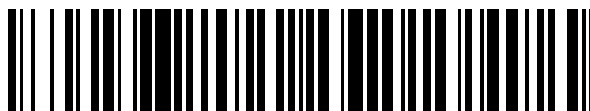


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 429**

51 Int. Cl.:

A61K 39/15

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2013** **PCT/US2013/026179**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013** **WO13123219**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2013** **E 13706871 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017** **EP 2814508**

54 Título: **Vacunas subunitarias de rotavirus y procedimientos para la fabricación y utilización de las mismas**

30 Prioridad:

14.02.2012 US 201261598624 P

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

13.09.2017

73 Titular/es:

**MERIAL, INC. (100.0%)
3239 Satellite Blvd.
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

**BEY, RUSSELL F.;
SIMONSON, RANDY R.;
SIRIGIREDDY, KAMESH REDDY y
HAUSE, BENJAMIN MATTHEW**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 632 429 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

Vacunas subunitarias de rotavirus y procedimientos para la fabricación y utilización de las mismas

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional No. de serie USSN 61/598.624, presentada el 14 de febrero de 2012.

10 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0002] La presente invención se refiere en general a vacunas subunitarias, en particular aquellas que comprenden péptidos de rotavirus que han sido diseñados para ser genética y antigénicamente casi idénticos a los expresados por los virus que infectan a una población diana de animales. Los plásmidos que expresan los péptidos antigénicos o proteína o proteínas de subunidades se mantienen en la población celular bacteriana por medio de un sistema de selección de toxina/antídoto. Las células bacterianas producen una proteína tóxica, que es contrarrestada por una proteína antídoto codificada por el plásmido que porta los péptidos, haciendo que las células no transformadas sean no viables.

20 **ANTECEDENTES**

[0003] El rotavirus es la causa más común de diarrea grave en lactantes y niños pequeños (Dennehy PH, 2000), y es uno de varios virus que causan infecciones a menudo llamadas gripe estomacal, a pesar de no tener ninguna relación con la gripe. Es un género de virus de ARN de doble cadena en la familia Reoviridae. Hay cinco especies de este virus, denominados A, B, C, D, y E (ICTV Virus Taxonomy: 2009 Release). La Tabla 1 proporciona un resumen de las proteínas de rotavirus conocidas. El rotavirus A, el más común, causa más de 90% de las infecciones en los seres humanos. El virus se transmite por vía fecal-oral, e infecta y daña las células que recubren el intestino delgado y causa la gastroenteritis. Además de su impacto en la salud humana, el rotavirus también infecta a los animales, y es un patógeno del ganado (Dubovi EJ, 2010).

[0004] Por ejemplo, según un estudio reciente, se encontró rotavirus habitualmente (65%) en las heces o contenido intestinal de cerdos con diarrea. La mayoría de los animales fueron infectados por un solo grupo (A, B, C) aunque la infección concurrente por más de un grupo rotavirus no tiene lugar (Yoon, KJ, Epidemiology of rotaviruses, ISUVDL submissions, 2010-2011, Iowa State). Cerca de un tercio de los animales estaban infectados por lo menos por el Rotavirus del Grupo C. Hasta ahora, la prevención del rotavirus en cerdos había implicado prácticas arcanas, tales como la alimentación de de tejido infectado de lechones a cerdos sanos. Esta práctica fue necesaria porque el rotavirus del Grupo C no puede cultivarse in vitro, evitando así la producción de las vacunas convencionales inactivadas/atenuadas de virus enteros. Por lo tanto, existe una necesidad clara y urgente de medidas preventivas más efectivas y seguras.

Tabla 1. Resumen de proteínas de rotavirus

Segmento de ARN (gen)	Tamaño (pb, en base a cepa de Rota C humano)	Proteína	Peso molecular kDa	Localización	Copias por partícula	Función
1	3309	VP1	125	En los vértices del núcleo	<25	ARN polimerasa dependiente de ARN
2	2736	VP2	102	forma capa protectora interna del núcleo	120	estimula ARN replicasa viral
3	2283	VP3	88	En los vértices del núcleo	<25	Enzima de bloqueo de ARNm de guanilil transferasa
4	2166	VP4	87	Espícula de la superficie	120	unión celular, virulencia
5	1353	NSP1	59	No estructural	0	unión a 5'ARN
6	1350	VP6	45	Cápside interna	780	antígeno estructural y específico de

						especie
7	1270	NSP3	37	No estructural	0	aumenta la actividad de ARNm viral e interrumpe la síntesis de proteínas celulares
8	1063	NSP2	35	No estructural	0	NTPasa implicada en el empaquetamiento de ARN
9	1037	VP7, VP7	38, 34	Superficie	38, 34	Antígeno estructural y de neutralización
10	730	NSP4	20	No estructural	20	Enterotoxina
11	613	NSP5 NSP6	22	No estructural	22	Modulador de unión a ssARN y dsARN de NSP2

[0005] Un enfoque alternativo sería producir vacunas que comprenden proteínas o antígenos de subunidades de rotavirus inmunogénicos. En el momento de la presentación de esta memoria, los inventores no tienen constancia de referencias que describan procedimientos de producción de vacunas subunitarias contra el rotavirus (autógenas o de otro tipo) para inmunizar de cerdos contra rotavirus, en particular la variedad Grupo C. Las siguientes patentes y solicitudes resumen rotavirus pertinentes de la técnica anterior, con énfasis en las vacunas basadas en subunidades.

[0006] El documento US7790178 (de Intervet) describe vacunas trivalentes, que incluyen rotavirus canino inactivados.

[0007] Los documentos US7311918 y US6589529 (de Children's Hospital Ohio) describen una proteína de fusión de rotavirus recombinante que comprende un fragmento de proteína VP6, destinada a la vacunación de seres humanos. Los datos en ratones indicaron que la vacuna generaba una respuesta inmune dirigida contra la proteína de fusión VP6.

[0008] El documento US6867353 (de Exploregen) describe en general la expresión de un fragmento de ADNc que codifica la proteína estructural de rotavirus humano utilizando tomate transformado.

[0009] El documento US6716431 (de Wyeth, ahora Pfizer) describe formas alternativas de NSP4 (es decir, SNP que resultan en cambios de aminoácidos), que aún conservan la antigenicidad, pero exhiben citotoxicidad reducida.

[0010] Los documentos US6673355 y US6210682 (de Baylor College of Medicine) se refieren al uso de NSP4 y fragmentos de la misma (NSP4 114-135, NSP4 120-147, NSP4 112-174, o NSP4 112-150) como prevención y/o tratamiento de la enfermedad por rotavirus. También se describen composiciones que incluyen un adyuvante de la enterotoxina. Los documentos US5891676 y US5827696 (también de Baylor) describen la expresión en baculovirus de rotavirus VP2 y VP7, respectivamente.

[0011] El documento US6187319 (de Universidad of Mass.) se refiere en general a procedimientos para producir respuestas inmunes en animales contra un primer rotavirus mediante la administración de un polipéptido VP6 aislado de un segundo rotavirus que infecta a una especie diferente que el animal a vacunar.

[0012] El documento US5298244 (de Universidad de Saskatchewan) describe partículas virales ensambladas que tienen VP4, VP6, y VP7.

[0013] El documento US20110171316 (de US Health and Human Service) describe partículas de tipo viral de rotavirus del grupo C humano recombinante. El documento US20100047763 (de Va et al.) describe el plásmido de ADN que codifica proteínas de rotavirus para su uso en kits de diagnóstico.

[0014] El documento US5186933 (de Baylor College of Medicine) describe la expresión de genes de rotavirus, en particular VP3 y VP7) utilizando un sistema de baculovirus. El documento WO02/36172 da a conocer NSP4 enterotoxina de Rotavirus y procedimientos de uso de la misma.

[0015] Hasta la presente descripción, los inventores no tiene constancia de ninguna vacuna subunitaria contra el rotavirus porcino eficaz preparada mediante la expresión de antígenos de rotavirus tipo C en E. coli. Además, no se

han descrito procedimientos para producir vacunas seguras y eficaces para cerdos, y por lo tanto es un objetivo de la presente descripción proporcionar tales vacunas.

Referencias

[0016]

Dennehy PH (2000). "Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home". *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19 (10 Suppl): S103-5. doi:10.1097/00006454-200010001-00003. PMID 11052397.

Bernstein DI (March 2009). "Rotavirus overview". *The Pediatric Infectious Disease Journal* 28 (3 Suppl): S50-3.

Grimwood K, Lambert SB (February 2009). "Rotavirus vaccines: opportunities and challenges". *Human Vaccines* 5 (2): 57-69. PMID 18838873.

Bishop R (October 2009). "Discovery of rotavirus: Implications for child health". *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24 Suppl 3: S81-5.

Rheingans RD, Heylen J, Giaquinto C (2006). "Economics of rotavirus gastroenteritis and vaccination in Europe: what makes sense?". *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25 (1 Suppl): S48-55.

Simpson E, Wittet S, Bonilla J, Gamazina K, Cooley L, Winkler JL (2007). "Use of formative research in developing a knowledge translation approach to rotavirus vaccine introduction in developing countries". *BMC Public Health* 7: 281.

Edward J Dubovi; Nigel James MacLachlan (2010). *Fenner's Veterinary Virology, Fourth Edition*. Boston: Academic Press. p. 288. ISBN 0-12-375158-6.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0017] Un objetivo de la presente invención es proporcionar vacunas subunitarias, así como procedimientos para el tratamiento y profilaxis de una infección por rotavirus.

[0018] En un aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunológica que comprende: (a) polipéptidos de rotavirus NSP4, VP4 y VP6; y (b) un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable.

[0019] En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una composición de la presente invención que comprende las etapas de: (a) obtener una muestra biológica de un animal conocido o sospechoso de estar infectado con uno o más tipos de rotavirus; (b) si el estado de infección no se conoce, determinar si el animal está infectado con rotavirus; (c) recoger el ARN del animal infectado con el uno o más tipos de rotavirus; (d) realizar la PCR con transcriptasa inversa usando cebadores complementarios a genes de NSP4, VP4 y VP6; (e) insertar el producto de la PCR de la etapa (d) en un vector de expresión adecuado; (f) colocar el vector producido en la etapa (e) en un sistema de expresión de huéspedes adecuado; (g) recoger los polipéptidos rotavirales; y (h) añadir a los polipéptidos rotavirales cualquiera de los componentes de vacunas adicionales, produciendo de este modo la composición de vacuna.

[0020] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona la composición de la presente invención para usar en terapia.

[0021] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona la composición de la presente invención para usar en la vacunación de un animal.

[0022] En el presente documento se describe un nuevo vector y el uso del mismo para la producción de una proteína heteróloga o de un gen de interés que se puede utilizar, por ejemplo, en el contexto de una inmunización. La proteína heteróloga puede ser una proteína de rotavirus. La proteína puede ser una proteína de rotavirus porcino seleccionada de NSP4, VP4, o VP6. En una realización de la invención, la proteína de rotavirus es una proteína de triple fusión NSP4-VP4-VP6.

[0023] Otro objetivo de la presente descripción es proporcionar un nuevo vector que puede utilizarse a escala industrial, que tiene la ventaja de producir un alto rendimiento de expresión, siendo este el caso en ausencia de cualquier uso de antibióticos, y que por lo tanto se puede utilizar para volúmenes a gran escala o pequeña escala (por ejemplo, cultivos de 1-10.000 litros). En el presente documento se describe un vector de autorreplicación desprovisto de cualquier gen de resistencia a antibióticos, que comprende: (a) una secuencia que codifica la proteína ccdA funcionalmente ligada a un primer promotor; y (b) una secuencia heteróloga funcionalmente ligada a un segundo promotor. El primer promotor puede ser un promotor constitutivo. El segundo promotor puede ser un promotor inducible, en particular, el segundo promotor puede ser el promotor T7. El promotor puede ser el promotor T5.

[0024] La secuencia heteróloga puede codificar un antígeno de vacuna.

[0025] En el presente documento se describe una célula procariota que expresa la proteína ccdB, que comprende un vector tal como se ha definido anteriormente.

[0026] Dicha célula procariótica puede ser una célula de E. coli.

[0027] En el presente documento se describe un procedimiento para producir una proteína heteróloga, que comprende las etapas de:

- (a) inocular un medio de cultivo apropiado con células procariotas que expresan la proteína ccdB y que contiene un vector como se ha definido anteriormente;
- (b) cultivar con fermentador la célula así transformada en ausencia de antibiótico; y
- (c) recuperar la proteína heteróloga producida durante la etapa (b) a partir del sobrenadante o del sedimento celular.

[0028] También se describe en el presente documento un procedimiento para producir péptidos de rotavirus recombinantes.

[0029] También se describe en el presente documento un procedimiento para producir un vector de autorreplicación tal como se define anteriormente, que comprende las etapas de:

- (a) inocular un medio de cultivo apropiado con células procariotas que expresa la proteína ccdB y que contiene un vector como se ha definido anteriormente;
- (b) cultivar con fermentador la célula así transformada en ausencia de antibiótico; y
- (c) recuperar el vector producido durante la etapa (b).

[0030] También se describe en el presente documento un procedimiento para construir un vector de autorreplicación tal como se define anteriormente, que comprende las etapas de:

- (a) empezar con un vector de autorreplicación que comprende un gen de resistencia a antibióticos funcional y un gen de ccdA;
- (b) llevar a cabo la PCR inversa para amplificar la secuencia de plásmido del gen de no resistencia a antibiótico;
- (c) fosforilar y ligar el producto de la PCR para producir la versión libre del gen de resistencia a antibiótico del vector citado en (a);
- (d) transformar una célula procariota que expresa la proteína ccdB; y
- (e) recuperar las células procarióticas que comprenden el vector de autorreplicación.

[0031] Según un aspecto de la invención, se pueden tomar muestras biológicas de poblaciones de animales de producción, incluyendo porcinos. Se recoge el ARN de las mismas y se lleva a cabo la transcripción inversa, utilizando cebadores específicos de gen de rotavirus. Los productos de PCR se clonan en el plásmido de autorreplicación definido anteriormente, y los nuevos plásmidos que contienen el gen de rotavirus específico de la manada y/o de la región se transforman en células procariotas que expresan ccdB. Los péptidos de rotavirus se recogen a partir de las células y se formulan en las vacunas autógenas de la invención y/o comerciales.

[0032] En una realización particular, las vacunas subunitarias de rotavirus autógenas comprenden un adyuvante. El adyuvante puede ser un aceite, emulsión, una sal de metal (por ejemplo $Al(OH)_3$), o combinaciones de los mismos. En una realización, el adyuvante es TRIGEN® o ULTRAGEN® o PrimaVant® (TRIGEN + Quil A), TS6 (descrito en US 7.371.395 de Merial), LR4 (descrito en US 7.691.368, de Merial), o cualquier formulación descrita en el documento US 2011-0129494 A1 (de Merial).

[0033] En una realización, la vacuna puede comprender una mezcla de VP4, VP6, y NSP4 de rotavirus, y una cantidad conservante de formaldehído y/o agentes antimicrobianos.

[0034] La invención proporciona además procedimientos para inducir una respuesta inmunológica (o inmunógena) o protectora contra rotavirus, así como procedimientos para prevenir o tratar el rotavirus o estado o estados de la enfermedad causados por rotavirus, que comprende administrar las subunidades, o una composición que comprende las subunidades.

[0035] En el presente documento se describen productos de expresión a partir del plásmido, así como anticuerpos generados a partir de los productos de expresión o la expresión de los mismos, y usos para tales productos y anticuerpos, por ejemplo, en aplicaciones de diagnóstico.

[0036] También se describen kits que comprenden al menos un polipéptido de rotavirus o fragmento o variante del mismo e instrucciones para su uso.

[0037] Estas y otras realizaciones se describen o son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y están abarcadas por la misma.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

[0038] En el resto de la memoria se expone más particularmente una descripción completa y posible de la presente invención, incluyendo el mejor modo de la misma, para un experto en la materia, incluyendo referencia a las figuras adjuntas, en las que:

la figura 1 proporciona un mapa de endonucleasas de restricción de pStaby1.2 (proporcionado por el proveedor);

la figura 2 esquematiza la eliminación del gen de resistencia a ampicilina de pStaby1.2;
 la figura 3 esquematiza la inserción del gen de GST en pNPL1 para formar pNPL2;
 la figura 4 es un mapa de las regiones flanqueantes y los sitios de inserción de gen de rotavirus de pNPL2;
 la figura 5 es un diagrama esquemático de la técnica de recuperación de ADN donante;
 la figura 6 esquematiza el proceso de aislar genes de rotavirus candidatos de vacunas autógenas de muestras clínicas;
 la figura 7 es un esquema del procedimiento que se utiliza para insertar ADN donante pNPL2 para producir pNPL2-Rota;
 la figura 8 es un gel PAGE que confirma la expresión y el tamaño de las proteínas de rotavirus VP4, VP6 y NSP4;
 la figura 9A presenta alineaciones de secuencias de nucleótidos y péptidos (con tabla de porcentaje de identidad) para aislados de NSP4;
 la figura 9B presenta alineaciones de secuencias de nucleótidos y péptidos (con tabla de porcentaje de identidad) para aislados de VP4;
 la figura 9C presenta alineaciones de secuencias de nucleótidos y péptidos (con tabla de porcentaje de identidad) para aislados de VP6;
 la figura 10 es un gráfico que muestra los resultados globales de serología para el estudio de eficacia de la vacuna;
 la figura 11 son gráficos que muestran la serología específica de VP4, VP6 y NSP4 medida por ELISA;
 la figura 12 es un gel PAGE que confirm la expresión de la proteína de triple fusión NSP4-VP4-VP6 Rota C. L, escalera; 1, antes de la inducción (OD = 0,6); 2, cultivos no inducidos (DO = 1,5); 3, cultivos inducidos (DO = 1,5);
 la figura 13 es una transferencia Western (izquierda) y gel PAGE (derecha) que confirman la expresión de proteínas de fusión. L-escalera, 1-BSA 1,5 µg, 2-proteína de fusión diluida 1:20, 3-proteína de fusión diluida 1:40, 4-GST 0,5 µg.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0039] La presente invención abarca subunidades de rotavirus (definidos en el presente documento, por ejemplo, como polipéptidos, proteínas, antígenos, epítomos o inmunógenos de rotavirus) que provocan una respuesta inmunogénica en un animal, particularmente las subunidades de rotavirus que provocan, inducen o estimulan una respuesta en un porcino.

[0040] Las subunidades rotavirus particulares de interés son VP4, VP6, y NSP4, en particular las codificadas por secuencias de ácido nucleico de porcinos infectados por rotavirus del grupo C. Se entiende que los precursores de cualquiera de estos antígenos se pueden utilizar en la práctica de esta invención.

[0041] En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para amplificar secuencias de rotavirus de porcinos infectados, y el uso de técnicas moleculares bien conocidas para colocar dichas secuencias amplificadas en vectores de expresión. La amplificación se lleva a cabo mediante PCR usando cebadores complementarios a las regiones altamente conservadas de los genes de rotavirus, de manera que los genes de una amplia variedad de cepas de rotavirus pueden amplificarse usando los mismos cebadores. En una realización, los cebadores son complementarios de la secuencia de ácido nucleico del rotavirus que codifica VP4, VP6, y/o NSP4, y tienen la secuencia que se expone en SEQ ID NOs: 8-13).

[0042] En el presente documento se describen procedimientos para la producción de vectores de expresión, que contienen y expresan en un huésped procariota, un gen de antídoto, que confiere viabilidad a células bacterianas que expresan toxinas proteicas. El antídoto puede ser CCDA y la toxina puede ser ccdB.

[0043] En otro aspecto, las nuevas secuencias de rotavirus se colocan en los vectores de expresión para producir subunidades de rotavirus para ser usados en la formulación de vacunas subunitarias.

[0044] En una realización, las vacunas subunitarias comprenden además un adyuvante. En una realización particular, el adyuvante es un adyuvante de aceite en agua. En algunas realizaciones, el adyuvante es TRIGEN, ULTRAGEN, PrimaVant, TS6, LR4, o combinaciones de los mismos. En una realización, las vacunas comprenden, además, una cantidad adyuvante de una sal de aluminio. Otros compuestos adyuvante se pueden añadir también a las vacunas subunitarias, incluyendo, pero no limitado a, saponina e hidróxido de aluminio. Estos compuestos adyuvantes adicionales pueden mejorar la estabilidad de almacenamiento de la vacuna, la eficacia, o ambos.

[0045] En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para proporcionar inmunidad protectora a los lechones contra el rotavirus, que comprende administrar las vacunas subunitarias de la invención para cerdas y cerdas jóvenes, antes del parto.

Tabla 1. Lista de cebadores usados en la construcción de los vectores y la clonación de los genes

SEQ ID #	#	Descripción
2	650	NdeI directo de GST
3	651	BamHI inverso de GST

4	644	Directo de delección del gen de AMP ^R
5	645	Inverso de delección del gen de AMP ^R
6	660	Directo de verificación de PCR
7	661	Inverso de verificación de PCR
8	652	Directo de NSP4 con sitio BamHI
9	653	Inverso de NSP4 con sitio HindIII
10	654	Directo de VP4 con sitio BamHI
11	655	Inverso de VP4 con sitio HindIII
12	656	Directo de VP6 con sitio BamHI
13	657	Inverso de VP6 con sitio HindIII
73	760	KSN760 – inverso de VP4
74	761	KSN761 – directo de VP4
75	762	KSN762 – inverso de VP4
76	763	KSN763 – directo de VP4
77	772	Cebador 1 para insertar la etiqueta de His en pNPL1
78	773	Cebador 2 para insertar la etiqueta de His en pNPL1
79	774	Directo de NSP4 de Rota C para pNPL3
80	775	Inverso de NSP4 de Rota C para pNPL3 o pNPL1
81	776	Directo de VP4 de Rota C para pNPL3
82	777	Inverso de VP4 de Rota C para pNPL3 o pNPL1
83	778	Directo de VP6 de Rota C para pNPL3
84	779	Inverso de VP6 de Rota C para pNPL3 o pNPL1
85	780	Directo de NSP4 de Rota C para pNPL1
86	781	Directo de VP4 de Rota C para pNPL1
87	782	Directo de VP6 de Rota C para pNPL1
88	783	Directo de VP7 de Rota C para pNPL3
89	784	Inverso de VP7 de Rota C para pNPL3 p pNPL1

[0046] Los polipéptidos o proteínas antigénicas según la presente invención son capaces de proteger contra rotavirus. Es decir, que son capaces de estimular una respuesta inmune en un animal. Por "antígeno" o "inmunógeno" se entiende una sustancia que induce una respuesta inmune específica en un animal huésped. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o parte de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; un trozo o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmune tras la presentación a un animal huésped; un polipéptido, un epítipo, un hapteno, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el inmunógeno o antígeno puede comprender una toxina o antitoxina.

[0047] El términos "proteína", "péptido", "polipéptido" y "fragmento de polipéptido" se usan indistintamente en este documento para referirse a polímeros de residuos de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados o análogos de aminoácidos, y puede estar interrumpido por restos químicos distintos de aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado naturalmente o mediante intervención; por ejemplo la formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje o bioactivo.

[0048] El término "polipéptido inmunogénico o antigénico", como se usa en el presente documento incluye polipéptidos que son inmunológicamente activos en el sentido de que una vez que se administra al huésped, es capaz de evocar una respuesta inmune 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 según la invención comprende o consiste esencialmente en o consiste en al menos un epítipo o determinante antigénico. Una proteína o polipéptido "inmunogénico", como se usa en el presente documento, incluye la secuencia de longitud completa de la proteína, análogos de la misma, o fragmentos inmunogénicos de la misma. Por "fragmento inmunogénico" se entiende un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítopos y de este modo provoca la respuesta inmunológica descrita anteriormente. Tales fragmentos pueden ser identificados usando cualquier técnica de mapeo de epítopos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando simultáneamente gran cantidad de péptidos sobre soportes sólidos, los péptidos correspondientes a porciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos están todavía unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en el sector y se describen en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos. No. 4.708.871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. De manera similar, los epítopos conformacionales son fácilmente identificados mediante la determinación de la conformación espacial de aminoácidos, tales como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols,

supra. Los procedimientos especialmente aplicables a las proteínas de T. parva se describen completamente en el documento PCT/US2004/022605.

