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 09-agosto-1995
- (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) AGENTE/INFORMACIÓN DEL AGENTE
- 30 (A) NOMBRE: White, John P.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 28.678
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES
- 35 (A) TELÉFONO: (212) 278-0400
- (B) TELEFAX: (212) 391-0526
- (C) TÉLEX: 422523

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

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

GGATACGATC GGTCTGACCC GGGGGAGTCA CCCGGGGACA GCCGTCAAGG CCTTGTTC	60
GGATAGAACT CCTCCTTCTA CAACGCTATC ATTGATGGTC AGTAGAGATC AGACAAACGA	120
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
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	218
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
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
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 Ser 95 100 105 110	458
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
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
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
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
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
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
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	938
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

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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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

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

```

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
CTACCAAAGC CCAAGCCAAA ACCCAATGCT CCAACACAGA GACCCCTGG TCGGCTGGGG 3122
CTGGATCAGG ACCGTCTCTG ATGAGGACCT TGAGTGAGGC TCCTGGGAGT CTCCCGACAA 3182
CACCCGCGCA GGTGTGGACA CAATTCGGCC TTACAACATC CCAAATTGGA TCCGTTCGCG 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

(D) 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

```

180										185					190				
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				
Thr	Ile	Thr	Leu	Phe	Ser	Ala	Asn	Ile	Asp	Ala	Ile	Thr	Ser	Leu	Ser				
225										230					235				
Val	Gly	Gly	Glu	Leu	Val	Phe	Arg	Thr	Ser	Val	His	Gly	Leu	Val	Leu				
245										250					255				
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				
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				
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				
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				
Glu	Tyr	Gly	Arg	Phe	Asp	Pro	Gly	Ala	Met	Asn	Tyr	Thr	Lys	Leu	Ile				
385										390					395				
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				
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				
Ala	Ala	Pro	Leu	Ala	His	Ala	Ile	Gly	Glu	Gly	Val	Asp	Tyr	Leu	Leu				
465										470					475				
Gly	Asp	Glu	Ala	Gln	Ala	Ala	Ser	Gly	Thr	Ala	Arg	Ala	Ala	Ser	Gly				
485										490					495				
Lys	Ala	Arg	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Ile	Arg	Gln	Leu	Thr	Leu	Ala	Ala				
500										505					510				
Asp	Lys	Gly	Tyr	Glu	Val	Val	Ala	Asn	Leu	Phe	Gln	Val	Pro	Gln	Asn				
515										520					525				
Pro	Val	Val	Asp	Gly	Ile	Leu	Ala	Ser	Pro	Gly	Val	Leu	Arg	Gly	Ala				

530	535	540
His Asn Leu Asp Cys Val Leu Arg Glu Gly Ala Thr Leu Phe Pro Val		
545	550	555
Val Ile Thr Thr Val Glu Asp Ala Met Thr Pro Lys Ala Leu Asn Ser		
	565	570
Lys Met Phe Ala Val Ile Glu Gly Val Arg Glu Asp Leu Gln Pro Pro		
	580	585
Ser Gln Arg Gly Ser Phe Ile Arg Thr Leu Ser Gly His Arg Val Tyr		
	595	600
Gly Tyr Ala Pro Asp Gly Val Leu Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asp Tyr		
	610	615
Thr Val Val Pro Ile Asp Asp Val Trp Asp Asp Ser Ile Met Leu Ser		
	625	630
Lys Asp Pro Ile Pro Pro Ile Val Gly Asn Ser Gly Asn Leu Ala Ile		
	645	650
Ala Tyr Met Asp Val Phe Arg Pro Lys Val Pro Ile His Val Ala Met		
	660	665
Thr Gly Ala Leu Asn Ala Cys Gly Glu Ile Glu Lys Val Ser Phe Arg		
	675	680
Ser Thr Lys Leu Ala Thr Ala His Arg Leu Gly Leu Lys Leu Ala Gly		
	690	695
Pro Gly Ala Phe Asp Val Asn Thr Gly Pro Asn Trp Ala Thr Phe Ile		
	705	710
Lys Arg Phe Pro His Asn Pro Arg Asp Trp Asp Arg Leu Pro Tyr Leu		
	725	730
Asn Leu Pro Tyr Leu Pro Pro Asn Ala Gly Arg Gln Tyr His Leu Ala		
	740	745
Met Ala Ala Ser Glu Phe Lys Arg Pro Arg Thr Arg Glu Cys Arg Gln		
	755	760
Ser Asn Gly Ser Ser Ser Gln Arg Gly Pro Thr Ile Pro Ile Cys Thr		
	770	775
Gln Cys Val His Val Ala Gly Arg Glu Trp Asp Cys Asp		
	785	790
		795

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 5426 pares de bases
 - (B) TIPO: Ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: doble
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- 15 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (ix) ASPECTO:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 (B) LOCALIZACIÓN: 73..1182
 (D) OTRA INFORMACIÓN:/ producto = "HVT UL42"

- 5 (ix) ASPECTO:
 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 (B) LOCALIZACIÓN: 1306..2574
 (D) OTRA INFORMACIÓN:/ producto = "HVT UL43"

- 10 (ix) ASPECTO:
 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 (B) LOCALIZACIÓN: 2790..4259
 (D) OTRA INFORMACIÓN:/ producto = "gA de HVT"

- 15 (ix) ASPECTO:
 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 (B) LOCALIZACIÓN: 4701..5339
 (D) OTRA INFORMACIÓN:/ producto = "HVT UL45"

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

```

GGATCCGAGC TTCTACTATA CAACGCGGAC GATAATTTTG TCCACCCCAT CGGTGTTTCA 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

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

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

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

GAC CGT GAT TCC TTC AGC GAA TAT GAA TGG CAT GGG CCA ACT GCG ATG 348
Asp Arg Asp Ser Phe Ser Glu Tyr Glu Trp His Gly Pro Thr Ala Met
      80                      85                      90

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

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

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

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

```

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

CAT	CGA	CAA	AAT	GGC	AAG	AAG	TGT	ATA	CGG	TGT	ATA	GTG	ATC	AGT	GTA	1476
His	Arg	Gln	Asn	Gly	Lys	Lys	Cys	Ile	Arg	Cys	Ile	Val	Ile	Ser	Val	
		45						50					55			
TGT	TCC	TTA	GTG	TGC	ATC	GCT	GCA	CAT	TTA	GCT	GTT	ACC	GTG	TCG	GGA	1524
Cys	Ser	Leu	Val	Cys	Ile	Ala	Ala	His	Leu	Ala	Val	Thr	Val	Ser	Gly	
		60					65					70				
GTG	GCA	TTA	ATT	CCG	CTT	ATC	GAT	CAA	AAC	AGA	GCT	TAC	GGA	AAC	TGT	1572
Val	Ala	Leu	Ile	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Asn	Arg	Ala	Tyr	Gly	Asn	Cys	
	75					80					85					
ACG	GTA	TGT	GTA	ATT	GCC	GGA	TTC	ATC	GCT	ACG	TTT	GCT	GCA	CGA	CTT	1620
Thr	Val	Cys	Val	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Ala	Thr	Phe	Ala	Ala	Arg	Leu	
	90				95					100					105	
ACG	ATA	AGA	CTT	TCG	GAA	ACG	CTT	ATG	CTA	GTG	GGC	AAG	CCG	GCG	CAG	1668
Thr	Ile	Arg	Leu	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Leu	Val	Gly	Lys	Pro	Ala	Gln	
			110						115					120		
TTT	ATA	TTT	GCT	ATA	ATC	GCT	TCC	GTT	GCG	GAA	ACA	CTG	ATC	AAT	AAC	1716
Phe	Ile	Phe	Ile	Ile	Ile	Ala	Ser	Val	Ala	Glu	Thr	Leu	Ile	Asn	Asn	
		125					130						135			
GAG	GCG	CTT	GCC	ATC	AGT	AAT	ACT	ACT	TAC	AAA	ACT	GCA	TTG	CGA	ATA	1764
Glu	Ala	Leu	Ala	Ile	Ser	Asn	Thr	Thr	Tyr	Lys	Thr	Ala	Leu	Arg	Ile	
		140					145					150				
ATC	GAA	GTA	ACA	TCT	TTG	GCG	TGT	TTT	GTT	ATG	CTC	GGG	GCA	ATA	ATT	1812
Ile	Glu	Val	Thr	Ser	Leu	Ala	Cys	Phe	Val	Met	Leu	Gly	Ala	Ile	Ile	
	155					160					165					
ACA	TCC	CAC	AAC	TAT	GTC	TGC	ATT	TCA	ACG	GCA	GGG	GAC	TTG	ACT	TGG	1860
Thr	Ser	His	Asn	Tyr	Val	Cys	Ile	Ser	Thr	Ala	Gly	Asp	Leu	Thr	Trp	
	170				175					180					185	
AAG	GGC	GGG	ATT	TTT	CAT	GCT	TAC	CAC	GGA	ACA	TTA	CTC	GGT	ATA	ACA	1908
Lys	Gly	Gly	Ile	Phe	His	Ala	Tyr	His	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Ile	Thr	
			190						195					200		
ATA	CCA	AAC	ATA	CAC	CCA	ATC	CCT	CTC	GCG	GGG	TTT	CTT	GCA	GTC	TAT	1956
Ile	Pro	Asn	Ile	His	Pro	Ile	Pro	Leu	Ala	Gly	Phe	Leu	Ala	Val	Tyr	
		205						210					215			
ACA	ATA	TTG	GCT	ATA	AAT	ATC	GCT	AGA	GAT	GCA	AGC	GCT	ACA	TTA	TTA	2004
Thr	Ile	Leu	Ala	Ile	Asn	Ile	Ala	Arg	Asp	Ala	Ser	Ala	Thr	Leu	Leu	
		220					225					230				
TCC	ACT	TGC	TAT	TAT	CGC	AAT	TGC	CGC	GAG	AGG	ACT	ATA	CTT	CGC	CCT	2052
Ser	Thr	Cys	Tyr	Tyr	Arg	Asn	Cys	Arg	Glu	Arg	Thr	Ile	Leu	Arg	Pro	
		235				240					245					
TCT	CGT	CTC	GGA	CAT	GGT	TAC	ACA	ATC	CCT	TCT	CCC	GGT	GCC	GAT	ATG	2100
Ser	Arg	Leu	Gly	His	Gly	Tyr	Thr	Ile	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	Asp	Met	
	250				255					260					265	
CTT	TAT	GAA	GAA	GAC	GTA	TAT	AGT	TTT	GAC	GCA	GCT	AAA	GGC	CAT	TAT	2148
Leu	Tyr	Glu	Glu	Asp	Val	Tyr	Ser	Phe	Asp	Ala	Ala	Lys	Gly	His	Tyr	
				270					275					280		
TCG	TCA	ATA	TTT	CTA	TGT	TAT	GCC	ATG	GGG	CTT	ACA	ACA	CCG	CTG	ATT	2196
Ser	Ser	Ile	Phe	Leu	Cys	Tyr	Ala	Met	Gly	Leu	Thr	Thr	Pro	Leu	Ile	
		285						290					295			
ATT	GCG	CTC	CAT	AAA	TAT	ATG	GCG	GGC	ATT	AAA	AAT	TCG	TCA	GAT	TGG	2244
Ile	Ala	Leu	His	Lys	Tyr	Met	Ala	Gly	Ile	Lys	Asn	Ser	Ser	Asp	Trp	
		300					305					310				

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

CTT ATA GTC GAC CCC CCT TCA GAC GAT GAA TGG TCC AAC TTC GCT CTT Leu Ile Val Asp 125 Pro Pro Ser Asp Asp Glu Trp Ser Asn Phe Ala Leu 135	3197
GAC GTC ACG TTC AAT CCA ATC GAA TAC CAC GCC AAC GAA AAG AAT GTA Asp Val Thr 140 Asn Pro Ile Glu Tyr His Ala Asn Glu Lys Asn Val 150	3245
GAG GTT GCC CGA GTG GCC GGT CTA TAC GGA GTA CCG GGG TCG GAT TAT Glu Val Ala Arg Val Ala Gly Leu Tyr Gly Val Pro Gly Ser Asp Tyr 165	3293
GCA TAC CCT AGG AAA TCG GAA TTA ATA TCC TCC ATT CGA CGG GAT CCC Ala Tyr Pro Arg Lys Ser Glu Leu Ile Ser Ser Ile Arg Arg Asp Pro 180	3341
CAG GGT TCT TTC TGG ACT AGT CCT ACA CCC CGT GGA AAT AAA TAT TTC Gln Gly Ser Phe Trp Thr Ser Pro Thr Pro Arg Gly Asn Lys Tyr Phe 200	3389
ATA TGG ATT AAT AAA ACA ATG CAC ACC ATG GGC GTG GAA GTT AGA AAT Ile Trp Ile Asn 205 Lys Thr Met His Thr Met Gly Val Glu Val Arg Asn 215	3437
GTC GAC TAC AAA GAC AAC GGC TAC TTT CAA GTG ATA CTG CGT GAT AGA Val Asp Tyr 220 Lys Asp Asn Gly Tyr Phe Gln Val Ile Leu Arg Asp Arg 230	3485
TTT AAT CGC CCA TTG GTA GAA AAA CAT ATT TAC ATG CGT GTG TGC CAA Phe Asn Arg Pro Leu Val Glu Lys His Ile Tyr Met Arg Val Cys Gln 245	3533
CGA CCC GCA TCC GTG GAT GTA TTG GCC CCT CCA GTT CTC AGC GGA GAA Arg Pro Ala Ser Val Asp Val Leu Ala Pro Pro Val Leu Ser Gly Glu 260	3581
AAC TAC AAA GCA TCT TGC ATC GTT AGA CAT TTT TAT CCC CCG GGA TCT Asn Tyr Lys Ala Ser Cys 270 Ile Val Arg His Phe Tyr Pro Pro Gly Ser 280	3629
GTC TAC GTA TCT TGG AGA CGT AAC GGA AAC ATT GCC ACA CCC CGC AAG Val Tyr Val Ser Trp Arg Arg Asn Gly Asn Ile Ala Thr Pro Arg Lys 295	3677
GAC CGT GAC GGG AGT TTT TGG TGG TTC GAA TCT GGC CGC GGG GCC ACA Asp Arg Asp 300 Gly Ser Phe Trp Trp Phe Glu Ser Gly Arg Gly Ala Thr 310	3725
CTA GTA TCC ACA ATA ACC CTC GGA AAC TCT GGA CTC GAA TCT CCT CCA Leu Val Ser Thr Ile Thr Leu Gly Asn Ser Gly Leu Glu Ser Pro Pro 325	3773
AAG GTT TCC TGC TTG GTA GCG TGG AGG CAA GGC GAT ATG ATA AGC ACA Lys Val Ser Cys Leu Val Ala Trp Arg Gln Gly Asp Met Ile Ser Thr 340	3821
TCG AAT GCT ACA GCT GTA CCG ACG GTA TAT TAT CAC CCC CGT ATC TCT Ser Asn Ala Thr Ala Val Pro Thr Val Tyr Tyr His Pro Arg Ile Ser 360	3869
CTG GCA TTT AAA GAT GGG TAT GCA ATA TGT ACT ATA GAA TGT GTT CCC Leu Ala Phe Lys Asp Gly Tyr Ala Ile Cys Thr Ile Glu Cys Val Pro 375	3917
TCT GGG ATT ACT GTG AGG TGG TTA GTT CAT GAT GAA CCC CAG CCT AAC Ser Gly Ile Thr Val Arg Trp Leu Val His Asp Glu Pro Gln Pro Asn 390	3965

