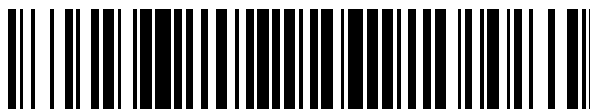


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 138**

51 Int. Cl.:

C07K 14/14 (2006.01)
C12N 15/863 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2007** **E 14170626 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017** **EP 2816057**

54 Título: **Vacuna recombinante contra el virus de la lengua azul**

30 Prioridad:

01.06.2006 US 444698

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

10.07.2017

73 Titular/es:

MERIAL LIMITED (50.0%)
3239 Satellite Boulevard
Duluth, GA 30096, US y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (50.0%)

72 Inventor/es:

AUDONNET, JEAN CHRISTOPHE FRANCIS;
KARACA, KERMAL;
YAO, JIANSHENG y
MACLACHLAN, NIGEL JAMES

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 623 138 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna recombinante contra el virus de la lengua azul.

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente de EE.UU. 11/444698 presentada el 1 de junio de 2006.

10 CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente descripción se refiere a vectores que contiene al menos un polinucleótido del género *Orbivirus* de la familia *Reoviridae*, más específicamente el virus de la lengua azul (o BTV) o al menos una molécula de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno, inmunógeno o epítipo del BTV, p. ej., vectores de expresión *in vivo* o *in vitro* que pueden comprender y expresar al menos un polinucleótido del BTV, o vectores de expresión *in vivo* o *in vitro* que pueden comprender y expresar al menos un antígeno, inmunógeno o epítipo del BTV, así como composiciones inmunógenas y vacunas contra la enfermedad de la lengua azul; por ejemplo dichas composiciones o vacunas que pueden contener uno o más vectores y/o uno o más productos de expresión de los vectores. La presente descripción también se refiere a procedimientos para usar los vectores, composiciones y vacunas, que incluyen la inmunización y vacunación contra este virus, la expresión de productos de expresión del o de los polinucleótidos, usando los productos de expresión en ensayos o para generar anticuerpos útiles en los ensayos, así como a procedimientos para hacer el o los polinucleótidos, vectores, composiciones, vacunas, ensayos, entre otros.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] La lengua azul (BT, por sus siglas en inglés *Bluetongue*) es una enfermedad de los rumiantes vírica infecciosa transmitida por artrópodos. El ganado vacuno y cabras se pueden infectar fácilmente con el BTV que la causa, pero sin lesión vascular extensa y por lo tanto en general estas especies no muestran signos clínicos pronunciados. En cambio, la enfermedad en las ovejas se caracteriza por la inflamación catarral de las membranas mucosas de la boca, nariz y rumen, y por la inflamación de las bandas coronarias y lámina de las pezuñas. Hay una excoiación del epitelio y finalmente necrosis de la mucosa bucal; la lengua y boca hinchadas e inflamadas pueden tomar un color azul del cual obtiene su nombre la enfermedad (Spreull 1905). La tasa de mortalidad en ovejas se calcula en 1-30 %.

[0004] El BTV es el virus prototipo del género *Orbivirus* (familia *Reoviridae*) y está compuesto de al menos 24 serotipos diferentes (Wilson y Mecham 2000). Se han identificado diferentes cepas de BTV en todo el mundo a lo largo de las zonas tropical y templada. La infección por BTV se ha encontrado tan lejos como 45°N en Europa, tan lejos como 50°N en Asia y América del Norte y tan lejos al Sur como 35°. El BTV no es contagioso entre rumiantes, por lo que la distribución del BTV depende de la presencia de la especie de artrópodo vector de *Coides sp.* (mosquitos *Culicoides*), encontrándose diferentes especies de vectores en diferentes regiones del mundo. Datos recientes sugieren que la deriva genética y el efecto fundador contribuyen a la diversificación de segmentos génicos individuales de cepas de campo del BTV (Bonneau, Mullens *et al.* 2001). Se ha mostrado que los animales seropositivos para BTV son resistentes a la reinfección con el serotipo de BTV homólogo.

[0005] La infección de los rumiantes por el BTV es transitoria, mientras que la infección del insecto vector *Culicoides* es persistente. La duración de la viremia depende de la especie animal y la cepa de BTV. Se ha descrito que la viremia puede ser muy transitoria en ovejas y puede durar hasta 41 días en los individuos infectados por el BTV, hasta 42 días en cabras y hasta 100 días en ganado vacuno. Puesto que la infección por BTV del ganado vacuno a menudo produce viremia prolongada pero no persistente, el ganado vacuno sirve como un reservorio del cual puede ingerir los virus el vector *Culicoides* y después transmitirlo a otros rumiantes (Anderson, Stott *et al.* 1985; MacLachlan 1994; MacLachlan y Pearson 2004). La ecología de muchas especies de vectores *Culicoides* se entiende poco y sus sitios de cría no están caracterizados en gran medida, y sus tasas de dispersión son desconocidas. *Culicoides sonorensis* es el vector principal del BTV en América del Norte. Los insectos hembra *Culicoides* se convierten en persistentemente infectados por el BTV y pueden transmitir el virus después de un período de incubación extrínseco de hasta 14 días (Mullens, Tabachnick *et al.* 1995). Se puede producir el paso del invierno del BTV en zonas templadas a través de los insectos vectores infectados verticalmente, aunque datos recientes indican que hay una expresión reducida de los genes de la cápside externa durante la infección por BTV persistente en estados larvarios de los insectos vectores (White, Wilson *et al.* 2005).

[0006] Los viriones del BTV tienen un diámetro de ~69 nm con un recubrimiento de doble cubierta (cápside) que a veces está rodeada de una "pseudoenvuelta" de lipoproteínas derivada de membranas celulares de las células infectadas. El genoma del BTV incluye 10 segmentos distintos de ARN bicatenario que codifican colectivamente siete proteínas estructurales (VP1 a VP7) y cuatro no estructurales (NS1, NS2, NS3 y NS3a) (Roy 1996); 9 de los 5 segmentos genómicos son monocistrónicos mientras que el segmento 10 codifica tanto NS3 como NS3A usando un segundo codón de iniciación dentro del marco. El ARN genómico está encapsidado en la partícula de virión icosaédrica por una cápside de proteína de doble capa (Verwoerd, Els *et al.* 1972). El núcleo icosaédrico consiste en dos proteínas principales (VP3 y VP7) y tres minoritarias (VP1, VP4, VP6) y está rodeado por la cápside externa que consiste en VP2 y VP5 que son codificadas respectivamente por los segmentos genómicos 2 y 5 (Roy 1996). VP2 es 10 responsable de la unión y entrada del BTV en células, neutralización, especificidad de serotipo y hemaglutinación. Las formas multiméricas de VP2 (dímeros y trímeros) decoran la mayor parte de la superficie de un armazón de VP5 en la superficie exterior de las partículas víricas (Hassan y Roy 1999). VP2 es la que más varía entre los 24 serotipos de BTV, y los niveles de anticuerpo contra VP2 se correlacionan con la neutralización de virus *in vitro* e *in vivo* (Huismans y Erasmus 1981). VP5 también varía notablemente entre los diferentes serotipos y cepas del BTV 15 (de Mattos, de Mattos *et al.* 1994; DeMaula, Bonneau *et al.* 2000) y aunque hasta la fecha no se han identificado AcM neutralizantes específicos de VP5, los datos sugieren que esta proteína tiene una función en la neutralización y determinación de serotipo a través de su influencia conformacional en VP2 (Huismans y Erasmus 1981; Roy, Urakawa *et al.* 1990; DeMaula *et al.*, 2000). Se inyectó en ovejas VP2 purificada, inmunoabsorbida con suero contra núcleo de BTV para eliminar las cantidades en trazas de VP7. Con una dosis inicial de 50 microgramos de VP2 era 20 suficiente para inducir anticuerpos que precipitaban VP2, así como anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación. Estas ovejas estaban completamente protegidas contra la exposición a una cepa virulenta del mismo serotipo de BTV. Dosis más bajas de VP2 todavía proporcionaban un nivel significativo de protección incluso aunque no se detectaron anticuerpos neutralizantes antes de la exposición (Huismans, van der Walt *et al.* 1987). Resultados recientes muestran que VP2 y NS1 expresan epítopos reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CTL) 25 (Andrew, Whiteley *et al.* 1995) mientras que no es probable que VP7 y VP5 tengan epítopos para los CTL. Hasta ahora VP3, VP4, VP6, NS2 y NS3 no han estimulado una respuesta de CTL en ovejas (Lobato, Coupar *et al.* 1997). La tabla 1 (modificada de (Wilson y Mecham 2000)), resume a continuación los genes del BTV y su función de proteína:

30 Tabla 1. Genes del virus de la lengua azul y proteínas codificadas con situación, propiedades y función de las proteínas

Segmento genómico	Proteína	Situación	Propiedades y función
L1 (3954 pb) (150 kDa)	VP1	Dentro del subnúcleo en el eje de orden 5	ARN polimerasa dependiente de ARN
L2 (2926 pb) (111 kDa)	VP2	Cápside externa (trímero)	Cápside externa, antígeno específico de serotipo, proteína de unión a célula de mamífero, epítopos neutralizantes
L3 (2770 pb) (103 kDa)	VP3	Capa de cápside del subnúcleo (simetría T=2)	Cubierta de cápside de proteína más interna, capa de cápside de subnúcleo, se autoensambla, retiene simetría icosaédrica, unión a ARN, interacciona con proteínas minoritarias internas
M4 (2011 pb) (76 kDa)	VP4	Dentro del subnúcleo en el eje de orden 5 (dímero)	Enzima de grupos terminales, guanililtransferasa
M5 (1638 pb) (59 kDa)	VP5	Cápside externa (trímero)	Proteína interior de la cápside externa, puede afectar a las características del serotipo del virus
M6 (1769 pb) (64 kDa)	NS1	Citoplasma	Forma túbulos en el citoplasma de la célula
S7 (1156 pb) (38 kDa)	VP7	Núcleo externo (simetría T=13, trímero)	Proteína externa de la superficie del núcleo, antígeno específico de serogrupo mayoritario inmunodominante, proteína de unión para células de insectos vectores, reacciona con anticuerpos neutralizantes del núcleo

S8 (1124 pb) (41 kDa)	NS2	Citoplasma, cuerpos de inclusión víricos (VIB)	Proteína de la matriz de cuerpos de inclusión víricos importante, que se une a ARNmc, fosforilada, puede estar asociada con la cápside externa
S9 (1046 pb) (36 kDa)	VP6	Dentro del subnúcleo en el eje de orden 5	Unión a ARNmc y ARNbc, helicasa, NTPasa
S10 (822 pb) (24 kDa)	NS3, NS3a	Membranas celulares	Glucoproteínas, proteínas de membrana, implicada en la salida de la célula

[0007] Lobato y Coupar (Lobato, Coupar *et al.* 1997) desarrollaron vectores de expresión basados en virus vaccinia que contenían diferentes insertos correspondientes a secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas estructurales VP2, VP5 y VP7 del BTV para estudios tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos vectores de expresión se administraron a conejos y ovejas para evaluar la respuesta inmunitaria con respecto a ELISA y valoración de anticuerpos neutralizantes, y se ensayó en ovejas la eficacia protectora de las construcciones de VP2 y VP5. VP2, VP5 y VP2 + VP5 expresados por el virus vaccinia eran protectores, encontrándose la protección más reproducible en animales inmunizados tanto con VP2 como con VP5, sin embargo, la protección incluso con esta construcción era variable.

[0008] Sería ventajoso proporcionar composiciones de vacuna e inmunógenas mejoradas contra el BTV, y procedimientos para hacer y usar dichas composiciones, incluyendo dichas composiciones que proporcionan procedimientos de diagnóstico diferenciales, ensayos y kits.

[0009] La cita o identificación de cualquier documento en esta solicitud no es admisión de que dicho documento está disponible como técnica anterior de la presente invención.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] La presente invención proporciona una composición inmunógena que induce una respuesta inmunitaria contra el virus *Orbivirus* (OV) en un animal susceptible a la enfermedad Orbiviral, que comprende un vector que comprende un virus recombinante; en la que el virus recombinante es un avipoxvirus recombinante; en el que además el virus recombinante codifica y expresa *in vivo* en el animal, polipéptidos de la cápside externa del *Orbivirus*; en el que los polipéptidos de la cápside externa de del *Orbivirus* son VP2 y VP5; en el que el *Orbivirus* es el virus de la lengua azul (BTV);

en la que el virus recombinante comprende una molécula de ácido nucleico que codifica VP2 de BTV que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 20 y una molécula de ácido nucleico que codifica VP5 de BTV que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 21, en la que la molécula de ácido nucleico que codifica VP2 de BTV que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 20 está operativamente unida a un promotor específico de poxvirus, y la molécula de ácido nucleico que codifica VP5 de BTV que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 21 está operativamente unida a un promotor específico de poxvirus; o en la que el virus recombinante comprende una molécula de ácido nucleico que codifica VP2 de BTV que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 y una molécula de ácido nucleico que codifica VP5 de BTV que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 que codifica VP2 de BTV está operativamente unida a un promotor específico de poxvirus, y la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 que codifica VP5 de BTV está operativamente unida a un promotor específico de poxvirus.

[0011] También se proporciona en el presente documento, el uso de una composición inmunógena de acuerdo con la invención, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria inmunológica o protectora contra el BTV en un animal.

[0012] Además, se proporciona en el presente documento una composición inmunógena de acuerdo con la invención, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunológica contra el BTV y contra otro patógeno en un animal.

[0013] Se proporciona en el presente documento una composición inmunógena de acuerdo con la invención, en la que (a) se formula para administración antes de (b) en un régimen de sensibilización-refuerzo, o (b) se formula para la administración antes de (a) en un régimen de sensibilización-refuerzo, o (a) y (b) se formulan para la

administración juntos, sea secuencialmente o en mezcla; en el que (a) es la composición inmunógena de acuerdo con la invención, y (b) es un antígeno, inmunógeno o epítipo del mismo aislado del BTV.

[0014] Se proporciona además en el presente documento, el uso de una composición inmunógena de acuerdo con la invención, en la fabricación de un diagnóstico diferencial, en el que el diagnóstico se formula para la administración a un animal y se ensaya en el animal la presencia o ausencia de una proteína de BTV o anticuerpo para la misma, no expresada por la composición inmunógena de acuerdo con la invención.

[0015] Se proporciona además todavía en el presente documento una composición inmunógena de acuerdo con la invención para usar en la inducción de una respuesta inmunitaria inmunológica o protectora contra el BTV en un animal.

[0016] Se proporciona además en el presente documento una composición inmunógena de acuerdo con la invención para usar en la inducción de una respuesta inmunitaria inmunológica o protectora contra el BTV y contra otro patógeno en un animal.

[0017] Se proporciona en el presente documento una composición inmunógena de acuerdo con la invención, en la que (a) se formula para administración antes de (b) en un régimen de sensibilización-refuerzo, o (b) se formula para la administración antes de (a) en un régimen de sensibilización-refuerzo, o (a) y (b) se formulan para la administración juntos, sea secuencialmente o en mezcla; en la que (a) es la composición inmunógena de acuerdo con la invención, y (b) es el antígeno, inmunógeno o epítipo del mismo aislado del BTV.

[0018] También se proporciona en el presente documento una composición inmunógena de acuerdo con la invención, para usar como un diagnóstico diferencial, en el que el diagnóstico se formula para administrar a un animal y se ensaya en el animal la presencia o ausencia de una proteína de BTV o anticuerpo para la misma, no expresada por la composición inmunógena de acuerdo con la invención.

[0019] La presente invención también proporciona un kit que comprende la composición inmunógena de acuerdo con la invención y un ensayo para ensayar la presencia o ausencia de la proteína de BTV, en recipientes separados, opcionalmente con instrucciones para la administración de la composición inmunógena y/o para realizar el ensayo.

[0020] Se proporciona además un kit que comprende (a) la composición inmunógena de acuerdo con la invención, y (b) el antígeno o inmunógeno o epítipo del mismo, de un patógeno distinto del BTV del animal, o el vector contiene y expresa *in vivo* en el animal una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno, inmunógeno o epítipo del mismo, o el patógeno inactivado o atenuado distinto del BTV del animal, en el que (a) y (b) están en recipientes separados, y el kit comprende opcionalmente instrucciones para la mezcla y/o administración de (a) y (b).

[0021] La presente descripción se refiere a una composición inmunógena o de vacuna para inducir una respuesta inmunitaria o respuesta inmunoprotectora contra *Orbivirus*, en especial el virus de la lengua azul (BTV) en un animal susceptible al BTV o virus relacionado, que comprende o consiste esencialmente en un vehículo o excipiente aceptable en farmacia o veterinaria y un vector que contiene o consiste esencialmente en moléculas de ácido nucleico heterólogas, y que expresa *in vivo* en el animal una proteína, antígeno, inmunógeno o epítipo del mismo del *Orbivirus* BTV, tal como, pero se limita a polipéptidos VP2 de BTV (L2) y VP5 de BTV (M5).

[0022] El vector puede ser un plásmido de ADN recombinante o un virus recombinante, tal como un adenovirus recombinante, herpesvirus o poxvirus, p. ej., un avipoxvirus, tal como el virus de la viruela de canarios o un virus de la viruela de aves de corral. El animal se puede seleccionar del grupo de ungulados que consiste en ovinos, bovinos, porcinos, cabras, antílope, equino, llama y otros.

[0023] Ventajosamente, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste esencialmente en los nucleótidos 20-2887 (SEQ ID NO: 3 y 1) que codifican VP2 de BTV (L2) y respectivamente, nucleótidos 30-1610 (SEQ ID NO: 4 y 2) que codifican la proteína VP5 de BTV (M5). Una realización preferida de la descripción comprende o consiste en moléculas de ácido nucleico de codones optimizados para mamífero.

[0024] La composición inmunógena o de vacuna puede comprender además un adyuvante, tal como un carbómero.

[0025] La composición inmunógena o de vacuna puede comprender además un antígeno o inmunógeno o

epítipo del mismo, de un patógeno distinto del BTV del animal, o un vector que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno, inmunógeno o epítipo del mismo y la expresa *in vivo* en el animal, o un patógeno inactivado o atenuado distinto del BTV.

5 **[0026]** La descripción implica además un kit que comprende o consiste esencialmente en (a) la composición inmunógena o de vacuna, y (b) el antígeno o inmunógeno o epítipo del mismo de un patógeno distinto del BTV del animal, o el vector que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno, inmunógeno o epítipo del mismo y lo expresa *in vivo* en el animal, o el patógeno inactivado o atenuado distinto del BTV del animal, en el que (a) y (b) están en recipientes separados, y el kit comprende opcionalmente instrucciones para la mezcla y/o
10 administración de (a) y (b).

[0027] La descripción también comprende un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria inmunológica o protectora contra el BTV en un animal, que puede comprender administrar al animal la composición inmunógena o de vacuna que contiene la molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno, inmunógeno o epítipo
15 del mismo.

[0028] La descripción comprende además un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria inmunológica o protectora contra el BTV en un animal, que puede comprender administrar al animal (a) la composición inmunógena o de vacuna, y (b) un antígeno, inmunógeno o epítipo del mismo de BTV aislado, en el que (a) se administra antes de (b) en un régimen de sensibilización-refuerzo, o (b) se administra antes de (a) en un régimen de sensibilización-refuerzo, o (a) y (b) se administran juntos, sea secuencialmente o en mezcla. La descripción también implica un kit para llevar a cabo esto, que puede comprender (a) y (b) en recipientes separados, opcionalmente con instrucciones para la mezcla y/o administración.

25 **[0029]** La descripción comprende además incluso una inmunización o vacunación de sensibilización-refuerzo contra el BTV, en el que la sensibilización con (a) vacuna(s) de ADN o composición(es) inmunológica(s) o inmunógena(s) que contiene(n) o consiste(n) esencialmente en (a) molécula(s) de ácido nucleico que codifica(n) y expresa(n) *in vivo* un inmunógeno, antígeno o epítipo de BTV, y el refuerzo se hace con (a) vacuna(s) o composición(es) inmunológica(s) o inmunógena(s) que es(son) una preparación(es) de BTV inactivado o atenuado o subunidad (antígeno, inmunógeno y/o epítipo), y/o (a) vacuna de virus recombinante o modificado o
30 composición(es) inmunológica(s) o inmunógena(s) que contiene(n) o consiste(n) esencialmente en (a) molécula de ácido nucleico que codifica y expresa *in vivo* (a) inmunógeno(s), antígeno(s) o epítipo(s) de BTV. Por lo tanto, la descripción proporciona un procedimiento de inmunización o vacunación de sensibilización-refuerzo contra el BTV, tal como una inmunización o vacunación de sensibilización-refuerzo que comprende administrar a una especie animal diana (a) vacuna(s) de ADN o composición(es) inmunológica(s) o inmunógena(s) de la invención (que contiene o consiste esencialmente en molécula(s) de ácido nucleico que codifica(n) y expresa(n) *in vivo* antígeno(s), inmunógeno(s) o epítipo(s) (como sensibilización) y después administrar (como refuerzo) preparación(es) de BTV inactivado y/o BTV atenuado o una subunidad de BTV (antígeno, inmunógeno y/o epítipo)) y/o vacuna de virus recombinante o modificado o composición inmunológica o inmunógena que puede comprender molécula(s) de ácido
40 nucleico que codifica(n) y expresa(n) *in vivo* inmunógeno(s), antígeno(s) o epítipo(s) de BTV, ventajosamente (a) vacuna recombinante o composición(es) inmunológica(s) o inmunógena(s) que expresa(n) el inmunógeno, antígeno o epítipo *in vivo*. El refuerzo se puede corresponder ventajosamente con la sensibilización, p. ej., el refuerzo contiene o consiste esencialmente en, o expresa al menos un antígeno, epítipo o inmunógeno que es expresado por la sensibilización.

45 **[0030]** El régimen de sensibilización-refuerzo de acuerdo con la descripción se puede usar en animales de cualquier edad, ventajosamente animales jóvenes (p. ej., animales que tienen anticuerpos maternos detectables y/o en cría o amamantamiento o lactante), animales preadultos (animales que son más mayores que un animal joven, pero todavía no han alcanzado la madurez o adultez o una edad para apareamiento o reproducción), animales
50 adultos (p. ej., animales que tienen una edad para apareamiento o reproducción o están más allá de este periodo en la vida), y es ventajoso usar el régimen de sensibilización-refuerzo en hembras embarazadas o hembras antes de parir, fecundación o inseminación.

[0031] La descripción también se refiere a dichas composiciones inmunógenas y de vacuna y kits de las
55 mismas adecuadas para usar en dichos regímenes de sensibilización-refuerzo, y a los regímenes de sensibilización-refuerzo. La especie hospedante u objetivo en la cual se puede practicar el régimen de sensibilización-refuerzo, incluye cualquier especie animal (objetivo u hospedante) susceptible a la enfermedad causada por infección por Orbivirus que incluyen mamíferos, reptiles, aves, en especial seres humanos, mamíferos o animales de compañía, tales como, pero no se limitan a, a caninos, felinos, equinos, mamíferos o animales de zoológico, tales como

animales acuáticos, p. ej., focas, felinos, equinos, reptiles de zoológico, tales como serpientes, cocodrilos, caimanes y especies de aves.

[0032] El régimen de sensibilización-refuerzo es especialmente ventajoso para practicar en un animal joven, ya que permite la vacunación o inmunización a una edad temprana, por ejemplo, cuando se realiza en un animal joven la primera administración en el régimen de sensibilización-refuerzo puede ser a una edad en la que el animal joven tiene anticuerpos maternos. Otra ventaja de este régimen es que puede proporcionar un grado de seguridad para hembras preñadas presentes en el mismo sitio o cerca del joven o unos de otros. Por lo tanto, la descripción proporciona un procedimiento de inmunización o vacunación de sensibilización-refuerzo contra el BTV, y el procedimiento se puede practicar en un animal joven, tal como un cordero, cachorro de perro o de gato, por ejemplo, en el que la sensibilización se hace en el momento en el que animal joven tiene anticuerpos maternos contra el BTV, con el refuerzo ventajosamente en el momento en el que los anticuerpos maternos pueden estar decayendo o disminuyendo o no estar normalmente presentes, tal como un período de tiempo después de amamantamiento, lactancia.

[0033] Por consiguiente, la descripción también implica kits para llevar a cabo un régimen de sensibilización-refuerzo que comprende o consiste esencialmente en una vacuna o composición inmunológica o inmunógena de sensibilización y una vacuna o composiciones inmunológicas o inmunógenas de refuerzo, en recipientes separados, opcionalmente con instrucciones para la mezcla y/o administración.

[0034] Aún más, la descripción proporciona un procedimiento de diagnóstico diferencial que comprende administrar a animales una composición inmunógena o de vacuna y/o un antígeno, inmunógeno o epítipo de BTV, y ensayar en los animales la presencia o ausencia de una proteína del BTV o anticuerpo para la misma no expresada por la composición inmunógena o de vacuna y/o no presente en el antígeno, inmunógeno o epítipo de TV. La descripción implica además un kit para llevar a cabo este procedimiento que comprende la composición inmunógena o de vacuna y/o el antígeno, inmunógeno o epítipo de BTV, y un ensayo para ensayar la presencia o ausencia de la proteína del BTV, en recipientes separados, opcionalmente con instrucciones para la administración de la composición inmunógena o de vacuna y/o el antígeno, inmunógeno o epítipo de BTV y/o para realizar el ensayo.

[0035] Hay que indicar que en esta descripción y en particular en las reivindicaciones y/o párrafos, los términos tales como “comprende”, “comprendido”, “que comprende” y similares, y términos tales como “que consiste esencialmente en” y “consiste esencialmente en” tienen el significado adscrito a los mismos en la ley de patentes de EE.UU., p. ej., permiten elementos no citados explícitamente, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o nueva de la invención.

[0036] Estas y otras realizaciones se describen o son obvias en y están abarcadas en la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS DIBUJOS

[0037] La siguiente descripción detallada, dada a modo de ejemplo, pero que no se pretende que limite la invención solo a las realizaciones específicas descritas, se puede entender mejor junto con los dibujos que acompañan.

La figura 1 representa la secuencia de ácido nucleico de VP2 natural de BTV-17 (SEQ ID NO: 3) frente a VP2 de codones optimizados de BTV-17 sintética (SEQ ID NO: 1).

La figura 2 representa la secuencia de ácido nucleico de VP5 natural de BTV-17 (SEQ ID NO: 4) frente a VP5 de codones optimizados de BTV-17 sintética (SEQ ID NO: 2).

La figura 3 es un esquema que muestra la construcción del plásmido 043004pPCR-Script que codifica la proteína VP2 de BTV sintética optimizada.

La figura 4 es un esquema que muestra un mapa de endonucleasas de restricción del plásmido donador pNVH6C5LSP-18.

La figura 5 es un esquema que muestra la construcción de pCXL148.2, un plásmido donador ALVAC.

La figura 6 proporciona la secuencia de ácido nucleico del plásmido donador pCXL148.2 (SEQ ID NO: 13)

La figura 7 es un esquema que muestra la construcción de pALVAC C5H6p-VP2 BTV sintética (pLH2030.2), plásmido donador.

La figura 8 es un esquema que muestra la construcción del plásmido 043005pPCR-Script que codifica la proteína VP5 de BTV por adición de la secuencia promotora sintética 42Kp del Entomopoxvirus *Amsacta moorei* al fragmento VP5de BTV.

La figura 9 es un esquema que muestra el esquema de clonación para la VP5 de BTV sintética optimizada dirigida por el promotor 42Kp en el vector de clonación/transportador pCR2.1 TOPO (creando pCR2-42KpVP5) para la amplificación del casete 42KpVP5.

La figura 10 es un esquema que muestra la construcción del vector de homología donador final vector pC5H6pVP2 42KpVP5 (pLH2078.15) que contiene VP2 optimizada dirigida por el promotor H6 y VP5 de BTV optimizada dirigida por el promotor 42K con homología de vector con la región C5R de ALVAC.

La figura 11 proporciona datos de la secuencia de ácido nucleico y proteína para pLH2078.15 (pC5 H6p BTV-VP2 sintética 42Kp BTV-VP5 sintética), el vector de homología final para la creación de ALVAC+BTV recombinante. A describe las SEQ ID NO: 20-21, respectivamente, en orden de aparición. B describe las SEQ ID NO: 20-21 que codifican la SEQ ID NO: 19. C describe los nucleótidos 1800-6293 de las SEQ ID NO: 20-21 que codifican la SEQ ID NO: 19. D describe la SEQ ID NO: 22.

La figura 12 representa un diagrama de flujo que ilustra la construcción del vector vírico ALVAC recombinante que codifica la VP2 y VP5 sintéticas optimizadas de BTV (vCP2289).

La figura 13 es un mapa de digestión de RE para ALVAC-vCP2289 de BTV recombinante generado a partir de plásmido y secuencias de ácidos nucleicos de ALVAC hechos por el programa Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad, CA).

La figura 14 es un gel de agarosa teñido que muestra la digestión por endonucleasas de restricción del ADN genómico preparado a partir de ALVAC+vCP2289 del virus recombinante BTV (compárese con el patrón de bandas esperado teórico como se ilustra en la figura 13 anterior).

La figura 15 muestra un análisis de transferencia Southern de digestión por endonucleasas de restricción de ADN genómico de vCP2289 hibridado con una sonda de ADN específica de BTV.

La figura 16 presenta una transferencia Western de lisato de CEF y fracciones de líquido sobrenadante, preparadas después de infección con dos aislados diferentes de hibridación de vCP2289 para la expresión de VP5 a partir del virus recombinante ALVAC. La sonda de anticuerpo primario era sueros policlonales de conejo específicos dirigidos contra VP5 BTV-17 usados con una dilución 1:2000.

La figura 17 es una gráfica de las temperaturas corporales medias de ovejas inmunizadas con vCP2289 comparadas con la vacuna de control WNV-CP después de exposición a BTV-17 de tipo natural virulento.

La figura 18 es una gráfica que muestra el recuento medio de glóbulos blancos (WBC) de ovejas inmunizadas con vCP2289 comparadas con una vacuna de control WNV-CP después de exposición a BTV-17 de tipo salvaje virulento.

La figura 19 es una gráfica que muestra el recuento medio de linfocitos de ovejas inmunizadas con vCP2289 comparadas con una vacuna de control WNV-CP después de exposición a BTV-17 de tipo salvaje virulento.

La figura 20 es una gráfica que muestra el recuento medio de plaquetas de ovejas inmunizadas con vCP2289 comparadas con una vacuna de control WNV-CP después de exposición a BTV-17 de tipo natural virulento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0038] Como se describe en el presente documento, la presente descripción se refiere a vectores que contienen al menos un polinucleótido de BTV o al menos una molécula de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno, inmunógeno o epítipo de BTV, p. ej., vectores de expresión *in vivo* o *in vitro* que comprenden al menos un polinucleótido de BTV o vectores de expresión *in vivo* o *in vitro* que comprenden y expresan al menos un antígeno, inmunógeno o epítipo de BTV, así como composiciones inmunógenas y vacunas contra la enfermedad de la lengua azul; por ejemplo, dichas composiciones o vacunas que contienen uno o más vectores y/o uno o más productos de expresión de los vectores.

[0039] Ventajosamente, los inmunógenos, antígenos comprenden la proteína de cápside externa VP2 (L2), o la proteína de cápside externa VP5 (M5), o epítipos o combinaciones de los mismos, p. ej., VP2 y VP5; VP2; y VP5 o un fragmento de las mismas. Las combinaciones pueden ser proteínas o poliproteínas separadas. Las composiciones o vacunas así obtenidas contienen uno o más vectores que expresan más de una de las proteínas, p. ej., diferentes proteínas. Las composiciones o vacunas pueden comprender, o vectores de las mismas expresar, proteínas de diferentes cepas o aislados de BTV. Por lo tanto, las composiciones o vacunas pueden comprender, o los vectores de las mismas expresar, VP2, VP5 o combinaciones de las mismas, en los que VP2 y VP5 son de diferentes cepas o aislados.

[0040] En relación con esto, hay que indicar que hay el aislado o cepa de serotipo BTV 17, p. ej., aislados de campo (depositados como segmentos en GenBank: (de Mattos, de Mattos *et al.*, 1994) [VP2] aislado 17B81, SEQ ID No. S72158; (Mecham y Johnson 2005) [VP5] aislado FL99, SEQ ID No: AY855281); y/o American Type Culture Collection VR-875™ (depositado como serotipo 17 de BTV; sangre de oveja con enfermedad de la lengua azul típica, Wyoming, 1962). Debido a la naturaleza segmentada del genoma del BTV, las secuencias de nucleótidos

genómicas para cada segmento se determinan de forma individual para cada segmento de serotipo. La tabla 2 cita las secuencias disponibles para el serotipo 17 de BTV.

Tabla 2

BTV-17 - Número de secuencias de ARN disponibles para el serotipo 17 de BTV.										
		Número de segmento genómico								
1 (VP1 (Pol))	2 (VP2)	3 (VP3(T2))	4 (VP4(CaP))	5 (NS1(ATuP))	6 (VP5)	7 (VP7(T13))	8 (NS2(ViP))	9 (VP6(Hel))	10 (NS3)	
1	5	2	1	2	2	6	1	7	8	

[0041] También se observa que el análisis filogenético comparativo de secuencias de VP2 dentro de los serotipos indica un grado de homología, pero existe suficiente variabilidad inherente para permitir la distinción de los linajes de virus dentro de un solo serotipo. El serotipo de BTV está controlado principalmente por la proteína VP2 de la cápside externa, codificada por el segmento de genoma 2. Se prevé que el análisis de secuencia del segmento 2 se podría usar no solo para identificar el serotipo de virus sino también, por comparación con secuencias de cepas de referencia, para identificar los orígenes de cepas de virus individuales.

[0042] Ventajosamente en realizaciones que implican al menos un epítopo presente en, o expresado por vector o vectores en, composiciones o vacunas de la descripción, el epítopo o epítopos son de VP2, VP5 o combinaciones de los mismos, y el epítopo o epítopos pueden ser de diferentes cepas o aislados. En relación con esto, se observa que se pueden localizar o cartografiar epítopos en antígenos o inmunógenos de BTV, tales como la proteína VP5; véase, p. ej., (Martínez-Torrecuadrada, Langeveld *et al.* 1999) y (Wang, Du Plessis *et al.* 1995), la proteína VP2 (Heidner, Rossitto *et al.* 1990; Rossitto y MacLachlan 1992; DeMaula, Bonneau *et al.* 2000) y la proteína VP1 (Huang, Hwang *et al.* 1995).

[0043] Como se describe en el presente documento, la descripción se refiere a procedimientos para usar los vectores, composiciones inmunológicas y vacunas, que incluyen la inmunización y vacunación contra este virus, para la expresión de polipéptidos codificados por el o los polinucleótidos, y a procedimientos para usar los productos de expresión en ensayos o para generar anticuerpos útiles en ensayos, así como a procedimientos para hacer el o los polinucleótidos, vectores, composiciones de vacunas, ensayos, entre otros.

[0044] La presente descripción se refiere por lo tanto a medios para prevenir y/o combatir enfermedades causadas por el BTV, de modo que disminuyan o se anulen los signos clínicos y/o la viremia y/o las lesiones.

[0045] La descripción se refiere a dichas composiciones inmunógenas y de vacuna adecuadas para usar en diferentes especies animales (objetivo u hospedante) susceptibles a la enfermedad causada por el BTV, que incluyen, pero no se limitan a mamíferos, reptiles, aves, en especial seres humanos, mamíferos o animales de compañía, tales como caninos, felinos, equinos, mamíferos o animales de zoológico, tales como animales acuáticos, felinos, equinos, reptiles de zoológico, y especies de aves.

[0046] La descripción se refiere además a procedimientos de inmunización y vacunación que implican composiciones inmunógenas y de vacuna, para la especie objetivo u hospedante. Y en este aspecto de la descripción, se menciona que como animales salvajes o no domesticados, tales como, pero no se limitan a, aves o mamíferos salvajes o no domesticados, las composiciones que comprenden uno o más vectores que expresan uno o más epítopos o antígenos o inmunógenos de BTV, se pueden suministrar por el alimento, p. ej., un cebo, o alimento para mamíferos o aves, dejado para que lo consuman aves o mamíferos salvajes o no domesticados, que incluye o contiene el uno o más vectores, de modo que puede darse la administración por vía oral de los mismos al consumir el alimento el mamífero o ave. Esta vía de administración puede ser ventajosa cuando el uno o más vectores son uno o más poxvirus, p. ej., un avipoxvirus tal como virus atenuado de la viruela del canario atenuado, por ejemplo ALVAC, o un virus de la viruela de aves de corral atenuado, por ejemplo TROVAC, o un virus vaccinia, tal como un virus vaccinia atenuado, por ejemplo NYVAC. Por consiguiente, la descripción contempla la administración oral o por mucosa, así como composiciones comestibles que contienen uno o más de los vectores descritos en el presente documento, similares al producto para conejos de MERIAL RABORAL™. A partir de esta descripción y el conocimiento en la técnica, el experto puede formular alimento comestible para animales para un ave o mamífero, que contiene una dosis adecuada de uno o más vectores descritos en el presente documento. Además, la descripción comprende la administración tópica de composiciones que contienen vectores, véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 6348450 en relación con la administración tópica de composiciones de vectores, y dispositivos para la administración tópica de composiciones para animales salvajes o no domesticados, véase, p. ej., el documento WO01/95715, solicitud de EE.UU. n.º de serie 10/374627, presentada el 26 de febrero, 2003, para dichos dispositivos para roedores y pájaros.

[0047] La descripción se refiere además a medios y procedimientos para hacer posibles diagnósticos diferenciales, p. ej., procedimientos para hacer, o permitir, una distinción entre un animal infectado por BTV patógeno y un animal al que se ha administrado una vacuna o composición inmunógena de acuerdo con la descripción.

[0048] Además del polinucleótidos que codifica VP2 y VP5, los vectores de expresión de acuerdo con la descripción, pueden comprender uno o más de otros polinucleótidos que codifican otras proteínas de BTV, preferiblemente proteínas estructurales de BTV y dichas secuencias se seleccionan preferiblemente de las que

codifican proteínas víricas estructurales.

[0049] El vector preferiblemente comprende un polinucleótido que codifica regiones que corresponden, p. ej., a VP2, VP5 o ventajosamente VP2 y VP5, o epítomos de las mismas; es decir, se considera ventajosa la expresión de múltiples proteínas o epítomos de las mismas. Un vector que comprende varios polinucleótidos separados que codifican las diferentes proteínas (p. ej., VP2 y/o VP5 o epítomos de las mismas) también está dentro del alcance de la presente descripción. El vector, en especial para la expresión *in vivo*, también puede comprender polinucleótidos que corresponden a más de un serotipo, cepa o aislado de BTV, por ejemplo, dos o más polinucleótidos que codifican VP2 o VP5 o epítomo(s) de las mismas, de diferentes cepas. De todos los serotipos diferentes tales como, pero no se limitan a, serotipos 1, 2, 4, 9, 10, 11, 13, 16 y 17.

[0050] Igualmente, una composición inmunógena o de vacuna puede comprender uno o más vectores para la expresión de polinucleótidos que corresponden a más de un serotipo, cepa o aislado de BTV, por ejemplo, dos o más polinucleótidos que codifican VP2 o VP5 o epítomo(s) de las mismas de diferentes cepas. El vector, en especial para la expresión *in vivo*, puede comprender además una o más secuencias de nucleótidos que codifican inmunógenos de otros agentes patógenos y/o citoquinas.

[0051] La expresión polinucleótido que codifica una proteína de BTV significa principalmente un fragmento de ADN o molécula de ADN aislada que codifica dicha proteína, o la cadena complementaria del mismo; pero no está excluido el ARN, ya que se entiende en la técnica que la timidina (T) en una secuencia de ADN se considera igual al uracilo (U) en una secuencia de ARN. Por lo tanto, las secuencias de ARN para usar en la invención, p. ej., para usar en vectores de ARN, se pueden obtener de secuencias de ADN, considerándose la timidina (T) en la secuencia de ADN igual al uracilo (U) en las secuencias de ARN.

[0052] El término proteína incluye péptidos y polipéptidos. Un fragmento de proteína es inmunológicamente activo en el sentido de que una vez administrado al hospedante, es capaz de inducir una respuesta inmunitaria de tipo humoral y/o celular dirigida contra la proteína. Preferiblemente, el fragmento de proteína es tal que tiene sustancialmente la misma actividad inmunológica que la proteína total. Por lo tanto, un fragmento de proteína de acuerdo con la descripción comprende o consiste esencialmente en, o consiste en al menos un epítomo o determinante antigénico. El término epítomo se refiere a un sitio de la proteína que es capaz de inducir una reacción inmunitaria de tipo humoral (linfocitos B) y/o de tipo celular (linfocitos T).

[0053] Por consiguiente, una estructura mínima del polinucleótido es aquella que comprende o consiste esencialmente en o consiste en nucleótidos que codifican un epítomo o determinante antigénico de la proteína de BTV. Un polinucleótido que codifica un fragmento de la proteína total, más ventajosamente que comprende o consiste esencialmente o consiste en un mínimo de 21 nucleótidos, ventajosamente al menos 42 nucleótidos, y preferiblemente al menos 57, 87 o 150 nucleótidos consecutivos o contiguos de la secuencia que codifica la proteína total o poliproteína. Como se ha mencionado antes, se pueden usar procedimientos de determinación de epítomos, tales como, la generación de bibliotecas de péptidos de que solapan (Hemmer, Pinilla *et al.* 1998), Pepscan (Geysen, Meloen *et al.* 1984); (Geysen, Barteling *et al.* 1985); (Van der Zee, Van Eden *et al.* 1989); (Geysen 1990); Multipin® Peptide Synthesis Kits de Chiron) y algoritmos (De Groot y Rothman 1999), en la práctica de la invención, sin experimentación excesiva. También se pueden consultar otros documentos citados en el presente documento, para los procedimientos de determinación de epítomos de un inmunógeno o antígeno y por lo tanto las moléculas de ácido nucleico que codifican dichos epítomos.

[0054] Ventajosamente están presentes en un vector elementos para la expresión del polinucleótido o polinucleótidos. De forma mínima, esto comprende, consiste esencialmente en o consiste en un codón de inicio (ATG), un codón de parada y un promotor, y opcionalmente también una secuencia de poliadenilación para algunos vectores tales como vectores plasmídicos y de algunos virus, p. ej., vectores víricos distintos de poxvirus. Cuando el polinucleótido codifica un fragmento de proteína, p. ej., ventajosamente en el vector, se coloca un ATG en 5' del marcado de lectura y se coloca un codón de parada en 3'. Pueden estar presentes otros elementos para controlar la expresión, tales como secuencias potenciadoras, secuencias estabilizantes y secuencias señal, que permiten la secreción de proteína.

[0055] Los procedimientos para hacer y/o administrar un vector o recombinantes o plásmido para la expresión de productos génicos de genes de la descripción, sea *in vivo* o *in vitro*, puede ser cualquier procedimiento deseado, p. ej., un procedimiento que es o es análogo a los procedimientos descritos en, o descritos en los documentos citados en: patentes de EE.UU. n.º 6130066, 5494807, 5514375, 5744140, 5744141, 5756103, 5752938, 5766599, 5990091, 6004777, 6130066, 6497883, 6464984, 6451770, 6391314, 6387376, 6376473,

6368603, 6348196, 6306400, 6228846, 6221362, 6217883, 6207166, 6207165, 6159477, 6153199, 6090393, 6074649, 6045803, 6033670, 6485729, 6103526, 6224882, 6312682, 6312683, 6348450, 4603112; 4769330; 5174993; 5505941; 5338683; 5494807; 4394448; 4722848; 4745051; 4769331; 5591639; 5589466; 4945050; 5677178; 5591439; 5552143; y 5580859; solicitud de patente de EE.UU. n.º de serie 920197, presentada el 16 de octubre de 1986; WO 94/16716; WO 96/39491; WO91/11525; WO 98/33510; WO 90/01543; EP 0370573; EP 265785; (Paoletti 1996); (Moss 1996); Richardson (Ed) (1995) *Methods in Molecular Biology* 39, "Baculovirus Expression Protocols", Humana Press Inc.; (Smith, Summers *et al.* 1983); (Pennock, Shoemaker *et al.* 1984); (Roizman 1996); (Andreansky, He *et al.* 1996); (Robertson, Ooka *et al.* 1996); (Frolov, Hoffman *et al.* 1996); (Kitson, Burke *et al.* 1991); (Ballay, Levrero *et al.* 1985); (Graham 1990); (Prevec, Schneider *et al.* 1989); (Felgner, Kumar *et al.* 1994); (Ulmer, Donnelly *et al.* 1993); (McClements, Armstrong *et al.*, 1996); (Ju, Edelstein *et al.*, 1998); y (Robinson y Torres 1997). Por lo tanto, el vector en la descripción puede ser cualquier virus o vector vírico recombinante adecuado, tal como un poxvirus (p. ej., virus vaccinia, avipoxvirus, virus de la viruela del canario, virus de la viruela de aves de corral, virus de la viruela del mapache, virus de la viruela del cerdo, etc.), adenovirus (p. ej., adenovirus canino), herpesvirus, baculovirus, retrovirus, etc.; o el vector puede ser un plásmido. Los citados en el presente documento además de proporcionar ejemplos de vectores útiles en la práctica de la invención, también pueden proporcionar fuentes para proteínas que no son de BTV o epítomos de las mismas, p. ej., inmunógenos que no son de BTV, o epítomos de los mismos, citoquinas, etc., para ser expresados por el vector o vectores en, o incluidos en composiciones inmunógenas o vacunas multivalentes o de cóctel de la descripción.

20 **[0056]** La presente descripción también se refiere a preparaciones que comprenden vectores, tales como vectores de expresión, p. ej., vacunas o composiciones inmunógenas. Las preparaciones pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en uno o más vectores, p. ej., vectores de expresión, tales como vectores de expresión *in vivo*, que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en (y ventajosamente expresan) uno o más de los polinucleótidos de BTV que codifican VP2, VP5 o combinaciones o poliproteínas de las mismas, en especial como se ha mencionado antes (VP2, VP5, VP2 y VP5 o al menos un epítomo de las mismas); y ventajosamente, el vector contiene y expresa un polinucleótido que incluye, consiste esencialmente en o consiste en una región codificante que codifica VP2 y/o VP5 de BTV, en un soporte, excipiente o vehículo aceptable en farmacia o veterinaria. Por lo tanto, de acuerdo con una realización de la descripción, el otro vector o vectores en la preparación comprenden, consisten esencialmente en o consisten en un polinucleótido que codifica, y en circunstancias adecuada el vector expresa una o más de otras proteínas de BTV, p. ej., VP2, VP5 o un epítomo de las mismas.

[0057] De acuerdo con otra realización, el vector o vectores en la preparación comprenden, consisten esencialmente en o consisten en polinucleótido(s) que codifica(n) una o más proteínas o epítomo(s) de las mismas de BTV, por ejemplo, uno o más serotipos, cepas o aislados de BTV; y ventajosamente, en una célula hospedante adecuada o en condiciones adecuadas, el vector o vectores expresan polipéptidos codificados por el o los polinucleótidos. La preparación descrita en el presente documento ventajosamente comprende, consiste esencialmente en o consiste en al menos dos vectores que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en, y ventajosamente también expresan, preferiblemente *in vivo* en condiciones apropiadas o condiciones adecuadas o en una célula hospedante adecuada, polipéptidos codificados por polinucleótidos de diferentes serotipos, cepas o aislados de BTV, que codifican las mismas proteínas y/o diferentes proteínas, pero preferiblemente las mismas proteínas. Como preparaciones que contienen uno o más vectores que contienen, consisten esencialmente en o consisten en polinucleótidos que codifican, y preferiblemente expresan ventajosamente *in vivo*, VP2 o VP5 de BTV o un epítomo de las mismas, se prefiere que los productos de expresión sean de dos, tres o más serotipos, cepas o aislados de BTV diferentes, ventajosamente cepas. La descripción también se dirige a mezclas de vectores que contienen, consisten esencialmente en o consisten en, codifican, y expresan, VP2 o VP5 de diferentes cepas. Se prefiere que, en dichas mezclas, al menos un vector contenga, consista esencialmente en o consista en, codifique y exprese VP2 o VP5 de diferentes cepas. Se prefiere que en dichas mezclas, al menos un vector contenga, consista esencialmente en, o consista en, codifique y exprese, VP2.

50 **[0058]** De acuerdo con otra realización más, como se mostrará con más detalle más adelante, el otro vector o vectores en la preparación comprende y expresa una o más citoquinas y/o uno o más inmunógenos de uno o más de otros agentes patógenos. Las fuentes de citoquinas, inmunógenos para otros agentes patógenos o epítomo(s) de los mismos, y moléculas de ácido nucleico que los codifican, se pueden encontrar en los documentos citados en el presente documento, así como en los documentos WO02096349, WO0208162, WO020025, WO0152888, WO0145735, WO0127097, WO0116330, WO0077210, WO0077188, WO0077043, WO9842743, WO9833928, WO9749826, WO9749825, patentes de EE.UU. n.º 6387376, 6306400, 6159477, 6156567, 6153199, 6090393, 6074649, 6033670.

[0059] La descripción también se refiere a diferentes combinaciones o diferentes realizaciones descritas en el presente documento, p. ej., composiciones o vacunas que contienen diferentes vectores, composiciones o vacunas que contienen un vector y una proteína (BTV o no BTV) y/o citoquinas, etc.

5 **[0060]** Las preparaciones que comprenden un vector de expresión *in vitro* o *in vivo* que comprenden y expresan un polinucleótido que codifica VP2, VP5, constituyen una realización preferida de la descripción.

[0061] De acuerdo con una realización ventajosa adicional, una o más de las proteínas estructurales adicionales VP7 y/o VP3 son expresadas conjuntamente con las proteínas estructurales VP2 y VP5 de acuerdo con
10 la descripción, sea por el mismo vector de expresión o por su propio vector de expresión. Se expresan preferiblemente juntos en un solo polinucleótido, p. ej., como una poliproteína. Es decir, en algunas realizaciones, el vector además contiene, consiste esencialmente en o consiste en, uno o más nucleótidos que codifican VP7 y/o VP3, o una composición o vacuna que además contiene, consiste esencialmente en o consiste en uno o más vectores adicionales que contienen, consiste esencialmente en o consiste en uno o más nucleótidos que codifican
15 VP7 y/o VP3; este vector o estos vectores expresan ventajosamente la(las) proteína(s) estructural(es); y, VP7 y VP3 son expresadas ventajosamente conjuntamente y, más ventajosamente, como una poliproteína.

[0062] De acuerdo con una realización ventajosa adicional, una o más proteínas no estructurales NS1, NS2 y NS3 y/o VP1, VP4 son expresadas conjuntamente con las proteínas estructurales VP2 y VP5 de acuerdo con la descripción, por el mismo vector de expresión, o por su propio vector de expresión. Es decir, en algunas realizaciones, el vector además contiene, consiste esencialmente en o consiste en, uno o más nucleótidos que codifican VP1, VP4, NS1, NS2 y/o NS3, o una composición o vacuna que además contiene, consiste esencialmente en o consiste en uno o más vectores que contienen, consisten esencialmente en o consisten en, uno o más nucleótidos que codifican VP1, VP4, NS1, NS2 y/o NS3; este vector o estos vectores ventajosamente expresa o
25 expresan la o las proteínas estructurales; y son expresados ventajosamente VP1, VP4, NS1, NS2 y/o NS3. Por lo tanto, la descripción se refiere también a un vector tal como un vector de expresión *in vivo* o *in vitro*, que comprende consiste esencialmente en o consiste en el o los polinucleótidos que codifican VP1, VP4, NS1, NS2 y NS3, combinaciones de las mismas, incluyendo poliproteínas de las mismas. El vector puede ser uno de los vectores descritos antes que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un polinucleótido que codifica una o más
30 proteínas estructurales, p. ej., combinaciones de VP2, VP5, VP7 y/o VP3 y poliproteínas de las mismas, p. ej., dicho vector que contiene o consiste esencialmente en polinucleótidos que codifican proteína o proteínas estructurales o epítomos de las mismas, también puede contener o consistir esencialmente en polinucleótidos de las mismas que codifican una o más proteínas no estructurales, combinaciones de las mismas, poliproteínas de las mismas, o epítomos de las mismas. Como alternativa, la descripción se refiere a una preparación como se ha descrito en lo que antecede, que también incorpora al menos uno de los vectores que contiene polinucleótido(s) que codifica(n) y
35 ventajosamente expresa(n) una proteína no estructural, y opcionalmente un soporte, vehículo o excipiente aceptable en farmacia o veterinaria.

[0063] Para preparar vectores, p. ej., vectores de expresión, de acuerdo con la descripción, el experto en la
40 materia tiene disponible diferentes serotipos, cepas y aislados de BTV y la descripción de la secuencia de nucleótidos de su genoma, véase, p. ej., la descripción del presente documento, también en relación con los 24 serotipos de BTV donde está disponible la información de secuencia de ácido nucleico (Wilson y Mecham 2000).

[0064] Se hace referencia, por ejemplo, a la cepa BTV-17. Para cada proteína se proporciona la
45 correspondiente secuencia de nucleótidos (de Mattos, de Mattos *et al.* 1994; Huang, Hwang *et al.* 1995; Bernard, Israel *et al.* 1997). Por comparación y alineamiento de las secuencias, se lleva cabo fácilmente la determinación de un polinucleótido que codifica dicha proteína en otro serotipo o cepa de BTV.

[0065] Como se describe en la presente memoria, el término polinucleótido se entiende que significa una
50 secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o un fragmento de la misma o un epítipo específico del mismo para una cepa de BTV particular; y por equivalencia, se entiende que el término polinucleótido incluye las correspondientes secuencias de nucleótidos de diferentes cepas de BTV y secuencias de nucleótidos que difieren debido a la degeneración de codones. Por lo tanto, se entiende que un polinucleótido que codifica VP2 de BTV que comprende, consiste esencialmente en o consiste en (a) nt 20-2887 de BTV-17 (SEQ ID NO:3), (b) las
55 correspondientes secuencias de diferentes cepas de BTV, y (c) las secuencias de nucleótidos que codifican VP2 de BTV pero difieren de (a) y (b) debido a la degeneración de codones.

[0066] El gen L2 de BTV que codifica la proteína de cápside externa, VP2, tiene el mayor grado de variabilidad genética entre cepas globales de BTV. Esto no es sorprendente puesto que esta proteína es

- responsable tanto de la neutralización de virus como de la especificidad de serotipo (Mecham, Dean *et al.* 1986; Roy 1992) y es probable que sea afectada por la selección de deriva genética y el efecto fundador. La deriva genética y el efecto fundador pueden dar como resultado variantes con mayor virulencia (Bernard, Israel *et al.* 1997). Se ha identificado una serie de determinantes de neutralización (Ghiasi, Fukusho *et al.* 1987; DeMaula, Heidner *et al.* 1993; Jewell y Mecham 1994). Se ha mostrado que VP2 es la proteína principalmente responsable de la unión y entrada en las células hospedantes de mamíferos (Hassan y Roy 1999). La variación entre los serotipos en general da como resultado segregación de los virus basada en serotipos independientemente del origen geográfico de aislamiento, cuando se usa análisis filogenético (Pritchard y Gould 1995; Bonneau, Zhang *et al.* 1999). El gen M5 de BTV codifica la proteína interior de la cápside externa, VP5, y tiene el segundo mayor grado de variabilidad genética entre los genes de BTV, mostrando 51-71 % de identidad dentro de un serogrupo dado. VP5 puede producir alteraciones conformacionales de la estructura de la cápside externa y cambios en las características de neutralización (Cowley y Gorman 1989; DeMaula, Bonneau *et al.* 2000). VP5 puede contribuir también al reconocimiento de células hospedantes (Roy 1992).
- 15 **[0067]** Debido a la variabilidad genética inherente dentro y fuera de serotipos, la descripción cubre polinucleótidos que codifican proteínas que tienen secuencias de aminoácidos, cuya identidad de secuencia u homología con la secuencia de aminoácidos consenso de BTV para la proteína, presenta equivalencia funcional. Por ejemplo, una proteína de cápside VP2 expresada puede tener más de 20 % de identidad con la correspondiente secuencia de cápside del polipéptido expresado de (a) que comprende los nucleótidos 20-2887 del segmento 2 de BTV-17 (SEQ ID NO:3), (b) las correspondientes secuencias de las diferentes cepas de BTV y/o (c) secuencias de nucleótidos que codifican VP2 de BTV pero difieren de (a) y (b) debido a la degeneración de codones, y de (a) y (b) debido a la variabilidad genética de cepa, serotipo y serogrupo. A pesar de esta variabilidad, funcionalmente los polinucleótidos codifican el polipéptido de cápside VP2.
- 25 **[0068]** Por lo tanto, la descripción comprende polinucleótidos que expresan dichos polipéptidos funcionalmente homólogos; y los correspondientes grados de homología o identidad de esos polinucleótidos respecto a los polinucleótidos que codifican polipéptidos con los cuales tienen homología o identidad polipéptidos homólogos. Los polipéptidos homólogos ventajosamente contienen uno o más epítomos del polipéptido con el cual hay una identidad u homología, tal que los polipéptidos homólogos presentan similitud o identidad inmunológica con el polipéptido con el cual hay identidad u homología, p. ej., el polipéptido homólogo produce respuesta inmunitaria similar o mejor (según el inmunólogo experto) que el polipéptido con el que hay identidad u homología, y/o el polipéptido homólogo se une a anticuerpos producidos por y/o a los cuales se une el polipéptido con el que hay identidad u homología, ventajosamente, y no a otros anticuerpos.
- 35 **[0069]** Por consiguiente, está contemplado que los fragmentos de polipéptidos homólogos y de polipéptidos con los que hay identidad u homología, ventajosamente aquellos fragmentos que presentan similitud o identidad inmunológica con los polipéptidos homólogos o polipéptidos con los que hay identidad u homología, son expresados, y por lo tanto, los polipéptidos que pueden representar fragmentos de polipéptidos u homólogos de polipéptidos y de polipéptidos con los que hay identidad u homología, también están contemplados y son útiles en la presente descripción.
- 40 **[0070]** La expresión "identidad de secuencia" indica una medida cuantitativa del grado de homología entre dos secuencias de aminoácidos de igual longitud, o entre dos secuencias de nucleótidos de igual longitud. Si las dos secuencias que se van a comparar no son de la misma longitud, se deben alinear con el mejor ajuste posible con la inserción de huecos, o alternativamente, truncado de los extremos de las secuencias de proteína. La identidad de secuencia se puede calcular como $((N_{\text{ref}} - N_{\text{dif}}) / N_{\text{ref}}) \times 100$, en donde N_{dif} es el número total de restos no idénticos en las dos secuencias cuando se alinean y en donde N_{ref} es el número de restos en una de las secuencias. Por lo tanto, la secuencia de ADN AGTCAGTC tendrá una identidad de secuencia de 75 % con la secuencia AATCAATC ($N_{\text{dif}}=2$ y $N_{\text{ref}}=8$). Un hueco se cuenta como no identidad del resto o restos específicos, es decir, la secuencia de ADN AGTGTC tendrá una identidad de secuencia de 75 % con la secuencia AGTCAGTC ($N_{\text{dif}}=2$ y $N_{\text{ref}}=8$). La identidad de secuencia se puede calcular alternativamente por el programa BLAST, p. ej. el programa BLASTP (Pearson y Lipman 1988) (www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST). En un aspecto de la descripción, el alineamiento se lleva a cabo con el procedimiento de alineamiento de secuencias ClustalW con los parámetros por defecto descritos por (Thompson, Higgins *et al.* 1994), disponibles en <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>. Por lo tanto, un polinucleótido puede ser cualquier molécula de ácido nucleico incluyendo ADN, ARN, LNA (ácidos nucleicos bloqueados), PNA, ARN, ARNbc, híbrido de ARN-ADN y nucleósidos que no se encuentran de forma natural.
- 55 **[0071]** Y a partir de la descripción del presente documento, ventajosamente, las proteínas o polipéptidos expresados por vectores de la descripción son péptidos y polipéptidos inmunológicamente activos, p. ej., con

respecto a los polipéptidos y proteínas de BTV-17, las proteínas o polipéptidos expresados por vectores de la descripción pueden ser:

- a) proteínas o polipéptidos correspondientes de uno o más serotipos, cepas o aislados de BTV diferentes,
- 5 b) proteínas que difieren de estos (de BTV-17 y/o a), pero que mantienen con la proteína de BTV natural una identidad igual o mayor que 20 %. Por lo tanto, una referencia a una proteína de BTV puede implicar proteínas adicionales como se describen en el presente documento.