[0049] Como se discute en el presente documento, la invención abarca fragmentos activos y variantes del polipéptido antigénico. Por lo tanto, el término "polipéptido inmunogénico o antigénico" contempla además delecciones, adiciones y sustituciones a la secuencia, siempre que el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica tal como se define en este documento. El término "variación conservativa" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de tal manera que el residuo de aminoácido codificado no cambia o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservativa, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos - aspartato y glutamato; (2) básicos - lisina, arginina, histidina; (3) no polares - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga - glicina, asparagina, glutamina, cistina, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces como aminoácidos aromáticos. Los ejemplos de variaciones conservativas incluyen la sustitución de un resto hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro residuo hidrófobo, o la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, y similares; o una sustitución conservativa similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado que no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia, pero que poseen sustituciones de aminoácidos menores que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína están, por lo tanto, dentro de la definición del polipéptido de referencia. Todos los polipéptidos producidos por estas modificaciones se incluyen en el presente documento. El término "variación conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido siempre que los anticuerpos producidos contra el polipéptido sustituido también inmunorreacten con el polipéptido no sustituido.

[0050] El término "epítipo" se refiere al sitio en un antígeno o hapteno al cual responden células B y/o células T específicas. El término también se usa indistintamente con "determinante antigénico" o "sitio determinante antigénico". Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana.

[0051] Una "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos a una composición o vacuna de interés. Normalmente, una "respuesta inmunológica" incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células T auxiliares, y/o células T citotóxicas, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferentemente, el huésped mostrará tanto una respuesta inmunológica terapéutica o protectora, tal que la resistencia a una nueva infección se verá aumentada y/o la gravedad clínica de la enfermedad se verá reducida. Dicha protección se demostrará por una reducción o ausencia de síntomas y/o signos clínicos de la enfermedad normalmente mostrados por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título viral disminuido en el huésped infectado.

[0052] Por "animal" se entienden mamíferos, aves, y similares. Animal o huésped tal como se usa en el presente documento incluye mamíferos y humanos. El animal puede seleccionarse del grupo que consiste en equino (por ejemplo, caballos), caninos (por ejemplo, perros, lobos, zorros, coyotes, chacales), felino (por ejemplo, leones, tigres, gatos domésticos, gatos salvajes, otros gatos grandes, y otros felinos incluyendo guepardos y lince), ovino (por ejemplo, ovejas), bovino (por ejemplo, ganado), porcino (por ejemplo, cerdo), aves (por ejemplo, pollo, pato, ganso, pavo, codorniz, faisán, loro, pinzones, halcón, cuervo, avestruz, emu y casuario), primate (por ejemplo, prosimio, tarsero, mono, gibón, mono), hurones, focas, y pescado. El término "animal" también incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo etapas de recién nacido, embrionario y fetal.

[0053] A menos que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Los términos singulares "un", "una", y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0054] Cabe indicar que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones y/o párrafos, los términos tales como "comprende" "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se le atribuye en la ley de Patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y que términos tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no citados de manera explícita, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan una característica básica o novedosa de la invención.

Composiciones

[0055] La presente invención se refiere a una vacuna o composición contra el rotavirus que pueden comprender un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de rotavirus y un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable. El polipéptido, proteína, antígeno, epítipo o inmunógeno de rotavirus pueden ser cualquier polipéptido, proteína, antígeno, epítipo o inmunógeno de rotavirus, tal como, pero no limitado a, una proteína, péptido o fragmento de la misma, que provoca, induce o estimula una respuesta en un animal.

[0056] Se describe en el presente documento una vacuna o composición contra el rotavirus que pueden comprender un polipéptido de rotavirus VP1, VP2, VP3, VP4, NSP1, VP6, NSP3, NSP2, VP7, NSP4, NSP5, o NSP6 y un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable. En una realización, el vector de expresión puede comprender además un polinucleótido que codifica los polipéptidos VP4, VP6 o NSP4, o combinaciones de los mismos. En una realización particular, el polinucleótido comprende la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, o combinaciones de las mismas.

[0057] En otra realización, el portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una emulsión de agua-en-aceite. En aún otra realización, la emulsión de agua-en-aceite puede ser una emulsión triple de agua/aceite/agua (W/O/W).

[0058] En una realización, el polipéptido de rotavirus, antígeno o fragmento o variante del mismo comprenden un polipéptido de rotavirus o fragmento o variante del mismo. En un aspecto de esta realización, el polipéptido de rotavirus o fragmento o variante del mismo es un polipéptido recombinante producido por un gen de rotavirus. En otro aspecto de esta realización, el gen de rotavirus tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, o combinaciones de las mismas. En otro aspecto de esta realización, el polipéptido de rotavirus o fragmento o variante del mismo tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, o 71, donde el polipéptido o fragmento o variante del mismo tienen el mismo papel funcional (es decir, el polipéptido es el polipéptido de rotavirus VP4, VP6, o NSP4 que pertenece a una cepa diferente del rotavirus del Grupo C).

[0059] Los antígenos sintéticos también se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, poliepitopos, epitopos flanqueantes, y otros antígenos recombinantes o derivados sintéticamente. Véase, por ejemplo, Bergmann et al., 1993; Bergmann et al., 1996; Suhrbier, 1997; Gardner et al., 1998. Los fragmentos inmunogénicos, para los propósitos de la presente invención, incluirán generalmente al menos aproximadamente 3 aminoácidos, al menos aproximadamente 5 aminoácidos, al menos aproximadamente 10-15 aminoácidos, o aproximadamente 15-25 aminoácidos o más aminoácidos, de la molécula. No hay límite superior crítico para la longitud del fragmento, que puede comprender casi la longitud completa de la secuencia de la proteína, o incluso una proteína de fusión que comprende al menos un epítipo de la proteína.

[0060] Por consiguiente, una estructura mínima de un polinucleótido que expresa un epítipo es el que comprende o consiste esencialmente en o consiste en nucleótidos que codifican un epítipo o determinante antigénico de un polipéptido de rotavirus. Un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido de rotavirus puede comprender o consistir esencialmente en o consistir en un mínimo de 15 nucleótidos, aproximadamente 30-45 nucleótidos, aproximadamente 45-75, o al menos 57, 87 o 150 nucleótidos consecutivos o contiguos de la secuencia que codifica el polipéptido. Los procedimientos de determinación de epítipo, tales como, la generación de bibliotecas de péptidos que se solapan, Pepscan (Geysen et al, 1984 (Hemmer et al., 1998); Geysen y col., 1985; Van der Zee. R. et al, 1989; Geysen., 1990; Multipin.RTM Peptide Synthesis Kits de Chiron) y algoritmos (de Groot et al, 1999; PCT/US2004/022605) se pueden utilizar en la práctica de la invención.

[0061] El término "ácido nucleico" y "polinucleótido" se refiere a ARN o ADN que es lineal o ramificado, monocatenario o bicatenario, o un híbrido de los mismos. El término también abarca híbridos de ARN/ADN. Los siguientes son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos de unión, tales como fluororibosa y tiolato, y ramas de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación, con un componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluidas en esta definición son los agentes de bloqueo, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, y la introducción de medios para unir el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componentes de marcaje, otros polinucleótidos o soporte sólido. Los polinucleótidos se pueden obtener por síntesis química o derivados de un microorganismo.

[0062] El término "gen" se utiliza ampliamente para referirse a cualquier segmento de polinucleótido asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen intrones y exones como en la secuencia genómica, o sólo las secuencias de codificación como en ADNc y/o las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Por

ejemplo, el gen también se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm o ARN funcional, o codifica una proteína específica, y que incluye secuencias reguladoras.

[0063] Se describe en el presente documento una hebra complementaria a un polinucleótido que codifica un antígeno epítipo o inmunógeno de rotavirus. La hebra complementaria puede ser polimérica y de cualquier longitud y puede contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y análogos en cualquier combinación.

[0064] Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico o proteína u orgánulo) se refiere a un componente que se ha separado sustancialmente o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que se produce naturalmente el componente, por ejemplo, otro de ADN y ARN, proteínas y orgánulos cromosómicos y extracromosómicos. Los ácidos nucleicos y proteínas que han sido "aislados" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante procedimientos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados por tecnología recombinante, así como síntesis química.

[0065] El término "purificado" como se usa en el presente documento no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende como un término relativo. Así, por ejemplo, una preparación de polipéptido parcialmente purificado es una en la que el polipéptido está más enriquecido que el polipéptido está en su medio natural. Es decir el polipéptido se separa de los componentes celulares. Por "sustancialmente purificado" se entiende de manera que al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 98%, o más de los componentes o materiales celulares se han eliminado. Del mismo modo, un polipéptido puede estar parcialmente purificado. Por "parcialmente purificado" se entiende que se elimina menos del 60% de los componentes o materiales celulares. Lo mismo se aplica a los polinucleótidos. Los polipéptidos descritos en este documento se pueden purificar por cualquiera de los medios conocidos en la técnica.

[0066] Se describen en el presente documento homólogos de polipéptidos de rotavirus. Como se usa en el presente documento, el término "homólogos" incluye ortólogos, análogos y parálogos. El término "análogos" se refiere a dos polinucleótidos o polipéptidos que tienen la misma función o similar, pero que han evolucionado por separado en organismos no relacionados. El término "ortólogos" se refiere a dos polinucleótidos o polipéptidos de diferentes especies, pero que han evolucionado a partir de un gen ancestral común por especiación. Normalmente, los ortólogos codifican polipéptidos que tienen las mismas funciones o similares. El término "parálogos" se refiere a dos polinucleótidos o polipéptidos que están relacionados por duplicación dentro de un genoma. Los parálogos normalmente tienen diferentes funciones, pero estas funciones pueden estar relacionadas. Por ejemplo, los análogos, ortólogos, y parálogos de un polipéptido de rotavirus de tipo salvaje pueden diferir del polipéptido de rotavirus de tipo salvaje en modificaciones posteriores a la traducción, en diferencias en la secuencia de aminoácidos, o en ambos. En particular, los homólogos de la invención mostrarán generalmente al menos el 80-85%, 85-90%, 90-95%, o 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia, con la totalidad o parte de las secuencias de polipéptidos o polinucleótidos de rotavirus de tipo salvaje, y mostrarán una función similar.

[0067] Se describen en el presente documento polipéptidos que tienen al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene una secuencia tal como la expuesta en la SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, o 71. Los fragmentos y variantes de los polipéptidos de rotavirus identificados anteriormente (SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, o 71) pueden prepararse fácilmente por un experto en la materia usando técnicas de biología molecular bien conocidas.

[0068] Las variantes son polipéptidos homólogos que tienen una secuencia de aminoácidos con al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, o 71.

[0069] Las variantes incluyen variantes alélicas. El término "variante alélica" se refiere a un polinucleótido o un polipéptido que contiene polimorfismos que conducen a cambios en las secuencias de aminoácidos de una proteína y que existen dentro de una población natural (por ejemplo, una especie o variedad de virus). Tales variaciones alélicas naturales pueden dar lugar típicamente al 1-5% de la variación en un polinucleótido o un polipéptido. Las variantes alélicas pueden identificarse por secuenciación de la secuencia de ácido nucleico de interés en un conjunto de diferentes especies, que puede llevarse a cabo fácilmente utilizando sondas de hibridación para identificar el locus genético del mismo gen en estas especies. Cualquiera y todas de dichas variaciones de ácido nucleico y los polimorfismos o variaciones de aminoácidos resultantes que son el resultado de la variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional del gen de interés, se pretende que estén dentro del alcance de la invención.

[0070] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "derivado" o "variante" se refiere a un polipéptido, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una o más variaciones conservativas de aminoácidos u otras modificaciones menores, tales que (1) el polipéptido correspondiente tiene una función sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido de tipo salvaje o (2) un anticuerpo generado contra el polipéptido es

inmunorreactivo con el polipéptido de tipo salvaje. Estas variantes o derivados incluyen polipéptidos que tienen modificaciones menores de las secuencias de aminoácidos primarias del polipéptido de rotavirus que pueden dar lugar a péptidos que tienen una actividad sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido homólogo sin modificar. Tales modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser espontáneas. El término "variante" contempla además delecciones, adiciones y sustituciones en la secuencia, siempre que el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica tal como se define en este documento.

[0071] El término "variación conservativa" indica el reemplazo de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de tal manera que el residuo de aminoácido codificado no cambia o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservativa, tal como se describe anteriormente.

[0072] Un fragmento inmunogénico de un polipéptido de rotavirus incluye al menos 8, 10, 13, 14, 15, o 20 aminoácidos consecutivos, al menos 21 aminoácidos, al menos 23 aminoácidos, al menos 25 aminoácidos, o al menos 30 aminoácidos de un polipéptido de rotavirus que tiene una secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, o variantes o fragmentos funcionales de las mismas.

[0073] Se describe en el presente documento un polinucleótido que codifica un polipéptido de rotavirus, tal como un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, o variantes o fragmentos funcionales de las mismas. En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un polipéptido que tiene una secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, o una variante conservativa, una variante alélica, un homólogo o un fragmento inmunogénico que comprende al menos ocho o al menos diez aminoácidos consecutivos de uno de estos polipéptidos, o una combinación de estos polipéptidos.

[0074] Se describe en el presente documento un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos tal como se expone en SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, o 71, o una variante o fragmento funcional de la misma. En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una de un polinucleótido que tiene una secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, o 71, o una variante de la misma.

[0075] Los polinucleótidos de la descripción incluyen secuencias que son degeneradas como resultado del código genético, por ejemplo, el uso de codones optimizados para un huésped específico. Tal como se usa en el presente documento, "optimizado" se refiere a un polinucleótido que se modifica mediante ingeniería genética para incrementar su expresión en una especie determinada. Para proporcionar polinucleótidos optimizados que codifican polipéptidos de rotavirus, la secuencia de ADN del gen de rotavirus se puede modificar para 1) comprender codones preferidos por genes altamente expresados en un sistema de expresión de célula huésped particular (por ejemplo célula huésped bacteriana); 2) comprender un contenido de A + T o G + C en la composición de bases de nucleótidos con el hallado sustancialmente en dicha célula huésped; 3) formar una secuencia de iniciación de dicha célula huésped; o 4) eliminar secuencias que causan la desestabilización, la degradación y terminación de ARN, o que forman horquillas de estructura secundaria. El aumento de la expresión de la proteína de rotavirus en dicho sistema de expresión de célula huésped se puede lograr mediante la utilización de la frecuencia de distribución del uso de codones en procariotas.

[0076] La identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos puede establecerse por el "blas" por parejas del NCBI (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología) y la matriz BLOSUM62, utilizando los parámetros estándar (véase, por ejemplo, el algoritmo BLAST o BLASTX disponible en el servidor del "Centro Nacional de Información sobre Biotecnología" (NCBI, Bethesda, Md., EE.UU.), así como en Altschul et al.; y por lo tanto, este documento habla de utilizar el algoritmo o BLAST o BLASTX y la matriz BLOSUM62 por el término "blasts").

[0077] La "identidad" con respecto a secuencias puede referirse al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido por el número de nucleótidos o aminoácidos en la más corta de las dos secuencias en las que la alineación de las dos secuencias puede determinarse según el algoritmo de Wilbur y Lipman (Wilbur y Lipman), por ejemplo, usando un tamaño de ventana de 20 nucleótidos, una longitud de palabra de 4 nucleótidos, y una penalización por hueco de 4, y el análisis asistido por ordenador y la interpretación de los datos de secuencia que incluye la alineación se pueden realizar convenientemente utilizando programas disponibles comercialmente (por ejemplo, Intelligenetics® Suite, Intelligenetics Inc. CA). Cuando las secuencias de ARN se dice que son similares o tienen un grado de identidad u homología de secuencia con secuencias de ADN, la timidina (T) en la

secuencia de ADN se considera igual a uracilo (U) en la secuencia de ARN. Por lo tanto, las secuencias de ARN están dentro del alcance de la invención y pueden derivarse de secuencias de ADN, considerando la timidina (T) en la secuencia de ADN igual a uracilo (U) en las secuencias de ARN.

[0078] La identidad de secuencia o similitud de secuencia de dos secuencias de aminoácidos, o la identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar utilizando el paquete de software Vector NTI (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA).

[0079] Los siguientes documentos proporcionan algoritmos para comparar la identidad u homología relativa de secuencias, y adicionalmente o alternativamente con respecto a lo anterior, las enseñanzas de estas referencias pueden utilizarse para determinar el porcentaje de homología o identidad: Needleman SB y Wunsch CD; Smith TF y Waterman MS; Smith TF, Waterman MS y Sadler JR; Feng DF y Dolittle RF; Higgins DG y Sharp PM; Thompson JD, Higgins DG y Gibson TJ; y, Devereux J, Haeblerle P y Smithies O. Y, sin demasiada experimentación, el experto puede consultar muchos otros programas o referencias para determinar el porcentaje de homología.

[0080] Las reacciones de hibridación se pueden realizar bajo condiciones de diferente "rigurosidad". Las condiciones que aumentan la rigurosidad de una reacción de hibridación son bien conocidos. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et al, 1989).

[0081] La descripción abarca además el polinucleótido de rotavirus contenido en una molécula de vector o un vector de expresión y unido operativamente a un elemento promotor y opcionalmente a un potenciador.

[0082] Un "vector" se refiere a un ADN recombinante o plásmido de ARN o virus que comprende un polinucleótido heterólogo para liberarse a una célula diana, ya sea in vitro o in vivo. El polinucleótido heterólogo puede comprender una secuencia de interés para los fines de prevención o terapia, y opcionalmente puede estar en forma de un casete de expresión. Tal como se usa en este documento, un vector no necesita ser capaz de replicación en la última célula diana o sujeto. El término incluye vectores de clonación y vectores virales.

[0083] El término "recombinante" significa un polinucleótido de origen semisintético o sintético que, o bien no se produce en la naturaleza o está ligado a otro polinucleótido en una disposición no encontrada en la naturaleza.

[0084] "Heterólogo" significa derivado de una entidad genéticamente distinta del resto de la entidad a la que se está comparando. Por ejemplo, un polinucleótido puede colocarse mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una fuente diferente, y es un polinucleótido heterólogo. Un promotor eliminado de su secuencia codificante nativa y unido operativamente a una secuencia codificante distinta de la secuencia nativa es un promotor heterólogo.

[0085] Los polinucleótidos tal como se describen en el presente documento pueden comprender secuencias adicionales, tales como secuencias adicionales de codificación dentro de la misma unidad de transcripción, elementos de control, tales como promotores, sitios de unión a ribosomas, 5'UTR, 3'UTR, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, unidades de transcripción adicionales bajo el control del mismo promotor o diferente, secuencias que permiten la clonación, expresión, recombinación homóloga y transformación de una célula huésped, y cualquier constructo, tal como pueda ser deseable para proporcionar realizaciones de esta invención.

[0086] Los elementos para la expresión de un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de rotavirus están presentes ventajosamente en un vector de la invención. De una manera mínima, éste comprende un codón de iniciación (ATG), un codón de terminación y un promotor, y opcionalmente también una secuencia de poliadenilación para ciertos vectores tales como vectores plásmidos y ciertos vectores virales, por ejemplo, vectores virales distintos del virus de los poxvirus. Cuando el polinucleótido codifica un fragmento de polipéptido, por ejemplo, un polipéptido de rotavirus, ventajosamente, en el vector, un ATG se coloca en 5' del marco de lectura y un codón de parada se coloca en 3'. Pueden estar presentes otros elementos de control de la expresión, tales como secuencias potenciadoras, secuencias estabilizantes, tales como secuencias de intrones y secuencias señal que permiten la secreción de la proteína.

[0087] Se describen en el presente documento preparaciones que comprenden vectores, tales como vectores de expresión, por ejemplo, composiciones terapéuticas. Las preparaciones pueden comprender uno o más vectores, por ejemplo, vectores de expresión, tales como vectores de expresión in vivo, que comprenden y expresan uno o más polipéptidos, antígenos, epítipos o inmunógenos de rotavirus. El vector puede contener y expresar un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica y/o expresión de un antígeno, epítipo o inmunógeno de rotavirus, en un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable. Por lo tanto, el otro vector o vectores en la preparación pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en un polinucleótido que codifica, y bajo circunstancias apropiadas, el vector expresa una o más proteínas de un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de rotavirus (por ejemplo, hemaglutinina, cápside, neuraminidasa, nucleoproteína, proteína no estructural, enterotoxina) o un fragmento de los mismos.

[0088] El vector o vectores en la preparación puede comprender, o consistir esencialmente en, o consistir en un polinucleótido o polinucleótidos que codifican una o más proteínas o fragmento o fragmentos de un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de rotavirus. La preparación puede comprender uno, dos, o más vectores que comprenden polinucleótidos que codifican y expresan, ventajosamente in vivo, un polipéptido de rotavirus, antígeno, proteína de fusión o un epítipo del mismo. La descripción también está dirigida a mezclas de vectores que comprenden polinucleótidos que codifican y expresan diferentes polipéptidos, antígenos, epítipos, proteína de fusión o inmunógenos de rotavirus, por ejemplo, un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de rotavirus de diferentes especies tales como, pero no limitado a, humanos, cerdos, vacas o ganado, perros, gatos y aves.

[0089] El vector de expresión puede ser un vector plásmido, en particular un vector de expresión in vivo. En un ejemplo no limitativo específico, se puede utilizar el plásmido pVR1020 o 1012 (VICAL Inc.; Lucas et al, 1997; Hartikka et al, 1996, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 5.846.946 y 6.451.769) como un vector para la inserción de una secuencia de polinucleótido. El plásmido pVR1020 se deriva de pVR1012 y contiene la secuencia señal tPA humana. La señal tPA humana puede comprender desde el aminoácido M (1) al aminoácido S(23) en el Genbank bajo el número de acceso HUMTPA14. En otro ejemplo no limitativo específico, el plásmido utilizado como un vector para la inserción de una secuencia de polinucleótidos puede contener la secuencia de péptido señal de IGF1 equino desde el aminoácido M(24) al aminoácido A(48) en el Genbank con número de acceso U28070. Información adicional sobre plásmidos de ADN que pueden consultarse o emplear en la práctica se encuentran, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nº 6.852.705; 6.818.628; 6.586.412; 6.576.243; 6.558.674; 6.464.984; 6.451.770; 6.376.473 y 6.221.362.

[0090] El término plásmido cubre cualquier unidad de transcripción de ADN que comprende un polinucleótido según la invención y los elementos necesarios para su expresión in vivo en una célula o células del huésped o diana deseados; y, en este sentido, se observa que un plásmido circular superenrollado o no superenrollado, así como una forma lineal, se pretende que estén dentro del alcance de la invención.

[0091] Cada plásmido comprende o contiene o consiste esencialmente en, además del polinucleótido que codifica un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno de rotavirus, opcionalmente fusionado con una secuencia, variante, análogo o fragmento de péptido heterólogo, unido operativamente a un promotor o bajo el control de un promotor o dependiente de un promotor. En general, es ventajoso emplear un promotor funcional fuerte en células eucariotas. El promotor fuerte puede ser, pero no limitado a, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV-IE) de origen humano o murino, o que tiene opcionalmente otro origen, tal como la rata o cobaya.

[0092] En términos más generales, el promotor tiene un origen viral o un origen celular. Un promotor viral fuerte distinto del CMV-IE que puede emplearse de forma útil en la práctica de la invención es el promotor temprano/tardío del virus SV40 o el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous. Un promotor celular fuerte que puede emplearse de forma útil en la práctica de la invención es el promotor de un gen del citoesqueleto, tal como por ejemplo el promotor de desmina (Kwissa et al., 2000), o el promotor de actina (Miyazaki et al., 1989).