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

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 369 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(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
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
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
Phe Ser Glu Tyr Glu Trp His Gly Pro Thr Ala Met Phe Leu Ala Leu 85 90 95
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

115	120	125
His Leu Ile Gln Ala Val Thr Tyr Met Thr Asp Gly Gly Ser Val Ser		
130	135	140
Asn Thr Ile Ile Lys Tyr Glu Leu Trp Asn Ala Ser Thr Ile Phe Pro		
145	150	155
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
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
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
Phe Cys Val Ala Leu Glu Asp Thr Ser Ala Phe Arg Asn Ile Val Asn		
	260	265
		270
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
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
Glu Tyr Phe Pro Thr Val Ser Gln Ala Thr Ser Lys Lys Arg Lys Gln		
	340	345
		350
Ser Pro Pro Pro Ile Glu Arg Glu Arg Lys Thr Thr Arg Ala Asp Thr		
	355	360
		365

Gln

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 422 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(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
 Tyr Pro Gln Cys Thr Ala Gly Arg Gly His Arg Gln Asn Gly Lys Lys
 35 40 45
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 Thr Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Ala Met Ser Cys Phe Thr Cys Ile
 370 375 380

```

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

Val Leu Leu Pro Leu Ser
                               420

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 489 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (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

```

His Ile Tyr Met Arg Val Cys Gln Arg Pro Ala Ser Val Asp Val Leu
 245 250 255
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 Leu Cys Phe Tyr Leu Pro Gly Arg Asn
 485

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 212 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (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

```

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
   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
   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
  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
  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
  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
  210

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1506 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

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

(iii) HIPOTÉTICA: NO

15 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(ix) ASPECTO:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..1506

20 (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

```

35	40	45	
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
GAT CGC GAT GGA AGT TTT TGG TGG TTC GAA TCT GGT AGA GGA GCT ACG			960

Asp 305	Arg	Asp	Gly	Ser	Phe 310	Trp	Trp	Phe	Glu	Ser 315	Gly	Arg	Gly	Ala	Thr 320	
TTG	GTT	TCT	ACA	ATA	ACA	TTG	GGA	AAT	TCA	GGA	ATT	GAT	TTC	CCC	CCC	1008
Leu	Val	Ser	Thr	Ile 325	Thr	Leu	Gly	Asn	Ser 330	Gly	Ile	Asp	Phe	Pro 335	Pro	
AAA	ATA	TCT	TGT	CTG	GTT	GCC	TGG	AAG	CAG	GGT	GAT	ATG	ATC	AGC	ACG	1056
Lys	Ile	Ser	Cys	Leu 340	Val	Ala	Trp	Lys 345	Gln	Gly	Asp	Met	Ile 350	Ser	Thr	
ACG	AAT	GCC	ACA	GCT	ATC	CCG	ACG	GTA	TAT	CAT	CAT	CCC	CGT	TTA	TCC	1104
Thr	Asn	Ala	Thr	Ala 355	Ile	Pro	Thr	Val 360	Tyr	His	His	Pro 365	Arg	Leu	Ser	
CTG	GCT	TTT	AAA	GAT	GGG	TAT	GCA	ATA	TGT	ACT	ATA	GAA	TGT	GTC	CCC	1152
Leu	Ala	Phe	Lys	Asp 370	Gly	Tyr 375	Ala	Ile	Cys	Thr 380	Ile	Glu	Cys	Val	Pro	
TCT	GAG	ATT	ACT	GTA	CGG	TGG	TTA	GTA	CAT	GAT	GAA	GCG	CAG	CCT	AAC	1200
Ser	Glu	Ile	Thr	Val 390	Arg	Trp	Leu	Val	His 395	Asp	Glu	Ala	Gln	Pro	Asn 400	
ACA	ACT	TAT	AAT	ACT	GTG	GTT	ACA	GGT	CTC	TGC	CGG	ACC	ATC	GAT	CGC	1248
Thr	Thr	Tyr	Asn 405	Thr	Val	Val	Thr	Gly 410	Cys	Arg	Thr	Ile 415	Asp	Arg		
CAT	AGA	AAT	CTC	CTC	AGC	CGC	ATT	CCA	GTA	TGG	GAC	AAT	TGG	ACG	AAA	1296
His	Arg	Asn 420	Leu	Leu	Ser	Arg	Ile 425	Pro	Val	Trp	Asp	Asn 430	Trp	Thr	Lys	
ACA	AAA	TAT	ACG	TGC	AGA	CTC	ATA	GGC	TAC	CCC	TTC	GAT	GAA	GAT	AAA	1344
Thr	Lys	Tyr 435	Thr	Cys	Arg	Leu 440	Ile	Gly	Tyr	Pro	Phe 445	Asp	Glu	Asp	Lys	
TTT	CAA	GAT	TCG	GAA	TAT	TAC	GAT	GCA	ACT	CCA	TCT	GCA	AGA	GGA	ACA	1392
Phe	Gln	Asp 450	Ser	Glu	Tyr 455	Tyr	Asp	Ala	Thr	Pro 460	Ser	Ala	Arg	Gly	Thr	
CCC	ATG	GTT	ATT	ACG	GTT	ACG	GCA	GTT	TTG	GGA	TTG	GCT	GTA	ATT	TTA	1440
Pro	Met	Val	Ile	Thr 470	Val	Thr	Ala	Val	Leu 475	Gly	Leu	Ala	Val	Ile	Leu 480	
GGG	ATG	GGG	ATA	ATC	ATG	ACT	GCC	CTA	TGT	TTA	TAC	AAC	TCC	ACA	CGA	1488
Gly	Met	Gly	Ile 485	Ile	Met	Thr	Ala	Leu 490	Cys	Leu	Tyr	Asn	Ser 495	Thr	Arg	
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:

- 5 (A) LONGITUD: 501 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

10

(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

15

20					25					30					
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				
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	
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			
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
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		
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				
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	
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			
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	
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			
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

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:10:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1734 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: doble
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- 15 (ix) ASPECTO:
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1..1734
- 20 (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	
1 5 10 15	
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	
20 25 30	
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	

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		
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			
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					
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	
AAT	TTT	ATC	CCG	GCG	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			
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				
GGT	GTG	CTC	CGG	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	
225					230					235					240	
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		
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				
ACA	ACA	TTA	TTC	GGG	GAC	TGG	GTG	GCC	AAC	TAC	CCA	GGA	GTA	GGG	GGT	912
Thr	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Trp	Val	Ala	Asn	Tyr	Pro	Gly	Val	Gly	Gly	
		290				295					300					
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		
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			

CGA	ATG	GCC	AAG	TCT	TCG	TAT	AAG	CCT	GGA	CGG	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				
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					
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		
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			
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					
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	
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			
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	Ser	Ile	Lys	Ala	Ala	Tyr	Thr	Thr	
			515				520					525				
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	
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		
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:

Met Asp Arg Ala Val Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Asp Glu Arg Glu
 1 5 10 15
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 Lys Pro Asn Thr Pro Ser Asp Thr Val Gln Glu Gly Lys Tyr Val Ile
 325 330 335

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:

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

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
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
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
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
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
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 Leu Thr Pro Leu Gly 85 90 95	288
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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

CCT ATT CTA TAC GAC TCA CAG ACT CAA CTC TTG GGT ATA CAG GTA ACT Pro Ile Leu Tyr Asp Ser Gln Thr 280 Gln Leu Leu Gly Ile Gln Val Thr 275 285	864
CTA CCT TCA GTC GGG AAC CTA AAT AAT ATG CGT GCC ACC TAC TTG GAA Leu Pro Ser Val Gly Asn Leu Asn Asn Met Arg Ala Thr Tyr Leu Glu 290 295 300	912
ACC TTA TCC GTA AGC ACA ACC AGG GGA TTT GCC TCG GCA CTT GTC CCA Thr Leu Ser Val Ser Thr Thr Arg Gly Phe Ala Ser Ala Leu Val Pro 305 310 315 320	960
AAA GTG GTG ACA CGG GTC GGT TCT GTG ATA GAA GAA CTT GAC ACC TCA Lys Val Val Thr Arg Val Gly Ser Val Ile Glu Glu Leu Asp Thr Ser 325 330 335	1008
TAC TGT ATA GAA ACT GAC TTA GAT TTA TAT TGT ACA AGA ATA GTA ACG Tyr Cys Ile Glu Thr Asp Leu Asp Leu Tyr Cys Thr Arg Ile Val Thr 340 345 350	1056
TTC CCT ATG TCC CCT GGT ATT TAC TCC TGC TTG AGC GGC AAT ACA TCG Phe Pro Met Ser Pro Gly Ile Tyr 360 Ser Cys Leu Ser Gly Asn Thr Ser 355 365	1104
GCC TGT ATG TAC TCA AAG ACC GAA GGC GCA CTT ACT ACA CCA TAT ATG Ala Cys Met Tyr Ser Lys Thr Glu Gly Ala Leu Thr Thr Pro Tyr Met 370 375 380	1152
ACT ATC AAA GGC TCA GTC ATC GCT AAC TGC AAG ATG ACA ACA TGT AGA Thr Ile Lys Gly Ser Val Ile Ala Asn Cys Lys Met Thr Thr Cys Arg 385 390 395 400	1200
TGT GTA AAC CCC CCG GGT ATC ATA TCG CAA AAC TAT GGA GAA GCC GTG Cys Val Asn Pro Pro Gly Ile Ile Ser Gln Asn Tyr Gly Glu Ala Val 405 410 415	1248
TCT CTA ATA GAT AAA CAA TCA TGC AAT GTT TTA TCC TTA GGC GGG ATA Ser Leu Ile Asp Lys Gln Ser Cys Asn Val Leu Ser Leu Gly Gly Ile 420 425 430	1296
ACT TTA AGG CTC AGT GGG GAA TTC GAT GTA ACT TAT CAG AAG AAT ATC Thr Leu Arg Leu Ser Gly Glu Phe Asp Val Thr Tyr Gln Lys Asn Ile 435 440 445	1344
TCA ATA CAA GAT TCT CAA GTA ATA ATA ACA GGC AAT CTT GAT ATC TCA Ser Ile Gln Asp Ser Gln Val Ile Ile Thr Gly Asn Leu Asp Ile Ser 450 455 460	1392
ACT GAG CTT GGG AAT GTC AAC AAC TCG ATC AGT AAT GCC TTG AAT AAG Thr Glu Leu Gly Asn Val Asn Asn Ser Ile Ser Asn Ala Leu Asn Lys 465 470 475 480	1440
TTA GAG GAA AGC AAC AGA AAA CTA GAC AAA GTC AAT GTC AAA CTG ACC Leu Glu Glu Ser Asn Arg Lys Leu Asp Lys Val Asn Val Lys Leu Thr 485 490 495	1488
AGC ACA TCT GCT CTC ATT ACC TAT ATC GTT TTG ACT ATC ATA TCT CTT Ser Thr Ser Ala Leu Ile Thr Tyr Ile Val Leu Thr Ile Ile Ser Leu 500 505 510	1536
GTT TTT GGT ATA CTT AGC CTG ATT CTA GCA TGC TAC CTA ATG TAC AAG Val Phe Gly Ile Leu Ser Leu Ile Leu Ala Cys Tyr Leu Met Tyr Lys 515 520 525	1584
CAA AAG GCG CAA CAA AAG ACC TTA TTA TGG CTT GGG AAT AAT ACC CTA Gln Lys Ala Gln Gln Lys Thr Leu Leu Trp Leu Gly Asn Asn Thr Leu 530 535 540	1632
GAT CAG ATG AGA GCC ACT ACA AAA ATG TGA Asp Gln Met Arg Ala Thr Thr Lys Met 545 550	1662

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:13:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 553 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

5

(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
 Leu Pro Ser Val Gly Asn Leu Asn Asn Met Arg Ala Thr Tyr Leu Glu
 290 295 300
 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
 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
 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
 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
 Thr Leu Arg Leu Ser Gly Glu Phe Asp Val Thr Tyr Gln Lys Asn Ile
 435 440 445
 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
 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
 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:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 3469 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: doble
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(ix) ASPECTO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..3489

5

(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			
AGT	GCT	GCT	TTG	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			
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				
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					
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	
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		
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			
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				
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					
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	
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			
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			
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				
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					
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	

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

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

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

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
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
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
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
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
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 Phe Asp Asn Asp Val Val 1140 1145 1150	3456
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:

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

Leu Thr Val Ser Val Ala Lys Tyr Pro Thr Phe Lys Ser Phe Gln Cys
 145 150 155 160
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 Thr Asp Ser Ala Val Ser Tyr Asn Tyr Leu Ala Asp Ala Gly Leu Ala
 450 455 460
 Ile Leu Asp Thr Ser Gly Ser Ile Asp Ile Phe Val Val Gln Gly Glu
 465 470 475 480
 Tyr Gly Leu Thr Tyr Tyr Lys Val Asn Pro Cys Glu Asp Val Asn Gln
 485 490 495

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

5 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(ix) ASPECTO:

10 (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				

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

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		
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			
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					
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	
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			
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				
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:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 615 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:17:

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		
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					
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
				85				90						95	

Phe Cys Thr Ala His Cys Asn Phe Thr Ser Tyr Ile Val Phe Val Thr
 100 105 110
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 Thr Leu Gly Lys Cys Val Asp Tyr Asn Val Tyr Gly Arg Thr Gly Gln
 435 440 445

Gly Phe Ile Thr Asn Val Thr Asp Leu Ala Thr Ser His Asn Tyr Leu
 450 455 460
 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
 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
 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
 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
 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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:18:

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

TATAATTATC TAGCAGACGC AGGTATGGCT ATTTAGATA CATCTGGTTC CATAGACATC	60
TTTGTTCAC AAGGTGAATA TGGCCTTACT TATTATAAGG CTAACCCTTG CGAAGACGTC	120
AACCAGCAGT TTGTAGTTTC TGGTGGTAAA TTAGTAGGTA TTCTTACTTC ACGTAATGAG	180
ACTGGTTCTC AGCTTCTTGA GAACCAGTTT TACATTAAAA TCACTAATGG AACACGTCGT	240
TCTAGACGTT CTATTACTGC AAATGTHACA AATYGCCCTT ATGTTAGCTA TGGCAAGTTT	300
TGTCTAAAC CTGATGGYTC AGYTTCTGYT ATAGCACCAC NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	360
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN	420
NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNT	480
GTTTGTGGCA ATTCTCTGGA TTGTAGAAAG TTGYTTCAAC AATATGGGCC TGTTTGBGAC	540

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 705 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

10

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:19:

Tyr Asn Tyr Leu Ala Asp Ala Gly Met Ala Ile Leu Asp Thr Ser Gly
 1 5 10 15
 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
 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
 65 70 75 80
 Ser Arg Arg Ser Ile Thr Ala Asn Val Thr Asn Xaa Pro Tyr Val Ser
 85 90 95
 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 Xaa
 115 120 125
 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
 145 150 155 160
 Val Cys Gly Asn Ser Leu Asp Cys Arg Lys Leu Xaa Gln Gln Tyr Gly
 165 170 175
 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
 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
 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
 260 265 270
 Leu Ala Cys Ala Arg Glu Tyr Asn Gly Leu Leu Xaa Xaa Xaa Pro Ile
 275 280 285
 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
 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
 340 345 350

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 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:

- (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 36

(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:

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:

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
 (C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

5 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

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

10 ACTCGGGCAG CGTTGGGTCC TGGGACTCTA GAGGATCGAT CCCCTATGGC GATCATC 57

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:24:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 99 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

25 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

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

GCGCCACGT GGCCTGGTAC AATTCGAGCT CGCCCGGGGA TCCTCTAGAG TCGACTCTAG 60
AGGATCGATC CTCTAGAGTC GCGGGGACGA GCCCGCGAT 99

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35 (A) LONGITUD: 57 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

40 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

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

TCCACAGGAC CTGCAGCGAC CCGCTTAACA GCGTCAACAG CGTGCCGCAG ATCGGGG 57

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:26:

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 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

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

GTTGATCCCG GGAGATGGGG GAGGCTAACT GAAAC 35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:27:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 103 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

10

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

15

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

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

GCTCATGGTG GCGCCCGGGC GGTTCACGA GGGCCAGTAC CGGCGCCTGG TGTCCGTCGA 60
CCTGCAGGTC GACTCTAGAG GATCCCGGG CGAGCTCGAA TTC 103

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 66 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

30

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

35

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

GAATTCGAGC TCGCCCGGGG ATCCTCTAGA GTCGACGTCT GGGGCGCGGG GGTGGTGCTC 60
TTCGAG 66

40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 66 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

50

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(ix) ASPECTO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 16..66

55

(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

CAA CGT CGT GAC TGG 66
 Gln Arg Arg Asp Trp
 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:30:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 17 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (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:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 132 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
- 25 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (ix) ASPECTO:
 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 (B) LOCALIZACIÓN: 1..93
- 30 (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 SEQ ID NO:32:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 31 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:32:

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:33:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 66 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: doble
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

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

AACGAGGGCC AGTACCGGCG CCTGGTGTCC GTCGACTCTA GAGGATCCCC GGGCGAGCTC 60
 GAATTC 66

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:34:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 65 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:34:

35 CAGGTCGAAG CTTGGGCGCT GCCTATGTAG TGAAATCTAT ACTGGGATTT ATCATAACTA 60
 GTTTA 65

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:35:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 65 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

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

AATAATCTAT CACTTTGTCA TGGAGATGCC CAAGCTTCGA CGACTCCCTT GGCCATGATG 60
 AATGG 65

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 65 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:36:

TATACCAGCT ACGGCGCTAG CATTATGGT ATCCCGTGAT TGCTCGATGC TTTCCTTCTG 60
 AATTC 65

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 65 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:37:

AAGCTTGGCC TCGTCGTAA TTAACCCAAT TCGAGCTCGC CCAGCTTGGG CTGCAGGTGG 60
 GGAAC 65

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:38:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 65 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:38:

TGTTTCAGTT AGCCTCCCC ATCTCCCGAC TCTAGAGGAT CTCGACATAG CGAATACATT 60
 TATGG 65

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (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

5 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

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

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

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 60 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:40:

25 GTCGACGTCT GGGGCGCGGG GGTGGTGCTC TTCGAGACGC TGCCTACCCC AAGACGATCG 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:41:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 60 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

40 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

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

AGCTCAACAA TGAAGTGGGC AACGTGGATC GATCCCGTCG TTTTACAACG TCGTGACTGG 60

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 120 pares de bases

50 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

55 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

60 (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:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 60 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) TIPO DE CADENA: doble
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- 15 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:43:

ACACAGTCAC ACTCATGGGG GCCGAAGGCA GAATTCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC 60

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 44:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 60 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 25 (C) TIPO DE CADENA: doble
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- 30 (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:44:

35 AACCTGTGCG TGCCAGCGAG CTCGGGATCC TCTAGAGGAT CCCCGGGCCC CGCCCCCTGC 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:45:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 60 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
- 50 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:45:

TCGTCCACAC GGAGCGCGGC TGCCGACACG GATCCCGGTT GGCGCCCTCC AGGTGCAGGA 60

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:46:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 60 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 60 (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:46:

AACCCCCCCC CCCCCCCCCC CCCCCCCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:47:

(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:47:

TGTCATGCCA TCCGTAAGAT GCTTTTCTGT GACTGGTGAG TCGGATCCTC TAGAGTCGAC 60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:48:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2681 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: 146..481

(ix) ASPECTO:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: complemento (602..1402)

(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	GACCCTGCAC	60
TTGATCCTGG	TTACCCCGAC	CCAANTTTTA	AGCCGGCTGG	CGCGGTCCCT	AGATAACCCC	120
CCGCTTAAAA	CTAGCCCCAA	TATTGATGTG	CAGATATAAC	ACAGNNANCC	GATCAATGGA	180
AGACATGCTA	CGGCGGTCAT	CTCCCGAAGA	CATCACCAGAT	TCCCTAACAA	TGTGCCTGAT	240
TATGTTATCG	CGCATTTCGT	GTACCATGCG	CACCGCAGGA	AATAAATATA	GCTATATGAT	300
AGATCCAATG	AATCGTATGT	CTAATTACAC	TCCAGGCGAA	TGTATGACAG	GTATATTGCG	360
ATATATTGAC	GAACATGCTA	GAAGGTGTCC	TGATCACATA	TGTAATTTGT	ATATCACATG	420
TACACTTATG	CCGATGTATG	TGCACGGGCG	ATATTTCTAT	TGTAATTCAT	TTTTTTGKTA	480
GTAAACTACC	ACAGGCTGTC	CGGAAATCTA	AGTTAATGAA	TAAAGTAGAT	GGTTAATACT	540
CATTGCTTAG	AATTGGACTA	CTTTTAATYC	TCTTTAATGT	TCGTATTAAA	TAAAAACATC	600
TTTAATAAAC	TTCAGCCTCT	TCGCTTATTG	TAGAAATTGA	GTATTCAMAA	TCATGTTCAA	660
AGCCGTCCTC	GGAGAGTGTA	CTGCCACGG	TGGTTGGAAC	ATCACTATGT	CTACACGTCA	720
AATTTAAGCA	CGTCAGGTCT	GTCGAGGACA	AGAAATGGTT	AACTAGTGTT	TCAATTATTC	780
TTATAAACGT	TAAGCATTGT	AAGCCCCCG	GCCGTCCGCA	GCAACAATTT	ACTAGTATGC	840
CGTGGGCTCC	GGGACTATCA	CGGATGTCCA	ATTCGCACAT	GCATATAATT	TTTCTAGGGT	900
CTCTCATTTT	GAGAAATCTT	CGGGGATCCA	TCAGCAATGC	GGGCTGTAGT	CCCGATTCCC	960
GTTTCAAATG	AAGGTGCTCC	AACACGGTCT	TCAAAGCAAC	CGGCATACCA	GCAAACACAG	1020
ACTGCAACTC	CCCCTGCAA	TGATTGGTTA	TAAACAGTAA	TCTGTCTTCT	GGAAGTATAT	1080
TTGCCCCGAC	AATCCACGGC	GCCCCCAAAG	TTAAAAACCA	TCCATGTGTA	TTTGCGTCTT	1140
CTCTGTAA	AGAATATTGA	CTGGCATT	CCCGTTGACC	GCCAGATATC	CAAAGTACAG	1200
CACGATGTTG	CACGGACGAC	TTTGCACTCA	CCAGCCTTCC	TTTCCACCCC	CCCACCAACA	1260
AAATGTTTAT	CGTAGGACCC	ATATCCGTAA	TAAGGATGGG	TCTGGCAGCA	ACCCCATAGG	1320
CGCCTCGGCG	TGGTAGTTCT	CGAGGATACA	TCCAAAGAGG	TTGAGTATTC	TCTCTACACT	1380
TCTTGTTAAA	TGGAAAGTGC	ATTGCTTGT	TCTTACAATC	GGCCCGAGTC	TCGTTACACAG	1440
CGCCTCGTTC	ACACTTAAAC	CACAAATAGT	CTACAGGCTA	TATGGGAGCC	AGACTGAAAC	1500
TCACATATGA	CTAATATTCT	GGGGTGTTAG	TCACGTGTAG	CCCATTGTGT	GATATAACG	1560
ATGTTGGACG	CGTCCTTATT	CGCGGTGTAC	TTGATACTAT	GGCAGCGAGC	ATGGGATATT	1620
CATCCTCGTC	ATCGTTAACA	TCTCTACGGG	TTCAGAAATGT	TTGGCATGTC	GTCGATCCTT	1680
TGCCCATCGT	TGCAAATTAC	AAGTCCGATC	GCCATGACCG	CGATAAGCCT	GTACCATGTG	1740

```

GCATTAGGGT GACATCTCGA TCATACATTA TAAGACCAAC GTGCGAGTCT TCCAAAGACC 1800
TGCACGCCCTT CTTCTTCGGA TTGTCAACGG GTTCTTCAGA ATCTATGCCC ATATCTGGCG 1860
TTGAGACCAT TGTGCGTTTA ATGAACAATA AAGCGGCATG CCATGGAAAG GAGGGCTGCA 1920
GATCTCCATT TTCTCAGGCC ACTATCCTGG ACGCTGTAGA CGATAATTAT ACCATGAATA 1980
TAGAGGGGGT ATGTTTCCAC TGCCACTGTG ATGATAAGTT TTCTCCAGAT TGTTGGATAT 2040
CTGCATTTTC TGCTGCCGAA CAAACTTCAT CGCTATGCAA AGAGATGCGT GTGTACACGC 2100
GCCGGTGGAG TATACGGGAA ACTAAATGTT CATAGAGGTC TTTGGGCTAT ATGTTATTAA 2160
ATAAAATAAT TGACCAGTGA ACAATTTGTT TAATGTTAGT TTATTCAATG CATTGGTTGC 2220
AAATATTCAT TACTTCTCCA ATCCCAGGTC ATTCTTTAGC GAGATGATGT TATGACATTG 2280
CTGTGAAAAT TACTACAGGA TATATTTTAA AGATGCAGGA GTAACAATGT GCATAGTAGG 2340
CGTAGTTATC GCAGACGTGC AACGCTTCGC ATTTGAGTTA CCGAAGTGCC CAACAGTGCT 2400
GCGGTTATGG TTTATGCGCA CAGAATCCAT GCATGTCCTA ATTGAACCAT CCGATTTTTC 2460
TTTTAATCGC GATCGATGTT TGGGCAACTG CGTTATTTCA GATCTAAAAA ATTTACCCTY 2520
TATGACCATC ACATCTCTCT GGYTCATACC CCGCTTGGGN TAAGATATCA TGTAGATTCC 2580
GCCCCTAAGA AATTGCAAAC TAACATNATT GNCGGGTTCC ATATACAATC CCATCTTGTC 2640
CNCTCGAAAT TACAACTCG CGCAATAGAC CCCC GTACAT T 2681

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:49:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 111 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (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: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

(B) TIPO: aminoácido

(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: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

(B) TIPO: aminoácido

(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:51:

```

Met Ala Ala Ser Met Gly Tyr Ser 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: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(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							

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:53:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 37 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Cebador oligonucleotídico de DNA
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- 15 (iv) ANTI-SENTIDO: SI
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:53:

CTCGCTCGCC CATGATCATT AAGCAAGAAT TCCGTCTG 37

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:54:

- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 39 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Cebador oligonucleotídico de DNA
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- 35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:54:

CTGGTTCGGC CCATGATCAG ATGACAAACC TGCAAGATC 39

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:55:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 57 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

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

CTCGGCGTGG TAGTTCTCGA GGCCTTAATT AAGGCCCTCG AGGATACATC CAAAGAG 57

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:56:

10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 63 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

15

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

20

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

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

CGGCGTGGA GTTCTCGAGG CCTTAAGCGG CCGCTTAAGG CCCTCGAGGA TACATCCAAA 60
GAG 63

25

(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

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

40

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

CGCAGGATCC GGGGCGTCAG AGGCGGGCGA GGTG 34

45 (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

50

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

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

60

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

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

TGTAGAGATC TGGCTAAGTG CGCGTGTTGC CTG 33

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:60:

(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

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

TGTACAGATC TCACCATGGC TGTGCCTGCA AGC 33

REIVINDICACIONES

1. Un herpesvirus recombinante de pavos que comprende una secuencia de DNA extraño que en términos de la secuencia del DNA del virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV) consiste en una secuencia que codifica la glicoproteína I del virus de la laringotraqueitis infecciosa y la glicoproteína D del virus de la laringotraqueitis infecciosa dentro del fragmento EcoRI nº 9 del genoma viral del herpesvirus de pavos, en donde la secuencia de DNA extraño que codifica dichas glicoproteínas es capaz de ser expresada en una célula hospedante infectada con el herpesvirus de pavos.

2. Un vector para producir un herpesvirus recombinante de pavos insertando una secuencia de DNA extraño que en términos de la secuencia del DNA del virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV) consiste en una secuencia que codifica la glicoproteína I del virus de la laringotraqueitis infecciosa y la glicoproteína D del virus de la laringotraqueitis infecciosa en el genoma viral del herpesvirus de pavo, comprendiendo dicho vector una molécula de DNA bicatenario que consiste esencialmente en:

- a) dicho DNA extraño en forma bicatenaria;
- b) en un extremo del DNA extraño, DNA bicatenario de herpesvirus de pavos situado en un lado del fragmento EcoRI nº 9 de la región codificadora del genoma viral del herpesvirus de pavos; y;
- c) en el otro extremo del DNA extraño, DNA bicatenario de herpesvirus de pavos situado en el otro lado del fragmento EcoRI nº9 de la región codificadora del genoma viral del herpes virus de pavos.

3. El vector de la reivindicación 2, en donde la secuencia de DNA extraño codifica un marcador detectable.

4. El vector de la reivindicación 3, en donde el marcador detectable es beta-galactosidasa de E. coli o beta glucuronidasa de E. coli.

5. Una vacuna útil para inmunizar un ave contra el virus de la laringotraqueitis infecciosa, que comprende una cantidad inmunizante eficaz del herpesvirus recombinante de pavos de la reivindicación 1 y un vehículo adecuado.

6. Una vacuna que comprende el herpesvirus recombinante de pavos de la reivindicación 1 para uso en inmunizar un ave contra el virus de la laringotraqueitis infecciosa.