[0072] Los diferentes serotipos y cepas de BTV están accesibles en colecciones, en especial en la American Type Culture Collection (ATCC), p. ej. con los números de acceso VR-875, VR-1231, VR-187, VR-873, VR-983, VR-1231AF o VR-1231CAF, y como se describe en otra parte en el presente documento, también se puede sintetizar químicamente el gen entero.

[0073] En la descripción, preferiblemente el polinucleótido también comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal, situado en la dirección 5' de la región codificante de la proteína expresada para facilitar la secreción de la misma; y por consiguiente, la descripción comprende la expresión de un polipéptido de BTV, tal como un antígeno, inmunógeno de BTV o fragmento del mismo, p. ej., epítipo, con una secuencia líder o señal. La secuencia líder o señal puede ser una secuencia endógena, p. ej., la secuencia señal natural de un polipéptido de BTV. La secuencia líder o señal también puede ser una secuencia heteróloga, y por lo tanto ser codificada por una secuencia de nucleótidos que es heteróloga del BTV. Por ejemplo, la secuencia líder o señal puede ser endógena al vector, o la secuencia líder o señal es heteróloga tanto al vector como a BTV, tal como un péptido señal del activador del plasminógeno tisular (tPA), p. ej., tPA humano, y por lo tanto, el vector o el polinucleótido incluido en este, puede incluir una secuencia que codifica el péptido líder o señal, p. ej., el péptido líder o señal del activador del plasminógeno tisular humano (tPA), (Hartikka, Sawdey *et al.* 1996). La secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal se inserta ventajosamente en el marco y en la dirección 5' de la secuencia que codifica el polipéptido de BTV, p. ej., VP2, VP5 o combinaciones, p. ej., VP2 y VP5.

[0074] De acuerdo con una realización de la descripción, los vectores, p. ej., vectores de expresión *in vivo* son vectores víricos.

[0075] Los vectores víricos, p. ej., vectores de expresión vírica son ventajosamente: poxvirus, p. ej., virus vaccinia o un virus vaccinia atenuado (por ejemplo, MVA, una cepa de Ankara modificada obtenida después de más de 570 pases de la cepa de vaccinia de Ankara en fibroblastos embrionarios de pollo; véase (Stickl y Hochstein-Mintzel 1971; Sutter y Moss 1992); disponible en ATCC VR-1508; o NYVAC, véase la patente de EE.UU. n.º 5494807, por ejemplo, los ejemplos 1 a 6 y siguientes de la patente de EE.UU. n.º 5494807, que describe la construcción de NYVAC, así como variaciones de NYVAC con ORF adicionales eliminados del genoma del virus vaccinia de la cepa de Copenhagen, así como la inserción de moléculas de ácidos nucleico codificantes heterólogas en sitios de este recombinante, y también, el uso de promotores emparejados; véase también el documento WO96/40241), avipoxvirus o un avipoxvirus atenuado (p. ej., de la viruela del canario, viruela de aves de corral, viruela de la paloma, viruela del pichón, viruela de la codorniz, ALVAC o TROVAC; véase, p. ej. patente de EE.UU. n.º 5505941, 5494807), virus de la viruela del cerdo, viruela del mapache, viruela del camello o de la mixomatosis; adenovirus, tales como adenovirus aviar, canino, porcino, bovino, humano; o herpesvirus, tales como herpesvirus ovino (OHV 1 y 2), herpesvirus equino (EHV serotipos 1 y 4), herpesvirus canino (CHV), herpesvirus felino (FHV), herpesvirus bovino (BHV serotipos 1 y 4), herpesvirus porcino (PRV), virus de la enfermedad de Marek (MDV serotipos 1 and 2), herpesvirus del pavo (HVT o MDV serotipo 3), herpesvirus de ánade. Cuando se usa un herpesvirus, se prefiere el vector HVT para la vacunación de la especie aviar, el vector bovino para la vacunación de ganado, el vector ovino para la vacunación de ovejas y el vector EHV para la vacunación de caballos.

[0076] De forma más general, en algunas realizaciones puede ser ventajoso emparejar un vector con un hospedante, tal como un virus equino, p. ej., EHV para usar en equinos, o un vector que es un patógeno aviar, tal como la viruela de aves de corral, HVT, MDV o herpes de ánade para usar en aves tales como aves de corral o pollos, o un vector que es un patógeno ovino tal como OHV, un patógeno bovino tal como BHV para usar en bovinos tales como vacas, o un vector que es un patógeno porcino tal como herpesvirus porcino para usar en porcinos, o un vector que es un patógeno canino tal como adenovirus canino o herpesvirus canino para usar en caninos tales como perros, un vector que es un patógeno felino tal como FHV para usar en felinos, ya que esto puede permitir una respuesta inmunitaria contra el vector y por lo tanto proporcionar una respuesta inmunitaria contra un patógeno del hospedante o especie objetivo además de una respuesta inmunitaria contra un orbivirus.

[0077] Sin embargo, también se indica que puede ser ventajoso que el vector no sea un patógeno natural del

hospedante; por ejemplo, de modo que el vector puede tener expresión del exógeno, p. ej., secuencias que codifican BTV, pero con replicación limitada o sin ella; por ejemplo, el uso de un vector de la viruela aviar en un hospedante mamífero, como en la patente de EE.UU. n.º 5174993. También se indica que la descripción comprende vacunas, composiciones inmunológicas e inmunógenas, usándose estos términos en el sentido atribuido a los mismos en la técnica; véase, p. ej., documentos citados en el presente documento, tales como la patente de EE.UU. n.º 6497883.

[0078] De acuerdo con otra realización de la descripción, el vector de poxvirus, p. ej., el vector de expresión es un virus de la viruela del canario o un vector de virus de la viruela de aves de corral, ventajosamente un virus de la viruela del canario o virus de la viruela de aves de corral atenuado. En relación con esto, el virus de la viruela del canario está disponible con el número de acceso en ATCC VR-111. Los virus de la viruela del canario atenuados se describen en la patente de EE.UU. n.º 5756103 (ALVAC) y WO01/05934. También están disponibles numerosas cepas de vacunación del virus de la viruela de aves de corral, p. ej. la cepa DIFTOSEC CT comercializada por MERIAL y la vacuna NOBILIS VARIOLE comercializada por Intervet; y también se hace referencia a la patente de EE.UU. n.º 5766599, que se refiere a la cepa de la viruela de aves de corral atenuada TROVAC.

[0079] Para información sobre poxvirus y cómo generar recombinantes de los mismos y cómo administrar recombinantes de los mismos, el experto en la materia puede remitirse a documentos citados en el presente documento y al documento WO90/12882, p. ej., en cuanto al virus vaccinia se mencionan las patentes de EE.UU. n.º 4769330, 4722848, 4603112, 5110587, 5494807 y 5762938 entre otros; en cuanto al virus de la viruela de aves de corral, se mencionan las patentes de EE.UU. n.º 5174993, 5505941 y US-5766599 entre otros; en cuanto al virus de la viruela del canario se menciona la patente de EE.UU. n.º 5756103 entre otros; en cuanto al virus de la viruela del cerdo se menciona la patente de EE.UU. n.º 5382425 entre otros; y, en cuanto al virus de la viruela del mapache se menciona el documento WO00/03030, entre otros.

[0080] Cuando el vector de expresión es un virus vaccinia, el sitio o sitios de inserción para el polinucleótido o polinucleótidos que se van a expresar, son ventajosamente en el gen o sitio de inserción de la timidina quinasa (TK), el gen o sitio de inserción de la hemaglutinina (HA), la región que codifica el cuerpo de inclusión del tipo A (ATI); véase también los documentos citados en el presente documento, en especial los relativos al virus vaccinia. En el caso del virus de la viruela del canario, el sitio o sitios de inserción son ventajosamente los ORF C3, C5 y/o C6; véase también los documentos citados en el presente documento, en especial los relativos al virus de la viruela del canario. En el caso, del virus de la viruela de aves de corral, ventajosamente el sitio o sitios de inserción son los ORF F7 y/o F8, véase también los documentos citados en el presente documento, en especial los relativos al virus de la viruela de aves de corral. El sitio o sitios de inserción para los virus MVA son ventajosamente como en varias publicaciones, que incluyen (Carroll, Overwijk *et al.* 1997); (Stittelaar, Wyatt *et al.* 2000); (Sutter, Wyatt *et al.* 1994); y, en relación con esto, se indica también que el genoma completo del MVA se describe en (Antoine, Scheifflinger *et al.* 1998), que permite al experto en la técnica usar otros sitios de inserción u otro promotores.

[0081] Preferiblemente, cuando el vector de expresión es un poxvirus, el polinucleótido que se va a expresar se inserta bajo el control de un promotor de poxvirus específico, p. ej., el promotor de vaccinia 7,5 kDa (Cochran, Puckett *et al.* 1985), el promotor de vaccinia I3L (Riviere, Tartaglia *et al.* 1992), el promotor de vaccinia HA (Shida 1986), el promotor de la viruela de la vaca ATI (Funahashi, Sato *et al.* 1988), el promotor de vaccinia H6 (Taylor, Weinberg *et al.* 1988); (Guo, Goebel *et al.* 1989); (Perkus, Limbach *et al.* 1989)), entre otros.

[0082] Preferiblemente, para la vacunación de mamíferos, el vector de expresión es un virus la viruela del canario o un virus de la viruela de aves de corral. De esta forma, puede haber expresión de las proteínas heterólogas, p. ej. proteínas BTV, con replicación limitada o no productiva. Preferiblemente, para la vacunación de aves, p. ej., pollos, patos, pavos y gansos, el vector de expresión es un virus la viruela del canario o un virus de la viruela de aves de corral.

[0083] Cuando el vector de expresión es un herpesvirus de pavo o HVT, el sitio o sitios de inserción ventajosos están situados en el fragmento BamHI o en el fragmento BamHI M del HVT. El fragmento de restricción de BamHI I de HVT comprende varios marcos de lectura abiertos (ORF) y tres regiones intergénicas y comprende varias zonas de inserción preferidas, tales como las tres regiones intergénicas 1, 2 y 3, que son regiones preferidas, y ORF UL55 (véase, p. ej., FR-A-2728795, patente de EE.UU. n.º 5980906). El fragmento de restricción BamHI M de HVT comprende el ORF UL43, que también es un sitio de inserción preferido (véase, p. ej., FR-A-2728794, patente de EE.UU. n.º 5733554).

[0084] Cuando el vector de expresión es un herpesvirus EHV-1 o EHV-4, el sitio o sitios de inserción ventajosos incluyen TK, UL43 y UL45 (véase, p. ej., documento EP-A-668355).

- [0085]** Preferiblemente, cuando el vector de expresión es un herpesvirus, el polinucleótido que se va a expresar se inserta bajo el control de un promotor eucariota, tal como un promotor eucariota fuerte, preferiblemente un promotor de CMV-IE (murino o humano); es decir, en realizaciones del presente documento, el polinucleótido que se va a expresar está operativamente unido a un promotor, y en realizaciones del herpesvirus, ventajosamente el polinucleótido que se va a expresar está operativamente unido a un promotor de eucariota fuerte tal como un promotor de mCMV-IE o hCMV-IE. Los promotores fuertes también se describen en el presente documento en relación con plásmidos como vectores.
- 10 **[0086]** De acuerdo con una realización adicional más de la descripción, el vector, p. ej., vector de expresión *in vivo*, es un vector plasmídico o un vector plasmídico de ADN, p. ej., el tipo de vector plasmídico usado en lo que se conoce como una vacuna de ADN (a diferencia con un plásmido de transfección usado en la recombinación homóloga para generar un virus recombinante, que no se usa en una vacuna de ADN).
- 15 **[0087]** El término plásmido cubre cualquier unidad de transcripción de ADN en forma de una secuencia de polinucleótido que comprende un polinucleótido de acuerdo con la descripción y los elementos necesarios para la expresión *in vivo* de lo que es codificado por el polinucleótido en una célula o células del hospedante u objetivo deseado; y, en relación con esto, hay que indicar que hay plásmidos circulares superenrollados y no superenrollados, así como formas lineales y multiméricas, todas las cuales se prevé que estén dentro del alcance de la descripción.
- 20 **[0088]** Cada plásmido comprende o contiene o consiste esencialmente en, además del polinucleótido que codifica el o los antígenos o epítomos del patógeno o patógenos, p. ej., BTV (o BTV y otro patógeno), un promotor para la expresión, en las células hospedantes del polinucleótido; y se puede decir que el polinucleótido está operativamente unido al promotor o bajo el control del promotor o dependiente del promotor. En general, es ventajoso usar un promotor eucariota, p.ej., un promotor eucariota fuerte. El promotor eucariota fuerte preferido es el promotor del citomegalovirus temprano inmediato (CMV-IE) de origen humano o murino, o que opcionalmente tiene otro origen tal como de rata o cobaya. El promotor de CMV-IE puede comprender la parte del promotor real, que puede estar o no asociada con la parte de potenciador. Se puede hacer referencia a los documentos EP-A-260148, EP-A-323 597, patentes de EE.UU. n.º 5 168 062, 5 385 839, y 4 968 615, así como a PCT WO87/03905. El promotor de CMV-IE preferiblemente es un CMV-IE humano (Boshart, Weber *et al.* 1985) o CMV-IE murino.
- 30 **[0089]** En términos más generales, el promotor tiene un origen vírico o celular. Un promotor vírico fuerte distinto del CMV-IE que se puede usar convenientemente en la práctica de la descripción es el promotor temprano/tardío del virus SV40 o el promotor LTR del virus del sarcoma Rous. Un promotor celular fuerte que se puede usar convenientemente en la práctica de la descripción, es el promotor de un gen del citoesqueleto, tal como, p. ej., el promotor de la desmina (Kwissa, van Kampen *et al.* 2000), o el promotor de la actina (Miyazaki, Takaki *et al.* 1989).
- 40 **[0090]** Los subfragmentos funcionales de estos promotores, es decir, partes de estos promotores que mantienen una actividad promotora adecuada, están incluidos dentro de la presente descripción, p. ej., se pueden usar promotores de CMV-IE truncados de acuerdo con el documento WO98/00166 o patente de EE.UU. n.º 6 156 567, en la práctica de la descripción. Un promotor en la práctica de la descripción incluye por consiguiente, derivados y subfragmentos de un promotor de longitud entera que mantiene una actividad promotora adecuada y por lo tanto funciona como un promotor, preferiblemente promotor de actividad sustancialmente similar a la del promotor real o de longitud entera, del cual deriva el derivado o subfragmento, p. ej., comparable a la actividad de los promotores de CMV-IE truncados de la patente de EE.UU. n.º 6 156 567, a la actividad de los promotores de CMV-IE de longitud entera. Por lo tanto, un promotor de CMV-IE en la práctica de la descripción puede comprender o consistir esencialmente en o consistir en la parte del promotor del promotor de longitud entera y/o la parte del potenciador del promotor de longitud entera, así como derivados y subfragmentos.
- 50 **[0091]** Preferiblemente, los plásmidos comprenden o consisten esencialmente en otros elementos de control de la expresión. Es particularmente ventajoso incorporar secuencia(s) estabilizante(s), p. ej., secuencia(s) de intrones, preferiblemente intrón II del gen de la β -globina del conejo (van Ooyen, van den Berg *et al.* 1979).
- 55 **[0092]** Como la señal de poliadenilación (poliA) para los plásmidos y vectores víricos distintos de los poxvirus, se puede usar mejor la señal de poliA del gen de la hormona del crecimiento bovina (bGH) (véase la patente de EE.UU. n.º 5 122 458), o la señal poli(A) del gen de la β -globina del conejo o la señal de poli(A) del virus SV40.

[0093] Como otros elementos de control de la expresión que se pueden usar en plásmidos, se dirige la atención a elementos de control de la expresión que son útiles en vectores de expresión del herpesvirus.

[0094] De acuerdo con la realización de la descripción, los vectores de expresión son vectores de expresión usados para la expresión *in vitro* de proteínas en un sistema de células adecuado. Las proteínas expresadas se pueden recoger en o del líquido sobrenadante del cultivo después, o no después de secreción (si no hay secreción típicamente se produce o se lleva a cabo una lisis celular), opcionalmente concentrar por procedimientos de concentración tales como ultrafiltración y/o purificar por medios de purificación, tales como afinidad, intercambio iónico o procedimientos de cromatografía de tipo filtración en gel.

[0095] La producción de proteínas puede tener lugar por la transfección de células de mamífero mediante plásmidos, por replicación o expresión sin replicación productiva de vectores víricos en células de mamífero o células de aves, o por replicación de baculovirus (véase, p. ej., patente de EE.UU. n.º 4745051); (Vialard, Lalumiere *et al.* 1990); Luckow (Luckow y Summers 1988), p. ej., el virus de la poliedrosis nuclear en *Autographa californica* AcNPV, en células de insectos (p. ej. células de *Spodoptera frugiperda* Sf9, ATCC CRL 1711; véanse también las patentes de EE.UU. n.º 6228846, 6103526). Las células de mamífero que se pueden usar son ventajosamente células de hámster (p. ej. CHO o BHK-21) o células de mono (p. ej. COS o VERO). Por lo tanto, la descripción comprende por consiguiente vectores de expresión que incorporan un polinucleótido de acuerdo con la descripción, así como las proteínas de BTV producidas o expresadas o fragmentos de las mismas, de la expresión *in vitro*, y preparaciones que contienen las mismas.

[0096] Por consiguiente, la presente descripción también se refiere a preparaciones concentradas y/o purificadas de proteínas de BTV. Cuando el polinucleótido codifica varias proteínas, son escindidas y las preparaciones mencionadas contienen entonces las proteínas escindidas.

[0097] La presente descripción se refiere también a composiciones inmunógenas y vacunas contra el BTV que comprenden al menos un vector de expresión *in vivo* de acuerdo con la descripción y un excipiente o soporte o vehículo aceptable en farmacia o veterinaria, y opcionalmente un adyuvante.

[0098] Una composición inmunógena cubre cualquier composición que, una vez administrada a la especie objetivo, induce una respuesta inmunitaria contra el BTV. El término vacuna se entiende que significa una composición que puede inducir una protección eficaz. Las especies objetivo incluyen mamíferos, p. ej., equinos, caninos, felinos, bovinos, ovinos, porciones y seres humanos; reptiles y pájaros o aves. Se pretende que la lista incluya animales que se reproducen, animales que ponen huevos, animales de producción y animales de compañía.

[0099] Los soportes o vehículos o excipientes aceptables en farmacia o veterinaria son bien conocidos para el experto en la materia. Por ejemplo, un soporte o vehículo o excipiente aceptable en farmacia o veterinaria puede ser una disolución salina de NaCl al 0,9% o un tampón de fosfato. Los soportes o vehículos o excipientes aceptables en farmacia o veterinaria pueden ser cualquier compuesto o combinación de compuestos que faciliten la administración del vector (o proteína expresada a partir de un vector de la invención *in vitro*); ventajosamente, el soporte, vehículo o excipiente puede facilitar la transfección y/o mejorar la conservación del vector (o proteína). Las dosis y volúmenes de dosis se describen en el presente documento en la descripción general de los procedimientos de inmunización y vacunación, y también las puede determinar el experto en la materia a partir de la descripción leída conjuntamente con el conocimiento en la técnica, sin ninguna experimentación excesiva.

[0100] Las composiciones y vacunas inmunógenas de acuerdo con la descripción preferiblemente comprenden o consisten esencialmente en uno o más adyuvantes. Los adyuvantes particularmente adecuados para usar en la práctica de la presente descripción son (1) polímeros de ácido acrílico o metacrílico, polímeros de anhídrido maleico y derivados de alqueno, (2) secuencias inmunoestimulantes (ISS), tales como secuencias e oligodesoxirribonucleótidos que tienen una o más unidades de CpG no metilada (Klinman, Yi *et al.* 1996; documento WO98/16247), (3) una emulsión de aceite en agua, tal como la emulsión SPT descrita en la página 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" publicado por M. Powell, M. Newman, (Powell y Newman 1995), y la emulsión MF59 descrita en la página 183 del mismo trabajo, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternaria, (5) citoquinas, (6) hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, o (7) otros adyuvantes descritos en cualquier documento citado en el presente documento, o (8) cualquier combinación o mezclas de los mismos.

[0101] La emulsión de aceite en agua (3), que es especialmente adecuada para vectores víricos, se puede basar en:

- aceite de parafina líquida ligera (tipo Farmacopea Europea),
- aceite isoprenoide tal como escualano, escualeno,
- aceite resultante de la oligomerización de alquenos, p. ej., isobuteno o deceno,
- ésteres de ácidos o alcoholes que tienen un grupo alquilo de cadena lineal, tal como aceites vegetales, oleato de etilo, propilenglicol, di(caprilato/caprato), tri(caprilato/caprato) de glicerol y dioleato de propilenglicol, o
- ésteres de alcoholes o ácidos grasos, ramificados, en especial ésteres de ácido isoesteárico.

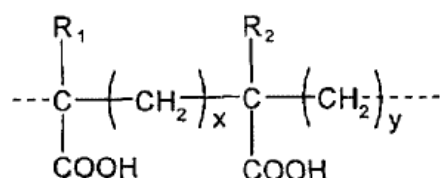
[0102] El aceite se usa en combinación con emulsionantes para formar una emulsión. Los emulsionantes pueden ser tensioactivos no iónicos, tales como:

- ésteres de, por una parte, sorbitán, manida (p. ej., oleato de anhidromanitol), glicerol, poliglicerol o propilenglicol, y por otra parte de ácidos oleico, isoesteárico, ricinoleico o hidroxiesteárico, estando dichos ésteres opcionalmente etoxilados,
- bloques de copolímeros de polioxipropileno-polioxietileno, tales como Pluronic, p. ej., L121.

[0103] Entre los polímeros adyuvantes de tipo (1), se da preferencia a polímeros de ácido acrílico o metacrílico reticulados, en especial reticulados por éteres de polialqueno de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos con el nombre de carbómero (Pharmeuropa, vol. 8, no. 2, Junio 1996). Un experto en la técnica también puede remitirse a la patente de EE.UU. n.º 2909462, que proporciona dichos polímeros acrílicos reticulados por un compuesto de polihidroxilo que tiene al menos tres grupos hidroxilo, preferiblemente no más de ocho de dichos grupos, sustituyéndose los átomos de hidrógeno de al menos tres grupos hidroxilo por radicales alifáticos, insaturados, que tiene al menos dos átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, p. ej., vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados también pueden contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos vendidos con el nombre de Carbopol (BF Goodrich, Ohio, EE.UU.) son especialmente adecuados. Están reticulados por alilsacarosa o por alilpentaeritritol. Entre ellos, se hace referencia a Carbopol 974P, 934P y 971P.

[0104] Como copolímeros de anhídrido maleico-derivado de alqueno, se prefiere EMA (Monsanto), que son copolímeros de etileno-anhídrido maleico de cadena lineal o reticulados, y están reticulados, por ejemplo, por éter divinílico. Se hace referencia también a (Regelson, Kuhar *et al.* 1960).

[0105] Con respecto a la estructura, los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y EMA están formados preferiblemente por unidades básicas que tienen la siguiente fórmula:



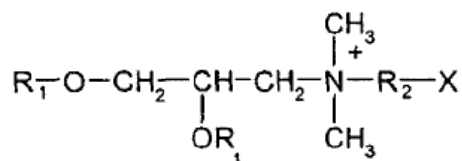
en la que:

- R₁ y R₂, que pueden ser iguales o diferentes, representan H o CH₃
- x = 0 o 1, preferiblemente x = 1
- y = 1, con x + y = 2.

Para EMA, x = 0 e y = 2, y para carbómeros x = y = 1.

[0106] Estos polímeros son solubles en agua o disolución salina fisiológica (NaCl 20 g/l) y el pH se puede ajustar de 7,3 a 7,4, p. ej., mediante sosa (NaOH), para proporcionar la disolución adyuvante en la que se puede incorporar el o los vectores de expresión. La concentración de polímero en la composición de vacuna final puede estar en el intervalo entre 0,01 y 1,5 % en p/v, ventajosamente de 0,05 a 1 % en p/v, y preferiblemente de 0,1 a 0,4 % en p/v.

[0107] Los lípidos catiónicos (4) que contienen una sal de amonio cuaternario que son ventajosamente pero no exclusivamente adecuados para plásmidos, son preferiblemente los que tienen la fórmula:



en la que R₁ es un radical alifático de cadena lineal saturado o insaturado, que tiene de 12 a 18 átomos de carbono, R₂ es otro radical alifático que contiene 2 o 3 átomos de carbono y X es una amina o grupo hidroxilo.

- 5
- [0108] Entre estos lípidos catiónicos, se prefiere DMRIE (N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-propano-amonio; documento WO96/34109), preferiblemente asociado con un lípido neutro, preferiblemente DOPE (dioleoilfosfatidil-etanolamina; Behr J. P., 1994, *Bioconjugate Chemistry*, 5, 382-389), para formar DMRIE-DOPE.
- 10 [0109] Preferiblemente, la mezcla de plásmido con el adyuvante se forma de manera extemporánea y preferiblemente contemporánea con la administración de la preparación o poco antes de la administración de la preparación; por ejemplo, poco antes o antes de la administración, se forma la mezcla de plásmido-adyuvante, ventajosamente para dar suficientemente tiempo antes de la administración para que la mezcla forme un complejo, p. ej., entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60 minutos antes de la administración, tal como
- 15 aproximadamente 30 minutos antes de la administración.
- [0110] Cuando está presente DOPE, la relación molar de DMRIE:DOPE es preferiblemente de aproximadamente 95:aproximadamente 5 a aproximadamente 5:aproximadamente 95, más preferiblemente aproximadamente 1:aproximadamente 1, p. ej., 1:1.
- 20 [0111] El DMRIE o la relación en peso de adyuvante DMRIE-DOPE:plásmido, puede ser entre aproximadamente 50:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 10, tal como entre aproximadamente 10:aproximadamente 1 y aproximadamente 1:aproximadamente 5, y preferiblemente entre aproximadamente 1: aproximadamente 1 y aproximadamente 1: aproximadamente 2, p. ej., 1:1 y 1:2.
- 25 [0112] La citoquina o citoquinas (5) pueden estar en forma de proteína en la composición inmunógena o de vacuna, o se pueden coexpresar en el hospedante con el inmunógeno o inmunógenos o epítipo(s) de los mismos. Se prefiere la coexpresión de la citoquina o citoquinas, por el mismo vector que el que expresa el inmunógeno o inmunógenos o epítipo(s) de los mismos, por un vector separado de este.
- 30 [0113] La o las citoquinas se pueden seleccionar de interleuquina 18 (IL-18), interleuquina 12 (IL-12), interleuquina 15 (IL-15), MIP-1 α (proteína inflamatoria de macrófagos 1 α ; (Marshall, Woolford *et al.* 1997), GM-CSF (Factor estimulador de la colonia de granulocitos-macrófagos). Se hace referencia en particular a citoquinas aviares, por ejemplo, las del pollo, tales como cIL-18 (Schneider, Puehler *et al.*, 2000), cIL-15 (Xin, Hamajima *et al.* 1999), y
- 35 citoquinas equinas, por ejemplo, GM-CSF equino (documento WO00/77210). Preferiblemente, se usan citoquinas de la especie que se va a vacunar; es decir, ventajosamente, la citoquina se corresponde con la especie objetivo u hospedante, y por ejemplo se indica GM-CSF canino (ejemplo 8 del documento WO00/77043), GM-CSF felino (ejemplo 9 del documento WO00/77043).
- 40 [0114] El documento WO00/77210 proporciona la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos que corresponden al GM-CSF equino, la producción de GM-CSF *in vitro* y la construcción de vectores (p. ej., plásmidos y vectores víricos) que permiten la expresión de GM-CSF *in vivo*. Estas proteínas, plásmidos y vectores víricos se pueden usar en composiciones inmunógenas y vacunas equinas de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, se puede usar el plásmido pJP097 descrito en el ejemplo 3 del documento WO00/77210 o se puede usar la
- 45 enseñanza de este último para producir otros vectores o para la producción *in vitro* del GM-CSF equino y la incorporación de los vectores del GM-CSF equino en composiciones inmunógenas o vacunas equinas de acuerdo con la descripción.
- [0115] La presente descripción se refiere también a composiciones inmunógenas y las llamadas vacunas de
- 50 subunidades, que incorporan o comprenden o consisten esencialmente en la proteína VP2 y opcionalmente una o más de otras proteínas de BTV mencionadas en la presente memoria, p. ej., VP5 o VP7 y ventajosamente producidas por expresión *in vitro* de la forma descrita en el presente documento, así como un soporte o vehículo o excipiente aceptable en farmacia o veterinaria.

[0116] El soporte o vehículo o excipiente aceptable en farmacia o veterinaria lo puede determinar el experto en la materia sin excesiva experimentación, a partir de la descripción del presente documento y el conocimiento en la materia, p. ej., por referencia a documentos citados en el presente documento o documentos a los que se hace referencia en los documentos citados en el presente documento y pueden ser, por ejemplo, disolución salina de NaCl al 0,9 % o tampón de fosfato.

[0117] Las composiciones inmunógenas y vacunas de subunidades de acuerdo con la descripción preferiblemente comprenden o consisten esencialmente en uno o más adyuvantes. Son especialmente adecuados para usar en la presente descripción (1) un polímero de ácido acrílico o metacrílico, o un polímero de anhídrido maleico y derivado de alqueno, (2) una secuencia inmunoestimuladora (ISS), tal como una secuencia de oligodesoxirribonucleótido que tiene una o más unidades de CpG no metiladas (Klinman, Yi *et al.* 1996), (3) una emulsión de aceite en agua, tal como la emulsión de SPT descrita en la pág. 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach", publicado por M. Powell, M. Newmann, (Powell y Newman 1995), y la emulsión MF59 descrita en la pág. 183 del mismo trabajo, (4) una emulsión de agua en aceite (EP-A-639 071), (5) saponina, tal como Quil-A, o (6) hidróxido de alúmina o un equivalente. Los diferentes tipos de adyuvantes definidos en 1), 2) y 3) se han descrito con mayor detalle en el presente documento en conexión con las vacunas basadas en vectores de expresión y composiciones inmunógenas.

[0118] La dosis y volúmenes de dosis se describen en el presente documento en conexión con la descripción general de los procedimientos de inmunización y vacunación.

[0119] Los animales inmunizados con composiciones o vacunas inmunógenas de acuerdo con la descripción desarrollan una inmunidad específica contra el BTV, que durante una infección por el BTV implica una disminución de la viremia, y puede bloquear totalmente el virus, comparado con animales de control no vacunados. Este aspecto ventajoso de la descripción se puede usar para detener la transmisión del BTV para limitar la existencia de reservorios víricos en mamíferos, y para prevenir los brotes de la enfermedad de la lengua azul.

[0120] Otro aspecto ventajoso de la descripción es que la inmunidad protectora se puede transmitir de sujetos vacunados a la progenie.

[0121] De acuerdo con la descripción, la vacunación contra el BTV se puede combinar con otras vacunaciones dentro del marco de programas de vacunación, en forma de kits o procedimientos de inmunización o vacunación, o en forma de composiciones inmunógenas multivalentes y vacunas multivalentes, es decir, que comprenden o consisten esencialmente en al menos un componente de vacuna contra el BTV y al menos un componente de vacuna contra al menos otro agente patógeno. Esto también incluye la expresión por el mismo vector de expresión de genes de al menos dos agentes patógenos, que incluyen el BTV.

[0122] Por lo tanto, la descripción también se refiere a una composición inmunógena multivalente o de "cóctel" o una vacuna multivalente o de "cóctel" contra el BTV, contra al menos otro patógeno de la especie objetivo, usando el mismo vector de expresión *in vivo* que contiene y expresa al menos un polinucleótido del BTV de acuerdo con la descripción y al menos un polinucleótido que expresa un inmunógeno de otro patógeno. Como composiciones inmunógenas o vacunas multivalentes o de "cóctel", así como inmunógenos o antígenos o epítomos de los mismos que van a estar en o expresar dichas composiciones o vacunas, se dirige la atención a los documentos citados en el presente documento, así como las patentes de EE.UU. n.º 5843456 y 6368603.

[0123] El "inmunógeno" expresado por un vector de la descripción o usado en las composiciones o vacunas multivalentes o de "cóctel" se entiende que significa una proteína, glucoproteína, polipéptido, péptido, epítomo o derivado, p. ej., proteína de fusión, que induce una respuesta inmunitaria, preferiblemente de una naturaleza protectora.

[0124] Como se describe en el presente documento, estas composiciones o vacunas multivalentes pueden comprender también o consistir esencialmente en un soporte o vehículo o excipiente aceptable en farmacia o veterinaria, y opcionalmente un adyuvante.

[0125] La descripción también se refiere a una composición inmunógena multivalente o una vacuna multivalente que comprende al menos un vector de expresión *in vivo* en el que se inserta (y expresa *in vivo*) al menos un polinucleótido del virus de la lengua azul y al menos un segundo vector de expresión en el que se inserta (y expresa *in vivo*) un polinucleótido que codifica un inmunógeno de otro agente patógeno. Dichas composiciones o

vacunas multivalentes también comprenden o consisten esencialmente en un soporte o vehículo o excipiente aceptable en farmacia o veterinaria, y opcionalmente un adyuvante.

[0126] Para antígeno(s) o inmunógeno(s) o epítipo(s) que se incluyen en o son expresados por una vacuna o composición inmunógena multivalente (además del antígeno(s), inmunógeno(s) o epítipo(s)), incluyendo la determinación o evaluación de epítipo(s), el experto en la materia puede consultar los documentos citados en el presente documento o documentos citados en los documentos citados en el presente documento.

[0127] Para las composiciones inmunógenas multivalentes y vacunas multivalentes ovinas, el o los patógenos ovinos adicionales, de los cuales los antígeno(s) o inmunógeno(s) o epítipo(s) de los mismos ovinos adicionales se incluyen en y/o son expresados por las composiciones inmunógenas multivalentes y vacunas multivalentes, se eligen ventajosamente del grupo que incluye virus del herpesvirus ovino de tipo 1 (OHV-1), herpesvirus ovino de tipo 2 (OHV-2), virus de la enfermedad de la frontera (BDV), virus de la enfermedad de Boma, peste de los pequeños rumiantes, virus de la enfermedad de ovina de Nairobi (NSDV), virus Ecthyma (parapoxvirus de oveja), virus de la rabia (rhabdovirus), parvovirus felino (FPV), rotavirus ovino, pestivirus ovino, adenovirus ovino, virus de la enfermedad de pies y boca (FMDV), fiebre del valle del Rift, y mezclas de los mismos. Antígenos adicionales adecuados para usar en las composiciones de la presente invención incluyen antígenos derivados de patógenos bacterianos y víricos de oveja. Los antígenos bacterianos y parasitarios preferidos incluyen *Cryptosporidium parvum*, *Chlamydia*, *Coxiella burnetii*, *Clostridium* sp., *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Salmonella typhimurium*, *Brucella*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Haemonchus contortis*, *Ostertagia*, *Coccidia* y *Escherichia coli*.

[0128] Para las composiciones inmunógenas multivalentes y vacunas multivalentes bovinas, el o los patógenos equinos adicionales, de los cuales los antígeno(s) o inmunógeno(s) o epítipo(s) de los mismos equinos adicionales se incluyen en y/o son expresados por las composiciones inmunógenas multivalentes y vacunas multivalentes, se eligen ventajosamente del grupo que incluye: herpesvirus bovino de tipo 1 (BHV-1) llamado también rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), virus de la enfermedad de las mucosas también llamado pestivirus bovino de tipo 1 o tipo 2 (virus de la diarrea vírica bovina o BVDV- 1 y BVDV-2), y virus parainfluenza de tipo 3, para cada valencia, uno o más de los genes seleccionados del grupo que consiste en gB y gD para herpesvirus bovino, F y G para el virus respiratorio sincitial bovino, E2, C+E1+E2 y E1+E2 para el virus de la enfermedad de las mucosas, y HN y F para los virus parainfluenza de tipo 3. Antígenos adicionales adecuados para usar en las composiciones de la presente invención incluyen antígenos derivados de patógenos bacterianos y víricos del ganado. Los antígenos bacterianos preferidos incluyen antígenos clostridiales, tales como *Clostridium botulinum* C y D, *Clostridium perfringens* tipo A, B, C y D, *Clostridium septicum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi* tipo B, *Clostridium sordellii*, *Clostridium haemolyticum*; antígenos de *Leptospira*, por ejemplo, *Leptospira interrogans* tales como *Leptospira hardjo*, *Leptospira Pomona*, *Leptospira copenhageni*, *Leptospira zanonii*, *Leptospira tarassovi*; antígenos de *Pasteurella* tales como *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica*; antígenos de *Corynebacterium* tales como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium renale*, *Corynebacterium cystitis*, *Corynebacterium pilosum* y *Corynebacterium bovis*; y antígenos de *Haemophilus* tales como *Haemophilus somnus* y *Haemophilus pleuropneumoniae*; *Dichelobacter nodosus pilus*; antígenos de *Mycoplasma* tales como *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma ovipneumoniae*. Los antígenos víricos preferidos incluyen antígenos del virus de la diarrea bovina (BVD), antígenos del virus de la rinotraqueitis bovina (IBR), antígenos de Parainfluenza-3, antígenos del virus respiratorio sincitial (RSV) y antígenos de la fiebre efímera bovina (BEF). Por lo tanto, la descripción comprende el uso de polinucleótido(s) que codifica(n) (un) fragmento(s) inmunológicamente activo(s) o (un) epítipo(s) de dicho(s) inmunógeno(s).

[0129] Para las composiciones inmunógenas multivalentes y vacunas multivalentes equinas, el o los patógenos equinos adicionales, de los cuales los antígeno(s) o inmunógeno(s) o epítipo(s) de los mismos equinos adicionales se incluyen en y/o son expresados por las composiciones inmunógenas multivalentes y vacunas multivalentes, se eligen ventajosamente del grupo que incluye virus de influenza equina (EI), peste equina africana (AHSV) preferiblemente con una combinación de inmunógenos VP2 y VP5), virus de la encefalitis equina (EEV) también con una combinación de VP2 y VP5), virus de la encefalitis equina occidental (WEEV), virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), virus de la encefalitis equina del este (EEEV), virus del Nilo occidental (WNV), *Clostridium tetani* (tétanos), y mezclas de los mismos. Preferiblemente, para AHSV los inmunógenos son VP2 y/o VP5, para EIV el inmunógeno es ventajosamente HA, NP y/o N; para los virus de la encefalitis, el inmunógeno es ventajosamente C y/o E2; y para *Clostridium tetani* el inmunógeno es toda o parte de la subunidad C de la toxina tetánica. Por lo tanto, la descripción comprende el uso de polinucleótido(s) que codifica(n) (un) fragmento(s) inmunológicamente activo(s) o (un) epítipo(s) de dicho(s) inmunógeno(s).

[0130] Para las composiciones inmunógenas multivalentes y vacunas multivalentes caninas, el o los patógenos caninos adicionales, de los cuales los antígeno(s) o inmunógeno(s) o epítipo(s) de los mismos caninos adicionales se incluyen en y/o son expresados por las composiciones inmunógenas multivalentes y vacunas multivalentes, se eligen ventajosamente del grupo que incluye virus de los virus de la enfermedad del sarampión, 5 adenovirus canino 1 (CAV-1), adenovirus canino 2 (CAV-2), virus del moquillo canino (CDV), virus parainfluenza canino de tipo 2 (CPI-2), herpesvirus canino de tipo 1 (CHV-1), virus de la rabia (rhabdovirus), parvovirus canino (CPV), coronavirus canino (CCV), adenovirus canino, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira* y mezclas de los mismos. Preferiblemente, para CDV el inmunógeno es ventajosamente F y/o HA (véanse también, las patentes de EE.UU. n.º 6309647, 5756102 en relación con inmunógeno y construcciones de CDV); para CPV el inmunógeno es 10 ventajosamente VP2; para CCV el inmunógeno es ventajosamente S y/o M; para CHV-1 el inmunógeno es ventajosamente gB y/o gC y/o gD (véanse también, las patentes de EE.UU. n.º 5688920, 5529780, en relación con inmunógenos y construcciones de CHV); para el virus de la rabia el inmunógeno es ventajosamente G (véase también, la patente de EE.UU. n.º 5843456 en relación con las composiciones de combinación de la rabia); para *Borrelia burgdorferi* el inmunógeno es ventajosamente OspA (véase también, la patente de EE.UU. n.º 6368603 en 15 relación con las composiciones de combinación de OspA). Por lo tanto, la descripción comprende el uso de polinucleótido(s) que codifica(n) (un) fragmento(s) inmunológicamente activo(s) o (un) epítipo(s) de dicho(s) inmunógeno(s).

[0131] Para las composiciones inmunógenas multivalentes y vacunas multivalentes felinas, el o los patógenos felinos adicionales, de los cuales los antígeno(s) o inmunógeno(s) o epítipo(s) de los mismos felinos adicionales se incluyen en y/o son expresados por las composiciones inmunógenas multivalentes y vacunas multivalentes, se eligen ventajosamente del grupo que incluye virus de herpesvirus felino de tipo 1 (FHV-1), calicivirus felino (FCV), virus de la rabia (rhabdovirus), parvovirus felino (FPV), virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV), virus de la leucemia felina (FeLV), virus de inmunodeficiencia felina (FIV), *Chlamydia* y mezclas de los 25 mismos. Preferiblemente, para FeLV el inmunógeno es ventajosamente A y/o B y/o gag y/o pol, p. ej., gag/pol; para FPV el inmunógeno es ventajosamente VP2; para FIPV el inmunógeno es ventajosamente S y/o M y/o N, p. ej., S y M y/o N (véanse también, las patentes de EE.UU. n.º 6348196 y 5858373 e inmunógenos y construcciones de los mismos); para FHV el inmunógeno es ventajosamente gB y/o gC y/o gD, p. ej., gB y gC y/o gD (véanse también, las patentes de EE.UU. n.º 5338683, 6183750; para inmunógenos de herpesvirus e inmunógenos que expresan los 30 mismos); para FCV el inmunógeno es ventajosamente C; para FIV el inmunógeno es ventajosamente env y/o gag y/o pro, p. ej., gag/pro, env, o env y gag/pro (véanse también los inmunógenos y construcciones descritos en Tartaglia *et al.*, solicitud de EE.UU. n.º de serie 08/746668, presentada el 14 de noviembre, 1996); para el virus de la rabia el inmunógeno es ventajosamente G. Por lo tanto, la descripción comprende el uso de polinucleótido(s) que codifica(n) (un) fragmento(s) inmunológicamente activo(s) o (un) epítipo(s) de dicho(s) inmunógeno(s).

[0132] Para las composiciones inmunógenas multivalentes y vacunas multivalentes aviares, el o los patógenos aviares adicionales, de los cuales los antígeno(s) o inmunógeno(s) o epítipo(s) de los mismos aviares adicionales se incluyen en y/o son expresados por las composiciones inmunógenas multivalentes y vacunas multivalentes, se eligen ventajosamente del grupo que incluye virus de virus de la enfermedad Marek (MDV) (p. ej., 40 serotipos 1 y 2, preferiblemente 1), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus de la enfermedad de Gumboro o virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV), virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de la anemia infecciosa o virus de la anemia del pollo (CAV), virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILT), virus de la encefalomiелitis o virus de la encefalomiелitis aviar (AEV o virus de la leucosis aviar ALV), virus de la enteritis hemorrágica de pavos (HEV), virus pneumovirosis (TRTV), virus de la gripe aviar (influenza aviar), virus de hidropericarditis aviar, reovirus aviar, *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallinarum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Haemophilus avium*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella multocida gallicida*, y mezclas de los mismos. Preferiblemente, para MDV el inmunógeno es ventajosamente gB y/o gD, p. ej., gB y gD, para NDV el inmunógeno es ventajosamente HN y/o F, p. ej., HN y F; para IBDV el inmunógeno es ventajosamente VP2; para IBV el 45 inmunógeno es ventajosamente S (más ventajosamente S1) y/o M y/o N, p. ej., S (o S1) y M y/o N; para CAV el inmunógeno es ventajosamente VP1 y/o VP2; para ILTV el inmunógeno es ventajosamente gB y/o gD; para AEV el inmunógeno es ventajosamente env y/o gag/pro, p. ej., env y gag/pro o gag/pro; para HEV el inmunógeno es ventajosamente la proteína 100K y/o hexón; para TRTV el inmunógeno es ventajosamente F y/o G, y para la gripe aviar el inmunógeno es ventajosamente HA y/o N y/o NP, p. ej., HA y N y/o NP. Por lo tanto, la descripción comprende el uso de polinucleótido(s) que codifica(n) (un) fragmento(s) inmunológicamente activo(s) o (un) 55 epítipo(s) de dicho(s) inmunógeno(s).

[0133] A modo de ejemplo, en una composición inmunógena multivalente o una vacuna multivalente de acuerdo con la descripción, a la que se han añadido opcionalmente uno o más adyuvantes (y por lo tanto la composición contiene o consiste esencialmente en o consiste en uno o más adyuvantes) como se describe en el

presente documento, y que está dirigida para especies equinas, se puede incorporar (y por tanto para que la vacuna comprenda, consista esencialmente o consista en) uno o más plásmidos descritos en el documento WO98/03198, ventajosamente como se describe en los ejemplos 8 a 25 del mismo, y/o los descritos en el documento WO00/77043 y que se refieren a especies equinas, ventajosamente los descritos en los ejemplos 6 y 7 del mismo. Para las especies caninas, una composición o vacuna multivalente puede contener o consistir esencialmente en o consistir en uno o más de los plásmidos descritos en el documento WO98/03199, ventajosamente como se describen en los ejemplos 8 a 16 del mismo, y/o los descritos en el documento WO00/77043 y que se refieren a especies caninas, ventajosamente los descritos en los ejemplos 2, 3 y 4 del mismo; y dichas composiciones o vacunas pueden contener o consistir esencialmente en o consistir en uno o más adyuvantes. Para las especies felinas, una composición o vacuna multivalente puede contener o consistir esencialmente en o consistir en uno o más de los plásmidos descritos en el documento WO98/03660, ventajosamente en los ejemplos 8 a 19 del mismo, y/o los descritos en el documento WO00/77043 y que se refieren a la especie felina, ventajosamente los descritos en el ejemplo 5 del mismo; y, dichas composiciones o vacunas pueden contener o consistir esencialmente en o consistir en uno o más adyuvantes. Y para la especie aviar, una composición o vacuna multivalente puede contener o consistir esencialmente en o consistir en uno o más de los plásmidos descritos en el documento WO98/03659, ventajosamente en los ejemplos 7 a 27 del mismo; y dichas composiciones o vacunas pueden contener o consistir esencialmente en o consistir en uno o más adyuvantes.

[0134] Las composiciones o vacunas inmunógenas descritas en el presente documento también se pueden combinar con al menos una vacuna convencional (p. ej., inactivada, viva atenuada o subunidad) dirigida contra el mismo patógeno o al menos otro patógeno de la especie a la que se dirige la composición o vacuna. Las composiciones o vacunas inmunógenas descritas en el presente documento se pueden administrar antes o después de la vacuna convencional, p. ej., en un régimen de "sensibilización-refuerzo".

[0135] La descripción comprende además la vacunación combinada que usa composición(es) inmunógena(s) o vacuna(s) de subunidad de acuerdo con la descripción. Por lo tanto, la descripción también se refiere a composiciones inmunógenas multivalentes y vacunas multivalentes que comprenden una o más proteínas de acuerdo con la descripción y uno o más inmunógenos (como se describe el término inmunógeno en el presente documento) de al menos otro agente patógeno (ventajosamente de entre los del presente documento y en documentos citados en el presente documento) y/u otro agente patógeno en forma inactivada o atenuada o como una subunidad. De la forma descrita, estas vacunas o composiciones multivalentes también contienen, consisten esencialmente o consisten en un vehículo o excipiente aceptable en farmacia o veterinaria y opcionalmente uno o más adyuvantes.

[0136] La presente descripción también se refiere a procedimientos para la inmunización y vacunación de una especie objetivo, p. ej., como se describe en el presente documento.

[0137] La presente descripción también se refiere a procedimientos para la inmunización y/o vacunación de una especie objetivo, usando un régimen de "sensibilización-refuerzo". La expresión "sensibilización-refuerzo" se refiere a la administración sucesiva de dos tipos de vacunas diferentes o tipos de composiciones inmunógenas o inmunológicas que tienen al menos un inmunógeno en común. La administración de la sensibilización (sensibilización) es la administración de un primer tipo de vacuna o composición inmunógena o inmunológica y puede comprender una, dos o más administraciones. La administración de refuerzo es la administración de un segundo tipo de vector o composición inmunógena o inmunológica, y puede comprender, una, dos o más administraciones, y, por ejemplo, puede comprender o consistir esencialmente en administraciones anuales.

[0138] Una realización de una inmunización o vacunación de sensibilización-refuerzo contra el BTV de acuerdo con la descripción es una inmunización o vacunación de sensibilización-refuerzo en la que se administra primero al animal una vacuna de ADN o composición inmunógena o inmunológica (sensibilización) que comprende o consiste esencialmente en y expresa *in vivo*, al menos un inmunógeno, antígeno o epítipo del BTV, y después se administra (con refuerzo) un segundo tipo de vacuna o composición inmunógena o inmunológica que contiene o consiste esencialmente en o expresa al menos un inmunógeno, antígeno o epítipo que es común con la vacuna o composición inmunógena o inmunológica de sensibilización. El segundo tipo de vacuna puede ser una vacuna de subunidad o composición inmunógena o inmunológica inactivada o atenuada o un vector, p. ej., vacuna de virus modificado o recombinante o composición inmunógena o inmunológica que tiene expresión *in vivo* (p. ej., poxvirus, herpesvirus, adenovirus). Se pueden usar ventajosamente los poxvirus, p. ej., virus vaccinia atenuados, como MVA o NYVAC, y avipoxvirus, como virus de la viruela del canario y virus de la viruela de aves de corral.

[0139] Ventajosamente, la vacuna de ADN está dirigida a inducir una respuesta inmunitaria de sensibilización

específica para el inmunógeno, antígeno o epítipo expresado o “respuesta inmunitaria inducida por ADN” (tal como respuesta de linfocitos T de memoria interferón gamma+ (IFN γ +) específica para el inmunógeno, antígeno o epítipo expresado) que es reforzable (se puede reforzar) mediante la posterior administración (refuerzo) de una vacuna o composición inmunológica inactivada o una vacuna recombinante viva que comprende o consiste esencialmente en un vector vírico, tal como un poxvirus recombinante vivo, que contiene o consiste esencialmente en y expresa *in vivo* al menos el o los mismos inmunógenos o antígenos o epítipos expresados por la vacuna de ADN. La respuesta de linfocitos T de memoria IFN γ + específica para el inmunógeno de BTV expresado se puede mostrar en un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos (ELISPOT) cuantitativo usando células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (Laval, Paillot *et al.* 2002).

[0140] El “refuerzo” se puede administrar desde aproximadamente 2 semanas hasta aproximadamente 6 meses después de la “sensibilización”, tal como de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 semanas después de sensibilización, y ventajosamente de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 semanas después de sensibilización, y más ventajosamente, aproximadamente 4 semanas después de sensibilización.

[0141] Para animales ovinos, bovinos o equinos, la sensibilización se puede hacer con una vacuna de ADN o composición inmunógena o inmunológica que comprende o consiste esencialmente en y expresa *in vivo* molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican un inmunógeno, antígeno o epítipo de BTV de acuerdo con la descripción, y el refuerzo se hace ventajosamente con una vacuna o composición inmunógena o inmunológica que comprende un vector vírico vivo recombinante (p. ej. poxvirus, herpesvirus, adenovirus), tal como un virus de la viruela de las aves de corral recombinante o virus viruela del canario recombinante, OHV-1 o OHV-2 recombinante, BHV-1 o BHV-2, EHV-1 o EHV-4, que comprende o consiste esencialmente en molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican y expresan *in vivo* al menos uno del o de los mismos inmunógenos, antígenos o epítipos de BTV que expresa la vacuna de ADN o la composición inmunógena o inmunológica. En otra realización, estas vacunas o composiciones inmunológicas o inmunógenas de sensibilización y refuerzo pueden tener adyuvantes tales como, por ejemplo, DMRIE-DOPE para la vacuna de ADN o composición inmunógena o inmunológica de sensibilización, y Carbopol® para la vacuna o composición inmunógena o inmunológica recombinante de refuerzo.

[0142] La sensibilización se puede llevar a cabo en una oveja joven, ternero o potro que pueden tener anticuerpos maternos contra el BTV (contra el cual se dirige la inmunización o vacunación). Ventajosamente, la vacuna de ADN o composición inmunógena o inmunológica se administra al animal joven desde el nacimiento hasta, e incluyendo, aproximadamente 16 semanas de edad, tal como desde el nacimiento hasta, e incluyendo, aproximadamente 8 semanas de edad, por ejemplo, desde el nacimiento hasta, e incluyendo, aproximadamente 6 semanas de edad, p. ej., desde el nacimiento hasta, e incluyendo, aproximadamente 4 semanas de edad.

[0143] Para los felinos, la sensibilización se puede hacer con una vacuna de ADN o composición inmunógena o inmunológica que comprende o consiste esencialmente en y expresa *in vivo* molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican un inmunógeno, antígeno o epítipo de BTV, y el refuerzo se hace ventajosamente con una vacuna o composición inmunógena o inmunológica que comprende o consiste esencialmente en un vector vírico vivo recombinante (p. ej. poxvirus, herpesvirus, adenovirus, ventajosamente virus de la viruela de las aves de corral recombinante, virus de la viruela del canario recombinante, FHV recombinante, adenovirus canino recombinante), que comprende o consiste esencialmente en molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican y expresan *in vivo* al menos un inmunógeno, antígeno o epítipo de BTV que es el mismo que el expresado por la vacuna de ADN. En otra realización, estas vacunas o composiciones inmunológicas o inmunógenas de sensibilización y refuerzo pueden tener adyuvantes tales como, por ejemplo, DMRIE-DOPE para la vacuna de ADN o composición inmunógena o inmunológica de sensibilización, y Carbopol® para la vacuna o composición inmunógena o inmunológica recombinante de refuerzo.

[0144] La sensibilización se puede llevar a cabo en un gato joven que puede tener anticuerpos maternos contra el BTV (contra el cual se dirige la inmunización o vacunación). La vacuna de ADN o composición inmunógena o inmunológica se administra al gato joven desde el nacimiento hasta, e incluyendo, aproximadamente 12 semanas de edad, por ejemplo, desde el nacimiento hasta, e incluyendo, aproximadamente 8 semanas de edad, ventajosamente desde el nacimiento hasta, e incluyendo, aproximadamente 6 semanas de edad, p. ej., desde el nacimiento hasta, e incluyendo, aproximadamente 4 semanas de edad.

[0145] Para los caninos, la sensibilización se puede hacer con una vacuna de ADN o composición inmunógena o inmunológica que comprende o consiste esencialmente en y expresa *in vivo* molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican un inmunógeno, antígeno o epítipo de BTV, y el refuerzo se hace ventajosamente con una vacuna o composición inmunógena o inmunológica que comprende o consiste esencialmente en un vector vírico

vivo recombinante (p. ej. poxvirus, herpesvirus, adenovirus, ventajosamente virus de la viruela de las aves de corral recombinante o virus de la viruela del canario recombinante, CHV recombinante, adenovirus canino recombinante), que comprende o consiste esencialmente en molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican y expresan *in vivo* al menos un inmunógeno, antígeno o epítipo de BTV que es el mismo que el expresado por la vacuna de ADN.

- 5 En otra realización, estas vacunas o composiciones inmunológicas o inmunógenas de sensibilización y refuerzo pueden tener adyuvantes tales como, por ejemplo, DMRIE-DOPE para la vacuna de ADN o composición inmunógena o inmunológica de sensibilización, y Carbopol® para la vacuna o composición inmunógena o inmunológica recombinante de refuerzo.

- 10 **[0146]** La sensibilización se puede llevar a cabo en un cachorro de perro joven que puede tener anticuerpos maternos contra el BTV (contra el cual se dirige la inmunización o vacunación). La vacuna de ADN o composición inmunógena o inmunológica se administra al cachorro joven desde el nacimiento hasta, e incluyendo, aproximadamente 12 semanas de edad, por ejemplo, desde el nacimiento hasta, e incluyendo, aproximadamente 8 semanas de edad, ventajosamente desde el nacimiento hasta, e incluyendo, aproximadamente 6 semanas de edad, p. ej., desde el nacimiento hasta, e incluyendo, aproximadamente 4 semanas de edad.

- [0147]** Para las aves, la sensibilización se puede hacer con una vacuna de ADN o composición inmunógena o inmunológica que comprende o consiste esencialmente en y expresa *in vivo* molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican un inmunógeno, antígeno o epítipo de BTV, y el refuerzo se hace ventajosamente con una
20 vacuna o composición inmunógena o inmunológica que comprende o consiste esencialmente en un vector vírico vivo recombinante (p. ej. poxvirus, herpesvirus, adenovirus, ventajosamente virus de la viruela de las aves de corral recombinante o virus de la viruela del canario recombinante, HVT recombinante, MDV recombinante, adenovirus aviar recombinante), que comprende o consiste esencialmente en molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican y expresan *in vivo* al menos un inmunógeno, antígeno o epítipo de BTV que es el mismo que el expresado
25 por la vacuna de ADN. En otra realización, estas vacunas o composiciones inmunológicas o inmunógenas de sensibilización y refuerzo pueden tener adyuvantes tales como, por ejemplo, DMRIE-DOPE para la vacuna de ADN o composición inmunógena o inmunológica de sensibilización, y Carbopol® para la vacuna o composición inmunógena o inmunológica recombinante de refuerzo.

- 30 **[0148]** En una realización, la vacuna de ADN o composición inmunógena o inmunológica de sensibilización comprende o consiste esencialmente en un plásmido que codifica y expresa los polipéptidos VP2, VP5, o VP2 y VP5, de modo que el plásmido pLH2078.15 (figura 10) al que se ha incorporado un promotor eucariota ubicuo, es decir, el citomegalovirus inmediato temprano humano (CMV-IE) para obtener así la expresión eficaz de las proteínas VP2 y VP5, y el refuerzo de la vacuna o composición inmunógena o inmunológica recombinante comprende o
35 consiste esencialmente en un poxvirus tal como el virus de la viruela del canario, por ejemplo, el virus de la viruela del canario recombinante vCP2289 (ejemplo 9). En otra realización, estas vacunas o composiciones inmunológicas o inmunógenas de sensibilización y refuerzo puede llevar adyuvante: la vacuna de ADN o composición inmunógena o inmunológica que contiene el plásmido pLH2078.15 (figura 10), que comprende, pero no se limita, al promotor de CMV-IE, puede llevar el adyuvante DMRIE-DOPE, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU.
40 20050255127; y la vacuna recombinante o composición inmunógena o inmunológica que contiene vCP2289 puede llevar el adyuvante Carbopol®, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. 20050255127.

- [0149]** La descripción también se refiere a kits para llevar a cabo procedimientos de sensibilización-refuerzo que comprenden o consisten esencialmente en una vacuna o composición inmunógena o inmunológica de
45 sensibilización y una vacuna o composiciones inmunológicas o inmunógenas de refuerzo en recipientes separados, opcionalmente con instrucciones para la mezcla y/o administración.