[0093] En cuanto a la señal de poliadenilación (poliA) para los plásmidos y vectores virales distintos de poxvirus, puede usarse la señal poli(A) del gen de la hormona de crecimiento bovina (bGH) (véase el documento US 5.122.458), o la señal poli(A) del gen de beta-globina de conejo o la señal poli(A) del virus SV40.

[0094] Una "célula huésped" se refiere a una célula procariota o eucariota que ha sido alterada genéticamente, o es capaz de ser alterada genéticamente mediante la administración de un polinucleótido exógeno, tal como un plásmido o vector recombinante. Cuando se hace referencia a células genéticamente modificadas, el término se refiere tanto a la célula originalmente alterada como a la progenie de la misma.

Procedimientos de uso y artículo de fabricación

[0095] La presente invención incluye las siguientes realizaciones de procedimiento. En una realización, se describe un procedimiento de vacunación de un animal que comprende administrar una composición que comprende un vector que comprende un polipéptido de rotavirus o un fragmento o variante del mismo y un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable a un animal. En un aspecto de esta realización, el animal es un cerdo.

[0096] En una realización de la invención, se puede emplear un régimen de sensibilización-refuerzo que se compone de al menos una administración primaria y al menos una administración de refuerzo usando al menos un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno común. Típicamente, la composición inmunológica o vacuna utilizada en la administración primaria es de naturaleza diferente de la utilizada como refuerzo. Sin embargo, se observa que la misma composición se puede utilizar como la administración primaria y la administración de refuerzo. Este protocolo de administración se llama "sensibilización-refuerzo".

[0097] Un régimen de sensibilización-refuerzo comprende al menos una administración de sensibilización y al menos una administración de refuerzo usando al menos un polipéptido común y/o variantes o fragmentos del mismo. La vacuna utilizada en la administración de sensibilización puede ser de naturaleza diferente a la utilizada como vacuna

de refuerzo posterior. La administración de sensibilización puede comprender una o más administraciones. Del mismo modo, la administración de refuerzo puede comprender una o más administraciones.

[0098] El volumen de dosis de composiciones para especies diana que son mamíferos, por ejemplo, el volumen de dosis de composiciones de cerdos o cochinos, basado en vectores virales, por ejemplo, composiciones basadas en vectores virales no poxvirus es generalmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,0 ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 ml, y de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 1,0 ml.

[0099] La eficacia de las vacunas puede probarse aproximadamente de 2 a 4 semanas después de la última inmunización mediante la estimulación de animales, tales como porcinos, con una cepa virulenta de rotavirus. Ambas cepas homólogas y heterólogas se utilizan para la estimulación para probar la eficacia de la vacuna. El animal puede estimularse por inyección IM o SC, aerosol, vía intra-nasal, intra-ocular, intra-traqueal, y/o por vía oral. El virus de la estimulación puede ser de aproximadamente 10^{5-8} EID₅₀, TCID₅₀ o 10^{3-8} equivalentes de genoma tal como se determina por qPCR en un volumen dependiendo de la vía de administración. Por ejemplo, si la administración es por pulverización, una suspensión de virus se aerosoliza para generar gotitas de aproximadamente 1 a 100 µm, si la administración es intra-nasal, intratraqueal u oral, el volumen del virus de estimulación es de aproximadamente 0,5 ml, 1-2 ml, y 5-10 ml, respectivamente. Los animales pueden ser observados diariamente durante 14 días después de la estimulación para detectar signos clínicos, por ejemplo, deshidratación, diarrea, heces pastosas a acuosa, muerte y/o pérdida de peso, retraso en el desarrollo, eliminación del virus. Además, los grupos de animales pueden ser sometidos a eutanasia y evaluar los hallazgos patológicos de la enfermedad intestinal, atrofia de las vellosidades. Se pueden recoger hisopos rectales o fecales de todos los animales tras la estimulación para el aislamiento o cuantificación o detección del virus. La presencia o ausencia de antígenos virales en los tejidos o las heces intestinales pueden ser evaluados mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Las muestras de sangre pueden recogerse antes y después de la estimulación y pueden ser analizadas para analizar la presencia de anticuerpos específicos de rotavirus.

[0100] Las composiciones que comprenden los polipéptidos antigénicos recombinantes de la invención usados en los protocolos de sensibilización-refuerzo están contenidas en un vehículo diluyente o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable. Los protocolos de la invención protegen el animal del rotavirus y/o previenen la progresión de la enfermedad en un animal infectado.

[0101] Las diversas administraciones se realizan preferiblemente con de 1 a 6 semanas de diferencia. El intervalo de tiempo preferido es de 3 a 5 semanas, y óptimamente 4 semanas. Según una realización, también se prevé un refuerzo anual. Los animales, por ejemplo, cerdos, pueden tener al menos 8 semanas de vida en el momento de la primera administración.

[0102] Se debe entender por un experto en la técnica que la presente descripción se proporciona a modo de ejemplo y la presente invención no se limita a ello. A partir de la descripción de este documento y el conocimiento en la técnica, el experto en la materia puede determinar el número de administraciones, la vía de administración, y las dosis a utilizar para cada protocolo de inyección, sin gran experimentación.

[0103] La presente invención contempla al menos una administración a un animal de una cantidad suficiente de la composición terapéutica producida según la invención. Por ejemplo, la cantidad suficiente puede ser de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 300 µg de proteína. En una realización, aproximadamente 100 µg de cada una de tres proteínas diferentes de rotavirus del grupo C están presentes en una cantidad suficiente de la composición terapéutica. El animal puede ser macho, hembra, hembra embarazada y recién nacido. Esta administración puede ser a través de diversas rutas incluyendo, pero no limitado a, inyección intramuscular (IM), intradérmica (ID), intraperitoneal (IP) o subcutánea (SC) o mediante administración intranasal o por vía oral. La composición terapéutica según la invención también se puede administrar mediante un aparato sin aguja (como, por ejemplo, Pulse Needle Free, Pulse Needlefree, Lenexa, KS, EE.UU., Pigjet, Dermojet, Biojector, Avijet (Meril, GA, EE.UU.), aparato Vetjet o Vitajet (Bioject, Oregon, EE.UU.)). Otro enfoque para la administración de composiciones de plásmidos es usar electroporación (véase, por ejemplo Tollefsen et al, 2002; Tollefsen et al, 2003; Babiuk et al, 2002; solicitud PCT No. WO99/01158). En otra realización, la composición terapéutica se administra al animal mediante pistola de genes o bombardeo de partículas de oro. En una realización ventajosa, el animal es un cerdo, perro, hurón o foca.

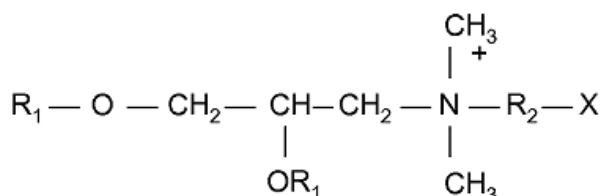
[0104] Se describe en el presente documento un kit para realizar un procedimiento de producir o inducir una respuesta inmunológica o protectora contra rotavirus en un animal que comprende una composición inmunológica o vacuna subunitaria de rotavirus y las instrucciones para realizar el procedimiento de liberación en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmune en el animal.

[0105] Se describe en el presente documento un kit para realizar un procedimiento de inducir una respuesta inmunológica o protectora contra rotavirus en un animal que comprende una composición o vacuna que comprende un polipéptido o antígeno de rotavirus de la invención, e instrucciones para realizar el procedimiento de liberación en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmune en el animal.

[0106] También se describe en el presente documento un kit para la vacunación de sensibilización-refuerzo según la presente invención tal como se describe anteriormente. El kit puede comprender al menos dos viales: un primer vial que contiene una vacuna o composición para la vacunación de sensibilización según la presente invención, y un segundo vial que contiene una vacuna o composición para el refuerzo de la vacunación según la presente invención. El kit puede contener ventajosamente primeros o segundos viales adicionales para vacunas de sensibilización adicionales o vacunas de refuerzo adicionales.

[0107] Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una solución de NaCl al 0,9% (por ejemplo, solución salina) o un tampón fosfato. Otros portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables que se pueden utilizar para los procedimientos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, poli-(L-glutamato) o polivinilpirrolidona. Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables 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 portador, 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 y también se pueden determinar por el experto en la materia a partir de esta descripción en relación con el conocimiento en la técnica, sin gran experimentación.

[0108] Los lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario que son ventajosamente, pero no exclusivamente, adecuados para plásmidos, son ventajosamente aquellos que tienen la siguiente 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 un grupo amina o hidroxilo, por ejemplo, DMRIE. En otra realización, el lípido catiónico puede estar asociado con un lípido neutro, por ejemplo DOPE.

[0109] Entre estos lípidos catiónicos, se da preferencia a DMRIE (N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-propano amonio; WO96/34109), ventajosamente asociado con un lípido neutro, ventajosamente DOPE (dioleoil-fosfatidil-etanolamina; Behr, 1994), para formar DMRIE-DOPE.

[0110] Cuando DOPE está presente, la relación molar de DMRIE:DOPE es ventajosamente aproximadamente 95:aproximadamente 5 a aproximadamente 5:aproximadamente 95, más ventajosamente aproximadamente 1:aproximadamente 1, por ejemplo, 1:1.

[0111] En otra realización, el portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una emulsión de agua-en-aceite. Ejemplos de emulsiones de agua-en-aceite adecuados incluyen emulsiones de agua-en-aceite vacunales de base aceite que son estables y fluidas a 4°C que contienen: de 6 a 50% v/v de una fase acuosa que contiene el antígeno, preferiblemente de 12 a 25% v/v, de 50 a 94% v/v de una fase aceite que contiene en total o en parte un aceite no metabolizable (por ejemplo, aceite mineral, tal como aceite de parafina) y/o aceite metabolizable (por ejemplo, aceite vegetal, o ácido graso, un poliol o ésteres de alcohol), de 0,2 a 20% p/v de tensioactivos, preferiblemente de 3 a 8% p/v, estando el último en total o en parte, o en una mezcla, ya sea de ésteres de poliglicerol ésteres, siendo dichos ésteres de poliglicerol preferiblemente (poli)ricinoleatos de poliglicerol, o aceites de ricino polioxietilenados u otros aceites de ricino polioxietilenados hidrogenados. Ejemplos de tensioactivos que pueden usarse en una emulsión de agua-en-aceite incluyen ésteres de sorbitán etoxilados (por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxietilenado (20) (TWEEN 80®), disponible de AppliChem, Inc., Cheshire, CT) y ésteres de sorbitán (por ejemplo, monooleato de sorbitán (SPAN 80®, disponible de Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Además, con respecto a una emulsión de agua-en-aceite, véase también el documento US 6.919.084. En algunas realizaciones, la fase acuosa que contiene antígeno comprende una solución salina que comprende uno o más agentes tamponantes. Un ejemplo de una solución tampón adecuada es solución salina tamponada con fosfato. En una realización ventajosa, la emulsión de agua-en-aceite puede ser una emulsión triple agua/aceite/agua (W/O/W) (US 6.358.500). Ejemplos de otras emulsiones adecuadas se describen en US 7.371.395.

[0112] Las composiciones y vacunas inmunológicas según la invención puede comprender o consistir esencialmente en uno o más adyuvantes. Los adyuvantes adecuados para uso en la práctica de la presente invención son (1) polímeros de ácido acrílico o metacrílico, anhídrido maleico y polímeros derivados con alqueno, (2) secuencias

inmunoestimulantes (ISS), tales como secuencias de oligodesoxirribonucleótidos que tienen una o más unidades CpG no metiladas (Klinman et al, 1996; 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, Plenum Press 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de la misma obra, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, por ejemplo, DDA (5) citoquinas, (6) hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, (7) saponina u (8) otros adyuvantes tratados en cualquier documento citado e incorporado por referencia en la presente solicitud, o (9) cualquier combinación o mezclas de los mismos.

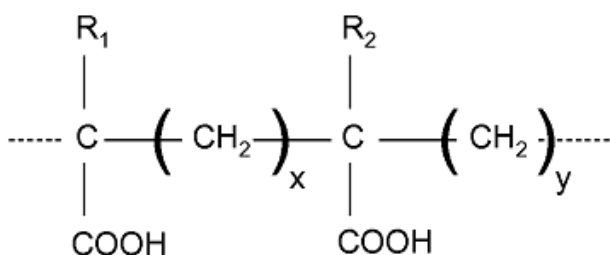
[0113] La emulsión de aceite en agua (3), que es especialmente apropiada para vectores virales, puede basarse en: aceite de parafina líquido ligero (tipo farmacopea europea), aceite de isoprenoide, tal como escualano, escualeno, aceite resultante de la oligomerización de alquenos, por ejemplo, isobuteno o deceno, ésteres de ácidos o alcoholes que tienen un grupo alquilo de cadena lineal, tales como aceites vegetales, oleato de etilo, propilenglicol, di(caprilato/caprato), tri(caprilato/caprato) de glicerol y dioleato de propilenglicol, o ésteres de alcoholes grasos o ácidos ramificados, especialmente ésteres de ácido isoesteárico.

[0114] El aceite se utiliza en combinación con emulsionantes para formar una emulsión. Los emulsionantes pueden ser tensioactivos no iónicos, tales como: ésteres de, por una parte, sorbitán, manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), glicerol, poliglicerol o propilenglicol y, por otra parte, ácidos oleico, isoesteárico, ricinoleico o hidroxisteárico, estando dichos ésteres opcionalmente etoxilados, o bloques de copolímero de polioxipropileno-polioxitileno, tal como Pluronic, por ejemplo, L121.

[0115] Entre los polímeros adyuvantes de tipo (1), se da preferencia a polímeros de ácido acrílico o metacrílico reticulado, especialmente reticulado por polialqueniil éteres de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos son conocidos bajo el nombre de carbómero (Pharmeuropa, vol. 8, no. 2, junio de 1996). Un experto en la técnica también puede hacer referencia a US 2909462, que proporciona tales polímeros acrílicos reticulados por un compuesto polihidroxílico que tiene al menos tres grupos hidroxilo, preferiblemente no más de ocho de tales grupos, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres grupos hidroxilo sustituidos por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos dos átomos de carbono. Los radicales preferidos son aquellos que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados también pueden contener otros sustituyentes, tales como metilo. Los productos vendidos bajo el nombre Carbopol (BF Goodrich, Ohio, EE.UU.) son especialmente adecuados. Se reticulan por alil sacarosa o por alilpentaeritritol. Entre ellos, se hace referencia a Carbopol 974P, 934P y 971P.

[0116] En cuanto a los copolímeros derivados de anhídrido maleico-alqueniilo, se da preferencia a EMA (Monsanto), que son copolímeros de etileno-anhídrido maleico de cadena lineal o reticulados y están, por ejemplo, reticulados por divinil éter. También se hace referencia a J. Fields et al., 1960.

[0117] Con respecto a la estructura, los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y EMA están formados preferentemente 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 o 2, con x + y = 2.

[0118] Para EMA, x = 0 e y = 2 y para carbómeros x = y = 1.

[0119] Estos polímeros son solubles en agua o solución salina fisiológica (20 g/1 NaCl) y el pH se puede ajustar a de 7,3 a 7,4, por ejemplo, mediante sosa (NaOH), para proporcionar la solución adyuvante en la que se puede incorporar el vector o vectores de expresión. La concentración de polímero en la composición inmunológica o de vacuna final puede oscilar entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1,5% p/v, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1% p/v, y de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,4% p/v.

[0120] La citoquina o citoquinas (5) pueden estar en forma de proteína en la composición inmunológica o de vacuna, o pueden coexpresarse en el huésped con el inmunógeno o inmunógenos o epítipo o epítopos de los mismos. Se da preferencia a la coexpresión de la citoquina o citoquinas, ya sea por el mismo vector que expresa el inmunógeno o inmunógenos o epítipo epítopos del mismo, o por un vector separado de la misma.

[0121] La invención comprende la preparación de tales composiciones de combinación; por ejemplo mezclando los componentes activos, de forma ventajosa entre sí y con un adyuvante, portador, citoquina, y/o diluyente.

[0122] Las citoquinas que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), interferón α (IFN α), interferón β (IFN- β), interferón γ (IFN- γ), interleuquina-1 α (IL-1 α), interleuquina-1 β (IL-1 β), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-5 (IL-5), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-7 (IL-7), interleuquina-8 (IL-8), interleuquina-9 (IL-9), interleuquina-10 (IL-10), interleuquina-11 (IL-11), interleuquina-12 (IL-12), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor de necrosis tumoral β (TNF- β), y factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Se entiende que las citoquinas se pueden coadministrar y/o administrar secuencialmente con la composición inmunológica o de vacuna de la presente invención. Así, por ejemplo, la vacuna de la presente invención puede también contener una molécula de ácido nucleico exógena que expresa in vivo una citoquina adecuada, por ejemplo, una citoquina emparejada a este huésped a vacunar o en el que debe provocarse una respuesta inmunológica (por ejemplo, una citoquina canina para las preparaciones a administrar a canino).

[0123] La invención se describirá a continuación adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

[0124] *Resumen.* Las vacunas virales se producen típicamente usando virus completos aislados a partir de muestras clínicas de los animales infectados, mediante adaptación del virus y propagación en embriones de huevos o en cultivo celular in vitro. Los rotavirus porcinos del grupo C son notoriamente difíciles de recuperar por estas técnicas virológicas convencionales, y los rotavirus se cree generalmente que son propensos a la distorsión antigénica durante la adaptación al embrión del huevo o el crecimiento de cultivo de células, lo que resulta en la producción de vacunas subóptima del virus completo aislado. Por lo tanto, se construyó un vector de expresión (pNPL2, SEQ ID NO: 15) para permitir la producción de vacunas que comprenden proteínas recombinantes de rotavirus del grupo C VP4, VP6 y/o NSP4. El material genético de rotavirus se rescató por PCR a partir de material clínico suministrado por un veterinario del hato. Se añadió a pNPL2 (a través del proceso descrito en este documento y se muestra en la Figura 7) un gen de codificación de los polipéptidos/subunidades VP4 (18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, o 40), VP6 (42, 44, 46, 48, o 50), o NSP4 (52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, o 72) para producir vectores pNPL2-RotaC, cada uno de los cuales codifica y es capaz de expresar en una célula huésped bacteriana una porción de cualquiera de NSP4, VP4, o VP6. Estos vectores se cultivaron después en células *E. coli* SE1, que expresan constitutivamente la toxina proteica ccdB, que mata las bacterias en ausencia del vector. Las células se cultivaron, inactivaron, y a continuación se recogieron las proteínas rotavirales expresadas de forma recombinante y se formularon con adyuvante para su uso como una vacuna autógena de proteínas subunitaria no viable. Las composiciones de vacuna de la invención provocaron en los animales porcinos inmunidad protectora contra rotavirus.

Ejemplo 1-Construcción del vector para la producción autógena o comercial de vacunas subunitarias de rotavirus

[0125] Construcción del vector de expresión pNPL1 y 2. El vector de expresión pNPL2 (SEQ ID NO: 15) se construyó a partir del vector pStaby1.2 (SEQ ID NO: 1) de Delphi Genetics (manual del usuario de pStaby1.2, tal como se publicó en 2011), mediante la delección del gen de resistencia a ampicilina y la inserción de un gen de GST (glutación S-transferasa), para facilitar el procesamiento de proteínas aguas abajo durante la producción. El vector no contiene ni expresa características de virulencia de mamíferos no conocidas, y, además, todos los genes de resistencia a antibióticos se eliminaron del mismo durante su construcción. pNPL2 se cultivó en *E. coli* SE1, y juntos son un sistema de producción huésped/vector de *E. coli* de cepa B (Manual del usuario pStaby).

[0126] El mapa de restricción de pStaby1.2 se presenta en la Figura 1, y como se indica, contiene un promotor T7 para dirigir la expresión del gen que codifica la proteína recombinante. El plásmido también contiene el gen *ccdA*, que codifica una proteína antídoto inestable, que inhibe la expresión de una proteína antigirasa estable (*ccdB*), que es tóxica para las células de *Enterobacteriaceae*. La proteína de *ccdB* está codificada por el gen *ccdB* que está presente en el cromosoma de las células huésped de *E. coli* SE1 huésped (el gen *ccdB* no está presente en el plásmido pStaby1.2). Después de la transformación, la presencia del gen *ccdA* en el plásmido asegura que las células transformadas con éxito son viables mientras que las células SE1 no portadoras de plásmidos producen la toxina sin antídoto y son por lo tanto no viables.

[0127] El gen de resistencia a ampicilina del vector pStaby1.2 se consideró indeseable para su uso en la producción de vacunas subunitarias de rotavirus, y por lo tanto se eliminó usando la técnica de PCR inversa (Figura 2). Una lista de los cebadores usados para todos los procedimientos descritos se muestra en la Tabla 1. El producto de PCR final se fosforiló y se autoligó para producir pNPL1 (SEQ ID NO: 14). A continuación, se añadió GST a pNPL1 para

aumentar el tamaño de cualquier proteína expresada, y para mejorar el procesamiento aguas abajo/análisis en línea. La GST se amplificó por PCR a partir de pGEX4T.1 (GE Life Sciences) utilizando los cebadores # 650 (SEQ ID NO: 2) y # 651 (SEQ ID NO: 3), y a continuación el amplicón (SEQ ID NO: 16) se digirió y se clonó en pNPL1 linealizado con NdeI-BamHI para producir pNPL2 (Figuras 2-4). pNPL2 digerido con BamHI y HindIII produjo dos bandas visibles en un gel de agarosa (5682 pb y 25 pb).

[0128] *Constricción de pNPL3.* Se realizó la PCR usando los cebadores KSN772 (SEQ ID NO: 77) y KSN773 (SEQ ID NO: 78), y pNPL1 como plantilla. El producto de PCR se fosforiló y se autiligó a partir de pNPL3, que ahora contenía una etiqueta de hexa-His. Los genes de NSP4, VP4, VP6 o VP7 pueden clonarse en el vector de pNPL3 digerido con BamHI y HindIII por reacción de infusión usando los productos de PCR generados mediante el uso de cebadores expuestos en las SEQ ID NOS: 79-89. pNPL3 es similar a pNPL2, excepto que pNPL3 carece de la secuencia de codificación para el gen de GST. En su lugar, pNPL3 tiene una secuencia que codifica una etiqueta de His, permitiendo péptidos de fusión etiquetados con His N-terminal.

Ejemplo 2-Producción de vacuna subunitaria de rotavirus autógena

[0129] Se aislaron ARN de rotavirus, se purificaron directamente a partir de muestras clínicas recogidas de cerdos infectados, y se sometieron a PCR de transcripción inversa (RT-PCR) usando cebadores específicos para genes que codifican VP4 (cebadores proporcionados por SEQ ID NOS: 10, 11), VP6 (cebadores proporcionados por SEQ ID NO: 12, 13), y NSP4 (cebadores proporcionados por SEQ ID NO: 8, 9). Cada par de cebadores fue diseñado para unirse a una región altamente conservada en cada extremo del gen diana (Figura 5), lo que permite la amplificación del genes rotavirales del grupo C de muchos aislados virales diferentes. Si los genes no pueden ser amplificados utilizando los cebadores específicos del gen de rotavirus C, como se establece en SEQ ID NOS: 8, 9, 10, 11, 12 y 13, se pueden diseñar y utilizar cebadores alternativos por las personas expertas utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden emplear cebadores degenerados, de manera que las posiciones críticas de cebadores (por ejemplo, el nucleótido terminal 3') se puede variar para dar cabida a la desviación de la plantilla de las secuencias conservativas. Los cebadores que tienen la secuencia tal como se expone en SEQ ID NOS: 73, 74, 75 y 76 se pueden usar para amplificar y clonar secuencias de VP4 en pNPL1 y/o pNPL2. Las SEQ ID NOS: 73 y 74 se pueden utilizar para amplificar la secuencia de VP4 y clonarla en el vector TOPO. A partir de entonces, las SEQ ID NOS: 75 y 76 se pueden utilizar para insertar la secuencia de VP4 en el vector pNPL2, para la producción de la posteroiro vacuna subunitaria.