7. Una célula hospedante infectada con el herpesvirus recombinante de pavo de la reivindicación 1.

8. La célula hospedante de la reivindicación 7, en donde la célula hospedante es una célula aviar.

* * *

FIGURA 1A
Fragmentos BamHI



FIGURA 1B
BamHI nº 16

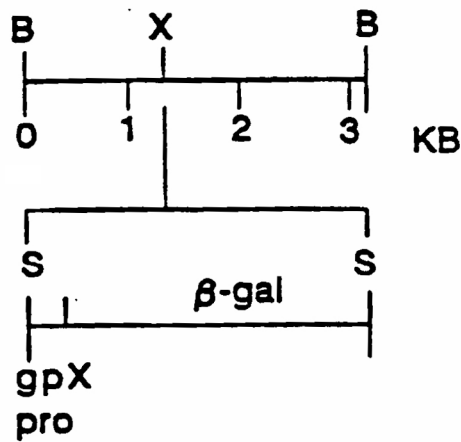


FIGURA 1C

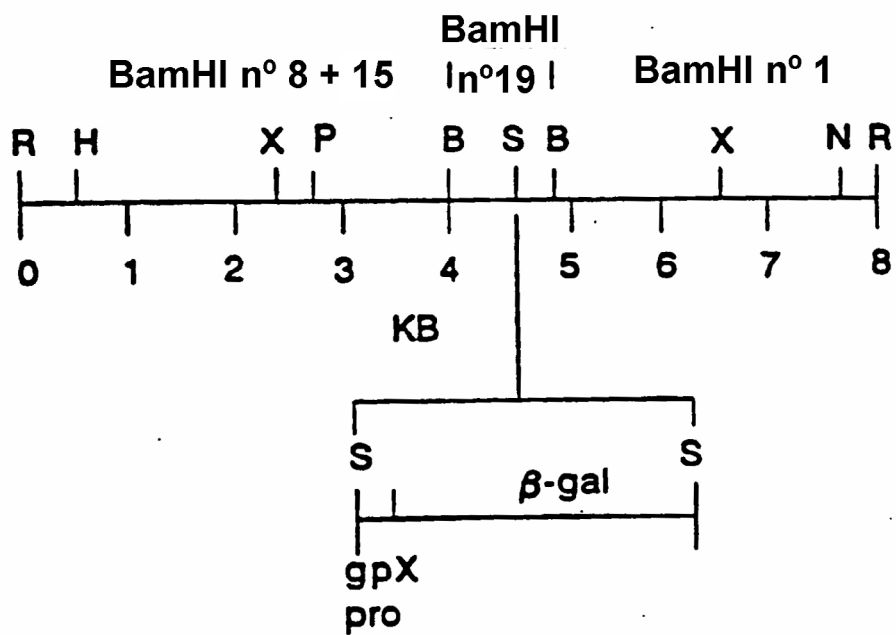


FIGURA 2A

FIGURA 2A
FIGURA 2B
FIGURA 2C
FIGURA 2D

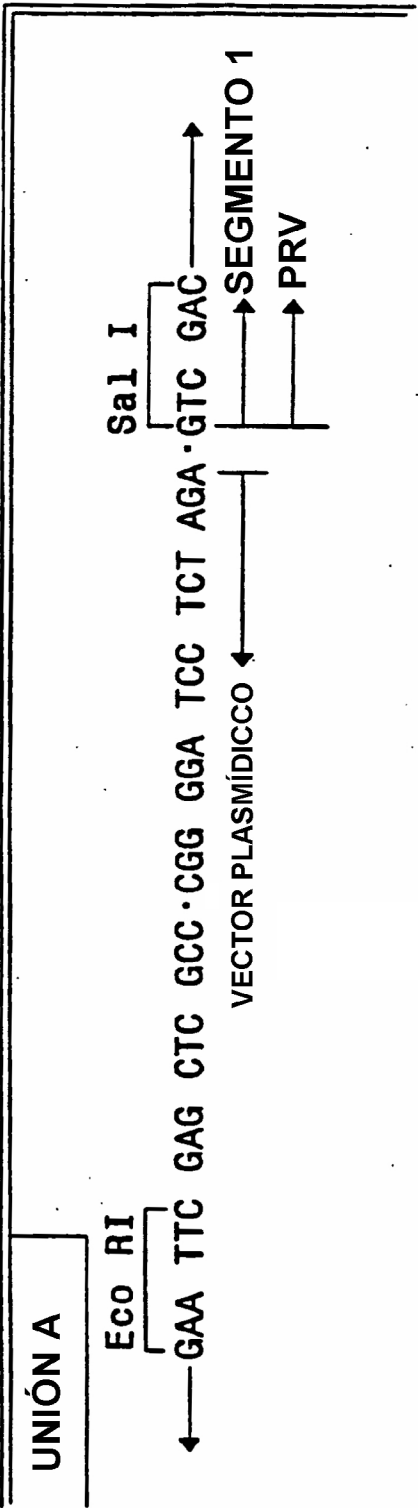
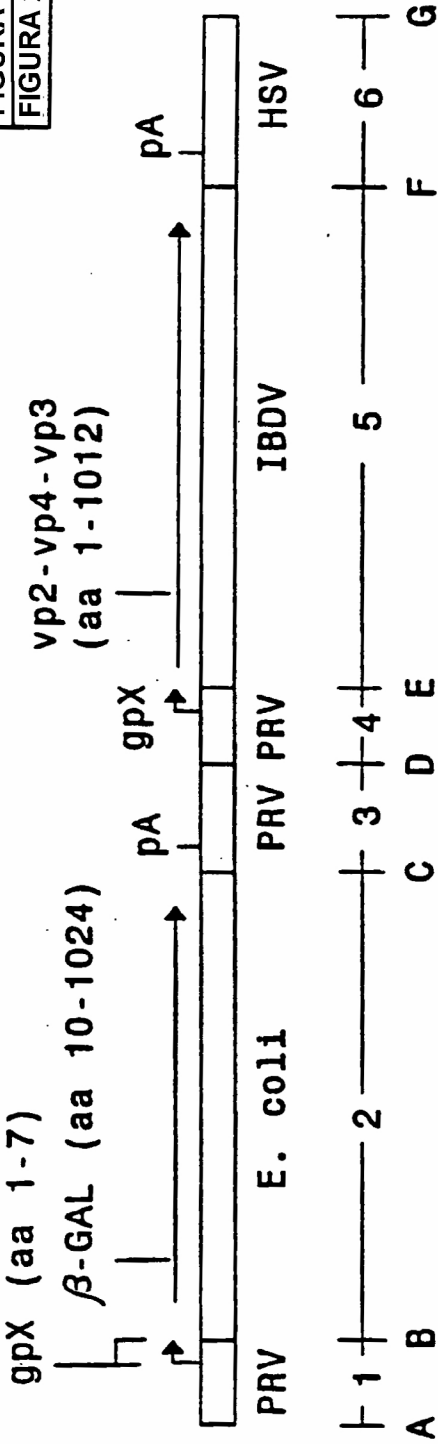