- [0150]** Las cantidades (dosis) administradas en la sensibilización y el refuerzo y la vía de administración para la sensibilización y el refuerzo pueden ser como se describen en el presente documento, de forma que a partir de
50 esta descripción y el conocimiento en la materia, se puede poner en práctica el régimen de sensibilización-refuerzo sin excesiva experimentación. Además, a partir de la descripción y el conocimiento en la técnica, el experto en la materia puede poner en práctica los procedimientos, kits, etc. del presente documento con respecto a cualquiera de las especies objetivo mencionadas en el presente documento.

- 55 **[0151]** Estos procedimientos pueden comprender, consistir esencialmente o consistir en la administración de una cantidad eficaz de una composición inmunógena o vacuna de acuerdo con la descripción. Esta administración puede ser por vía parenteral, p. ej., por administración subcutánea, intradérmica o intramuscular, y/o por vías oral y/o nasal. Ventajosamente, esta administración es intramuscular o subcutánea. Pueden tener lugar una o más administraciones, tales como dos administraciones.

[0152] Las vacunas o composiciones inmunógenas se pueden inyectar mediante un inyector de chorro líquido o inyector de chorro de polvo sin aguja. Para los plásmidos se pueden usar partículas de oro recubiertas con el plásmido y expulsadas de modo que penetren en las células de la piel del sujeto que se va a inmunizar (Tang, DeVit *et al.* 1992). Se pueden consultar otros documentos citados en la presente memoria para los procedimientos y aparatos de administración de vacunas o composiciones inmunógenas de la descripción. El inyector sin agujas también puede ser, por ejemplo, Biojector 2000 (Bioject Inc., Portland OR, EE.UU.).

[0153] Ventajosamente las composiciones inmunógenas y vacunas de acuerdo con la descripción comprenden o consisten esencialmente en o consisten en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmunológica tal como, pero no se limita a, anticuerpos neutralizantes y/o una respuesta inmunológica protectora de uno o más vectores de expresión y/o polipéptidos como se describen en el presente documento; y, se puede determinar una cantidad eficaz a partir de esta descripción, y el conocimiento en la materia, sin excesiva experimentación. Ventajosamente, las composiciones inmunógenas y vacunas de acuerdo con la descripción comprenden o consisten esencialmente en o consisten en una cantidad eficaz de uno o más vectores de expresión y/o polipéptidos como se describen en el presente documento, que producen una respuesta protectora tal como, pero no se limita a, reducción o extinción de los síntomas clínicos tales como, pero no se limita a hipertermia, leucopenia, linfopenia, trombocitopenia y/o reducción o extinción de la viremia.

[0154] En el caso de composiciones inmunógenas o vacunas basadas en un vector plasmídico, una dosis puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en, en términos generales, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 2000 µg, ventajosamente de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 1000 µg. Los volúmenes de dosis pueden ser entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 2 ml, preferiblemente entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 1 ml.

[0155] Estas dosis y volúmenes de dosis son adecuados para la vacunación de equinos y otras especies objetivo que son mamíferos tales como ovinos, bovinos, caninos, felinos.

[0156] Para la vacunación o inmunización en aves, una dosis está ventajosamente entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 500 µg y preferiblemente entre aproximadamente 50 µg y aproximadamente 200 µg. Los volúmenes de dosis pueden ser entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1 ml, preferiblemente entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,5 ml.

[0157] El experto en la materia puede determinar la dosis de plásmido eficaz para usar para cada protocolo de inmunización o vacunación y especies, a partir de esta descripción y el conocimiento en la materia.

[0158] En el caso de composiciones inmunógenas o vacunas basadas en poxvirus, una dosis puede ser entre aproximadamente 10^2 ufp y aproximadamente 10^9 ufp.

[0159] Para ovinos, bovinos, equinos y otras especies objetivo que son mamíferos tales como felinos y caninos, cuando el vector es un virus vaccinia, la dosis es más ventajosamente entre aproximadamente 10^4 ufp y aproximadamente 10^9 ufp, preferiblemente entre aproximadamente 10^5 ufp y aproximadamente 10^8 ufp y cuando el vector es un virus de la viruela del canario, la dosis es más ventajosamente entre aproximadamente 10^5 ufp y aproximadamente 10^9 ufp y preferiblemente entre aproximadamente $10^{5,5}$ ufp o aproximadamente 10^6 ufp y aproximadamente 10^8 ufp.

[0160] Para aves, cuando el vector es un poxvirus tal como el virus de la viruela del canario, la dosis es más ventajosamente entre aproximadamente 10^3 ufp y aproximadamente 10^7 ufp, preferiblemente entre aproximadamente 10^4 ufp y aproximadamente 10^6 ufp; y cuando el vector es un poxvirus, tal como un virus de la viruela de las aves de corral, la dosis es más ventajosamente entre aproximadamente 10^2 ufp y aproximadamente 10^5 ufp, preferiblemente entre aproximadamente 10^3 ufp y aproximadamente 10^5 ufp. A partir de esta descripción y el conocimiento en la materia, el experto en la materia puede determinar la dosis adecuada cuando el vector es otro avipoxvirus, tal como el virus de la viruela de la paloma, de la viruela del pichón, etc.

[0161] En el caso de composiciones inmunógenas o vacunas de una especie objetivo de mamífero, basadas en un vector vírico distinto de un poxvirus, tal como un herpesvirus o adenovirus, una dosis es en general entre aproximadamente 10^3 ufp y aproximadamente 10^8 ufp; y en el caso de dichas composiciones inmunógenas basadas en vector vírico que no es poxvirus para especies de aves o vacunas de aves, una dosis en general es entre aproximadamente 10^3 ufp y aproximadamente 10^6 ufp. Para dichas composiciones inmunógenas o de vacunas

basadas en vector vírico que no es poxvirus, para especies de mamíferos objetivos más grandes, p. ej., gatos más grandes (p. ej., mantenidos en un zoo) o equinos, p. ej., en el caso de composiciones inmunógenas o de vacunas para equinos, una dosis ventajosamente es entre aproximadamente 10^6 ufp y aproximadamente 10^8 ufp.

5 **[0162]** El volumen de dosis de las composiciones inmunógenas y de vacunas para las especies objetivo que son mamíferos, p. ej., el volumen de dosis de composiciones inmunógenas o de vacunas equinas, basadas en vectores víricos, p. ej., composiciones inmunógenas o de vacunas basadas en vector vírico que no es poxvirus, en general es entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 2,5 ml, tal como entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 2,0 ml, preferiblemente entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 ml, preferiblemente
10 aproximadamente 1,0 ml. El volumen de dosis de las composiciones inmunógenas o de vacunas para aves basadas en vectores víricos, p. ej., el volumen de dosis de composiciones inmunógenas o de vacunas aviares basadas en vector vírico que no es poxvirus, es en general entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1,0 ml, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5 ml y más ventajosamente entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,3 ml. También en relación con dicha vacuna o composición
15 inmunógena, a partir de la descripción en el presente documento y el conocimiento en la materia, un experto en la materia puede determinar el número de administraciones, la vía de administración y las dosis que se usan para cada protocolo de inmunización o vacunación, sin excesiva experimentación. Por ejemplo, puede haber dos administraciones a una oveja, vaca o caballo, p. ej., en intervalos de 35 días.

20 **[0163]** En el caso de composiciones inmunógenas de subunidad o vacunas de subunidad, con respecto a la cantidad del principio activo, p. ej., la subunidad (antígeno, inmunógeno, epítipo), una dosis comprende o consiste esencialmente en o consiste en, en términos generales, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 2000 µg, ventajosamente de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 1000 µg. El volumen de dosis de dichas composiciones inmunógenas o de vacuna para las especies objetivo que son mamíferos, p. ej., para equinos, es en
25 general entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 ml, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 2,0 ml y más ventajosamente aproximadamente 1,0 ml. Los volúmenes de dosis de dichas composiciones inmunógenas o de vacuna en general es entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1,0 ml, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,5 ml, y más ventajosamente entre 0,2 y 0,3 ml. También para dicha vacuna o composición inmunógena, el experto en la materia, a partir de esta descripción y el
30 conocimiento en la materia puede, sin excesiva experimentación, determinar el número de administraciones, la vía de administración y las dosis que se usan para cada protocolo de inmunización o vacunación.

[0164] La descripción también se refiere al uso de un vector de expresión *in vivo* o una preparación de vectores y/o polipéptidos de acuerdo con la descripción, para la formulación de una composición inmunógena o una
35 vacuna prevista para proteger una especie objetivo, o producir en la especie objetivo una respuesta inmunológica, contra el BTV, y en algunas realizaciones, contra al menos otro agente patógeno.

[0165] Una vacuna basada en plásmido o una vacuna vírica que expresa una o más proteínas de BTV o una vacuna de subunidad de BTV de acuerdo con la presente descripción, no inducirá en el animal inmunizado o
40 vacunado, anticuerpos contra otras proteínas del virus que no son presentadas en o por la composición inmunógena o vacuna (p. ej., no están presentes en la composición inmunógena o vacuna y/o no son expresadas por la composición inmunógena o vacuna). Por esta característica, la presente descripción proporciona procedimientos de diagnóstico diferenciales. La presente descripción hace posible hacer una distinción entre animales infectados por las cepas de campo patógenas del BTV y animales vacunados o inmunizados con vacunas o composiciones de
45 acuerdo con la descripción. En el primer caso, las proteínas y/o anticuerpos dirigidos contra estas, están presentes y se pueden detectar mediante una reacción de antígeno-anticuerpo. En el último (los animales vacunados o inmunizados de acuerdo con la descripción), este no es el caso, ya que dichos animales permanecen negativos en dicha reacción de antígeno-anticuerpo para proteínas no presentadas en o por la composición inmunógena o de vacuna o anticuerpos contra las mismas. Con el fin de hacer esta discriminación, el procedimiento de diagnóstico
50 usa una proteína que no está representada en o por la vacuna o composición inmunógena (no presente y/o no expresada), p. ej., proteínas VP7, NS 1, NS2 o NS3 cuando no están representadas en la vacuna o composición inmunógena.

[0166] Por consiguiente, la presente descripción comprende ensayos de diagnóstico o kits que usan una
55 proteína o anticuerpo para la misma, que no es presentada en o por una vacuna o composición inmunógena de la descripción; y kits que contienen dicho ensayo o kit de diagnóstico y dicha vacuna o composición inmunógena, de modo que el usuario puede inocular y/o vacunar animales y después hacer el ensayo en animales para determinar aquellos animales que han sido expuestos al BTV frente a aquellos animales que solo han sido inmunizados y/o vacunados contra el BTV.

[0167] Por lo tanto, la presente descripción se refiere al uso de vectores, preparaciones y polipéptidos de acuerdo con la descripción para la preparación de composiciones inmunógenas y vacunas, permitiendo la discriminación entre animales vacunados o inmunizados y animales infectados.

[0168] La presente descripción se refiere también a un procedimiento de inmunización o vacunación asociado con un procedimiento de diagnóstico que permite dicha discriminación.

[0169] La proteína seleccionada para el diagnóstico o uno de sus fragmentos o epítomos se usa como el antígeno en el ensayo de diagnóstico y/o se usa para producir anticuerpos policlonales o monoclonales.

[0170] El experto en la materia tiene suficiente conocimiento práctico para producir estos anticuerpos y para implementar antígenos y/o anticuerpos en procedimientos de diagnóstico convencionales, p. ej., pruebas de ELISA y de esta forma realizar ensayos de diagnóstico diferenciales de acuerdo con la presente descripción.

[0171] La invención se describirá ahora y se ilustrará mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

[0172] Todas las construcciones se implementan usando procedimientos de biología molecular (clonación, digestión por enzimas de restricción, síntesis de un ADN monocatenario complementario, reacción en cadena de la polimerasa, alargamiento de un oligonucleótido por la ADN polimerasa, etc.) descritos por Sambrook J. *et al.* (Sambrook y Russell 2001). Todos los fragmentos de restricción usados para estos ejemplos de la presente invención, así como los diferentes productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se aíslan y purifican usando la extracción en gel de Qiagen o kits de purificación de PCR.

Ejemplo 1: Cultivo del virus de la lengua azul (BTV) de exposición

[0173] Se usó en todo el experimento el serotipo 17 de BTV, una cepa que fue aislada originalmente de la sangre de ovejas de Tulare County, CA (EE.UU.) que murieron de la enfermedad de la lengua azul. El virus se pasó dos veces en ganado seronegativo antes de aislarlo en células endoteliales de la microvasculatura pulmonar bovinas primarias. Para la amplificación, esta cepa del serotipo 17 de BTV (Bonneau, DeMaula *et al.* 2002; DeMaula, Leutenegger *et al.* 2002) se cultivó en células BHK-21 (células de riñón de hámster recién nacido), que se pueden obtener de la American Type Culture Collection (ATCC) con el n.º CCL-10.

[0174] Las células BHK-21 se cultivaron en medio Eagle (EMEM) complementado con suero bovino fetal al 10 % (Hyclone Laboratories), caldo de fosfato de triptosa al 10 %, y penicilina y estreptomycin al 1 %. Las células se cultivaron a +37 °C con una atmósfera de 5 % de CO₂.

[0175] La monocapa celular es confluyente en el espacio de 3 días. El medio de cultivo después se sustituye por medio EMEM de nueva aportación complementado con FBS al 10 %, y se añade el BTV en una relación de aproximadamente 5 ufp/célula. Cuando se completó el efecto citopatógeno (CPE) (en general de 48 a 72 horas después de inicio del cultivo), se recogieron las suspensiones de virus y después se clarificaron por centrifugación y se congelaron a -70 °C. Fueron necesarios uno o dos pasos para producir un lote de virus, que se almacenó a -70 °C.

Ejemplo 2: Síntesis de VP2 y VP5 de BTV optimizadas

[0176] La preferencia de codones entre diferentes especies puede ser notablemente diferentes. Para potenciar el nivel de expresión de una proteína extraña, es decir VP2 y VP5 de BTV usando un sistema de expresión del virus de la viruela del canario (ALVAC) en una célula de mamífero ovino/bovino/equino, es muy importante ajustar la frecuencia de codones de la proteína extraña para que se corresponda con la del sistema de expresión del hospedante (Kim, Oh *et al.* 1997). Para la optimización de codones, los bioinformáticos tienen en cuenta muchos otros factores, p. ej., la estructura secundaria, contenido de GC, codones repetidos, sitios de endonucleasas de restricción, etc., y desarrollan algoritmos patentados. Geneart GmbH (Regensburg, Alemania) ha desarrollado el software patentado GeneOptimizer™ (patente en trámite) que implementa la optimización de multiparámetros en una sola operación. Teniendo en cuenta los parámetros más importantes en paralelo, el software genera un total de hasta 500000 variantes optimizadas de la secuencia objetivo en un procedimiento evolutivo y selecciona el que se ajusta mejor. Se ha descrito que dichos genes optimizados tienen aumentos de rendimientos en la expresión de

hasta 100 veces comparado con la secuencia génica original (Bradel-Tretheway, Zhen *et al.* 2003; Disbrow, Sunitha *et al.* 2003).

[0177] La información de la secuencia de ácido nucleico para VP2 de BTV-17 (SEQ ID NO: 3) (de Mattos, de Mattos *et al.* 1994) y para VP5 de BTV-17 (SEQ ID NO: 4) se envió a Geneart para usar como las secuencias de BTV-17 "naturales". Esta información de secuencia se aplicó al software GeneOptimizer™ por Geneart, y se obtuvieron las secuencias sintéticas optimizadas para VP2 y VP5.

[0178] La figura 1 proporciona una comparación/alineamiento de secuencias de nucleótidos entre VP2 natural (SEQ ID NO: 3) y VP2 sintética optimizada (por Geneart) (SEQ ID NO: 1). La figura 2 proporciona una comparación/alineamiento de secuencias de nucleótidos entre VP5 natural (SEQ ID NO: 4) y la VP5 sintética optimizada (SEQ ID NO: 2). La secuencia optimizada para VP2 y VP5 fue usada por Geneart como base para la síntesis química de una matriz de oligonucleótidos con alta precisión que considerados juntos abarcan la secuencia codificante sintética entera para cada uno de los genes. Los oligonucleótidos para cada gen después se ensamblan usando una estrategia basada en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para dar la secuencia codificante sintética completa de VP2 y VP5.

Ejemplo 3: Clonación por pPCR-Script de VP2 sintético y VP5 sintético de BTV-17 optimizados

[0179] VP2 sintético. El vector de clonación pPCR-Script® Amp SK(+) disponible en Stratagene (San Diego, CA, EE.UU.) se linearizó en su región de sitio de clonado múltiple (MCS) mediante las endonucleasas de restricción (RE) *Sac* I y *Kpn* I. La secuencia codificante de VP2 sintética completamente ensamblada, lineal, de 2.913 nucleótidos, que contenía el extremo 3' del promotor H6 inmediatamente en la dirección 5' del cordón de inicio ATG, después se ligó al vector plasmídico con ADN ligasa T4. El ADN ligado se usó para transformar células de *E. coli* competentes. Se seleccionaron los transformantes positivos que eran resistentes a la ampicilina (llevan el vector plasmídico) y que albergan la secuencia génica sintética de VP2 en virtud de su fenotipo "blanco" en placas de indicador de XGal (gen de la β -galactosidasa interrumpido por la inserción de VP2 en MCS de pPCR-Script®) para la caracterización adicional. Se aisló un clon, 043004 pPCR-Script (5779 pb) y se determinó que era correcto por el análisis de secuencia de ADN. La figura 3 ilustra la estrategia de clonación anterior. El clon 043004 se usó para las posteriores operaciones de clonación.

[0180] VP5 sintético. El vector de clonación pPCR-Script® Amp SK(+) disponible en Stratagene (San Diego, CA, EE.UU.) se linearizó en su región MCS mediante escisión por las RE *Sac* I y *Kpn* I. La secuencia codificante de VP5 sintética completamente ensamblada, lineal, de 1638 nucleótidos, después se ligó al vector plasmídico con ADN ligasa T4. El ADN ligado se usó para transformar células de *E. coli* ultracompetentes. Se seleccionaron los transformantes positivos que eran resistentes a la ampicilina (llevan el vector plasmídico) y que albergaban la secuencia génica sintética de VP5 en virtud de su fenotipo "blanco" en placas de indicador de XGal (gen de la β -galactosidasa interrumpido por la inserción de VP2 en MCS de pPCR-Script®) para la caracterización adicional. Se aisló un clon, 043005 pPCR-Script (4492 pb) y se determinó que era correcto por el análisis de secuencia de ADN. La figura 8 ilustra la estrategia de clonación anterior. El clon se usó para posteriores operaciones de clonación.

Ejemplo 4: plásmido donador ALVAC pNVQH6C5LSP-18. La construcción del plásmido donador ALVAC pNVQH6C5LSP-18 se ha descrito (solicitud de patente de EE.UU. 20050255127). Se identificó un locus de 5 kb de ADN del virus de la viruela del canario, que codificaba un ORF designado **C5** que empezaba en la posición 1864 y terminaba en la posición 2187 del genoma vírico. A continuación, se describe un plásmido de inserción de **C5** construido eliminando la mayor parte del ORF de **C5** y sustituyéndola por el promotor H6, un sitio de clonado múltiple (MCS) y secuencias de terminación de transcripción y traducción en todos los marcos de lectura. Se amplifica un fragmento por PCR de 1590 pb, que contiene el brazo C5R en la dirección 5' a partir del ADN genómico del virus de la viruela del canario usando los cebadores C5A1 y C5B1 (SEQ ID NO: 5) C5A:

- 5' GGCCGAATTCTGAATGTTAAATGTTATACTTT 3'

(SEQ ID NO:6): C5B1:

-5' CCCGGGATCGATGGATCCTTTTTATAGCTAATTAGTCACGTACCTTT
GAGAGTACCACTTCAGCTA 3'

[0181] El fragmento amplificado incluye un sitio *Eco*R I en el extremo 5', secuencias de terminación y un MCS

que contiene *Bam*H I, *Cla* I y *Xma* I en el extremo 3'.

[0182] Se amplificó un fragmento por PCR de 458 pb, que contiene el brazo C5L en la dirección 3' a partir del ADN genómico del virus de la viruela del canario usando los cebadores C5C1 y C5D1:

(SEQ ID NO :7) C5C1:

- 5' GGATCCATCGATCCCGGGTTTTTATGACTAGTTAATCACGGCCGCTT
ATAAAGATCTAAAATGCAT 3'

(SEQ ID NO: 8) C5D1

- 5' GGCTGCAGGTATTCTAAACTAGGAATAGAT 3'

[0183] El fragmento amplificado incluye los sitios de endonucleasas de restricción en 5' *Bam*H I, *Cla* I y *Xma* I, secuencias de terminación y un sitio *Pst* I en el extremo 3'.

[0184] Los fragmentos de PCR anteriores se fusionaron entre sí por reamplificación de los cebadores C5A y C5D (anteriores), generando un fragmento *Eco*R I-*Pst* I de 2.030 pb que se clona en el vector plasmídico pUC8 pUC/C5L/B *Cla* Xm/C5R. Se usaron los siguientes oligonucleótidos para introducir una secuencia única *Not* I en el extremo 5' del brazo C5R, por oligoinserción en el sitio *Eco*R I, generando pUC/*Not* I/C5R/MCS/C5L:

Oligonucleótido para la introducción de *Not* I 5' AATTGCGGCCGC 3' (**SEQ ID NO: 18**)

[0185] El promotor H6 de vaccinia está contenido en el plásmido pBSH6-1

[0186] Se amplificó un fragmento de 176 pb (fragmento H6) que contenía el promotor H6 y secuencias de reconocimiento para un sitio de clonado múltiple que contenía *Asp*718 I, *Xho* I, *Xba* I, *Cla* I y *Sma* I, usando los cebadores H6A1 y H6B1:

(SEQ ID NO: 9) H6A1:

- 5' TCGTTAATTAATTAGAGCTTCTTTAT- TCTATACTTAAAAAG 3'

(SEQ ID NO: 10) H6B1:

- 5' AAAACCCGGGATCGATTCTAGACTCGAGGGTACCTACGATACAAACT
TAACGGATA 3'

[0187] Los fragmentos que codificaban H6 (anterior) se mezclaron y reamplificaron usando H6B1 para generar un fragmento H6p/MCS de 232 pb que se insertó en pUC/C5L/B *Cla* Xm/C5R entre los sitios *Bam*H I y *Xma* I. La figura 4 muestra el plásmido resultante, pNH6C5LSP-18, un plásmido de inserción de **C5** que contenía el promotor H6, terminadores de la transcripción y traducción funcionales en todos los marcos de lectura y un MCS.

[0188] **Ejemplo 5: construcción del plásmido donador ALVAC pCXL148.2.** El análisis de la secuencia de nucleótidos del plásmido donador pNVQH6C5LSP-18 indicaba que hay una mutación de una sola base en la región C5R del plásmido donador ALVAC pNVQH6C5LSP-18 (descrito en la solicitud de EE.UU. 20050255127) con respecto a la del vector vírico ALVAC (no se proporciona la secuencia). Por consiguiente, se creó pCXL148 como sigue, para modificar la secuencia del plásmido donador con el fin de obtener la correspondencia exacta con el ALVAC clonado (purificado por placa), de modo que se minimiza cualquier discrepancia de secuencia que pueda surgir durante la creación de construcciones del virus ALVAC de la lengua azul obtenido recombinante. La figura 5 ilustra la estrategia de construcción.

[0189] El plásmido pNVQH6C5LSP-18 (solicitud de EE.UU. 20050255127) se digirió con las endonucleasas de restricción *Sna*BI+*Bsr*GI para generar un fragmento de 3923 pb y un fragmento de 962 pb. La digestión por RE se resolvió por electroforesis en gel de agarosa, y el fragmento de 3923 pb se cortó del gel. El fragmento de ADN se

purificó usando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen Inc., EE.UU.; n.º de cat. 28704) como describe el fabricante.

[0190] A continuación, se usó el ADN genómico de ALVAC como molde para la reacción de PCR con el conjunto de cebadores 7634CXL y 7521CXL (véase más adelante) para generar un fragmento de PCR de 1,89 kb que expande la región C5R del virus.

(SEQ ID NO: 11) 7521CXL (directo):

10 -5' TTATTTAGAAATTATGCATTTTAGA

(SEQ ID NO: 12) 7634CXL (inverso):

15 -5' GTTCTCGTAGGAGAGAACTATTGAC

[0191] El fragmento amplificado por PCR de 1,89 kb se digirió con *Sna*BI+*Bsr*GI para generar tres fragmentos: 361 pb, 569 pb y 962 pb. Esta digestión por RE se presentó por electroforesis en gel de agarosa, y el fragmento de 962 pb se cortó del gel y el ADN se purificó usando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen Inc., EE.UU.; n.º de cat. 28704) como describe el fabricante.

[0192] La reconstrucción del plásmido donador ALVAC pNVQH6C5LSP-18 en el que el nucleótido "T" mutado en la región codificante C5R del plásmido donador se sustituye por el correspondiente nucleótido "C" de ALVAC salvaje, se lleva a cabo por combinación de fragmentos de RE para crear pCXL148.2, como sigue:

25 a. El fragmento de 3923 pb de la digestión con RE (*Sna*BI+*Bsr*GI) de pNVQH6C5LSP-18 se liga direccionalmente con la ADN ligasa T4 al fragmento de 962 pb *Sna*BI+*Bsr*GI obtenido de la región C5R amplificada por PCR de ALVAC.

30 b. Se usaron reacciones de ligado para transformar células de *E. coli* competentes y las reacciones de transformación se desarrollaron con selección con ampicilina.

[0193] Se seleccionaron los transformantes, y su ADN plasmídico se caracterizó por digestiones con RE. Se encontró que la secuencia de nucleótidos de un clon candidato pCXL148.2 tenía el nucleótido "C" correcto en la región C5R. El nuevo plásmido donador C5 pCXL148.2 tiene una homología exacta con las correspondientes secuencias en el vector vírico ALVAC. La secuencia de ácido nucleico del plásmido donador pCXL148.2 se proporciona en la figura 6 (SEQ ID NO: 13)

Ejemplo 6: Construcción de pC5 H6pVP2

40 **[0194]** El plásmido VP2 BTV 17 (043004, figura 3) se digirió con las RE *Eco*R V + *Xho* I para generar un fragmento único de 2.913 pb que comprende: un sitio 5' *Eco*R V seguido VP2-BTV de codones optimizado sintético de longitud completa seguido del sitio 3' *Xho* I. Esta digestión por RE se presentó por electroforesis en gel de agarosa, y el fragmento de 2.913 pb se cortó del gel y el ADN se purificó usando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen Inc., EE.UU.; n.º de cat. 28704) como describe el fabricante.

45 **[0195]** Se digirió pCXL148.2 (plásmido donador pC5, véase la figura 5) con *Eco*R V y *Xho* I para generar un vector de homología linearizado de 4879 pb que contenía el brazo derecho de C5, el promotor H6 y el brazo izquierdo de C5.

50 **[0196]** El fragmento de 2.913 pb purificado de la digestión con RE (*Eco*RV+*Xho*I) de 043004pVP2 BTV 17 se liga direccionalmente con la ADN ligasa T4 al plásmido ALVAC donador pCXL-148.2 linearizado y digerido con *Eco*RV+*Xho*I, de 4879 pb. Se usaron reacciones de ligado para transformar células de *E. coli* competentes, y las reacciones de transformación se desarrollaron con selección con ampicilina. Se seleccionaron los transformantes, se desarrollaron, y su ADN plasmídico se caracterizó por digestiones con RE. Los clones con los mapas de RE correctos se hibridaron en transferencias Southern con oligonucleótidos de ácido nucleico específico de VP2. Se seleccionó un clon positivo, pALVAC C5H6p-syntheticBTV VP2, para la posterior manipulación de clonación. La estrategia de clonación anterior se proporciona en la figura 7.

Ejemplo 7: Amplificación por PCR de VP5 que incorpora el promotor 42K.

[0197] Se seleccionó el promotor de Entomopoxvirus Amsacta moorei 42K (Barcena, Lorenzo *et al.* 2000) para regular la expresión del gen de VP5 sintético optimizado. La secuencia de ácido nucleico del promotor 42K (véase a continuación: la secuencia del promotor está en *italica y subrayada*) se puso adyacente al codón de inicio 5' ATG del gen de VP5 sintético usando una estrategia basada en la PCR en la que el promotor 42K se insertó en el extremo 5' de un cebador directo sintético. El uso de este cebador junto con un cebador inverso permite la amplificación directamente desde el plásmido VP5 BTV 17 (043005), que sirve como molde (véase la figura 8). Se usó la pareja de cebadores 13247.JY / 13248.JY (a continuación, y figura 21) en una reacción de PCR para amplificar un fragmento de ADN que comprende el casete de expresión 42Kp -VP5 flanqueado por sitios *Xho* I.

[0198] Cebadores para la amplificación del casete que expresa 42Kp -VP5-BTV:

(SEQ ID NO: 14) 13247.JY directo:

**-5' GCGCTCGAGTTTTTATTCAAAATTGAAAATATATAATTACAATATAAAA
TGGGCAAGATCATCAAGAGCCTG**

(SEQ ID NO: 15) 13247.JY inverso:

-5' ATCTCGAGATAAAAAATCATCAGGCGTTCCTCAGGAACAGGGGCACGTC

[0199] Se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (PCR) con los cebadores anteriores y el producto resultante de la PCR se clonó en el sitio *Xho*I del vector de clonación pCR®2.1-TOPO de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.) para crear pLH2033.1 (pCR2.1 42Kp VP5-BTV sintético). Se confirmó que esta construcción contiene la secuencia correcta. La estrategia de clonación se ilustra en la figura 9. El clon pLH2033.1 se expandió para amplificar los rendimientos de plásmidos según fuera necesario en posteriores actividades de clonación.

Ejemplo 8: Construcción del vector de homología donador pLH2078.15 (pC5H6VP242KpVP5)

[0200] pLH2033.1 que alberga la secuencia de 42Kp-VP5-BTV sintética se escindió con *Xho* I que libera un fragmento de 1647 pb que codifica VP5 de BTV. Esta digestión con *Xho* I se presentó por electroforesis en gel de agarosa, y el fragmento de VP2 de 1647 pb se cortó del gel y el ADN se purificó usando el kit de tracción en gel QIAquick (Qiagen Inc., EE.UU.; n.º cat. 28704) como describe el fabricante.

[0201] pLH2030.2 (pALVAC C5H6p-VP2-BTV sintético, el plásmido donador de pC5, véase la figura 7) se digirió con *Xho* I para generar un vector de homología linearizado de 7.744 pb que contenía el brazo derecho de C5, promotor H6, VP2 de BTV sintético, y el brazo izquierdo de C5.

[0202] El fragmento purificado de 1647 pb de la digestión con *Xho* I de pLH2033.1 se ligó con la ADN ligasa T4 al plásmido ALVAC donador pLH2030.2, linearizado, de 7744 pb por *Xho* I. Las reacciones de ligado se usaron para transformar células de *E. coli* competentes y las reacciones de transformación se desarrollaron con selección de ampicilina. Los transformantes se seleccionaron, se desarrollaron y su ADN plasmídico se caracterizó por digestiones con RE. Debido a que el ligado descrito no es direccional, un componente elemental de la selección de clones implica la orientación correcta del inserto de 42K-VP5 sintético con respecto al de H6pVP2 en el plásmido donador, en esta realización, la orientación preferida es de cabeza a cola, p. ej., VP2 y VP5 son transcritos y traducidos en la misma dirección de 5' a 3' en el plásmido. Los clones con el patrón de RE correcto se seleccionaron para la caracterización adicional. Se seleccionó y secuenció un clon positivo pLH2978.15. La estrategia de clonación descrita para la construcción del plásmido donador final ALVAC-BTV se proporciona en la figura 10. La secuencia de nucleótidos comentada de pLH2978.15 se proporciona en la figura 11.

Ejemplo 9. Generación y caracterización de ALVAC BTV (vCP2289).

[0203] Para generar recombinantes ALVAC-basados en BTV, se transfectaron células de fibroblastos embrionarios de pollo primarios (CEF) con 15 µg de ADN plasmídico donador pLH2078.15 linearizado con *Not* I (pC5 H6p-BTV VP2-42Kp-BTV VP5) mezclado con el reactivo de transfección FuGENE-6 (Roche). Las células transfectadas posteriormente se infectaron con ALVAC (6,3 x 10⁹ ufp/ml HM1372) como el virus de rescate con una MDI de 10. Después de 24 horas, las células transfectadas-infectadas se recogieron, se trataron con ultrasonidos y se usaron para la purificación en placa y cribado de virus recombinantes. 24-48 horas después del cultivo en placa

de CEF recientes, las placas recombinantes se transfirieron sobre membrana de nailon y se hibridaron con una sonda de ADN específica para BTV que se marcó con peroxidasa de rábano picante, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Amersham n.º de cat. RPM3001). Después de 4 ciclos secuenciales de purificación en placa, las placas individuales se amplificaron para producir las reservas denominadas vCP2289.1.2.1.1 y vCP2289.1.1.1. Se confirmó por hibridación que los virus recombinantes eran 100 % positivos para el inserto de BTV y 100 % negativos para el sitio C5 vacío.

[0204] Se seleccionaron placas individuales del ciclo final de la purificación en placa, y se expandieron para obtener las reservas P1 (matraz T-25), P2 (matraz T-75) y P3 (botellas giratorias) para amplificar vCP2289.1.2.1.1 y vCP2289.2.1.1.1. Los recombinantes se volvieron a confirmar a nivel de P2 por hibridación y se encontró que eran 100 % positivos para el inserto y 100 % negativos para el sitio C5 vacío. El fluido del cultivo celular infectado de las botellas giratorias se recogió y se concentró para producir las reservas de virus (1,8 ml de vCP2289.1.2.1.1 con $1,25 \times 10^{10}$ ufp/ml, y 1,9 ml de vCP2289.2.1.1.1 con $1,0 \times 10^{10}$ ufp/ml). La figura 12 presenta un diagrama de flujo para la construcción de ALVAC + VP2 y VP5 de BTV (vCP2289) recombinante.

Ejemplo 10. Caracterización de ALVAC BTV (vCP2289).

[0205]

1. Confirmación de la pureza genética. Las reservas P3 se reconfirmaron por hibridación, como 100 % positivas para el inserto de BTV y 100 % negativas para el sitio C5 vacío.

2. Análisis genómico.

a. Mapa de restricción:

i. Se creó un análisis de fragmentos por electroforesis en gel de endonucleasas de restricción (RE) teórico para el ADN genómico en Vector NTI (Invitrogen, EE.UU.) y se muestra en la figura 13.

ii. El ADN genómico se extrajo de vCP2289.1.2.1.1 y vCP2289.2.1.1.1, se digirió con *Bam*H I, *Hind* III o *Pst* I, y se separó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. Los resultados pusieron de manifiesto la inserción correcta de la secuencia génica extraña (véase la figura 14).

b. Transferencia Southern: El ADN genómico se digirió con *Bam*H I, *Hind* III, o *Pst* I se transfirió a membrana de nailon y se llevó a cabo el análisis de transferencia de Southern por hibridación con la sonda de BTV. Las bandas de 9508bp de *Bam*H I, 14974bp de *Hind* III y 2901bp de *Pst* I específicas de BTV, se observaron a los tamaños esperados. Los resultados indican la inserción correcta del inserto de BTV en el locus C5. La figura 15 proporciona los resultados de la transferencia de Southern.

3. Análisis de expresión:

a. Transferencia Western. 1º células CEF se infectaron con las reservas P3 de vCP2289.1.2.1.1 y vCP2289.2.1.1.1 con una MDI de 10 y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Después se recogieron las células y el líquido sobrenadante del cultivo. Las proteínas de la muestra se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10 %, se transfirieron por electrotransferencia a membrana de nailon Immobilon y se hibridaron con la IgG de conejo dirigida contra VP5 de BTV17 purificada por afinidad (University of California, Davis, EE.UU.) con una dilución 1:2000. Se usó anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa como un anticuerpo secundario y las bandas se visualizaron usando reactivos de detección de Amersham. Se detectaron dos bandas de proteínas entre 47KDa y 60KDa en los sedimentos celulares de vCP2289.1.2.1.1 y vCP2289.2.1.1.1, indicando la expresión de la proteína VP5 de BTV-17 (véase la figura 16). La proteína VP5 de BTV-17 no era secretada al medio de cultivo celular.

b. Inmunofluorescencia. Usando una mezcla de cuatro anticuerpos de ratón dirigidos contra VP2 de BTV-17 (ABX IgG 17,81 α-BTV 17; PA IgG 17,815 α-BTV 17; PA IgG 17,85 α-BTV 17; PA IgG 17,813 α-BTV-17, de la University of California, Davis, EE.UU.), las transferencias western y los ensayos en inmunoplaaca para la expresión de VP2 eran probablemente negativos debido a las sensibilidades conformacionales de los reactivos y el entorno de "tipo desnaturalizante" impuesto por la transferencia e hibridación. Por consiguiente, las células CEF primero se infectaron con las reservas P3 de vCP2289.1.2.1.1 y vCP2289.2.1.1.1 con una MDI de 0,1 y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Después las células se fijaron con paraformaldehído al 3 % y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5 %. La mezcla de cuatro anticuerpos de ratón dirigidos contra VP2 de BTV-17 (ABX IgG 17,81 α-BTV 17; PA IgG 17,815 α-BTV 17; PA IgG 17,85 α-BTV 17; PA IgG 17,813 α-BTV-17, de la University of California, Davis, EE.UU.), se usó

como el anticuerpo primario con una dilución 1:100 y un anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugado con FTIC se usó como un anticuerpo secundario. Las células fluorescentes verdes fuertes se visualizaron con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE300, indicando la expresión de la proteína VP2 de BTV (no se muestran los datos).

5

4. Análisis de secuencia: se llevó a cabo un análisis más detallado del ADN genómico de la reserva P3 por amplificación por PCR y análisis de secuencia de los brazos que flanquean del locus C5 y el inserto de BTV. Se usaron los cebadores 7931.DC y 7932.DC situados más allá de los brazos de locus C5, para amplificar el fragmento entero de C5R-inserto de BTV-C5L.

10

[0206] Los cebadores para la amplificación por PCR de los brazos de C5 más inserto vCP2289:

(SEQ ID NO: 16) 7931.DC:

15

-5 GAATCTGTTAGTTAGTTACTTGGAT

(SEQ ID NO: 17) 7932.DC:

20

-5 TGATTATAGCTATTATCACAGACTC

[0207] Los resultados muestran que las secuencias del inserto de BTV y los brazos izquierdo y derecho de C5 alrededor del inserto vCP2289.1.2.1.1 y vCP2289.2.1.1.1 eran correctas.

Ejemplo 11: Producción de vacunas recombinantes

25

[0208] Para la preparación de las vacunas ovinas, bovinas o equinas, el virus de la viruela del canario recombinante vCP2289 (ejemplo 9) se hará con disoluciones de carbómero adyuvantes, en particular Carbopol™974P fabricado por BF Goodrich, Ohio, EE.UU. (peso molecular aproximadamente 3000000).

30

[0209] Se preparó inicialmente una disolución madre de Carbopol™974P al 1,5 % en agua destilada que contenía 1 g/l de cloruro sódico. Esta disolución madre después se usó para la preparación de una disolución de Carbopol™974P de 4 mg/ml en disolución salina fisiológica. La disolución madre se mezcló con el volumen adecuado de la disolución salina fisiológica, en una sola etapa o en varias etapas sucesivas, ajustándose el valor de pH en cada etapa con una disolución de hidróxido sódico 1 N (o incluso más concentrada) con el fin de obtener un

35

valor de pH final de 7,3 a 7,4.

[0210] La disolución de Carbopol™974P lista para usar obtenida de esta forma se usó para recoger virus recombinantes, liofilizados, o para diluir disoluciones madres de virus recombinantes. Por ejemplo, para obtener una suspensión de virus que contenía una dosis de 10^8 ufp/1 ml, una disolución madre de virus se diluyó para obtener un

40

valor de $10^{8.3}$ ufp/ml, seguido de dilución en partes iguales de dicha disolución de Carbopol™974P 4 mg/ml lista para usar.

Ejemplo 12: Producción de vacunas de ADN para ovinos, bovinos o equinos.

45

[0211] Para la inmunización con ADN, se construirán plásmidos en los que la secuencia de nucleótidos de VP2 de BTV con codones optimizados (Dibujo 1, SEQ ID: 1) está situada en un plásmido, y las secuencias de nucleótidos de VP5 de BTV (SEQ ID: 2) están en un plásmido separado. La expresión de las secuencias de BTV para cada plásmido puede ser dirigida, pero no está limitado, por el promotor de CMV-IE (CMV humano o CMV murino). La secuencia señal de poliadenina (poliA) (sea del gen de la hormona de crecimiento bovino o del gen de la beta-globina de conejo, pero no limitado) se incorporará en el extremo 3' de la secuencia que codifica el BTV en cada plásmido.

50

[0212] Puede ser conveniente expresar VP2 y VP5 de BTV desde el mismo plásmido para asegurar la coexpresión de las proteínas de BTV en la misma célula. En este caso, se construirá un plásmido similar pLH2078.15 (ejemplo 8, dibujo 10) en el que los promotores de poxvirus se han sustituido por, pero no se limita a, promotores eucariotas ubicuos, tales como el promotor de CMV-IE. La expresión de VP2 y VP5 de BTV será controlada necesariamente por diferentes promotores. Las secuencias señal poliA se incluirán en el extremo 3' de cada secuencia de nucleótidos de BTV.

55

[0213] Una disolución de ADN que contiene el o los plásmidos descritos antes, se concentrará por precipitación en etanol de la forma descrita en Sambrook *et al.* (1989). El sedimento de ADN se recogerá con una disolución de NaCl al 0,9 % para así obtener una concentración de 1 mg/ml. Se preparará una disolución de DMRIE-DOPE 0,75 mM recogiendo un liofilizado de DMRIE-DOPE mediante un volumen adecuado de H₂O estéril.

5

[0214] La formación de complejos de plásmido-ADN lipídico se llevará a cabo diluyendo en partes iguales la disolución de DMRIE-DOPE 0,75 mM (1:1) con la disolución de ADN 1 mg/ml en NaCl al 0,9 %. La disolución de ADN se introducirá progresivamente con la ayuda de una aguja ondulada 26G a lo largo de la pared del matraz que contenía la disolución de lípido catiónico, para así prevenir la formación de espuma. Se agitará suavemente en cuanto se mezclen las dos disoluciones. Finalmente se obtendrá una composición que comprende DMRIE-DOPE 0,375 mM y plásmido 500 µg/ml.

10

[0215] Es conveniente que todas las disoluciones que se usen estén a temperatura ambiente para todas las operaciones descritas en el presente documento. La formación de complejo de ADN/DMRIE-DOPE tendrá lugar a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de la inmunización de los animales.

15

Ejemplo 13: Vacunación de ovejas con virus de la viruela del canario recombinante

[0216] Se adquirieron 11 corderos Dorset sin cuernos (9 machos, 2 hembras) de un proveedor en el noroeste de CA, una región sin infección por BTV. Los animales se albergaron en instalaciones de aislamiento de seguridad frente a insectos a lo largo de los estudios descritos, y antes de la vacunación se confirmó que estaban todos exentos de anticuerpos contra el BTV por ELISA competitivo. Aproximadamente a los 13 meses de edad (11/22/05), se inoculó a cada uno de 6 corderos SQ/IM con aproximadamente 1 ml de BTV-CP diluido en PBS (0,2 ml no diluidos de [10^{9,5}DICT₅₀/ml] vCP2289/oveja = ~ 6,3 X 10⁸ partículas víricas) y 5 se vacunaron con virus de la viruela del canario recombinante que expresaba las proteínas preM y E del virus del Nilo occidental vCP/WNV; Recombitek) que se reconstituyó y se administró de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se volvió a vacunar a todas las ovejas 22 días más tarde (12/14/05) con la respectiva construcción de vacuna con la misma dosis que la inmunización primaria. Los animales se alojaron juntos independientemente del tipo de vacuna.

20

25

Ejemplo 14: Valoración de anticuerpos neutralizantes contra BTV

[0217] Se produjeron diluciones seriadas para cada suero con una proporción de 3 en medio DMEM al que se había añadido suero de ternero fetal al 10 % en placas de 96 pocillos del tipo de cultivo celular. A 0,05 ml del suero diluido se añadieron 0,05 ml de medio de cultivo que contenía aproximadamente 100 CCIP₅₀/ml de BTV. Esta mezcla se incubó durante 2 horas a 37 °C en un horno en una atmósfera que contenía 5 % de CO₂.

30

[0218] Después se añadieron 0,15 ml de una suspensión de células BHK-21 que contenían aproximadamente 100000 células/ml a cada mezcla. Se observó el efecto citopático (CPE) por microscopía de contraste de fase después de 4 a 5 días de cultivo a 37 °C en una atmósfera que contenía 5 % de CO₂. Se calcularon los valores neutralizantes de cada suero usando el procedimiento Kärber. Los valores se dieron en forma de la dilución mayor que inhibía el efecto citopático para 50 % de los pocillos. Los valores se expresaron en log₁₀ VN₅₀. Cada suero se valoró al menos dos veces y preferiblemente cuatro veces.

40

Ejemplo 15: Infección por BTV de ovejas y recogida de muestra

45

[0219] Se expusieron los 11 corderos por inoculación subcutánea de 10^{5,5} DICT₅₀ de BTV-17 34 días después de la segunda vacunación. Se evaluó diariamente en los animales durante 3 semanas después de inoculación las manifestaciones de la lengua azul. Se recogió sangre para el análisis hematológico (recogida en EDTA) antes de inoculación y a los 3, 6, 9, 13 y 16 días post-inoculación (DPI) para los recuentos de sangre completos (CBC). Se recogieron muestras de sangre (ácido-citrato-dextrosa) a los 0,1, 3, 5, 7, 9, 11, 14 y 21 DPI para aislar los virus. Se recogió el suero ("Tiger Top" separador de suero) de todas las ovejas y a intervalos semanales inmediatamente antes de la vacunación. Se sacrificaron compasivamente todas las ovejas a los 25 días después de la exposición al BTV.

50

Ejemplo 16. Aislamiento del virus BTV

55

[0220] El aislamiento del virus se hizo de la sangre entera de las ovejas como se ha descrito previamente (Bonneau, Mullens *et al.* 2001; Bonneau, DeMaula *et al.* 2002; DeMaula, Leutenegger *et al.* 2002). Brevemente, se centrifugaron tubos Vacutainer a 2500 G durante 10 minutos a 4 °C. El suero se decantó y se descartó. Los glóbulos

rojos/blancos se lavaron con 1x con 5 ml de PBS estéril (1x), se volvieron a centrifugar y el sedimento celular se volvió a suspender en un volumen igual de agua bidestilada (ddH₂O). Las células sanguíneas lavadas/lisadas se trataron con ultrasonidos durante 1-2 min antes de la dilución (de 10⁻¹ a 10⁻⁴) en EMEM e inoculación (0,25 ml/pocillo) en monocapas de BHK-21 confluentes en placas de 24 pocillos. Los cultivos se inocularon durante 1 h a 37 °C, cuando se añadió el medio de mantenimiento. Los cultivos se examinaron diariamente durante 10 días y se determinaron las valoraciones de virus por el procedimiento de Reed y Munch.

Ejemplo 17. Inmunogenicidad del ALVAC recombinante BTV-vCP2289 en ovejas

- 10 [0221] Todas las ovejas eran seronegativas para el BTV tanto por ensayos de ELISA competitivos como de microneutralización de BTV-17 antes de la vacunación (no se muestran los datos). Las ovejas vacunadas con el vector de expresión vCP/BTV desarrollaron anticuerpos neutralizantes contra BTV-17, mientras que las inmunizadas con el vCP/WNV no lo hicieron (véase la tabla 3, a continuación). Todas las ovejas permanecieron sanas y no mostraron efectos adversos después de vacunación.

15

Tabla 3. Valores de anticuerpos neutralizantes de BTV-17

	Semanas después de vacunación			
	-1	2	4	6
Vacunados:				
353	≤10	≤10	80	40
355	≤10	≤10	80	40
359	≤10	10	160	80
361	≤10	≤10	160	80
363	≤10	10	80	160
364	≤10	10	80	160
Controles:				
354	≤10	≤10	≤10	≤10
356	≤10	≤10	≤10	≤10
357	≤10	≤10	≤10	≤10
358	≤10	≤10	≤10	≤10
362	≤10	≤10	≤10	≤10

Ejemplo 18. Protección de ovejas inmunizadas con BTV-CP después de exposición

- 20 [0222] Se evaluó la capacidad de vCP/BTV para inmunizar de forma protectora a las ovejas, comparando los valores de BTV-17 en la sangre de ovejas inmunizadas con vCP/BTV vCP2289 y vCP/WNV después de exposición a BTV-17.

- 25 [0223] Tabla 4. Valores del virus de la lengua azul en la sangre de ovejas expuestas al virus después de inmunización con virus de la viruela del canario recombinante que expresa proteínas de la cubierta bien del virus de la lengua azul (vCP/BTV) o del virus del Nilo occidental (vCP/WNV).

- 30 Tabla 4: Valores del virus de la lengua azul en la sangre de ovejas expuestas al BTV-17 después de inmunización con virus de la viruela del canario recombinante que expresa proteínas de la cubierta bien del virus de la lengua azul (vCP/BTV) o del virus del Nilo occidental (vCP/WNV)

Tratamiento/ID oveja	Valor de virus log ¹⁰ DICT ₅₀ por ml de sangre (días post-inoculación)							
	1	3	5	7	9	11	14	21
Vacunados:								
353	-*	-	-	-	-	-	-	-
355	-	-	-	-	-	-	-	-
359	-	-	-	-	-	-	-	-
361	-	-	-	-	-	-	-	-
363	-	-	-	-	-	-	-	-
364	-	-	-	-	-	-	-	-

Controles:	-							
354		10 ^{4,1}	10 ^{4,1}	10 ^{3,6}	10 ^{3,1}	10 ^{3,1}	10 ^{2,1}	10 ^{1,6}
356	-	10 ^{2,1}	10 ^{3,1}	10 ^{3,1}	10 ^{3,1}	10 ^{1,6}	-	-
357	-	-	10 ^{3,6}	10 ^{3,1}	10 ^{2,1}	10 ^{2,1}	-	-
358	-	10 ^{2,1}	10 ^{2,6}	10 ^{3,6}	10 ^{3,1}	10 ^{1,6}	-	10 ^{2,1}
362	-	10 ^{3,6}	10 ^{4,1}	10 ^{3,1}	-	-	-	-

* indica que el virus no se aisló de 50 µl de células sanguíneas lavadas y lisadas

[0224] Los resultados (tabla 4 anterior) muestran que las ovejas de control (WNV-CP) son infectadas activamente por la exposición al virus BTV a los 3 días después de exposición. Los controles continúan presentando viremia hasta tanto como 21 días después de la exposición, punto en el que terminó el experimento.

[0225] Las ovejas que se inmunizaron con la vacuna de BTV-CP presentaron una protección exquisita frente a la viremia después de infección por exposición experimental, ya que el BTV no era detectable en la sangre en las ovejas vacunadas durante los 21 días de duración del estudio. Las seis ovejas inmunizadas con BTV-CP eran completamente resistentes a la exposición virulenta indicando la eficacia de la vacuna.

Ejemplo 19. Respuestas clínicas de las ovejas infectadas por el BTV

[0226] A continuación se proporciona la comparación de la respuesta clínica de ovejas vacunadas con BTV-CP (vacunados) y WNV-CP (controles) después de exposición a BTV-17.

1. Temperatura corporal (TC). Se controló la temperatura corporal durante 14 días después de la exposición, diariamente, en las seis ovejas vacunadas con BTV-CP y en las 5 de control (inmunizadas con WNV-CP). Los datos de la temperatura de las ovejas expuestas se muestran a continuación en la tabla 3 y el dibujo 17. Los datos muestran un aumento de ~1 °C en la TC media el día 3 después de exposición en los controles, sin cambios en la TC media en las vacunadas con BTV-CP. El día 6, se observó un aumento de temperatura de 4 °C (105 °C) en los animales de control. Esto es una respuesta típica para un animal infectado con BTV virémico. Los animales inmunizados con BTV-CP presentaron temperaturas normales que no se desviaban significativamente de los animales antes de exposición. Estos resultados confirman la eficacia de la vacuna (BTV-CP).

Tabla 5: Datos de temperatura después de exposición a BTv

Vacunados con BTv														
Oveja n.º	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	
353	102,6	102,2	102,6	101,8	102,6	102,6	100,8	101,1	102	102	102,2	101,6	101,6	
355	102,2	102	102,1	101,6	102,4	102,2	101,4	102,2	102,4	102,2	102,8	102,8	102,2	
359	102,4	102,7	101,8	101,8	102	101,8	101,2	103	101,6	102,4	102,4	102	101,8	
361	101,2	102,8	101,8	101,2	102,6	100,6	102	102	102,4	102,4	102,4	102	101,8	
363	102,6	102,9	102	101,2	102,2	102	102	102,8	102,6	102,4	102,6	101,8	101,8	
364	102	102,6	102,4	101,8	102,8	101,6	102	102	102,6	102,4	102,6	104	101,9	
Media:														
	102,1667	102,5333	102,1167	101,5667	102,4333	101,8	101,5667	102,1833	102,2667	102,3	102,5	102,3667	101,85	
Controles WNV														
Oveja n.º	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	
354	101,4	103,6	103,2	103,6	104,6	104,6	104	100,8	101	101,2	101,6	102	101,8	
356	102,2	103,5	103,2	101,6	106,6	102,4	103	103,8	102	101,8	102	102,4	101,6	
357	102,2	103	102,5	101,6	106,6	104,4	104,4	105,8	103	102	102,2	101,9	101,6	
358	103,9	103,3	103,4	105,1	106,2	104,2	102,2	103,4	103,2	103	102,6	102,4	102,6	
362	102,8	103	103,4	104	106,2	105	103,6	101,8	102,4	102,8	102,4	103	102,2	
Media:														
	102,5	103,28	103,14	103,18	106,04	104,12	103,44	103,12	102,32	102,16	102,16	102,34	101,96	

2. Recuento de glóbulos blancos. Se controlaron los recuentos de glóbulos blancos (WBC) durante 16 días después de exposición, el día 0 y a intervalos de aproximadamente 3 días hasta el día 16, en las 6 ovejas vacunadas con BTV-CP y las 5 de control (inmunizadas con WNV-CP). Los datos de WBC de las ovejas expuestas se muestran a continuación en la tabla 6 y en el dibujo 18. Los datos muestran una ligera disminución inicial en los WBC medios hasta el día 8 después de exposición con un aumento continuo de los WBC medios los días 9-16 después de exposición en los controles, sin cambio en los WBC medios en los vacunados con BTV-CP. El aumento retrasado de los WBC después de exposición es una respuesta típica de un animal infectado con BTV virémico. Los animales inmunizados con BTV-CP presentaron WBC normales que no se desviaban significativamente de los animales antes de la exposición. Estos resultados confirman la eficacia de la vacuna (BTV-CP).

Tabla 6. Datos de WBC del estudio de exposición a BTV

Vacunados con BTV									
Oveja n.º	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 13	Día 16		Día	Media
353	3,73	4,16	4,68	3,91	3,84	4,79		0	4,9
355	5,13	4,77	5,51	4,36	4,51	3,6		3	4,94
359	6,11	6,46	7,47	6	6,07	6,86		6	5,59
361	3,69	4,25	4,62	4,44	4,32	4,46		9	5,01
363	5,86	4,61	5,69	5,66	5,68	6,7		13	4,96
364	4,9	5,36	5,59	5,7	5,32	5,91		16	5,39
Media:	4,903333	4,935	5,593333	5,011667	4,956667	5,386667			
Controles WNV									
Oveja n.º	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 13	Día 16		Día	Media
354	3,46	2,43	3,46	3,82	4,71	5,1		0	4,36
356	3,39	3,61	3,12	3,16	4,63	5,4		3	4,04
357	4,94	6,73	2,97	5,28	7,74	7,73		6	3,5
358	4,15	4,01	3,85	4,31	6,36	8,24		9	4,39
362	5,86	3,41	4,08	5,38	7,37	7,4		13	6,16
								16	6,77

3. Recuento de linfocitos. Se controlaron los recuentos de linfocitos durante 16 días después de exposición, el día 0 y a intervalos de aproximadamente 3 días hasta el día 16 en las 6 ovejas vacunadas con BTV-CP y las 5 de control (inmunizadas con WNV-CP). Los datos de linfocitos de las ovejas expuestas se muestran a continuación en la tabla 7 y en el dibujo 19. Los datos muestran una ligera disminución inicial en el WBC medio hasta el día 8 después de exposición con una subida continua en el recuento medio de linfocitos el día 9-16 después de exposición en los controles, sin cambio en el número medio de linfocitos en los vacunados con BTV-CP. El aumento retardado en los recuentos de linfocitos después de exposición, es una respuesta típica para un animal infectado por BTV virémico. Los animales inmunizados con BTV-CP presentaron recuentos de linfocitos normales que no se desviaban significativamente de los animales antes de exposición. Estos resultados confirman la eficacia de la vacuna (BTV-CP).

Tabla 7. Datos de linfocitos del estudio de exposición a BTV 17

Vacunados con BTV									
Oveja n.º	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 13	Día 16		Día	Media
353	2,5	2,09	2,65	1,92	1,84	2,48		0	3,17
355	3,3	3,04	3,79	3,11	3	2,43		3	3,09
359	4,33	3,88	4,73	4,03	3,62	4,33		6	3,57
361	1,84	2,9	3,2	2,85	2,64	2,67		- 9	3,14
363	3,51	2,9	3,6	3,25	3,42	3,93		13	2,86
364	3,56	3,74	3,44	3,69	2,66	3,34		16	3,2
Media:	3,173333	3,091667	3,568333	3,141667	2,863333	3,196667			
Controles WNV									
Oveja n.º	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 13	Día 16		Día	Media
354	2,19	1,05	2,16	2,6	2,87	3,73		0	2,92

356	1,85	1,58	1,98	2,11	2,7	2,72	3	2,18
357	3,14	3,93	1,82	3,8	5,4	6,16	6	2,37
358	2,74	2,49	3,06	3,37	5,71	6,47	9	3,35
362	4,69	1,84	2,82	4,85	5,89	6,3	13	4,51
							16	5,08
Media:	2,922	2,178	2,368	3,346	4,514	5,076		

4. Recuento de plaquetas. Se controlaron los recuentos de plaquetas durante 16 días después de exposición, el día 0 y a intervalos de aproximadamente 3 días hasta el día 16 en las 6 ovejas vacunadas con BTV-CP y las 5 de control (inmunizadas con WNV-CP). Los datos de plaquetas de las ovejas expuestas se muestran a continuación en la tabla 8 y en el dibujo 20. Los datos muestran una ligera disminución inicial en el recuento de plaquetas hasta el día 8 después de exposición con una subida continua en el recuento medio de plaquetas el día 9-16 después de exposición en los controles. En los vacunados con BTV-CP hay un aumento gradual de plaquetas a lo largo del estudio. En los vacunados con BTV-CP, los recuentos de plaquetas son elevados por encima de los controles a lo largo del curso del estudio. La disminución del recuento de plaquetas después de exposición, es una respuesta típica para un animal infectado por BTV virémico. Los animales inmunizados con BTV-CP presentaron recuentos de linfocitos normales que no se desviaban significativamente de los animales antes de exposición. Estos resultados confirman la eficacia de la vacuna (BTV-CP).