[0130] El extremo 5' de cada cebador incluía una secuencia de 15 nucleótidos para permitir la inserción en pNPL2 durante una reacción de infusión posterior. El aislamiento y la amplificación de los genes rotavirales de origen en el campo para la producción de ADN del donante a utilizar en el sistema de expresión se muestran en las Figuras 4, 5 y 6. La presencia de los genes *ccda* (vector codificado) y *ccdB* (genoma de la célula codificada) dentro de células SE1 transformadas da como resultado cultivos estables viables que expresan el gen de rotavirus. Cualquier célula no transformada o curada con plásmidos son inviables. La inserción de genes se caracterizó y verificó por secuenciación y la expresión de la proteína se verificó por SDS PAGE (Figura 8), lo que indicó pesos moleculares aproximados de 36 kDa (NSP4), 52 kDa (VP4), y 68 kDa (VP6). Este enfoque se prevé que sea aplicable a cualquier cepa del campo de rotavirus que tiene suficiente homología con los cebadores de clonación en las regiones conservadas.

[0131] Para la producción a gran escala, las colonias individuales o múltiples colonias uniformes se transfirieron a medios LB de 10 ml-200.000 ml. Cuando la densidad óptica, medida a 600 nm, alcanzó 0,4-1,0, se añadió IPTG ([isopropil β-D-tiogalactopiranosido] Sigma Aldrich nº de catálogo 15502 o equivalente) a una concentración final de 1 mM. Los cultivos se incubaron durante 2-6 horas adicionales. Los cultivos se pueden hacer crecer en un fermentador, de la siguiente manera:

a. Temperatura del cultivo se mantiene a 36°C ± 3°C.

b. Flujo de aire comprimido filtrado se mantiene a 0,1-300 L/minuto.

c. pH del cultivo se mantiene a 7,4 ± 0,3.

d. Cuando la densidad óptica, medida a 600 nm, alcanza 0,4-1,0, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM.

Los cultivos se incubaron durante 2-6 horas adicionales.

[0132] *Técnica de recogida.* El medio de cultivo gastado se separó de las células de E. coli por filtración o centrifugación, y las células se concentraron por filtración usando un filtro de 0,1-0,45 micras. Las células concentradas se lisaron a continuación usando reactivo B-PER (Thermo Scientific, nº de catálogo 78248 o equivalente) a continuación, con agitación o moviendo la solución durante 0,5-2 horas. Las células lisadas se concentraron por centrifugación a 5000-10000 g durante 15-30 minutos o por filtración usando un filtro de 0,1 a 0,45 micras y se desactó el sobrenadante/permeado. El sedimento/concentrado se volvió a suspender en tampón de lavado A (Tris-HCl 20 mM, EDTA 2 mM y Triton X-100 al 0,1%, ajustar el pH a de 7,5 a 8,5) mediante agitación o movimiento durante 0,1-0,5 horas, y la suspensión resultante se concentró por centrifugación a 5000-10000 g durante 15-30 minutos o por filtración usando un filtro de 0,1 a 0,45 micras. El sedimento/concentrado se volvió a suspender en tampón de lavado B (Tris-HCl 20 mM y EDTA 2 mM, ajustar el pH a de 7,5 a 8,5) mediante agitación o movimiento durante 0,1-0,5 horas, a continuación la suspensión se concentró por centrifugación a 5000-10000 g

durante 15 -30 minutos o por filtración usando un filtro de 0,1-0,4 micras. Después de suspender en urea 8 M (Sigma-Aldrich, nº de catálogo U6504 o equivalente) y agitación o movimiento durante 0,5-2 horas, la suspensión final se diluyó con PBS estéril.

[0133] Formulaciones de vacuna. Después de la recogida, las subunidades de rotavirus se formularon con TRIGEN (aceite en agua) y conservantes (gentamicina a una concentración de <30,0 µg/ml y anfotericina B a una concentración de < 2,50 µg/ml o polimixina B a una concentración de < 30 µg/ml). Se añadió a la mezcla a) gel de hidróxido de aluminio (ALHYDROGEL® "85", fabricado por Brenntag Biosector, Cat. No. EMS 2485-2 o REHYDRAGEL® HPA, Reheis Cat. No. 203130070600, REHYDRAGEL LV, Reheis Cat. No. 203120070602 o equivalente) que proporciona de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5% de Al₂O₃ en el producto final. Alternativamente, el adyuvante Quil A estaba presente en las formulaciones en una proporción de 0,5 a 2,5% de los fluidos inactivados con aceite en adyuvante agua. Los adyuvantes comprenden desde aproximadamente 10 a aproximadamente 50% del producto final.

Ejemplo 3 - Inmunización de cerdas utilizando vacunas subunitarias de rotavirus autógenas

[0134] Resumen. 48 cerdas de investigación, con infección crónica por rotavirus C y de paridad similar se utilizaron en el estudio de eficacia de la vacuna. Veintiséis (26) animales fueron controles vacunados con placebo, mientras que 22 animales recibieron vacuna subunitaria de rotavirus que comprendía una mezcla de VP4, VP6, NSP4, y de emulsión/adyuvantes adicionales. La vacuna se formula de tal manera que hay aproximadamente 100 microgramos de cada proteína (un total de 300 microgramos de proteína) y Trigen al 10% por cada dosis de vacuna. Las vacunas se administraron por vía intramuscular a las 6 y 3 semanas antes del parto. Se recogió suero de la sangre de cerdas antes de la vacunación y del parto, y posteriormente se recogió suero de sangre de lechones a los 7 días después del parto.

[0135] Resultados. Los lechones nacidos de cerdas no vacunadas tuvieron una tasa de mortalidad del 21%, en comparación con los lechones nacidos de cerdas vacunadas, que tenían una tasa de mortalidad del 14% (es decir, un 33% de disminución). La morbilidad también se redujo significativamente en los cerdos nacidos de cerdas vacunadas. Los lechones de cerdas vacunadas también tenían significativamente ($p < 0,05$) títulos de anticuerpos más altos que los lechones de control (Figura 9).

Ejemplo 4 - Eficacia de una nueva vacuna de Rotavirus C en la reducción de la incidencia de diarrea en el lechón-cerdo y mejora del rendimiento

[0136] Resumen. Se seleccionó una raza de 3600 cerdas de un grupo de destete para evaluar la eficacia de una nueva vacuna contra el rotavirus C. El grupo consistía en hembras PIC L03 cruzadas con jabalíes de línea 02. Todas las dietas suministradas en la granja se formulan para cumplir o exceder los requerimientos de nutrientes (NRC, 1998). Las cerdas y cerdas jóvenes fueron asignadas aleatoriamente a uno de dos tratamientos (control (CON) o vacuna RS de Rota C (VACC) basándose en el día de la reproducción y dentro de la paridad. Los animales en el grupo VACC asignado recibieron 2 ml de vacuna por vía intramuscular a las 3 semanas; 3 y 5 semanas; o 3, 5, y 8 semanas antes del parto. Todas las crías de estos animales se alimentaron de forma cruzada en 24 horas del nacimiento mediante tratamiento. Las puntuaciones de la diarrea se realizaron diariamente desde el día de nacimiento hasta el día 5. Se dio una puntuación de 0 (sin diarrea), 1 (poca diarrea), 2 (50% de las crías con diarrea), o 3 (más del 50% de las crías con diarrea). Se registraron los cerdos extraídos de las crías originales debido a la mortalidad asociada con la diarrea. No hubo diferencias en las puntuaciones de la diarrea o la mortalidad asociada con la diarrea cuando se utilizaron los programas de vacunación de la semana 3 o las semanas 3, 5 y 8. Sin embargo, las puntuaciones de la diarrea se redujeron entre los tratamientos CON y VACC (3 y 5 semanas) (0,56 vs. 0,41, $P < 0,05$). Además, el porcentaje de crías con diarrea se redujo del día 1 hasta el día 5 con el tratamiento VACC (semanas 3 y 5) frente al CON. En conclusión, la nueva vacuna contra el rotavirus C no alteró la incidencia de diarrea de cerdos lechones o la mortalidad cuando las cerdas se vacunaron una vez o tres veces. Sin embargo, el uso de la vacuna novedosa pareció reducir la incidencia de diarrea cuando se les administra a las 3 y 5 semanas antes del parto.

[0137] Tratamientos. Las cerdas y cerdas jóvenes fueron asignados aleatoriamente a uno de cuatro tratamientos (control (CON) o tratamientos de vacunas Newport 1-3 (VACC) basándose en el día de la reproducción y dentro de paridad. La formulación fue de 100 microgramos de cada polipéptido: VP4 (SEQ ID NO: 42), VP6 (SEQ ID NO: 52) y NSP4 (SEQ ID NO: 18), que se originó a partir de la muestra aislada 1 de rotavirus. Estas subunidades de la proteína se combinaron con TRIGEN al 10% (compuesto aproximadamente de 1,6% de monooleato de sorbitán polioxietileno, 10% gel de hidróxido de aluminio, 38% solución acuosa/salina, 45% de aceite mineral purificado, y 5% de monooleato de sorbitán) formulado para una dosis de 2 cc. Los animales en el grupo 1 de tratamiento VACC asignado recibieron 2 ml de vacuna por vía intramuscular a las 3 semanas antes del parto, los animales en el grupo 2 de tratamiento VACC asignado recibieron 2 ml de vacuna por vía intramuscular a las 5 semanas antes del parto y de nuevo otra vez 3 semanas antes del parto, los animales en el grupo 3 de tratamiento VACC asignado recibieron 2 ml de vacuna por vía intramuscular a las 7 semanas antes del parto, 5 semanas antes del parto, y de nuevo 3 semanas antes del parto. Todas las crías de estos animales se alimentaron de forma cruzada dentro de las 24 horas del nacimiento mediante tratamiento.

[0138] Recopilación de Datos. Las puntuaciones de diarrea se llevaron a cabo diariamente desde el día de nacimiento hasta el día 5. El individuo del que se compilaron todos los datos era ciego de las asignaciones de tratamiento originales. Los cerdos extraídos de las camadas originales debido a la mortalidad asociada con la diarrea se anotaron en el día de la extracción y se compilaron como la mortalidad/morbidez en el conjunto de datos.

[0139] Análisis de datos. La mortalidad/morbidez y las puntuaciones de diarrea se analizaron utilizando los procedimientos GLM. También se incluyeron en el modelo el espacio y la paridad.

[0140] Resultados. La mortalidad y la morbilidad de lechones se redujeron en el grupo que recibió dos dosis de la vacuna antes del parto en comparación con sus respectivos homólogos de control, aunque no significativamente. Sin embargo, en los grupos que recibieron una o tres dosis de vacuna, no hubo diferencias. Las puntuaciones de diarrea fueron significativamente diferentes solamente en el día 1 después del parto para el tratamiento de vacunación de dos dosis. No se observaron otras diferencias en las puntuaciones de diarrea en cualquier otro punto de tiempo o con el programa de una o tres dosis. De manera interesante en este estudio, la vacuna mostró una reducción utilizando el programa de vacunación de dos dosis y no el programa de dosis única o triple.

Tabla 2. Datos de rendimiento medidos con la vacunación de 2 dosis.

	CON	VACC	Valor P
Mortalidad debido a diarreas, n	37	23	
Mortalidad debido a diarreas, %	1,72	1,02	0,19
Defectuosos, %	0,69	0,92	0,53

Tabla 3. Puntuación promedio de diarrea por día después del parto con vacunación de 2 dosis.

	CON	VACC	SEM	Valor P
Día 1	0,56	0,41	0,06	0,05
Día 2	0,87	0,84	0,07	0,77
Día 3	1,01	1,00	0,08	0,98
Día 4	0,51	0,40	0,10	0,41
Día 5	0,29	0,24	0,04	0,37

Tabla 4. Puntuación promedio de diarrea por día después del parto con vacunación de 3 dosis.

	CON	VACC	SEM	Valor P
Día 1	0,30	0,32	0,10	0,84
Día 2	0,61	0,40	0,12	0,15
Día 3	0,80	0,76	0,13	0,79
Día 4	0,25	0,15	0,09	0,32
Día 5	0,02	0,00	0,02	0,31

Ejemplo 5-Producción de vacuna contra el rotavirus C de triple fusión

[0141] Resumen. Como se describió anteriormente, la producción de la vacuna subunitaria de Rota C se llevó a cabo mediante la clonación de los tres genes diferentes (NSP4, VP4 y VP6) en tres vectores diferentes y el crecimiento de tres cultivos diferentes de E. coli. Para simplificar este proceso, los tres genes fueron colocados en un único vector plásmido, en tándem y en marco, permitiendo así la producción de vacunas usando un único lote de cultivo de E. coli. Este constructo se construyó clonando los genes de Rota C (aislados 12-1260-5) en pNPL2 (etiqueta de GST en marco en el extremo N-terminal). La fusión de tres genes (no incluyendo la etiqueta de GST) tiene la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 94. La poliproteína codificada tiene la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 95.

[0142] Materiales y Procedimientos. Se extrae ARN de una muestra clínica usando el kit de extracción de ARN viral de Qiagen según el protocolo del fabricante. La concentración y pureza del ARN se verificó midiendo la absorbancia a 260 y 280 usando Nanodrop. El ARN fue calificado si la relación 260/280 fue de al menos 1,7 y la concentración de ARN fue de al menos 50 ng/μl. Los genes rotavirales se amplificaron (cebadores expuestos en la Tabla 5) y los productos de la PCR se purificaron usando el kit de purificación Qiagen PCR. El tamaño de los productos se confirmó mediante el desarrollo en un gel de ADN (NSP4-300 pb, VP4-750 pb, VP6-1200 pb) y se estimó la concentración usando Nanodrop.

Tabla 5. Cebadores de triple fusión de rota C

SEQ ID	Nombre	Orientación	Secuencia
8	KSN652	NSP4 Directa	GGTTCCGCGTGGATCCATCACCTCAAAAACTG
13	KSN657	VP6 Inversa	GTGCGGCCGCAAGCTTCTACATCACCATTCTCTC
96	KSN859	NSP4 Inversa	AAGTGAGGACGCCCTTAGACAAACTTCCGTCTCC
97	KSN860	VP4 Directa	AGGGCGTCCTCACTTTATC
98	KSN861	VP4 Inversa	TGAAAACAGCACGTCTAACACCATCATTCTC
99	KSN862	VP6 Directa	GACGTGCTGTTTTCAATTGC

[0143] *Clonación de productos de PCR en pNPL2.* Los tres productos fueron clonados de forma simultánea en el vector de expresión. La reacción se estableció como se indica a continuación y se incubó a 50°C durante 15 min seguido de mantenimiento a 4°C. Se usan aproximadamente 5 µl de los productos de reacción para transformar células competentes de *E. coli* Cys21 (Cat # GE-STCB-22) según las recomendaciones del fabricante (Delphi Genetics). La *E. coli* recombinante que contiene el plásmido se cultiva en medio LB y el ADN plasmídico se secuenció utilizando cebadores enumerados en la Tabla 5 junto con el promotor T7 y cebadores del terminador T7 (cebadores libres estándar). Las secuencias fueron alineadas para generar un marco de lectura abierto grande y se verificó su precisión; el ORF contenía los tres genes en el marco con la etiqueta de GST (GST-NSP4-VP4-VP6; aproximadamente 2,9 kb).

Tabla 6. Mezcla de reacción de ligación de triple fusión

Marcador	Volumen
pNPL2 cortado con BamH I y Hind III (~ 50 ng/ul)	3 µl
producto de PCR NSP4 (~ 50 ng/ul)	0,5 µl
producto de PCR VP4 (~ 50 ng/ul)	1 µl
producto de PCR VP6 (~ 50 ng/ul)	1,5 µl
5X mezcla de clonación HD por infusión (Cat # 639646, Clontech)	2 µl
agua libre de nucleasa	2 µl

[0144] *Análisis de la expresión de la poliproteína NSP4-VP4-VP6.* La expresión proteica fue inducida en la cepa SE1 de *E. coli* mediante la adición de IPTG según protocolos estándar. Los fluidos de cultivo se separaron en un gel PAGE para verificar la expresión de la proteína de fusión (Figura 12). La proteína de fusión estaba presente en la fracción soluble en urea de los fluidos, pero no en la fracción de solución B (PAGE, los datos no se muestran). La proteína de fusión soluble en urea se diluyó con agua 1:20 y 1:40, y se desarrolló en PAGE para la posterior transferencia Western. La transferencia se sondeó utilizando anticuerpo monoclonal contra GST (Genscript A00866 Cat) a 0,1 µg/ml de concentración final usando el protocolo estándar (Figura 13).

LISTADO DE SECUENCIAS

[0145]

<110> Merial
Bey, Russell
Sirigireddy, Kamesh
Hause, Benjamin
Simonson, Randy

<120> Vacunas subunitarias de Rotavirus C y procedimientos para la fabricación y utilización de las mismas

<130> x1V1541

<160> 99

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5932

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pStaby1

ES 2 632 429 T3

	<400> 1		
	tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaacgcgc gcgggtgtgg tggttacgcg	60	
5	cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcgccgt cctttcgctt tcttcccttc	120	
	ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg	180	
	gttccgattt agtgctttac ggcacctga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc	240	
10	acgtagtggg ccatcgccct gatagacggg ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt	300	
	ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc	360	
	ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta	420	
15	acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt	480	
	tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta	540	
20	tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat	600	
	gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt	660	
25	ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg	720	
	agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaaagatc cttgagagtt ttcgccccga	780	
	agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg	840	
30	tattgacgcc gggcaagagc aactcggctg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt	900	
	tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg	960	
35	cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg	1020	
	aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga	1080	
	tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc	1140	
40	tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaacggc gaactactta ctctagcttc	1200	
	ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc	1260	
45	ggcccttccg gctggctggg ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg	1320	
	cggatatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac	1380	
	gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc	1440	
50	actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt	1500	
	aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac	1560	
55	caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa	1620	
	aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc	1680	
	accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt	1740	
60	aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg	1800	
	ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc	1860	
65	agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt	1920	
	accggataag gcgcagcggg cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga	1980	
	gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct	2040	

ES 2 632 429 T3

	tcccgaaggg	agaaaggcgg	acaggtatcc	ggtaagcggc	agggtcggaa	caggagagcg	2100
5	cacgagggag	cttccagggg	gaaacgcctg	gtatctttat	agtcctgtcg	ggtttcgcca	2160
	cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	gggcggagcc	tatggaaaaa	2220
	cgccagcaac	gcggcctttt	tacggttcct	ggccttttgc	tggccttttg	ctcacatgtt	2280
10	ctttcctgcg	ttatcccctg	attctgtgga	taaccgtatt	accgcctttg	agtgagctga	2340
	taccgctcgc	cgcagccgaa	cgaccgagcg	cagcgagtca	gtgagcgagg	aagcgggaaga	2400
15	gcgcctgatg	cggatatttt	tccttacgca	tctgtgcggg	atttcacacc	gcataatatgg	2460
	tgcactctca	gtacaatctg	ctctgatgcc	gcatagttaa	gccagtatac	actccgctat	2520
	cgctacgtga	ctgggtcatg	gctgcgcccc	gacacccgcc	aacacccgct	gacgcgccct	2580
20	gacgggcttg	tctgctcccg	gcatccgctt	acagacaagc	tgtgaccgtc	tccgggagct	2640
	gcatgtgtca	gaggttttca	ccgtcatcac	cgaaacgcgc	gaggcagctg	cggtaaagct	2700
25	catcagcgtg	gtcgtgaagc	gattcacaga	tgtctgcctg	ttcatccgcg	tccagctcgt	2760
	tgagtttctc	cagaagcggt	aatgtctggc	ttctgataaa	gcggggccatg	ttaagggcgg	2820
	ttttttcctg	tttggtcact	gatgcctccg	tgtaaggggg	atcttctgttc	atgggggtaa	2880
30	tgataccgat	gaaacgagag	aggatgctca	cgatacgggt	tactgatgat	gaacatgccc	2940
	ggttactgga	acgttgtgag	ggtaaacaac	tggcgggtatg	gatgcggcgg	gaccagagaa	3000
35	aaatcactca	gggtcaatgc	cagcgcttcg	ttaatacaga	tgtaggtgtt	ccacagggta	3060
	gccagcagca	tcctgcgatg	cagatccgga	acataatggg	gcagggcgct	gacttccgcg	3120
	tttcagact	ttacgaaaca	cggaaaccga	agaccattca	tgttggttgct	caggtcgcag	3180
40	acgttttgca	gcagcagtcg	cttcacgttc	gctcgcgtat	cggtgattca	ttctgctaac	3240
	cagtaaggca	accccgccag	cctagccggg	tcctcaacga	caggagcacg	atcatgcgca	3300
45	cccgtggggc	cgccatgccg	gcgataatgg	cctgcttctc	gccgaaacgt	ttggtggcgg	3360
	gaccagtga	gaaggcttga	gcgagggcgt	gcaagattcc	gaataaccga	agcgacaggc	3420
	cgatcatcgt	cgcgctccag	cgaaagcggg	cctcgccgaa	aatgacccag	agcgctgccg	3480
50	gcacctgtcc	tacgagttgc	atgataaaga	agacagtcac	aagtgcggcg	acgatagtca	3540
	tgccccgcgc	ccaccggaag	gagctgactg	ggttgaaggc	tctcaagggc	atcggtcgag	3600
55	atcccgggtg	ctaatgagtg	agctaactta	cattaattgc	gttgcgctca	ctgcccgcct	3660
	tccagtcggg	aaacctgtcg	tgccagctgc	attaatgaat	cggccaacgc	gcggggagag	3720
	gcggtttgcg	tattgggcgc	caggggtggt	tttcttttca	ccagtgcgac	gggcaacagc	3780
60	tgattgccct	tcaccgcctg	gccctgagag	agttgcagca	agcgggtccac	gctggtttgc	3840
	cccagcaggc	gaaaatcctg	tttgatgggtg	gttaacggcg	ggatataaca	tgagctgtct	3900
65	tcggtatcgt	cgtatcccac	taccgagata	tccgcaccaa	cgcgagccc	ggactcggta	3960
	atggcgcgca	ttgcgcccag	cgccatctga	tcgttggtgca	ccagcatcgc	agtgggaacg	4020
	atgccctcat	tcagcatttg	catggtttgt	tgaaaaccgg	acatggcact	ccagtcgcct	4080