FIGURA 2B

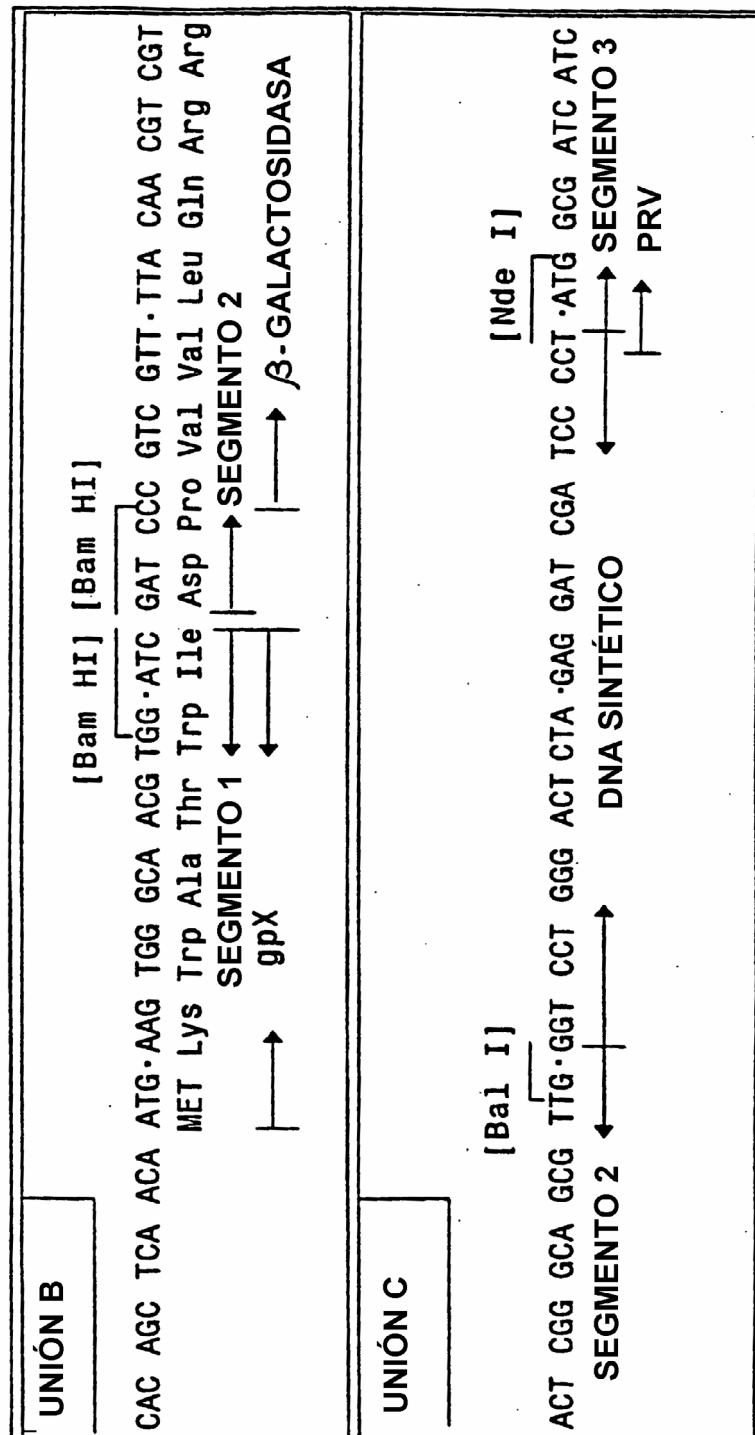


FIGURA 2C

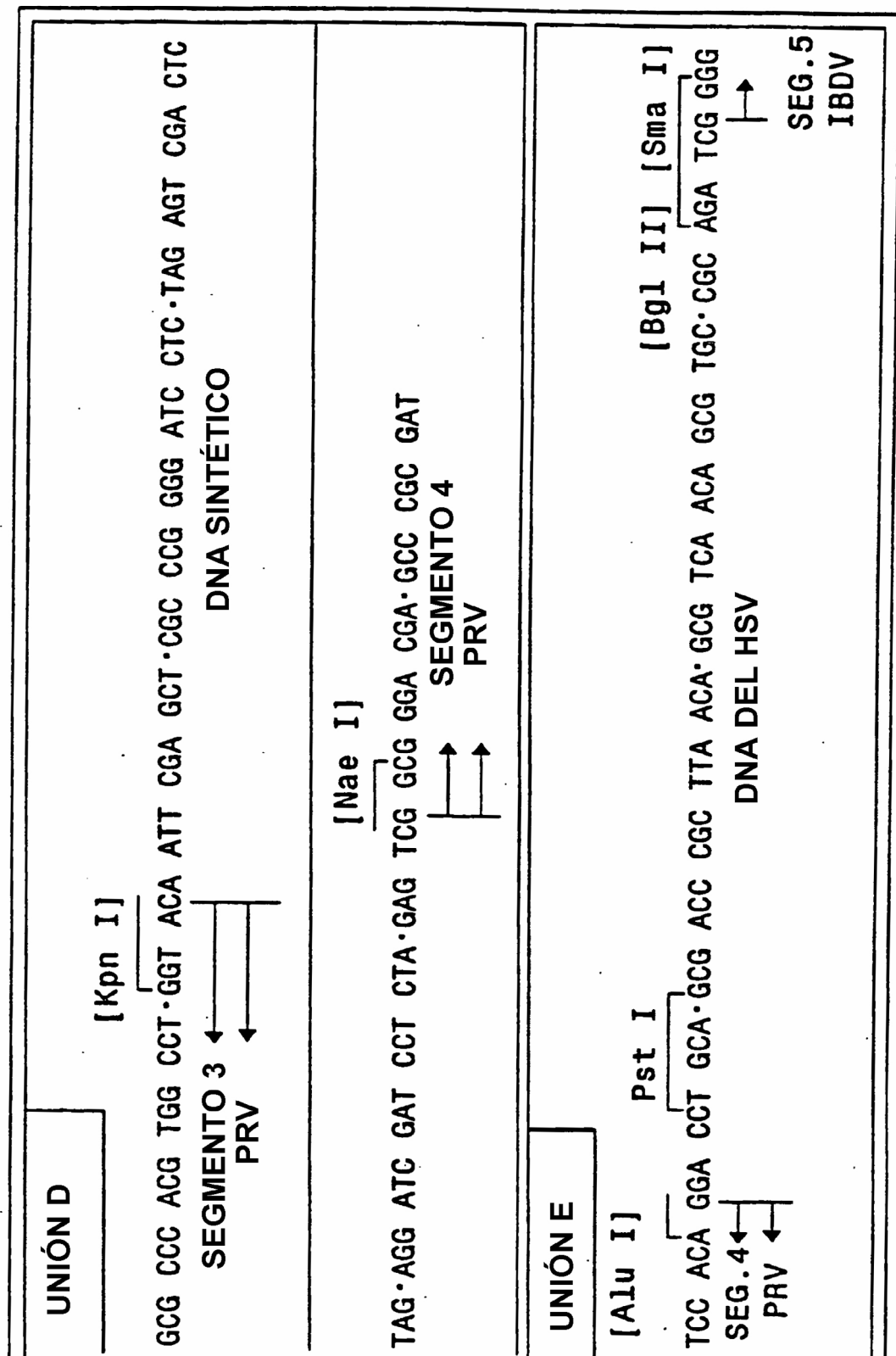


FIGURA 2D

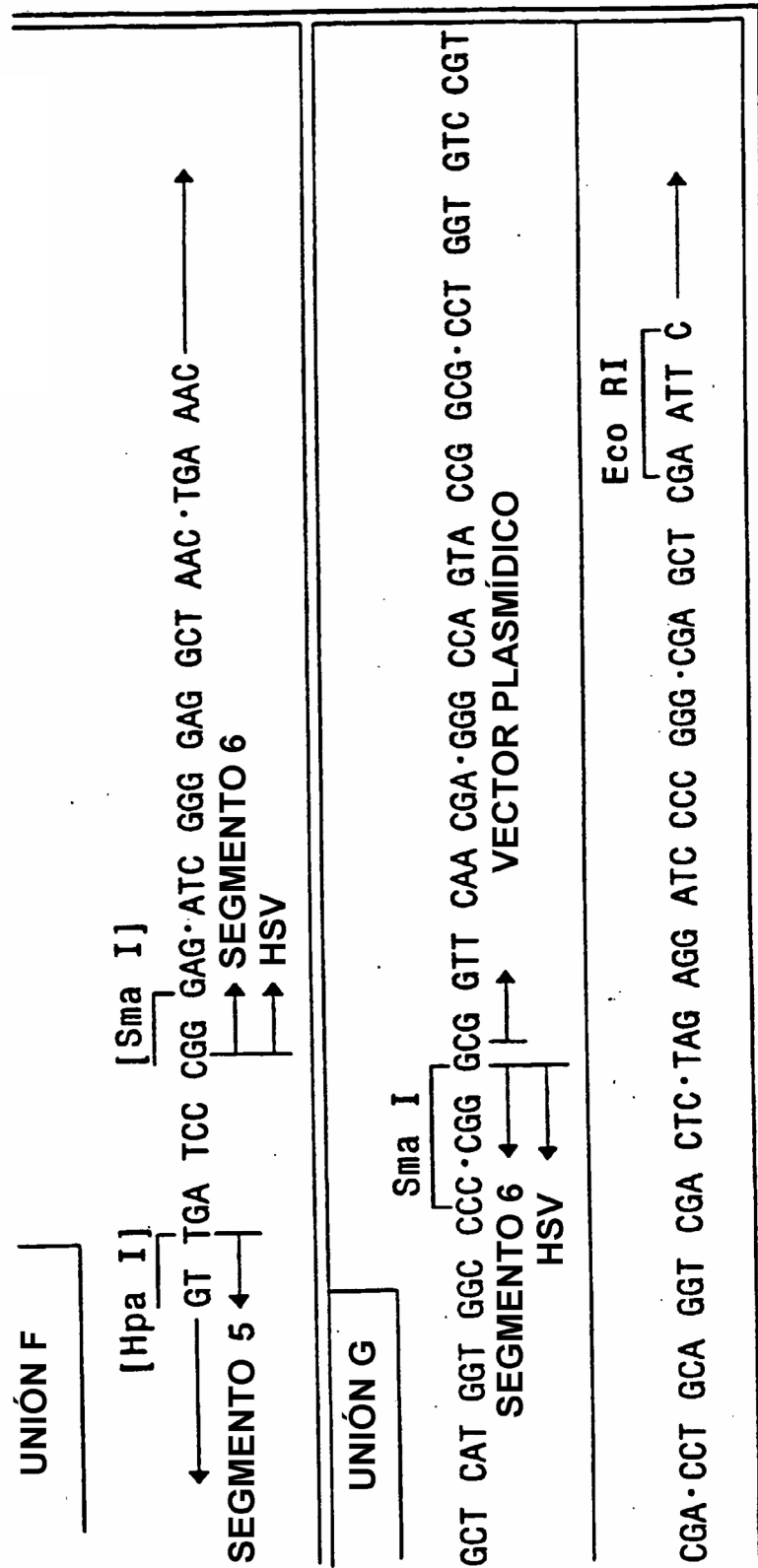


FIGURA 3A

Ejemplo comparativo

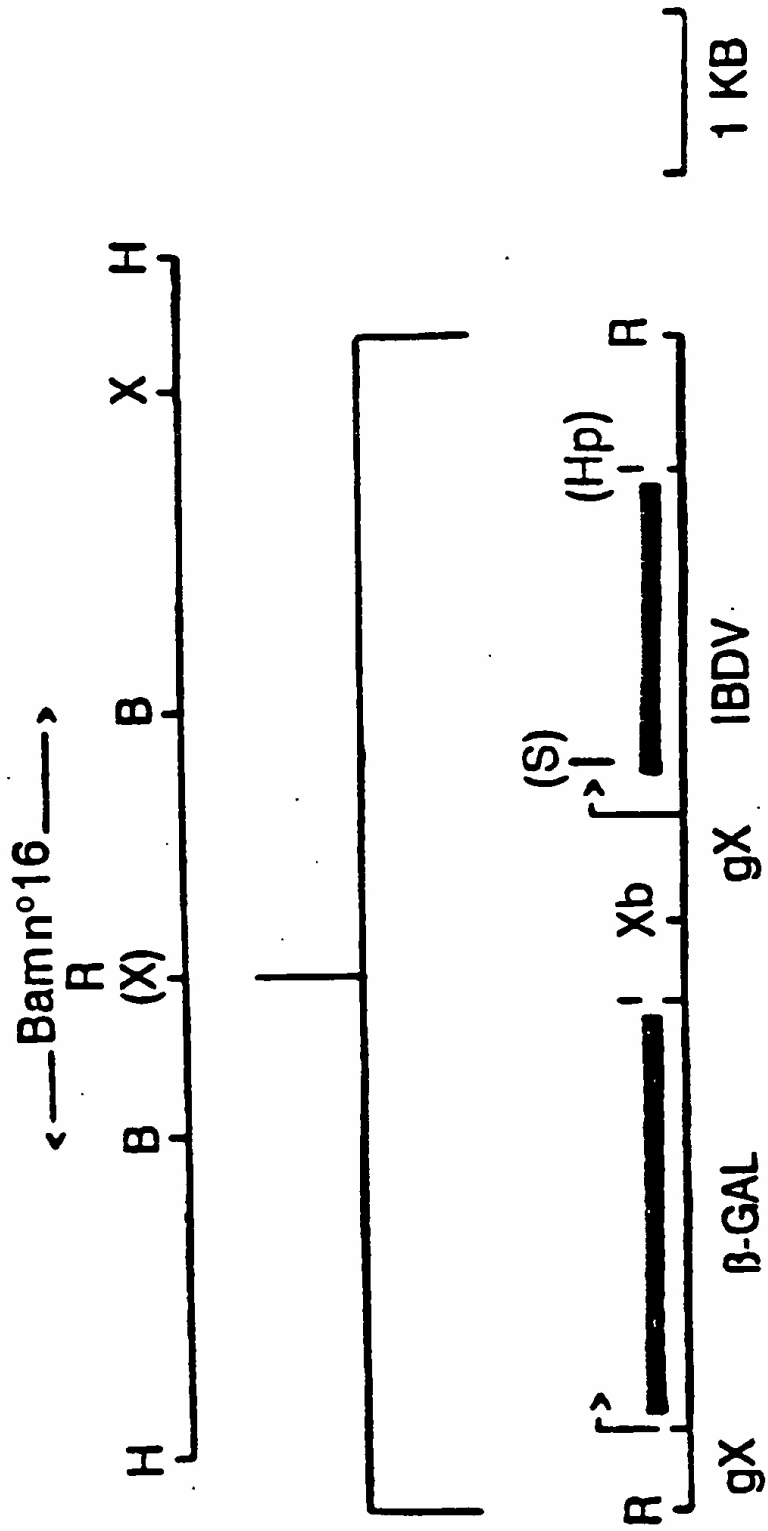


FIGURA 3B

Ejemplo comparativo

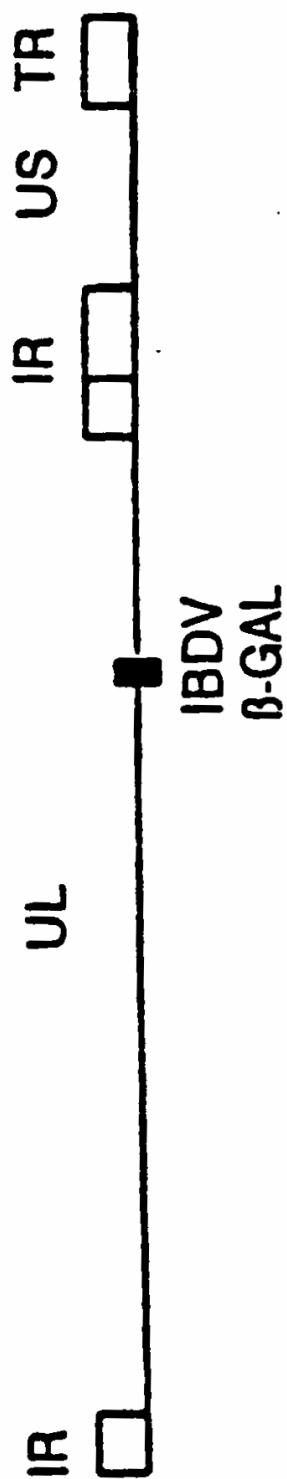


FIGURA 4

Ejemplo comparativo

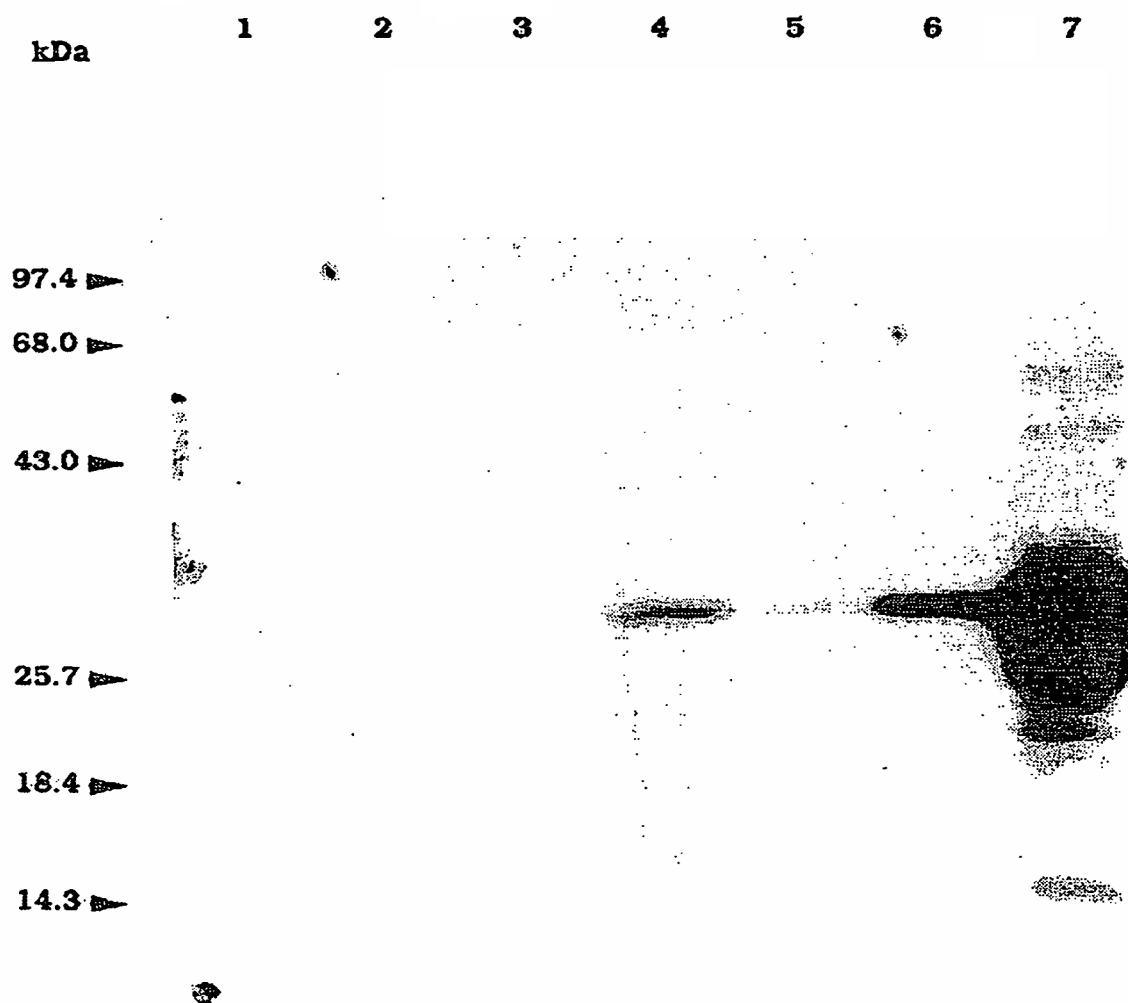
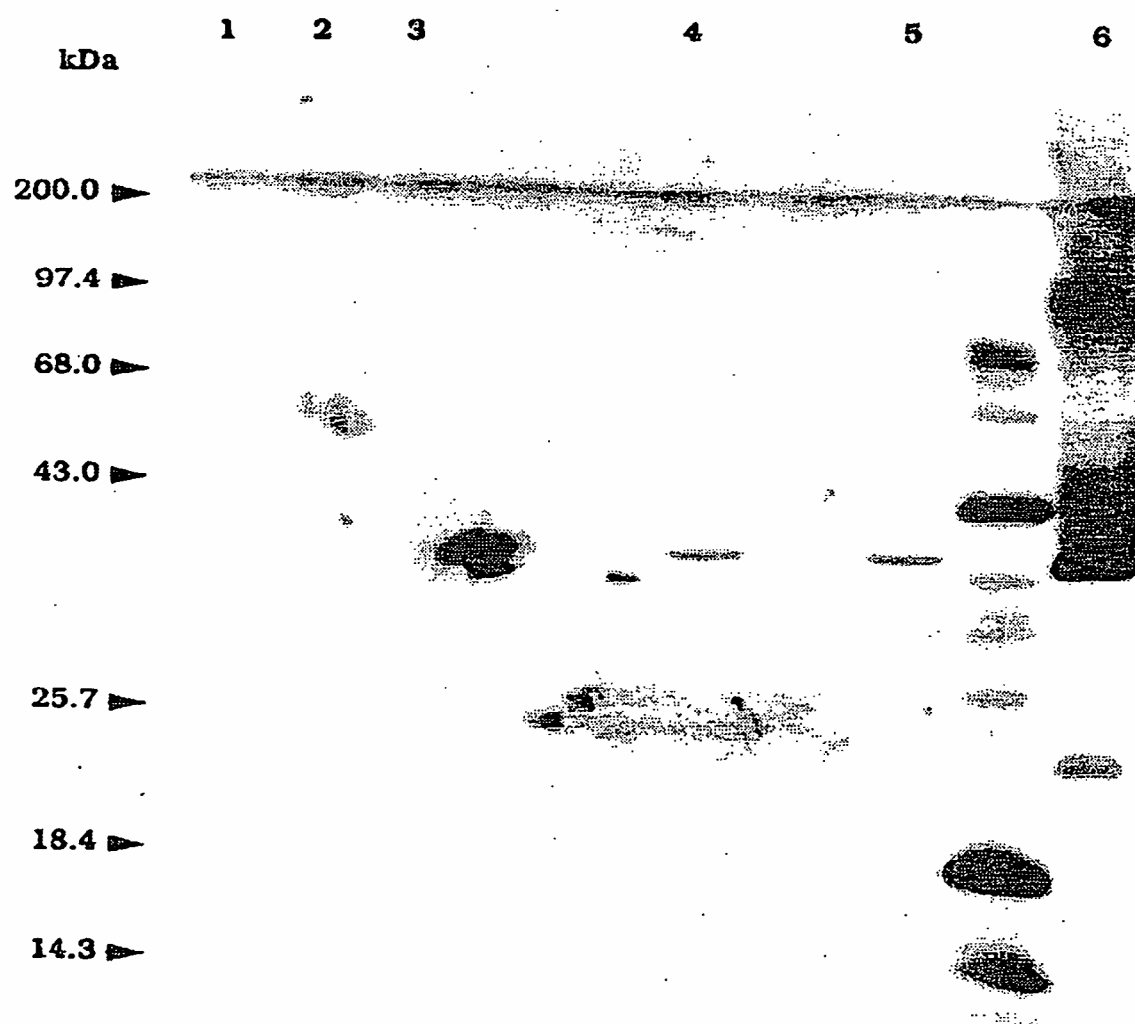