Tabla 8. Recuentos de plaquetas - BTV

Vacunadas con BTV								Día	Media
Oveja n.º	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 13	Día 16			
353	822	566	863	945	909	936		0	686,3
355	1076	935	941	905	956	1056		3	546,3
359	602	528	692	607	739	854		6	763,3
361	510	405	580	553	442	680		9	708,5
363	565	327	828	865	705	775		13	734,8
364	543	517	676	376	658	799		16	850
Media:	686,3333	546,3333	763,3333	708,5	734,8333	850			
Controles con WNV								Día	Media
Oveja n.º	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 13	Día 16			
354	792	7,2	479	439	550	800		0	544
356	495	423	373	308	594	621		3	301,6
357	625	548	435	418	760	873		6	374,6
358	627	144	371	366	489	579		9	357
362	181	386	215	254	665	605		13	611,6
								16	695,6
Media:	544	301,64	374,6	357	611,6	695,6			

REFERENCIAS

[0227]

- 20 Anderson, G. A., J. L. Stott, *et al.* (1985). "Subclinical and clinical bluetongue disease in cattle: clinical, pathological and pathogenic considerations." *Prog Clin Biol Res* 178: 103-7.
- Andreansky, S. S., B. He, *et al.* (1996). "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11313-8.
- Andrew, M., P. Whiteley, *et al.* (1995). "Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus." *Vet Immunol Immunopathol* 47(3-4): 311-22.
- 25 Antoine, G., F. Scheiflinger, *et al.* (1998). "The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses." *Virology* 244(2): 365-96.
- Ballay, A., M. Levrero, *et al.* (1985). "In vitro and in vivo synthesis of the hepatitis B virus surface antigen and of the receptor for polymerized human serum albumin from recombinant human adenoviruses." *Embo J* 4(13B): 3861-5.
- 30 Barcena, J., M. M. Lorenzo, *et al.* (2000). "Sequence and analysis of a swinepox virus homologue of the vaccinia virus major envelope protein P37 (F13L)." *J Gen Virol* 81(Pt 4): 1073-85.
- Bernard, K. A., B. A. Israel, *et al.* (1997). "Sequence and cognitive analyses of two virulence-associated markers of

- bluetongue virus serotype 17." *Intervirology* 40(4): 226-31.
- Bonneau, K. R., C. D. DeMaula, *et al.* (2002). "Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep." *Vet Microbiol* 88(2): 115-25.
- Bonneau, K. R., B. A. Mullens, *et al.* (2001). "Occurrence of genetic drift and founder effect during quasispecies evolution of the VP2 and NS3/NS3A genes of bluetongue virus upon passage between sheep, cattle, and *Culicoides sonorensis*." *J Virol* 75(17): 8298-305.
- Bonneau, K. R., N. Zhang, *et al.* (1999). "Sequence comparison of the L2 and S10 genes of bluetongue viruses from the United States and the People's Republic of China." *Virus Res* 61(2): 153-60.
- Boshart, M., F. Weber, *et al.* (1985). "A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus." *Cell* 41(2): 521-30.
- Bradel-Tretheway, B. G., Z. Zhen, *et al.* (2003). "Effects of codon-optimization on protein expression by the human herpesvirus 6 and 7 U51 open reading frame." *J Virol Methods* 111(2): 145-56.
- Carroll, M. W., W. W. Overwijk, *et al.* (1997). "Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MVA) as an effective recombinant vector: a murine tumor model." *Vaccine* 15(4): 387-94.
- Cochran, M. A., C. Puckett, *et al.* (1985). "In vitro mutagenesis of the promoter region for a vaccinia virus gene: evidence for tandem early and late regulatory signals." *J Virol* 54(1): 30-7.
- Cowley, J. A. and B. M. Gorman (1989). "Cross-neutralization of genetic reassortants of bluetongue virus serotypes 20 and 21." *Vet Microbiol* 19(1): 37-51.
- De Groot, A. S. and F. G. Rothman (1999). "In silico predictions; in vivo veritas." *Nat Biotechnol* 17(6): 533-4.
- de Mattos, C. A., C. C. de Mattos, *et al.* (1994). "Heterogeneity of the L2 gene of field isolates of bluetongue virus serotype 17 from the San Joaquin Valley of California." *Virus Res* 31(1): 67-87.
- DeMaula, C. D., K. R. Bonneau, *et al.* (2000). "Changes in the outer capsid proteins of bluetongue virus serotype ten that abrogate neutralization by monoclonal antibodies." *Virus Res* 67(1): 59-66.
- DeMaula, C. D., H. W. Heidner, *et al.* (1993). "Neutralization determinants of United States bluetongue virus serotype ten." *Virology* 195(1): 292-6.
- DeMaula, C. D., C. M. Leutenegger, *et al.* (2002). "The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue." *Virology* 296(2): 330-7.
- Disbrow, G. L., I. Sunitha, *et al.* (2003). "Codon optimization of the HPV-16 E5 gene enhances protein expression." *Virology* 311(1): 105-14.
- Felgner, J. H., R. Kumar, *et al.* (1994). "Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations." *J Biol Chem* 269(4): 2550-61.
- Frolov, I., T. A. Hoffman, *et al.* (1996). "Alphavirus-based expression vectors: strategies and applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11371-7.
- Funahashi, S., T. Sato, *et al.* (1988). "Cloning and characterization of the gene encoding the major protein of the A-type inclusion body of cowpox virus." *J Gen Virol* 69 (Pt 1): 35-47.
- Geysen, H. M. (1990). "Molecular technology: peptide epitope mapping and the pin technology." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 21(4): 523-33.
- Geysen, H. M., S. J. Barteling, *et al.* (1985). "Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(1): 178-82.
- Geysen, H. M., R. H. Meloen, *et al.* (1984). "Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(13): 3998-4002.
- Ghiasi, H., A. Fukusho, *et al.* (1987). "Identification and characterization of conserved and variable regions in the neutralization VP2 gene of bluetongue virus." *Virology* 160(1): 100-9.
- Graham, F. L. (1990). "Adenoviruses as expression vectors and recombinant vaccines." *Trends Biotechnol* 8(4): 85-7.
- Guo, P. X., S. Goebel, *et al.* (1989). "Expression in recombinant vaccinia virus of the equine herpesvirus 1 gene encoding glycoprotein gp13 and protection of immunized animals." *J Virol* 63(10): 4189-98.
- Hartikka, J., M. Sawdey, *et al.* (1996). "An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle." *Hum Gene Ther* 7(10): 1205-17.
- Hassan, S. S. y P. Roy (1999). "Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry." *J Virol* 73(12): 9832-42.
- Heidner, H. W., P. V. Rossitto, *et al.* (1990). "Identification of four distinct neutralizing epitopes on bluetongue virus serotype 10 using neutralizing monoclonal antibodies and neutralization-escape variants." *Virology* 176(2): 658-61.
- Hemmer, B., C. Pinilla, *et al.* (1998). "The use of soluble synthetic peptide combinatorial libraries to determine antigen recognition of T cells." *J Pept Res* 52(5): 338-45.
- Huang, I. J., G. Y. Hwang, *et al.* (1995). "Sequence analyses and antigenic epitope mapping of the putative RNAdirected RNA polymerase of five U.S. bluetongue viruses." *Virology* 214(1): 280-8.
- Huisman, H. and B. J. Erasmus (1981). "Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of

- bluetongue virus." *Onderstepoort J Vet Res* 48(2): 51-8.
- Huismans, H., N. T. van der Walt, *et al.* (1987). "Isolation of a capsid protein of bluetongue virus that induces a protective immune response in sheep." *Virology* 157(1): 172-9.
- Jewell, J. E. and J. O. Mecham (1994). "Identification of an amino acid on VP2 that affects neutralization of bluetongue virus serotype 10." *Virus Res* 33(2): 139-44.
- 5 Ju, Q., D. Edelstein, *et al.* (1998). "Transduction of non-dividing adult human pancreatic beta cells by an integrating lentiviral vector." *Diabetologia* 41(6): 736-9.
- Kim, C. H., Y. Oh, *et al.* (1997). "Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells." *Gene* 199(1-2): 293-301.
- 10 Kitson, J. D., K. L. Burke, *et al.* (1991). "Chimeric polioviruses that include sequences derived from two independent antigenic sites of foot-and-mouth disease virus (FMDV) induce neutralizing antibodies against FMDV in guinea pigs." *J Virol* 65(6): 3068-75.
- Klinman, D. M., A. K. Yi, *et al.* (1996). "CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(7): 2879-83.
- 15 Kwissa, M., K. van Kampen, *et al.* (2000). "Efficient vaccination by intradermal or intramuscular inoculation of plasmid DNA expressing hepatitis B surface antigen under desmin promoter/enhancer control." *Vaccine* 18(22): 2337-44.
- Laval, F., R. Paillot, *et al.* (2002). "Quantitative analysis of the antigen-specific IFNgamma+ T cell-mediated immune response in conventional outbred pigs: kinetics and duration of the DNA-induced IFNgamma+ CD8+ T cell response." *Vet Immunol Immunopathol* 90(3-4): 191-201.
- 20 Lobato, Z. I., B. E. Coupar, *et al.* (1997). "Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens." *Vet Immunol Immunopathol* 59(3-4): 293-309.
- Luckow, V. A. and M. D. Summers (1988). "Signals important for high-level expression of foreign genes in Autographa californica nuclear polyhedrosis virus expression vectors." *Virology* 167(1): 56-71.
- MacLachlan, N. J. (1994). "The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants." *Coup Immunol Microbiol Infect Dis* 17(3-4): 197-206.
- MacLachlan, N. J. and J. E. Pearson (2004). Bluetongue: Proceedings of the Third International Symposium. Bluetongue: Proceedings of the Third International Symposium. N. J. MacLachlan and J. E. Pearson, *Vet Italiana*. 40: 1-730.
- Marshall, E., L. B. Woolford, *et al.* (1997). "Continuous infusion of macrophage inflammatory protein MIP-1 alpha enhances leucocyte recovery and haemopoietic progenitor cell mobilization after cyclophosphamide." *Br J Cancer* 75(12): 1715-20.
- 30 Martinez-Torrecuadrada, J. L., J. P. Langeveld, *et al.* (1999). "Antigenic profile of African horse sickness virus serotype 4 VP5 and identification of a neutralizing epitope shared with bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus." *Virology* 257(2): 449-59.
- 35 McClements, W. L., M. E. Armstrong, *et al.* (1996). "Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11414-20.
- Mecham, J. O., V. C. Dean, *et al.* (1986). "Correlation of serotype specificity and protein structure of the five U.S. serotypes of bluetongue virus." *J Gen Virol* 67 (Pt 12): 2617-24.
- 40 Mecham, J. O. and D. J. Johnson (2005). "Persistence of bluetongue virus serotype 2 (BTV-2) in the southeast United States." *Virus Res* 113(2): 116-22.
- Miyazaki, J., S. Takaki, *et al.* (1989). "Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5." *Gene* 79(2): 269-77.
- Moss, B. (1996). "Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11341-8.
- 45 Mullens, B. A., W. J. Tabachnick, *et al.* (1995). "Effects of temperature on virogenesis of bluetongue virus serotype 11 in *Culicoides variipennis sonorensis*." *Med Vet Entomol* 9(1): 71-6.
- Paoletti, E. (1996). "Applications of pox virus vectors to vaccination: an update." *Proc Natl Acad Sci USA* 93(21): 11349-53.
- 50 Pearson, W. R. and D. J. Lipman (1988). "Improved tools for biological sequence comparison." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(8): 2444-8.
- Pennock, G. D., C. Shoemaker, *et al.* (1984). "Strong and regulated expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector." *Mol Cell Biol* 4(3): 399-406.
- Perkus, M. E., K. Limbach, *et al.* (1989). "Cloning and expression of foreign genes in vaccinia virus, using a host range selection system." *J Virol* 63(9): 3829-36.
- 55 Powell, M. F. and M. J. Newman (1995). Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach. A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients. F. Vogel y M. Powell. New York, Plenum Press. 6: 147, 183.
- Prevec, L., M. Schneider, *et al.* (1989). "Use of human adenovirus-based vectors for antigen expression in animals." *J Gen Virol* 70 (Pt 2): 429-34.

- Pritchard, L. I. and A. R. Gould (1995). "Phylogenetic comparison of the serotype-specific VP2 protein of bluetongue and related orbiviruses." *Virus Res* 39(2-3): 207-20.
- Regelson, W., S. Kuhar, *et al.* (1960). "Synthetic polyelectrolytes as tumour inhibitors." *Nature* 186: 778-80.
- Riviere, M., J. Tartaglia, *et al.* (1992). "Protection of mice and swine from pseudorabies virus conferred by vaccinia virus-based recombinants." *J Virol* 66(6): 3424-34.
- Robertson, E. S., T. Ooka, *et al.* (1996). "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11334-40.
- Robinson, H. L. y C. A. Torres (1997). "DNA vaccines." *Semin Immunol* 9(5): 271-83.
- Roizman, B. (1996). "The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11307-12.
- Rossitto, P. V. and N. J. MacLachlan (1992). "Neutralizing epitopes of the serotypes of bluetongue virus present in the United States." *J Gen Virol* 73 (Pt 8): 1947-52.
- Roy, P. (1992). "Bluetongue virus proteins." *J Gen Virol* 73 (Pt 12): 3051-64.
- Roy, P. (1996). "Orbivirus structure and assembly." *Virology* 216(1): 1-11.
- Roy, P. (1996). Orbiviruses and their replication. Fields Virology. B. N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley. Philadelphia, PA, *Lippincott-Raven*: 1709-1734.
- Roy, P., T. Urakawa, *et al.* (1990). "Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep." *J Virol* 64(5): 1998-2003.
- Sambrook, J. y D. W. Russell (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schneider, K., F. Puehler, *et al.* (2000). "cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18." *J Interferon Cytokine Res* 20(10): 879-83.
- Shida, H. (1986). "Nucleotide sequence of the vaccinia virus hemagglutinin gene." *Virology* 150(2): 451-62.
- Smith, G. E., M. D. Summers, *et al.* (1983). "Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector." *Mol Cell Biol* 3(12): 2156-65.
- Spreull, J. (1905). "Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa." *J. Comp. Path.. Ther.* 18: 321-337.
- Stickl, H. y V. Hochstein-Mintzel (1971). "[Intracutaneous smallpox vaccination with a weak pathogenic vaccinia virus ("MVA virus").]" *Munch Med Wochenschr* 113(35): 1149-53.
- Stittelaar, K. J., L. S. Wyatt, *et al.* (2000). "Protective immunity in macaques vaccinated with a modified vaccinia virus Ankara-based measles virus vaccine in the presence of passively acquired antibodies." *J Virol* 74(9): 4236-43.
- Sutter, G. y B. Moss (1992). "Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes." *Proc Natl Acad Sci USA* 89(22): 10847-51.
- Sutter, G., L. S. Wyatt, *et al.* (1994). "A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus." *Vaccine* 12(11): 1032-40.
- Tang, D. C., M. DeVit, *et al.* (1992). "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response." *Nature* 356(6365): 152-4.
- Taylor, J., R. Weinberg, *et al.* (1988). "Protective immunity against avian influenza induced by a fowlpox virus recombinant." *Vaccine* 6(6): 504-8.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, *et al.* (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Res* 22(22): 4673-80.
- Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, *et al.* (1993). "Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein." *Science* 259(5102): 1745-9.
- Van der Zee, R., W. Van Eden, *et al.* (1989). "Efficient mapping and characterization of a T cell epitope by the simultaneous synthesis of multiple peptides." *Eur J Immunol* 19(1): 43-7.
- Van Ooyen, A., J. van den Berg, *et al.* (1979). "Comparison of total sequence of a cloned rabbit beta-globin gene and its flanking regions with a homologous mouse sequence." *Science* 206(4416): 337-44.
- Verwoerd, D. W., H. J. Els, *et al.* (1972). "Structure of the bluetongue virus capsid." *J Virol* 10(4): 783-94.
- Vialard, J., M. Lalumiere, *et al.* (1990). "Synthesis of the membrane fusion and hemagglutinin proteins of measles virus, using a novel baculovirus vector containing the beta-galactosidase gene." *J Virol* 64(1): 37-50.
- Wang, L. F., D. H. Du Plessis, *et al.* (1995). "Use of a gene-targeted phage display random epitope library to map an antigenic determinant on the bluetongue virus outer capsid protein VP5." *J Immunol Methods* 178(1): 1-12.
- White, D. M., W. C. Wilson, *et al.* (2005). "Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects." *J Gen Virol* 86(Pt 2): 453-62.
- Wilson, W. C. y J. O. Mecham (2000). "Molecular Evolution of Orbiviruses." *Proc USAHA* 104: 169-180.
- Xin, K. Q., K. Hamajima, *et al.* (1999). "IL-15 expression plasmid enhances cell-mediated immunity induced by an HIV-1 DNA vaccine." *Vaccine* 17(7-8): 858-66.

LISTA DE SECUENCIAS

[0228]

- 5 <110> Merial Ltd.
The Regents of the University of California
- <120> VACUNA RECOMBINANTE CONTRA EL VIRUS DE LA LENGUA AZUL
- 10 <130> P035792EPA
- <150> US 11/444698
<151> 2006-06-01
- 15 <160> 30
- <170> PatentIn Versión 3.5
- <210> 1
- 20 <211> 2868
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> VP2 sintético de codones optimizados de BTV17
- <400> 1

atggaggagt tcgtgatccc cgtgtacagc gaggacgaga tcccctacgc cctgctgagc 60
 agataccctc tggccatcca gaccaacgtg aagatcgagg acgtggaggg caagcacaac 120
 gtggtgaaga tccccgagag cgacatgatc gacatcccc ggctgaccat cgtggaggcc 180
 atgaactaca agcccgccag gaacgacggc atcgtggtgc ctagactgct ggacatcacc 240
 ctgagagcct acgacgaccg gaagagcacc aagagcgcca gaggcacga gttcatgacc 300
 aacgcccggc ggatgaagtg ggccatcgac gacaggatgg acatccagcc cctgaagggtg 360
 accctggacc actactgcag cgtgaatcac cagctgttca actgcgtggt gaaggccaac 420
 gccgccaatg ccgacaccat ctactacgac tacttcccc tggaggacca caagaagcgg 480
 tgcaaccaca ccaacctgga cctgctgagg agcctgacca acatggagct gttccacgcc 540
 ctgcagggag ccgcctacag catcaagagc agctacgaac tggcggccaa cagcgagaga 600
 gagagcctgg aggagaccta cgccatcggc cagcctaagt ggatccacct gaccaggggc 660
 accagaatcg gcaacagcgg cctgccttac gagagattca tcagcagcat ggtgcagggtg 720
 atcgtgaacg gcaagatccc tagcgagatc gccaacgagg tggcccagct gaacagaatc 780
 cgggccgagt ggatcgccgc cacctacgac agaggcagga tcagagccct ggagctgtgc 840
 aagatcctga gcaccatcgg ccggaagatc ctgaataccc acgaggagcc caaggacgag 900
 atggacctgt ccacccggtt ccagttcaag ctggacgaga agttcaacag gaccgacccc 960
 gagcacgtga atatcttcgg agtgagggcc cctgccaccg acgagggcag attctacgcc 1020
 ctgatcgcca ttgccgccac cgacaccagc aagggcagag tgtggaggac caaccctac 1080
 ccttgccctga gaggcgccct ggtggccgcc gagtgcgagc tgggcgacgt gtacagcacc 1140

ctgCGGaggg tGTacagatg gagcctgaga cctgagtacg gccagcacga gagacagctg 1200
gagaacaaca agtacgtgtt caaccggatc aacctgttcg acagcaatct ggccgtgggc 1260
gaccagatca tccactggcg ctacgaggtg aaggcctccg ccgagaccac ctacgatagc 1320
ggctacatgt gcaggcacga ggtggaggag gacgagctgc tGTgtaagat caacgaggac 1380
aagtacaagg acatgctgga ccggatgatc cagggcggtt gggatcagga gaggttcaag 1440
ctgcacaaca tcctgaccga cccaacctg ctgacaatcg acttcgagaa ggacgcctac 1500
ctgaacagca gaagcgagct ggtgttcccc gactacttcg acaagtggat cagcagcccc 1560
atgttcaacg cccggctgag aatcaccaag ggcgagatcg gcaccagcaa gaaggacgac 1620
ccctggaaca acagagccgt gcggggctac atcaagagcc ctgccgagtc cctggacttc 1680
gtgctggggc cctactacga tctgCGgctg ctgttcttcg gcgaggccct gagcctgaag 1740
caggagcaga gcgccgtgtt ccagtacctg agccagctgg acgacttccc cgccctgacc 1800
cagctgaccg gcgacgccgt gtgtcctcac agcgcgag cctgtacac cttcaggaag 1860
gtggccctgt tcctgatcgg caactacgag aagctgagcc ccgacctgca cgagggcatg 1920
gagcaccaga cctacgtgca cccagcacc ggCGgcacct accagaaatg cgtgctggag 1980
atgaaggacc cctgccagct gatgtgcttc gtgatcgact acatcttcga gaagcgggag 2040
cagctgagag acaccaagga ggcccgtac atcgtgtacc tgatccagag cctgaccggc 2100
atccagagac tggacgtgct gaagagcacc tccccaaact tcttcagcg gctgctgatg 2160
ctgaaggaga tcaagtttgt gcgggacctg aacgtgatca acttcctgcc cctgatgttc 2220
ctggtgcacg acaacatcag ctacagccac cggcagtgga gcacccctat ggtgctgttc 2280
gacgacacca tcaagctgat cctgttgaa gtggcgccct acgccaacag attcggttc 2340
aagagcttca tgaacttcac caggttcac cctggcgaga gcaagaaga gcagatcgcc 2400
gaggacgtgc acaaggagtt cggcgtggtg gccttcgagt actacaccaa caccaagatc 2460
agccagggca gcgtgcacac ccccgatg accaccaaga tggatgtgct gaaaatccac 2520
ctgagcagcc tGTgtgccg cctggccgac agcatcgtgt acaccctgcc cgtggcccac 2580
cccaagaagt gcacgtgct gatcattgtg ggcgacgaca agctggagcc tcacaccaga 2640
tccgagcaga tcgtgtccc gtacaactac agccggaagc acatctgcg cgtggtgtcc 2700
gtgacagtgg gccagaacag ccagctgaga gtgtacacca gcggcatcgt gaagcacaga 2760
gtgtgcgaca agttcatcct gaagcacaaa tgcaaggatg tcctggtgag gatgcccggc 2820
tacgtgttcg gcaacgacga gctgatgacc aagctgctga atgtgtga 2868

<210> 2

<211> 1581

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VP5 sintético de codones optimizados de BTv17

<400> 2

```

atgggcaaga tcatcaagag cctgagccgc ttccggcaaga aagtgggcaa tgccctgacc 60
agcaacaccg ccaagaagat ctacagcacc atcgggcaagg ccgccgagag attcgccgag 120
agcgagatcg gagccgccac catcgacggc ctggtgcagg gcagcgtgca cagcatcatc 180
accggcgaga gctacggcga gagcgtgaag caggccgtgc tgctgaacgt gctgggcaca 240
ggcgaggagc tgcccgaccc cctgagccct ggcgagagag gcatccagac caagatcaag 300
gagctggagg acgagcagag aaacgagctg gtgcggctga agtacaacaa ggagatcacc 360
aaggagttcg gcaaggaact ggaagaggtg tacgacttca tgaacggcga ggccaaggag 420
gaggaggtgg tgcaagaaca gtacagcatg ctgtgcaagg ccgtggacag ctacgagaag 480
atcctgaagg ccgaggactc caagatggcc atgctggcca gagccctgca gagggaggcc 540
agcgagagaa gccaggacga gatcaagatg gtgaaggagt accggcagaa gatcgacgcc 600
ctgaagaacg ccatcgagat cgagagggac ggcattgcagg aggaggccat ccaagaaatc 660
gccggcatga ccgccgacgt gctggaggcc gccagcgagg aggtgcccct gattggcgcc 720
ggaatggcca ccgccgtggc caccggcaga gccatcgagg gcgcctacaa gctgaagaag 780
gtgatcaacg ccctgagcgg catcgacctg agccacatga ggagcccaa gatcgagcct 840
accatcatcg ccaccacctt ggagcaccgg ttcaaggaga tccctgacga gcagctggcc 900
gtgtccgtgc tgaacaagaa aaccgccgtg accgacaact gcaacgagat cgcccacatc 960
aagcaggaga tcctgcccga gttcaagcag atcatggacg aggagaagga gatcgagggc 1020
atcgaggaca aggtgatcca cccccgggtg atgatgaggt tcaagatccc cagaaccag 1080
cagcctcaga tccacatcta tgccgcccct tgggacagcg acgacgtgtt cttcttccac 1140
tgctgtctcc accaccacag gaacgagagc ttcttctctg gcttcgacct gggcatcgac 1200
gtggtgcact tcgaggatct gaccagccac tggcacgccc tgggcctggc ccaggaggcc 1260
tccggcagaa ccctgaccga ggcctacagg gagttcctga acctgagcat cagcagcacc 1320
tacagcagcg ccatccacgc ccggagaatg atcagatcca gggccgtgca ccctatcttt 1380
ctgggcagca ccactacga catcacctac gaggcctga aaaacaacgc ccagcggatc 1440
gtgtacgatg aggagctgca gatgcacatc ctgagaggcc ctctgcactt ccagaggaga 1500
gccatcctgg gcgccctgaa gttcggcatc aagatcctgg gcgacaagat cgacgtgccc 1560
ctgttcctga ggaacgcctg a 1581

```

5 <210> 3

<211> 2868

<212> ADN

<213> Virus de la lengua azul 17

<400> 3

```

atggaggagt tcgtcattcc agtctattca gaagatgaaa ttccatacgc tttactgagc 60
agataccott tggcgataca gacaaatggt aaaatagagg atgttgaagg aaaacataat 120
gttgtaaaaa ttctgaatc cgatatgata gatataccaa gattaacaat tgtagaggcg 180
atgaattata aaccagcgag aaacgatgga atcgttgtac ctagattact tgatataaca 240
ttacgtgctt atgatgatag gaaatcgaca aaaagtgtc gagggataga gttcatgacg 300
aacgctagat ggatgaaatg ggccatagat gatagaatgg atatccaacc gcttaaagtc 360
actttggatc attactgttc cgtcaacat cagctcttta actgcgtcgt caaagcgaat 420
gctgccaacg ctgatacgat ctattatgat tatttccac ttgaagacca taaaaaaga 480
tgtaaccaca caaatcttga tttattgaga agtttgacca atatggagtt gttccacgcg 540
ttgcaagggtg ctgcatacag tatcaaactg agctacgaat tagtggcaaa ctccgaaaga 600
gaaagcttgg aggagactta tgcgatagga cagccaaagt ggatacattt gactagagga 660
acgcgaatag gcaatagtgg attaccttat gaacggttta tctcaagcat ggtccagggtg 720
atcgtaaatg gcaagattcc aagcgagata gcgaacgagg tcgcgcaact gaatagaata 780
agggcagagt ggatagcggc tacatacgat agaggcagga ttagagcgct agagctatgc 840
aagatccttt ccacgattgg gcgtaagata ctgaacacgc atgaagagcc gaaagatgaa 900
atggatctat caacaagatt tcagttcaaa cttgacgaaa aatttaacag aacagatcca 960
gaacatgtta atatttttgg tgtaagagcc ccagcgacag atgaaggaag attttacgct 1020
ctgattgcaa tcgcagcgac ggatacacia aagggtagag tgtggagaac aaatccgtat 1080
ccatgcttgc gaggtgcttt agttgcagct gagtgtgaat taggtgacgt ttacagtacg 1140
ctccgacgtg tgtatagatg gagtctaagg ccggagtatg gacagcacga gcgacaatta 1200
gagaacaata aatacgtctt taatcgtata aatttattcg attcaaactt agcggtcggc 1260
gatcagataa ttcattggcg ttatgaggtt aaagcatcgg cggagacgac ttatgacagt 1320
ggatacatgt gtcggcatga ggttgaggag gatgaactat tatgtaaaat caatgaggac 1380
aaatataaag acatgctgga cagaatgatt cagggtggtt gggatcagga aagatttaaa 1440
cttcataaca tactgacgga ccctaactta ttgacgattg actttgaaa agatgcgtat 1500
ctgaactcac ggtccgagtt agtttttccg gattatttcg acaaattgat cagttcacca 1560
atgtttaacg cgcgcttaag aattactaaa ggggagatcg gaacatcgaa aaaggatgat 1620
ccatggaaca accgcgcagt acgtggatac atcaagtccc ctgcggagtc gttggatttt 1680
gttctcgggc cttactacga tctcgggcta ctattttttg gcgaggcggt gagcttaaaa 1740
caggaacaat ccgcggtttt tcaatatttg agtcagctcg atgattttcc cgcgcttacg 1800

```

cagctaacag gagatgccgt atgccacat tcaggcggag cgctatatac gtttaggaaa 1860
gtcgcgctat ttttaatcgg gaattatgaa aagttaagtc cggatctaca tgaaggatatg 1920
gaacatcaaa catatgtgca tccgtcgact ggtgggacgt atcagaaatg cgtgctagag 1980
atgaaggacc cttgtcaact aatgtgcttt gtgattgatt acatctttga aaaacgtgag 2040
cagctacgtg ataccaaaga ggcgaggtac atcgtgtatc taattcaaag tctcactggg 2100
atacaacggc tggatgttct gaaatcgacg ttcccgaatt tttccaacg attattaatg 2160
ctgaaagaga tcaaatttgt gcgtgattta aatgtgatca acttcctccc tctgatgttc 2220
cttgttcatg ataacatctc gtattcgcat agacagtggg caattccaat ggtactgttt 2280
gacgatacga ttaagttaat acccgtagag gttggcgcgt atgcaaatag atttggtatc 2340
aaaagtttta tgaactttac acggtttcac cctggtgagt caaagaaaaa acagattgcc 2400
gaggatgtgc ataaggagtt tggagtggtc gctttcgaat attacaccaa tacaaaaatt 2460
tcccagggga gtgtccatac accagtaatg actacgaaaa tggatgtatt gaagatacat 2520
ttgtcttctt tatgtgcagg tctggcggat tctatcgtat atacattacc ggttgcgcac 2580
cctaagaaat gcacgttctt aataattgtg ggagatgaca aattggaacc gcatacgcgt 2640
tcagaacaaa tagttagtcg gtataattac tcacgtaagc acatttgtgg agttgtatcc 2700
gtcaccgtcg ggcagaatag tcagttgaga gtttatacct ctggaattgt taaacaccgt 2760
gtatgcgaca agttcattct aaaacacaag tgcaagggtga tattagttag gatgccgggg 2820
tacgttttcg gaaatgatga attaatgacg aaactattga atgtctag 2868

<210> 4

<211> 1581

<212> ADN

5 <213> Virus de la lengua azul 17

<400> 4

```

atggggaaga taattaaatc gctaagtaga tttggaaaga aggttgggaa tgcattgacg 60
tcgaacacag cgaagaagat ttattcaacc atcgggaaag cagcggagcg atttgctgaa 120
agtgaaatcg gtgcggcaac gatagacggt ttggtgcagg gcagtgttca ttccataatt 180
acaggtgaat cgtatggaga gtcagttaaa caagcgggtc ttctcaacgt gttaggtaca 240
ggtgaagaat taccagatcc tctgagcccc ggcgaacgtg gtatccaaac gaaaataaag 300
gaattagaag atgagcagcg aaatgaactt gttcgattga agtataacaa agagataaca 360
aaggagtttg ggaaggagtt agaggaagtc tacgacttca tgaatggcga ggcgaaggag 420
gaggaagtgg ttcaggaaca atactcaatg ttatgtaaag cagtggattc ttacgagaaa 480
atattaaagg cggaagactc gaaaatggca atgttggcgc gcgcactgca acgggagggt 540
tcagagagaa gtcaggacga gatcaaatg gtaaaggagt acagacagaa aattgatgcg 600

cttaagaatg cgatcgagat tgaacgagac ggaatgcagg aggaggcgat ccaggagatt 660
gctggaatga ccgctgacgt cttagaagcg gcttcagagg aagtgccctt aatcggtgca 720
ggtatggcca ctgctgtagc aaccggcaga gcaatagagg gcgcatataa attgaagaaa 780
gttataaatg cgttaagtgg aatcgatttg tcgcatatga ggagtccaaa gatcgaacca 840
actattatcg ctacaacact ggagcaccga tttaaagaga taccagatga gcagctagca 900
gtaagtgtgt tgaataagaa gacagccgta actgataact gcaatgaaat cgcgcatatt 960
aaacaagaaa tattaccaaa gtttaagcag attatggatg aggagaagga gattgaagga 1020
atagaggaca aagtgattca cccgcgggtg atgatgaggt tcaagattcc tagaacgcag 1080
caaccgcaaa tccacattta tgcggctccg tgggattctg atgacgtatt tttctttcat 1140
tgcgtttcac accatcatcg gaatgaatct ttcttttttg gatttgattt aggaatcgat 1200
gtcgttcaact tcgaagactt aaccagccat tggcacgcat tagggctagc gcaagaggcg 1260
agcgggcgta cgttaacgga ggcgtatcgt gaatttctca atctatcaat ttcaagcacg 1320
tatagtagcg cgatacatgc gagacgcatg atcaggtcac gagcagtaca tccgatcttt 1380
ttaggatcaa cgcactacga tattacatat gaggctttaa aaaataatgc gcagagaata 1440
gtctatgatg aggaactgca aatgcatatt ctaaggggac ctttgcatth tcaacgccga 1500
gccattcttg gagcgtgaa atttggaaac aaaatattag gcgataaaat tgatgttccc 1560
ctcttcttac gaaatgcatg a 1581

```

<210> 5

<211> 32

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético C5A

<400> 5
ggccgaattc tgaatgtaa atgtatact tt 32

5 <210> 6
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador sintético C5B1

<400> 6
cccgggatcg atggatcctt tttatagcta attagtcacg tacctttgag agtaccactt 60
cagcta 66

15 <210> 7
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador sintético C5C1

<400> 7
ggatccatcg atccccgggtt tttatgacta gttaatcacg gccgcttata aagatctaaa 60
atgcat 66

25 <210> 8
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador sintético C5D1

<400> 8
ggctgcaggt attctaaact aggaatagat 30

35 <210> 9
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador sintético H6A1

<400> 9

45 tcgtaatta attagagctt ctttattcta tacttaaaaa g 41

<210> 10
<211> 56
<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético H6B1

<400> 10
aaaacccggg atcgattcta gactcgaggg tacctacgat acaaacttaa cggata 56

5 <210> 11
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador sintético 7521CXL directo

<400> 11
ttatttagaa attatgcatt ttaga 25

15 <210> 12
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador sintético 7634CXL inverso

<400> 12
25 gttctcgtag gagagaacta ttgac 25

<210> 13
<211> 4879
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de plásmido donador pCXL148.2

35 <400> 13

ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tegtgtctta ccgggttgga ctcaagacga 60
 tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc 120
 ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc 180
 acgcttcccc aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga 240
 gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggatc tttatagtcc tgtcgggttt 300
 cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggag gagcctatgg 360
 aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttccctggcct tttgctggcc ttttgctcac 420
 atgttctttc ctgcgttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga 480
 gctgataccg ctgcgcgag ccgaacgacc gagcgagcg agtcagttag cgaggaagcg 540
 gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagc 600
 tggcacgaca ggtttccga ctggaaagcg ggcagttagc gcaacgcaat taatgtgagt 660
 tagctcactc attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt 720
 ggaattgtga gcggataaca atttcacaca ggaaacagct atgaccatga ttacgaattg 780
 cggccgcaat tctgaatgtt aaatgttata ctttggatga agctataaat atgcattgga 840
 aaaataatcc atttaaagaa aggattcaaa tactacaaaa cctaagcgat aatatgttaa 900
 ctaagcttat tcttaacgac gctttaaata tacacaaata aacataattt ttgtataacc 960
 taacaaataa ctaaaacata aaaataataa aaggaaatgt aatatcgtaa ttattttact 1020
 caggaatggg gttaaataatt tatatcacgt gtatatctat actgttatcg tatactcttt 1080
 acaattacta ttacgaatat gcaagagata ataagattac gtatttaaga gaatcttgct 1140
 atgataattg ggtacgacat agtgataaat gctatttcgc atcgttacat aaagtcagtt 1200
 ggaaagatgg atttgacaga tgtaacttaa taggtgcaa aatgttaaat aacagcattc 1260
 tatcggaaga taggatacca gttatattat acaaaaatca ctggttgat aaaacagatt 1320

ctgcaatatt cgtaaaagat gaagattact gcgaatttgt aaactatgac aataaaaagc 1380
 catttatctc aacgacatcg tgtaattctt ccatgtttta tgtatgtgtt tcagatatta 1440
 tgagattact ataaactttt tgtataactta tattccgtaa actatattaa tcatgaagaa 1500
 aatgaaaaag tatagaagct gttcacgagc gggtgttgaa aacaacaaaa ttatacattc 1560
 aagatggctt acatatacgt ctgtgaggct atcatggata atgacaatgc atctctaaat 1620
 aggttttttg acaatggatt cgaccctaac acggaatatg gtactctaca atctcctctt 1680
 gaaatggctg taatgttcaa gaataccgag gctataaaaa tcttgatgag gtatggagct 1740
 aaacctgtag ttactgaatg cacaacttct tgtctgcatg atgcggtgtt gagagacgac 1800
 tacaaaaatag tgaaagatct gttgaagaat aactatgtaa acaatgttct ttacagcgga 1860
 ggctttactc ctttgtgttt ggcagcttac cttaacaaag ttaatttggt taaacttcta 1920
 ttggctcatt cggcggatgt agatatttca aacacggatc ggtaactcc tctacatata 1980
 gccgtatcaa ataaaaatth aacaatgggt aaacttctat tgaacaaaag tgctgatact 2040
 gacttgctgg ataacatggg acgtactcct ttaatgatcg ctgtacaatc tggaaatatt 2100
 gaaatatgta gcacactact taaaaaaaaat aaaatgtcca gaactgggaa aaattgatct 2160
 tgccagctgt aattcatggt agaaaagaag tgctcaggct acttttcaac aaaggagcag 2220
 atgtaaacta catctttgaa agaaatggaa aatcatatac tgttttggaa ttgattaaag 2280
 aaagttactc tgagacacaa aagaggtagc tgaagtggta ctctcaaagg tacgtgacta 2340
 attagctata aaaaggatcc gggtaatta attagtcac aggcaggcg agaacgagac 2400
 tatctgctcg ttaattaatt agagcttctt tattctatac ttaaaaagtg aaaataaata 2460
 caaaggttct tgagggttgt gttaaattga aagcgagaaa taatcataaa ttatttcatt 2520
 atcgcgatat ccgttaagtt tgtatcgtag gtaccctcga gtctagaatc gatcccggt 2580
 ttttatgact agttaatcac ggcgcgttat aaagatctaa aatgcataat ttctaaataa 2640
 tgaaaaaaag tacatcatga gcaacgcgtt agtatatttt acaatggaga ttaacgctct 2700
 ataccgttct atgtttattg attcagatga tgtttttagaa aagaaagtta ttgaatatga 2760
 aaactttaat gaagatgaag atgacgacga tgattattgt tgtaaactctg ttttagatga 2820
 agaagatgac gcgctaaagt atactatggt tacaaagtat aagtctatac tactaatggc 2880
 gacttgtgca agaaggtata gtatagttaa aatgttgta gattatgatt atgaaaaacc 2940
 aaataaatca gatccatata taaaggatat tcctttgcac ataatttcatt ctattcctag 3000
 tttagaatac ctgcagccaa gcttggcact ggccgtcgtt ttacaacgtc gtgactggga 3060
 aaaccctggc gttacccaac ttaatcgctc tgcagcacat cccctttcg ccagctggcg 3120
 taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga 3180
 atggcgctg atgcggtatt ttctccttac gcactgtgc ggtatttcac accgcatatg 3240

gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc gacacccgcc 3300
aacacccgct gacgcgccct gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc 3360
tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc 3420
gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttatagggt aatgtcatga taataatggt 3480
ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccta tttgtttatt 3540
tttctaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca 3600
ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt 3660
ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctgggtga aagtaaaaga 3720
tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa 3780
gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct 3840
gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat 3900
acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga 3960
tggtcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtata aactgcggc 4020
caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat 4080
gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa 4140
cgacgagcgt gacaccacga tgccctgtagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac 4200
tggtgaacta ctactctag cttcccgga acaattaata gactggatgg aggcggataa 4260
agttgcagga ccacttctgc gctcgccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc 4320
tggtgacggt gagcgtgggt ctgcggtat cattgcagca ctggggccag atggttaagc 4380
ctcccgatc gtatgtatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag 4440
acagatcgct gagatagggt cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttaa 4500
ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa 4560
gatccttttt gataatctca tgacccaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc 4620
gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat 4680
ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcgggt gtttgtttgc cggtatcaaga 4740
gtaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaataactgt 4800
ccttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata 4860
cctcgctctg ctaatcctg 4879

<210> 14

<211> 72

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético 13247.JY directo

<400> 14

gcgctcgagt ttttattcaa aattgaaaat atataattac aatataaaat gggcaagatc 60

atcaagagcc tg

72

5 <210> 15

<211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador sintético 13247.JY inverso

<400> 15

atctcgagat aaaaatcatc aggcgttct caggaacagg ggcacgtc 48

15

<210> 16

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador sintético 7931.DC

<400> 16

25 gaatctgta gtagttact tggat 25

<210> 17

<211> 25

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético 7932.DC

35 <400> 17

tgattatgc tattatcaca gactc 25

<210> 18

<211> 12

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

45

<400> 18

aattgcggcc gc 12

<210> 19

50 <211> 6795

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<220>

<221> CDS
<222> (1800)..(4664)

<220>

5 <221> CDS
<222> (4716)..(6293)

<400> 19
ggaaacagct atgaccatga ttacgaattg cggcgcgaat tctgaatgtt aaatgttata 60
ctttggatga agctataaat atgcattgga aaaataatcc atttaaagaa aggattcaaa 120
tactacaaaa cctaagcgat aatatgttaa ctaagcttat tcttaacgac gctttaaata 180
tacacaaata aacataatth ttgtataacc taacaaataa ctaaaacata aaaataataa 240
aaggaaatgt aatatcgtaa ttatthttact caggaatggg gttaaattatt tatatcacgt 300
gtatatctat actgttatcg tatactctth acaattacta ttacgaatat gcaagagata 360
ataagattac gtatttaaga gaatcttgct atgataattg ggtacgacat agtgataaat 420
gctatthtcgc atcgttacat aaagtcagtt ggaaagatgg atthtgacaga tgtaacttaa 480
taggtgcaaa aatgttaaat aacagcattc tatcggaaga taggatacca gttatattat 540
acaaaaatca ctggttggtat aaaacagatt ctgcaatatt cgtaaaagat gaagattact 600
gcgaatthgt aaactatgac aataaaaagc catthtatctc aacgacatcg tgtaattctt 660
ccatgththta tgtatgtgtt tcagatatta tgagattact ataaacttht tgtatactta 720
tattccgtaa actatattaa tcatgaagaa aatgaaaaag tatagaagct gttcacgagc 780
ggttgthtgaa aacaacaaaa ttatacatth aagatggctt acatatacgt ctgtgaggct 840
atcatggata atgacaatgc atctctaaat aggtththtg acaatggatt cgaccctaac 900
acggaatatg gtactctaca atctctctt gaaatggctg taatgttcaa gaataccgag 960
gctataaaaa tcttgatgag gtatggagct aaacctgtag ttactgaatg cacaacttct 1020
tgtctgcatg atgcggtgtt gagagacgac tacaaaatag tgaaagatct gttgaagaat 1080
aactatgtaa acaatgttct ttacagcgga ggctthactc cthtgtgtt ggagcgttac 1140
cttaacaaaag ttaatthggt taaacttcta ttggctcatt cggcggtatg agatatttca 1200
aacacggatc ggttaactcc tctacatata gccgtatcaa ataaaaatth aacaatggtt 1260
aaacttctat tgaacaaagg tgctgatact gacttgctgg ataacatggg acgtactcct 1320
ttaatgatcg ctgtacaatc tggaaatatt gaaatatgta gcacactact taaaaaaat 1380
aaaatgtcca gaactgggaa aaattgatct tgccagctgt aatcatggt agaaaagaag 1440
tgctcaggct actthtcaac aaaggagcag atgtaaacta catctthgaa agaatggaa 1500
aatcatatac tgtthtgga ttgattaaag aaagthactc tgagacacaa aagaggtagc 1560

tgaagtggta ctctcaaagg tacgtgacta attagctata aaaaggatcc gggttaatta	1620
attagtcatc aggcagggcg agaacgagac tatctgctcg ttaattaatt agagcttctt	1680
tattctatac ttaaaaagtg aaaataaata caaagggttct tgagggttgt gttaaattga	1740
aagcgagaaa taatcataaa ttatttcatt atcgcgatat ccgttaagtt tgtatcgta	1799
atg gag gag ttc gtg atc ccc gtg tac agc gag gac gag atc ccc tac Met Glu Glu Phe Val Ile Pro Val Tyr Ser Glu Asp Glu Ile Pro Tyr 1 5 10 15	1847
gcc ctg ctg agc aga tac cct ctg gcc atc cag acc aac gtg aag atc Ala Leu Leu Ser Arg Tyr Pro Leu Ala Ile Gln Thr Asn Val Lys Ile 20 25 30	1895
gag gac gtg gag ggc aag cac aac gtg gtg aag atc ccc gag agc gac Glu Asp Val Glu Gly Lys His Asn Val Val Lys Ile Pro Glu Ser Asp 35 40 45	1943
atg atc gac atc ccc cgg ctg acc atc gtg gag gcc atg aac tac aag Met Ile Asp Ile Pro Arg Leu Thr Ile Val Glu Ala Met Asn Tyr Lys 50 55 60	1991
ccc gcc agg aac gac ggc atc gtg gtg cct aga ctg ctg gac atc acc Pro Ala Arg Asn Asp Gly Ile Val Val Pro Arg Leu Leu Asp Ile Thr 65 70 75 80	2039
ctg aga gcc tac gac gac cgg aag agc acc aag agc gcc aga ggc atc Leu Arg Ala Tyr Asp Asp Arg Lys Ser Thr Lys Ser Ala Arg Gly Ile 85 90 95	2087
gag ttc atg acc aac gcc cgg tgg atg aag tgg gcc atc gac gac agg Glu Phe Met Thr Asn Ala Arg Trp Met Lys Trp Ala Ile Asp Asp Arg 100 105 110	2135
atg gac atc cag ccc ctg aag gtg acc ctg gac cac tac tgc agc gtg Met Asp Ile Gln Pro Leu Lys Val Thr Leu Asp His Tyr Cys Ser Val 115 120 125	2183
aat cac cag ctg ttc aac tgc gtg gtg aag gcc aac gcc gcc aat gcc Asn His Gln Leu Phe Asn Cys Val Val Lys Ala Asn Ala Ala Asn Ala 130 135 140	2231
gac acc atc tac tac gac tac ttc ccc ctg gag gac cac aag aag cgg Asp Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Phe Pro Leu Glu Asp His Lys Lys Arg 145 150 155 160	2279
tgc aac cac acc aac ctg gac ctg ctg agg agc ctg acc aac atg gag Cys Asn His Thr Asn Leu Asp Leu Leu Arg Ser Leu Thr Asn Met Glu 165 170 175	2327
ctg ttc cac gcc ctg cag gga gcc gcc tac agc atc aag agc agc tac Leu Phe His Ala Leu Gln Gly Ala Ala Tyr Ser Ile Lys Ser Ser Tyr 180 185 190	2375
gaa ctg gtg gcc aac agc gag aga gag agc ctg gag gag acc tac gcc Glu Leu Val Ala Asn Ser Glu Arg Glu Ser Leu Glu Glu Thr Tyr Ala 195 200 205	2423
atc ggc cag cct aag tgg atc cac ctg acc agg ggc acc aga atc ggc Ile Gly Gln Pro Lys Trp Ile His Leu Thr Arg Gly Thr Arg Ile Gly	2471

ES 2 623 138 T3

210	215	220	
aac agc ggc ctg cct tac gag aga ttc atc agc agc atg gtg cag gtg Asn Ser Gly Leu Pro Tyr Glu Arg Phe Ile Ser Ser Met Val Gln Val 225 230 235 240			2519
atc gtg aac ggc aag atc cct agc gag atc gcc aac gag gtg gcc cag Ile Val Asn Gly Lys Ile Pro Ser Glu Ile Ala Asn Glu Val Ala Gln 245 250 255			2567
ctg aac aga atc cgg gcc gag tgg atc gcc gcc acc tac gac aga ggc Leu Asn Arg Ile Arg Ala Glu Trp Ile Ala Ala Thr Tyr Asp Arg Gly 260 265 270			2615
agg atc aga gcc ctg gag ctg tgc aag atc ctg agc acc atc ggc cgg Arg Ile Arg Ala Leu Glu Leu Cys Lys Ile Leu Ser Thr Ile Gly Arg 275 280 285			2663
aag atc ctg aat acc cac gag gag ccc aag gac gag atg gac ctg tcc Lys Ile Leu Asn Thr His Glu Glu Pro Lys Asp Glu Met Asp Leu Ser 290 295 300			2711
acc cgg ttc cag ttc aag ctg gac gag aag ttc aac agg acc gac ccc Thr Arg Phe Gln Phe Lys Leu Asp Glu Lys Phe Asn Arg Thr Asp Pro 305 310 315 320			2759
gag cac gtg aat atc ttc gga gtg agg gcc cct gcc acc gac gag ggc Glu His Val Asn Ile Phe Gly Val Arg Ala Pro Ala Thr Asp Glu Gly 325 330 335			2807
aga ttc tac gcc ctg atc gcc att gcc gcc acc gac acc cag aag ggc Arg Phe Tyr Ala Leu Ile Ala Ile Ala Ala Thr Asp Thr Gln Lys Gly 340 345 350			2855
aga gtg tgg agg acc aac ccc tac cct tgc ctg aga ggc gcc ctg gtg Arg Val Trp Arg Thr Asn Pro Tyr Trp Cys Leu Arg Gly Ala Leu Val 355 360 365			2903
gcc gcc gag tgc gag ctg ggc gac gtg tac agc acc ctg cgg agg gtg Ala Ala Glu Cys Glu Leu Gly Asp Val Tyr Ser Thr Leu Arg Arg Val 370 375 380			2951
tac aga tgg agc ctg aga cct gag tac ggc cag cac gag aga cag ctg Tyr Arg Trp Ser Leu Arg Pro Glu Tyr Gly Gln His Glu Arg Gln Leu 385 390 395 400			2999
gag aac aac aag tac gtg ttc aac cgg atc aac ctg ttc gac agc aat Glu Asn Asn Lys Tyr Val Phe Asn Arg Ile Asn Leu Phe Asp Ser Asn 405 410 415			3047
ctg gcc gtg ggc gac cag atc atc cac tgg cgc tac gag gtg aag gcc Leu Ala Val Gly Asp Gln Ile Ile His Trp Arg Tyr Glu Val Lys Ala 420 425 430			3095
tcc gcc gag acc acc tac gat agc ggc tac atg tgc agg cac gag gtg Ser Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Ser Gly Tyr Met Cys Arg His Glu Val 435 440 445			3143
gag gag gac gag ctg ctg tgt aag atc aac gag gac aag tac aag gac Glu Glu Asp Glu Leu Leu Cys Lys Ile Asn Glu Asp Lys Tyr Lys Asp 450 455 460			3191
atg ctg gac cgg atg atc cag ggc ggc tgg gat cag gag agg ttc aag			3239

ES 2 623 138 T3

Met 465	Leu	Asp	Arg	Met	Ile 470	Gln	Gly	Gly	Trp	Asp 475	Gln	Glu	Arg	Phe	Lys 480	
ctg	cac	aac	atc	ctg	acc	gac	ccc	aac	ctg	ctg	aca	atc	gac	ttc	gag	3287
Leu	His	Asn	Ile	Leu	Thr	Asp	Pro	Asn	Leu	Leu	Thr	Ile	Asp	Phe	Glu	
				485					490					495		
aag	gac	gcc	tac	ctg	aac	agc	aga	agc	gag	ctg	gtg	ttc	ccc	gac	tac	3335
Lys	Asp	Ala	Tyr	Leu	Asn	Ser	Arg	Ser	Glu	Leu	Val	Phe	Pro	Asp	Tyr	
			500					505					510			
ttc	gac	aag	tgg	atc	agc	agc	ccc	atg	ttc	aac	gcc	cgg	ctg	aga	atc	3383
Phe	Asp	Lys	Trp	Ile	Ser	Ser	Pro	Met	Phe	Asn	Ala	Arg	Leu	Arg	Ile	
		515					520					525				
acc	aag	ggc	gag	atc	ggc	acc	agc	aag	aag	gac	gac	ccc	tgg	aac	aac	3431
Thr	Lys	Gly	Glu	Ile	Gly	Thr	Ser	Lys	Lys	Asp	Asp	Pro	Trp	Asn	Asn	
		530				535					540					
aga	gcc	gtg	cgg	ggc	tac	atc	aag	agc	cct	gcc	gag	tcc	ctg	gac	ttc	3479
Arg	Ala	Val	Arg	Gly	Tyr	Ile	Lys	Ser	Pro	Ala	Glu	Ser	Leu	Asp	Phe	
545					550					555					560	
gtg	ctg	ggc	ccc	tac	tac	gat	ctg	cgg	ctg	ctg	ttc	ttc	ggc	gag	gcc	3527
Val	Leu	Gly	Pro	Tyr	Tyr	Asp	Leu	Arg	Leu	Leu	Phe	Phe	Gly	Glu	Ala	
				565				570						575		
ctg	agc	ctg	aag	cag	gag	cag	agc	gcc	gtg	ttc	cag	tac	ctg	agc	cag	3575
Leu	Ser	Leu	Lys	Gln	Glu	Gln	Ser	Ala	Val	Phe	Gln	Tyr	Leu	Ser	Gln	
			580					585					590			
ctg	gac	gac	ttc	ccc	gcc	ctg	acc	cag	ctg	acc	ggc	gac	gcc	gtg	tgt	3623
Leu	Asp	Asp	Phe	Pro	Ala	Leu	Thr	Gln	Leu	Thr	Gly	Asp	Ala	Val	Cys	
		595					600					605				
cct	cac	agc	ggc	gga	gcc	ctg	tac	acc	ttc	agg	aag	gtg	gcc	ctg	ttc	3671
Pro	His	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Tyr	Thr	Phe	Arg	Lys	Val	Ala	Leu	Phe	
		610				615					620					
ctg	atc	ggc	aac	tac	gag	aag	ctg	agc	ccc	gac	ctg	cac	gag	ggc	atg	3719
Leu	Ile	Gly	Asn	Tyr	Glu	Lys	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	His	Glu	Gly	Met	
625					630					635					640	
gag	cac	cag	acc	tac	gtg	cac	ccc	agc	acc	ggc	ggc	acc	tac	cag	aaa	3767
Glu	His	Gln	Thr	Tyr	Val	His	Pro	Ser	Thr	Gly	Gly	Thr	Tyr	Gln	Lys	
			645					650						655		
tgc	gtg	ctg	gag	atg	aag	gac	ccc	tgc	cag	ctg	atg	tgc	ttc	gtg	atc	3815
Cys	Val	Leu	Glu	Met	Lys	Asp	Pro	Cys	Gln	Leu	Met	Cys	Phe	Val	Ile	
			660					665					670			
gac	tac	atc	ttc	gag	aag	cgg	gag	cag	ctg	aga	gac	acc	aag	gag	gcc	3863
Asp	Tyr	Ile	Phe	Glu	Lys	Arg	Glu	Gln	Leu	Arg	Asp	Thr	Lys	Glu	Ala	
		675					680					685				
cgg	tac	atc	gtg	tac	ctg	atc	cag	agc	ctg	acc	ggc	atc	cag	aga	ctg	3911
Arg	Tyr	Ile	Val	Tyr	Leu	Ile	Gln	Ser	Leu	Thr	Gly	Ile	Gln	Arg	Leu	
		690				695					700					
gac	gtg	ctg	aag	agc	acc	ttc	ccc	aac	ttc	ttc	cag	cgg	ctg	ctg	atg	3959
Asp	Val	Leu	Lys	Ser	Thr	Phe	Pro	Asn	Phe	Phe	Gln	Arg	Leu	Leu	Met	
705					710					715					720	

ES 2 623 138 T3

ctg aag gag atc aag ttt gtg cgg gac ctg aac gtg atc aac ttc ctg Leu Lys Glu Ile Lys Phe Val Arg Asp Leu Asn Val Ile Asn Phe Leu 725 730 735	4007
ccc ctg atg ttc ctg gtg cac gac aac atc agc tac agc cac cgg cag Pro Leu Met Phe Leu Val His Asp Asn Ile Ser Tyr Ser His Arg Gln 740 745 750	4055
tgg agc atc cct atg gtg ctg ttc gac gac acc atc aag ctg atc cct Trp Ser Ile Pro Met Val Leu Phe Asp Asp Thr Ile Lys Leu Ile Pro 755 760 765	4103
gtg gaa gtg ggc gcc tac gcc aac aga ttc ggc ttc aag agc ttc atg Val Glu Val Gly Ala Tyr Ala Asn Arg Phe Gly Phe Lys Ser Phe Met 770 775 780	4151
aac ttc acc agg ttc cac cct ggc gag agc aag aag aag cag atc gcc Asn Phe Thr Arg Phe His Pro Gly Glu Ser Lys Lys Lys Gln Ile Ala 785 790 795 800	4199
gag gac gtg cac aag gag ttc ggc gtg gtg gcc ttc gag tac tac acc Glu Asp Val His Lys Glu Phe Gly Val Ala Phe Glu Tyr Tyr Thr 805 810 815	4247
aac acc aag atc agc cag ggc agc gtg cac acc ccc gtg atg acc acc Asn Thr Lys Ile Ser Gln Gly Ser Val His Thr Pro Val Met Thr Thr 820 825 830	4295
aag atg gat gtg ctg aaa atc cac ctg agc agc ctg tgt gcc ggc ctg Lys Met Asp Val Leu Lys Ile His Leu Ser Ser Leu Cys Ala Gly Leu 835 840 845	4343
gcc gac agc atc gtg tac acc ctg ccc gtg gcc cac ccc aag aag tgc Ala Asp Ser Ile Val Tyr Thr Leu Pro Val Ala His Pro Lys Lys Cys 850 855 860	4391
atc gtg ctg atc att gtg ggc gac gac aag ctg gag cct cac acc aga Ile Val Leu Ile Ile Val Gly Asp Asp Lys Leu Glu Pro His Thr Arg 865 870 875 880	4439
tcc gag cag atc gtg tcc cgg tac aac tac agc cgg aag cac atc tgc Ser Glu Gln Ile Val Ser Arg Tyr Asn Tyr Ser Arg Lys His Ile Cys 885 890 895	4487
ggc gtg gtg tcc gtg aca gtg ggc cag aac agc cag ctg aga gtg tac Gly Val Val Ser Val Thr Val Gly Gln Asn Ser Gln Leu Arg Val Tyr 900 905 910	4535
acc agc ggc atc gtg aag cac aga gtg tgc gac aag ttc atc ctg aag Thr Ser Gly Ile Val Lys His Arg Val Cys Asp Lys Phe Ile Leu Lys 915 920 925	4583
cac aaa tgc aag gtg atc ctg gtg agg atg ccc ggc tac gtg ttc ggc His Lys Cys Lys Val Ile Leu Val Arg Met Pro Gly Tyr Val Phe Gly 930 935 940	4631
aac gac gag ctg atg acc aag ctg ctg aat gtg tgatgactcg agtttttatt Asn Asp Glu Leu Met Thr Lys Leu Leu Asn Val 945 950 955	4684
caaaattgaa aatatataat tacaatataa a atg ggc aag atc atc aag agc Met Gly Lys Ile Ile Lys Ser 960	4736

ctg agc cgc ttc ggc aag aaa gtg ggc aat gcc ctg acc agc aac acc Leu Ser Arg Phe Gly Lys Lys Val Gly Asn Ala Leu Thr Ser Asn Thr 965 970 975	4784
gcc aag aag atc tac agc acc atc ggc aag gcc gcc gag aga ttc gcc Ala Lys Lys Ile Tyr Ser Thr Ile Gly Lys Ala Ala Glu Arg Phe Ala 980 985 990	4832
gag agc gag atc gga gcc gcc acc atc gac gcc ctg gtg cag ggc Glu Ser Glu Ile Gly Ala Ala Thr Ile Asp Gly Leu Val Gln Gly 995 1000 1005	4877
agc gtg cac agc atc atc acc ggc gag agc tac gcc gag agc gtg Ser Val His Ser Ile Ile Thr Gly Glu Ser Tyr Gly Glu Ser Val 1010 1015 1020	4922
aag cag gcc gtg ctg ctg aac gtg ctg gcc aca gcc gag gag ctg Lys Gln Ala Val Leu Leu Asn Val Leu Gly Thr Gly Glu Glu Leu 1025 1030 1035	4967
ccc gac ccc ctg agc cct gcc gag aga gcc atc cag acc aag atc Pro Asp Pro Leu Ser Pro Gly Glu Arg Gly Ile Gln Thr Lys Ile 1040 1045 1050	5012
aag gag ctg gag gac gag cag aga aac gag ctg gtg cgg ctg aag Lys Glu Leu Glu Asp Glu Gln Arg Asn Glu Leu Val Arg Leu Lys 1055 1060 1065	5057
tac aac aag gag atc acc aag gag ttc gcc aag gaa ctg gaa gag Tyr Asn Lys Glu Ile Thr Lys Glu Phe Gly Lys Glu Leu Glu Glu 1070 1075 1080	5102
gtg tac gac ttc atg aac gcc gag gcc aag gag gag gag gtg gtg Val Tyr Asp Phe Met Asn Gly Glu Ala Lys Glu Glu Glu Val Val 1085 1090 1095	5147
caa gaa cag tac agc atg ctg tgc aag gcc gtg gac agc tac gag Gln Glu Gln Tyr Ser Met Leu Cys Lys Ala Val Asp Ser Tyr Glu 1100 1105 1110	5192
aag atc ctg aag gcc gag gac tcc aag atg gcc atg ctg gcc aga Lys Ile Leu Lys Ala Glu Asp Ser Lys Met Ala Met Leu Ala Arg 1115 1120 1125	5237
gcc ctg cag agg gag gcc agc gag aga agc cag gac gag atc aag Ala Leu Gln Arg Glu Ala Ser Glu Arg Ser Gln Asp Glu Ile Lys 1130 1135 1140	5282
atg gtg aag gag tac cgg cag aag atc gac gcc ctg aag aac gcc Met Val Lys Glu Tyr Arg Gln Lys Ile Asp Ala Leu Lys Asn Ala 1145 1150 1155	5327
atc gag atc gag agg gac gcc atg cag gag gag gcc atc caa gaa Ile Glu Ile Glu Arg Asp Gly Met Gln Glu Ala Ile Gln Glu 1160 1165 1170	5372
atc gcc ggc atg acc gcc gac gtg ctg gag gcc gcc agc gag gag Ile Ala Gly Met Thr Ala Asp Val Leu Glu Ala Ala Ser Glu Glu 1175 1180 1185	5417
gtg ccc ctg att ggc gcc gga atg gcc acc gcc gtg gcc acc ggc Val Pro Leu Ile Gly Ala Gly Met Ala Thr Ala Val Ala Thr Gly 1190 1195 1200	5462