ES 2 632 429 T3

	tcccgttccg	ctatcggctg	aatttgattg	cgagtgagat	atttatgcca	gccagccaga	4140
5	cgcagacgcg	ccgagacaga	acttaatggg	cccgcctaaca	gcgcgatttg	ctggtgaccc	4200
	aatgcgacca	gatgctccac	gcccagtcgc	gtaccgtctt	catgggagaa	aataatactg	4260
	ttgatgggtg	tctggtcaga	gacatcaaga	aataacgccg	gaacattagt	gcaggcagct	4320
10	tccacagcaa	tggcatcctg	gtcatccagc	ggatagttaa	tgatcagccc	actgacgcgt	4380
	tgcgcgagaa	gattgtgcac	cgccgcttta	caggcttcga	cgccgcttcg	ttctaccatc	4440
	gacaccacca	cgctggcacc	cagttgatcg	gcgcgagatt	taatcgccgc	gacaatttgc	4500
15	gacggcgcgt	gcagggccag	actggagggtg	gcaacgcaa	tcagcaacga	ctgtttgccc	4560
	gccagttgtt	gtgccacgcg	gttgggaatg	taattcagct	ccgccatcgc	cgcttccact	4620
20	ttttcccgcg	ttttcgcaga	aacgtggctg	gcctggttca	ccacgcggga	aacggtctga	4680
	taagagacac	cggcatactc	tgcgacatcg	tataacgtta	ctggtttcac	attcaccacc	4740
	ctgaattgac	tctcttccgg	gcgctatcat	gccataccgc	gaaaggtttt	gcgccattcg	4800
25	atggtgtccg	ggatctcgac	gctctccctt	atgcgactcc	tgcattagga	agcagcccag	4860
	tagtaggttg	aggccgttga	gcaccgccgc	cgcaaggaa	ggtgcatgct	caccagtccc	4920
30	tgttctcgtc	agcaaaagag	ccgttcattt	caataaaccg	ggcgacctca	gcatccctt	4980
	cctgattttc	cgctttccag	cgttcggcac	gcagacgacg	ggcttcattc	tgcatgggtg	5040
	tgcttaccag	accggagata	ttgacatcgt	atgccttgag	caactgatag	ctgtcgctgt	5100
35	caactgtcac	tgtaatacgc	tgcttcatgc	ctgccccctc	cttttggtgt	ccaaccggct	5160
	cgacgggggc	agcgcaaggc	ggtgcctccg	gcggggccact	caatgcttga	gtatactcac	5220
40	tagactttgc	ttcgcaaagt	cgtgaccgcc	tacggcggct	gcggcgccct	acgggcttgc	5280
	tctccgggct	tcgccctgcg	cggctcgctgc	gctcccttgc	cagcccgtgg	atatgtggac	5340
	gatggccgcg	agcggccacc	ggctggctcg	cttcgctcgg	cccgtggaca	acgcatgcaa	5400
45	ggagatggcg	cccaacagtc	ccccggccac	ggggcctgcc	accataccca	cgccgaaaca	5460
	agcgctcatg	agcccgaagt	ggcgagcccc	atcttcccca	tcggtgatgt	cggcgatata	5520
50	ggcgccagca	accgcacctg	tggcgccggt	gatgccggcc	acgatgcgtc	cggcgtagag	5580
	gatcgagatc	tcgatccccg	gaaattaata	cgactcacta	taggggaatt	gtgagcggat	5640
	aacaattccc	ctctagaaat	aattttgttt	aactttaaga	aggagatata	catatggcta	5700
55	gcatgactgg	tggacagcaa	atgggtcgcg	gatccgaatt	cgagctccgt	cgacaagctt	5760
	gcggccgcac	tcgagcacca	ccaccaccac	cactgagatc	cggctgctaa	caaagcccga	5820
60	aaggaagctg	agttggctgc	tgccaccgct	gagcaataac	tagcataacc	ccttggggcc	5880
	tctaaacggg	tcttgagggg	ttttttgctg	aaaggaggaa	ctatatccgg	at	5932
65	<210>	2					
	<211>	29					
	<212>	ADN					
	<213>	Secuencia artificial					

	<220>		
	<223>	Cebador NdeI directo de GST	
5	<400>	2	
		gtccatatgt cccctatact aggttattg	29
10	<210>	3	
	<211>	30	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
15	<220>		
	<223>	Cebador BamHI inverso de GST	
	<400>	3	
		gtcggatccg gatccacgcg gaaccagatc	30
20	<210>	4	
	<211>	28	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
25	<220>		
	<223>	Cebador directo de la delección del gen de AMPR	
30	<400>	4	
		actcttcctt tttcaatatt attgaagc	28
35	<210>	5	
	<211>	28	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
40	<220>		
	<223>	Cebador inverso de la delección del gen de AMPR	
	<400>	5	
		ctgtcagacc aagtttactc atatatac	28
45	<210>	6	
	<211>	29	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
50	<220>		
	<223>	Cebador directo de verificación de PCR	
	<400>	6	
		ctcgatcccg cgaaattaat acgactcac	29
55	<210>	7	
	<211>	29	
	<212>	ADN	
60	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador inverso de verificación de PCR	
65	<400>	7	
		cagccaactc agcttccttt cgggctttg	29

	<210> 8		
	<211> 32		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Cebador directo de NSP4 con sitio BamHI		
	<400> 8		
10	ggttccgcgt ggatccatca cctcaaaaac tg		32
	<210> 9		
	<211> 37		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso de NSP4 con sitio HindIII		
20	<400> 9		
	gtgcggccgc aagctttcat agacaaactt ccgtctc		37
	<210> 10		
25	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Cebador directo de VP4 con sitio BamHI		
	<400> 10		
35	ggttccgcgt ggatccaggg cgtcctcact ttatc		35
	<210> 11		
	<211> 35		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso de VP4 con sitio HindIII		
45	<400> 11		
	gtgcggccgc aagcttttat aacaccatca ttctc		35
	<210> 12		
50	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
55	<223> Cebador directo de VP6 con sitio BamHI		
	<400> 12		
	ggttccgcgt ggatccgacg tgctgttttc aattg		35
60	<210> 13		
	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
65	<220>		
	<223> Cebador inverso de VP6 con sitio HindIII		

	<400> 13		
	gtgcggccgc aagcttctac atcaccattc tcttc		35
5	<210> 14		
	<211> 5071		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Plásmido pNPL1 (pStaby1 menos el gen de AmpR)		
	<400> 14		
15	tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaacgcgc gcgggtgtgg tggttacgcg	60	
	cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcggcgt cctttcgctt tcttcccttc	120	
	ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg	180	
20	gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc	240	
	acgtagtggg ccatcgccct gatagacggg ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt	300	
	ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc	360	
25	ttttgattta taagggaatt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta	420	
	acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt	480	
30	tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta	540	
	tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtct	600	
	gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaatttaa	660	
35	aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt	720	
	ttcgtttcac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt	780	
40	ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg	840	
	tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca	900	
	gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt	960	
45	agcaccgcct acatacctcg ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga	1020	
	taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc	1080	
50	gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact	1140	
	gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga	1200	
	caggatatccg gtaagcggca gggctcggaa aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg	1260	
55	aaacgccttg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt	1320	
	tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt	1380	
60	acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga	1440	
	ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac	1500	
	gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcctgatgc ggtattttct	1560	
65	ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg catatatggg gactctcag tacaatctgc	1620	
	tctgatgccg catagttaag ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac tgggtcatgg	1680	

ES 2 632 429 T3

	ctgcgccccg	acacccgcca	acacccgctg	acgcgcccctg	acgggcttgt	ctgctccccg	1740
5	catccgctta	cagacaagct	gtgaccgtct	ccgggagctg	catgtgtcag	aggttttcac	1800
	cgatcatcacc	gaaacgcgcg	aggcagctgc	ggtaaagctc	atcagcgtgg	tcgtgaagcg	1860
	attcacagat	gtctgcctgt	tcatccgcgt	ccagctcgtt	gagtttctcc	agaagcgтта	1920
10	atgtctggct	tctgataaag	cgggccatgt	taagggcggt	tttttcctgt	ttggtcactg	1980
	atgcctccgt	gtaaggggga	tttctgttca	tgggggtaat	gataccgatg	aaacgagaga	2040
	ggatgctcac	gatacgggtt	actgatgatg	aacatgcccg	gttactggaa	cgttgtgagg	2100
15	gtaaacaact	ggcggtatgg	atgcggcggg	accagagaaa	aatcactcag	ggtcaatgcc	2160
	agcgcttcgt	taatacagat	gtaggtgttc	cacagggtag	ccagcagcat	cctgcgatgc	2220
20	agatccggaa	cataatgggtg	cagggcgctg	acttccgcgt	ttccagactt	tacgaaacac	2280
	ggaaaccgaa	gaccattcat	gttggtgttc	aggtcgcaga	cgttttgcag	cagcagtcgc	2340
	ttcacgttcg	ctcgcgtatc	ggtgattcat	tctgctaacc	agtaaggcaa	ccccgccagc	2400
25	ctagccgggt	cctcaacgac	aggagcacga	tcatgcgcac	ccgtggggcc	gccatgccgg	2460
	cgataatggc	ctgcttctcg	ccgaaacggt	tgggtggcggg	accagtgcg	aaggcttgag	2520
30	cgagggcggtg	caagattccg	aataccgcaa	gcgacaggcc	gatcatcgtc	gcgctccagc	2580
	gaaagcggtc	ctcgccgaaa	atgacccaga	gcgctgccgg	cacctgtcct	acgagttgca	2640
	tgataaagaa	gacagtcata	agtgcggcga	cgatagtcac	gccccgcgcc	caccggaagg	2700
35	agctgactgg	gttgaaggct	ctcaagggca	tcggctcgaga	tcccgggtgcc	taatgagtga	2760
	gctaacttac	attaattgcg	ttgcgctcac	tgcccgcctt	ccagtcggga	aacctgtcgt	2820
40	gccagctgca	ttaatgaatc	ggccaacgcg	cggggagagg	cggtttgcgt	attgggcgcc	2880
	aggggtggttt	ttctttttcac	cagtgagacg	ggcaacagct	gattgccctt	caccgcctgg	2940
	ccctgagaga	gttgacagcaa	gcggtccacg	ctggtttgcc	ccagcaggcg	aaaatcctgt	3000
45	ttgatggtgg	ttaacggcgg	gatataacat	gagctgtcct	cggtatcgtc	gtatcccact	3060
	accgagatat	ccgcaccaac	gcgcagcccg	gactcggtaa	tggcgcgcac	tgcgcccagc	3120
50	gccatctgat	cgttggcaac	cagcatcgca	gtgggaacga	tgccctcatt	cagcatttgc	3180
	atggtttggt	gaaaaccgga	catggcactc	cagtcgcctt	cccgttccgc	tatcggctga	3240
	atgttgattgc	gagtgagata	tttatgccag	ccagccagac	gcagacgcgc	cgagacagaa	3300
55	cttaatgggc	ccgctaacag	cgcgatttgc	tggtgaccca	atgcgaccag	atgctccacg	3360
	cccagtcgcg	taccgtcttc	atgggagaaa	ataatactgt	tgatgggtgt	ctggtcagag	3420
60	acatcaagaa	ataacgccgg	aacattagtg	caggcagctt	ccacagcaat	ggcatcctgg	3480
	tcatccagcg	gatagttaat	gatcagccca	ctgacgcgtt	gcgcgagaag	attgtgcacc	3540
	gccgctttac	aggcttcgac	gccgcttcgt	tctaccatcg	acaccaccac	gctggcacc	3600
65	agttgatcgg	cgcgagattt	aatcgccgcg	acaatttgcg	acggcgcgtg	cagggccaga	3660
	ctggaggtgg	caacgccaat	cagcaacgac	tgtttgcccg	ccagttgttg	tgccacgcgg	3720

ES 2 632 429 T3

	ttgggaatgt aattcagctc cgccatcgcc gcttccactt tttcccgcgt tttcgcagaa	3780
5	acgtggcttg cctggttcac cacgcgggaa acggtctgat aagagacacc ggcatactct	3840
	gcgacatcgt ataacgttac tggtttcaca ttcaccaccc tgaattgact ctcttcggg	3900
	cgctatcatg ccataccgcg aaaggttttg cgccattcga tgggtgtccg gatctcgacg	3960
10	ctctccctta tgcgactcct gcattaggaa gcagcccagt agtaggttga ggccgttgag	4020
	caccgccgcc gcaaggaatg gtgcatgctc accagtccct gttctcgtca gcaaaagagc	4080
15	cgttcatttc aataaaccgg gcgacctcag ccattcccttc ctgattttcc gctttccagc	4140
	gttcggcacg cagacgacgg gcttcattct gcatggttgt gcttaccaga ccggagatat	4200
	tgacatcgta tgccttgagc aactgatagc tgtcgtctgc aactgtcact gtaatacgct	4260
20	gcttcatgcc tgccccctcc ttttggtgtc caaccggctc gacgggggca gcgcaaggcg	4320
	gtgcctccgg cgggccactc aatgcttgag tatactcact agactttgct tcgcaaagtc	4380
25	gtgaccgcct acggcggctg cggcgcccta cgggcttgct ctccgggctt cgccctgcgc	4440
	ggtcgtcgcg ctcccttgcc agcccgtgga tatgtggacg atggccgcga gcggccaccg	4500
	gctggctcgc ttcgctcggc ccgtggacaa cgcatgcaag gagatggcgc ccaacagtcc	4560
30	cccggccacg gggcctgcca ccatacccac gccgaaacaa gcgctcatga gcccgaagtg	4620
	gcgagcccga tcttccccat cgggtgatgtc ggcgatatag gcgccagcaa ccgcacctgt	4680
35	ggcgccggtg atgccggcca cgatgcgtcc ggcgtagagg atcgagatct cgatcccgcg	4740
	aaattaatac gactcactat aggggaattg tgagcggata acaattcccc tctagaaata	4800
	attttgttta actttaagaa ggagatatat atatggctag catgactggt ggacagcaaa	4860
40	tgggtcgcgg atccgaattc gagctccgtc gacaagcttg cggccgcact cgagcaccac	4920
	caccaccacc actgagatcc ggctgctaac aaagcccga aggaagctga gttggctgct	4980
45	gccaccgctg agcaataact agcataacct cttggggcct ctaaacgggt cttgaggggt	5040
	tttttgctga aaggaggaac tatatccgga t	5071
50	<210> 15 <211> 5707 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> pNPL2 SEQ ID NO:15	
	<400> 15	
	tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaaagcgc gcgggtgtgg tggttacgcg	60
60	cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgtc cttttcgctt tcttcccttc	120
	ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg	180
65	gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc	240
	acgtagtggg ccatcgccct gatagacggg ttttcgccct ttgacgttg agtccacgtt	300
	ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc	360

ES 2 632 429 T3

	ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta	420
5	acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt	480
	tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta	540
	tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtct	600
10	gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaattta	660
	aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt	720
	ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt	780
15	ttttctgctg gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg	840
	tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca	900
20	gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt	960
	agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga	1020
	taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc	1080
25	gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact	1140
	gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga	1200
30	caggatatccg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg	1260
	aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt	1320
	tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt	1380
35	acggttcctg gccttttgct ggccttttgct tcacatgttc tttcctgctg tatcccctga	1440
	ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac	1500
40	gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcctgatgc ggtattttct	1560
	ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg catatatggt gactctcag tacaatctgc	1620
	tctgatgccg catagttaag ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac tgggtcatgg	1680
45	ctgcgccccg acaccgcca acaccgctg acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccgg	1740
	catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac	1800
50	cgtcatcacc gaaacgcgcg aggcagctgc ggtaaagctc atcagcgtgg tcgtgaagcg	1860
	attcacagat gtctgcctgt tcatccgcgt ccagctcgtt gagtttctcc agaagcgtta	1920
	atgtctggct tctgataaag cgggccatgt taagggcggg tttttcctgt ttggtcactg	1980
55	atgcctccgt gtaaggggga tttctgttca tgggggtaat gataccgatg aaacgagaga	2040
	ggatgctcac gatacgggtt actgatgatg aacatgcccc gttactggaa cgttgtgagg	2100
60	gtaaacaact ggcggtatgg atgcggcggg accagagaaa aatcactcag ggtcaatgcc	2160
	agcgcttcgt taatacagat gtaggtgttc cacagggtag ccagcagcat cctgcgatgc	2220
	agatccggaa cataatggtg cagggcgctg acttccgcgt ttccagactt tacgaaacac	2280
65	ggaaaccgaa gaccattcat gttgttgctc aggtcgcaga cgttttgcag cagcagtcgc	2340
	ttcacgttcg ctgcgctatc ggtgattcat tctgctaacc agtaaggcaa ccccgcagc	2400

ES 2 632 429 T3

	ctagccgggt	cctcaacgac	aggagcacga	tcatgcgcac	ccgtggggcc	gccatgccgg	2460
5	cgataatggc	ctgcttctcg	ccgaaacggt	tggtggcggg	accagtgcg	aaggcttgag	2520
	cgagggcgtg	caagattccg	aataccgcaa	gcgacaggcc	gatcatcgtc	gcgctccagc	2580
	gaaagcggtc	ctcgccgaaa	atgaccagaa	gcgctgccgg	cacctgtcct	acgagttgca	2640
10	tgataaagaa	gacagtcata	agtgcggcga	cgatagtcac	gccccgcgcc	caccggaagg	2700
	agctgactgg	gttgaaggct	ctcaaggcca	tcggctcgaga	tcccgggtgcc	taatgagtga	2760
	gctaacttac	attaattgcg	ttgcgctcac	tgcccgcctt	ccagtcggga	aacctgtcgt	2820
15	gccagctgca	ttaatgaatc	ggccaacgcg	cggggagagg	cggtttgctg	attgggcgcc	2880
	aggggtggtt	ttcttttcac	cagtgcgacg	ggcaacagct	gattgccctt	caccgcctgg	2940
20	ccctgagaga	gttgacgcaa	gcggtccacg	ctggtttgcc	ccagcaggcg	aaaatcctgt	3000
	ttgatggtgg	ttaacggcgg	gatataacat	gagctgtcct	cggatcgtc	gtatccact	3060
	accgagatat	ccgcaccaac	gcgcagcccg	gactcggtaa	tggcgcgcac	tgccccagc	3120
25	gccatctgat	cggttgcaac	cagcatcgca	gtgggaacga	tgccctcatt	cagcatttgc	3180
	atggtttggt	gaaaaccgga	catggcactc	cagtcgcctt	cccgttccgc	tatcggctga	3240
30	atgtgattgc	gagtgcagata	tttatgccag	ccagccagac	gcagacgcgc	cgagacagaa	3300
	cttaattggc	ccgctaacag	cgcgatttgc	tggtgaccca	atgcgaccag	atgctccacg	3360
	cccagtcgcg	taccgtcttc	atgggagaaa	ataatactgt	tgatgggtgt	ctggtcagag	3420
35	acatcaagaa	ataacgccgg	aacattagtg	caggcagctt	ccacagcaat	ggcatcctgg	3480
	tcatccagcg	gatagttaat	gatcagccca	ctgacgcgtt	gcgcgagaag	attgtgcacc	3540
40	gccgctttac	aggcttcgac	gccgcttcgt	tctaccatcg	acaccaccac	gctggcacc	3600
	agttgatcgg	cgcgagattt	aatcgccgcg	acaatttgcg	acggcgcgtg	cagggccaga	3660
	ctggaggtgg	caacgccaat	cagcaacgac	tgtttgcccg	ccagttgttg	tgccacgcgg	3720
45	ttgggaatgt	aattcagctc	cgccatcgcc	gcttccactt	tttcccgcgt	tttcgcagaa	3780
	acgtggctgg	cctggttcac	cacgcgggaa	acggctctgat	aagagacacc	ggcatactct	3840
50	gcgacatcgt	ataacgttac	tggtttcaca	ttcaccaccc	tgaattgact	ctcttcggg	3900
	cgctatcatg	ccataccgcg	aaagggtttg	cgccattcga	tggtgtccgg	gatctcgacg	3960
	ctctccctta	tgcgactcct	gcattaggaa	gcagcccag	agtaggttga	ggccgttgag	4020
55	caccgccgcc	gcaaggaatg	gtgcatgctc	accagtccct	gttctcgtca	gaaaagagc	4080
	cgttcatttc	aataaaccgg	gcgacctcag	ccatcccttc	ctgattttcc	gctttccagc	4140
60	gttcggcacg	cagacgacgg	gcttcattct	gcattggtgt	gcttaccaga	ccggagatat	4200
	tgacatcgta	tgcccttgagc	aactgatagc	tgctcgctgtc	aactgtcact	gtaatacgct	4260
	gcttcattgc	tgccccctcc	ttttggtgtc	caaccggctc	gacgggggca	gcgcaaggcg	4320
65	gtgcctccgg	cgggcccactc	aatgcttgag	tatactcact	agactttgct	tcgcaaagtc	4380
	gtgaccgcct	acggcgggctg	cggcgcccta	cgggcttgct	ctccgggctt	cgccctgcgc	4440

ES 2 632 429 T3

	ggtcgctgcg	ctcccttgcc	agcccgtgga	tatgtggacg	atggccgcga	gcggccaccg	4500
5	gctggctcgc	ttcgtctggc	ccgtggacaa	cgcattgcaag	gagatggcgc	ccaacagtcc	4560
	cccggccacg	gggcctgcca	ccatacccac	gccgaaacaa	gcgctcatga	gcccgaagtg	4620
	gcgagcccga	tcttcccat	cggtagatgc	ggcgtatag	gcgccagcaa	ccgcacctgt	4680
10	ggcgccggtg	atgccggcca	cgatgcgtcc	ggcgtagagg	atcgagatct	cgatcccgcg	4740
	aaattaatac	gactcactat	aggggaattg	tgagcggata	acaattcccc	tctagaaata	4800
	atcttgttta	actttaagaa	ggagatatac	atatgtcccc	tatactaggt	tattggaaaa	4860
15	ttaagggcct	tgtgcaaccc	actcgacttc	ttttggaata	tcttgaagaa	aaatatgaag	4920
	agcatttgta	tgagcgcgat	gaaggtgata	aatggcgaaa	caaaaagttt	gaattgggtt	4980
20	tggagtttcc	caatcttcct	tattatattg	atggtagatg	taaattaaca	cagtctatgg	5040
	ccatcatacg	ttatatagct	gacaagcaca	acatgttggg	tggttgtcca	aaagagcgtg	5100
	cagagatttc	aatgcttgaa	ggagcgggtt	tggatattag	atacgggtgt	tcgagaattg	5160
25	catatagtaa	agactttgaa	actctcaaag	ttgattttct	tagcaagcta	cctgaaatgc	5220
	tgaaaatggt	cgaagatcgt	ttatgtcata	aaacatatatt	aaatggtgat	catgtaaccc	5280
30	atcctgactt	catgtttgat	gacgctcttg	atgttgtttt	atacatggac	ccaatgtgcc	5340
	tggatgcgtt	cccaaaatta	gtttgtttta	aaaaacgtat	tgaagctatc	ccacaaattg	5400
	ataagtactt	gaaatccagc	aagtatatag	catggccttt	gcagggctgg	caagccacgt	5460
35	ttggtggtgg	cgaccatcct	ccaaaatcgg	atctggttcc	gcgtggatcc	gaattcgagc	5520
	tccgtcgaca	agcttgccgc	cgcactcgag	caccaccacc	accaccactg	agatccggct	5580
40	gctaacaaag	cccgaagga	agctgagttg	gctgctgcca	ccgctgagca	ataactagca	5640
	taacccttg	gggcctctaa	acgggtcttg	aggggttttt	tgctgaaagg	aggaactata	5700
45	tccggat						5707
	<210>	16					
	<211>	687					
	<212>	ADN					
50	<213>	Secuencia artificial					
	<220>						
	<223>	Amplicón de GST producido usando las SEQ ID NOS 2 y 3 (cebadores)					
55	<400>	16					
	gtccatatgt	cccctatact	aggttatttg	aaaattaagg	gccttgtgca	accactcga	60
	cttcttttgg	aatatcttga	agaaaaatat	gaagagcatt	tgtatgagcg	cgatgaagg	120
60	gataaatggc	gaaacaaaaa	gtttgaattg	ggtttgaggt	ttcccaatct	tccttattat	180
	attgatggtg	atgttaaatt	aacacagtct	atggccatca	tacgttatat	agctgacaag	240
	cacaacatgt	tgggtggttg	tccaaaagag	cgtgcagaga	tttcaatgct	tgaaggagcg	300
65	gttttgata	ttagatacgg	tgtttcgaga	attgcatata	gtaaagactt	tgaactctc	360
	aaagttgatt	ttcttagcaa	gctacctgaa	atgctgaaaa	tgttcgaaga	tcgtttatgt	420

cataaaacat atttaaattgg tgatcatgta acccatcctg acttcatggt gtatgacgct 480
 5 cttgatgttg ttttatacat ggacccaatg tgcctggatg cgttcccaaa attagtttgt 540
 tttaaaaaac gtattgaagc tatcccacaa attgataagt acttgaaatc cagcaagtat 600
 atagcatggc ctttgcaggg ctggcaagcc acgtttggtg gtggcgacca tcctccaaaa 660
 10 tcggatctgg ttccgcgtgg atccgac 687