FIGURA 5

Ejemplo comparativo



Ejemplo comparativo

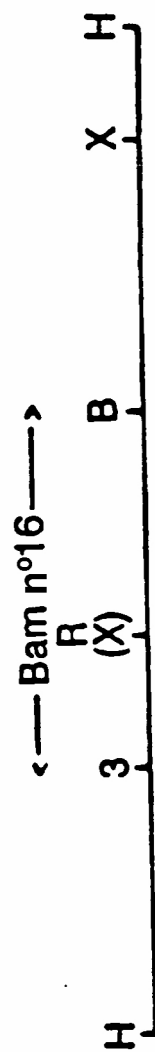


FIGURA 6A

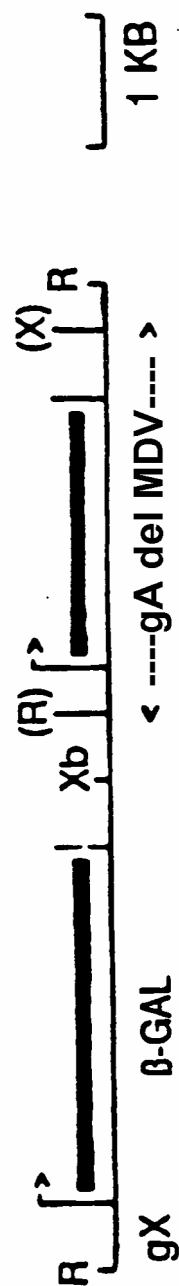
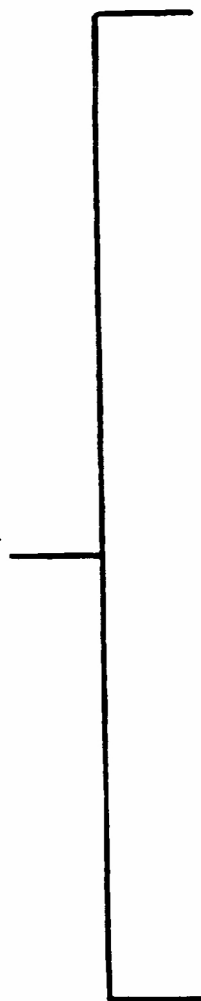