ES 2 623 138 T3

1190		1195		1200		
aga gcc atc gag ggc gcc	tac aag ctg aag aag	gtg atc aac gcc	5507			
Arg Ala Ile Glu Gly Ala	Tyr Lys Leu Lys Lys	Val Ile Asn Ala				
1205	1210	1215				
ctg agc ggc atc gac ctg	agc cac atg agg agc	ccc aag atc gag	5552			
Leu Ser Gly Ile Asp Leu	Ser His Met Arg Ser	Pro Lys Ile Glu				
1220	1225	1230				
cct acc atc atc gcc acc	acc ctg gag cac cgg	ttc aag gag atc	5597			
Pro Thr Ile Ile Ala Thr	Thr Leu Glu His Arg	Phe Lys Glu Ile				
1235	1240	1245				
cct gac gag cag ctg gcc	gtg tcc gtg ctg aac	aag aaa acc gcc	5642			
Pro Asp Glu Gln Leu Ala	Val Ser Val Leu Asn	Lys Lys Thr Ala				
1250	1255	1260				
gtg acc gac aac tgc aac	gag atc gcc cac atc	aag cag gag atc	5687			
Val Thr Asp Asn Cys Asn	Glu Ile Ala His Ile	Lys Gln Glu Ile				
1265	1270	1275				
ctg ccc aag ttc aag cag	atc atg gac gag gag	aag gag atc gag	5732			
Leu Pro Lys Phe Lys Gln	Ile Met Asp Glu Glu	Lys Glu Ile Glu				
1280	1285	1290				
ggc atc gag gac aag gtg	atc cac ccc cgg gtg	atg atg agg ttc	5777			
Gly Ile Glu Asp Lys Val	Ile His Pro Arg Val	Met Met Arg Phe				
1295	1300	1305				
aag atc ccc aga acc cag	cag cct cag atc cac	atc tat gcc gcc	5822			
Lys Ile Pro Arg Thr Gln	Gln Pro Gln Ile His	Ile Tyr Ala Ala				
1310	1315	1320				
cct tgg gac agc gac gac	gtg ttc ttc ttc cac	tgc gtg tcc cac	5867			
Pro Trp Asp Ser Asp Asp	Val Phe Phe Phe His	Cys Val Ser His				
1325	1330	1335				
cac cac agg aac gag agc	ttc ttc ctg ggc ttc	gac ctg ggc atc	5912			
His His Arg Asn Glu Ser	Phe Phe Leu Gly Phe	Asp Leu Gly Ile				
1340	1345	1350				
gac gtg gtg cac ttc gag	gat ctg acc agc cac	tgg cac gcc ctg	5957			
Asp Val Val His Phe Glu	Asp Leu Thr Ser His	Trp His Ala Leu				
1355	1360	1365				
ggc ctg gcc cag gag gcc	tcc ggc aga acc ctg	acc gag gcc tac	6002			
Gly Leu Ala Gln Glu Ala	Ser Gly Arg Thr Leu	Thr Glu Ala Tyr				
1370	1375	1380				
agg gag ttc ctg aac ctg	agc atc agc agc acc	tac agc agc gcc	6047			
Arg Glu Phe Leu Asn Leu	Ser Ile Ser Ser Thr	Tyr Ser Ser Ala				
1385	1390	1395				
atc cac gcc cgg aga atg	atc aga tcc agg gcc	gtg cac cct atc	6092			
Ile His Ala Arg Arg Met	Ile Arg Ser Arg Ala	Val His Pro Ile				
1400	1405	1410				
ttt ctg ggc agc acc cac	tac gac atc acc tac	gag gcc ctg aaa	6137			
Phe Leu Gly Ser Thr His	Tyr Asp Ile Thr Tyr	Glu Ala Leu Lys				
1415	1420	1425				
aac aac gcc cag cgg atc	gtg tac gat gag gag	ctg cag atg cac	6182			

Asn	Asn	Ala	Gln	Arg	Ile	Val	Tyr	Asp	Glu	Glu	Leu	Gln	Met	His	
1430					1435					1440					
atc	ctg	aga	ggc	cct	ctg	cac	ttc	cag	agg	aga	gcc	atc	ctg	ggc	6227
Ile	Leu	Arg	Gly	Pro	Leu	His	Phe	Gln	Arg	Arg	Ala	Ile	Leu	Gly	
1445					1450					1455					
gcc	ctg	aag	ttc	ggc	atc	aag	atc	ctg	ggc	gac	aag	atc	gac	gtg	6272
Ala	Leu	Lys	Phe	Gly	Ile	Lys	Ile	Leu	Gly	Asp	Lys	Ile	Asp	Val	
1460					1465					1470					
ccc	ctg	ttc	ctg	agg	aac	gcc	tgatgatttt	tatctcgagt	ctagaatcga						6323
Pro	Leu	Phe	Leu	Arg	Asn	Ala									
1475					1480										
tcccggggttt	ttagtactag	ttaatcacgg	ccgcttataa	agatctaaaa	tgcataattt										6383
ctaaataatg	aaaaaaagta	catcatgagc	aacgcggttag	tatatatttac	aatggagatt										6443
aacgctctat	accgttctat	gtttattgat	tcagatgatg	ttttagaaaa	gaaagttatt										6503
gaatatgaaa	actttaatga	agatgaagat	gacgacgatg	attattgttg	taaatctggt										6563
ttagatgaag	aagatgacgc	gctaaagtat	actatgggta	caaagtataa	gtctatacta										6623
ctaattggcga	cttgtgcaag	aaggtatagt	atagtgaaaa	tgttgttaga	ttagtattat										6683
gaaaaaccaa	ataaatcaga	tccatatcta	aaggatatctc	ctttgcacat	aatttcatct										6743
attcctagtt	tagaatacct	gcagccaagc	ttggcactgg	ccgtcgtttt	ac										6795

<210> 20

<211> 955

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de proteína

10 <400> 20

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

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

Glu Glu Asp Glu Leu Leu Cys Lys Ile Asn Glu Asp Lys Tyr Lys Asp
 450 455 460
 Met Leu Asp Arg Met Ile Gln Gly Gly Trp Asp Gln Glu Arg Phe Lys
 465 470 475 480
 Leu His Asn Ile Leu Thr Asp Pro Asn Leu Leu Thr Ile Asp Phe Glu
 485 490 495
 Lys Asp Ala Tyr Leu Asn Ser Arg Ser Glu Leu Val Phe Pro Asp Tyr
 500 505 510
 Phe Asp Lys Trp Ile Ser Ser Pro Met Phe Asn Ala Arg Leu Arg Ile
 515 520 525
 Thr Lys Gly Glu Ile Gly Thr Ser Lys Lys Asp Asp Pro Trp Asn Asn
 530 535 540
 Arg Ala Val Arg Gly Tyr Ile Lys Ser Pro Ala Glu Ser Leu Asp Phe
 545 550 555 560
 Val Leu Gly Pro Tyr Tyr Asp Leu Arg Leu Leu Phe Phe Gly Glu Ala
 565 570 575
 Leu Ser Leu Lys Gln Glu Gln Ser Ala Val Phe Gln Tyr Leu Ser Gln
 580 585 590
 Leu Asp Asp Phe Pro Ala Leu Thr Gln Leu Thr Gly Asp Ala Val Cys
 595 600 605
 Pro His Ser Gly Gly Ala Leu Tyr Thr Phe Arg Lys Val Ala Leu Phe
 610 615 620
 Leu Ile Gly Asn Tyr Glu Lys Leu Ser Pro Asp Leu His Glu Gly Met
 625 630 635 640
 Glu His Gln Thr Tyr Val His Pro Ser Thr Gly Gly Thr Tyr Gln Lys
 645 650 655
 Cys Val Leu Glu Met Lys Asp Pro Cys Gln Leu Met Cys Phe Val Ile
 660 665 670
 Asp Tyr Ile Phe Glu Lys Arg Glu Gln Leu Arg Asp Thr Lys Glu Ala
 675 680 685
 Arg Tyr Ile Val Tyr Leu Ile Gln Ser Leu Thr Gly Ile Gln Arg Leu
 690 695 700
 Asp Val Leu Lys Ser Thr Phe Pro Asn Phe Phe Gln Arg Leu Leu Met
 705 710 715 720
 Leu Lys Glu Ile Lys Phe Val Arg Asp Leu Asn Val Ile Asn Phe Leu
 725 730 735
 Pro Leu Met Phe Leu Val His Asp Asn Ile Ser Tyr Ser His Arg Gln
 740 745 750
 Trp Ser Ile Pro Met Val Leu Phe Asp Asp Thr Ile Lys Leu Ile Pro
 755 760 765
 Val Glu Val Gly Ala Tyr Ala Asn Arg Phe Gly Phe Lys Ser Phe Met
 770 775 780

Asn Phe Thr Arg Phe His Pro Gly Glu Ser Lys Lys Lys Gln Ile Ala
 785 790 795 800
 Glu Asp Val His Lys Glu Phe Gly Val Val Ala Phe Glu Tyr Tyr Thr
 805 810 815
 Asn Thr Lys Ile Ser Gln Gly Ser Val His Thr Pro Val Met Thr Thr
 820 825 830
 Lys Met Asp Val Leu Lys Ile His Leu Ser Ser Leu Cys Ala Gly Leu
 835 840 845
 Ala Asp Ser Ile Val Tyr Thr Leu Pro Val Ala His Pro Lys Lys Cys
 850 855 860
 Ile Val Leu Ile Ile Val Gly Asp Asp Lys Leu Glu Pro His Thr Arg
 865 870 875 880
 Ser Glu Gln Ile Val Ser Arg Tyr Asn Tyr Ser Arg Lys His Ile Cys
 885 890 895
 Gly Val Val Ser Val Thr Val Gly Gln Asn Ser Gln Leu Arg Val Tyr
 900 905 910
 Thr Ser Gly Ile Val Lys His Arg Val Cys Asp Lys Phe Ile Leu Lys
 915 920 925
 His Lys Cys Lys Val Ile Leu Val Arg Met Pro Gly Tyr Val Phe Gly
 930 935 940
 Asn Asp Glu Leu Met Thr Lys Leu Leu Asn Val
 945 950 955

<210> 21

<211> 526

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de proteína

10 <400> 21

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

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

Leu Asn Leu Ser Ile Ser Ser Thr Tyr Ser Ser Ala Ile His Ala Arg
 435 440 445

Arg Met Ile Arg Ser Arg Ala Val His Pro Ile Phe Leu Gly Ser Thr
 450 455 460

His Tyr Asp Ile Thr Tyr Glu Ala Leu Lys Asn Asn Ala Gln Arg Ile
 465 470 475 480

Val Tyr Asp Glu Glu Leu Gln Met His Ile Leu Arg Gly Pro Leu His
 485 490 495

Phe Gln Arg Arg Ala Ile Leu Gly Ala Leu Lys Phe Gly Ile Lys Ile
 500 505 510

Leu Gly Asp Lys Ile Asp Val Pro Leu Phe Leu Arg Asn Ala
 515 520 525

<210> 22

<211> 9380

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

10 <400> 22

gcgccaata cgaaaccgc ctctccccgc gcgttgccg attcattaat gcagctggca 60

cgacagggtt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagtttagct 120

cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat 180

tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aattgcggcc 240

gcaattctga atgttaaatg ttatactttg gatgaagcta taaatatgca ttggaaaaat 300

aatccattta aagaaaggat tcaaatacta caaacctaa gcgataatat gttaactaag 360

cttattctta acgacgcttt aaatatacac aaataaacat aatttttcta taacctaa 420

aataactaaa acataaaaat aataaaagga aatgtaatat cgtaattatt ttactcagga 480

atgggggtta atatttatat cacgtgtata tctatactgt tatcgtatac tctttacaat 540

tactattacg aatatgcaag agataataag attacgtatt taagagaatc ttgtcatgat 600

aattgggtac gacatagtga taaatgctat ttgcgcatcg tacataaagt cagttggaaa 660

gatggatttg acagatgtaa cttaataggt gcaaaaatgt taaataacag cattctatcg 720

gaagatagga taccagttat attatacaaa aatcactggg tggataaaac agattctgca 780

atattcgtaa aagatgaaga ttactgcaaa tttgtaaact atgacaataa aaagccattt 840

atctcaacga catcgtgtaa ttcttccatg ttttatgtat gtgtttcaga tattatgaga 900

ttactataaa ctttttctat acttatattc cgtaaaactat attaactatg aagaaaatga 960

aaaagtatag aagctgttca cgagcgggtg ttgaaaacaa caaaattata cattcaagat 1020

ggcttacata tacgtctgtg aggtatcat ggataatgac aatgcatctc taaatagggt 1080

tttggacaat ggattcgacc ctaacacgga atatggtact ctacaatctc ctcttgaaat 1140
 ggctgtaatg ttcaagaata ccgaggctat aaaaatcttg atgaggtatg gagctaaacc 1200
 tgtagttact gaatgcacaa cttcttgtct gcatgatgcg gtggtgagag acgactacaa 1260
 aatagtgaaa gatctgttga agaataacta tgtaaacaat gttctttaca gcggaggcctt 1320
 tactcctttg tgtttggcag cttaccttaa caaagttaat ttggttaaac ttctattggc 1380
 tcattcggcg gatgtagata tttcaaacac ggatcgggta actcctctac atatagccgt 1440
 atcaaataaa aatttaacaa tgggttaaact tctattgaac aaaggtgctg atactgactt 1500
 gctggataac atgggacgta ctcctttaat gatcgctgta caatctggaa atattgaaat 1560
 atgtagcaca ctacttaaaa aaaataaaat gtccagaact gggaaaaatt gatcttgcca 1620
 gctgtaattc atggtagaaa agaagtgctc aggctacttt tcaacaaagg agcagatgta 1680
 aactacatct ttgaaagaaa tggaaaatca tatactgttt tggaattgat taaagaaagt 1740
 tactctgaga caaaaagag gtagctgaag tggtagctc aaaggtacgt gactaattag 1800
 ctataaaaag gatccggggtt aattaattag tcatcaggca gggcgagaac gagactatct 1860
 gctcgtaaat taattagagc ttctttattc tatacttaaa aagtgaaaat aaatacaaag 1920
 gttcttgagg gttgtgttaa attgaaagcg agaaataatc ataaattatt tcattatcgc 1980
 gatatccgtt aagtttgtat cgtaatggag gagttcgtga tccccgtgta cagcgaggac 2040
 gagatcccct acgccctgct gagcagatac cctctggcca tccagaccaa cgtgaagatc 2100
 gaggacgtgg agggcaagca caacgtggtg aagatccccg agagcgacat gatcgacatc 2160
 ccccggtgga ccatcgtgga ggccatgaac tacaagcccc ccaggaacga cggcatcgtg 2220
 gtgcctagac tgctggacat caccctgaga gcctacgacg accggaagag caccaagagc 2280
 gccagaggca tcgagttcat gaccaacgcc cgggtggatga agtgggcat cgacgacagg 2340
 atggacatcc agcccctgaa ggtgaccctg gaccactact gcagcgtgaa tcaccagctg 2400
 ttcaactgcg tggggaaggc caacgccgcc aatgccgaca ccatctacta cgactacttc 2460
 cccctggagg accacaagaa gcggtgcaac cacaccaacc tggacctgct gaggagcctg 2520
 accaacaatg agctgttcca cgccctgcag ggagccgcct acagcatcaa gagcagctac 2580
 gaactggtgg ccaacagcga gagagagagc ctggaggaga cctacgccat cggccagcct 2640
 aagtggatcc acctgaccag gggcaccaga atcggcaaca gcggcctgcc ttacgagaga 2700
 ttcatcagca gcatggtgca ggtgatcgtg aacggcaaga tccctagcga gatcgccaac 2760
 gaggtggccc agctgaacag aatccgggcc gagtggatcg ccgccaccta cgacagaggc 2820
 aggatcagag ccctggagct gtgcaagatc ctgagcacca tcggccggaa gatcctgaat 2880
 acccacgagg agcccaagga cgagatggac ctgtccaccc ggttccagtt caagctggac 2940

gagaagttca acaggaccga ccccgagcac gtgaatatct tcggagttag ggcccctgcc 3000
 accgacgagg gcagattcta cgccctgac gccattgccg ccaccgacac ccagaagggc 3060
 agagtgtgga ggaccaaccc ctacccttgc ctgagaggcg ccctggtggc cgccgagtgc 3120
 gagctgggcg acgtgtacag caccctgcgg aggggtgtaca gatggagcct gagacctgag 3180
 tacggccagc acgagagaca gctggagaac aacaagtacg tgttcaaccg gatcaacctg 3240
 ttcgacagca atctggccgt gggcgaccag atcatccact ggcgctacga ggtgaaggcc 3300
 tccgccgaga ccacctacga tagcggctac atgtgcaggc acgaggtgga ggaggacgag 3360
 ctgctgtgta agatcaacga ggacaagtac aaggacatgc tggaccggat gatccagggc 3420
 ggctgggatac aggagagggt caagctgcac aacatcctga ccgaccccaa cctgctgaca 3480
 atcgacttcg agaaggacgc ctacctgaac agcagaagcg agctggtgtt ccccgactac 3540
 ttcgacaagt ggtacgagc ccccatgttc aacgcccggc tgagaatcac caagggcgag 3600
 atcggcacca gcaagaagga cgacccctgg aacaacagag ccgtgcgggg ctacatcaag 3660
 agccctgccg agtccctgga ctctgtgctg ggcccctact acgatctgcg gctgctgttc 3720
 ttcggcgagg ccctgagcct gaagcaggag cagagcgccg tgttccagta cctgagccag 3780
 ctggacgact tccccgccct gaccagctg accggcgacg ccgtgtgtcc tcacagcggc 3840
 ggagccctgt acaccttcag gaaggtggcc ctgttcctga tcggcaacta cgagaagtgc 3900
 agccccgacc tgcacgaggg catggagcac cagacctacg tgcaccccag caccggcggc 3960
 acctaccaga aatgcgtgct ggagatgaag gacccctgcc agctgatgtg ctctgtgac 4020
 gactacatct tcgagaagcg ggagcagctg agagacacca aggaggcccg gtacatcgtg 4080
 tacctgatcc agagcctgac cggcatccag agactggacg tgctgaagag caccttcccc 4140
 aacttcttcc agcggctgct gatgctgaag gagatcaagt ttgtgcggga cctgaactgc 4200
 atcaacttcc tgcccctgat gttcctggtg cacgacaaca tcagctacag ccaccggcag 4260
 tggagcatcc ctatggtgct gttcgacgac accatcaagc tgatccctgt ggaagtgggc 4320
 gcctacgcca acagattcgg ctcaagagc ttcatgaact tcaccagggt ccaccctggc 4380
 gagagcaaga agaagcagat cgccgaggac gtgcacaagg agttcggcgt ggtggccttc 4440
 gagtactaca ccaacaccaa gatcagccag ggcagcgtgc acacccccgt gatgaccacc 4500
 aagatggatg tgctgaaaat ccacctgagc agcctgtgtg ccggcctggc cgacagcatc 4560
 gtgtacaccc tgcccgtggc ccacccaag aagtgcacg tgctgatcat tgtgggcgac 4620
 gacaagctgg agcctcacac cagatccgag cagatcgtgt cccggtacaa ctacagccgg 4680
 aagcacatct gcggcgtggt gtccgtgaca gtgggcccaga acagccagct gagagtgtac 4740
 accagcggca tcgtgaagca cagagtgtgc gacaagttca tcctgaagca caaatgcaag 4800
 gtgatcctgg tgaggatgcc cggctacgtg ttgggcaacg acgagctgat gaccaagctg 4860

ctgaatgtgt gatgactcga gtttttattc aaaattgaaa atatataatt acaatataaa 4920
 atgggcaaga tcatcaagag cctgagccgc ttoggcaaga aagtgggcaa tgccctgacc 4980
 agcaacaccg ccaagaagat ctacagcacc atcggcaagg ccgccgagag attcgccgag 5040
 agcgagatcg gagccgccac catcgacggc ctggtgcagg gcagcgtgca cagcatcatc 5100
 accggcgaga gctacggcga gagcgtgaag caggccgtgc tgctgaacgt gctgggcaca 5160
 ggcgaggagc tgcccgaccc cctgagccct ggcgagagag gcatccagac caagatcaag 5220
 gagctggagg acgagcagag aaacgagctg gtgcggtga agtacaacaa ggagatcacc 5280
 aaggagtctg gcaaggaact ggaagaggtg tacgacttca tgaacggcga ggccaaggag 5340
 gaggaggtgg tgcaagaaca gtacagcatg ctgtgcaagg ccgtggacag ctacgagaag 5400
 atcctgaagg ccgaggactc caagatggcc atgctggcca gagccctgca gagggaggcc 5460
 agcgagagaa gccaggacga gatcaagatg gtgaaggagt accggcagaa gatcgacgcc 5520
 ctgaagaacg ccatcgagat cgagagggac ggcatgcagg aggaggccat ccaagaaatc 5580
 gccggcatga ccgccgacgt gctggaggcc gccagcgagg aggtgccctt gattggcgcc 5640
 ggaatggcca ccgccgtggc caccggcaga gccatcgagg gcgcctacaa gctgaagaag 5700
 gtgatcaacg ccctgagcgg catcgacctg agccacatga ggagcccaa gatcgagcct 5760
 accatcatcg ccaccaccct ggagcaccgg ttcaaggaga tccttgacga gcagctggcc 5820
 gtgtccgtgc tgaacaagaa aaccgccgtg accgacaact gcaacgagat cggccacatc 5880
 aagcaggaga tcctgcccaa gttcaagcag atcatggacg aggagaagga gatcgagggc 5940
 atcgaggaca aggtgatcca ccccggtg atgatgaggt tcaagatccc cagaacccag 6000
 cagcctcaga tccacatcta tgccgcccct tgggacagcg acgacgtgtt cttcttccac 6060
 tgctgtccc accaccacag gaacgagagc ttcttcttgg gcttcgacct gggcatcgac 6120
 gtggtgcaact tcgaggatct gaccagccac tggcacgccc tgggcctggc ccaggaggcc 6180
 tccggcagaa ccctgaccga ggcctacagg gagttcctga acctgagcat cagcagcacc 6240
 tacagcagcg ccatccacgc ccggagaatg atcagatcca gggccgtgca ccctatcttt 6300
 ctgggcagca cccactacga catcacctac gaggccctga aaaacaacgc ccagcggatc 6360
 gtgtacgatg aggagctgca gatgcacatc ctgagaggcc ctctgcactt ccagaggaga 6420
 gccatcctgg gcgccctgaa gttcggcatc aagatcctgg gcgacaagat cgacgtgccc 6480
 ctgttctga ggaacgcctg atgattttta tctcgagtct agaatcgatc ccgggttttt 6540
 atgactagtt aatcacggcc gcttataaag atctaaaatg cataatttct aaataatgaa 6600
 aaaaagtaca tcatgagcaa cgcgttagta tattttacaa tggagattaa cgctctatac 6660
 cgttctatgt ttattgattc agatgatgtt ttagaaaaga aagttattga atatgaaaac 6720

tttaatgaag atgaagatga cgacgatgat tattgttgta aatctgtttt agatgaagaa 6780
 gatgacgcgc taaagtatac tatggttaca aagtataagt ctatactact aatggcgact 6840
 tgtgcaagaa ggtatagtat agtgaaaatg ttgttagatt atgattatga aaaaccaa 6900
 aaatcagatc catatctaaa ggtatctcct ttgcacataa tttcatctat tcctagttaa 6960
 gaatacctgc agccaagctt ggcaactggc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac 7020
 cctggcggtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat 7080
 agcgaagagg ccgcacccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg 7140
 cgcctgatgc ggtatcttct ccttacgcat ctgtgcggtt tttcacaccg catatggtgc 7200
 actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca 7260
 cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg 7320
 accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt catcacgaa acgcgcgaga 7380
 cgaaagggcc tcgtgatacg cctatcttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct 7440
 tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatcttct 7500
 taaatacatt caaatatgta tcgcctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa 7560
 tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt 7620
 gcggcatttt gccttctgtt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct 7680
 gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc 7740
 cttgagagtt ttgcgccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta 7800
 tgtggcgcggt tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac 7860
 tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc 7920
 atgacagtaa gagaattatg cagtgtctgc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac 7980
 ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg 8040
 gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac 8100
 gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attactggc 8160
 gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 8220
 gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggg ttattgctga taaatctgga 8280
 gccggtgagc gtgggtctcg cggatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc 8340
 cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag 8400
 atcgtgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca 8460
 tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc 8520
 ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca 8580
 gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt ttttctgcg cgtaatctgc 8640

tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta 8700
ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt 8760
ctagtgtagc cgtagtttag ccaccacttc aagaactctg tagcacccgc tacatacctc 8820
gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg 8880
ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg 8940
tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag 9000
ctatgagaaa gcgccacgct tccgaaggg agaaaggcgc acaggtatcc ggtaagcggc 9060
agggtcggaa caggagagcg cagcaggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat 9120
agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctgctcaggg 9180
gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc 9240
tggccttttg ctcacatgtt ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt 9300
accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca 9360
gtgagcgagg aagcggaaga 9380

<210> 23

<211> 72

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

10 <220>

<221> CDS

<222> (49)..(72)

<400> 23

gcgctcgagt ttttattcaa aattgaaaat atataattac aatataaa atg ggc aag 57

Met Gly Lys

1

atc atc aag agc ctg

72

Ile Ile Lys Ser Leu

5

15

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 24

Met Gly Lys Ile Ile Lys Ser Leu

1

5

<210> 25

<211> 48

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de nucleótidos

10 <400> 25

<210> 26

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Péptido sintético

<400> 26

Ala Asn Arg Leu Phe Leu Pro Val Asp

1

5

<210> 27

25 <211> 4494

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2865)

35

<220>

<221> CDS

<222> (2917)..(4494)

40 <400> 27

ES 2 623 138 T3

atg gag gag ttc gtg atc ccc gtg tac agc gag gac gag atc ccc tac	48
Met Glu Glu Phe Val Ile Pro Val Tyr Ser Glu Asp Glu Ile Pro Tyr	
1 5 10 15	
gcc ctg ctg agc aga tac cct ctg gcc atc cag acc aac gtg aag atc	96
Ala Leu Leu Ser Arg Tyr Pro Leu Ala Ile Gln Thr Asn Val Lys Ile	
20 25 30	
gag gac gtg gag ggc aag cac aac gtg gtg aag atc ccc gag agc gac	144
Glu Asp Val Glu Gly Lys His Asn Val Val Lys Ile Pro Glu Ser Asp	
35 40 45	
atg atc gac atc ccc cgg ctg acc atc gtg gag gcc atg aac tac aag	192
Met Ile Asp Ile Pro Arg Leu Thr Ile Val Glu Ala Met Asn Tyr Lys	
50 55 60	

ES 2 623 138 T3

ccc gcc agg aac gac ggc atc gtg gtg cct aga ctg ctg gac atc acc Pro Ala Arg Asn Asp Gly Ile Val Val Pro Arg Leu Leu Asp Ile Thr 65 70 75 80	240
ctg aga gcc tac gac gac cgg aag agc acc aag agc gcc aga ggc atc Leu Arg Ala Tyr Asp Asp Arg Lys Ser Thr Lys Ser Ala Arg Gly Ile 85 90 95	288
gag ttc atg acc aac gcc cgg tgg atg aag tgg gcc atc gac gac agg Glu Phe Met Thr Asn Ala Arg Trp Met Lys Trp Ala Ile Asp Asp Arg 100 105 110	336
atg gac atc cag ccc ctg aag gtg acc ctg gac cac tac tgc agc gtg Met Asp Ile Gln Pro Leu Lys Val Thr Leu Asp His Tyr Cys Ser Val 115 120 125	384
aat cac cag ctg ttc aac tgc gtg gtg aag gcc aac gcc gcc aat gcc Asn His Gln Leu Phe Asn Cys Val Val Lys Ala Asn Ala Ala Asn Ala 130 135 140	432
gac acc atc tac tac gac tac ttc ccc ctg gag gac cac aag aag cgg Asp Thr Ile Tyr Tyr Asp Tyr Phe Pro Leu Glu Asp His Lys Lys Arg 145 150 155 160	480
tgc aac cac acc aac ctg gac ctg ctg agg agc ctg acc aac atg gag Cys Asn His Thr Asn Leu Asp Leu Leu Arg Ser Leu Thr Asn Met Glu 165 170 175	528
ctg ttc cac gcc ctg cag gga gcc gcc tac agc atc aag agc agc tac Leu Phe His Ala Leu Gln Gly Ala Ala Tyr Ser Ile Lys Ser Ser Tyr 180 185 190	576
gaa ctg gtg gcc aac agc gag aga gag agc ctg gag gag acc tac gcc Glu Leu Val Ala Asn Ser Glu Arg Glu Ser Leu Glu Thr Tyr Ala 195 200 205	624
atc ggc cag cct aag tgg atc cac ctg acc agg ggc acc aga atc ggc Ile Gly Gln Pro Lys Trp Ile His Leu Thr Arg Gly Thr Arg Ile Gly 210 215 220	672
aac agc ggc ctg cct tac gag aga ttc atc agc agc atg gtg cag gtg Asn Ser Gly Leu Pro Tyr Glu Arg Phe Ile Ser Ser Met Val Gln Val 225 230 235 240	720
atc gtg aac ggc aag atc cct agc gag atc gcc aac gag gtg gcc cag Ile Val Asn Gly Lys Ile Pro Ser Glu Ile Ala Asn Glu Val Ala Gln 245 250 255	768
ctg aac aga atc cgg gcc gag tgg atc gcc gcc acc tac gac aga ggc Leu Asn Arg Ile Cgg Ala Glu Trp Ile Ala Ala Thr Tyr Asp Arg Gly 260 265 270	816
agg atc aga gcc ctg gag ctg tgc aag atc ctg agc acc atc ggc cgg Arg Ile Arg Ala Leu Glu Leu Cys Lys Ile Leu Ser Thr Ile Gly Arg 275 280 285	864
aag atc ctg aat acc cac gag gag ccc aag gac gag atg gac ctg tcc Lys Ile Leu Asn Thr His Glu Glu Pro Lys Asp Glu Met Asp Leu Ser 290 295 300	912
acc cgg ttc cag ttc aag ctg gac gag aag ttc aac agg acc gac ccc Thr Arg Phe Gln Phe Lys Leu Asp Glu Lys Phe Asn Arg Thr Asp Pro 305 310 315 320	960

gag cac gtg aat atc ttc gga gtg agg gcc cct gcc acc gac gag ggc Glu His Val Asn Ile Phe Gly Val Arg Ala Pro Ala Thr Asp Glu Gly 325 330 335	1008
aga ttc tac gcc ctg atc gcc att gcc gcc acc gac acc cag aag ggc Arg Phe Tyr Ala Leu Ile Ala Ile Ala Ala Thr Asp Thr Gln Lys Gly 340 345 350	1056
aga gtg tgg agg acc aac ccc tac cct tgc ctg aga ggc gcc ctg gtg Arg Val Trp Arg Thr Asn Pro Tyr Pro Cys Leu Arg Gly Ala Leu Val 355 360 365	1104
gcc gcc gag tgc gag ctg ggc gac gtg tac agc acc ctg cgg agg gtg Ala Ala Glu Cys Glu Leu Gly Asp Val Tyr Ser Thr Leu Arg Arg Val 370 375 380	1152
tac aga tgg agc ctg aga cct gag tac ggc cag cac gag aga cag ctg Tyr Arg Trp Ser Leu Arg Pro Glu Tyr Gly Gln His Glu Arg Gln Leu 385 390 395 400	1200
gag aac aac aag tac gtg ttc aac cgg atc aac ctg ttc gac agc aat Glu Asn Asn Lys Tyr Val Phe Asn Arg Ile Asn Leu Phe Asp Ser Asn 405 410 415	1248
ctg gcc gtg ggc gac cag atc atc cac tgg cgc tac gag gtg aag gcc Leu Ala Val Gly Asp Gln Ile Ile His Trp Arg Tyr Glu Val Lys Ala 420 425 430	1296
tcc gcc gag acc acc tac gat agc ggc tac atg tgc agg cac gag gtg Ser Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Ser Gly Tyr Met Cys Arg His Glu Val 435 440 445	1344
gag gag gac gag ctg ctg tgt aag atc aac gag gac aag tac aag gac Glu Glu Asp Glu Leu Leu Cys Lys Ile Asn Glu Asp Lys Tyr Lys Asp 450 455 460	1392
atg ctg gac cgg atg atc cag ggc ggc tgg gat cag gag agg ttc aag Met Leu Asp Arg Met Ile Gln Gly Gly Trp Asp Gln Glu Arg Phe Lys 465 470 475 480	1440
ctg cac aac atc ctg acc gac ccc aac ctg ctg aca atc gac ttc gag Leu His Asn Ile Leu Thr Asp Pro Asn Leu Leu Thr Ile Asp Phe Glu 485 490 495	1488
aag gac gcc tac ctg aac agc aga agc gag ctg gtg ttc ccc gac tac Lys Asp Ala Tyr Leu Asn Ser Arg Ser Glu Leu Val Phe Pro Asp Tyr 500 505 510	1536
ttc gac aag tgg atc agc agc ccc atg ttc aac gcc cgg ctg aga atc Phe Asp Lys Trp Ile Ser Ser Pro Met Phe Asn Ala Arg Leu Arg Ile 515 520 525	1584
acc aag ggc gag atc ggc acc agc aag aag gac gac ccc tgg aac aac Thr Lys Gly Glu Ile Gly Thr Ser Lys Lys Asp Asp Pro Trp Asn Asn 530 535 540	1632
aga gcc gtg cgg ggc tac atc aag agc cct gcc gag tcc ctg gac ttc Arg Ala Val Arg Gly Tyr Ile Lys Ser Pro Ala Glu Ser Leu Asp Phe 545 550 555 560	1680
gtg ctg ggc ccc tac tac gat ctg cgg ctg ctg ttc ttc ggc gag gcc Val Leu Gly Pro Tyr Tyr Asp Leu Arg Leu Leu Phe Phe Gly Glu Ala	1728

ES 2 623 138 T3

				565				570				575							
ctg	agc	ctg	aag	cag	gag	cag	agc	gcc	gtg	ttc	cag	tac	ctg	agc	cag		1776		
Leu	Ser	Leu	Lys	Gln	Glu	Gln	Ser	Ala	Val	Phe	Gln	Tyr	Leu	Ser	Gln				
				580				585				590							
ctg	gac	gac	ttc	ccc	gcc	ctg	acc	cag	ctg	acc	ggc	gac	gcc	gtg	tgt		1824		
Leu	Asp	Asp	Phe	Pro	Ala	Leu	Thr	Gln	Leu	Thr	Gly	Asp	Ala	Val	Cys				
				595				600				605							
cct	cac	agc	ggc	gga	gcc	ctg	tac	acc	ttc	agg	aag	gtg	gcc	ctg	ttc		1872		
Pro	His	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Tyr	Thr	Phe	Arg	Lys	Val	Ala	Leu	Phe				
				610				615				620							
ctg	atc	ggc	aac	tac	gag	aag	ctg	agc	ccc	gac	ctg	cac	gag	ggc	atg		1920		
Leu	Ile	Gly	Asn	Tyr	Glu	Lys	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	His	Glu	Gly	Met				
				630				635				640							
gag	cac	cag	acc	tac	gtg	cac	ccc	agc	acc	ggc	ggc	acc	tac	cag	aaa		1968		
Glu	His	Gln	Thr	Tyr	Val	His	Pro	Ser	Thr	Gly	Gly	Thr	Tyr	Gln	Lys				
				645				650				655							
tgc	gtg	ctg	gag	atg	aag	gac	ccc	tgc	cag	ctg	atg	tgc	ttc	gtg	atc		2016		
Cys	Val	Leu	Glu	Met	Lys	Asp	Pro	Cys	Gln	Leu	Met	Cys	Phe	Val	Ile				
				660				665				670							
gac	tac	atc	ttc	gag	aag	cgg	gag	cag	ctg	aga	gac	acc	aag	gag	gcc		2064		
Asp	Tyr	Ile	Phe	Glu	Lys	Arg	Glu	Gln	Leu	Arg	Asp	Thr	Lys	Glu	Ala				
				675				680				685							
cgg	tac	atc	gtg	tac	ctg	atc	cag	agc	ctg	acc	ggc	atc	cag	aga	ctg		2112		
Arg	Tyr	Ile	Val	Tyr	Leu	Ile	Gln	Ser	Leu	Thr	Gly	Ile	Gln	Arg	Leu				
				690				695				700							
gac	gtg	ctg	aag	agc	acc	ttc	ccc	aac	ttc	ttc	cag	cgg	ctg	ctg	atg		2160		
Asp	Val	Leu	Lys	Ser	Thr	Phe	Pro	Asn	Phe	Phe	Gln	Arg	Leu	Leu	Met				
				710				715				720							
ctg	aag	gag	atc	aag	ttt	gtg	cgg	gac	ctg	aac	gtg	atc	aac	ttc	ctg		2208		
Leu	Lys	Glu	Ile	Lys	Phe	Val	Arg	Asp	Leu	Asn	Val	Ile	Asn	Phe	Leu				
				725				730				735							
ccc	ctg	atg	ttc	ctg	gtg	cac	gac	aac	atc	agc	tac	agc	cac	cgg	cag		2256		
Pro	Leu	Met	Phe	Leu	Val	His	Asp	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	His	Arg	Gln				
				740				745				750							
tgg	agc	atc	cct	atg	gtg	ctg	ttc	gac	gac	acc	atc	aag	ctg	atc	cct		2304		
Trp	Ser	Ile	Pro	Met	Val	Leu	Phe	Asp	Asp	Thr	Ile	Lys	Leu	Ile	Pro				
				755				760				765							
gtg	gaa	gtg	ggc	gcc	tac	gcc	aac	aga	ttc	ggc	ttc	aag	agc	ttc	atg		2352		
Val	Glu	Val	Gly	Ala	Tyr	Ala	Asn	Arg	Phe	Gly	Phe	Lys	Ser	Phe	Met				
				770				775				780							
aac	ttc	acc	agg	ttc	cac	cct	ggc	gag	agc	aag	aag	aag	cag	atc	gcc		2400		
Asn	Phe	Thr	Arg	Phe	His	Pro	Gly	Glu	Ser	Lys	Lys	Lys	Gln	Ile	Ala				
				785				790				795				800			
gag	gac	gtg	cac	aag	gag	ttc	ggc	gtg	gtg	gcc	ttc	gag	tac	tac	acc		2448		
Glu	Asp	Val	His	Lys	Glu	Phe	Gly	Val	Val	Ala	Phe	Glu	Tyr	Tyr	Thr				
				805				810				815							
aac	acc	aag	atc	agc	cag	ggc	agc	gtg	cac	acc	ccc	gtg	atg	acc	acc		2496		

Asn Thr Lys Ile Ser Gln Gly Ser Val His Thr Pro Val Met Thr Thr	
820 825 830	
aag atg gat gtg ctg aaa atc cac ctg agc agc ctg tgt gcc ggc ctg	2544
Lys Met Asp Val Leu Lys Ile His Leu Ser Ser Leu Cys Ala Gly Leu	
835 840 845	
gcc gac agc atc gtg tac acc ctg ccc gtg gcc cac ccc aag aag tgc	2592
Ala Asp Ser Ile Val Tyr Thr Leu Pro Val Ala His Pro Lys Lys Cys	
850 855 860	
atc gtg ctg atc att gtg ggc gac gac aag ctg gag cct cac acc aga	2640
Ile Val Leu Ile Ile Val Gly Asp Asp Lys Leu Glu Pro His Thr Arg	
865 870 875 880	
tcc gag cag atc gtg tcc cgg tac aac tac agc cgg aag cac atc tgc	2688
Ser Glu Gln Ile Val Ser Arg Tyr Asn Tyr Ser Arg Lys His Ile Cys	
885 890 895	
ggc gtg gtg tcc gtg aca gtg ggc cag aac agc cag ctg aga gtg tac	2736
Gly Val Val Ser Val Thr Val Gly Gln Asn Ser Gln Leu Arg Val Tyr	
900 905 910	
acc agc ggc atc gtg aag cac aga gtg tgc gac aag ttc atc ctg aag	2784
Thr Ser Gly Ile Val Lys His Arg Val Cys Asp Lys Phe Ile Leu Lys	
915 920 925	
cac aaa tgc aag gtg atc ctg gtg agg atg ccc ggc tac gtg ttc ggc	2832
His Lys Cys Lys Val Ile Leu Val Arg Met Pro Gly Tyr Val Phe Gly	
930 935 940	
aac gac gag ctg atg acc aag ctg ctg aat gtg tgatgactcg agtttttatt	2885
Asn Asp Glu Leu Met Thr Lys Leu Leu Asn Val	
945 950 955	
caaaattgaa aatatataat tacaatataa a atg ggc aag atc atc aag agc	2937
Met Gly Lys Ile Ile Lys Ser	
960	
ctg agc cgc ttc ggc aag aaa gtg ggc aat gcc ctg acc agc aac acc	2985
Leu Ser Arg Phe Gly Lys Lys Val Gly Asn Ala Leu Thr Ser Asn Thr	
965 970 975	
gcc aag aag atc tac agc acc atc ggc aag gcc gcc gag aga ttc gcc	3033
Ala Lys Lys Ile Tyr Ser Thr Ile Gly Lys Ala Ala Glu Arg Phe Ala	
980 985 990	
gag agc gag atc gga gcc gcc acc atc gac ggc ctg gtg cag ggc	3078
Glu Ser Glu Ile Gly Ala Ala Thr Ile Asp Gly Leu Val Gln Gly	
995 1000 1005	
agc gtg cac agc atc atc acc ggc gag agc tac ggc gag agc gtg	3123
Ser Val His Ser Ile Ile Thr Gly Glu Ser Tyr Gly Glu Ser Val	
1010 1015 1020	
aag cag gcc gtg ctg ctg aac gtg ctg ggc aca ggc gag gag ctg	3168
Lys Gln Ala Val Leu Leu Asn Val Leu Gly Thr Gly Glu Glu Leu	
1025 1030 1035	
ccc gac ccc ctg agc cct ggc gag aga ggc atc cag acc aag atc	3213
Pro Asp Pro Leu Ser Pro Gly Glu Arg Gly Ile Gln Thr Lys Ile	
1040 1045 1050	

aag Lys 1055	gag Glu	ctg Leu	gag Glu	gac Asp	gag Glu 1060	cag Gln	aga Arg	aac Asn	gag Glu	ctg Leu 1065	gtg Val	cgg Arg	ctg Leu	aag Lys	3258
tac Tyr 1070	aac Asn	aag Lys	gag Glu	atc Ile	acc Thr 1075	aag Lys	gag Glu	ttc Phe	ggc Gly	aag Lys 1080	gaa Glu	ctg Leu	gaa Glu	gag Glu	3303
gtg Val 1085	tac Tyr	gac Asp	ttc Phe	atg Met	aac Asn 1090	ggc Gly	gag Glu	gcc Ala	aag Lys	gag Glu 1095	gag Glu	gag Glu	gtg Val	gtg Val	3348
caa Gln 1100	gaa Glu	cag Gln	tac Tyr	agc Ser	atg Met 1105	ctg Leu	tgc Cys	aag Lys	gcc Ala	gtg Val 1110	gac Asp	agc Ser	tac Tyr	gag Glu	3393
aag Lys 1115	atc Ile	ctg Leu	aag Lys	gcc Ala	gag Glu 1120	gac Asp	tcc Ser	aag Lys	atg Met	gcc Ala 1125	atg Met	ctg Leu	gcc Ala	aga Arg	3438
gcc Ala 1130	ctg Leu	cag Gln	agg Arg	gag Glu	gcc Ala 1135	agc Ser	gag Glu	aga Arg	agc Ser	cag Gln 1140	gac Asp	gag Glu	atc Ile	aag Lys	3483
atg Met 1145	gtg Val	aag Lys	gag Glu	tac Tyr	cgg Arg 1150	cag Gln	aag Lys	atc Ile	gac Asp	gcc Ala 1155	ctg Leu	aag Lys	aac Asn	gcc Ala	3528
atc Ile 1160	gag Glu	atc Ile	gag Glu	agg Arg	gac Asp 1165	ggc Gly	atg Met	cag Gln	gag Glu	gag Glu 1170	gcc Ala	atc Ile	caa Gln	gaa Glu	3573
atc Ile 1175	gcc Ala	ggc Gly	atg Met	acc Thr	gcc Ala 1180	gac Asp	gtg Val	ctg Leu	gag Glu	gcc Ala 1185	gcc Ala	agc Ser	gag Glu	gag Glu	3618
gtg Val 1190	ccc Pro	ctg Leu	att Ile	ggc Gly	gcc Ala 1195	gga Gly	atg Met	gcc Ala	acc Thr	gcc Ala 1200	gtg Val	gcc Ala	acc Thr	ggc Gly	3663
aga Arg 1205	gcc Ala	atc Ile	gag Glu	ggc Gly	gcc Ala 1210	tac Tyr	aag Lys	ctg Leu	aag Lys	aag Lys 1215	gtg Val	atc Ile	aac Asn	gcc Ala	3708
ctg Leu 1220	agc Ser	ggc Gly	atc Ile	gac Asp	ctg Leu 1225	agc Ser	cac His	atg Met	agg Arg	agc Ser 1230	ccc Pro	aag Lys	atc Ile	gag Glu	3753
cct Pro 1235	acc Thr	atc Ile	atc Ile	gcc Ala	acc Thr 1240	acc Thr	ctg Leu	gag Glu	cac His	cgg Arg 1245	ttc Phe	aag Lys	gag Glu	atc Ile	3798
cct Pro 1250	gac Asp	gag Glu	cag Gln	ctg Leu	gcc Ala 1255	gtg Val	tcc Ser	gtg Val	ctg Leu	aac Asn 1260	aag Lys	aaa Lys	acc Thr	gcc Ala	3843
gtg Val 1265	acc Thr	gac Asp	aac Asn	tgc Cys	aac Asn 1270	gag Glu	atc Ile	gcc Ala	cac His	atc Ile 1275	aag Lys	cag Gln	gag Glu	atc Ile	3888
ctg Leu 1280	ccc Pro	aag Lys	ttc Phe	aag Lys	cag Gln 1285	atc Ile	atg Met	gac Asp	gag Glu	gag Glu 1290	aag Lys	gag Glu	atc Ile	gag Glu	3933

ES 2 623 138 T3

ggc atc gag gac aag gtg atc cac ccc cgg gtg atg atg agg ttc Gly Ile Glu Asp Lys Val Ile His Pro Arg Val Met Met Arg Phe 1295 1300 1305	3978
aag atc ccc aga acc cag cag cct cag atc cac atc tat gcc gcc Lys Ile Pro Arg Thr Gln Gln Pro Gln Ile His Ile Tyr Ala Ala 1310 1315 1320	4023
cct tgg gac agc gac gac gtg ttc ttc ttc cac tgc gtg tcc cac Pro Trp Asp Ser Asp Asp Val Phe Phe Phe His Cys Val Ser His 1325 1330 1335	4068
cac cac agg aac gag agc ttc ttc ctg ggc ttc gac ctg ggc atc His His Arg Asn Glu Ser Phe Phe Leu Gly Phe Asp Leu Gly Ile 1340 1345 1350	4113
gac gtg gtg cac ttc gag gat ctg acc agc cac tgg cac gcc ctg Asp Val Val His Phe Glu Asp Leu Thr Ser His Trp His Ala Leu 1355 1360 1365	4158
ggc ctg gcc cag gag gcc tcc ggc aga acc ctg acc gag gcc tac Gly Leu Ala Gln Glu Ala Ser Gly Arg Thr Leu Thr Glu Ala Tyr 1370 1375 1380	4203
agg gag ttc ctg aac ctg agc atc agc agc acc tac agc agc gcc Arg Glu Phe Leu Asn Leu Ser Ile Ser Ser Thr Tyr Ser Ser Ala 1385 1390 1395	4248
atc cac gcc cgg aga atg atc aga tcc agg gcc gtg cac cct atc Ile His Ala Arg Arg Met Ile Arg Ser Arg Ala Val His Pro Ile 1400 1405 1410	4293
ttt ctg ggc agc acc cac tac gac atc acc tac gag gcc ctg aaa Phe Leu Gly Ser Thr His Tyr Asp Ile Thr Tyr Glu Ala Leu Lys 1415 1420 1425	4338
aac aac gcc cag cgg atc gtg tac gat gag gag ctg cag atg cac Asn Asn Ala Gln Arg Ile Val Tyr Asp Glu Glu Leu Gln Met His 1430 1435 1440	4383
atc ctg aga ggc cct ctg cac ttc cag agg aga gcc atc ctg ggc Ile Leu Arg Gly Pro Leu His Phe Gln Arg Arg Ala Ile Leu Gly 1445 1450 1455	4428
gcc ctg aag ttc ggc atc aag atc ctg ggc gac aag atc gac gtg Ala Leu Lys Phe Gly Ile Lys Ile Leu Gly Asp Lys Ile Asp Val 1460 1465 1470	4473
ccc ctg ttc ctg agg aac gcc Pro Leu Phe Leu Arg Asn Ala 1475 1480	4494

<210> 28

<211> 955

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10 <400> 28

ES 2 623 138 T3

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

ES 2 623 138 T3

Leu Asn Arg Ile Arg Ala Glu Trp Ile Ala Ala Thr Tyr Asp Arg Gly
 260 265 270
 Arg Ile Arg Ala Leu Glu Leu Cys Lys Ile Leu Ser Thr Ile Gly Arg
 275 280 285
 Lys Ile Leu Asn Thr His Glu Glu Pro Lys Asp Glu Met Asp Leu Ser
 290 295 300
 Thr Arg Phe Gln Phe Lys Leu Asp Glu Lys Phe Asn Arg Thr Asp Pro
 305 310 315 320
 Glu His Val Asn Ile Phe Gly Val Arg Ala Pro Ala Thr Asp Glu Gly
 325 330 335
 Arg Phe Tyr Ala Leu Ile Ala Ile Ala Ala Thr Asp Thr Gln Lys Gly
 340 345 350
 Arg Val Trp Arg Thr Asn Pro Tyr Pro Cys Leu Arg Gly Ala Leu Val
 355 360 365
 Ala Ala Glu Cys Glu Leu Gly Asp Val Tyr Ser Thr Leu Arg Arg Val
 370 375 380
 Tyr Arg Trp Ser Leu Arg Pro Glu Tyr Gly Gln His Glu Arg Gln Leu
 385 390 395 400
 Glu Asn Asn Lys Tyr Val Phe Asn Arg Ile Asn Leu Phe Asp Ser Asn
 405 410 415
 Leu Ala Val Gly Asp Gln Ile Ile His Trp Arg Tyr Glu Val Lys Ala
 420 425 430
 Ser Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Ser Gly Tyr Met Cys Arg His Glu Val
 435 440 445
 Glu Glu Asp Glu Leu Leu Cys Lys Ile Asn Glu Asp Lys Tyr Lys Asp
 450 455 460
 Met Leu Asp Arg Met Ile Gln Gly Gly Trp Asp Gln Glu Arg Phe Lys
 465 470 475 480
 Leu His Asn Ile Leu Thr Asp Pro Asn Leu Leu Thr Ile Asp Phe Glu
 485 490 495
 Lys Asp Ala Tyr Leu Asn Ser Arg Ser Glu Leu Val Phe Pro Asp Tyr

ES 2 623 138 T3

				500						505						510			
Phe	Asp	Lys	Trp	Ile	Ser	Ser	Pro	Met	Phe	Asn	Ala	Arg	Leu	Arg	Ile				
		515						520					525						
Thr	Lys	Gly	Glu	Ile	Gly	Thr	Ser	Lys	Lys	Asp	Asp	Pro	Trp	Asn	Asn				
	530					535					540								
Arg	Ala	Val	Arg	Gly	Tyr	Ile	Lys	Ser	Pro	Ala	Glu	Ser	Leu	Asp	Phe				
545					550					555					560				
Val	Leu	Gly	Pro	Tyr	Tyr	Asp	Leu	Arg	Leu	Leu	Phe	Phe	Gly	Glu	Ala				
				565					570					575					
Leu	Ser	Leu	Lys	Gln	Glu	Gln	Ser	Ala	Val	Phe	Gln	Tyr	Leu	Ser	Gln				
			580					585					590						
Leu	Asp	Asp	Phe	Pro	Ala	Leu	Thr	Gln	Leu	Thr	Gly	Asp	Ala	Val	Cys				
		595					600					605							
Pro	His	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu	Tyr	Thr	Phe	Arg	Lys	Val	Ala	Leu	Phe				
	610					615					620								
Leu	Ile	Gly	Asn	Tyr	Glu	Lys	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	His	Glu	Gly	Met				
625					630					635					640				
Glu	His	Gln	Thr	Tyr	Val	His	Pro	Ser	Thr	Gly	Gly	Thr	Tyr	Gln	Lys				
				645					650					655					
Cys	Val	Leu	Glu	Met	Lys	Asp	Pro	Cys	Gln	Leu	Met	Cys	Phe	Val	Ile				
			660					665					670						
Asp	Tyr	Ile	Phe	Glu	Lys	Arg	Glu	Gln	Leu	Arg	Asp	Thr	Lys	Glu	Ala				
		675					680					685							
Arg	Tyr	Ile	Val	Tyr	Leu	Ile	Gln	Ser	Leu	Thr	Gly	Ile	Gln	Arg	Leu				
	690					695					700								
Asp	Val	Leu	Lys	Ser	Thr	Phe	Pro	Asn	Phe	Phe	Gln	Arg	Leu	Leu	Met				
705					710					715					720				
Leu	Lys	Glu	Ile	Lys	Phe	Val	Arg	Asp	Leu	Asn	Val	Ile	Asn	Phe	Leu				
				725					730					735					
Pro	Leu	Met	Phe	Leu	Val	His	Asp	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	His	Arg	Gln				
			740					745					750						

Trp Ser Ile Pro Met Val Leu Phe Asp Asp Thr Ile Lys Leu Ile Pro
755 760 765

Val Glu Val Gly Ala Tyr Ala Asn Arg Phe Gly Phe Lys Ser Phe Met
770 775 780

Asn Phe Thr Arg Phe His Pro Gly Glu Ser Lys Lys Lys Gln Ile Ala
785 790 795 800

Glu Asp Val His Lys Glu Phe Gly Val Val Ala Phe Glu Tyr Tyr Thr
805 810 815

Asn Thr Lys Ile Ser Gln Gly Ser Val His Thr Pro Val Met Thr Thr
820 825 830

Lys Met Asp Val Leu Lys Ile His Leu Ser Ser Leu Cys Ala Gly Leu
835 840 845

Ala Asp Ser Ile Val Tyr Thr Leu Pro Val Ala His Pro Lys Lys Cys
850 855 860

Ile Val Leu Ile Ile Val Gly Asp Asp Lys Leu Glu Pro His Thr Arg
865 870 875 880

Ser Glu Gln Ile Val Ser Arg Tyr Asn Tyr Ser Arg Lys His Ile Cys
885 890 895

Gly Val Val Ser Val Thr Val Gly Gln Asn Ser Gln Leu Arg Val Tyr
900 905 910

Thr Ser Gly Ile Val Lys His Arg Val Cys Asp Lys Phe Ile Leu Lys
915 920 925

His Lys Cys Lys Val Ile Leu Val Arg Met Pro Gly Tyr Val Phe Gly
930 935 940

Asn Asp Glu Leu Met Thr Lys Leu Leu Asn Val
945 950 955

<210> 29

<211> 526

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10 <400> 29

Met Gly Lys Ile Ile Lys Ser Leu Ser Arg Phe Gly Lys Lys Val Gly

ES 2 623 138 T3

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

ES 2 623 138 T3

Lys Leu Lys Lys Val Ile Asn Ala Leu Ser Gly Ile Asp Leu Ser His
 260 265 270
 Met Arg Ser Pro Lys Ile Glu Pro Thr Ile Ile Ala Thr Thr Leu Glu
 275 280 285
 His Arg Phe Lys Glu Ile Pro Asp Glu Gln Leu Ala Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Asn Lys Lys Thr Ala Val Thr Asp Asn Cys Asn Glu Ile Ala His Ile
 305 310 315 320
 Lys Gln Glu Ile Leu Pro Lys Phe Lys Gln Ile Met Asp Glu Glu Lys
 325 330 335
 Glu Ile Glu Gly Ile Glu Asp Lys Val Ile His Pro Arg Val Met Met
 340 345 350
 Arg Phe Lys Ile Pro Arg Thr Gln Gln Pro Gln Ile His Ile Tyr Ala
 355 360 365
 Ala Pro Trp Asp Ser Asp Asp Val Phe Phe Phe His Cys Val Ser His
 370 375 380
 His His Arg Asn Glu Ser Phe Phe Leu Gly Phe Asp Leu Gly Ile Asp
 385 390 395 400
 Val Val His Phe Glu Asp Leu Thr Ser His Trp His Ala Leu Gly Leu
 405 410 415
 Ala Gln Glu Ala Ser Gly Arg Thr Leu Thr Glu Ala Tyr Arg Glu Phe
 420 425 430
 Leu Asn Leu Ser Ile Ser Ser Thr Tyr Ser Ser Ala Ile His Ala Arg
 435 440 445
 Arg Met Ile Arg Ser Arg Ala Val His Pro Ile Phe Leu Gly Ser Thr
 450 455 460
 His Tyr Asp Ile Thr Tyr Glu Ala Leu Lys Asn Asn Ala Gln Arg Ile
 465 470 475 480
 Val Tyr Asp Glu Glu Leu Gln Met His Ile Leu Arg Gly Pro Leu His
 485 490 495
 Phe Gln Arg Arg Ala Ile Leu Gly Ala Leu Lys Phe Gly Ile Lys Ile
 500 505 510

ES 2 623 138 T3

Leu Gly Asp Lys Ile Asp Val Pro Leu Phe Leu Arg Asn Ala
515 520 525

<210> 30

<211> 38

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de ADN

10 <400> 30

agacagtggc caattccaat ggtactgttt gacgatac

38

REIVINDICACIONES

1. Composición inmunógena para inducir una respuesta inmunitaria contra el virus *Orbivirus* (OV) en un animal susceptible a la enfermedad Orbiviral que comprende un vector que comprende un virus recombinante; en la que el virus recombinante es un avipoxvirus recombinante; en la que además el virus recombinante codifica y expresa *in vivo* en el animal, polipéptidos de la cápside externa del *Orbivirus*; en la que los polipéptidos de la cápside externa de del *Orbivirus* son VP2 y VP5; en la que el *Orbivirus* es el virus de la lengua azul (BTV);
 en la que el virus recombinante comprende una molécula de ácido nucleico que codifica VP2 de BTV que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 20 y una molécula de ácido nucleico que codifica VP5 de BTV que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 21, en la que la molécula de ácido nucleico que codifica VP2 de BTV que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 20 está operativamente unida a un promotor específico de poxvirus, y la molécula de ácido nucleico que codifica VP5 de BTV que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 21 está operativamente unida a un promotor específico de poxvirus; o
 en la que el virus recombinante comprende una molécula de ácido nucleico que codifica VP2 de BTV que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 y una molécula de ácido nucleico que codifica VP5 de BTV que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 que codifica VP2 de BTV está operativamente unida a un promotor específico de poxvirus, y la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 que codifica VP5 de BTV está operativamente unida a un promotor específico de poxvirus.
2. Composición inmunógena según la reivindicación 1, en la que la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 que codifica la VP2 de BTV está operativamente unida al promotor H6, y la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 que codifica la VP5 de BTV está operativamente unida al promotor 42K, en la que el promotor H6 tiene la secuencia expuesta en los nucleótidos 1881 a 2004 de la figura 11B y en la que el promotor 42K tiene la secuencia expuesta en los nucleótidos 4889 a 4920 de la figura 11B.
3. Composición inmunógena según la reivindicación 1 o 2, en la que el avipoxvirus recombinante es un virus de la viruela del canario.
4. Composición inmunógena según la reivindicación 3, en la que el virus de la viruela del canario es ALVAC.
5. Composición inmunógena según cualquier reivindicación anterior, que además comprende un adyuvante.
6. Composición inmunógena según la reivindicación 5, en la que el adyuvante es un polímero de ácido acrílico o metacrílico, anhídrido maleico o un polímero derivado de alquienilo.
7. Composición inmunógena de cualquier reivindicación anterior, que además comprende un antígeno o inmunógeno o epítipo del mismo de un patógeno distinto de BTV del animal, o un vector que contiene y expresa *in vivo* en el animal una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno o inmunógeno o epítipo del mismo, o un patógeno inactivado o atenuado distinto del BTV del animal.
8. Composición inmunógena de cualquier reivindicación anterior, en la que el animal es un ovino, bovino, felino o equino.
9. Uso de una composición inmunógena de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunológica o inmunoprotectora contra el BTV en un animal.
10. Uso de una composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunológica contra el BTV y contra otro patógeno en un animal.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 9 o reivindicación 10, en el que la composición
 - (a) se formula para administrar antes de (b) en un régimen de sensibilización-refuerzo, o (b) se formula para administrar antes de (a) en un régimen

de sensibilización-refuerzo, o (a) y (b) se formulan para administrar juntos, sea de forma secuencial o mezclados; en la que (a) es la composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y (b) un antígeno, inmunógeno o epítipo del mismo aislado de BTV.