<210> 17
 <211> 297
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Muestra aislada 1 de NSP4
 20

<400> 17
 atcacctcaa aaactgtgat tggtaaattc aagactgaaa acaatattag tcatcagaat 60
 gacgacattc ataaagaata tgaagagggtg atgaaacaaa tgcgtgacat gagagttcat 120
 25 gtaactgcac tatttaatatag tatacataag gataatatgg agtggagaat gagtgaatcg 180
 attcgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa acaaatacgg tcgagaatga agttaagaat 240
 30 cacgtagatg atgtaaatat atgtggtacg tctggattag agacggaagt ttgtcta 297

<210> 18
 <211> 99
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Muestra aislada 1 de NSP4
 40

<400> 18

Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Gly Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asn Ile
 1 5 10 15

Ser His Gln Asn Asp Asp Ile His Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys
 20 25 30

Gln Met Arg Asp Met Arg Val His Val Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile
 35 40 45

His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu
 50 55 60

Lys Lys Arg Glu Met Lys Thr Asn Thr Val Glu Asn Glu Val Lys Asn
 65 70 75 80

His Val Asp Asp Val Asn Ile Cys Gly Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu
 85 90 95

65 Val Cys Leu

5 <210> 19
 <211> 297
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Muestra aislada 63 de NSP4

 15 <400> 19
 atcacctcaa agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac 60
 aatgatatca ataaggaata tgaagagggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat 120
 atgactgcat tattttaatag tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca 180
 attcgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa tcaaatacaa ccgggaatga agtcaagaat 240
 20 cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaggt ttgtcta 297

 25 <210> 20
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Muestra aislada 63 de NSP4

 35 <400> 20
 Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile
 1 5 10 15
 Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys
 20 25 30
 40 Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile
 35 40 45
 45 His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu
 50 55 60
 50 Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Thr Thr Gly Asn Glu Val Lys Asn
 65 70 75 80
 55 His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu
 85 90 95
 val Cys Leu

 60 <210> 21
 <211> 297
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Muestra aislada 64 de NSP4

ES 2 632 429 T3

<400> 21
 atcacctcaa agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac 60
 aacgatatca ataaggaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat 120
 5 atgactgcat tatttaatag tatacataaa gataatatgg aatggagaat gagtgaatca 180
 attcgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagatt 240
 10 cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaggt ttgtcta 297

<210> 22
 <211> 99
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Muestra aislada 64 de NSP4
 20 <400> 22

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

50 <210> 23
 <211> 297
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Muestra aislada 66 de NSP4

<400> 23
 60 atcacctcaa agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac 60
 aacgatatca ataaggaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat 120
 atgactgcat tatttaatag tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca 180
 65 attcgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagatt 240
 cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaggt ttgtcta 297

5 <210> 24
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Muestra aislada 66 de NSP4
 <400> 24

 15 Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile
 1 5 10 15

 20 Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys
 20 25 30

 25 Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile
 35 40 45

 30 His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu
 50 55 60

 35 Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Ile
 65 70 75 80

 40 His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu
 85 90 95

 45 Val Cys Leu

 50 <210> 25
 <211> 297
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Muestra aislada 67 de NSP4
 <400> 25
 atcacctcaa agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac 60
 aacgatatca ataaggaata tgaagaggta atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat 120
 atgactgcat tattttaatag tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca 180
 attcgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagaat 240
 cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agatggaggt ttgtcta 297

 60 <210> 26
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 65 <220>
 <223> Muestra aislada 67 de NSP4

ES 2 632 429 T3

<400> 26

Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile
1 5 10 15

Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys
20 25 30

Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile
35 40 45

His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu
50 55 60

Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Asn
65 70 75 80

His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Met Glu
85 90 95

Val Cys Leu

<210> 27
<211> 297
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Muestra aislada 68 de NSP4

<400> 27

atcacctcaa agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac 60

aacgatatca ataaggaata tgaagagggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagtccat 120

atgactgcat tatttaatatg tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca 180

atccgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagaat 240

cacacgaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaggt ttgtcta 297

<210> 28
<211> 99
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Muestra aislada 68 de NSP4

<400> 28

Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile
1 5 10 15

Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys
20 25 30

Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile
35 40 45

5 His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu
50 55 60

10 Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Asn
65 70 75 80

His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu
85 90 95

15 Val Cys Leu

20
<210> 29
<211> 297
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> Muestra aislada 69 de NSP4

30
<400> 29
atcacctcga agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac 60
aacgatatca ataaggaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat 120
atgactgcat tattttaatag tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca 180
35 atccgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagaat 240
cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaggt ttgtcta 297

40
<210> 30
<211> 99
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<223> Muestra aislada 69 de NSP4

50
<400> 30
Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile
1 5 10 15

55 Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys
20 25 30

60 Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile
35 40 45

His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu
50 55 60

65 Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Asn
65 70 75 80

ES 2 632 429 T3

His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu
 85 90 95
 5 Val Cys Leu
 10
 <210> 31
 <211> 297
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Muestra aislada 70 de NSP4
 <400> 31
 20 atcacctcaa agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac 60
 aacgatatca ataaggaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat 120
 atgactgcat tattttaatag tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca 180
 25 attcgcagag aaaagaaacg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagaat 240
 cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaggt ttgtcta 297
 30
 <210> 32
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Muestra aislada 70 de NSP4
 <400> 32
 40 Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile
 1 5 10 15
 45 Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys
 20 25 30
 50 Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile
 35 40 45
 55 His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu
 50 55 60
 Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Asn
 65 70 75 80
 60 His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu
 85 90 95
 65 Val Cys Leu

ES 2 632 429 T3

<210> 33
 <211> 297
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Muestra aislada 71 de NSP4
 <400> 33
 10 atcacctcaa agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac 60
 aacgatatca ataaggaata tgaagagggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat 120
 atgactgcat tatttaatatg tatacataaaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca 180
 15 attcgcagag aaaagaaacg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagaat 240
 cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaggt ttgtcta 297
 20
 <210> 34
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia de AA de muestra aislada 71 de NSP4
 <400> 34
 30 Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile
 1 5 10 15
 35 Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys
 20 25 30
 40 Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile
 35 40 45
 45 His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu
 50 55 60
 50 Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Asn
 65 70 75 80
 55 His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu
 85 90 95
 60 Val Cys Leu
 65
 <210> 35
 <211> 297
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Muestra aislada 72 de NSP4
 <400> 35
 atcacctcaa agactgtgat tagtaagttc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac 60

ES 2 632 429 T3

	aacgatatca ataaggaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat	120
5	atgactgcat tattttaatag tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca	180
	attcgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagatt	240
	cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaggt ttgtcta	297
10	<210> 36 <211> 99 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Muestra aislada 72 de NSP4	
20	<400> 36 Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Ser Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile	
	1 5 10 15	
25	Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys	
	20 25 30	
30	Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile	
	35 40 45	
35	His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu	
	50 55 60	
40	Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Ile	
	65 70 75 80	
45	His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu	
	85 90 95	
50	Val Cys Leu	
	<210> 37 <211> 297 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Muestra aislada 3882 de NSP4	
	<400> 37 atcacctcaa aaactgtgat tggtaaattc aagactgaaa acaatattag tcatcagaat	60
60	gacgacattc ataaagaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgacat gagagttcat	120
	gtaactgcac tattttaatag tatacataag gataatatgg agtggagaat gagtgaatcg	180
65	attcgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa acaaatacgg tcgagaatga agttaagaat	240
	cacgtagatg atgtaaatat atgtgatacg tctggattag agacggaagt ttgtcta	297

ES 2 632 429 T3

<210> 38
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Muestra aislada 3882 de NSP4
 <400> 38
 10
 Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Gly Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asn Ile
 1 5 10 15
 15 Ser His Gln Asn Asp Asp Ile His Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys
 20 25 30
 20 Gln Met Arg Asp Met Arg Val His Val Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile
 35 40 45
 25 His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu
 50 55 60
 Lys Lys Arg Glu Met Lys Thr Asn Thr Val Glu Asn Glu Val Lys Asn
 65 70 75 80
 30 His Val Asp Asp Val Asn Ile Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu
 85 90 95
 35 Val Cys Leu
 40
 <210> 39
 <211> 297
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Muestra aislada 3509 de NSP4
 <400> 39
 atcacctcaa aaactgtgat tggtaaattc aagactgaaa atgacattag ccaccagaac 60
 50 aacgatatca ataaggaata tgaagaggtg atgaaacaaa tgcgtgaaat gagagttcat 120
 atgactgcat tatttaatatg tatacataaa gataatatgg agtggagaat gagtgaatca 180
 attcgcagag aaaagaagcg tgaaatgaaa tcaaatgcaa ccgggaatga agtcaagatt 240
 55 cacaccaatg atgtaaatgt atgtgatacg tctggattag agacggaagt ttgtcta 297
 60
 <210> 40
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> Muestra aislada 3509 de NSP4
 <400> 40

ES 2 632 429 T3

Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Gly Lys Phe Lys Thr Glu Asn Asp Ile
1 5 10 15

5 Ser His Gln Asn Asn Asp Ile Asn Lys Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys
20 25 30

10 Gln Met Arg Glu Met Arg Val His Met Thr Ala Leu Phe Asn Ser Ile
35 40 45

15 His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu
50 55 60

Lys Lys Arg Glu Met Lys Ser Asn Ala Thr Gly Asn Glu Val Lys Ile
65 70 75 80

20 His Thr Asn Asp Val Asn Val Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu
85 90 95

25 Val Cys Leu

30 <210> 41
<211> 732
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Muestra aislada 1 de VP4

<400> 41
agggcgctcct cactttatca tcaattaatt tctcagaatt attattcaac tgggaatgag 60

40 atcttaaaag atttacaac gactaaaact actgttgact atgtagatgc tgggaattat 120
acatatgctc aattgccgcc aacgaagtgg ggagctggag ctaccttcga atcagtcctt 180
agcgcagctg aaataacagg accgcacaca aatagagtta tagagtggaa gaatttacta 240

45 aattctgacc agtgggttgct gtttccaaaa ccagctgaca cagttaaatt acttaaacad 300
ggacctcaaa catatgatag cacttttagcg gcatgtgaat tgtggtatgg gaaggctaatt 360

50 actatagtga catcagaaca ctattcatca ttaagtgata atcaggatga tgtaaatgcc 420
gattcattag tattatcttg gaatgctgga gggacaacat tcgataaaca aatagttaat 480
tttgcttggg atatgggtgg aattctgatt aagccgtcaa gtcaacaacc tagattagat 540

55 atatacatgg ccaacatgaa taatttcaat agtgataatt tcaattggga agagtggcgt 600
ttcacactac ctgcagtaa tgcaacaatt aacatataca ctgattatta cctagctagc 660

60 agtgatccat acaatcagct gaaagaatta caacagtcaa ctattaccac attcgaaatg 720
agaatgatgg tg 732

65 <210> 42
<211> 244
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Muestra aislada 1 de VP4

5 <400> 42

Arg Ala Ser Ser Leu Tyr His Gln Leu Ile Ser Gln Asn Tyr Tyr Ser
1 5 10 15

10 Thr Gly Asn Glu Ile Leu Lys Asp Leu Gln Thr Thr Lys Thr Thr Val
20 25 30

15 Asp Tyr Val Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Tyr Ala Gln Leu Pro Pro Thr
35 40 45

20 Lys Trp Gly Ala Gly Ala Thr Phe Glu Ser Val Phe Ser Ala Ala Glu
50 55 60

25 Ile Thr Gly Pro His Thr Asn Arg Val Ile Glu Trp Lys Asn Leu Leu
65 70 75 80

Asn Ser Asp Gln Trp Leu Leu Phe Pro Lys Pro Ala Asp Thr Val Lys
85 90 95

30 Leu Leu Lys His Gly Pro Gln Thr Tyr Asp Ser Thr Leu Ala Ala Cys
100 105 110

35 Glu Leu Trp Tyr Gly Lys Ala Asn Thr Ile Val Thr Ser Glu His Tyr
115 120 125

40 Ser Ser Leu Ser Asp Asn Gln Val Asn Val Asn Ala Asp Ser Leu Val
130 135 140

45 Leu Phe Trp Asn Ala Gly Gly Thr Thr Phe Asp Lys Gln Ile Val Asn
145 150 155 160

Phe Ala Trp Asp Met Gly Gly Ile Leu Ile Lys Pro Ser Ser Gln Gln
165 170 175

50 Pro Arg Leu Asp Ile Tyr Met Ala Asn Met Asn Asn Phe Asn Ser Asp
180 185 190

55 Asn Phe Asn Trp Glu Glu Trp Arg Phe Thr Leu Pro Arg Ser Asn Ala
195 200 205

60 Thr Ile Asn Ile Tyr Thr Asp Tyr Tyr Leu Ala Ser Ser Asp Pro Tyr
210 215 220

Asn Gln Leu Lys Glu Leu Gln Gln Ser Thr Ile Thr Thr Phe Glu Met
225 230 235 240

65 Arg Met Met Val

<210> 43
 <211> 735
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Muestra aislada 66 de VP4

 <400> 43
 agggcgctcct cactttatca gcaattaatt tcacagaatt attattcaac tggaaatgat 60
 attttactgg atcagcaaac aaataacaca actggtgact atatagatat aggaaattat 120
 tcgtatacac aattaccgcc gacatcatgg ggagcaggaa tgacttttaa gtctgcattt 180
 aatgcagagg aaattacagg acccaatata ggtgatatag atttgaataa ttgacaaat 240
 gcgaatgggt ggatattgta tgacaaacca actgatacaa aacgattgtt aaaactagga 300
 ccagaaagtt atgacagtgt gtacgcagca ttcgaattat ggtatggtaa agcaaatact 360
 gtagtcacat caatatacta ttcatcagtg caaaactctg aaaacactgt aacagtacaa 420
 catgactcat tagtgttatt ctttaatggt gggttatactg gtctaactaa gcaaatagtt 480
 aaatttaact ggaatatggg aggcataatta gttagaccga ctgctgatgg tagagtggat 540
 atttgtatgg ctgacatgaa tgattttaat agtgataatt ttaattggga atcttgga 600
 cgtagttttc cacgtagcaa cattaacatg tacactgaat attatttagc gaatgttgat 660
 ccatataatc aactaaaaat attaaaccaa ctaactgcaa aaaatgtaga aattagaatg 720
 atgaaggcaa ttaag 735

<210> 44
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Muestra aislada 66 de VP4

 <400> 44
 Arg Ala Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Leu Ile Ser Gln Asn Tyr Tyr Ser
 1 5 10 15

 Thr Gly Asn Asp Ile Leu Leu Asp Gln Gln Thr Asn Asn Thr Thr Val
 20 25 30

 Asp Tyr Ile Asp Ile Gly Asn Tyr Ser Tyr Thr Gln Leu Pro Pro Thr
 35 40 45

 Ser Trp Gly Ala Gly Met Thr Phe Lys Ser Ala Phe Asn Ala Glu Glu
 50 55 60

 Ile Thr Gly Pro Asn Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Asn Leu Thr Asn
 65 70 75 80

ES 2 632 429 T3

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

5 Leu Lys Leu Gly Pro Glu Ser Tyr Asp Ser Val Tyr Ala Ala Phe Glu
100 105 110

10 Leu Trp Tyr Gly Lys Ala Asn Thr Val Val Thr Ser Ile Tyr Tyr Ser
115 120 125

15 Ser Val Gln Asn Ser Glu Asn Thr Val Thr Val Gln His Asp Ser Leu
130 135 140

20 Val Leu Phe Phe Asn Val Gly Tyr Thr Gly Leu Thr Lys Gln Ile Val
145 150 155 160

Lys Phe Asn Trp Asn Met Gly Gly Ile Leu Val Arg Pro Thr Ala Asp
165 170 175

25 Gly Arg Val Asp Ile Cys Met Ala Asp Met Asn Asp Phe Asn Ser Asp
180 185 190

30 Asn Phe Asn Trp Glu Ser Trp Lys Arg Ser Phe Pro Arg Ser Asn Ile
195 200 205

35 Asn Met Tyr Thr Glu Tyr Tyr Leu Ala Asn Val Asp Pro Tyr Asn Gln
210 215 220

40 Leu Lys Ile Leu Asn Gln Leu Thr Ala Lys Asn Val Glu Ile Arg Met
225 230 235 240

Met Lys Ala Ile Lys
245

45 <210> 45
<211> 735
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Muestra aislada 71 de VP4

<400> 45

55 agggcgtcct cactttatca gcaattaatc tcacagaatt attattcaac tggaaatgat 60
atcttactgg atcagcaaac aaataacaca actgttgact atatagatat aggaaattac 120
tcgtatacac aattaccgcc gacatcatgg ggagcaggaa tgacttttaa gtctgcattt 180
aatgcagagg aaattacagg acccaatacg ggtgatatag atttgaataa tttgacaaat 240
gcgaatggat ggatattgta tgacaaacca actgatacaa aacgattgtt aaaactagga 300
ccagaaagtt atgacagtgt gtacgcagca ttcgaattat ggtatggtaa agcaaatact 360
65 gtagtcacat caatatacta ttcatcagtg caaaactctg aaaacactgt aacagtacag 420
catgactcat tagtggttatt ctttaatggt gggtatactg gtctaactaa gcaaatagtt 480

ES 2 632 429 T3

aaatttaatt ggaatatggg aggcataatta gttagaccga ctactgatgg tagagtggat 540
 atttgtatgg ctgacatgaa tgattttagt agtgataatt ttaattggga atcttgga 600
 5 cgtagttttc cacgtagcaa cattaacatg tacactgaat attatttagc gaatgttgat 660
 ccatataatc aactaaaaat attaaaccaa ctaactgcaa aaaatgtaga aattagaatg 720
 10 atgaaggcaa ttaag 735

<210> 46
 <211> 245
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Muestra aislada 71 de VP4
 20 <400> 46

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

ES 2 632 429 T3

Asn Phe Asn Trp Glu Ser Trp Lys Arg Ser Phe Pro Arg Ser Asn Ile
 195 200 205
 5
 Asn Met Tyr Thr Glu Tyr Tyr Leu Ala Asn Val Asp Pro Tyr Asn Gln
 210 215 220
 10
 Leu Lys Ile Leu Asn Gln Leu Thr Ala Lys Asn Val Glu Ile Arg Met
 225 230 235 240
 15 Met Lys Ala Ile Lys
 245
 20 <210> 47
 <211> 735
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Muestra aislada 3509 de VP4
 <400> 47
 agggcgctcct cactttatca gcaattaatc tcacagaatt attattcaac tggaaatgat 60
 30 attttactgg atcagcaaac aaataacaca actgttgact atatagatat aggaaattat 120
 tcgtatacac aattaccgcc gacatcatgg ggagcaggaa tgacttttac gtctgcattt 180
 35 aatgcagagg aaattacagg acccaataca ggtgatatag atttgaataa tttgacaaat 240
 gcgaatgggt ggatattgta tgacaaacca actgatacaa aacgattggt aaaactagga 300
 ccagaaagtt atgacagtgt atacgcagca ttcgaattat ggtatggtaa agcaaatact 360
 40 gtagtcacat caatatacta ttcatcagtg caaaactctg aaaacactgt aacagtacag 420
 catgactcat tagtgttatt ctttaatggt gggttatactg gtctaactaa gcaaataggt 480
 45 aaatttaact ggaatatggg aggcataatta gttagaccga ctactgatgg tagagtggat 540
 atttgcatgg ctgacatgaa tgattttaat agtgataatt ttaattggga atcttgghaa 600
 cgtagttttc cacgtagcaa cattaacatg tacactgaat attatttagc gaatgttgat 660
 50 ccatataatc aactaaaaat attaaaccaa ctaactgcaa aaaatgtaga aattagaatg 720
 atgaaggcaa ttaag 735
 55 <210> 48
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Muestra aislada 3509 de VP4
 <400> 48
 65 Arg Ala Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Leu Ile Ser Gln Asn Tyr Tyr Ser
 1 5 10 15

ES 2 632 429 T3

Thr Gly Asn Asp Ile Leu Leu Asp Gln Gln Thr Asn Asn Thr Thr Val
 20 25 30
 5 Asp Tyr Ile Asp Ile Gly Asn Tyr Ser Tyr Thr Gln Leu Pro Pro Thr
 35 40 45
 10 Ser Trp Gly Ala Gly Met Thr Phe Thr Ser Ala Phe Asn Ala Glu Glu
 50 55 60
 15 Ile Thr Gly Pro Asn Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Asn Leu Thr Asn
 65 70 75 80
 Ala Asn Gly Trp Ile Leu Tyr Asp Lys Pro Thr Asp Thr Lys Arg Leu
 85 90 95
 20 Leu Lys Leu Gly Pro Glu Ser Tyr Asp Ser Val Tyr Ala Ala Phe Glu
 100 105 110
 25 Leu Trp Tyr Gly Lys Ala Asn Thr Val Val Thr Ser Ile Tyr Tyr Ser
 115 120 125
 30 Ser Val Gln Asn Ser Glu Asn Thr Val Thr Val Gln His Asp Ser Leu
 130 135 140
 35 Val Leu Phe Phe Asn Val Gly Tyr Thr Gly Leu Thr Lys Gln Ile Val
 145 150 155 160
 Lys Phe Asn Trp Asn Met Gly Gly Ile Leu Val Arg Pro Thr Thr Asp
 165 170 175
 40 Gly Arg Val Asp Ile Cys Met Ala Asp Met Asn Asp Phe Asn Ser Asp
 180 185 190
 45 Asn Phe Asn Trp Glu Ser Trp Lys Arg Ser Phe Pro Arg Ser Asn Ile
 195 200 205
 50 Asn Met Tyr Thr Glu Tyr Tyr Leu Ala Asn Val Asp Pro Tyr Asn Gln
 210 215 220
 55 Leu Lys Ile Leu Asn Gln Leu Thr Ala Lys Asn Val Glu Ile Arg Met
 225 230 235 240
 Met Lys Ala Ile Lys
 245
 60 <210> 49
 <211> 735
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Muestra aislada 3882 de VP4

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (59)..(59)
 5 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (690)..(690)
 10 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (699)..(700)
 15 <223> n es a, c, g, o t

<400> 49
 agggcgctcct cactttatca gcaattaatc tcacaaaatt attattcaac tgggaatgnt 60
 20 atattattgg atcagcaaac gaataaaaca actggttgatt atgtagatgt gggaaattat 120
 tcatatacac aattaccacc aacatcatgg ggagcaggaa tgacttttaa gtctgcattt 180
 aatgcagaag aaatgacggg acctaacaca ggtgatatag atctgagtaa tctcacaact 240
 25 gcgaatggat ggatattata tgagaagccg acaattacca aacgggttatt aaaactaggg 300
 ccagatgttt acgatagtgt ttatgccgca tttgaactgt ggtatggtaa agcaaataca 360
 30 gtagttacat caatatatta tgcatcagca caaaattctg agaatactgt aacattacag 420
 tatgactcat tagtactatt tttcaatggt ggttacactg gtctgactaa gcaaatagtt 480
 agatttaatt gggatatggg aggcataatta gttaggccaa ctgctgatgg tagagtagat 540
 35 atctgtatgg cagacatgaa tgatttttagc agcgacaatt ttaattggga gaaatggact 600
 cgtagctttc cacgcagtaa tattaatatg tatgctgaat attacttagc aaatgttgac 660
 40 ccgtatagtc aattaaagc attaaatcan ctcacaacnn aaaatataga aattagaatg 720
 atgaagtcaa ttaag 735

45 <210> 50
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Muestra aislada 3882 de VP4