FIGURA 6B

FIGURA 6C

Ejemplo comparativo

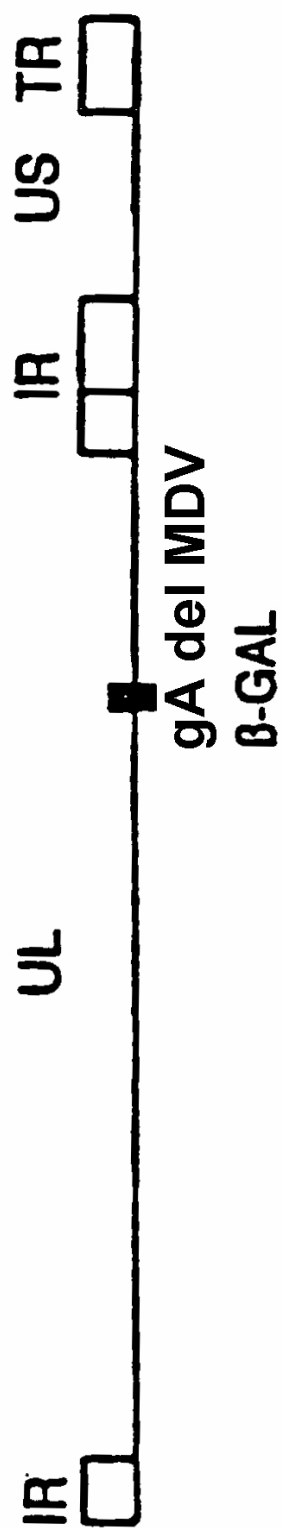


FIGURA 7A

Ejemplo comparativo

FIGURA 7A
FIGURA 7B

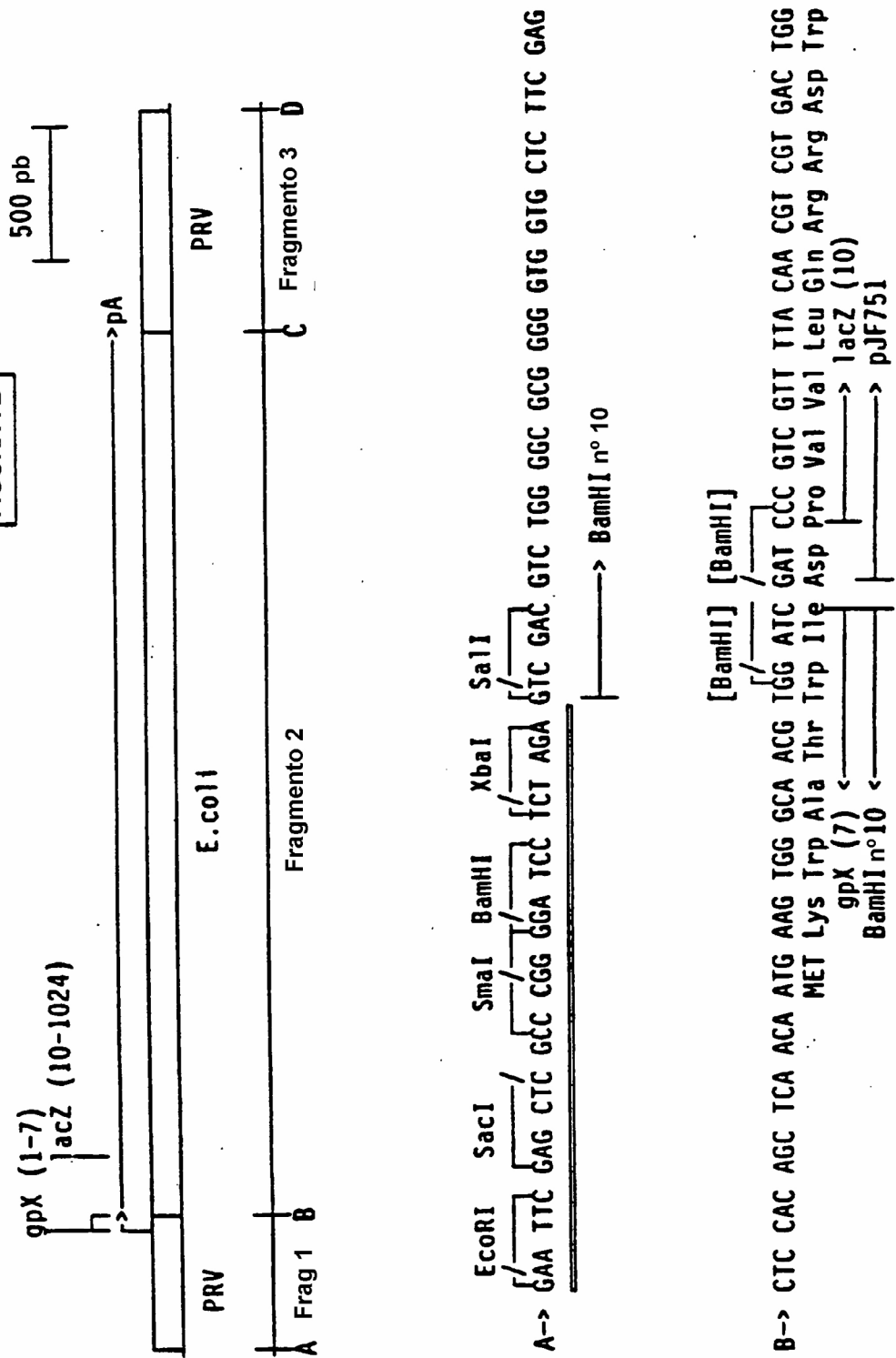


FIGURA 7B Ejemplo comparativo

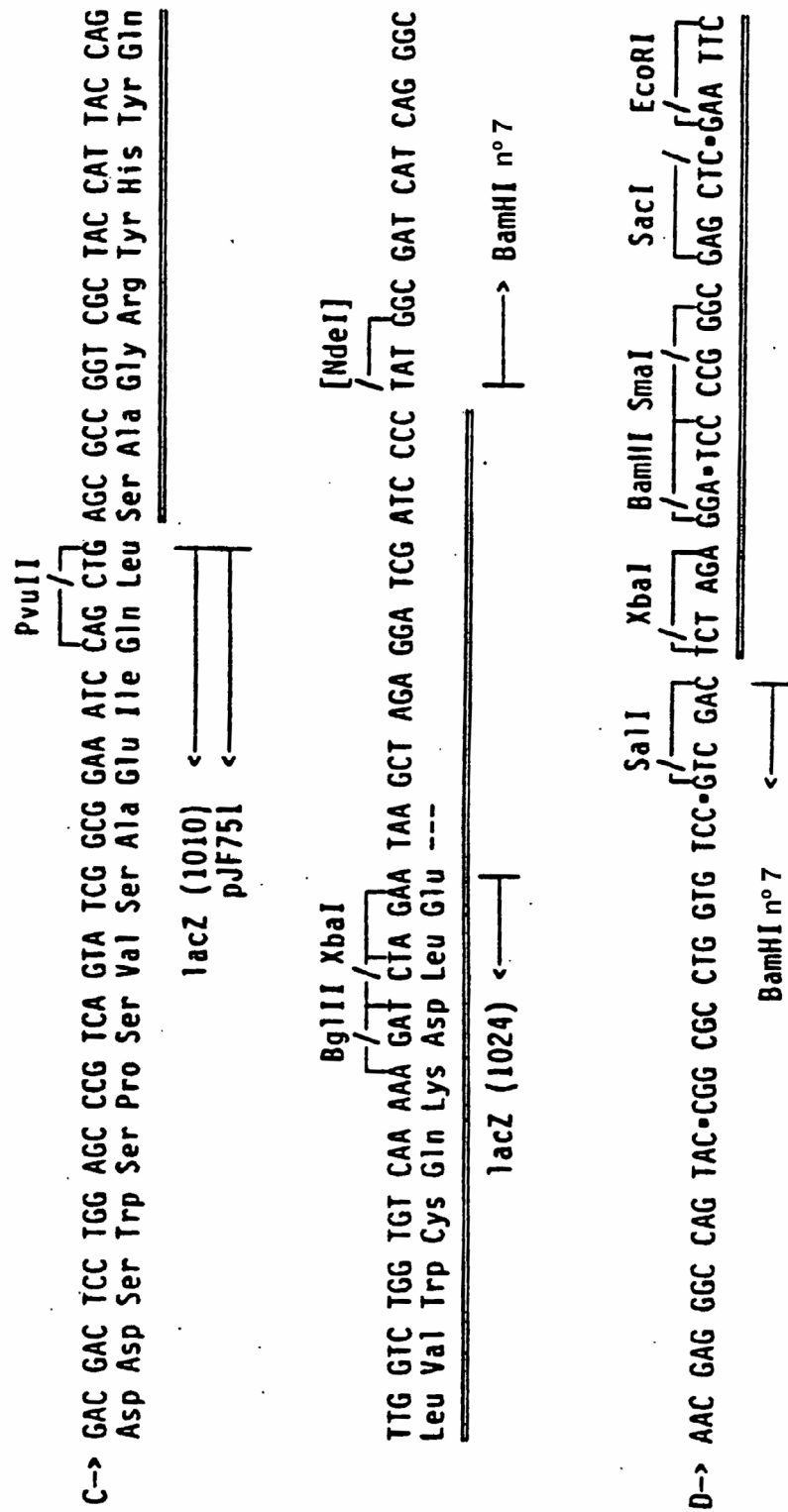


FIGURA 8

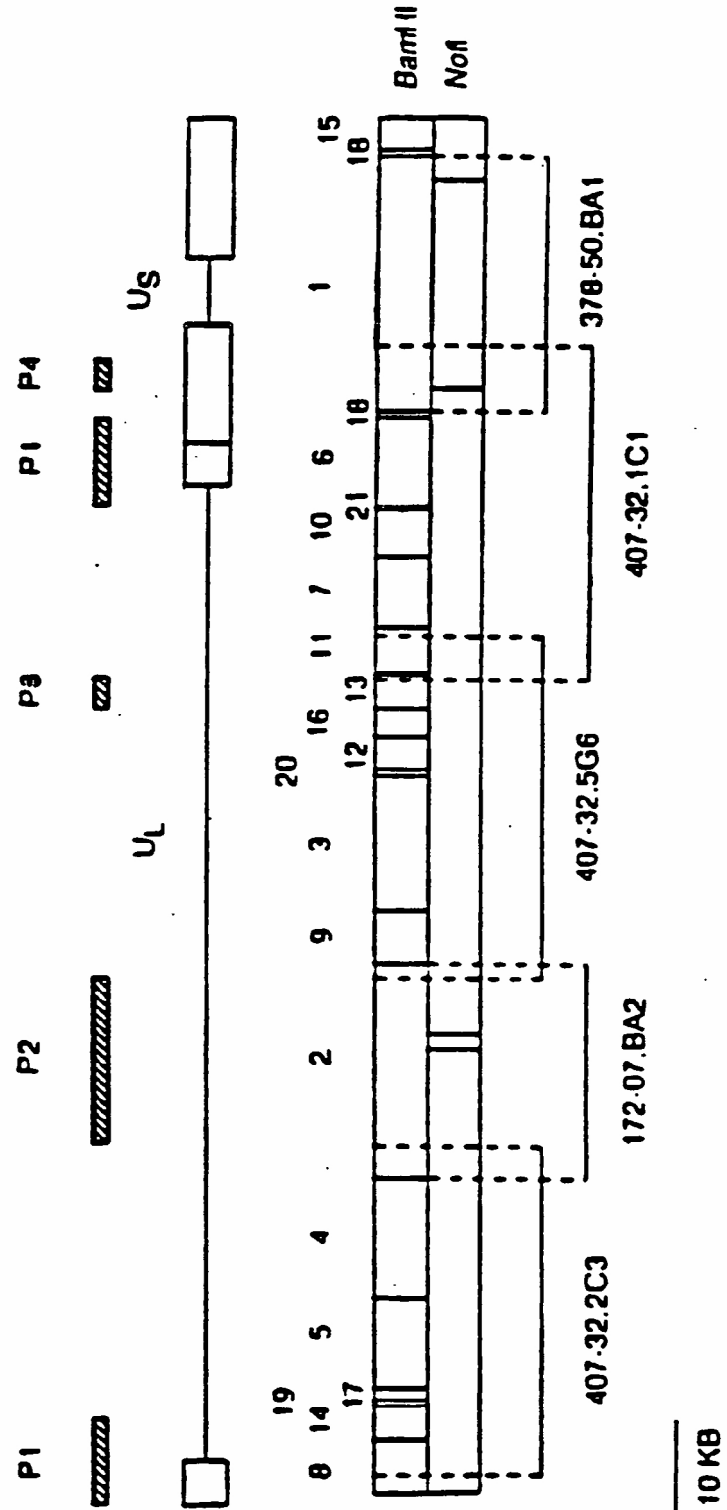


FIGURA 9

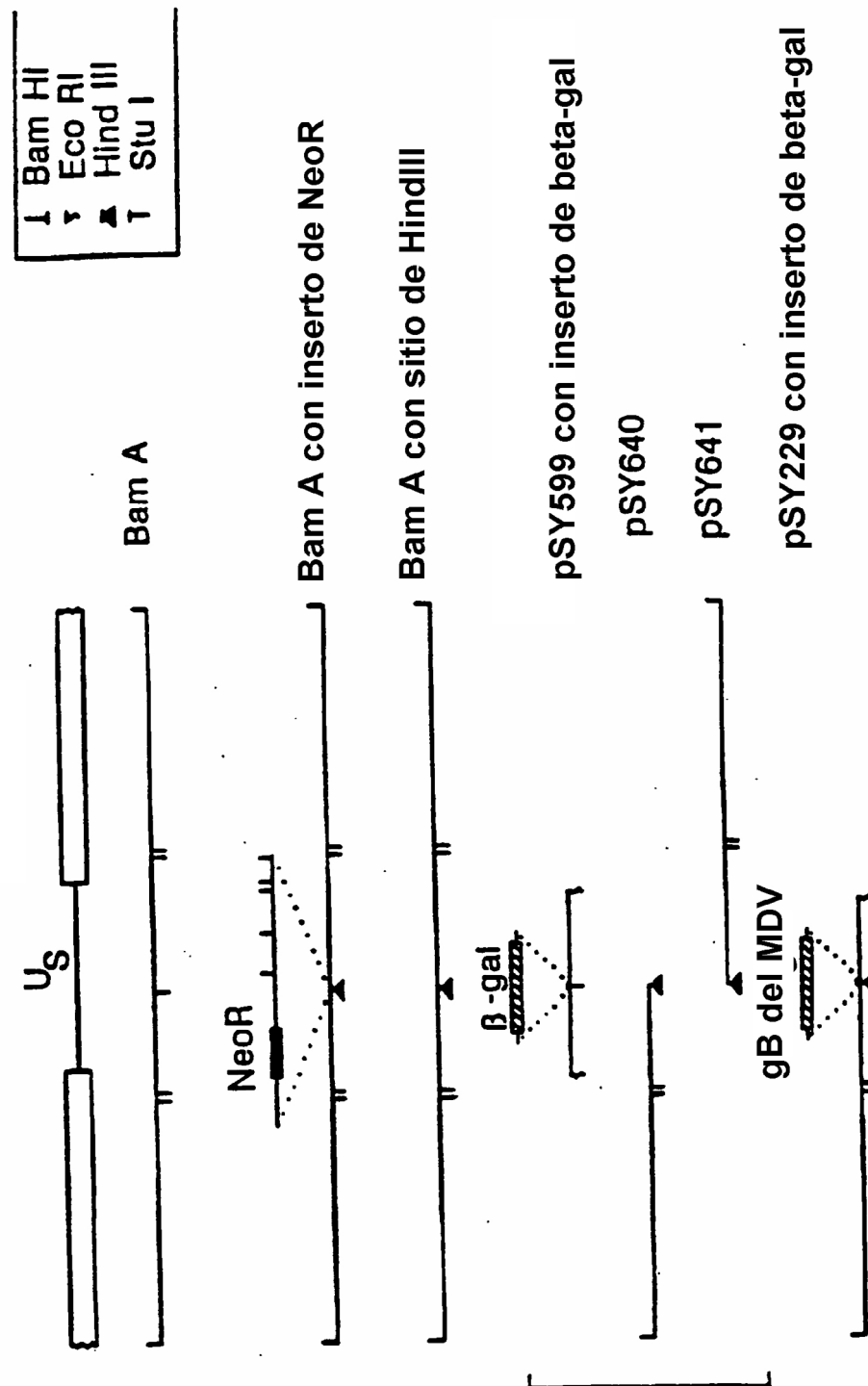


FIGURA 10A

Ejemplo comparativo

FIGURA 10A
FIGURA 10B

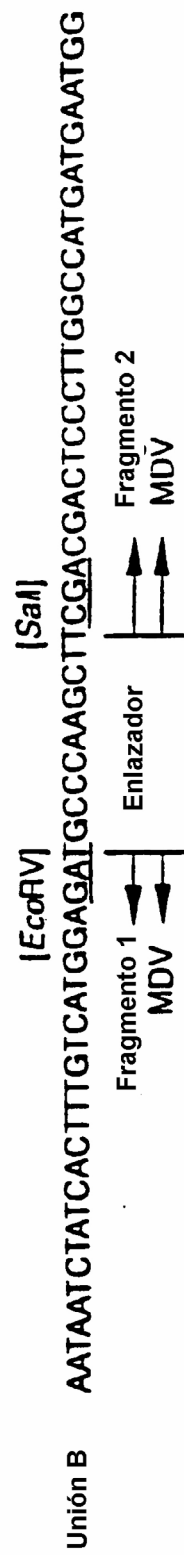
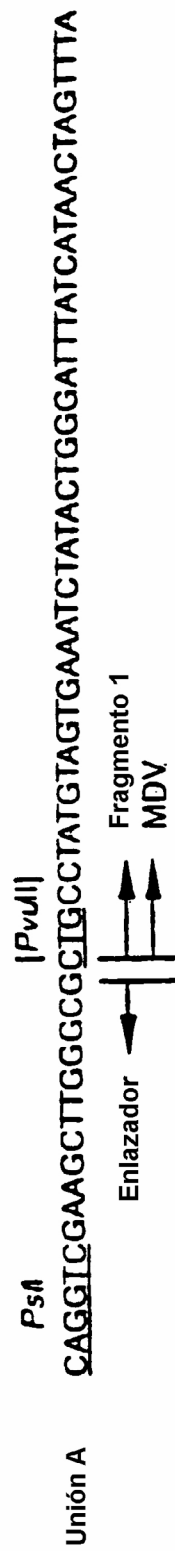
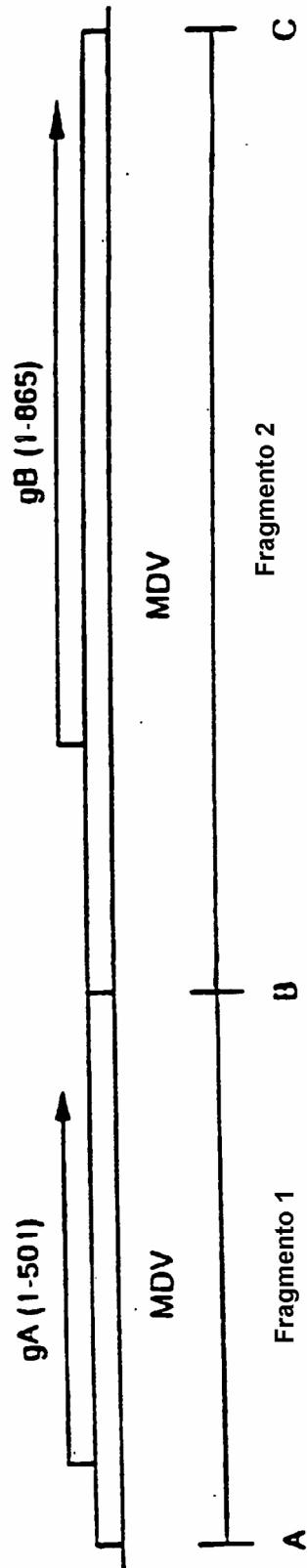


FIGURA 10B

Ejemplo comparativo

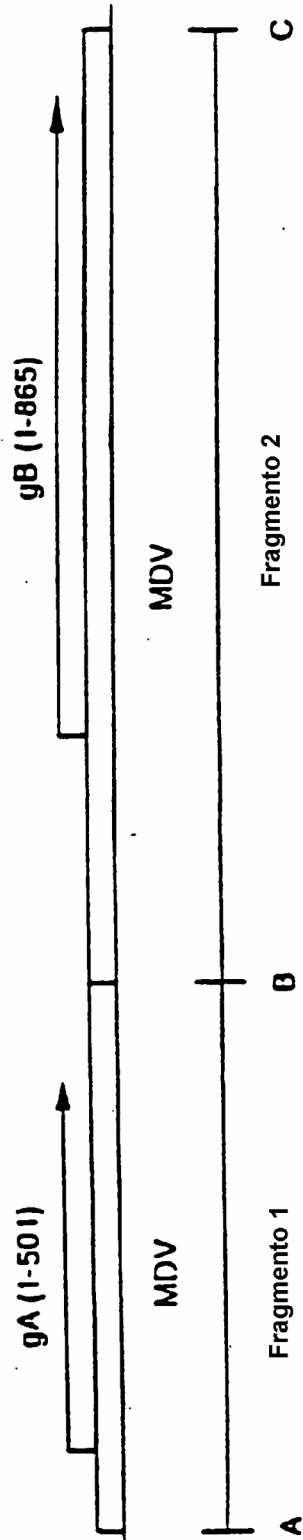
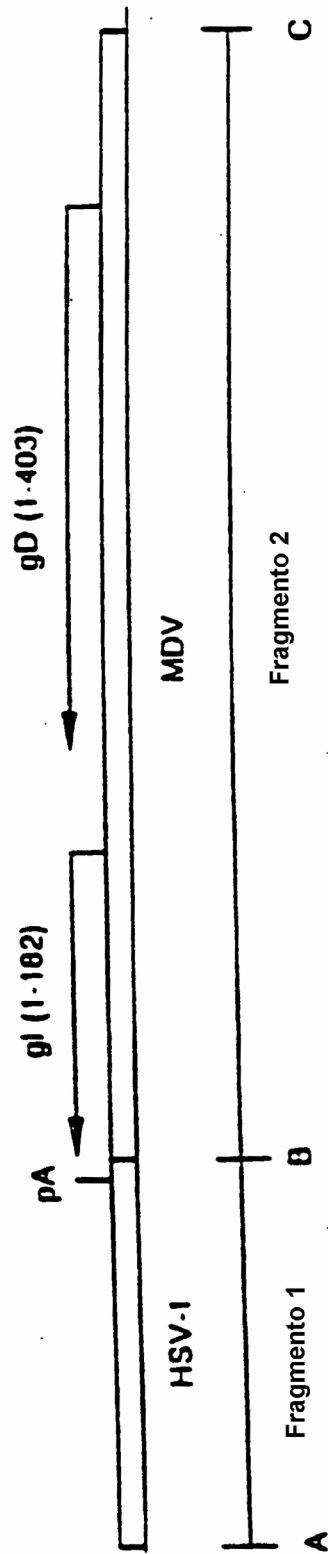


FIGURA 11A

Ejemplo comparativo

FIGURA 11A
FIGURA 11B



Unión A

HindIII

AAGCTTGGCCTCGTCGTTAATTAAACCCCAATTCGAGCTCGCCAGCTTGGGCTGCAGGTCGGGAAC

[SmaI]

Enlazador

Fragmento 1

Fragmento 2

MDV

Unión B

TGTTTCAGTTAGCCTCCCCCAATCTCCCGACICTAGAGGATCTCGACATAGCGAATACATTATGG

[SmaI]

Enlazador

Fragmento 1

Fragmento 2

MDV

FIGURA 12A

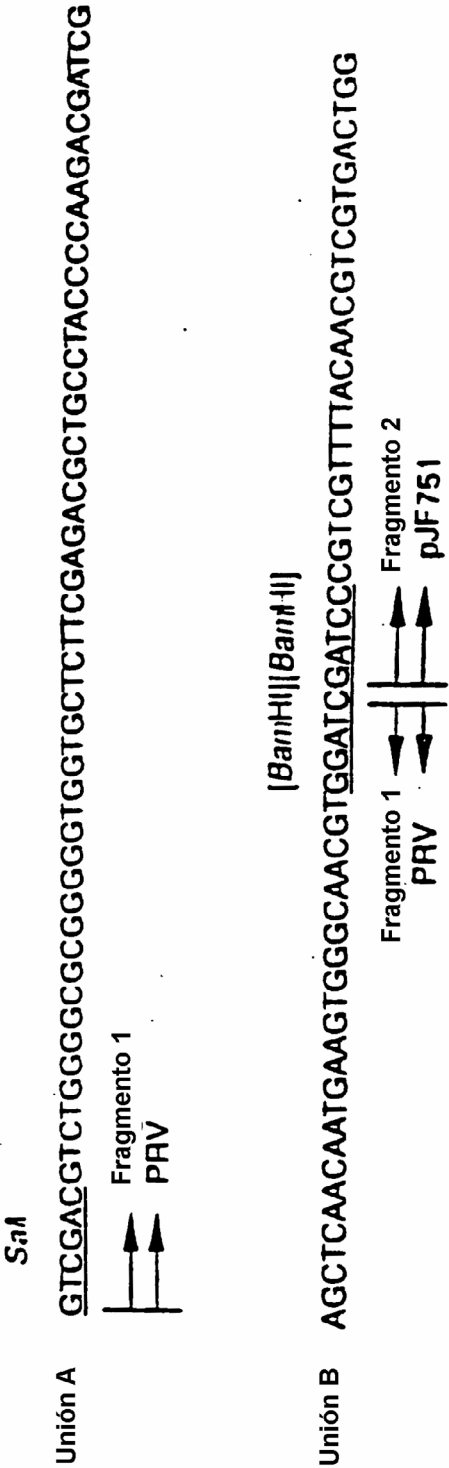
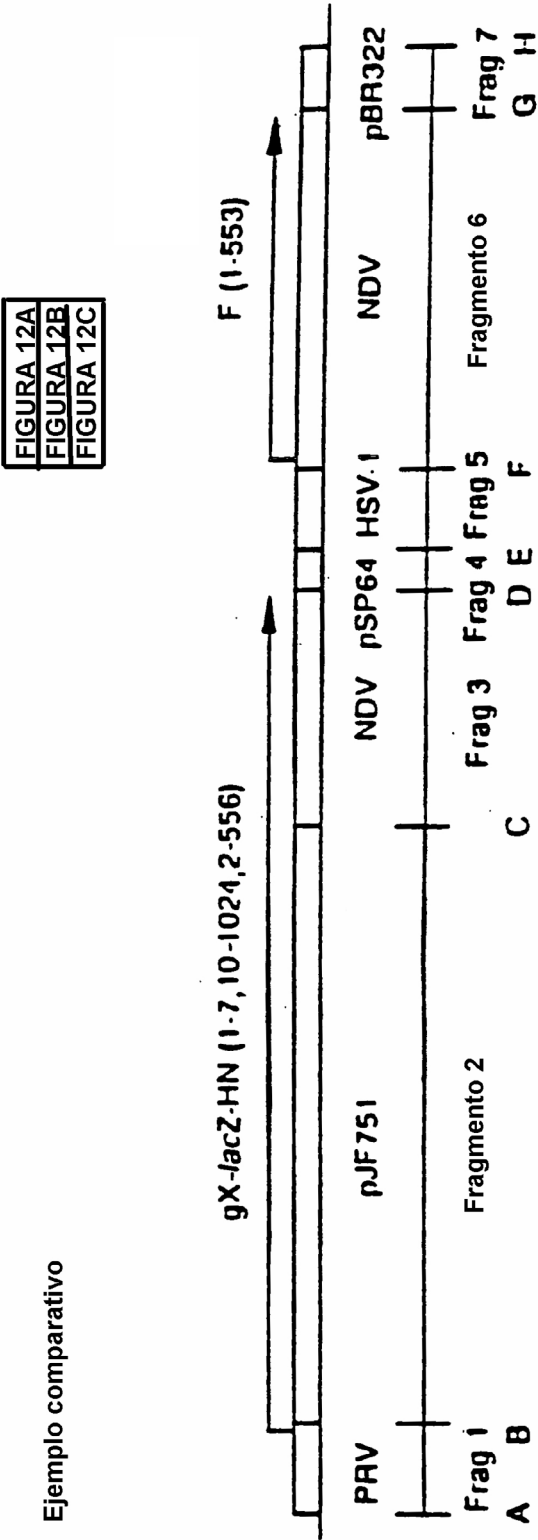