- 5 12. Uso de una composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la fabricación de un diagnóstico diferencial, en el que el diagnóstico se formula para administrar a un animal y se ensaya en el animal la presencia o ausencia de una proteína de BTV o anticuerpo contra la misma, no expresada por la composición inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 10 13. Composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para usar en una respuesta inmunológica o inmunoprotectora contra el BTV en un animal.
14. Composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 8 o 7, para usar para inducir una respuesta inmunológica o inmunoprotectora contra el BTV y contra otro patógeno en un animal.
- 15 15. Composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en la que la composición (a) se formula para administrar antes de (b) en un régimen de sensibilización-refuerzo, o (b) se formula para la administración antes de (a) en un régimen de sensibilización-refuerzo, o (a) y (b) se formulan para administrar juntos, de forma secuencial o mezclada; en la que (a) es la composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las 20 reivindicaciones 1 a 8, y (b) un antígeno, inmunógeno o epítipo del mismo aislado de BTV.
16. Composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para usar en un diagnóstico diferencial, en el que el diagnóstico se formula para administrar a un animal y se ensaya en el animal la presencia o ausencia de una proteína de BTV o anticuerpo contra la misma, no expresada por la composición 25 inmunógena de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
17. Kit que comprende la composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un ensayo para ensayar la presencia o ausencia de la proteína BTV, en recipientes separados, opcionalmente con instrucciones para la administración de la composición inmunógena y/o para realizar el ensayo.
- 30 18. Kit que comprende (a) la composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y (b) el antígeno o inmunógeno o epítipo del mismo de un patógeno distinto de BTV del animal, o el vector que contiene y expresa *in vivo* en el animal una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno, inmunógeno o epítipo del mismo, o el patógeno inactivado o atenuado distinto del BTV del animal, en el 35 que (a) y (b) están en recipientes separados, y el kit contiene opcionalmente instrucciones para la mezcla y/o administración de (a) y (b).
19. Uso de una composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-10 o 12; una composición inmunógena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-14 o 16; o el kit según la 40 reivindicación 18, en el que el animal es un ovino, bovino, felino o equino.

1 50
 VP2 de HIV17 natural (1) ATGGAGGAGTTCGTTCATTCCAGTCTATTTCAGAAGATGAAATTCATACGC
 VP2 de HIV17 sintético (1) ATGGAGGAGTTCGTGATCCCCGTGTACAGCGAGGACGAGATCCCCCTACGC
 SEQ ID NO: 1

51 100
 VP2 de HIV17 natural (51) TTTACTGAGCAGATACCCTTTGGCGATACAGACAAATGTTAAATAGAGG
 VP2 de HIV17 sintético (51) CCTGCTGAGCAGATACCCTCTGGCCATCCAGACCAACGTGAAGATCGAGG
 101 150
 VP2 de HIV17 natural (101) ATGTTGAAGGAAAACATAATGTTGTAAAAATTCCTGAATCCGATATGATA
 VP2 de HIV17 sintético (101) ACGTGGAGGGCAAGCACAACTGGTGAAGATCCCCGAGAGCGACATGATC
 151 200
 VP2 de HIV17 natural (151) GATATACCAAGATTAACAATTGTAGAGGCGATGAATTATAAACCAGCGAG
 VP2 de HIV17 sintético (151) GACATCCCCCGGTGACCATCGTGGAGGCCATGAATACAGCCCGCCAG
 201 250
 VP2 de HIV17 natural (201) AAACGATGGAATCGTTGTACCTAGATTACTTGATATAACATTACGTGCTT
 VP2 de HIV17 sintético (201) GAACGACGGCATCGTGGTGCCTAGACTGCTGGACATCACCCTGAGAGCCT
 251 300
 VP2 de HIV17 natural (251) ATGATGATAGGAAATCGACAAAAAGTGCTCGAGGGATAGAGTTCATGACG
 VP2 de HIV17 sintético (251) ACGACGACCGGAAGAGCACCAAGAGCGCCAGAGGCATCGAGTTCATGACC
 301 350
 VP2 de HIV17 natural (301) AACGCTAGATGGATGAAATGGGCCATAGATGATAGAATGGATATCCAACC
 VP2 de HIV17 sintético (301) AACGCCCCGTGGATGAAGTGGGCCATCGACGACAGGATGGACATCCAGCC
 351 400
 VP2 de HIV17 natural (351) GCTTAAAGTCACTTTGGATCATTACTGTTCCGTCAACCATCAGCTCTTTA
 VP2 de HIV17 sintético (351) CCTGAAGGTGACCCCTGGACCACTACTGCAGCGTGAATCACCAGCTGTTCA
 401 450
 VP2 de HIV17 natural (401) ACTGCGTCGTCAAAGCGAATGCTGCCAACGCTGATACGATCTATTATGAT
 VP2 de HIV17 sintético (401) ACTGCGTGGTGAAGGCCAACGCCCAATGCCGACACCATCTACTACGAC
 451 500
 VP2 de HIV17 natural (451) TATTTCCCACTTGAAGACCATAAAAAAGATGTAACCACACAAATCTTGA
 VP2 de HIV17 sintético (451) TACTTCCCCCTGGAGGACCACAAGAAGCGGTGCAACCACACCAACCTGGA
 501 550
 VP2 de HIV17 natural (501) TTTATTGAGAAGTTTGACCAATATGGAGTTGTTCCACGCGTTGCAAGGTG
 VP2 de HIV17 sintético (501) CTGCTGAGGAGCCTGACCAACATGGAGCTGTTCCACGCCCTGCAGGGAG
 551 600
 VP2 de HIV17 natural (551) CTGCATACAGTATCAAATCGAGCTACGAATTAGTGGCAAACCTCCGAAAGA
 VP2 de HIV17 sintético (551) CCGCTACAGCATCAAGAGCAGCTACGAATGGTGGCCAAACAGCGAGAGA
 601 650
 VP2 de HIV17 natural (601) GAAAGCTTGGAGGAGACTTATGCGATAGGACAGCCAAAGTGGATACATTT
 VP2 de HIV17 sintético (601) GAGAGCCTGGAGGAGACCTACGCCATCGGCCAGCCTAAGTGGATCCACCT
 651 700
 VP2 de HIV17 natural (651) GACTAGAGGAACGCGAATAGGCAATAGTGGATTACCTTATGAACGGTTTA
 VP2 de HIV17 sintético (651) GACCAGGGGCACCAGAATCGGCAACAGCGGCCCTGCCTTACGAGAGATTCA
 701 750
 VP2 de HIV17 natural (701) TCTCAAGCATGGTCCAGGTGATCGTAAATGGCAAGATTCCAAGCGAGATA
 VP2 de HIV17 sintético (701) TCAGCAGCATGGTGCAGGTGATCGTGAACGGCAAGATCCCTAGCGAGATC
 751 800
 VP2 de HIV17 natural (751) GCGAACGAGGTGCGGCAACTGAATAGAATAAGGGCAGAGTGGATAGCGGC
 VP2 de HIV17 sintético (751) GCCAACGAGGTGGCCAGCTGAACAGAATCCGGGCCGAGTGGATCGCCGC
 801 850
 VP2 de HIV17 natural (801) TACATACGATAGAGGCAGGATTAGAGCGCTAGAGCTATGCAAGATCCTTT
 VP2 de HIV17 sintético (801) CACCTACGACAGAGGCAGGATCAGAGCCCTGGAGCTGTGCAAGATCCTGA
 851 900
 VP2 de HIV17 natural (851) CCACGATTGGGCGTAAGATACTGAACACGCATGAAGAGCCGAAAGATGAA
 VP2 de HIV17 sintético (851) GCACCATCGGCCGGAAGATCCTGAATACCCACGAGGAGCCCAAGGACGAG
 901 950
 VP2 de HIV17 natural (901) ATGGATCTATCAACAAGATTTTCAGTTCAAACCTTGACGAAAAATTTAACAG
 VP2 de HIV17 sintético (901) ATGGACCTGTCCACCCGTTTCAGTTCAAAGCTGGACGAGAAGTTCAACAG
 951 1000
 VP2 de HIV17 natural (951) AACAGATCCAGAACATGTTAATATTTTGGTGTAAGAGCCCCAGCGACAG
 VP2 de HIV17 sintético (951) GACCGACCCCGAGCAGTGAATATCTTCGGAGTGAGGGCCCTGCCACCG

	1001	1050
VP2 de HIV17 natural	(1001) ATGAAGGAAGATTTTACGCTCTGATTGCAATCGCAGCGACGGATACACAA	
VP2 de HIV17 sintético	(1001) ACGAGGGCAGATTCTACGCCCTGATCGCCATTGCCGCCACCGACACCCAG	
	1051	1100
VP2 de HIV17 natural	(1051) AAGGGTAGAGTGTGGAGAACAATCCGTATCCATGCTTGCGAGGTGCTTT	
VP2 de HIV17 sintético	(1051) AAGGGCAGAGTGTGGAGGACCAACCCCTACCCCTTGCCTGAGAGGCGCCCT	
	1101	1150
VP2 de HIV17 natural	(1101) AGTTGCAGCTGAGTGTGAATTAGGTGACGTTTACAGTACGCTCCGACGTG	
VP2 de HIV17 sintético	(1101) GGTGGCCGCCGAGTGCAGAGCTGGGCGACGTGTACAGCACCCCTGCGGAGGG	
	1151	1200
VP2 de HIV17 natural	(1151) TGTATAGATGGAGTCTAAGGCCGGAGTATGGACAGCAGAGCGACAATTA	
VP2 de HIV17 sintético	(1151) TGTACAGATGGAGCCTGAGACCTGAGTACGGCCAGCACGAGAGACAGCTG	
	1201	1250
VP2 de HIV17 natural	(1201) GAGAACAATAAATACGTCTTTAATCGTATAAATTTATTCGATTCAAACTT	
VP2 de HIV17 sintético	(1201) GAGAACAACAAGTACGTGTTCAACCGGATCAACCTGTTTCGACAGCAATCT	
	1251	1300
VP2 de HIV17 natural	(1251) AGCGGTTCGGCGATCAGATAATTCATTGGCGTTATGAGGTTAAAGCATCGG	
VP2 de HIV17 sintético	(1251) GGCCGTGGGCGACAGATCATCCACTGGCGCTACGAGGTGAAGGCCCTCG	
	1301	1350
VP2 de HIV17 natural	(1301) CGGAGACGACTTATGACAGTGGATACATGTGTGCGCATGAGGTTGAGGAG	
VP2 de HIV17 sintético	(1301) CCGAGACCACCTACGATAGCGGCTACATGTGCAGGCACGAGGTGGAGGAG	
	1351	1400
VP2 de HIV17 natural	(1351) GATGAACATATTATGTAAAATCAATGAGGACAAATATAAAGACATGCTGGA	
VP2 de HIV17 sintético	(1351) GACGAGCTGCTGTGTAAGATCAACGAGGACAAGTACAAGGACATGCTGGA	
	1401	1450
VP2 de HIV17 natural	(1401) CAGAATGATTACAGGGTGGGTGGGATCAGGAAAGATTTAAACTTCATAACA	
VP2 de HIV17 sintético	(1401) CCGGATGATCCAGGGCGGCTGGGATCAGGAGAGGTTCAAGTGCACAACA	
	1451	1500
VP2 de HIV17 natural	(1451) TACTGACGGACCCTAACTTATTGACGATTGACTTTGAAAAAGATGCGTAT	
VP2 de HIV17 sintético	(1451) TCCTGACCGACCCCAACCTGCTGACAATCGACTTCGAGAAGGACGCCCTAC	
	1501	1550
VP2 de HIV17 natural	(1501) CTGAACTCACGGTCCGAGTTAGTTTTTCCGGATTATTTTCGACAAATGGAT	
VP2 de HIV17 sintético	(1501) CTGAACAGCAGAAGCGAGCTGGTGTCCCCGACTACTTCGACAAGTGGAT	
	1551	1600
VP2 de HIV17 natural	(1551) CAGTTCACCAATGTTTAAACGCGCGCTTAAGAATTACTAAAGGGGAGATCG	
VP2 de HIV17 sintético	(1551) CAGCAGCCCCATGTTCAACGCCCGGCTGAGAATCACCAAGGGCGAGATCG	
	1601	1650
VP2 de HIV17 natural	(1601) GAACATCGAAAAAGGATGATCCATGGAACAACCGCGCAGTACGTGGATAC	
VP2 de HIV17 sintético	(1601) GCACCAGCAAGAAGGACGACCCCTGGAACAACAGAGCCGTGCGGGGTAC	
	1651	1700
VP2 de HIV17 natural	(1651) ATCAAGTCCCTGCGGAGTCGTTGGATTTTGTCTCGGGCCTTACTACGA	
VP2 de HIV17 sintético	(1651) ATCAAGAGCCCTGCCGAGTCCCTGGACTTCGTGCTGGGCCCTTACTACGA	
	1701	1750
VP2 de HIV17 natural	(1701) TCTGCGGCTACTATTTTTTGGCGAGGCGTTGAGCTTAAACAGGAACAAT	
VP2 de HIV17 sintético	(1701) TCTGCGGCTGCTGTTCTTCGGCGAGGCCCTGAGCCTGAAGCAGGAGCAGA	
	1751	1800
VP2 de HIV17 natural	(1751) CCGCGGTTTTTCAATATTTGAGTCAGCTCGATGATTTTCCCGCGCTTACC	
VP2 de HIV17 sintético	(1751) GCGCCGTGTTCCAGTACCTGAGCCAGCTGGACGACTTCCCGGCCCTGACC	
	1801	1850
VP2 de HIV17 natural	(1801) CAGCTAACAGGAGATGCCGTATGCCACATTACGGCGAGCGCTATATAC	
VP2 de HIV17 sintético	(1801) CAGCTGACCGGCGACGCGGTGTGTCTCACAGCGGCGGAGCCCTGTACAC	
	1851	1900
VP2 de HIV17 natural	(1851) GTTTAGGAAAGTCGCGCTATTTTTAATCGGGAATTATGAAAAGTTAAGTC	
VP2 de HIV17 sintético	(1851) CTTAGGAAGGTGGCCCTGTTCTTGATCGGCAACTACGAGAAGCTGAGCC	
	1901	1950
VP2 de HIV17 natural	(1901) CGGATCTACATGAAGGTATGGAACATCAAACATATGTGCATCCGTGACT	
VP2 de HIV17 sintético	(1901) CCGACCTGCACGAGGGCATGGAGCACCAGACCTACGTGCACCCAGCACC	
	1951	2000
VP2 de HIV17 natural	(1951) GGTGGGACGTATCAGAAATGCGTGCTAGAGATGAAGGACCCTTGTCAACT	
VP2 de HIV17 sintético	(1951) GGCGGCACCTACCAGAAATGCGTGCTGGAGATGAAGGACCCTGCCAGCT	
	2001	2050
VP2 de HIV17 natural	(2001) AATGTGCTTTGTGATTGATTACATCTTTGAAAAACGTGAGCAGCTACGTG	
VP2 de HIV17 sintético	(2001) GATGTGCTTCGTGATCGACTACATCTTCGAGAAGCGGGAGCAGCTGAGAG	

	2051	2100
VP2 de HIV17 natural	(2051) ATACCAAAGAGGCGAGGTACATCGTGTATCTAATTCAAAGTCTCACTGGG	
VP2 de HIV17 sintético (2051)	ACACCAAGGAGGCCCGGTACATCGTGTACCTGATCCAGAGCCTGACCCGC	
	2101	2150
VP2 de HIV17 natural	(2101) ATACAACGGCTGGATGTTCTGAAATCGACGTTCCCGAATTTTTTCCAACG	
VP2 de HIV17 sintético (2101)	ATCCAGAGACTGGACGTGCTGAAGAGCACCTTCCCCAATTCTTCCAGCG	
	2151	2200
VP2 de HIV17 natural	(2151) ATTATTAATGCTGAAAGAGATCAAATTTGTGCGTGATTTAAATGTGATCA	
VP2 de HIV17 sintético (2151)	GCTGCTGATGCTGAAGGAGATCAAGTTTGTGCGGACCTGAACGTGATCA	
	2201	2250
VP2 de HIV17 natural	(2201) ACTTCCTCCCTCTGATGTTCTTGTTCATGATAACATCTCGTATTCGCAT	
VP2 de HIV17 sintético (2201)	ACTTCCTGCCCTGATGTTCTTGGTGACGACAACATCAGCTACAGCCAC	
	2251	2300
VP2 de HIV17 natural	(2251) AGACAGTGGTCAATTCCAATGGTACTGTTTGACGATACGATTAAGTTAAT	
VP2 de HIV17 sintético (2251)	CGGCAGTGGAGCATCCCTATGGTGCTGTTGACGACACCATCAAGCTGAT	
	2301	2350
VP2 de HIV17 natural	(2301) ACCCGTAGAGGTTGGCGCGTATGCAAATAGATTTGGATTCAAAAGTTTTTA	
VP2 de HIV17 sintético (2301)	CCCTGTGGAAGTGGGCGCCTACGCCAACAGATTCGGCTTCAAGAGCTTCA	
	2351	2400
VP2 de HIV17 natural	(2351) TGAACCTTACACGGTTTACCCTGGTGAGTCAAAGAAAAACAGATTGCC	
VP2 de HIV17 sintético (2351)	TGAACCTTACCAGGTTCCACCCTGGCGAGAGCAAGAAGAGCAGATCGCC	
	2401	2450
VP2 de HIV17 natural	(2401) GAGGATGTGCATAAGGAGTTTGGAGTGGTCGCTTTTGAATATTACACCAA	
VP2 de HIV17 sintético (2401)	GAGGACGTGCACAAGGAGTTCCGGCGTGGTGGCCTTCGAGTACTACACCAA	
	2451	2500
VP2 de HIV17 natural	(2451) TACAAAAATTTCCAGGGGAGTGTCATACACCAGTAATGACTACGAAAA	
VP2 de HIV17 sintético (2451)	CACCAAGATCAGCCAGGGCAGCGTGACACCCCGTGATGACCACCAAGA	
	2501	2550
VP2 de HIV17 natural	(2501) TGGATGTATTGAAGATACATTTGTCTTCTTTATGTGCAGGTCTGGCGGAT	
VP2 de HIV17 sintético (2501)	TGGATGTGCTGAAAAATCCACCTGAGCAGCCTGTGTGCCGGCCTGGCCGAC	
	2551	2600
VP2 de HIV17 natural	(2551) TCTATCGTATATACATTACCGGTTGCGCATCCTAAGAAATGCATCGTTCT	
VP2 de HIV17 sintético (2551)	AGCATCGTGTACACCCTGCCCCTGGCCACCCCAAGAAGTGCATCGTGCT	
	2601	2650
VP2 de HIV17 natural	(2601) AATAATTGTGGGAGATGACAAATTGGAACCGCATACGCGTTCAGAACAAA	
VP2 de HIV17 sintético (2601)	GATCATTTGTGGGCGACGACAAGCTGGAGCCTCACACCAGATCCGAGCAGA	
	2651	2700
VP2 de HIV17 natural	(2651) TAGTTAGTCGGTATAATTACTCACGTAAGCACATTTGTGGAGTTGTATCC	
VP2 de HIV17 sintético (2651)	TCGTGTCCCGGTACAACTACAGCCGGAAGCACATCTGCGGCGTGGTGTCC	
	2701	2750
VP2 de HIV17 natural	(2701) GTCACCGTCGGGCGAATAGTCAGTTGAGAGTTTATACCTCTGGAATTGT	
VP2 de HIV17 sintético (2701)	GTGACAGTGGGCCAGAACAGCCAGCTGAGAGTGACACCAGCGGCATCGT	
	2751	2800
VP2 de HIV17 natural	(2751) TAAACACCGTGATGCGACAAGTTCATTCTAAACACAAGTGCAAGGTGA	
VP2 de HIV17 sintético (2751)	GAAGCACAGAGTGTGCGACAAGTTCATCCTGAAGCACAAATGCAAGGTGA	
	2801	2850
VP2 de HIV17 natural	(2801) TATTAGTGAGGATGCCGGGTACGTTTTTCGGAATGATGAATTAATGACG	
VP2 de HIV17 sintético (2801)	TCCTGGTGAGGATGCCGGCTACGTGTTTCGGCAACGACGAGCTGATGACC	
	2851	2868
VP2 de HIV17 natural	(2851) AACTATTGAATGTCTAG	
VP2 de HIV17 sintético (2851)	AAGCTGCTGAATGTGTGA	

Fig. 1

	1	50
VP5 de HIV17 natural	(1)	ATGGGGAAGATAATTAAATCGCTAAGTAGATTGGAAGAAGGTTGGGAA
VP5 de HIV17 sintético	(1)	ATGGGCAAGATCATCAAGAGCCTGAGCCGCTTCGGCAAGAAAGTGGGCAA
SEQ ID NO: 2		
	51	100
VP5 de HIV17 natural	(51)	TGCATTGACGTGGAACACAGCGAAGAAGATTATTCAACCATCGGAAAAG
VP5 de HIV17 sintético	(51)	TGCCCTGACCAGCAACACCGCCAAGAAGATCTACAGCACCATCGGCAAGG
	101	150
VP5 de HIV17 natural	(101)	CAGCGGAGCGATTGCTGAAAGTGAAATCGGTGCGGCAACGATAGACGGT
VP5 de HIV17 sintético	(101)	CCGCCGAGAGATTCGCCGAGAGCGAGATCGGAGCCGCCACCATCGACGGC
	151	200
VP5 de HIV17 natural	(151)	TTGGTGCAGGGCAGTGTTCATTCCATAATTACAGGTGAATCGTATGGAGA
VP5 de HIV17 sintético	(151)	CTGGTGCAGGGCAGCGTGCACAGCATCATCACCGCGGAGAGCTACGGCGA
	201	250
VP5 de HIV17 natural	(201)	GTCAGTTAAACAAGCGGTTCTTCTCAACGTGTAGGTACAGGTGAAGAAT
VP5 de HIV17 sintético	(201)	GAGCGTGAAGCAGGCCGTGCTGCTGAACGTGTGGGCACAGCGAGGAGC
	251	300
VP5 de HIV17 natural	(251)	TACCAGATCCTCTGAGCCCCGGCGAACGTGGTATCCAAACGAAAATAAAG
VP5 de HIV17 sintético	(251)	TGCCCCACCCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGGCATCCAGACCAAGATCAAG
	301	350
VP5 de HIV17 natural	(301)	GAATTAGAAGATGAGCAGCGAAATGAACTTGTTCGATTGAAGTATAACAA
VP5 de HIV17 sintético	(301)	GAGCTGGAGGACGAGCAGAGAAACGAGCTGGTGCAGGCTGAAGTACAACAA
	351	400
VP5 de HIV17 natural	(351)	AGAGATAACAAAGGAGTTTGGGAAGGAGTTAGAGGAAGTCTACGACTTCA
VP5 de HIV17 sintético	(351)	GGAGATCACCAAGGAGTTCGGCAAGGAACTGGAAGAGGTGTACGACTTCA
	401	450
VP5 de HIV17 natural	(401)	TGAATGGCGAGGCGAAGGAGGAGGAAGTGGTTCAGGAACAATACTCAATG
VP5 de HIV17 sintético	(401)	TGAACGGCGAGGCCAAGGAGGAGGAGGTGGTGAAGAAGTACAGCATG
	451	500
VP5 de HIV17 natural	(451)	TTATGTAAAGCAGTGGATTCTTACGAGAAAATATTAAAGGCGGAAGACTC
VP5 de HIV17 sintético	(451)	CTGTGCAAGGCCGTGGACAGCTACGAGAAGATCCTGAAGGCCGAGGACTC
	501	550
VP5 de HIV17 natural	(501)	GAAAATGGCAATGTTGGCGCGCGCACTGCAACGGGAGGCTTCAGAGAGAA
VP5 de HIV17 sintético	(501)	CAAGATGGCCATGCTGGCCAGAGCCCTGCAGAGGGAGGCCAGCGAGAGAA
	551	600
VP5 de HIV17 natural	(551)	GTCAGGACGAGATCAAAATGGTAAAGGAGTACAGACAGAAAATTGATCGC
VP5 de HIV17 sintético	(551)	GCCAGGACGAGATCAAGATGGTGAAGGAGTACCGGCAGAAAGATCGACGCC
	601	650
VP5 de HIV17 natural	(601)	CTTAAGAATGCGATCGAGATTGAACGAGACGGAATGCAGGAGGAGGCGAT
VP5 de HIV17 sintético	(601)	CTGAAGAACGCCATCGAGATCGAGAGGGACGSCATGCAGGAGGAGGCCAT
	651	700
VP5 de HIV17 natural	(651)	CCAGGAGATTGCTGGAATGACCGCTGACGTCTTAGAAGCGGCTTCAGAGG
VP5 de HIV17 sintético	(651)	CCAAGAAATCGCCGGCATGACCGCCGACGTGCTGGAGGCCGCCAGCGAGG
	701	750
VP5 de HIV17 natural	(701)	AAGTGCCTTAAATCGGTGCAGGTATGGCCACTGCTGTAGCAACCGGCAGA
VP5 de HIV17 sintético	(701)	AGGTGCCCCGTGTTGGCGCCGGAATGGCCACCGCCGTGGCCACCGGCAGA
	751	800
VP5 de HIV17 natural	(751)	GCAATAGAGGGCGCATATAAATTGAAGAAAGTTATAAATGCGTTAAGTGG
VP5 de HIV17 sintético	(751)	GCCATCGAGGGCGCCTACAAGCTGAAGAAGGTGATCAACGCCCTGAGCGG
	801	850
VP5 de HIV17 natural	(801)	AATCGATTTGTGCGCATATGAGGAGTCCAAAGATCGAACCACCTATTATCG
VP5 de HIV17 sintético	(801)	CATCGACCTGAGCCACATGAGGAGCCCCAAGATCGAGCCTACCATCATCG
	851	900
VP5 de HIV17 natural	(851)	CTACAACACTGGAGCACCGATTAAAGAGATACCAGATGAGCAGCTAGCA
VP5 de HIV17 sintético	(851)	CCACCACCCTGGAGCACCGGTTCAAGGAGATCCCTGACGAGCAGCTGGCC
	901	950
VP5 de HIV17 natural	(901)	GTAAGTGTGTTGAATAAGAAGACAGCCGTAAGTGAATACTGCAATGAAAT
VP5 de HIV17 sintético	(901)	GTGTCCGTGCTGAACAAGAAAACCGCGTGACCGACAAGTGAACGAGAT
	951	1000
VP5 de HIV17 natural	(951)	CGCGCATATTAAACAAGAAATATTACCAAAGTTAAGCAGATTATGGATG
VP5 de HIV17 sintético	(951)	CGCCACATCAAGCAGGAGATCCTGCCCAAGTTCAAGCAGATCATGGACG

		1001		1050
VP5 de HIV17 natural	(1001)	AGGAGAAGGAGATTGAAGGAATAGAGGACAAAGTGATTACCCCGGGTG		
VP5 de HIV17 sintético	(1001)	AGGAGAAGGAGATCGAGGGCATCGAGGACAAGGTGATCCACCCCGGGTG		
		1051		1100
VP5 de HIV17 natural	(1051)	ATGATGAGGTTCAAGATTCTAGAACGCAGCAACCGCAAATCCACATTTA		
VP5 de HIV17 sintético	(1051)	ATGATGAGGTTCAAGATCCCCAGAACCCAGCAGCCTCAGATCCACATCTA		
		1101		1150
VP5 de HIV17 natural	(1101)	TGCGGCTCCGTGGGATTCTGATGACGTATTTTCTTTTCATTGCGTTTCAC		
VP5 de HIV17 sintético	(1101)	TGCCGCCCTTGGGACAGCGACGACGTGTTCTTCTTCCACTGCGTGTCCC		
		1151		1200
VP5 de HIV17 natural	(1151)	ACCATCATCGGAATGAATCTTTCTTTTGGGATTGATTTAGGAATCGAT		
VP5 de HIV17 sintético	(1151)	ACCACCACAGGAACGAGAGCTTCTTCTGGGCTTCGACCTGGGCATCGAC		
		1201		1250
VP5 de HIV17 natural	(1201)	GTCGTTCACTTCGAAGACTTAACCAGCCATTGGCAGCATTAGGGCTAGC		
VP5 de HIV17 sintético	(1201)	GTGGTGCACCTTCGAGGATCTGACCAGCCACTGGCAGCCCTGGGCCTGGC		
		1251		1300
VP5 de HIV17 natural	(1251)	GCAAGAGGCGAGCGGGCGTACGTTAACGGAGGCGTATCGTGAATTTCTCA		
VP5 de HIV17 sintético	(1251)	CCAGAGGCCTCCGGCAGAACCCTGACCGAGGCCTACAGGAGTTCTCTGA		
		1301		1350
VP5 de HIV17 natural	(1301)	ATCTATCAATTTCAAGCACGTATAGTAGCGGATACATGCGAGACGCATG		
VP5 de HIV17 sintético	(1301)	ACCTGAGCATCAGCAGCACCTACAGCAGCGCCATCCACGCCCGGAGAATG		
		1351		1400
VP5 de HIV17 natural	(1351)	ATCAGGTCACGAGCAGTACATCCGATCTTTTATAGGATCAACGCACTACGA		
VP5 de HIV17 sintético	(1351)	ATCAGATCCAGGGCCGTGCACCCATCTTTCTGGGCAGCACCCACTACGA		
		1401		1450
VP5 de HIV17 natural	(1401)	TATTACATATGAGGCTTTAAAAAATAATGCGCAGAGAATAGTCTATGATG		
VP5 de HIV17 sintético	(1401)	CATCACCTACGAGGCCCTGAAAAACAACGCCAGCGGATCGTGTACGATG		
		1451		1500
VP5 de HIV17 natural	(1451)	AGGAACTGCAAATGCATATTCTAAGGGGACCTTTGCATTTTCAACGCCGA		
VP5 de HIV17 sintético	(1451)	AGGAGCTGCAGATGCACATCCTGAGAGGCCCTCTGCACCTCCAGAGGAGA		
		1501		1550
VP5 de HIV17 natural	(1501)	GCCATTCTGGGAGCGCTGAAATTTGGAATCAAAATATTAGGCGATAAAAT		
VP5 de HIV17 sintético	(1501)	GCCATCCTGGGCGCCCTGAAGTTCGGCATCAAGATCCTGGGCGACAAGAT		
		1551		1581
VP5 de HIV17 natural	(1551)	TGATGTTCCCTCTTCTTACGAAATGCATGA		
VP5 de HIV17 sintético	(1551)	CGACGTGCCCTGTTCCTGAGGAACGCCTGA		

Fig. 2

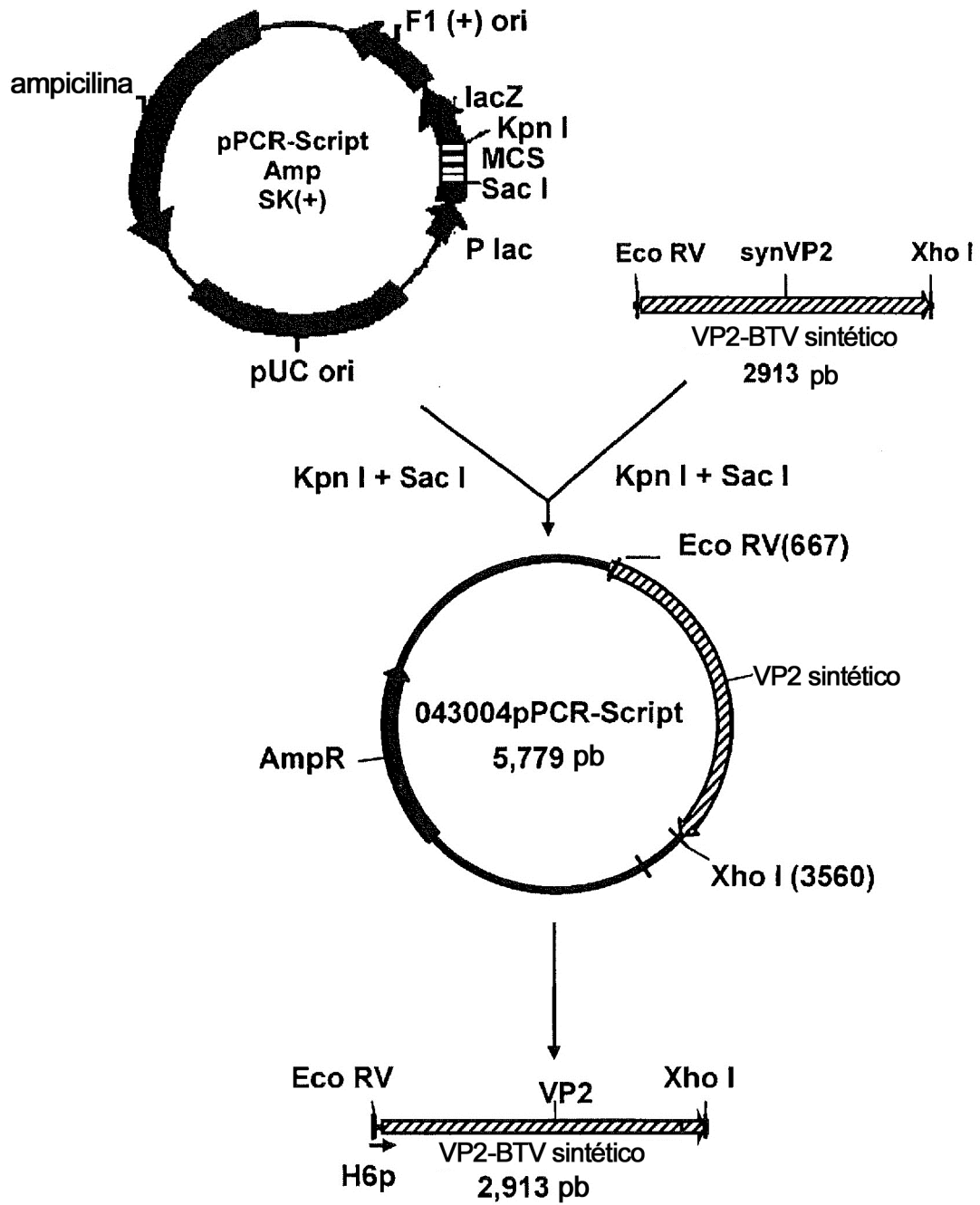


Fig. 3

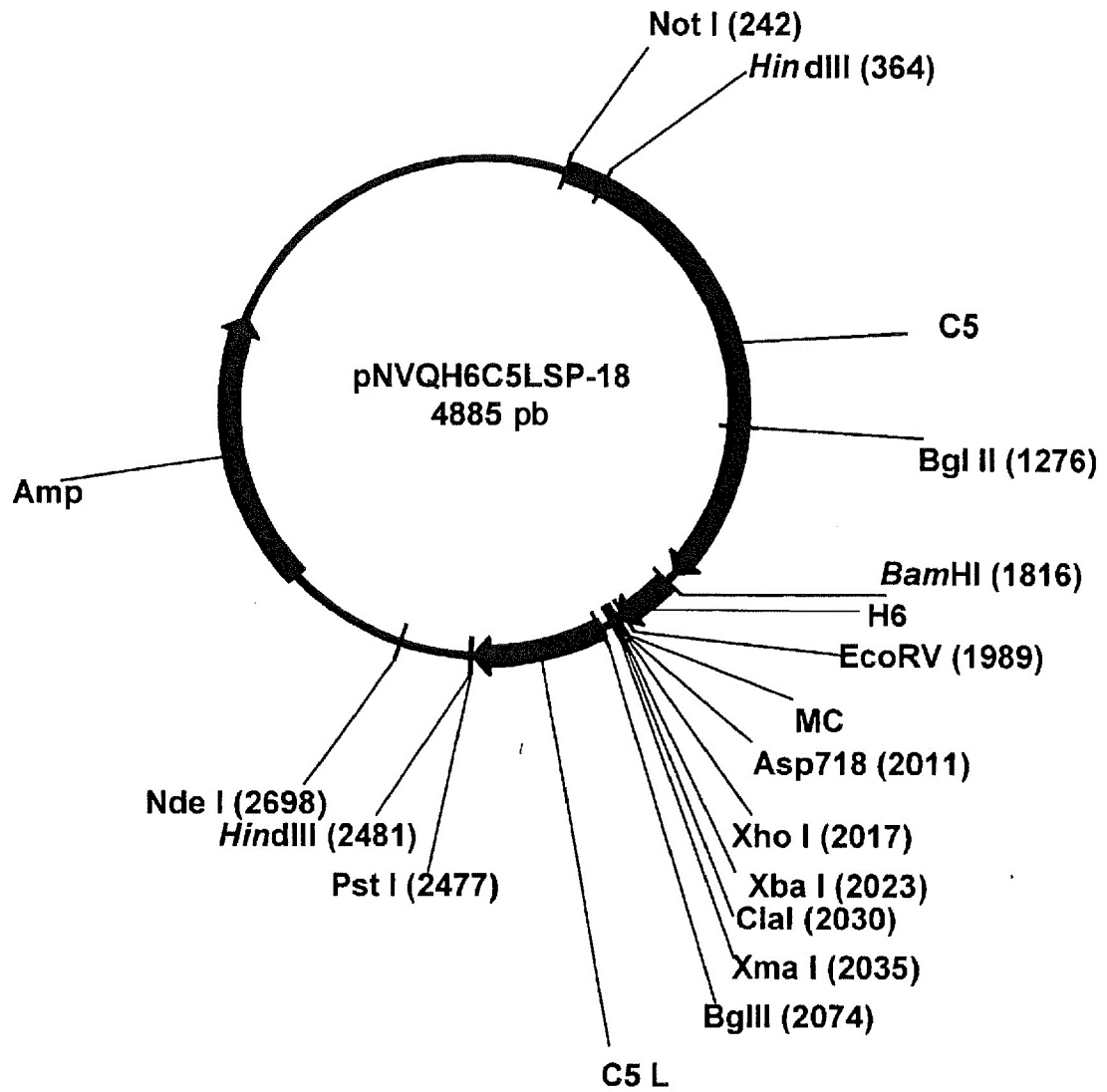


Fig. 4

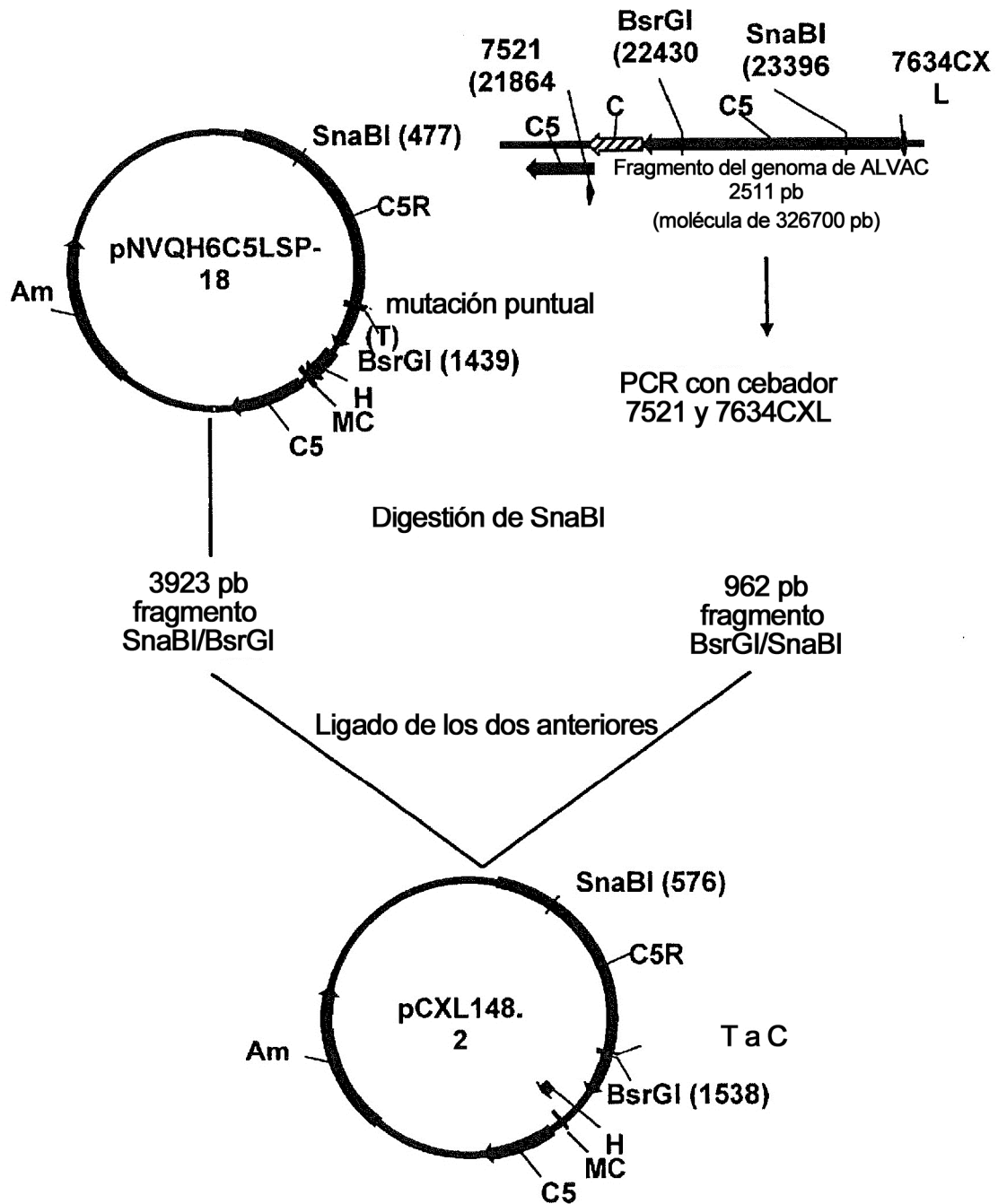


Fig. 5

SEQ ID NO:13

ttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagtt
 accggataaaggcgcagcggctcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaa
 cgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggccagcttcccgaagg
 agaaaggcggacaggtatccggttaagcggcaggggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttcc
 agggggaaacgcctgggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgat
 ttttgtgatgctcgtcaggggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacgg
 ttccctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatccctgattctgtgga
 taaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcg
 agtcagtgagcggaggaagcgggaagagcgcccaatacgcaaacgcctctccccgcgcgttggcgg
 attcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcgaacgcaat
 taatgtgagtttagctcactcattaggcaccgccaggtttacactttatgcttccggctcgtatgt
 tgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgacctgattacgaattg
 cggccgcaattctgaatgttaaatgttatactttggatgaagctataaatatgcattggaaaaat
 aatccattttaagaaaggattcaaatactacaaaacctaagcgataaatatgttaactaagcttat
 tcttaacgacgcctttaatatatacacaataaacataatttttgtataacctaacaaataactaaa
 acataaaaaataataaaaggaaatgtaatatcgtaattattttactcaggaatgggggttaaatatt
 tatacacgtgtatatctatactgttatcgtatactctttacaattactattacgaatatgcaag
 agataataagattacgtatttaagagaatcttgtcatgataattgggtacgacatagtgataaat
 gctatttcgcacgttacataaaagtcagttggaaagatggatttgacagatgtaacttaaatagg
 gcaaaaatgttaataaacagcattctatcggaagataggataaccagttatattatacaaaaaatca
 ctggttggataaaaacagattctgcaatattcgtaaaagatgaagattactgcaatttgtaaact
 atgacaataaaaaagccatttatctcaacgacatcgtgtaattcttccatgttttatgtatgtgtt
 tcagatattatgagattactataaaactttttgtatacttatattccgtaaactatattaatcatg
 aagaaaatgaaaaagtatagaagctgttcacgagcgggtgttgaaaacaacaaaattatacattc
 aagatggcttacatatacgtctgtgaggctatcatggataatgacaatgcattcttaaatagggtt
 tttggacattggattcgaccctaacacggaatatggtaactctacaatctcctcttgaaatggctg
 taatgttcaagaataccgaggctataaaaaatcttgatgaggtatggagctaaacctgtagttact
 gaatgcacaactctctgtctgcatgatgcgggtgttgagagcgcactacaaaatagtgaagatct
 gttgaagaataactatgtaacaatgttctttacagcggaggcttactcctttgtgtttggcag
 cttaccttaacaaagtttaatttgggttaactcttatgggtcattcggcggtatgtagatatttca
 aacacggatcgggttaactcctctacatatagccgtatcaataaaaaatttaacaatgggttaact
 tctattgaacaaagggtgctgatactgacttgcgtggataacatgggacgtactcctttaatgatcg
 ctgtacaatctggaaatattgaaatattgtagcacactacttaaaaaaaataaaatgtccagaact
 gggaaaaattgatcttgccagctgtaattcatggtagaaaagaagtgtcaggctacttttcaac
 aaaggagcagatgtaaactacatctttgaaagaaatggaaaatcatatactgttttgggaattgat
 taaagaaagttactctgagacacaaaagaggtagctgaagtggtaactctcaaaggtagctgacta
 attagctataaaaaggatccgggttaatttaattagtcacaggcagggcgagaacgagactatct
 gctcgttaatttaattagagcttctttattctatacttaaaaagtgaataataatacaaaaggttct
 tgagggttgtgttaattgaaagcgagaaataatcataaattatttcattatcgcgatatccggtt
 aagtttgtatcgtaggtaccctcgagctctagaatcgatcccgggtttttatgactagttaatcac
 ggcgcgttatataaagatctaaaatgcataattttctaataatgaaaaaagtacatcatgagcaac
 gcgttagtatattttacaatggagattaacgctctataccgttctatgtttattgattcagatga
 tgttttagaaaagaaagttattgaatatgaaaactttaatgaagatgaagatgacgacgatgatt
 attgttgtaaatctgttttagatgaagaagatgacgcgctaaagtatactatgggtacaaagtat
 aagctatactactaatggcgacttgtgcaagaaggtatagtatagtgaatatgtgttagatta
 tgattatgaaaaaccaaataaatcagatccatatctaaaggtatctcctttgcacataatttcat
 ctattcctagtttagaatacctgcagccaagcttggcactggccgtcgttttacaacgtcgtgac
 tgggaaaaacccctggcgttacccaacttaatcgcttgcagcacatccccctttcgccagctggcg
 taatagcgaagaggcccgccagatcgcccttcccaacagttgcgcgacctgaatggcgaatggc

gcctgatgcgggtatTTTTctccttacgcacatctgtgcgggtatTTTcacaccgcacatggtgcactctc
 agtacaatctgctctgatgccgcacatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgc
 gccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgacgctctccgggagct
 gcatgtgtcagaggTTTTcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgc
 ctatTTTTtataggTTaatgtcatgataataatggTTTTcttagacgtcaggTggcactTTTcgggg
 aaatgtgcgcggaacccctatTTTgTTTTTTTTctaaatacattcaaataatgtatccgctcatga
 gacaataacccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagTattcaacattTc
 cgtgtcgcccttattccctTTTTTgcggcattTTTgccttcctgTTTTTgctcaccagaaacgct
 ggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggggttacatcgaaactggatctca
 acagcggtaagatccttgagagTTTTcgccccgaagaacgTTTTccaatgatgagcactTTTaaa
 gttctgctatgtggcgcggtattatcccgatttgacgcgggcaagagcaactcggctcgccgcat
 aactattctcagaatgactTggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggca
 tgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtataacactgcggccaacttactt
 ctgacaaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctTTTTTgcacaacatgggggatcatgtaac
 tgccttgatcgttggaacccggagctgaatgaagccataccaaaacgacgagcgtgacaccacga
 tgctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaaactacttactctagcttcc
 cggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagtTgcaggaccacttctgcgctcggccct
 tccggctggctggttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattg
 cagcactggggccagatggtaagccctcccgatcgtagtTatctacacgacggggagtcaggca
 actatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaact
 gtcagaccaagtTtactcatatatactTTtagattgattTaaaacttcattTTTaatTTTaaaagga
 tctaggtgaagatcctTTTTgataatctcatgacccaaatcccttaacgtgagTTTTcgTtccac
 tgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctTTTTTctgcgcgtaat
 ctgctgcttgcaaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggTTTTgtTgccggatcaagagctac
 caactctTTTTccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagt
 tagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgcta
 cctg