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (230)..(230)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (233)..(234)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (245)..(245)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 5 <400> 50
 Arg Ala Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Leu Ile Ser Gln Asn Tyr Tyr Ser
 1 5 10 15
 Thr Gly Asn xaa Ile Leu Leu Asp Gln Gln Thr Asn Lys Thr Thr Val
 20 25 30
 Asp Tyr Val Asp Val Gly Asn Tyr Ser Tyr Thr Gln Leu Pro Pro Thr
 35 40 45
 Ser Trp Gly Ala Gly Met Thr Phe Lys Ser Ala Phe Asn Ala Glu Glu
 50 55 60
 Met Thr Gly Pro Asn Thr Gly Asp Ile Asp Leu Ser Asn Leu Thr Thr
 65 70 75 80
 Ala Asn Gly Trp Ile Leu Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Thr Lys Arg Leu
 85 90 95
 Leu Lys Leu Gly Pro Asp Val Tyr Asp Ser Val Tyr Ala Ala Phe Glu
 100 105 110
 Leu Trp Tyr Gly Lys Ala Asn Thr Val Val Thr Ser Ile Tyr Tyr Ala
 115 120 125
 Ser Ala Gln Asn Ser Glu Asn Thr Val Thr Leu Gln Tyr Asp Ser Leu
 130 135 140
 Val Leu Phe Phe Asn Val Gly Tyr Thr Gly Leu Thr Lys Gln Ile Val
 145 150 155 160
 Arg Phe Asn Trp Asp Met Gly Gly Ile Leu Val Arg Pro Thr Ala Asp
 165 170 175
 Gly Arg Val Asp Ile Cys Met Ala Asp Met Asn Asp Phe Ser Ser Asp
 180 185 190
 Asn Phe Asn Trp Glu Lys Trp Thr Arg Ser Phe Pro Arg Ser Asn Ile
 195 200 205
 Asn Met Tyr Ala Glu Tyr Tyr Leu Ala Asn Val Asp Pro Tyr Ser Gln
 210 215 220
 Leu Lys Ala Leu Asn xaa Leu Thr xaa xaa Asn Ile Glu Ile Arg Met
 225 230 235 240
 Met Lys Ser Ile xaa

245

5 <210> 51
 <211> 1182
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Muestra aislada 1 de VP6

<400> 51
 gacgtgctgt tttcaattgc gaaaactgta tctgaactca aaaagaaagt tgtagttggt 60
 15 actattttaca ctaatgtaga agatataatt caacaaacca atgaactgat tagaactttg 120
 aatggtaata cgtttcatac aggtggtatt ggaacacagc ctcaggaaga gtggaatttt 180
 caattaccgc agctaggtag gacactctta aatttagatg acaactatgt tcaagccact 240
 20 agaagtgtta ttgattatgt ggcttcattt atagaatcag tatgtgatga tgaaattgtc 300
 agagaagcat ctagaaatgg aatgcagcca cagtcgccag cacttataac gctgtcatca 360
 25 tcaaagttta agactatcaa ctttaataac agttcacaaat caattaaaaa ttggagtgtc 420
 caatcaagac gtgaaaatcc agtctatgaa tacagaaatc caatgatatt cgaatataga 480
 aattcatata ttcttcagcg tgctaattcca caatttggaa tcgtaatggg attgaggtat 540
 30 tatacaactg gtaacacctg tcaagttgca gcttttgatt caacatttgc tgaaaatgct 600
 cctaataata ctcaacgttt tatctataat ggaagactta agagaccaac ttctaattgca 660
 35 ttgatgaaaa ttgaggctgg cgctcagaac atcagtattc caacagtttt gcctgatctg 720
 gcaaatcaaa caacatgggt atttaattcca gtgcaagtaa tgaatggaac attctctatt 780
 gaattttata acaatggaca actagttgat atgattagaa atatgggagt agttactgtt 840
 40 agaacttttg attcttacag aataacaatc gatgtgatta gaccagcagc tatgacacaa 900
 tacgttcaga gaacattccc gcaagggtgg ccttatccat accaagctgc atacatgttg 960
 45 acgctcagtg tattagatgc gacaacggaa tctgtcctat gcgattcaca ctctgtggat 1020
 tattcaattg ttgcaaacgt tagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtatttcaa 1080
 ccagggtttc catgggaaca gacattatcc aactacactg ttgctcagga agataattta 1140
 50 gaaagacttt tactagttgc gtccgtgaag agaatggtga tg 1182

55 <210> 52
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Muestra aislada 1 de VP6

<400> 52

65 Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Glu Leu Lys Lys Lys
 1 5 10 15

Val Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln

ES 2 632 429 T3

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

ES 2 632 429 T3

	290		295		300	
5	Thr 305	Phe	Pro	Gln	Gly 310	Gly Pro Tyr Pro Tyr Gln 315 Ala Ala Tyr Met Leu 320
10	Thr	Leu	Ser	Val 325	Leu Asp Ala Thr Thr Glu 330	Ser Val Leu Cys Asp 335 Ser
15	His	Ser	Val 340	Asp Tyr Ser Ile Val 345	Ala Asn Val Arg Arg Asp 350	Ser Ala
20	Met	Pro	Ala 355	Gly Thr Val Phe Gln 360	Pro Gly Phe Pro Trp 365	Glu Gln Thr
25	Leu	Ser	Asn	Tyr Thr Val 370	Ala Gln Glu Asp Asn 375	Leu Glu Arg Leu Leu 380
30	Leu	Val	Ala	Ser Val 385	Lys Arg Met Val 390	Met
35	<210> 53					
40	<211> 1182					
45	<212> ADN					
50	<213> Secuencia artificial					
55	<220>					
60	<223> Muestra aislada 63 de VP6					
65	<400> 53					
70	gatgtgctgt tctccattgc gaagactgtc tcagatctta agaagaaagt tgtagttaggt					
75						60
80	actatattata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattgat tagaactttg					120
85	aatggcaaca cattccatac tgggtggaatt ggaacacaac ctcagaaaga atggaatttt					180
90	caactaccac agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact					240
95	agaagtatca tcgattatattt ggcctcattt atagaagctg tgtgtgatga cgaaattggt					300
100	agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca					360
105	gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaat ccattaagaa ttggagtgtc					420
110	cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaaatc caatgggtgtt tgagtataga					480
115	aattcatata ttcttcagcg tgccaatgca caatatggga acgtaatggg gctgagatat					540
120	tacacagcca gcaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caacttttagc tgaaaatgct					600
125	cctaattggca ctcaacgggtt tatttataat ggaagactta aaagaccaat ttctaattgtg					660
130	ttgatgaaaa ttgaggcggg tgctccaaac attagtaatc caacaatact acctgatcca					720
135	gcaaatcaga caacatggct atttaaatcca gtgcagataa tgaatggaac atttactatt					780
140	gagttttata ataatgggca gttagttagat ttgattagaa atatgggagt agttactgtt					840
145	agaacatttg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcaac catgacacag					900
150	tatgtacaaa gactgtttcc acaggggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata					960

ES 2 632 429 T3

actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcatgt gtgattcaca ttcagtagat 1020
tattcaatcg tcgcaaatgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtatttcaa 1080
5 ccaggatttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta 1140
gaaagacttt tgtttagttgc gtctgtgaag agaatggtga tg 1182

10 <210> 54
<211> 394
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Muestra aislada 63 de VP6
<400> 54

20 Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys Lys
1 5 10 15

25 Val Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln
20 25 30

30 Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly
35 40 45

35 Gly Ile Gly Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln
50 55 60

40 Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr
65 70 75 80

45 Arg Ser Ile Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp
85 90 95

50 Asp Glu Ile Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser
100 105 110

55 Pro Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ser Ala Lys Phe Lys Thr Ile Asn Phe
115 120 125

60 Asn Asn Ser Ser Gln Ser Ile Lys Asn Trp Ser Ala Gln Ser Arg Arg
130 135 140

65 Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Lys Asn Pro Met Val Phe Glu Tyr Arg
145 150 155 160

70 Asn Ser Tyr Ile Leu Gln Arg Ala Asn Ala Gln Tyr Gly Asn Val Met
165 170 175

75 Gly Leu Arg Tyr Tyr Thr Ala Ser Asn Ala Cys Gln Ile Ala Ala Phe
180 185 190

80 Asp Ser Thr Leu Ala Glu Asn Ala Pro Asn Gly Thr Gln Arg Phe Ile

ES 2 632 429 T3

	195	200	205	
5	Tyr Asn Gly Arg Leu Lys Arg Pro Ile Ser Asn Val Leu Met Lys Ile 210 215 220			
10	Glu Ala Gly Ala Pro Asn Ile Ser Asn Pro Thr Ile Leu Pro Asp Pro 225 230 235 240			
15	Ala Asn Gln Thr Thr Trp Leu Phe Asn Pro Val Gln Ile Met Asn Gly 245 250 255			
20	Thr Phe Thr Ile Glu Phe Tyr Asn Asn Gly Gln Leu Val Asp Leu Ile 260 265 270			
25	Arg Asn Met Gly Val Val Thr Val Arg Thr Phe Asp Thr Tyr Arg Ile 275 280 285			
30	Thr Ile Asp Met Ile Arg Pro Ala Thr Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg 290 295 300			
35	Leu Phe Pro Gln Gly Gly Pro Tyr Gln His Gln Ala Ala Tyr Met Ile 305 310 315 320			
40	Thr Leu Ser Ile Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Met Cys Asp Ser 325 330 335			
45	His Ser Val Asp Tyr Ser Ile Val Ala Asn Val Arg Arg Asp Ser Ala 340 345 350			
50	Met Pro Ala Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Ile 355 360 365			
55	Leu Ser Asn Tyr Thr Val Ala Gln Glu Asp Asn Leu Glu Arg Leu Leu 370 375 380			
60	Leu Val Ala Ser Val Lys Arg Met Val Met 385 390			
65	<210> 55 <211> 1182 <212> ADN <213> Secuencia artificial			
	<220> <223> Muestra aislada 64 de VP6			
60	<400> 55 gatgtgctgt tctccattgc gaagactgtc tcagatctta agaagaaagt tgtagttaggt			60
	actattttata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattgat tagaactttg			120
65	aatggcaaca catttcatac tgggtggaatt ggaacacaac ctcagaaaga atggaatttt			180
	caactaccac agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact			240

ES 2 632 429 T3

agaagtatca tcgattatattt ggccctcattt atagaagctg tgtgtgatga cgaaattgtt 300
agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca 360
5 gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaaat ccattaagaa ttggagtgct 420
cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaaatc caatgggtgtt tgagtataga 480
aattcatata ttcttcagcg tgctaatagca caatatggga atgtaatggg gctgagatat 540
10 tacacagcga gtaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caacttttagc tgaaaatgcc 600
cctaattggta ctcaacgggtt tatttataat ggaagactta aaagaccaat ttctaattgtg 660
15 ttgatgaaaa ttgaggcggg tgctccaaac attagtaatc caacaatact acctgatcca 720
gcaaadcaga caacatggct atttaatcca gtacagataa tgaatggaac atttactatt 780
gagttttata ataatgggca gttagttgat ttaattagaa atatgggagt agttactgtt 840
20 agaacatttg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcagc catgacacag 900
tatgtacaaa gactgtttcc acaggggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata 960
25 actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcatgt gtgattcaca ttcagtagat 1020
tattcaatcg tcgcaaatgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtatttcaa 1080
ccaggctttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta 1140
30 gaaagacttt tgttagttgc gtctgtgaag agaatgggtga tg 1182

<210> 56
35 <211> 394
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Secuencias de AA de muestra aislada 64 de VP6
<400> 56

Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys Lys
45 1 5 10 15

Val Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln
50 20 25 30

Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly
55 35 40 45

Gly Ile Gly Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln
60 50 55 60

Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr
65 65 70 75 80

Arg Ser Ile Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp
65 85 90 95

Asp Glu Ile Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser

ES 2 632 429 T3

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

ES 2 632 429 T3

	370	375	380	
5	Leu Val Ala Ser Val	Lys Arg Met Val Met		
	385	390		
10	<210> 57 <211> 1182 <212> ADN <213> Secuencia artificial			
15	<220> <223> Muestra aislada 65 de VP6			
20	<400> 57 gatgtgctgt tttcaattgc gaagactgtc tcagaactca aaaagaaagt ttagattggt		60	
25	actattttaca ctaatgtaga agatataatt cagcaaacta atgaattaat tagaactttg		120	
30	aatggcaaca cgtttcatac aggtggtatt ggaacgcagc ctcaaaaaga gtggaatttt		180	
35	caattaccac agctaggtag aacactcttg aatttagatg ataactatgt ccaagctact		240	
40	agaagtgtta ttgactatatt ggcctcattc atagaagcag tatgtgatga tgagattgtc		300	
45	agagaagcat cgagaaatgg aatgcagcct caatcaccta cacttatagc gctgtcctca		360	
50	tcaaaattta aaactattaa ttttaataac agttcacaat ctattaaaaa ctggagtgtc		420	
55	caatcaagac gcgaaaatcc agtctacgag tacagaaatc cgatgatatt cgaatataga		480	
60	aattcatata ttcttcagcg cgctaatacca caatttggaa atgtaatggg gttgaggtat		540	
65	tatacaacta gtaacacttg tcaaactgca gcttttgact caacatttgc tgagaatgct		600	
70	cctaataata ctcaacgttt catctataat ggaagactta agagaccaat ttctaattgtg		660	
75	ctaataaaaa ttgaggctgg tgctcagaac atcagtagtc caacagtcct acctgatccg		720	
80	acaaatcaaa caacatggct atttaatacca gtacaagtaa tgaatggaac ttttactatt		780	
85	gagttttata ataattggaca attagttgat atgattagaa acatgggagt agttactgtt		840	
90	agaacttttg attcttatag aataacaatt gatattgatca gaccagcagc tatgacacaa		900	
95	tacgttcaga gaacattccc acaagggtgg ccttatccat accaagctgc atacatgttg		960	
100	acactcagtg tatttagatgc tacaacagaa tctgtcctat gcgattcaca ctctgtagac		1020	
105	tattcaattg ttgcaaakat tagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtattttcaa		1080	
110	ccaggatttc catgggaaca gacattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta		1140	
115	gaaagacttc tactagttgc gtccgtgaag agaattggtga tg		1182	
120	<210> 58 <211> 394 <212> PRT <213> Secuencia artificial			
125	<220> <223> Muestra aislada 65 de VP6			
130	<400> 58			
	Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Glu Leu Lys Lys Lys			

ES 2 632 429 T3

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

ES 2 632 429 T3

	275	280	285	
5	Thr Ile Asp Met Ile Arg Pro Ala Ala Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg 290 295 300			
10	Thr Phe Pro Gln Gly Gly Pro Tyr Pro Tyr Gln Ala Ala Tyr Met Leu 305 310 315 320			
15	Thr Leu Ser Val Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Leu Cys Asp Ser 325 330 335			
20	His Ser Val Asp Tyr Ser Ile Val Ala Asn Ile Arg Arg Asp Ser Ala 340 345 350			
25	Met Pro Ala Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Thr 355 360 365			
30	Leu Ser Asn Tyr Thr Val Ala Gln Glu Asp Asn Leu Glu Arg Leu Leu 370 375 380			
35	Leu Val Ala Ser Val Lys Arg Met Val Met 385 390			
	<210> 59			
	<211> 1182			
	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> Muestra aislada 66 de VP6			
40	<400> 59			
	gatgtgctgt tttcaattgc gaagactgtc tcagatctta agaagaaagt ttagttaggt			60
	actattttata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattgat tagaactttg			120
45	aatggcaaca catttcatac tgggtggaatt ggaacacaaac ctgagaaaga atggaatttt			180
	caactaccac agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact			240
50	agaagtatca tcgattatatt ggcctcattt atagaagctg tgtgtgatga cgaaattggt			300
	agagaggcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca			360
	gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaat ccattaagaa ttggagtgtc			420
55	cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaatc caatgggtgtt tgagtataga			480
	aattcatata ttcttcagcg tgctaattgca caatatggga atgtaatggg gctgagatat			540
60	tacacagcga gtaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caacttttagc tgaaaatgcc			600
	cctaattggtc ctcaacgggt tattttataat ggaagactta aaagaccaat ttctaattgtg			660
	ttgatgaaaa ttgaggcggg tgctccaaac attagtaatc caacaatact acctgatcca			720
65	gcaaatcaga caacatggct atttaaatcca gtacagataa tgaatggaac atttactatt			780
	gagttttata ataatgggca gtttagttgat ttaattagaa atatgggagt agttactgtt			840

ES 2 632 429 T3

agaacatttg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcagc catgacacag 900
 tatgtacaaa gactgtttcc acaggggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata 960
 5 actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcatgt gtgattcaca ttcagtagat 1020
 tattcaatcg tcgcaaattgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtatttcaa 1080
 10 ccaggctttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta 1140
 gaaagacttt tgtttagttgc gtctgtgaag agaatggtga tg 1182

<210> 60
 15 <211> 394
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Muestra aislada 66 de VP6

<400> 60

25 Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys Lys
 1 5 10 15

Val Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln
 20 25 30

Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly
 35 40 45

Gly Ile Gly Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln
 50 55 60

40 Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr
 65 70 75 80

Arg Ser Ile Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp
 45 85 90 95

Asp Glu Ile Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser
 50 100 105 110

Pro Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ser Ala Lys Phe Lys Thr Ile Asn Phe
 115 120 125

55 Asn Asn Ser Ser Gln Ser Ile Lys Asn Trp Ser Ala Gln Ser Arg Arg
 130 135 140

60 Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Lys Asn Pro Met Val Phe Glu Tyr Arg
 145 150 155 160

65 Asn Ser Tyr Ile Leu Gln Arg Ala Asn Ala Gln Tyr Gly Asn Val Met
 165 170 175

Gly Leu Arg Tyr Tyr Thr Ala Ser Asn Ala Cys Gln Ile Ala Ala Phe

ES 2 632 429 T3

	180	185	190	
5	Asp Ser Thr 195	Leu Ala Glu Asn 200	Pro Asn Gly Thr 205	Gln Arg Phe Ile
10	Tyr Asn Gly 210	Arg Leu Lys Arg 215	Pro Ile Ser Asn 220	Val Leu Met Lys Ile
15	Glu Ala Gly 225	Ala Pro Asn 230	Ile Ser Asn Pro 235	Thr Ile Leu Pro Asp Pro 240
20	Ala Asn Gln Thr 245	Thr Trp Leu Phe Asn 250	Pro Val Gln Ile Met 255	Asn Gly
25	Thr Phe Thr 260	Ile Glu Phe Tyr Asn 265	Asn Gly Gln Leu Val 270	Asp Leu Ile
30	Arg Asn Met 275	Gly Val Val Thr 280	Val Arg Thr Phe Asp 285	Thr Tyr Arg Ile
35	Thr Ile Asp 290	Met Ile Arg Pro 295	Ala Ala Met Thr 300	Gln Tyr Val Gln Arg
40	Leu Phe Pro 305	Gln Gly Gly 310	Pro Tyr Gln His 315	Gln Ala Ala Tyr Met Ile 320
45	Thr Leu Ser 325	Ile Leu Asp Ala Thr 330	Thr Glu Ser Val 335	Met Cys Asp Ser
50	His Ser Val 340	Asp Tyr Ser Ile Val 345	Ala Asn Val Arg Arg 350	Asp Ser Ala
55	Met Pro Ala 355	Gly Thr Val Phe Gln 360	Pro Gly Phe Pro 365	Trp Glu Gln Ile
60	Leu Ser Asn 370	Tyr Thr Val Ala 375	Gln Glu Asp Asn 380	Leu Glu Arg Leu Leu
65	Leu Val Ala 385	Ser Val Lys 390	Arg Met Val Met	
60	<210> 61	<211> 1182	<212> ADN	<213> Secuencia artificial
65	<220>	<223> Muestra aislada 67 de VP6	<400> 61	
	gatgtgctgt tctctattgc gaagactgtc tcagatctta agaagaaagt ttagttggt			60
	actattttata caaatgtaga agatataatc caacaaacta atgaattgat tagaactttg			120

ES 2 632 429 T3

	aatggcaaca cattccatac tgggtggaatt ggaacacaaac ctcagaaaaga atggaat	180
	caactaccgc agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact	240
5	agaagtatca tcgattat	300
	agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca	360
10	gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaat ccattaagaa ttggagtgct	420
	cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaatc caatgggtgtt tgagtataga	480
	aattcatata ttcttcagcg tgccaatgca caatatggga acgtgatggg gctgagatat	540
15	tacacagcta gcaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caactttagc tgaaaatgcc	600
	cctaattggtg ctcaacgggt tatttataat gggagactta aaagaccaat ttctaattgtg	660
20	ttgatgaaaa ttgaggcggg tgctccaaac attagtactc caacaatact acctgatcca	720
	gcaaatcaga caacatggct atttaaatcca gtacagataa tgaatggaac atttactatt	780
	gagttttata ataatgggca gttagttgat ttaattagaa atatgggagt agttactgtt	840
25	agaacattcg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcagc catgacacag	900
	tatgtacaaa gactgtttcc acaggggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata	960
30	actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcatgt gtgattcaca ttcagtagat	1020
	tattcaatcg tcgcaa	1080
	ccaggctttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta	1140
35	gaaagacttt tgttagttgc gtctgtgaag agaatgggtga tg	1182

	<210> 62
	<211> 394
40	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Muestra aislada 67 de VP6
45	<400> 62
50	Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys Lys
	1 5 10 15
	Val Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln
	20 25 30
55	Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly
	35 40 45
60	Gly Ile Gly Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln
	50 55 60
65	Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr
	65 70 75 80
	Arg Ser Ile Ile Asp Tyr Leu Thr Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp

ES 2 632 429 T3

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

ES 2 632 429 T3

	355	360	365	
5	Leu Ser Asn Tyr Thr Val	Ala Gln Glu Asp Asn	Leu Glu Arg Leu Leu	
	370	375	380	
10	Leu Val Ala Ser Val	Lys Arg Met Val Met		
	385	390		
	<210> 63			
	<211> 1182			
	<212> ADN			
15	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> Muestra aislada 68 de VP6			
20	<400> 63			
	gatgtgctgt tctccattgc gaagactgtc tcagatctta agaagaaagt tgtagttaggt			60
	actattttata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattgat tagaactttg			120
25	aatggcaaca cattccatac tgggtggaatt ggaacacaac ctcagaaaaga atggaattttt			180
	caactaccac agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact			240
	agaagtatca tcgattattt ggcctcattt atagaagctg tgtgtgatga cgaaattggt			300
30	agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca			360
	gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaaat ccattaagaa ttggagcgct			420
35	cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaatc caatgggtgtt tgagtataga			480
	aattcatata ttcttcagcg tgccaatgca caatatggga acgtaatggg gctgagatat			540
40	tacacagcca gcaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caacttttagc tgaaaatgcc			600
	cctaattggca ctcaacgggt tattttataat ggaagactta aaagaccgat ttctaattgtg			660
	ttgatgaaaa tcgaggcggg tgctccaaac attagtaatc caacaatact acctgatcca			720
45	gcaaatcaga caacatgggt gtttaaatcca gtgcagataa tgaatggaac atttactatt			780
	gagttttata ataatgggca gttagttagt ttgattagaa atatgggagt agttactgtt			840
	agaacatttg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcaac catgacacag			900
50	tatgtacaaa gactgtttcc acaggggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata			960
	actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcatgt gtgattcaca ttcagtagat			1020
55	tattcaatcg tcgcaaattg cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtattttcaa			1080
	ccaggatttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta			1140
60	gaaagacttt tgtttagttgc gtctgtgaag agaatgggtga tg			1182
	<210> 64			
	<211> 394			
	<212> PRT			
65	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> Muestra aislada 68 de VP6			