FIGURA 12B

Ejemplo comparativo

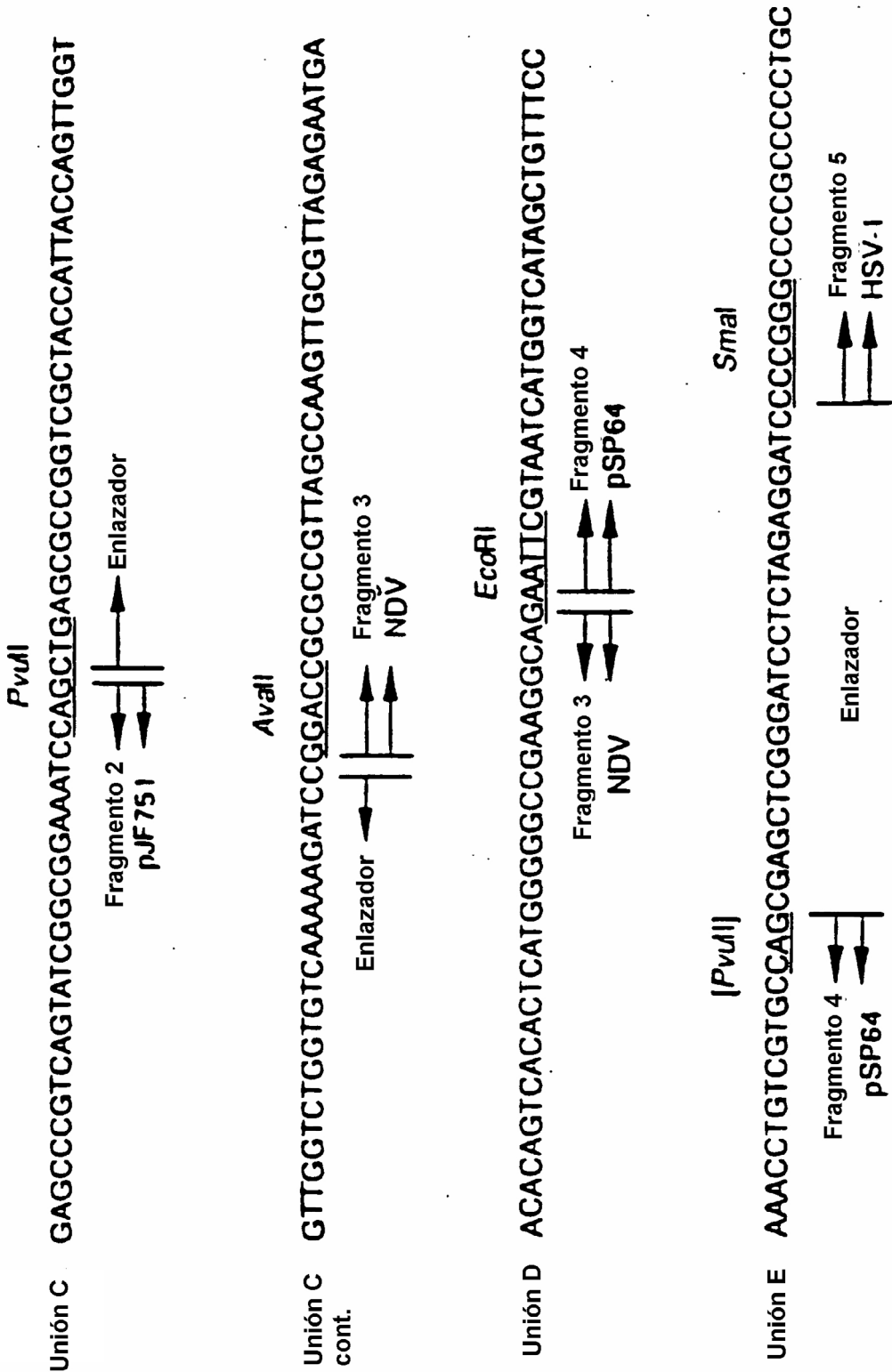


FIGURA 12C

Ejemplo comparativo

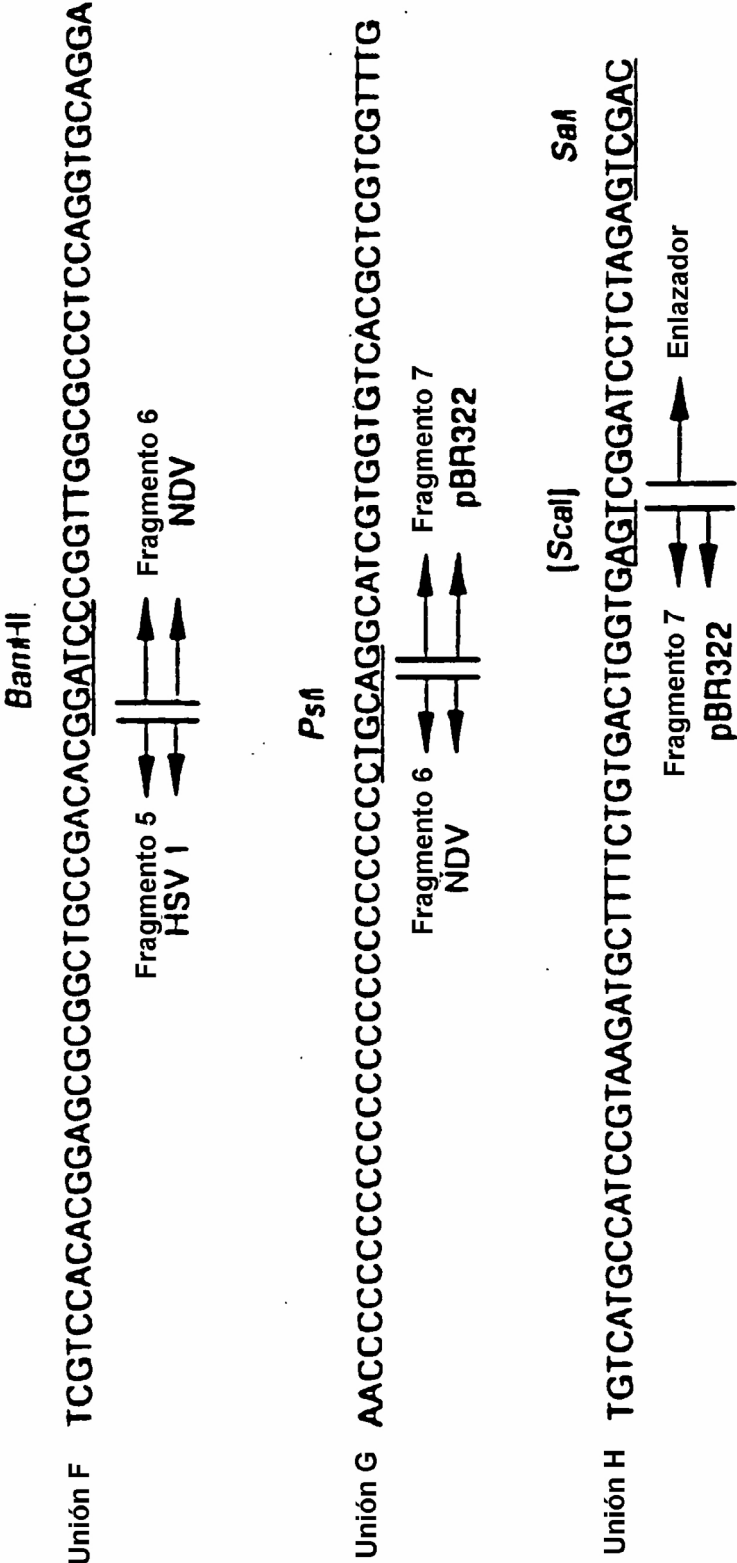


FIGURA 13A

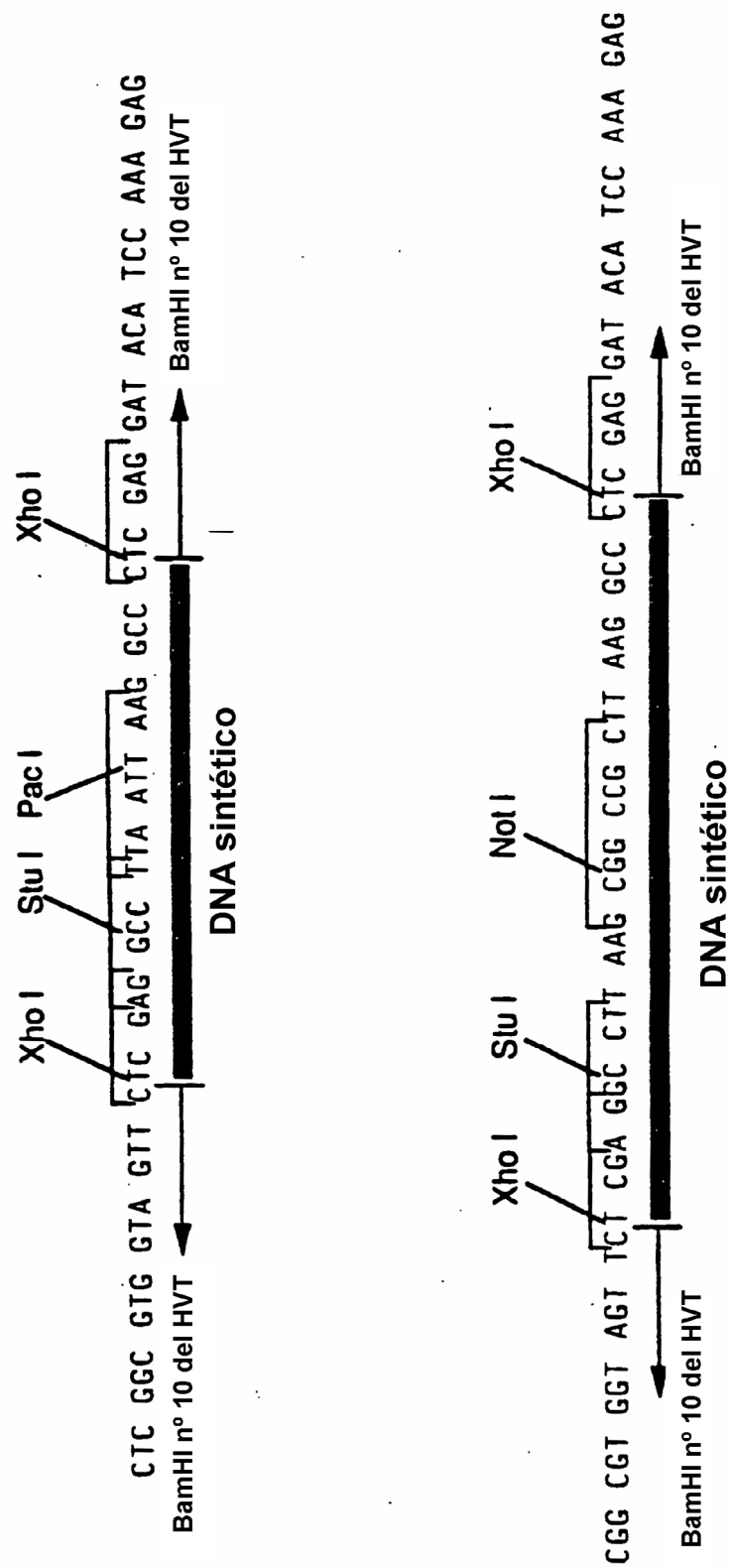


FIGURA 14

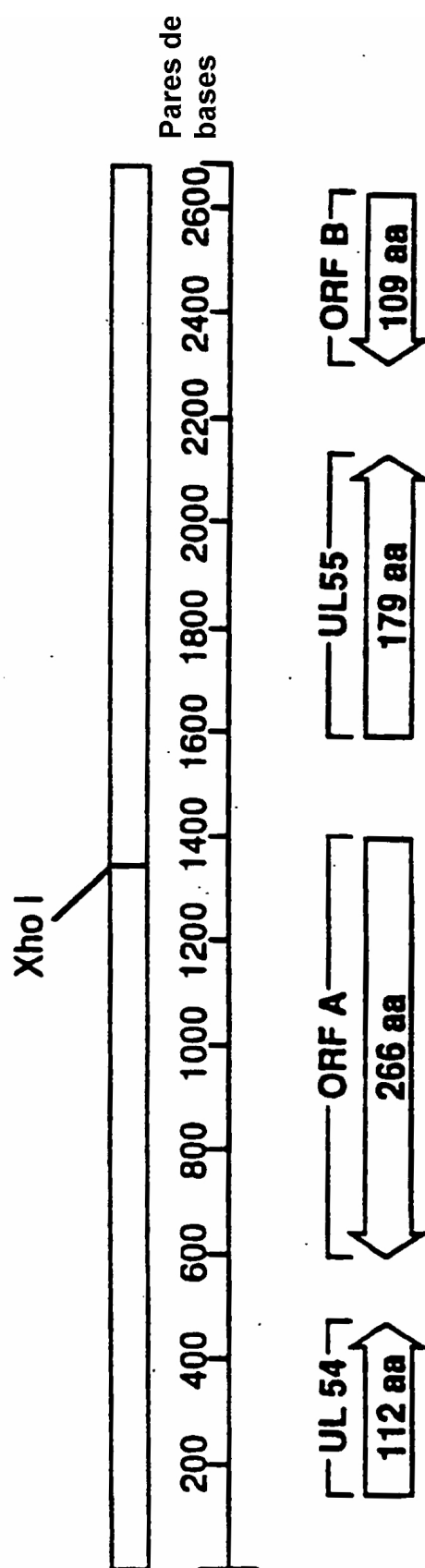


FIGURA 15