Fig. 6

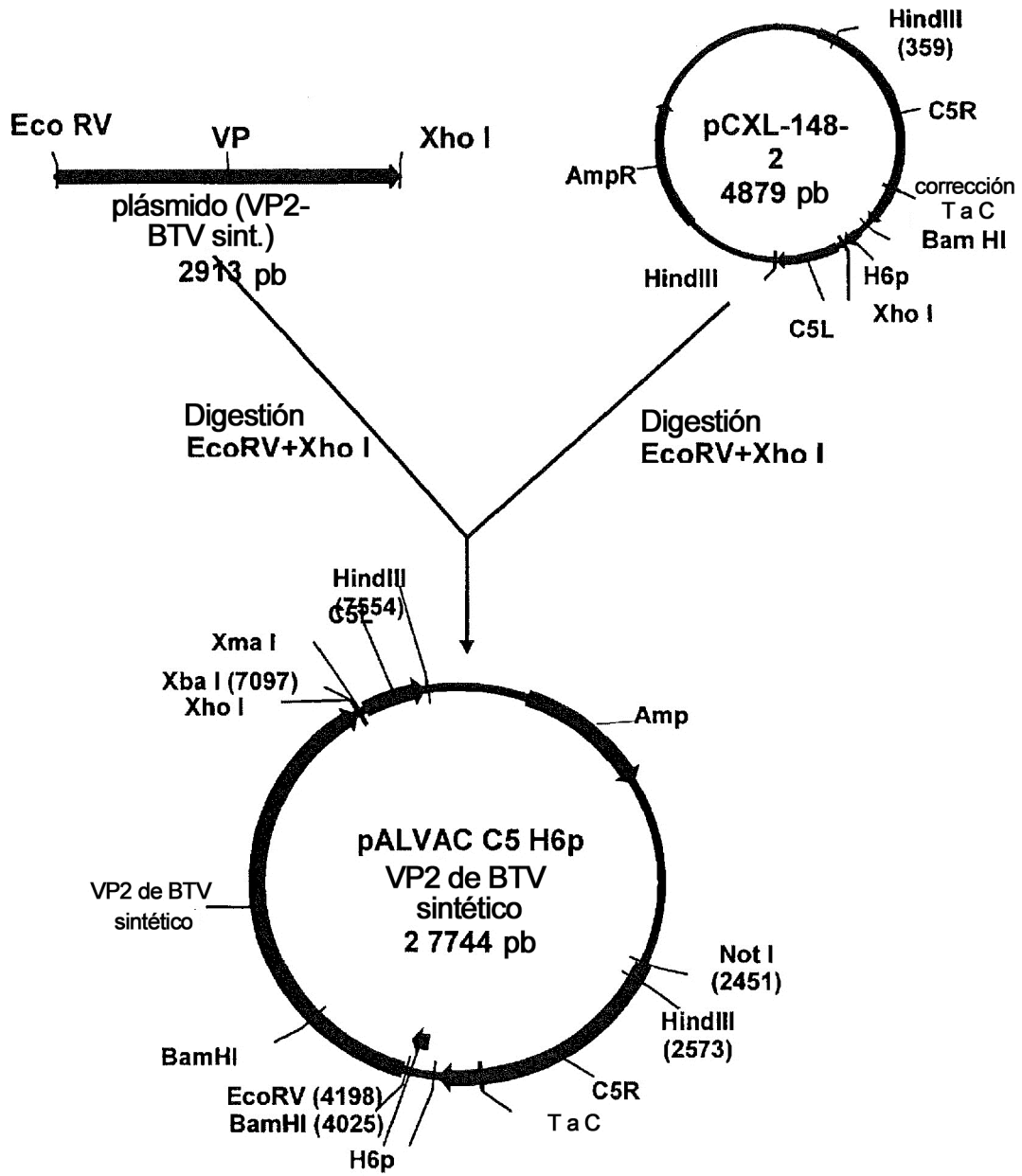


Fig. 7

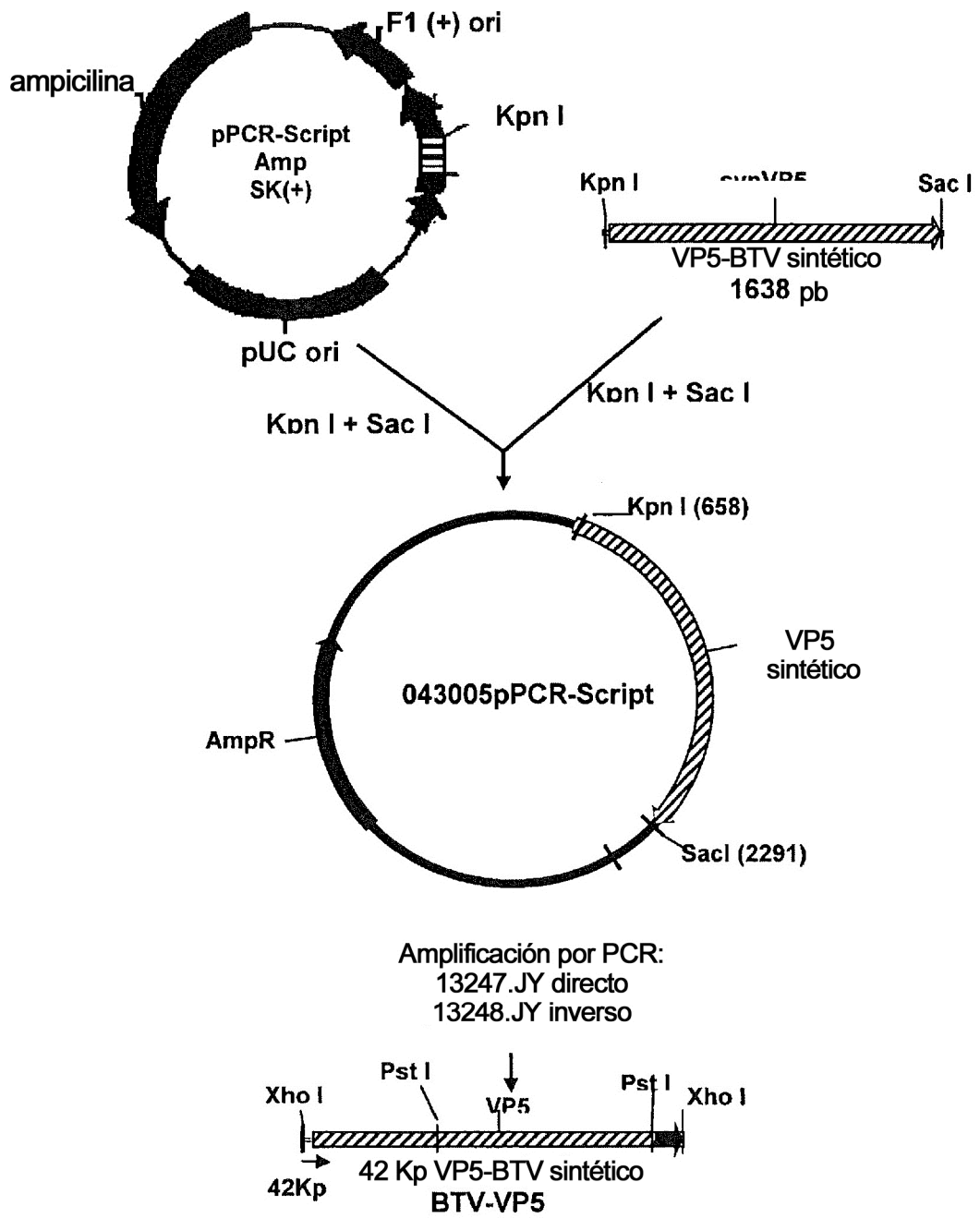


Fig. 8

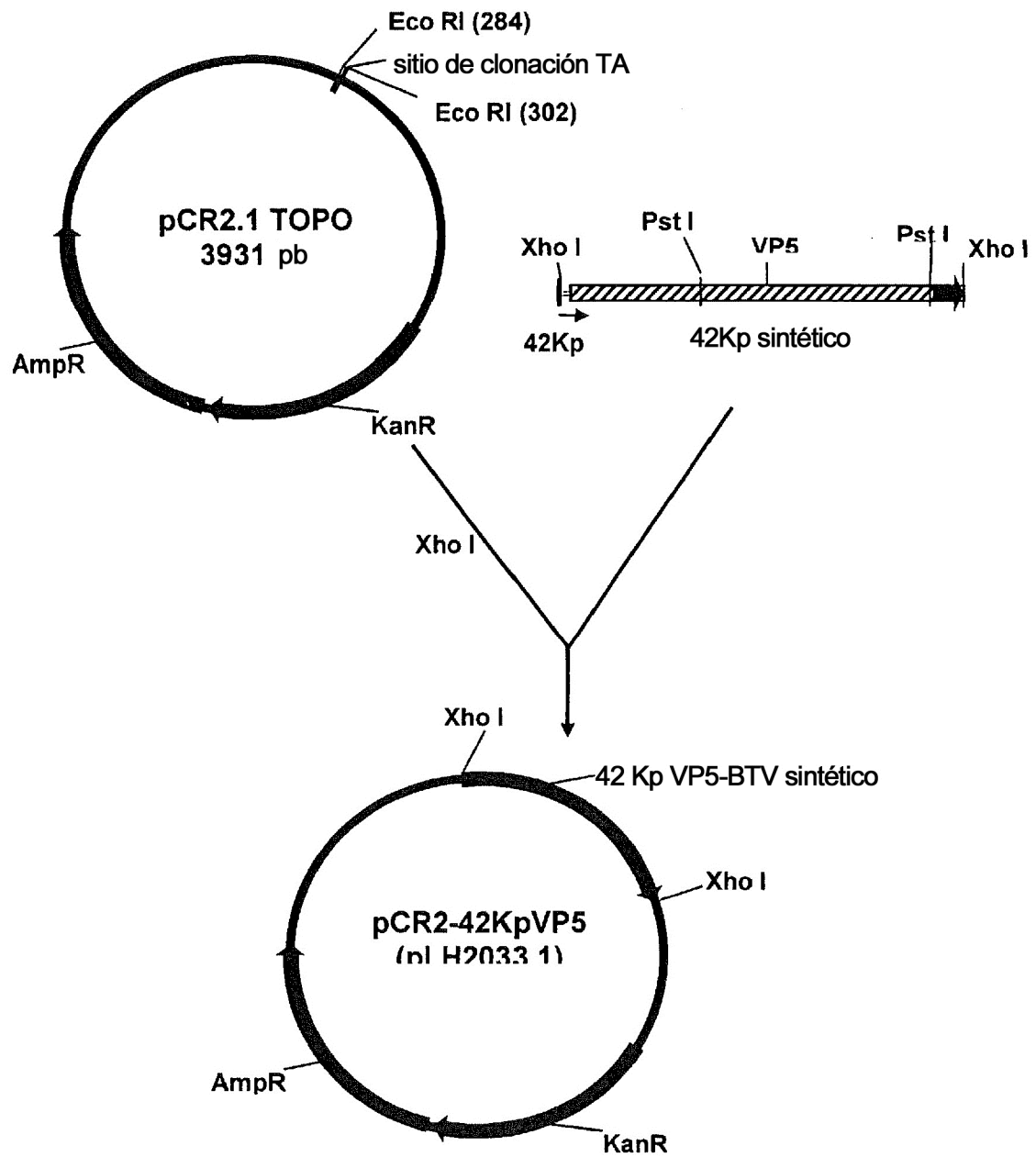


Fig. 9

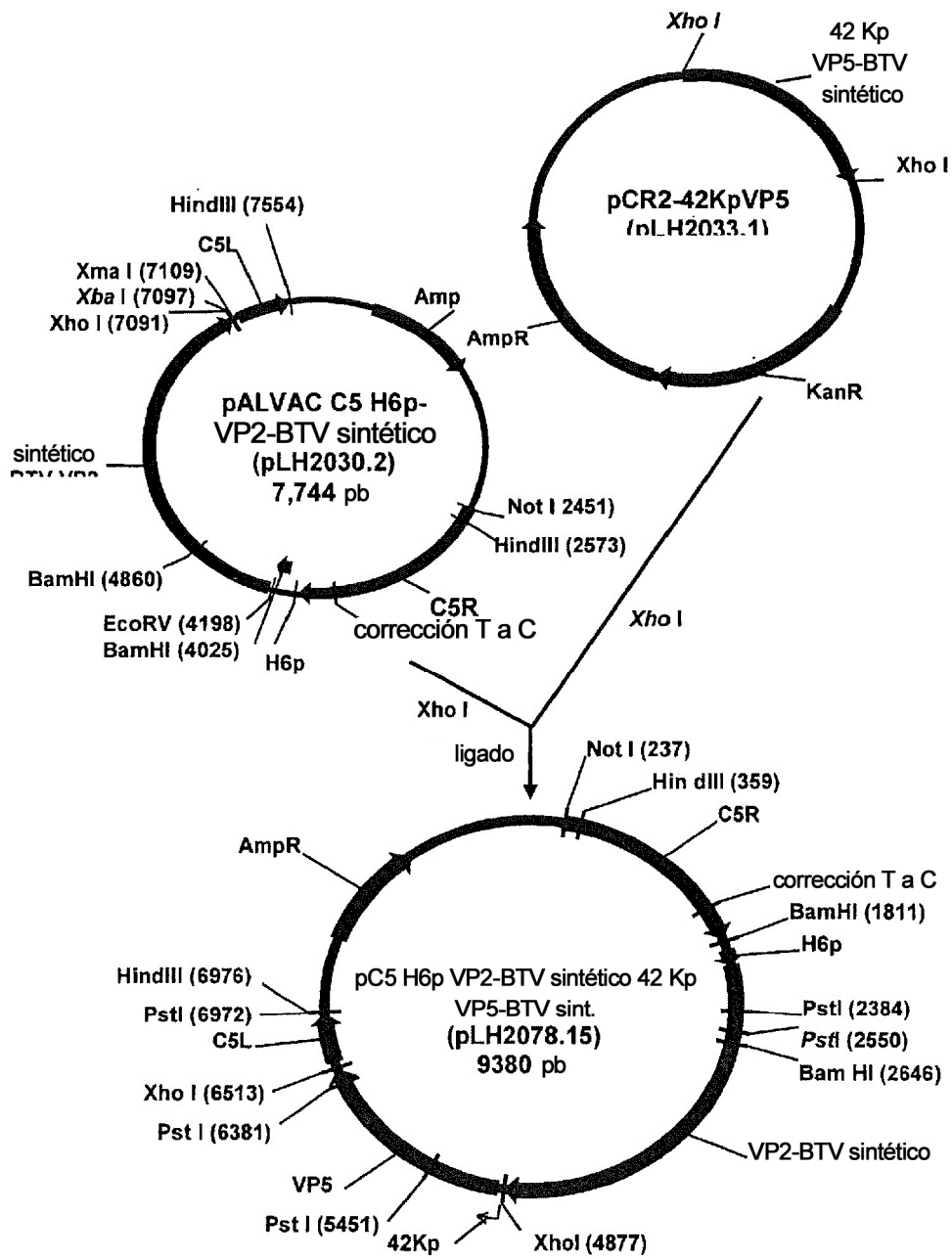


Fig. 10

Mapa de funciones**CDS (3 total)**

VP2-BTV sintético	Inicio: 2005	Final: 4875
VP5-BTV sintético	Inicio: 4921	Final: 6498
Ampr	Inicio: 7579	Final: 8436

Funciones varias (2 total)

C5L	Inicio: 6562	Final: 6966
C5R	Inicio: 248	Final: 1783

Promotor eucariota (2 total)

H6	Inicio: 1881	Final: 2004
42K	Inicio: 4889	Final: 4920

A: Secuencia de aminoácidos prevista del(los) producto(s)**VP2-BTV sintético (SEQ ID NO:20)**

```

1  MEEFVIPVYS EDEIPYALLS RYPLAIQTNV KIEDVEGKHN VVKIPESDMI
51  DIPRLTIVEA MNYKPARNDG IVVPRLLDIT LRAYDDRKST KSARGIEFMT
101 NARWMKWAID DRMDIQPLKV TLDHYCSVNH QLFNCVVKAN AANADTIYYD
151 YFPLEDHKKR CNHTNLDLLR SLTNMELFHA LQGAAYSIS SYELVANSER
201 ESLEETYAIG QPKWIHLTRG TRIGNSGLPY ERFISSMVQV IVNGKIPSEI
251 ANEVAQLNRI RAEWIAATYD RGRIRALELC KILSTIGRKI LNTHEEPKDE
301 MDLSTRFQFK LDEKFNRTDP EHVNIQGVRA PATDEGRFYA LIAIAATDTQ
351 KGRVWRINPY PCLRGALVAA ECELGDVYST LRRVYRWSLR PEYQGHERQL
401 ENNKYVFNRI NLFDSNLAVG DQIIHWRYEV KASAETTYDS GYMCHEVEVE
451 DELLCKINED KYKDMLDRMI QGGWDQERFK LHNILTDPNL LTIDFEKDAY
501 LNSRSELVFP DYFDKWISSP MFNARLRITK GEIGTSKKDD PWNNAVRGY
551 IKSPAESLDF VLGPPYDLRL LFFGEALSLK QEQSAVFQYL SQLDDFPALT
601 QLTGDAVCPH SGGALYTFRK VALFLIGNYE KLSPLDHEGM EHQTYVHPST
651 GGTQKCVLE MKDPCQLMCF VIDYIFEKRE QLRDTKEARY IVYLIQSLTG
701 IQRLDVLKST FPNFFQRLLM LKEIKFVRDL NVINFLPLMF LVHDNISYSH
751 RQWSIPMVLF DDTIKLIPVE VGAYANRFGF KSEFMNTRFH PGESKKKQIA
801 EDVHKEFGVV AFEYYTNTKI SQGSVHTPVM TTKMDVLKIH LSSLCAGLAD
851 SIVYTLPAVAH PKKCIVLIIV GDDKLEPHTR SEQIVSRYNY SRKHICGVVS
901 VTVGQNSQLR VYTSGIVKHR VCDKFILKHK CKVILVRMPG YVFGNDELMT
951 KLLNV**

```

VP5-BTV sintético (SEQ ID NO:21)

```

1  MGKIIKSLSR FGKKVGNALT SNTAKKIYST IGKAAERFAE SEIGAATIDG
51  LVQGSVHSII TGESYGESVK QAVLLNVLT GEELPDPLSP GERGIQTKIK
101 ELEDEQRNEL VRLKYNKEIT KEFGKELEEY YDFMNGEAKE EEVVQEQYSM
151 LCKAVDSYEK ILKAEDSKMA MLARALQREA SERSQDEIKM VKEYRQKIDA
201 LKNAIEIERD GMQEEAIQEI AGMTADVLEA ASEEVPLIGA GMATAVATGR
251 AIEGAYKLKK VINALSGIDL SHMRSPKIEP TIIATTLHR FKEIPDEQLA
301 VSVLNKKTAV TDNCNEIAHI KQEILPKFKQ IMDEEKEIEG IEDKVIHPRV
351 MMREFKIPRTQ QPQIHIYAAP WDSDDVFFFH CVSHHHRNES FFLGFDLGID
401 VVHFEDLTSH WHALGLAQEA SGRTLTEAYR EFLNLSISST YSSAIHARM
451 IRSRAVHPIF LGSTHYDITY EALKNNAQRI VYDEELQMH I LRGPLHFQRR
501 AILGALKFGEI KILGDKIDVP LFLRNA

```


B: Secuencia de nucleótidos de brazos e inserto con traducción
(SEQ ID NO: 19)

Negrita: brazo derecho de C5

Itálica: VP2-BTV

.....: promotor H6

Subrayado doble: promotor 42 K

.....: brazo izquierdo de C5

		M13R			C5R→
201	<u>GGAAA</u>	CAGCTATGAC	CATGATTACG	AATTGCGGCC	GCAATTCTGA
	<u>CCTTT</u>	GTCGATACTG	GTAATAATGC	TTAACGCCGG	CGTTAAGACT
251	ATGTTAAATG	TTATACTTTG	GATGAAGCTA	TAAATATGCA	TTGGAAAAAT
	TACAATTTAC	AATATGAAAC	CTACTTCGAT	ATTTATACGT	AACCTTTTTA
301	AATCCATTTA	AAGAAAGGAT	TCAAATACTA	CAAAACCTAA	GCGATAATAT
	TTAGGTAAAT	TTCTTTCCTA	AGTTTATGAT	GTTTTGGATT	CGCTATTATA
351	GTTAACTAAG	CTTATTCTTA	ACGACGCTTT	AAATATACAC	AAATAAACAT
	CAATTGATTC	GAATAAGAAT	TGCTGCGAAA	TTTATATGTG	TTTATTTGTA
401	AATTTTTGTA	TAACCTAACA	AATAACTAAA	ACATAAAAAT	AATAAAAGGA
	TTAAAAACAT	ATTGGATTGT	TTATTGATTT	TGTATTTTAA	TTATTTTCCT
451	AATGTAATAT	CGTAATTATT	TTACTCAGGA	ATGGGGTTAA	ATATTTATAT
	TTACATTATA	GCATTAATAA	AATGAGTCCT	TACCCCAATT	TATAAATATA
501	CACGTGTATA	TCTATACTGT	TATCGTATAC	TCTTTACAAT	TACTATTACG
	GTGCACATAT	AGATATGACA	ATAGCATATG	AGAAATGTTA	<u>ATGATAATGC</u>
					7927.DC
551	AATATGCAAG	AGATAATAAG	ATTACGTATT	TAAGAGAATC	TTGTCATGAT
	<u>TTATACGTTT</u>	<u>TCTATTATT</u>	TAATGCATAA	ATTCTCTTAG	AACAGTACTA
	7927.DC				
601	AATTGGGTAC	GACATAGTGA	TAAATGCTAT	TTCGCATCGT	TACATAAAGT
	TTAACCCATG	CTGTATCACT	ATTTACGATA	AAGCGTAGCA	ATGTATTTCA
651	CAGTTGGAAA	GATGGATTTG	ACAGATGTAA	CTTAATAGGT	GCAAAAATGT
	GTCAACCTTT	CTACCTAAAC	TGTCTACATT	GAATTATCCA	CGTTTTTACA
		7696.CXL			
701	TAAATAACAG	<u>CATTCTATCG</u>	<u>GAAGATAGGA</u>	<u>TACCAGTTAT</u>	ATTATACAAA
	ATTTATTGTC	GTAAGATAGC	CTTCTATCCT	ATGGTCAATA	TAATATGTTT
751	AATCACTGGT	TGGATAAAAC	AGATTCTGCA	ATATTCTGTA	AAGATGAAGA
	TTAGTGACCA	ACCTATTTTG	TCTAAGACGT	TATAAGCATT	TTCTACTTCT
801	TTACTGCGAA	TTTGTAACCT	ATGACAATAA	AAAGCCATTT	ATCTCAACGA
	AATGACGCTT	AAACATTGTA	TACTGTTATT	TTTCGGTAAA	TAGAGTTGCT
851	CATCGTGTA	TTCTTCCATG	TTTTATGTAT	GTGTTTCAGA	TATTATGAGA
	GTAGCACATT	AAGAAGGTAC	AAAATACATA	CACAAAGTCT	ATAATACTCT
901	TTACTATAAA	CTTTTTGTAT	ACTTATATTC	CGTAAACTAT	ATTAATCATG
	AATGATATTT	GAAAAACATA	TGAATATAAG	GCATTTGATA	TAATTAGTAC
951	AAGAAAATGA	AAAAGTATAG	AAGCTGTTCA	CGAGCGGTTG	TTGAAAACAA
	TTCTTTTACT	TTTTCATATC	<u>TTTCGACAAGT</u>	<u>GCTCGCCAAC</u>	<u>AACTTTTGTT</u>
		7926.DC			
1001	CAAATTATA	CATTCAAGAT	GGCTTACATA	TACGTCTGTG	AGGCTATCAT
	GTTTTAATAT	GTAAGTTCTA	CCGAATGTAT	ATGCAGACAC	TCCGATAGTA
1051	GGATAATGAC	AATGCATCTC	TAAATAGGTT	TTTGGACAAT	GGATTCGACC
	CCTATTACTG	TTACGTAGAG	ATTTATCCAA	AAACCTGTTA	CCTAAGCTGG
1101	CTAACACGGA	ATATGGTACT	CTACAATCTC	CTCTTGAAAT	GGCTGTAATG
	GATTGTGCCT	TATACCATGA	GATGTTAGAG	GAGAACTTTA	CCGACATTAC

1151 TTCAAGAATA CCGAGGCTAT AAAAATCTTG ATGAGGTATG GAGCTAAACC
 AAGTTCTTAT GGCTCCGATA TTTTITAGAAC TACTCCATAC CTCGATTGCG
 7697.CXL
 1201 TGTAAGTTACT GAATGCACAA CTTCTTGTCT GCATGATGCG GTGTTGAGAG
 ACATCAATGA CTTACGTGTT GAAGAACAGA CGTACTACGC CACAACCTCTC
 1251 ACGACTACAA AATAGTGAAA GATCTGTTGA AGAATAACTA TGTAACAAT
 TGCTGATGTT TTATCACTTT CTAGACAAC TCTTATTGAT ACATTTGTTA
 1301 GTTCTTTTACA GCGGAGGCTT TACTCCTTTG TGTTTGGCAG CTTACCTTAA
 CAAGAAATGT CGCCTCCGAA ATGAGGAAAC ACAAACCGTC GAATGGAATT
 1351 CAAAGTTAAT TTGGTTAAAC TTCTATTGGC TCATTCCGGC GATGTAGATA
 GTTTCATTA AACCAATTTG AAGATAACCG AGTAAGCCGC CTACATCTAT
 1401 TTTCAAACAC GGATCGGTTA ACTCCTCTAC ATATAGCCGT ATCAAATAAA
 AAAGTTTGTG CCTAGCCAAT TGAGGAGATG TATATCGGCA TAGTTTATTT
 7925.DC
 1451 AATTTAACAA TGGTTAAACT TCTATTGAAC AAAGGTGCTG ATACTGACTT
 TTAAATTGTT ACCAATTTGA AGATAACTTG TTTCCACGAC TATGACTGAA
 1501 GCTGGATAAC ATGGGACGTA CTCCTTTAAT GATCGCTGTA CAATCTGGAA
 CGACCTATTG TACCCTGCAT GAGGAAATTA CTAGCGACAT GTTAGACCTT
 1551 ATATTGAAAT ATGTAGCACA CTACTTAAAA AAAATAAAAT GTCCAGAACT
 TATAACTTTA TACATCGTGT GATGAATTTT TTTTATTTTA CAGGTCTTGA
 1601 GGGAAAAATT GATCTTGCCA GCTGTAATTC ATGGTAGAAA AGAAGTGCTC
 CCTTTTFTTA CTAGAACGGT CGACATTAAG TACCATCTTT TCTTCACGAG
 7792.SL
 1651 AGGCTACTTT TCAACAAAGG AGCAGATGTA AACTACATCT TTGAAAGAAA
 TCCGATGAAA AGTTGTTTCC TCGTCTACAT TTGATGTAGA AACTTTCTTT
 7792.SL 1701
 TGGAAATCA TATACTGTTT TGGAAATGAT TAAAGAAAGT TACTCTGAGA
 ACCTTTTAGT ATATGACAAA ACCTTAACTA ATTTCTTTCA ATGAGACTCT
 1751 CACAAAAGAG GTAGCTGAAG TGGTACTCTC AAAGGTACGT GACTAATTAG
 GTGTTTCTC CATCGACTTC ACCATGAGAG TTTCCATGCA CTGATTAATC
 1801 CTATAAAAAG GATCCGGGTT AATTAATTAG TCATCAGGCA GGGCGAGAAC
 GATATTTTTC CTAGGCCCAA TTAATTAATC AGTAGTCCGT CCCGCTCTTG
 H6p→
 1851 GAGACTATCT GCTCGTTAAT TAATTAGAGC TTCTTTATTC TATACTTAAA
 CTCTGATAGA CGAGCAATTA ATTAATCTCG AAGAAATAAG ATATGAATTT
 1901 AAGTGAAAAT AAATACAAAG GTTCTTGAGG GTTGTGTTAA ATTGAAAGCG
 TTCACTTTTA TTTATGTTTC CAAGAACTCC CAACACAATT TAACTTTTCG
 1951 AGAAATAATC ATAAATTATT TCATTATCGC GATATCCGTT AAGTTTGTAT
 TCTTTATTAG TATTTAATAA AGTAATAGCG CTATAGGCAA TTCAAACATA
 VP2-BTV→
 13249JY
 M E E F V I P V Y S E D E I P Y .
 2001 CGTAATGGAG GAGTTCGTGA TCCCCGTGTA CAGCGAGGAC GAGATCCCCT
 GCATACCTC CTCAAGCACT AGGGGCACAT GTCGCTCCTG CTCTAGGGGA
 13250JY
 . . A L L S R Y P L A I Q T N V K I
 2051 ACGCCCTGCT GAGCAGATAC CCTCTGGCCA TCCAGACCAA CGTGAAGATC
 TCGGGGACGA CTCGTCTATG GGAGACCGGT AGGTCTGGTT GCACTTCTAG
 E D V E G K H N V V K I P E S D M .
 2101 GAGGACGTGG AGGGCAAGCA CAACGTGGTG AAGATCCCCG AGAGCGACAT

CTCCTGCACC TCCCGTTCGT GTTGCAACCAC TTCTAGGGGC TCTCGCTGTA
 . I D I P R L T I V E A M N Y K P A .
 2151 GATCGACATC CCCC GGCTGA CCATCGTGGA GGCCATGAAC TACAAGCCCG
 CTAGCTGTAG GGGGCCGACT GGTAGCACCT CCGGTACTTG ATGTTCCGGC
 .. R N D G I V V P R L L D I T L R
 2201 CCAGGAACGA CGGCATCGTG GTGCCTAGAC TGCTGGACAT CACCCGTAGA
 GGTCCCTTGCT GCCGTAGCAC CACGGATCTG ACGACCTGTA GTGGGACTCT
 A Y D D R K S T K S A R G I E F M .
 2251 GCCTACGACG ACCGGAAGAG CACCAAGAGC GCCAGAGGCA TCGAGTTCAT
 CGGATGCTGC TGGCCTTCTC GTGGTTCTCG CCGTCTCCGT AGCTCAAGTA
 . T N A R W M K W A I D D R M D I Q .
 2301 GACCAACGCC CGGTGGATGA AGTGGGCCAT CGACGACAGG ATGGACATCC
 CTGGTTGCGG GCCACCTACT TCACCCGGTA GCTGCTGTCC TACCTGTAGG
 13251JY
 . P L K V T L D H Y C S V N H Q L
 2351 AGCCCTGAA GGTGACCCTG GACCACTACT GCAGCGTGAA TCACCAGCTG
TCGGGGACTT CCACTGGGAC CTGGTGATGA CGTCGCACTT AGTGGTCGAC
 13252JY

F N C V V K A N A A N A D T I Y Y .
 2401 TTCAACTGCG TGGTGAAGGC CAACGCCGCC AATGCCGACA CCATCTACTA
AAGTTGACGC ACCACTTCCG GTTGCGGCGG TTACGGCTGT GGTAGATGAT

. D Y F P L E D H K K R C N H T N L .
 2451 CGACTACTTC CCCCTGGAGG ACCACAAGAA GCGGTGCAAC CACACCAACC
 GCTGATGAAG GGGGACCTCC TGGTGTCTT CGCCACGTTG GTGTGGTTGG
 .. D L L R S L T N M E L F H A L Q
 2501 TGGACCTGCT GAGGAGCCTG ACCAACATGG AGCTGTTCCA CGCCCTGCAG
 ACCTGGACGA CTCCTCGGAC TGGTTGTACC TCGACAAGGT GCGGGACGTC
 G A A Y S I K S S Y E L V A N S E .
 2551 GGAGCCGCCT ACAGCATCAA GAGCAGCTAC GAAC TGGTGG CCAACAGCGA
 CCTCGGCGGA TGTCGTAGTT CTCGTGATG CTTGACCACC GGTGTCGCT
 . R E S L E E T Y A I G Q P K W I H .
 2601 GAGAGAGAGC CTGGAGGAGA CCTACGCCAT CGGCCAGCCT AAGTGGATCC
 CTCTCTCTCG GACCTCCTCT GGATGCGGTA GCCGGTCGGA TTCACCTAGG
 .. L T R G T R I G N S G L P Y E R
 2651 ACCTGACCAG GGGCACCAGA ATCGGCAACA GCGGCCTGCC TTACGAGAGA
 TGGACTGGTC CCCGTGGTCT TAGCCGTTGT CGCCGGACGG AATGCTCTCT
 F I S S M V Q V I V N G K I P S E .
 2701 TTCATCAGCA GCATGGTGCA GGTGATCGTG AACGGCAAGA TCCCTAGCGA
 AAGTAGTCGT CGTACCACGT CCACTAGCAC TTGCCGTTCT AGGGATCGCT
 . I A N E V A Q L N R I R A E W I A .
 2751 GATCGCCAAC GAGGTGGCCC AGCTGAACAG AATCCGGGCC GAGTGGATCG
 CTAGCGGTTG CTCCACCGGG TCGACTTGTC TTAGGCCCGG CTCACCTAGC
 13253JY
 .. A T Y D R G R I R A L E L C K I
 2801 CCGCCACCTA CGACAGAGGC AGGATCAGAG CCCTGGAGCT GTGCAAGATC
GGCGGTGGAT GCTGTCTCCG TCCTAGTCTC GGGACCTCGA CACGTTCTAG
 13254JY
 L S T I G R K I L N T H E E P K D .
 2851 CTGAGCACCA TCGGCCGGAA GATCCTGAAT ACCCAGGAGG AGCCCAAGGA
 GACTCGTGGT AGCCGGCCTT CTAGGACTTA TGGGTGCTCC TCGGGTTCCT

. E M D L S T R F Q F K L D E K F N .
 2901 CGAGATGGAC CTGTCCACCC GGTTCAGTT CAAGCTGGAC GAGAAGTTCA
 GCTCTACCTG GACAGGTGGG CCAAGGTCAA GTTCGACCTG CTCTTCAAGT
 .. R T D P E H V N I F G V R A P A
 2951 ACAGGACCGA CCCCAGACAC GTGAATATCT TCGGAGTGAG GGGCCCTGCC
 TGTCTGGCT GGGGCTCGTG CACTTATAGA AGCCTCACTC CCGGGGACGG
 T D E G R F Y A L I A I A A T D T .
 3001 ACCGACGAGG GCAGATTCTA CGCCCTGATC GCCATTGCCG CCACCGACAC
 TGGCTGCTCC CGTCTAAGAT GCGGGACTAG CGGTAACGGC GGTGGCTGTG
 . Q K G R V W R T N P Y P C L R G A .
 3051 CCAGAAGGGC AGAGTGTGGA GGACCAACCC CTACCCCTTG CTGAGAGGCG
 GGTCTTCCCG TCTCACACCT CCTGGTTGGG GATGGGAACG GACTCTCCGC
 .. L V A A E C E L G D V Y S T L R
 3101 CCCTGGTGGC CGCCGAGTGC GAGCTGGGCG ACGTGTACAG CACCCTGCGG
 GGGACCACCG GCGGCTCACG CTCGACCCGC TGCACATGTC GTGGGACGCC
 R V Y R W S L R P E Y G Q H E R Q .
 3151 AGGGTGTACA GATGGAGCCT GAGACCTGAG TACGGCCAGC ACGAGAGACA
 TCCACATGT CTACCTCGGA CTCTGGACTC ATGCCGGTCG TGCTCTCTGT
 13255JY
 L E N N K Y V F N R I N L F D S N .
 3201 CCTGGAGAAC AACAAGTACG TGTTC AACCG GATCAACCTG TTCGACAGCA
 CGACCTCTTG TTGTTTCATGC ACAAGTTGGC CTAGTTGGAC AAGCTGTCTG
 13256JY
 .. L A V G D Q I I H W R Y E V K A
 3251 ATCTGGCCGT GGGCGACCAG ATCATCCACT GCGGCTACGA GGTGAAGGCC
 TAGACCGGCA CCCGCTGGTC TAGTAGGTGA CCGCGATGCT CCACTTCCGG
 S A E T T Y D S G Y M C R H E V E .
 3301 TCCGCCGAGA CCACCTACGA TAGCGGCTAC ATGTGCAGGC ACGAGGTGGA
 AGGCGGCTCT GGTGGATGCT ATCGCCGATG TACACGTCCG TGCTCCACCT
 . E D E L L C K I N E D K Y K D M L .
 3351 GGAGGACGAG CTGCTGTGTA AGATCAACGA GGACAAGTAC AAGGACATGC
 CCTCTGCTC GACGACACAT TCTAGTTGCT CCTGTTTCATG TTCCTGTACG
 .. D R M I Q G G W D Q E R F K L H
 3401 TGGACCGGAT GATCCAGGGC GGCTGGGATC AGGAGAGGTT CAAGCTGCAC
 ACCTGGCCTA CTAGGTCCCG CCGACCCTAG TCCTCTCCAA GTTCGACGTG
 N I L T D P N L L T I D F E K D A .
 3451 AACATCCTGA CCGACCCCAA CCTGCTGACA ATCGACTTCG AGAAGGACGC
 TTGTAGGACT GGCTGGGGTT GGACGACTGT TAGCTGAAGC TCTTCTGCG
 . Y L N S R S E L V F P D Y F D K W .
 3501 CTACCTGAAC AGCAGAAGCG AGCTGGTGTT CCCCAGTAC TTCGACAAGT
 GATGGACTTG TCGTCTTCGC TCGACCACAA GGGGCTGATG AAGCTGTTCA
 .. I S S P M F N A R L R I T K G E
 3551 GGATCAGCAG CCCCATGTTT AACGCCCCGGC TGAGAATCAC CAAGGGCGAG
 CCTAGTCGTC GGGGTACAAG TTGCGGGCCG ACTCTTAGTG GTTCCCGCTC
 13257JY
 I G T S K K D D P W N N R A V R G .
 3601 ATCGGCACCA GCAAGAAGGA CGACCCCTGG AACAAAGAG CCGTGCGGGG
 TAGCCGTGGT CGTTCTTCTT GCTGGGGACC TTGTTGTCTC GGCACGCCCC
 13258JY
 13257JY
 Y I K S P A E S L D F V L G P Y Y .
 3651 CTACATCAAG AGCCCTGCCG AGTCCCTGGA CTTCGTGCTG GGGCCCTACT

GATGTAGTTC TCGGGACGGC TCAGGGACCT GAAGCACGAC CCGGGGATGA
 13258JY
 .. D L R L L F F G E A L S L K Q E
 3701 ACGATCTGCG GCTGCTGTTC TTCGGCGAGG CCCTGAGCCT GAAGCAGGAG
 TGCTAGACGC CGACGACAAG AAGCCGCTCC GGGACTCGGA CTTGCTCCTC
 Q S A V F Q Y L S Q L D D F P A L .
 3751 CAGAGCGCCG TGTCCAGTA CCTGAGCCAG CTGGACGACT TCCCCGCCCT
 GTCTCGCGGC ACAAGGTCAT GGACTCGGTC GACCTGCTGA AGGGGCGGGA
 . T Q L T G D A V C P H S G G A L Y .
 3801 GACCCAGCTG ACCGSGCAGC CCGTGTGTCC TCACAGCGGC GGAGCCCTGT
 CTGGGTCGAC TGGCCGCTGC GGCACACAGG AGTGTGCGCG CCTCGGGACA
 .. T F R K V A L F L I G N Y E K L
 3851 ACACCTTCAG GAAGGTGGCC CTGTTCTCTGA TCGGCAACTA CGAGAAGCTG
 TGTGGAAAGTC CTTCCACCGG GACAAGGACT AGCCGTTGAT GCTCTTCGAC
 S P D L H E G M E H Q T Y V H P S .
 3901 AGCCCCGACC TGCACGAGGG CATGGAGCAC CAGACCTACG TGCACCCGAG
 TCGGGGCTGG ACGTGTCTCC GTACCTCGTG GTCTGGATGC ACGTGGGGTC
 . T G G T Y Q K C V L E M K D P C Q .
 3951 CACCGGCGGC ACCTACCAGA AATGCGTGCT GGAGATGAAG GACCCCTGCC
 GTGGCCGCCG TGGATGGTCT TTACGCACGA CCTCTACTTC CTGGGGACGG
 .. L M C F V I D Y I F E K R E Q L
 4001 AGCTGATGTG CTTGCTGATC GACTACATCT TCGAGAAGCG GGAGCAGCTG
 TCGACTACAC GAAGCACTAG CTGATGTAGA AGCTCTTCGC CCTCGTCGAC
 13259JY
 R D T K E A R Y I V Y L I Q S L T .
 4051 AGAGACACCA AGGAGGCCCG GTACATCGTG TACCTGATCC AGAGCCTGAC
 TCTCTGTGGT TCCTCCGGGC CATGTAGCAC ATGGACTAGG TCTCGGACTG
 13260JY
 . G I Q R L D V L K S T F P N F F Q .
 4101 CGGCAITCCAG AGACTGGACG TGCTGAAGAG CACCTTCCCC AACTTCTTCC
 GCCGTAGGTC TCTGACCTGC ACGACTTCTC GTGGAAGGGG TTGAAGAAGG
 .. R L L M L K E I K F V R D L N V
 4151 AGCGGCTGCT GATGCTGAAG GAGATCAAGT TTGTGCGGGA CCTGAACGTG
 TCGCCGACGA CTACGACTTC CTCTAGTTCA AACACGCCCT GGACTTGCAC
 I N F L P L M F L V H D N I S Y S .
 4201 ATCAACTTCC TGCCCTGAT GTTCTGCTG CACGACAACA TCAGCTACAG
 TAGTTGAAGG ACGGGGACTA CAAGGACCAC GTGCTGTTGT AGTCGATGTC
 . H R Q W S I P M V L F D D T I K L .
 4251 CCACCGGCAG TGGAGCATCC CTATGGTGCT GTTCGACGAC ACCATCAAGC
 GGTGGCCGTC ACCTCGTAGG GATACCACGA CAAGCTGCTG TGGTAGTTCTG
 .. I P V E V G A Y A N R F G F K S
 4301 TGATCCCTGT GGAAGTGGGC GCCTACGCCA ACAGATTGCG CTTCAAGAGC
 ACTAGGGACA CCTTCACCCG CGGATGCCGT TGTCTAATCC CAAGTTCTCG
 F M N F T R F H P G E S K K K Q I .
 4351 TTCAATGAACT TCACAGGTT CCACCTGGC GAGAGCAAGA AGAAGCAGAT
 AAGTACTTGA AGTGGTCCAA GGTGGGACCG CTCTCGTTCT TCTTCGTCTA
 . A E D V H K E F G V V A F E Y Y T .
 4401 CGCCGAGGAC GTGCACAAGG AGTTGGCGT GGTGGCCTTC GAGTACTACA
 GCGGCTCCTG CACGTGTTCC TCAAGCCGCA CCACCGGAAG CTCATGATGT
 13261JY
 .. N T K I S Q G S V H T P V M T T
 4451 CCAACACCAA GATCAGCCAG GGCAGCGTGC ACACCCCGT GATGACCACC

GGTTGTGGTT CTAGTCGGTC CCGTCGCACG TGTGGGGGCA CTACTGGTGG
13262JY
K M D V L K I H L S S L C A G L A .
4501 AAGATGGATG TGCTGAAAAT CCACCTGAGC AGCCTGTGTG CCGGCCTGGC
TTCTACCTAC ACGACTTTTA GGTGGACTCG TCGGACACAC GGCCGGACCG
. D S I V Y T L P V A H P K K C I V .
4551 CGACAGCATC GTGTACACCC TGCCCGTGGC CCACCCCAAG AAGTGCATCG
GCTGTCGTAG CACATGTGGG ACGGGCACCG GGTGGGGTTC TTCACGTAGC
.. L I I V G D D K L E P H T R S E
4601 TGCTGATCAT TGTGGGCGAC GACAAGCTGG AGCCTCACAC CAGATCCGAG
ACGACTAGTA ACACCCGCTG CTGTTGACC TCGGAGTGTG GTCTAGGCTC
Q I V S R Y N Y S R K H I C G V V .
4651 CAGATCGTGT CCCGTACAA CTACAGCCGG AAGCACATCT GCGGCGTGGT
GTCTAGCACA GGGCCATGTT GATGTCGGCC TTCGTGTAGA CGCCGCACCA
. S V T V G Q N S Q L R V Y T S G I .
4701 GTCCGTGACA GTGGGCCAGA ACAGCCAGCT GAGAGTGTAC ACCAGCGGCA
CAGGCACTGT CACCCGGTCT TGTCGGTCCA CTCTCACATG TGGTCGCCGT
.. V K H R V C D K F I L K H K C K
4751 TCGTGAAGCA CAGAGTGTGC GACAAGTTCA TCCTGAAGCA CAAATGCAAG
AGCACTTCGT GTCTCACACG CTGTTCAAGT AGGACTTCGT GTTACGTTT
13263JY
V I L V R M P G Y V F G N D E L M .
4801 GTGATCCTGG TGAGGATGCC CGGCTACGTG TTCGGCAACG ACGAGCTGAT
CACTAGGACC ACTCCTACGG GCCGATGCAC AAGCCGTTGC TGCTCGACTA
13264JY
13263JY
. T K L L N V * * 42Kp→
4851 GACCAAGCTG CTGAATGTGT GATGACTCGA GTTTTTATTC AAAATTGAAA
CTGGTTCGAC GACTTACACA CTACTGAGCT CAAAAATAAG TTTTAACTTT
13264JY VP5-BTV→
13265.JY
M G K I I K S L S R
4901 ATATATAATT ACAATATAAA ATGGGCAAGA TCATCAAGAG CCTGAGCCGC
TATATATTAA TGTTATATTT TACCCGTTCT AGTAGTTCTC GGACTCGGCG
13266.JY
F G K K V G N A L T S N T A K K I .
4951 TTCGGCAAGA AAGTGGGCAA TGCCCTGACC AGCAACACCG CCAAGAAGAT
AAGCCGTTCT TTCACCCGTT ACGGGACTGG TCGTTGTGGC GGTTCTTCTA
. Y S T I G K A A E R F A E S E I G .
5001 CTACAGCACC ATCGGCAAGG CCGCCGAGAG ATTCGCCGAG ACGGAGATCG
GATGTCGTGG TAGCCGTTCC GCGGCTCTC TAAGCGGCTC TCGCTCTAGC
.. A A T I D G L V Q G S V H S I I
5051 GAGCCGCCAC CATCGACGGC CTGGTGACAG GCAGCGTGCA CAGCATCATC
CTCGGCGGTG GTAGCTGCCG GACCACGTCC CGTCGCACGT GTCGTAGTAG
T G E S Y G E S V K Q A V L L N V .
5101 ACCGGCGAGA GCTACGGCGA GAGCGTGAAG CAGGCCGTGC TGCTGAACGT
TGGCCGCTCT CGATGCCGCT CTCGCACTTC GTCCGGCAGC ACGACTTGCA
. L G T G E E L P D P L S P G E R G .
5151 GCTGGGCACA GCGGAGGAGC TGCCCGACCC CCTGAGCCCT GCGGAGAGAG
CGACCCGTGT CCGCTCCTCG ACGGGCTGGG GGACTCGGGA CCGCTCTCTC
.. I Q T K I K E L E D E Q R N E L

5201 GCATCCAGAC CAAGATCAAG GAGCTGGAGG ACGAGCAGAG AAACGAGCTG
 CGTAGGTCTG GTTCTAGTTC CTCGACCTCC TGCTCGTCTC TTTGCTCGAC
 V R L K Y N K E I T K E F G K E L .
 5251 GTGCGGCTGA AGTACAACAA GGAGATCACC AAGGAGTTCG GCAAGGAACT
 CACGCCGACT TCATGTTGTT CCTCTAGTGG TTCTCAAGC CGTTCCTTGA
 13267.JY
 . E E V Y D F M N G E A K E E E V V .
 5301 GGAAGAGGTG TACGACTTCA TGAACGGCGA GGCCAAGGAG GAGGAGGTGG
CCTTCTCCAC ATGCTGAAGT ACTTGCCGCT CCGGTTCCTC CTCCTCCACC
 13268.JY
 .. Q E Q Y S M L C K A V D S Y E K
 5351 TGCAAGAACA GTACAGCATG CTGTGCAAGG CCGTGGACAG CTACGAGAAG
 ACGTTCTTGT CATGTCGTAC GACACGTTCC GGCACCTGTC GATGCTCTTC
 I L K A E D S K M A M L A R A L Q .
 5401 ATCCTGAAGG CCGAGGACTC CAAGATGGCC ATGCTGGCCA GAGCCCTGCA
 TAGGACTTCC GGCTCCTGAG GTTCTACCGG TACGACCGGT CTCGGGACGT
 . R E A S E R S Q D E I K M V K E Y .
 5451 GAGGGAGGCC AGCGAGAGAA GCCAGGACGA GATCAAGATG GTGAAGGAGT
 CTCCCTCCGG TCGCTCTCTT CGGTCTGCT CTAGTTCTAC CACTTCCTCA
 .. R Q K I D A L K N A I E I E R D
 5501 ACCGGCAGAA GATCGACGCC CTGAAGAACG CCATCGAGAT CGAGAGGGAC
 TGGCCGTCTT CTAGCTGCGG GACTTCTTGC GGTAGCTCTA GCTCTCCCTG
 G M Q E E A I Q E I A G M T A D V .
 5551 GGCATGCAGG AGGAGGCCAT CCAAGAAATC GCCGGCATGA CCGCCGACGT
 CCGTACGTCC TCCTCCGGTA GGTTCCTTAC CGGCCGTACT GGCGGCTGCA
 . L E A A S E E V P L I G A G M A T .
 5601 GCTGGAGGCC GCCAGCGAGG AGGTGCCCCCT GATTGGCGCC GGAATGGCCA
 CGACCTCCGG CGGTCGCTCC TCCACGGGGA CTAACCGCGG CCTTACCGGT
 .. A V A T G R A I E G A Y K L K K
 5651 CCGCCGTGGC CACCGGCAGA GCCATCGAGG GCGCCTACAA GCTGAAGAAG
 GGCGGCACCG GTGGCCGTCT CGGTAGCTCC CGCGGATGTT CGACTTCTTC
 13269.JY
 V I N A L S G I D L S H M R S P K .
 5701 GTGATCAACG CCCTGAGCGG CATCGACCTG AGCCACATGA GGAGCCCCAA
CACTAGTTGC GGGACTCGCC GTAGCTGGAC TCGGTGTACT CCTCGGGGTT
 13270.JY
 . I E P T I I A T T L E H R F K E I .
 5751 GATCGAGCCT ACCATCATCG CCACCACCT GGAGCACCGG TTCAAGGAGA
CTAGCTCGGA TGGTAGTAGC GGTGGTGGGA CCTCGTGGCC AAGTTCCTCT
 .. P D E Q L A V S V L N K K T A V
 5801 TCCTGACGA GCAGCTGGCC GTGTCCGTGC TGAACAAGAA AACCGCCGTG
 AGGCACTGCT CGTCGACCGG CACAGGCACG ACTTGTTCTT TTGGCGGCAC
 T D N C N E I A H I K Q E I L P K .
 5851 ACCGACAAC T GCAACGAGAT CGCCACATC AAGCAGGAGA TCCTGCCCAA
 TGGCTGTTGA CGTTGCTCTA GCGGGTGTAG TTCGTCCTCT AGGACGGGTT
 . F K Q I M D E E K E I E G I E D K .
 5901 GTTCAAGCAG ATCATGGACG AGGAGAAGGA GATCGAGGGC ATCGAGGACA
 CAAGTTCGTC TAGTACCTGC TCCTCTTCCT CTAGCTCCCG TAGCTCCTGT
 .. V I H P R V M M R F K I P R T Q
 5951 AGGTGATCCA CCCCCGGGTG ATGATGAGGT TCAAGATCCC CAGAAGCCAG
 TCCACTAGGT GGGGGCCAC TACTACTCCA AGTTCTAGGG GTCTTGGGTC
 Q P Q I H I Y A A P W D S D D V F .

6001 CAGCCTCAGA TCCACATCTA TGCCGCCCT TGGGACAGCG ACGACGTGTT
 GTCGGAGTCT AGGTGTAGAT ACGGCGGGGA ACCCTGTGCG TGCTGCACAA
 . F F H C V S H H H R N E S F F L G .
 6051 CTTCTTCCAC TGCGTGTCCC ACCACCACAG GAACGAGAGC TTCTTCTGG
 GAAGAAGGTG ACGCACAGGG TGGTGGTGTG CTTGCTCTCG AAGAAGGACC
 .. F D L G I D V V H F E D L T S H
 6101 GCTTCGACCT GGGCATCGAC GTGGTGCCT TCGAGGATCT GACCAGCCAC
 CGAAGCTGGA CCCGTAGCTG CACCACGTGA AGCTCCTAGA CTGGTCGGTG
 13271.JY
 W H A L G L A Q E A S G R T L T E .
 6151 TGGCACGCCC TGGGCCTGGC CCAGGAGGCC TCCGGCAGAA CCCTGACCGA
 ACCGTGCGGG ACCCGGACCG GGTCTCCGG AGGCCGTCTT GGGACTGGCT
 13272.JY
 . A Y R E F L N L S I S S T Y S S A .
 6201 GGCTTACAGG GAGTTCCTGA ACCTGAGCAT CAGCAGCACC TACAGCAGCG
 CCGGATGTCC CTCAAGGACT TGGACTCGTA GTCGTCTGG ATGTCGTGCG
 .. I H A R R M I R S R A V H P I F
 6251 CCATCCACGC CCGGAGAATG ATCAGATCCA GGGCCGTGCA CCCTATCTTT
 GGTAGGTGCG GGCTCTTAC TAGTCTAGGT CCCGGCACGT GGGATAGAAA
 L G S T H Y D I T Y E A L K N N A .
 6301 CTGGGCAGCA CCCACTACGA CATCACCTAC GAGGCCCTGA AAAACAACGC
 GACCCGTGCT GGGTGATGCT GTAGTGGATG CTCCGGGACT TTTTGTGCG
 . Q R I V Y D E E L Q M H I L R G P .
 6351 CCAGCGGATC GTGTACGATG AGGAGCTGCA GATGCACATC CTGAGAGGCC
 GGTGCGCTAG CACATGCTAC TCCTCGACGT CTACGTGTAG GACTCTCCGG
 .. L H F Q R R A I L G A L K F G I
 6401 CTCTGCACTT CCAGAGGAGA GCCATCCTGG GCGCCCTGAA GTTCGGCATC
 GAGACGTGAA GGTCTCCTCT CGGTAGGACC CGCGGGACTT CAAGCCGTAG
 13273.JY
 K I L G D K I D V P L F L R N A
 6451 AAGATCCTGG GCGACAAGAT CGACGTGCCC CTGTTCTCTGA GGAACGCCTG
 TTCTAGGACC CGCTGTTCTA GCTGCACGGG GACAAGGACT CCTTGCGGAC
 13274.JY
 6501 ATGATTTTTA TCTCGAGTCT AGAATCGATC CCGGGTTTTT ATGACTAGTT
 TACTAAAAAT AGAGCTCAGA TCTTAGCTAG GGCCCAAAA TACTGATCAA
 C5L→
 6551 AATCACGGCC GCTTATAAAG ATCTAAAATG CATAATTTCT AAATAATGAA
 TTAGTGCCGG CGAATATTTC TAGATTTTAC GTATTAAAGA TTTATTACTT
 7928.DC
 6601 AAAAAGTACA TCATGAGCAA CGCGTTAGTA TATTTTACAA TGGAGATTAA
 TTTTTCATGT AGTACTCGTT GCGCAATCAT ATAAATGTT ACCTCTAATT
 7793.SL
 6651 CGCTCTATAC CGTTCATGT TTATTGATTC AGATGATGTT TTAGAAAAGA
 GCGAGATATG GCAAGATACA AATAACTAAG TCTACTACAA AATCTTTTCT
 7793.SL
 6701 AAGTTATTGA ATATGAAAAC TTAAATGAAG ATGAAGATGA CGACGATGAT
 TTCAATAACT TATACTTTTG AAATTACTTC TACTTCTACT GCTGCTACTA
 6751 TATTGTTGTA AATCTGTTT AGATGAAGAA GATGACGCGC TAAAGTATAC
 ATAACAACAT TTAGACAAAA TCTACTTCTT CTACTGCGCG ATTTTCATATG
 6801 TATGGTTACA AAGTATAAGT CTATACTACT AATGGCGACT TGTGCAAGAA
 ATACCAATGT TTCATATTCA GATATGATGA TTACCGCTGA ACACGTTCTT

6851 GGTATAGTAT AGTGAAAATG TTGTTAGATT ATGATTATGA AAAACCAAAT
 CCATATCATA TCACTTTTAC AACAATCTAA TACTAATACT TTTTGGTTTA
 6901 AAATCAGATC CATATCTAAA GGTATCTCCT TTGCACATAA TTTCATCTAT
 TTTAGTCTAG GTATAGATTT CCATAGAGGA AACGTGTATT AAAGTAGATA
 7929.DC
 6951 TCCTAGTTTA GAATACCTGC AGCCAAGCTT GGCACCTGGCC GTCGTTTTAC
 AGGATCAAAT CTTATGGACG TCGGTTTCGAA CCGTGACCGG CAGCAAATG
 M13F

C: Secuencia de nucleótidos y traducción del inserto (nucleótidos 1800-6293 de la SEQ ID NO: 19)

VP2-BTV

	M E E F V I P V Y S E D E I P Y .
2001	ATGGAG GAGTTCGTGA TCCCCGTGTA CAGCGAGGAC GAGATCCCCT TACCTC CTCAAGCACT AGGGGACACAT GTCGCTCCTG CTCTAGGGGA .. A L L S R Y P L A I Q T N V K I
2051	ACGCCCTGCT GAGCAGATAC CCTCTGGCCA TCCAGACCAA CGTGAAGATC TGCGGGACGA CTCGTCTATG GGAGACCGGT AGGTCTGGTT GCACTTCTAG E D V E G K H N V V K I P E S D M .
2101	GAGGACGTGG AGGGCAAGCA CAACGTGGTG AAGATCCCCG AGAGCGACAT CTCCTGCACC TCCCGTTCGT GTTGCACCAC TTCTAGGGGC TCTCGCTGTA . I D I P R L T I V E A M N Y K P A .
2151	GATCGACATC CCCC GGCTGA CCATCGTGGA GGCCATGAAC TACAAGCCCG CTAGCTGTAG GGGGCCGACT GGTAGCACCT CCGGTACTTG ATGTTCCGGC .. R N D G I V V P R L L D I T L R
2201	CCAGGAACGA CGGCATCGTG GTGCCTAGAC TGCTGGACAT CACCCTGAGA GGTCCTTGCT GCCGTAGCAC CACGGATCTG ACGACCTGTA GTGGGACTCT A Y D D R K S T K S A R G I E F M .
2251	GCCTACGACG ACCGGAAGAG CACCAAGAGC GCCAGAGGCA TCGAGTTCAT CGGATGCTGC TGGCCTTCTC GTGTTCTCG CGGTCTCCGT AGCTCAAGTA . T N A R W M K W A I D D R M D I Q .
2301	GACCAACGCC CGGTGGATGA AGTGGGCCAT CGACGACAGG ATGDACATCC CTGTTGCGG GCCACCTACT TCACCCGGTA GCTGCTGTCC TACCTGTAGG .. P L K V T L D H Y C S V N H Q L
2351	AGCCCCTGAA GGTGACCCTG GACCACTACT GCAGCGTGAA TCACCAGCTG TCGGGGACTT CCACTGGGAC CTGGTGATGA CGTCGCACTT AGTGGTCGAC F N C V V K A N A A N A D T I Y Y .
2401	TTCAACTGCG TGGTGAAGGC CAACGCCGCC AATGCCGACA CCATCTACTA AAGTTGACGC ACCACTTCCG GTTGCGGCGG TTACGGCTGT GGTAGATGAT . D Y F P L E D H K K R C N H T N L .
2451	CGACTACTTC CCCCTGGAGG ACCACAAGAA GCGGTGCAAC CACACCAACC GCTGATGAAG GGGGACCTCC TGGTGTCTT CGCCACGTTG GTGTGCTTGC .. D L L R S L T N M E L F H A L Q
2501	TGGACCTGCT GAGGAGCCTG ACCAACATGG AGCTGTTCCA CGCCCTGCAG ACCTGGACGA CTCCTCGGAC TGGTTGTACC TCGACAAGGT GCGGGACGTC G A A Y S I K S S Y E L V A N S E .
2551	GGAGCCGCCT ACAGCATCAA GAGCAGCTAC GAACTGGTGG CCAACAGCGA CCTCGGCGGA TGTCGTAGTT CTCGTCGATG CTTGACCACC GGTGTGCTGT . R E S L E E T Y A I G Q P K W I H .
2601	GAGAGAGAGC CTGGAGGAGA CCTACGCCAT CGGCCAGCCT AAGTGGATCC CTCTCTCTCG GACCTCCTCT GGATGCGGTA GCCGGTCGGA TTCACCTAGG

```

.. L T R   G T R   I G N S   G L P   Y E R
2651 ACCTGACCAG GGGCACCAGA ATCGGCAACA GCGGCCTGCC TTACGAGAGA
TGGACTGGTC CCCGTGGTCT TAGCCGTTGT CGCCGGACGG AATGCTCTCT
  F I S S   M V Q   V I V   N G K I   P S E .
2701 TTCATCAGCA GCATGGTGCA GGTGATCGTG AACGGCAAGA TCCCTAGCGA
AAGTAGTCGT CGTACCACGT CCACTAGCAC TTGCCGTTCT AGGGATCGCT
  . I A N   E V A Q   L N R   I R A   E W I A .
2751 GATCGCCAAC GAGGTGGCCC AGCTGAACAG AATCCGGGCC GAGTGGATCG
CTAGCGGTTG CTCCACCGGG TCGACTTGTC TTAGGCCCCG CTCACCTAGC
.. A T Y   D R G   R I R A   L E L   C K I
2801 CCGCCACCTA CGACAGAGGC AGGATCAGAG CCCTGGAGCT GTGCAAGATC
GGCGGTGGAT GCTGTCTCCG TCCTAGTCTC GGGACCTCGA CACGTTCTAG
  L S T I   G R K   I L N   T H E E   P K D .
2851 CTGAGCACCA TCGGCCGGA GATCCTGAAT ACCCACGAGG AGCCCAAGGA
GACTCGTGGT AGCCGGCCTT CTAGGACTTA TGGGTGCTCC TCGGGTTCCT
  . E M D   L S T R   F Q F   K L D   E K F N .
2901 CGAGATGGAC CTGTCCACCC GGTTCAGTT CAAGCTGGAC GAGAAGTTCA
GCTCTACCTG GACAGGTGGG CCAAGGTCAA GTTCGACCTG CTCTTCAAGT
.. R T D   P E H   V N I F   G V R   A P A
2951 ACAGGACCGA CCCCAGACAC GTGAATATCT TCGGAGTGAG GGCCCTGCC
TGTCCTGGCT GGGGCTCGTG CACTTATAGA AGCCTCACTC CCGGGGACGG
  T D E G   R F Y   A L I   A I A A   T D T .
3001 ACCGACGAGG GCAGATTCTA CGCCCTGATC GCCATTGCCG CCACCGACAC
TGGCTGCTCC CGTCTAAGAT GCGGGACTAG CGGTAACGGC GGTGGCTGTG
  . Q K G   R V W R   T N P   Y P C   L R G A .
3051 CCAGAAGGGC AGAGTGTGGA GGACCAACCC CTACCCTTGC CTGAGAGGCG
GGTCTTCCCG TCTCACACCT CCTGGTTGGG GATGGGAACG GACTCTCCGC
.. L V A   A E C   E L G D   V Y S   T L R
3101 CCCTGGTGGC CGCCGAGTGC GAGCTGGGCG ACGTGTACAG CACCCTGCGG
GGGACCACCG GCGGCTCACG CTCGACCCGC TGCACATGTC GTGGGACGCC
  R V Y R   W S L   R P E   Y G Q H   E R Q .
3151 AGGCTGTACA GATGGAGCCT GAGACCTGAG TACGGCCAGC ACGAGAGACA
TCCCACATGT CTACCTCGGA CTCTGGACTC ATGCCGGTCG TGCTCTCTGT
  . L E N   N K Y V   F N R   I N L   F D S N .
3201 GCTGGAGAAC AACAAGTACG TGTCAACCG GATCAACCTG TTCGACAGNA
CGACCTCTTG TTGTTTCATG ACAAGTTGGC CTAGTTGGAC AAGCTGTCGT
.. L A V   G D Q   I I H W   R Y E   V K A
3251 ATCTGGCCGT GGGCGACCAG ATCATCCACT GGCGCTACGA GGTGAAGGCC
TAGACCGGCA CCCGCTGGTC TAGTAGGTGA CCGCGATGCT CCACTTCCGG
  S A E T   T Y D   S G Y   M C R H   E V E .
3301 TCCGCCGAGA CCACCTACGA TAGCGGCTAC ATGTGCAGGC ACGAGGTGGA
AGGCGGCTCT GGTGGATGCT ATCGCCGATG TACACGTCCG TGCTCCACCT
  . E D E   L L C K   I N E   D K Y   K D M L .
3351 GGAGGACGAG CTGCTGTGTA AGATCAACGA GGACAAGTAC AAGGACATGC
CCTCCTGCTC GACGACACAT TCTAGTTGCT CCTGTTTCATG TTCCTGTACG
.. D R M   I Q G   G W D Q   E R F   K L H
3401 TGGACCGGAT GATCCAGGCG GGCTGGGATC AGGAGAGGTT CAAGCTGCAC
ACCTGGCCTA CTAGGTCCCG CCGACCCTAG TCCTCTCCAA GTTCGACGTG
  N I L T   D P N   L L T   I D F E   K D A .
3451 AACATCCTGA CCGACCCCAA CCTGCTGACA ATCGACTTCG AGAAGGACGC
TTGTAGGACT GGCTGGGGTT GGACGACTGT TAGCTGAAGC TCTTCCTGCG
  . Y L N   S R S E   L V F   P D Y   F D K W .

```

3501 CTACCTGAAC AGCAGAAGCG AGCTGGTGT CCCCCTACTAC TTCGACAAGT
 GATGGACTTG TCGTCTTCGC TCGACCACAA GGGGCTGATG AAGCTGTTCA
 .. I S S P M F N A R L R I T K G E
 3551 GGATCAGCAG CCCCATGTTC AACGCCCGGC TGAGAATCAC CAAGGGCGAG
 CCTAGTCGTC GGGGTACAAG TTGCGGGCCG ACTCTTAGTG GTTCCCGCTC
 I G T S K K D D P W N N R A V R G .
 3601 ATCGGCACCA GCAAGAAGGA CGACCCCTGG AACACAGAG CCGTGCAGGG
 TAGCCGTGGT CGTTCTTCCT GCTGGGGACC TTGTGTCTC GGCACGCCCC
 . Y I K S P A E S L D F V L G P Y Y .
 3651 CTACATCAAG AGCCCTGCCG AGTCCCTGGA CTTCGTGCTG GGCCCTACT
 GATGTAGTTC TCGGGACGGC TCAGGGACCT GAAGCACGAC CCGGGGATGA
 .. D L R L L F F G E A L S L K Q E
 3701 ACGATCTGCG GCTGCTGTTC TTCGGCGAGG CCCTGAGCCT GAAGCAGGAG
 TGCTAGACGC CGACGACAAG AAGCCGCTCC GGGACTCGGA CTTCGTCTTC
 Q S A V F Q Y L S Q L D D F P A L .
 3751 CAGAGCGCCG TGTTCAGTA CCTGAGCCAG CTGGACGACT TCCCCGCCCT
 GTCTCGCGGC ACAAGGTCAT GGAATCGGTC GACCTGCTGA AGGGGCGGGA
 . T Q L T G D A V C P H S G G A L Y .
 3801 GACCCAGCTG ACCGGCGACG CCGTGTGTCC TCACAGCGGC GGAGCCCTGT
 CTGGGTCGAC TGGCCGCTGC GGCACACAGG AGTGTCGCCG CCTCGGGACA
 .. T F R K V A L F L I G N Y E K L
 3851 ACACCTTCAG GAAGGTGGCC CTGTTCTGA TCGGCAACTA CGAGAAGCTG
 TGTGGAAGTC CTTCCACCGG GACAAGGACT AGCCGTTGAT GCTCTTCGAC
 S P D L H E G M E H Q T Y V H P S .
 3901 AGCCCCGACC TGCACGAGGG CATGGAGCAC CAGACCTACG TGCACCCCAG
 TCGGGGCTGG ACGTGCTCCC GTACCTCGTG GTCTGGATGC ACGTGGGGTC
 . T G G T Y Q K C V L E M K D P C Q .
 3951 CACCGGCGGC ACCTACCAGA AATGCGTGCT GGAGATGAAG GACCCCTGCC
 GTGGCCGCGC TGGATGGTCT TTACGCACGA CCTCTACTTC CTGGGGACGG
 .. L M C F V I D Y I F E K R E Q L
 4001 AGCTGATGTG CTTCTGATC GACTACATCT TCGAGAAGCG GGAGCAGCTG
 TCGACTACAC GAAGCACTAG CTGATGTAGA AGCTCTTCGC CCTCGTCGAC
 R D T K E A R Y I V Y L I Q S L T .
 4051 AGAGACACCA AGGAGGCCCG GTACATCGTG TACCTGATCC AGAGCCTGAC
 TCTCTGTGGT TCCTCCGGGC CATGTAGCAC ATGGACTAGG TCTCGGACTG
 . G I Q R L D V L K S T F P N F F Q .
 4101 CGGCATCCAG AACTGGACG TGCTGAAGAG CACCTTCCCC AACTTCTTCC
 GCCGTAGGTC TCTGACCTGC ACGACTTCTC GTGGAAGGGG TTGAAGAAGG
 .. R L L M L K E I K F V R D L N V
 4151 AGCGGCTGCT GATGCTGAAG GAGATCAAGT TTGTGCGGGA CCTGAACGTG
 TCGCCGACGA CTACGACTTC CTCTAGTTCA AACACGCCCT GGAATTGCAC
 I N F L P L M F L V H D N I S Y S .
 4201 ATCAACTTCC TGCCCTGAT GTTCCTGGTG CACGACAACA TCAGCTACAG
 TAGTTGAAGG ACGGGGACTA CAAGGACCAC GTGCTGTTGT AGTCGATGTC
 . H R Q W S I P M V L F D D T I K L .
 4251 CCACCGGCAG TGGAGCATCC CTATGGTGCT GTTCGACGAC ACCATCAAGC
 GGTGGCCGTC ACCTCGTAGG GATACCACGA CAAGCTGCTG TGGTAGTTCTG
 .. I P V E V G A Y A N R F G F K S
 4301 TGATCCCTGT GGAAGTGGGC GCCTACGCCA ACAGATTCGG CTTCAGAGC
 ACTAGGGACA CCTTCACCCG CGGATGCGGT TGTCTAAGCC GAAGTTCTCG
 F M N F T R F H P G E S K K K Q I .
 4351 TTCATGAAGT TCACCAGGTT CCACCCCTGGC GAGAGCAAGA AGAAGCAGAT

```

AAGTACTTGA AGTGGTCCAA GGTGGGACCG CTCTCGTTCT TCTTCGTCTA
. A E D V H K E F G V V A F E Y Y T .
4401 CGCCGAGGAC GTGCACAAGG AGTTCGGCGT GGTGGCCTTC GAGTACTACA
GCGGCTCCTG CACGTGTTCC TCAAGCCGCA CCACCGGAAG CTCATGATGT
.. N T K I S Q G S V H T P V M T T
4451 CCAACACCAA GATCAGCCAG GGCAGCGTGC ACACCCCGT GATGACCACC
GGTTGTGGTT CTAGTCGGTC CCGTCGCACG TGTGGGGGCA CTACTGGTGG
K M D V L K I H L S S L C A G L A .
4501 AAGATGGATG TGCTGAAAAT CCACCTGAGC AGCCTGTGTG CCGGCCTGGC
TTCTACCTAC ACGACTTTTA GGTGGACTCG TCGGACACAC GGCCGGACCG
. D S I V Y T L P V A H P K K C I V .
4551 CGACAGCATC GTGTACACCC TGCCCGTGGC CCACCCCAAG AAGTGCATCG
GCTGTCTAG CACATGTGGG ACGGGCACCG GGTGGGGTTC TTCACGTAGC
.. L I I V G D D K L E P H T R S E
4601 TGCTGATCAT TGTGGGCGAC GACAAGCTGG AGCCTCACAC CAGATCCGAG
ACGACTAGTA ACACCCGCTG CTGTTGACC TCGGAGTGTG GTCTAGGCTC
Q I V S R Y N Y S R K H I C G V V .
4651 CAGATCGTGT CCCGGTACAA CTACAGCCGG AAGCACATCT GCGGCGTGGT
GTCTAGCACA GGGCCATGTT GATGTCGGCC TTCGTGTAGA CGCCGCACCA
. S V T V G Q N S Q L R V Y T S G I .
4701 GTCCGTGACA GTGGGCCAGA ACAGCCAGCT GAGAGTGTAC ACCAGCGGCA
CAGGCACTGT CACCCGGTCT TGTCGGTCTGA CTCTCACATG TGGTCGCCGT
.. V K H R V C D K F I L K H K C K
4751 TCGTGAAGCA CAGAGTGTGC GACAAGTTCA TCCTGAAGCA CAAATGCAAG
AGCACTTCGT GTCTCACACG CTGTTCAAGT AGGACTTCGT GTTTACGTTT
V I L V R M P G Y V F G N D E L M .
4801 GTGATCCTGG TGAGGATGCC CGGCTACGTG TTCGGCAACG ACGAGCTGAT
CACTAGGACC ACTCCTACGG GCCGATGCAC AAGCCGTTGC TGCTCGACTA
. T K L L N V * *
4851 GACCAAGCTG CTGAATGTGT GATGACTCGA GTTTTTTATTC AAAATTGAAA
CTGGTTCGAC GACTTACACA CTACTGAGCT CAAAAATAAG TTTTAACTTT
VP5-HIV M G K I I K S L S R
4901 ATATATAATT ACAATATAAA ATGGGCAAGA TCATCAAGAG CCTGAGCCGC
TATATATTAA TGTTATATTT TACCCGTTCT AGTAGTTCTC GGA CTGCGGCG
F G K K V G N A L T S N T A K K I .
4951 TTCGGCAAGA AAGTGGGCAA TGCCCTGACC AGCAACACCG CCAAGAAGAT
AAGCCGTTCT TTCACCCGTT ACGGGACTGG TCGTTGTGGC GGTTCCTCTA
. Y S T I G K A A E R F A E S E I G .
5001 CTACAGCACC ATCGGCAAGG CCGCCGAGAG ATTCGCCGAG AGCGAGATCG
GATGTCGTGG TAGCCGTTCC GGCGGCTCTC TAAGCGGCTC TCGCTCTAGC
.. A A T I D G L V Q G S V H S I I
5051 GAGCCGCCAC CATCGACGGC CTGGTGCAGG GCAGCGTGCA CAGCATCATC
CTCGGCGGTG GTAGCTGCCG GACCACGTCC CGTCGCACGT GTCGTAGTAG
T G E S Y G E S V K Q A V L L N V .
5101 ACCGGCGAGA GCTACGGCGA GAGCGTGAAG CAGGCCGTGC TGCTGAACGT
TGCCCGCTCT CGATGCCGCT CTCGCACTTC GTCCGGCACG ACGACTTGCA
. L G T G E E L P D P L S P G E R G .
5151 GCTGGGCACA GGCGAGGAGC TGCCCGACCC CCTGAGCCCT GGCGAGAGAG
CGACCCGTGT CCGCTCCTCG ACGGGCTGGG GGA CTGCGGA CCGCTCTCTC
.. I Q T K I K E L E D E Q R N E L
5201 GCATCCAGAC CAAGATCAAG GAGCTGGAGG ACGAGCAGAG AAACGAGCTG
CGTAGGTCTG GTTCTAGTTC CTCGACCTCC TGCTCGTCTC TTTGCTCGAC

```

V R L K Y N K E I T K E F G K E L .
 5251 GTGCGGCTGA AGTACAACAA GGAGATCACC AAGGAGTTCG GCAAGGAAC T
 CACGCCGACT TCATGTTGTT CCTCTAGTGG TTCCTCAAGC CGTTCCTTGA
 . E E V Y D F M N G E A K E E E V V .
 5301 GGAAGAGGTG TACGACTTCA TGAACGGCGA GGCCAAGGAG GAGGAGGTGG
 CCTTCTCCAC ATGCTGAAGT ACTTGCCGCT CCGGTTCCCTC CTCCTCCACC
 .. Q E Q Y S M L C K A V D S Y E K
 5351 TGCAAGAACA GTACAGCATG CTGTGCAAGG CCGTGGACAG CTACGAGAAG
 ACGTTCTTGT CATGTCGTAC GACACGTTCC GGCACCTGTC GATGCTCTTC
 I L K A E D S K M A M L A R A L Q .
 5401 ATCCTGAAGG CCGAGGACTC CAAGATGGCC ATGCTGGCCA GAGCCCTGCA
 TAGGACTTCC GGCTCCTGAG GTTCTACCGG TACGACCGGT CTCGGGACGT
 . R E A S E R S Q D E I K M V K E Y .
 5451 GAGGGAGGCC AGCGAGAGAA GCCAGGACGA GATCAAGATG GTGAAGGAGT
 CTCCCTCCGG TCGCTCTCTT CGGTCCCTGCT CTAGTTCTAC CACTTCTCTCA
 .. R Q K I D A L K N A I E I E R D
 5501 ACCGGCAGAA GATCGACGCC CTGAAGAACG CCATCGAGAT CGAGAGGGAC
 TGGCCGTCTT CTAGCTGCGG GACTTCTTGC GGTAGCTCTA GCTCTCCCTG
 G M Q E E A I Q E I A G M T A D V .
 5551 GGCATGCAGG AGGAGGCCAT CCAAGAAATC GCCGGCATGA CCGCCGACGT
 CCGTACGTCC TCCTCCGGTA GGTTCTTTAG CGGCCGTACT GGCGGCTGCA
 . L E A A S E E V P L I G A G M A T .
 5601 GCTGGAGGCC GCCAGCGAGG AGGTGCCCC TATTGGCGCC GGAATGGCCA
 CGACCTCCGG CGGTGCTCC TCCACGGGA CTAACCGCG CTTACCGGT
 .. A V A T G R A I E G A Y K L K K
 5651 CCGCCGTGGC CACCGGCAGA GCCATCGAGG GCGCCTACAA GCTGAAGAAG
 GGCGGCACCG GTGGCCGTCT CGGTAGCTCC CGCGGATGTT CGACTTCTTC
 V I N A L S G I D L S H M R S P K .
 5701 GTGATCAACG CCCTGAGCGG CATCGACCTG AGCCACATGA GGAGCCCCAA
 CACTAGTTGC GGGACTCGCC GTAGCTGGAC TCGGTGTACT CCTCGGGGTT
 . I E P T I I A T T L E H R F K E I .
 5751 GATCGAGCCT ACCATCATCG CCACCACCCT GGAGCACCGG TTCAAGGAGA
 CTAGCTCGGA TGGTAGTAGC GGTGGTGGGA CCTCGTGGCC AAGTTCCTCT
 .. P D E Q L A V S V L N K K T A V
 5801 TCCCTGACGA GCAGCTGGCC GTGTCCGTGC TGAACAAGAA AACCGCCGTG
 AGGGACTGCT CGTCGACCGG CACAGGCACG ACTTGTCTT TTGGCGGCAC
 T D N C N E I A H I K Q E I L P K .
 5851 ACCGACAAC T GCAACGAGAT CGCCCACATC AAGCAGGAGA TCCTGCCCAA
 TGGCTGTTGA CGTTGCTCTA GCGGGTGTAG TTCGTCTCTT AGGACGGGTT
 . F K Q I M D E E K E I E G I E D K .
 5901 GTTCAAGCAG ATCATGGACG AGGAGAAGGA GATCGAGGGC ATCGAGGACA
 CAAGTTCGTC TAGTACCTGC TCCTCTTCCT CTAGCTCCCG TAGCTCCTGT
 .. V I H P R V M M R F K I P R T Q
 5951 AGGTGATCCA CCCCCGGGTG ATGATGAGGT TCAAGATCCC CAGAACCAG
 TCCACTAGGT GGGGGCCCCAC TACTACTCCA AGTTCTAGGG GTCTTGGGTC
 Q P Q I H I Y A A P W D S D D V F .
 6001 CAGCCTCAGA TCCACATCTA TGCCGCCCC TGGGACAGCG ACGACGTGT
 GTCGGAGTCT AGGTGTAGAT ACGGCGGGGA ACCCTGTGCG TGCTGCACAA
 . F F H C V S H H H R N E S F F L G .
 6051 CTTCCTCCAC TCGGTGTCCC ACCACCACAG GAACGAGAGC TTCTTCCTGG
 GAAGAAGGTG ACGCACAGGG TGGTGGTGTG CTTGCTCTCG AAGAAGGACC
 .. F D L G I D V V H F E D L T S H

6101 GCTTCGACCT GGGCATCGAC GTGGTGC ACT TCGAGGATCT GACCAGCCAC
CGAAGCTGGA CCCGTAGCTG CACCACGTGA AGCTCCTAGA CTGGTCGGTG
W H A L G L A Q E A S G R T L T E .
6151 TGGCACGCCC TGGGCCTGGC CCAGGAGGCC TCCGGCAGAA CCCTGACCGA
ACCGTGCGGG ACCCGGACCG GGTCTCCGG AGGCCGTCTT GGGACTGGCT
. A Y R E F L N L S I S S T Y S S A .
6201 GGCCTACAGG GAGTTCCTGA ACCTGAGCAT CAGCAGCACC TACAGCAGCG
CCGGATGTCC CTCAAGGACT TGGACTCGTA GTCGTCGTGG ATGTCGTGCG
. . I H A R R M I R S R A V H P I F
6251 CCATCCACGC CCGGAGAATG ATCAGATCCA GGGCCGTGCA CCCTATCTTT
GGTAGGTGCG GGCCTCTTAC TAGTCTAGGT CCCGGCACGT GGGATAGAAA
L G S T H Y D I T Y E A L K N N A .
6301 CTGGGCAGCA CCCACTACGA CATCACCTAC GAGGCCCTGA AAAACAACGC
GACCCGTCGT GGGTGATGCT GTAGTGATG CTCCGGGACT TTTTGTGCG
. Q R I V Y D E E L Q M H I L R G P .
6351 CCAGCGGATC GTGTACGATG AGGAGCTGCA GATGCACATC CTGAGAGGCC
GGTCGCCTAG CACATGCTAC TCCTCGACGT CTACGTGTAG GACTCTCCGG
. . L H F Q R R A I L G A L K F G I
6401 CTCTGCACTT CCAGAGGAGA GCCATCCTGG GCGCCCTGAA GTTCGGCATC
GAGACGTGAA GGTCTCCTCT CGGTAGGACC CGCGGGACTT CAAGCCGTAG
K I L G D K I D V P L F L R N A
6451 AAGATCCTGG GCGACAAGAT CGACGTGCCC CTGTTCTGA GGAACGCC
TTCTAGGACC CGCTGTTCTA GCTGCACGGG GACAAGGACT CCTTGCGG

**D: Secuencia teórica del vector entero: (no comentado para usar
en programas de ADN) (SEQ ID NO: 22)**

gcgcccaatacgcgaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcagcaca
gggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattag
gcaccccaaggctttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataaca
atttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgaattgcggccgcaattctgaatgttaaattg
ttatactttggatgaagctataaaatgcatgtgaaaaataatccatttaaagaaaggattcaaa
tactacaaaacctaagcgataaatatgttaactaagcttattcttaacgacgctttaaataacac
aaataaacataatttttgtataacctaacaataactaaaaacataaaaaataaaaaggaaatgt
aatatcgtaattatttttactcaggaatgggggttaaatatttatatcacgtgtatatctatactgt
tatactatactctttacaattactattacgaatatgcaagagataataagattacgtatttaaga
gaatcttgtcatgataattgggtacgacatagtgataaatgctatttcgcatcggttacataaagt
cagttggaaagatggatttgacagatgtaacttaataggtgcaaaaatgttaataacagcattc
tatcggaagataggataaccagttatattatacaaaaaatcactggttgataaaacagattctgca
atattcgtaaaaagatgaagattactgcgaattttgtaaactatgacaataaaaagccatttatctc
aacgacatcgtgtaattcttccatgttttatgtatgtgtttcagatattatgagattactataaa
ctttttgtatacttatattccgtaaactatattaatcatgaagaaaatgaaaaagtatagaagct
gttcacgagcgggttgttgaaaacaacaaaattatacattcaagatggcttacatatacgtctgtg
aggctatcatggataaatgacaatgcatctctaaatagggtttttggacaatggattcgaccctaac
acggaatatggtaactctacaatctcctcttgaaatggctgtaattgttcaagaataccgaggtat
aaaaatcttgatgaggtatggagctaaacctgtagttactgaatgcacaacttcttgtctgcatg
atgcggtgttgagagacgactacaaaaatagtgaagatctgttgaagaataactatgtaacaat
gttctttacagcggaggtttactcctttgtgtttggcagcttaccttaacaaagttaatttgggt
taaaacttctattggctcattcggcggatgtagatatttcaaacacggatcggttaactcctctac
atatagccgtatcaataaaaaatttaacaatggttaaaacttctattgaacaaaggtgctgatact
gacttgctggataacatgggacgtactcctttaatgatcgctgtacaatctggaaaatattgaaat
atgtagcacactacttaaaaaaaaaataaatgtccagaactgggaaaaattgatcttgcagctgtg

aattcatggtagaaaagaagtgtctcaggctacttttcaacaaaggagcagatgtaaactacatct
ttgaaagaaatggaaaatcatatactgttttggattgattaaagaaagttactctgagacacaa
aagaggtagctgaagtggtagctctcaaaggtagctgactaattagctataaaaaaggatccgggtt
aattaattagtcacaggcagggcgagaacgagactatctgctcgttaattaattagagcttctt
tattctatacttaaaaagtgaataaaatacaaaaggttcttgagggttctgtttaaattgaaagcg
agaaataatcataaattattttcattatcgcgatatccgttaagtttctatcgtaatggaggagt
cgtgatccccgtgtacagcgaggacgagatccctacgcctgctgagcagataccctctggcca
tcagaccaacgtgaagatcgaggacgtggagggaagcacaacgtggtgaagatccccgagagc
gacatgatcgacatccccgggtgacctcgtggaggccatgaactacaagcccgccaggaaacga
cggcatcgtggtgcttagactgctggacatcacctgagagcctacgacgacccggaagagcacca
agagcgccagaggcatcgagttcatgaccaacgcctgggtggatgaagtgggcatcgacgacagg
atggacatccagccctgaaggtgacctggacctactgcagcgtgaatcaccagctgttcaa
ctgctggtgaaggccaacgcctgcaatgcccacaccatctactacgactacttccccctggagg
accacaagaagcgtgcaaccacaccaacctggacctgctgaggagcctgaccaacatggagctg
ttccacgcctgacaggagccgctacagcatcaagagcagctacgaactggtggccaacagcga
gagagagagcctggaggagacctacgcctcggccagcctaagtggatccacctgaccaggggca
ccagaatcggcaacagcggcctgcttacgagagattcatcagcagcatggtgaggtgatcgtg
aacggcaagatccctagcgagatcgccaacgaggtggccagctgaacagaatccgggcccagtg
gatcgccgcccacctacgacagaggcaggatcagagcctggagctgtgcaagatcctgagcacca
tcggccggaagatcctgaatccccacgaggagcccaaggacgagatggacctgtccacccgggtc
cagttcaagctggaacgagaagttcaacaggaccccgagcagcagtgaaatatcttcggagtga
ggccctgcccacgacgagggcagattctacgcctgatcgccattgcccacacgacacccaga
agggcagagtggtggaggaccaacccctaccttgctgagaggcgccctggtggccgcccagtg
gagctggcgacgtgtacagcacctgcccggaggtgtacagatggagcctgagacctgagtacgg
ccagcagagagacagctggagaacaacaagtagtggttcaacggatcaacctgttcgacagca
atctggccgtggcgacacagatcatccactggcgctacgaggtgaaggcctccgcccagaccc
tacgatagcggctacatgtgcaggcacgaggtggaggaggacgagctgctgtgaagatcaacga
ggacaagtacaaggacatgctggaccggatgatccaggccgctgggatcaggagaggttcaagc
tgcaacaacatcctgacgcaccccaacctgctgacaatcgacttcgagaaggacgcctacctgaac
agcagaagcgagctggtgttccccgactacttcgacaagtggatcagcagccccatgttcaacgc
ccggtgagaatcaccaagggcgagatcggcaccagcaagaaggacgacccctggaacaacagag
ccgtgcccgggtacatcaagagccctgcgagtccttggacttcgtgctgggcccctactacgat
ctgcccgtgctgttcttcggcgaggccctgagcctgaagcaggagcagagcgccgtgttccagta
cctgagccagctggacgacttccccgcctgacccagctgacggcgacgcctgtgtcctcaca
gcccggagccctgtacaccttcaggaaggtggccctgttctctgatcggcaactacgagaagctg
agccccgacctgcacgagggcagtgagcaccagacctacgtgcaccccgacccggcgccacct
ccagaaatgcgtgctggagatgaaggacccctgccagctgatgtgcttcgtgatcgactacatct
tcgagaagcgggagcagctgagagacaccaaggaggcccggtacatcgtgtacctgatccagagc
ctgaccggcatccagagactggacgtgctgaagagcaccttccccaaacttctccagcggtgct
gatgctgaaggagatcaagtttctgctgggacctgaacgtgatcaacttctgcccctgatgttcc
tggtgcacgacaacatcagctacagccacggcagtgaggatccctatggtgctgttcgacgac
accatcaagctgatccctgtggaagtggcgccctacgccaacagattcggcttcaagagcttcat
gaacttaccaggttccacctggcgagagcaagaagaagcagatcgccgaggacgtgcacaagg
agttccggcgtggtggccttcgagtactacaccaacaccaagatcagccagggcagcgtgcacac
cccgtgatgaccaccaagatggatgtgctgaaaatccacctgagcagcctgtgtgcccgcctggc
cgacagcatcgtgtacacctgcccgtggccaccccaagaagtgcacgtgctgatcattgtgg
gcgacgacaagctggagcctcacaccagatccgagcagatcgtgtcccgttacaactacagccg
aagcacatctgcggcgtggtgtccgtgacagtgggccagaacagccagctgagagtgtaaccag
cggcatcgtgaagcacagagtggtgcgacaagttcatcctgaagcacaaatgcaaggtgatccgtg
tgaggatgcccggctacgtgttcggcaacgacgagctgatgaccaagctgctgaatgtgtgatga
ctcgagtttttattcaaaattgaaaatatataattacaatatataaatgggcaagatcatcaagag
cctgagccgcttcggcaagaaagtgggcaatgcctgaccagcaacacccgccaagaagatctaca

gcaccatcggaaggccgcgagagattcgccgagagcgagatcggaagccaccatcgacggc
 ctggtgcaggccagcgtgcacagcatcatcaccggcgagagctacggcgagagcgtgaagcaggc
 cgtgctgctgaacgtgctgggcacaggcgaggagctgcccgaacccctgagccctggcgagagag
 gcatccagaccaagatcaaggagctggaggacgagcagagaaacgagctggtgcggctgaagtac
 aacaaggagatcaccaaggagtccggcaaggaaactggaagaggtgtacgacttcatgaacggcga
 ggccaaggaggaggaggtggtgcaagaacagtacagcatgctgtgcaaggccgtggacagctacg
 agaagatcctgaaggccgaggactccaagatggccatgctggccagagccctgcagaggaggcc
 agcgagagaagccaggacgagatcaagatggtgaaggagtacggcgagaagatcgacgcccga
 gaacgccatcgagatcgagagggaaggcatgcaggaggaggccatccaagaaatcgccggcatga
 ccggcgacgtgctggaggccgcgcagcgaggaggtgcccctgattggcgccggaatggccaccg
 gtggccaccggcgagagccatcgaggggccctacaagctgaagaagggtgatcaacgccctgagcgg
 catcgacctgagccacatgaggagccccaagatcgagccctaccatcatcgccaccaccctggagc
 accggttcaaggagatccctgacgagcagctggccgtgtccgtgctgaacaagaaaaccgccgtg
 accgacaactgcaacgagatcgccacatcaagcaggagatcctgcccgaagttcaagcagatcat
 ggacgaggagaaggagatcgaggccatcgaggacaagggtgatccacccccgggtgatgatgagg
 tcaagatcccagaaccagcagccctcagatccacatctatgcgcgcccttgggacagcgacgac
 gtgttcttcttccactgcgtgtcccaccaccacaggaacgagagcttcttccctgggttcgacct
 gggcatcgacgtggtgcacttcgaggatctgaccagccactggcagccctgggcccggccagg
 aggcctccggcgagaacccctgaccgaggccctacaggggagttccctgaacctgagcatcagcagcacc
 tacagcagcgccatccacgcccggagaatgatcagatccaggggccgtgcaccctatcttctggg
 cagcaccaccactacgacatccctacgaggccctgaaaaacaacgcccagcggatcgtgtacgatg
 aggagctgcagatgcacatccctgagaggccctctgcacttcagaggagagccatcctggggcc
 ctgaagttccggcatcaagatccctgggcgacaagatcgacgtgcccctgttccctgaggaaagcgtg
 atgatttttatctcgagtctagaatcgatcccggttttttatgactagttaatcacggccgctta
 taaagatctaaaatgcataattttctaataatgaaaaaaagtacatcatgagcaacgcgttagta
 tattttacaatggagattaaacgctctataccgttctatgtttattgattcagatgatgttttaga
 aaagaaagttattgaatatgaaaacttttaataagatgaagatgacgacgatgattattgttga
 aatctgttttagatgaagaagatgacgcgctaaagtatactatggttacaaagtataagttctata
 ctactaatggcgacttgtgcaagaagggtatagttatagtgaagaatgttggtagattatgattatga
 aaaaccaaataaatcagatccatctctaaaggtatctcctttgcacataatttcatctatctcta
 gtttagaataacctgcagccaagcttggcactggccgtcgttttacaacgtcgctgactgggaaaac
 cctggcggttaccacaacttaatgcgcttgcagcacaatcccccttccgccagctggcgtaataagcga
 agaggcccgacccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgccctgatgc
 ggtattttctccttaacgcatctgtgcggtatttcacacgcgcatatggtgcactctcagtacaatc
 tgcctctgatgcgcgcatagtttaagccagcccccgaaccccgcccaaccccgctgacgcgcccctgacg
 ggttctgtctgctcccgcatccgcttacagacaagctgtgacgctctccgggagctgcagtgctc
 agaggttttcacggtcatcaccgaaaacgcgcgagacgaaaggccctcgtgatacgcctattttta
 taggttaattgtcatgataataatgggttcttagacgtcagggtggcacttttccggggaaatgtgcg
 cggaaacccctatttgtttatttttctaataacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataac
 cctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcc
 ctatttcccttttttgggcatttttgccttctgtttttgtcaccagaaaacgctgggtgaaagt
 aaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggta
 agatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaaagttctgcta
 tgtggcgcggtattatcccgatttgacgcggggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattc
 tcagaatgacttgggttagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaa
 gagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataaacactgcccgaacttacttctgacaacg
 atcgaggagaccgaaggagctaacgcgttttttgcaaacatgggggatcatgtaactcgccctga
 tcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtag
 caatggcaacaacggttgcgcaactattaactggcgaactacttactctagetttccgggcaacaa
 ttaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcgcccttccggctgg
 ctggtttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactgg
 ggcagatggtaagccctccgctatcgtagttatctacacgacggggagttaggcaactatggat

gaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagacca
 agtttactcatatatacttttagattgattttaaacttcatttttaattttaaaggatctaggtga
 agatccctttttgataatctcatgacccaaatcccttaacgtgagttttcggtccactgagcgtca
 gaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccctttttctgcgcgtaatctgctgctt
 gcaaacaaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgcgggatcaagagctaccaactcttt
 ttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtag
 ttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaactctgttacc
 agtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggaactcaagacgatagttaccgg
 ataaggcgcagcggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggaagcgaacgacc
 tacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggccacgcttcccgaaggagaaa
 ggcggacaggtatccggttaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggg
 gaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatctttg
 tgatgctcgtcaggggggaggagcctatggaaaaacgcagcaacgcggcctttttacggttcct
 ggccttttgctggccttttgctcacatggttctttcctgcgttatccctgattctgtggataacc
 gtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcagtc
 gtgagcgaggaagcgggaaga

Fig. 11

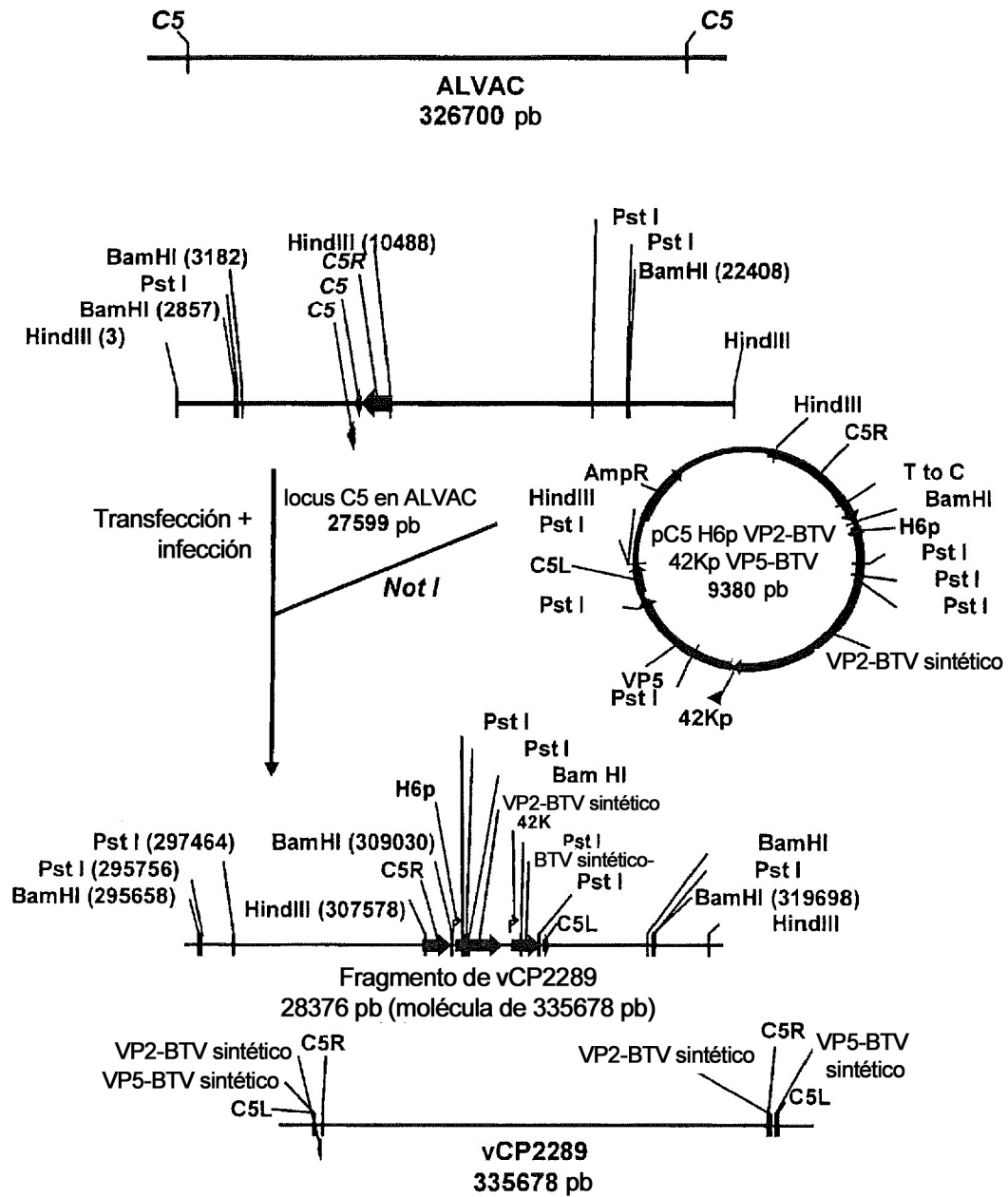
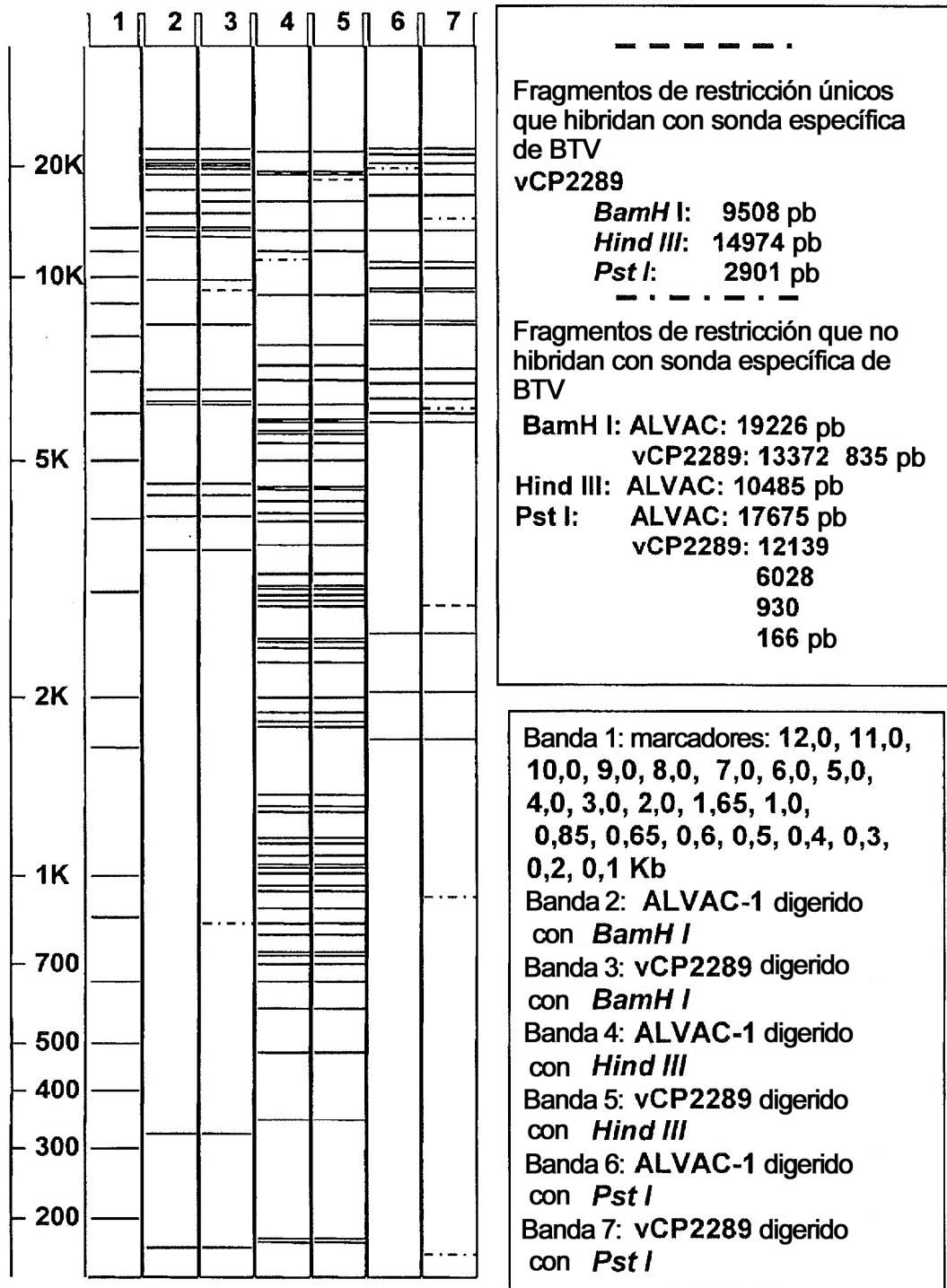


Fig. 12

**Fig. 13**

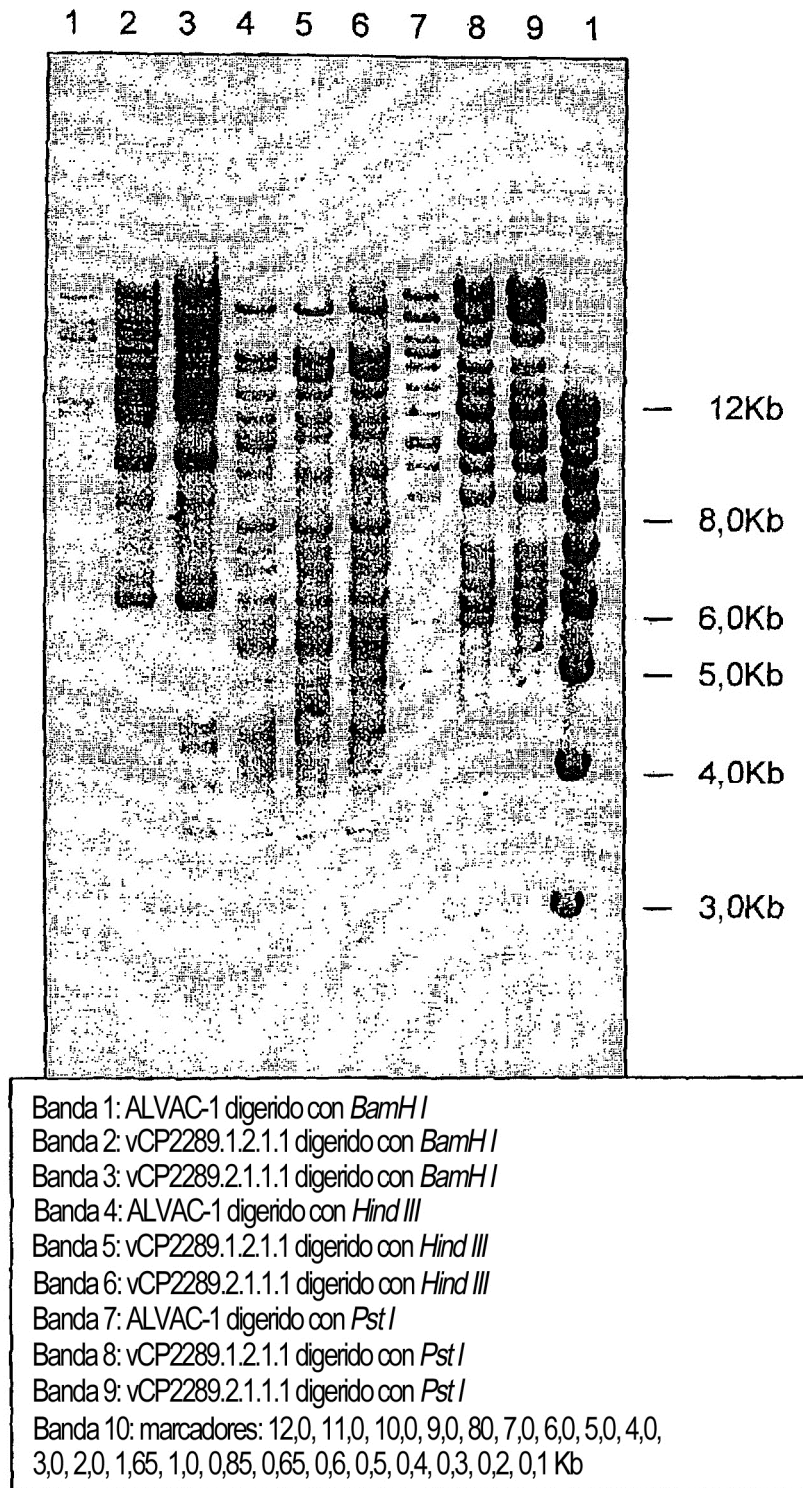
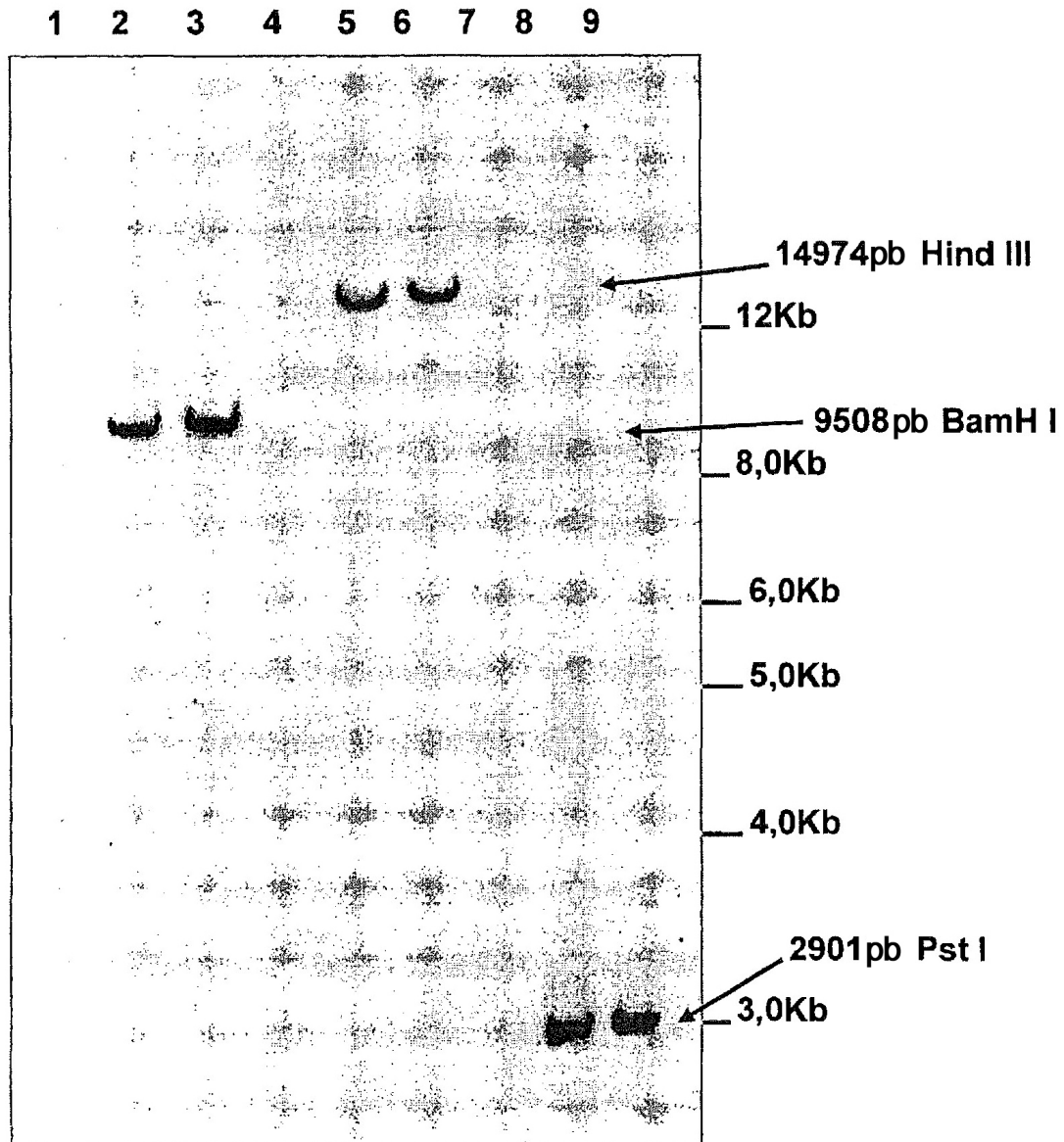


Fig. 14



Sonda: Sonda específica de BTV

Banda 1: ALVAC-1 digerido con *BamH I*

Banda 2: vCP2289.1.2.1.1 digerido con *BamH I*

Banda 3: vCP2289.2.1.1.1 digerido con *BamH I*

Banda 4: ALVAC-1 digerido con *Hind III*

Banda 5: vCP2289.1.2.1.1 digerido con *Hind III*

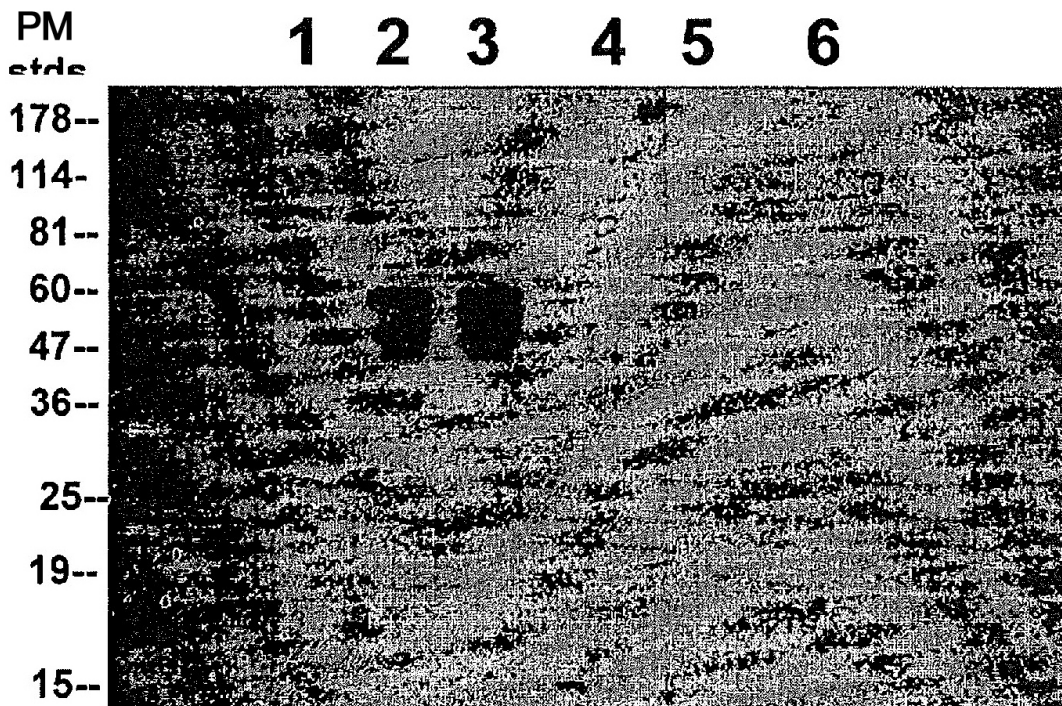
Banda 6: vCP2289.2.1.1.1 digerido con *Hind III*

Banda 7: ALVAC-1 digerido con *Pst I*

Banda 8: vCP2289.1.2.1.1 digerido con *Pst I*

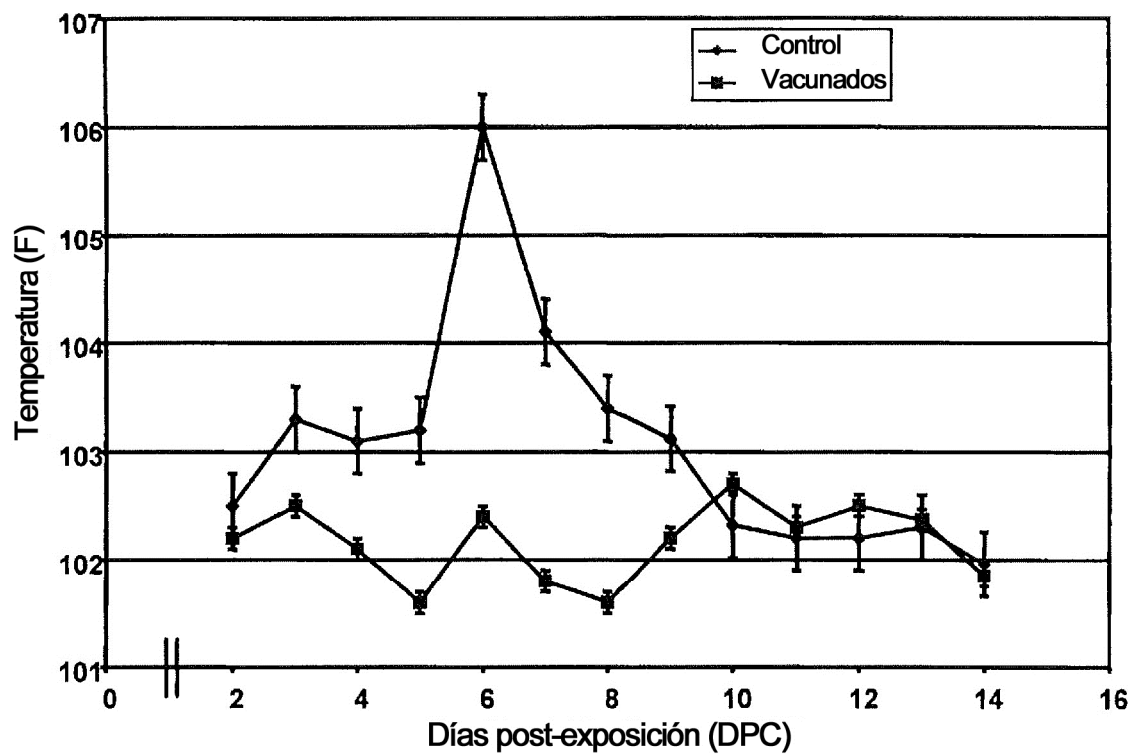
Banda 9: vCP2289.2.1.1.1 digerido con *Pst I*

Fig. 15



Banda 1: sedimento celular de ALVAC
 Banda 2: sedimento celular de vCP2289.1.2.1.1
 Banda 3: sedimento celular de vCP2289.2.1.1.1
 Banda 4: líquido sobrenadante de ALVAC
 Banda 5: líquido sobrenadante de vCP2289.1.2.1.1
 Banda 6: líquido sobrenadante de vFP2289.2.1.1.1

Fig. 16

**Fig. 17**

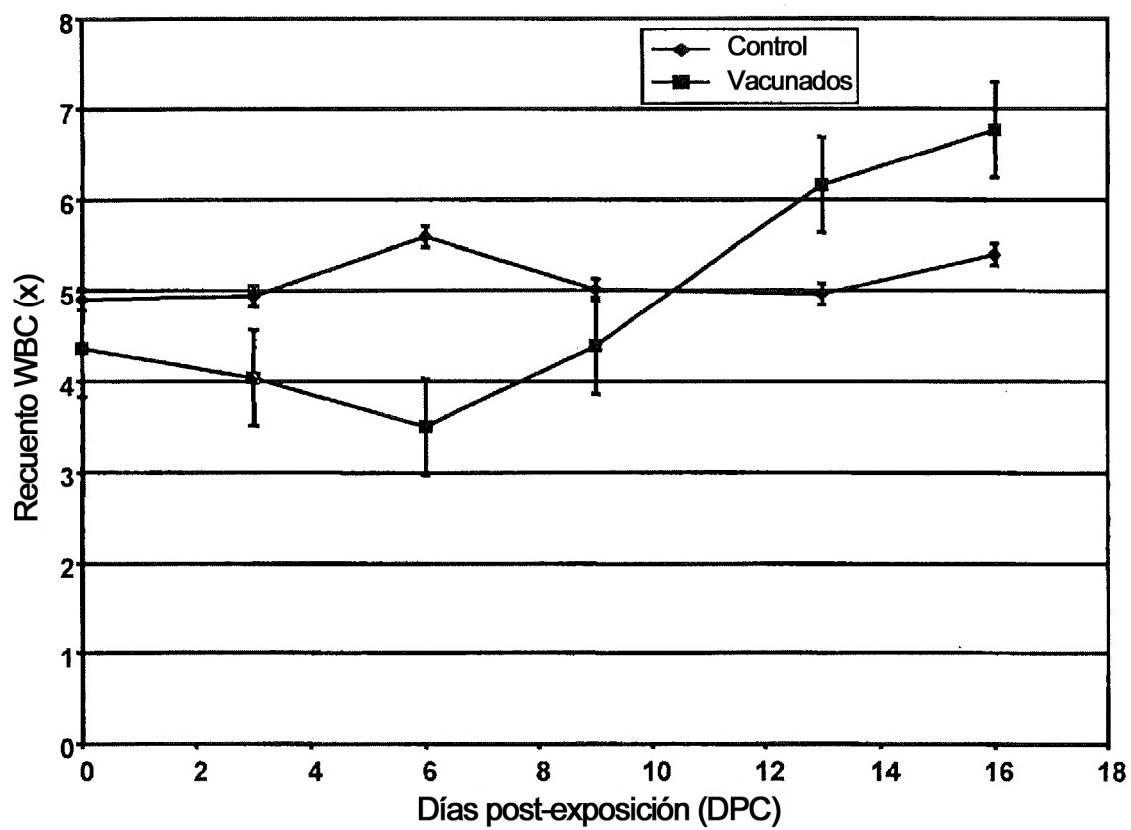


Fig. 18

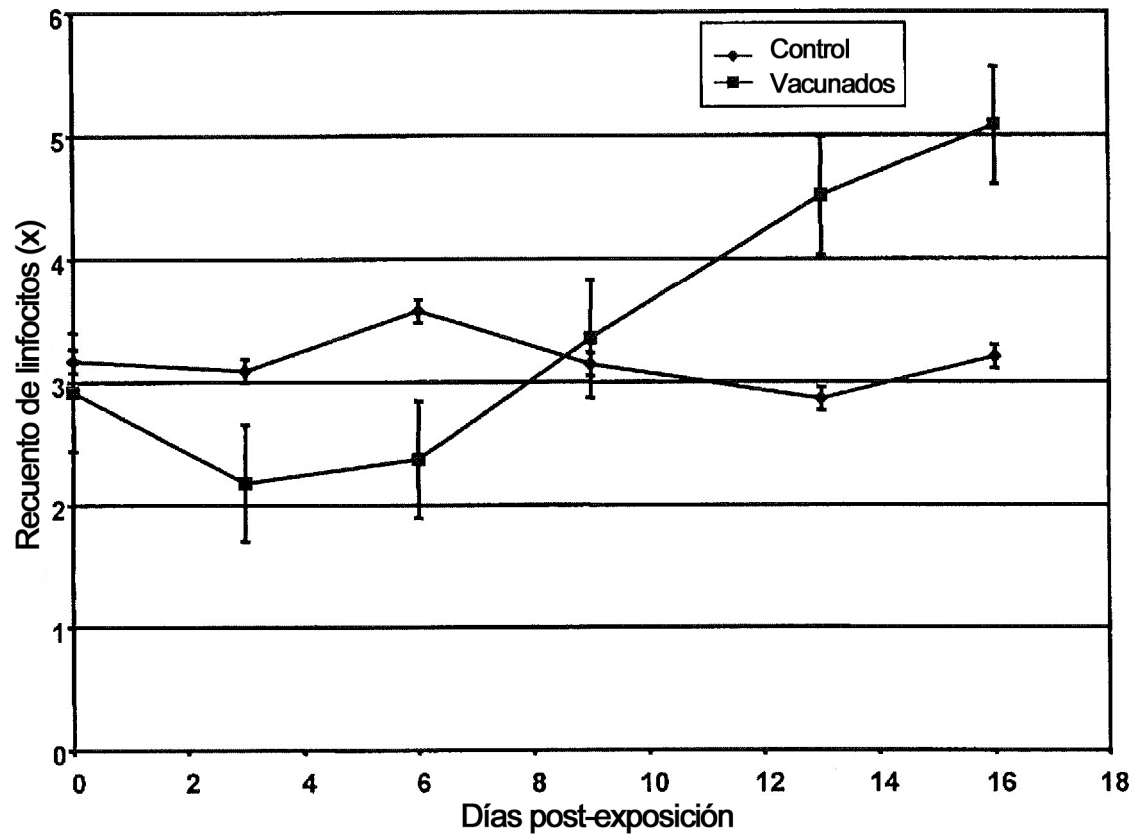


Fig. 19

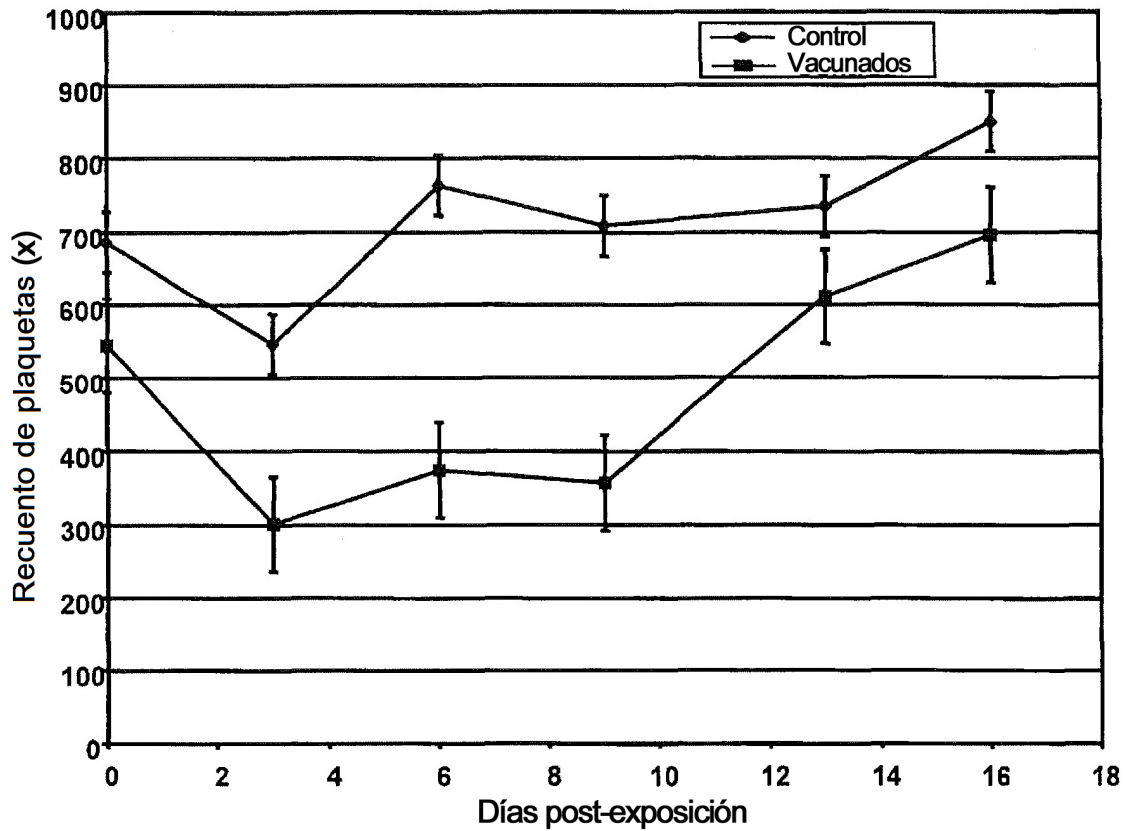


Fig. 20

13247.JY (directo)
XhoI 42Kp M G K I I K S L
5' GCGCTCGAGTTTTTATTCAAAAATTGAAAATATATAATTACAATATAAAATGGGCAAGATCATCAAGAGCCTG

13248.JY (inverso)
XhoI T5NT A N R L F L P V D
5' ATCTCGAGATAAAAAATCATCAGGCGTTCCTCAGGAACAGGGGCACGTC

Fig. 21.