ES 2 632 429 T3

<400> 64

5 Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys Lys
1 5 10 15

Val Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln
20 25 30

10 Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly
35 40 45

15 Gly Ile Gly Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln
50 55 60

20 Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr
65 70 75 80

25 Arg Ser Ile Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp
85 90 95

30 Asp Glu Ile Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser
100 105 110

35 Pro Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ser Ala Lys Phe Lys Thr Ile Asn Phe
115 120 125

40 Asn Asn Ser Ser Gln Ser Ile Lys Asn Trp Ser Ala Gln Ser Arg Arg
130 135 140

45 Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Lys Asn Pro Met Val Phe Glu Tyr Arg
145 150 155 160

50 Asn Ser Tyr Ile Leu Gln Arg Ala Asn Ala Gln Tyr Gly Asn Val Met
165 170 175

Gly Leu Arg Tyr Tyr Thr Ala Ser Asn Ala Cys Gln Ile Ala Ala Phe
180 185 190

55 Asp Ser Thr Leu Ala Glu Asn Ala Pro Asn Gly Thr Gln Arg Phe Ile
195 200 205

60 Tyr Asn Gly Arg Leu Lys Arg Pro Ile Ser Asn Val Leu Met Lys Ile
210 215 220

65 Glu Ala Gly Ala Pro Asn Ile Ser Asn Pro Thr Ile Leu Pro Asp Pro
225 230 235 240

Ala Asn Gln Thr Thr Trp Leu Phe Asn Pro Val Gln Ile Met Asn Gly
245 250 255

Thr Phe Thr Ile Glu Phe Tyr Asn Asn Gly Gln Leu Val Asp Leu Ile

ES 2 632 429 T3

	260	265	270	
5	Arg Asn Met Gly Val Val Thr Val Arg Thr Phe Asp Thr Tyr Arg Ile	275	280	285
10	Thr Ile Asp Met Ile Arg Pro Ala Thr Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg	290	295	300
15	Leu Phe Pro Gln Gly Gly Pro Tyr Gln His Gln Ala Ala Tyr Met Ile	305	310	315
20	Thr Leu Ser Ile Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Met Cys Asp Ser	325	330	335
25	His Ser Val Asp Tyr Ser Ile Val Ala Asn Val Arg Arg Asp Ser Ala	340	345	350
30	Met Pro Ala Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Ile	355	360	365
35	Leu Ser Asn Tyr Thr Val Ala Gln Glu Asp Asn Leu Glu Arg Leu Leu	370	375	380
40	Leu Val Ala Ser Val Lys Arg Met Val Met	385	390	
45	<210> 65 <211> 1182 <212> ADN <213> Secuencia artificial			
50	<220> <223> Muestra aislada 69 de VP6			
55	<400> 65			
60	gatgtgctgt tctccattgc gaagactgtc tcagatctta agaagaaagt ttagttggt			60
65	actatttata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattgat tagaactttg			120
70	aatggcaaca cattccatac tgggtggaatt ggaacacaac ctcagaaaga atggaatttt			180
75	caactaccac agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact			240
80	agaagtatca tcgattatgt ggcctcattt atagaagctg tgtgtgatga cgaaattggt			300
85	agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca			360
90	gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaat ccattaagaa ttggagtgtc			420
95	cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaatc caatgggtgtt tgagtataga			480
100	aattcatata ttcttcagcg tgccaatgca caatatggga acgtaatggg gctgagatat			540
105	tacacagcca gcaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caacttttagc tgaaaatgcc			600
110	cctaattggca ctcaacggtt tatttataat ggaagactta aaagaccaat ttctaattgtg			660
115	ttgatgaaaa tcgaggcggg tgctccaaac attagtaatc caacaatact acctgatcca			720

gcaaatcaga caacatggct atttaatcca gtgcagataa tgaatggaac atttactatt 780
gagttttata ataatgggca gttagttgat ttgattagaa atatgggagt agttactgtt 840
5 agaacatttg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcaac catgacacag 900
tatgtacaaa gactgtttcc acaggggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata 960
10 actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcattgt gtgattcaca ttcagtagat 1020
tattcaatcg tcgcaaatgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtatttcaa 1080
ccaggatttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta 1140
15 gaaagacttt tgtttagttgc gtctgtgaag agaatggtga tg 1182

<210> 66
<211> 394
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia de AA de muestra aislada 69 de VP6
25 <400> 66

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

ES 2 632 429 T3

	165	170	175	
5	Gly Leu Arg Tyr 180 Tyr Thr Ala Ser Asn 185 Ala Cys Gln Ile Ala 190 Ala Phe			
10	Asp Ser Thr 195 Leu Ala Glu Asn 200 Ala Pro Asn Gly Thr Gln 205 Arg Phe Ile			
15	Tyr Asn 210 Gly Arg Leu Lys Arg 215 Pro Ile Ser Asn Val 220 Leu Met Lys Ile			
20	Glu Ala Gly Ala Pro Asn 230 Ile Ser Asn Pro Thr 235 Ile Leu Pro Asp Pro 240			
25	Ala Asn Gln Thr Thr 245 Trp Leu Phe Asn 250 Pro Val Gln Ile Met Asn 255 Gly			
30	Thr Phe Thr Ile 260 Glu Phe Tyr Asn 265 Asn Gly Gln Leu Val Asp 270 Leu Ile			
35	Arg Asn Met 275 Gly Val Val Thr Val 280 Arg Thr Phe Asp Thr 285 Tyr Arg Ile			
40	Thr Ile 290 Asp Met Ile Arg Pro 295 Ala Thr Met Thr Gln 300 Tyr Val Gln Arg			
45	Leu Phe Pro Gln Gly Gly 310 Pro Tyr Gln His Gln 315 Ala Ala Tyr Met Ile 320			
50	Thr Leu Ser Ile 325 Leu Asp Ala Thr Thr Glu 330 Ser Val Met Cys Asp 335 Ser			
55	His Ser Val 340 Asp Tyr Ser Ile Val Ala 345 Asn Val Arg Arg Asp 350 Ser Ala			
60	Met Pro Ala 355 Gly Thr Val Phe Gln 360 Pro Gly Phe Pro Trp 365 Glu Gln Ile			
65	Leu Ser 370 Asn Tyr Thr Val Ala 375 Gln Glu Asp Asn Leu 380 Glu Arg Leu Leu			
70	Leu Val Ala Ser Val 385 Lys Arg Met Val Met 390			
75	<210> 67			
80	<211> 1182			
85	<212> ADN			
90	<213> Secuencia artificial			
95	<220>			
100	<223> Muestra aislada 70 de VP6			
105	<400> 67			

ES 2 632 429 T3

gatgtgctgt tctccattgc gaagactgtc tcagatctta agaagaaagt tgtagttggt 60
 actattttata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattgat tagaactttg 120
 5 aatggcaaca cattccatac tgggtggaatt gggacacaac ctcagaaaga atggaatttt 180
 caactaccac agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact 240
 10 agaagtatca tcgattatgtt ggccctcattt atagaagctg tgtgtgatga tgaaattggt 300
 agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca 360
 gcaaaatttta agactattaa ttttaacaat agttcacaat ccattaagaa ttggagtgtc 420
 15 cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaaatc caatgggtgtt tgagtataga 480
 aattcatata ttcttcagcg tgccaatgca caatatggga atgtaatggg gctgagatat 540
 20 tatacagcca gtaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caacttttagc tgaaaatgcc 600
 cctaattggta ctcaacgggtt tattttataat ggaagactta aaagaccaat ttctaattgtg 660
 ttgatgaaaa ttgaggcggg tgctccaaac attagtaatc taacaatact acctgatcca 720
 25 gcaaatcaga caacatgggt atttaaatcca gtacaaataa tgaatggaac atttactatt 780
 gagttttata ataatgggca gttagttgat ttgattagaa atatgggagt agttactgtt 840
 30 agaacatttg atacgtacag aatcacaatt gacatgatta gaccagcagc catgacacag 900
 tatgtacaaa gactgtttcc acaggggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata 960
 actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcatgt gtgattcaca ttcagtagat 1020
 35 tattcaatcg tcgcaaatgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtatttcaa 1080
 ccagggtttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta 1140
 40 gaaagacttt tgttagttgc gtctgtgaag agaatgggtga tg 1182

<210> 68
 <211> 394
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Muestra aislada 70 de VP6
 50 <400> 68

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

ES 2 632 429 T3

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

ES 2 632 429 T3

	340	345	350	
5	Met Pro Ala Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Ile	355	360	365
10	Leu Ser Asn Tyr Thr Val Ala Gln Glu Asp Asn Leu Glu Arg Leu Leu	370	375	380
15	Leu Val Ala Ser Val Lys Arg Met Val Met	385	390	
20	<210> 69			
	<211> 1182			
	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			
25	gatgtgctgt tctccattgc gaaaactgtc tcagatctta agaagaaagt tgtagttggt			60
	actatattata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattaat tagaactttg			120
30	aatggcaaca cattccatac tgggtggaatt ggaacacaac ctcagaaaga atggaatttt			180
	caactaccac agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact			240
	agaagtatca tcgattatatt ggccctcattt atagaagctg tgtgtgatga cgaaattggt			300
35	agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca			360
	gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaaat ccattaagaa ttggagtgct			420
40	cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaaatc caatgggtgtt tgagtataga			480
	aattcatata ttcttcagcg tgccaatgca caatatggga atgtaatggg gctgagatat			540
	tacacagcca gtaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caacttttagc tgaaaatgcc			600
45	cctaattggtta ctcaacgggtt tattttataat ggaagactta aaagaccaat ttctaattgta			660
	ttgatgaaaa ttgaggcggg tgctccaaac attagtaatc caacaatact acctgatcca			720
50	gcaaatcaga caacatggct atttaattcca gtacagataa tgaatggaac atttactatt			780
	gagttttata ataatgggca gtttagttgat ttgattagaa atatgggagt agttactggt			840
	agaacatttg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcagc catgacgcag			900
55	tatgttcaaa gactgtttcc acaggggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata			960
	actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcattgt gtgattcaca ttcagtagat			1020
60	tattcaatcg tcgcaaatgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtatttcaa			1080
	ccaggctttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta			1140
	gaaagacttt tgttagttgc gtctgtgaag agaatgggtga tg			1182
65	<210> 70			
	<211> 394			
	<212> PRT			

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Muestra aislada 71 de VP6

<400> 70

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

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

ES 2 632 429 T3

	245	250	255
5	Thr Phe Thr Ile ₂₆₀ Glu Phe Tyr Asn Asn ₂₆₅ Gly Gln Leu Val Asp ₂₇₀ Leu Ile		
10	Arg Asn Met ₂₇₅ Gly Val Val Thr Val ₂₈₀ Arg Thr Phe Asp Thr ₂₈₅ Tyr Arg Ile		
15	Thr Ile ₂₉₀ Asp Met Ile Arg Pro ₂₉₅ Ala Ala Met Thr Gln ₃₀₀ Tyr Val Gln Arg		
20	Leu Phe Pro Gln Gly Gly ₃₁₀ Pro Tyr Gln His Gln ₃₁₅ Ala Ala Tyr Met Ile ₃₂₀		
25	Thr Leu Ser Ile ₃₂₅ Leu Asp Ala Thr Thr Glu ₃₃₀ Ser Val Met Cys Asp ₃₃₅ Ser		
30	His Ser Val Asp ₃₄₀ Tyr Ser Ile Val Ala ₃₄₅ Asn Val Arg Arg Asp ₃₅₀ Ser Ala		
35	Met Pro Ala ₃₅₅ Gly Thr Val Phe Gln ₃₆₀ Pro Gly Phe Pro Trp ₃₆₅ Glu Gln Ile		
40	Leu Ser ₃₇₀ Asn Tyr Thr Val Ala ₃₇₅ Gln Glu Asp Asn Leu ₃₈₀ Glu Arg Leu Leu		
45	Leu Val ₃₈₅ Ala Ser Val Lys ₃₉₀ Arg Met Val Met		
50	<210> 71 <211> 1182 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> <223> Muestra aislada 72 de VP6		
60	<400> 71 gatgtgctgt tctccattgc gaaaactgtc tcagatctta agaagaaagt tgtagttggt	60	
65	actattttata caaatgtaga agatataatc caacagacta atgaattaat tagaactttg	120	
	aatggcaaca cattccatac tgggtggaatt ggaacacaac ctcagaaaga atggaatttt	180	
	caactaccac agctaggtac aacacttttg aatttagatg ataactatgt tcaagcaact	240	
	agaagtatca tcgattatctt ggccctcattt atagaagctg tgtgtgatga cgaaattggt	300	
	agagaagcgt caagaaatgg aatgcaacct caatctcctg cacttatagc gttatcttca	360	
	gcaaaattta agactattaa ttttaacaat agttcacaat ccattaagaa ttggagtgtc	420	
	cagtcaagac gtgaaaatcc agtgtatgaa tataaaaaatc caatgggtgtt tgagtataga	480	
	aattcatata ttcttcagcg tgccaatgca caatatggga atgtaatggg gctgagatat	540	
	tacacagcca gtaatgcctg tcagattgca gcttttgatt caacttttagc tgaaaatgcc	600	

ES 2 632 429 T3

cctaattggtta ctcaacgggtt tatttataat ggaagactta aaagaccaat ttctaattgta 660
 ttgatgaaaa ttgaggcggg tgctccaaac attagtaatc caacaatact acctgatcca 720
 5 gcaaattcaga caacatggct atttaattcca gtacagataa tgaatggaac atttactatt 780
 gagttttata ataattgggca gtttagttgat ttgattagaa atatggggagt agttactgtt 840
 10 agaacattttg atacgtacag aattacaatt gacatgatta gaccagcagc catgacgcag 900
 tatgtttcaaa gactgtttcc acaggggtggc ccatatcaac atcaagccgc atatatgata 960
 actcttagta tattggatgc cacaacagaa tcagtcattgt gtgattcaca ttcagtagat 1020
 15 tattcaatcg tcgcaaatgt cagaagagac tcagcaatgc cagctggaac agtattttcaa 1080
 ccaggctttc catgggaaca gatattatcc aactacactg ttgctcagga ggataattta 1140
 20 gaaagacttt tgtttagttgc gtctgtgaag agaattgggtga tg 1182

<210> 72
 <211> 394
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Muestra aislada 72 de VP6
 30 <400> 72
 Asp Val Leu Phe Ser Ile Ala Lys Thr Val Ser Asp Leu Lys Lys Lys
 1 5 10 15
 35 Val Val Val Gly Thr Ile Tyr Thr Asn Val Glu Asp Ile Ile Gln Gln
 20 25 30
 40 Thr Asn Glu Leu Ile Arg Thr Leu Asn Gly Asn Thr Phe His Thr Gly
 35 40 45
 45 Gly Ile Gly Thr Gln Pro Gln Lys Glu Trp Asn Phe Gln Leu Pro Gln
 50 55 60
 Leu Gly Thr Thr Leu Leu Asn Leu Asp Asp Asn Tyr Val Gln Ala Thr
 65 70 75 80
 50 Arg Ser Ile Ile Asp Tyr Leu Ala Ser Phe Ile Glu Ala Val Cys Asp
 85 90 95
 55 Asp Glu Ile Val Arg Glu Ala Ser Arg Asn Gly Met Gln Pro Gln Ser
 100 105 110
 60 Pro Ala Leu Ile Ala Leu Ser Ser Ala Lys Phe Lys Thr Ile Asn Phe
 115 120 125
 65 Asn Asn Ser Ser Gln Ser Ile Lys Asn Trp Ser Ala Gln Ser Arg Arg
 130 135 140
 Glu Asn Pro Val Tyr Glu Tyr Lys Asn Pro Met Val Phe Glu Tyr Arg

ES 2 632 429 T3

	145				150				155				160			
5	Asn	Ser	Tyr	Ile	Leu 165	Gln	Arg	Ala	Asn	Ala 170	Gln	Tyr	Gly	Asn	Val 175	Met
10	Gly	Leu	Arg	Tyr 180	Tyr	Thr	Ala	Ser	Asn 185	Ala	Cys	Gln	Ile	Ala 190	Ala	Phe
15	Asp	Ser	Thr 195	Leu	Ala	Glu	Asn	Ala 200	Pro	Asn	Gly	Thr	Gln 205	Arg	Phe	Ile
20	Tyr	Asn 210	Gly	Arg	Leu	Lys	Arg 215	Pro	Ile	Ser	Asn	Val 220	Leu	Met	Lys	Ile
25	Glu 225	Ala	Gly	Ala	Pro	Asn 230	Ile	Ser	Asn	Pro	Thr 235	Ile	Leu	Pro	Asp	Pro 240
30	Ala	Asn	Gln	Thr	Thr 245	Trp	Leu	Phe	Asn	Pro 250	Val	Gln	Ile	Met	Asn 255	Gly
35	Thr	Phe	Thr	Ile 260	Glu	Phe	Tyr	Asn	Asn 265	Gly	Gln	Leu	Val	Asp 270	Leu	Ile
40	Arg	Asn	Met 275	Gly	Val	Val	Thr	Val 280	Arg	Thr	Phe	Asp	Thr 285	Tyr	Arg	Ile
45	Thr	Ile 290	Asp	Met	Ile	Arg	Pro 295	Ala	Ala	Met	Thr	Gln 300	Tyr	Val	Gln	Arg
50	Leu 305	Phe	Pro	Gln	Gly	Gly 310	Pro	Tyr	Gln	His	Gln 315	Ala	Ala	Tyr	Met	Ile 320
55	Thr	Leu	Ser	Ile	Leu 325	Asp	Ala	Thr	Thr	Glu 330	Ser	Val	Met	Cys	Asp 335	Ser
60	His	Ser	Val	Asp 340	Tyr	Ser	Ile	Val	Ala 345	Asn	Val	Arg	Arg	Asp 350	Ser	Ala
65	Met	Pro	Ala 355	Gly	Thr	Val	Phe	Gln 360	Pro	Gly	Phe	Pro	Trp 365	Glu	Gln	Ile
70	Leu	Ser 370	Asn	Tyr	Thr	Val	Ala 375	Gln	Glu	Asp	Asn	Leu 380	Glu	Arg	Leu	Leu
75	Leu 385	Val	Ala	Ser	Val	Lys 390	Arg	Met	Val	Met						
80	<210>	73														
85	<211>	33														
90	<212>	ADN														
95	<213>	Secuencia artificial														

	<220>		
	<223>	Cebador de VP4 inverso de Rota C KSN760	
5	<400>	73 cyttrmtay yacttyatyh rmdtttattr dbc	33
10	<210>	74	
	<211>	34	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
15	<220>		
	<223>	Cebador de VP4 directo de Rota C KSN761	
	<400>	74 atggcgtcct cactttatca gcarttraty tcac	34
20	<210>	75	
	<211>	52	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
25	<220>		
	<223>	Cebador de VP4 inverso de Rota C KSN762	
30	<400>	75 gtgcggccgc aagcttttac yttrmtayy acttyatyhr mdttdattd bc	52
35	<210>	76	
	<211>	47	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
40	<220>		
	<223>	Cebador directo de Rota C KSN763	
	<400>	76 ggttccgcgt ggatccgcgt cctcacttta tcagcarttr atytcac	47
45	<210>	77	
	<211>	30	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
50	<220>		
	<223>	Cebador 1 para insertar la etiqueta de His en pNPL1	
	<400>	77 atgatgatgc atatgtatat ctccttctta	30
55	<210>	78	
	<211>	28	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
60	<220>		
	<223>	Cebador 2 para insertar la etiqueta de His en pNPL1	
65	<400>	78 catcatcatg gatccgaatt cgagctcc	28

	<210> 79	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador directo de NSP4 de Rota C para pNPL3	
	<400> 79	
10	tcatcatcat ggatccatca cctcaaaaac tg	32
	<210> 80	
	<211> 37	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de NSP4 de Rota C para pNPL3 o pNPL1	
20	<400> 80	
	gtgcggccgc aagctttcat agacaaactt ccgtctc	37
	<210> 81	
25	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador directo de VP4 de Rota C para pNPL3	
	<400> 81	
35	tcatcatcat ggatccaggg cgtcctcact ttatc	35
	<210> 82	
	<211> 35	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de VP4 de Rota C para pNPL3 o pNPL1	
45	<400> 82	
	gtgcggccgc aagcttttat aacaccatca ttctc	35
	<210> 83	
50	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador directo de VP6 de Rota C para pNPL3	
	<400> 83	
	tcatcatcat ggatccgacg tgctgttttc aattg	35
60	<210> 84	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador inverso de VP6 de Rota C para pNPL3 o pNPL1	

	<400> 84 gtgcggccgc aagcttctac atcaccattc tcttc	35
5	<210> 85 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador directo de NSP4 de Rota C para pNPL1	
15	<400> 85 aatgggtcgc ggatccatca cctcaaaaac tg	32
20	<210> 86 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo de VP4 de Rota C para pNPL1	
25	<400> 86 aatgggtcgc ggatccaggc cgtcctcact ttatc	35
30	<210> 87 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador directo de VP6 de Rota C para pNPL1	
40	<400> 87 aatgggtcgc ggatccgacg tgctgttttc aattg	35
45	<210> 88 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo de VP7 de Rota C para pNPL3	
50	<400> 88 tcacatcat ggatccgttt gtgcaacatt g	31
55	<210> 89 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador inverso de VP7 de Rota C para pNPL3 o pNPL1	
	<400> 89 gtgcggccgc aagcttttac gcgtatctta gcatc	35
65	<210> 90 <211> 996 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

```

<220>
<223>  Secuencia de VP7: ORF completo

5
<220>
<221>  misc_feature
<222>  (781)..(781)
<223>  n es a, c, g, o t

10
<400>  90
atggtttgtg caacattgta cactgtttgc gttatactct gcattctttt tatatacact      60
ttactgttta gaaaaatggt ccacctaatt actgatacat taatcataac ttttaataata      120
15 tctaactgta ttggatggac acatgggtcaa atgtttattg atgacatgaa ttataatgga      180
aacgttgaaa tagtcattaa cgctactgat ccattcaatg tagaatctct atgtatatat      240
20 tttccaaatg ctgttgtagg atcacaagga cctgggtcaaa cgaatggcca tttaaatgat      300
ggaaattatg ctcaaacaat tgctacctta tttgagacaa aaggattccc aaaaggctca      360
25 gtaacactta aaacatacat taaagcttca gatTTTTatta gttcagtaga gatgacttgt      420
tcgtataatg tagttataat acctgatgat ccaaataagt cagaggagat tgaacaaata      480
gcagaatgga ttctgaatgt ttggagatgt gatgatattg atttaactat ttataacttac      540
30 gaacaaacag gaatagataa tttgtgggct gcttttggtg acgattgtga tatactctgtt      600
tgtccactag acactacaat gcatggaatt ggatgttcac ctgcaagtac agaaacatat      660
35 gaagtattat caaataacac gcaagtagcg ttaattaatg ttgtagataa tgtaaaacac      720
agaattcaaa tgaatactgg tcattgtaag ttaaagaatt gtgtgaaagg cgaagcaaga      780
ntaaatactg caatagtaag aatttcaaag tcatcaagct ttgataattc attgtcacca      840
40 ttaaataatg gtcaaactac acgatcattt aaaataaacg ctaagaaatg gtggacaata      900
ttttatacaa taattgatta cattaataga attgtacaga caatgactcc tagacatagg      960
45 gccatttacc cagaagggtg gatgctaaga tacgcg      996

<210>  91
<211>  332
<212>  PRT
50 <213>  Secuencia artificial

<220>
<223>  Secuencia de VP7: ORF Completo

55
<220>
<221>  misc_feature
<222>  (261)..(261)
<223>  Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

60
<400>  91

Met Val Cys Ala Thr Leu Tyr Thr Val Cys Val Ile Leu Cys Ile Leu
1          5          10          15

65
Phe Ile Tyr Thr Leu Leu Phe Arg Lys Met Phe His Leu Ile Thr Asp
20          25          30

```

ES 2 632 429 T3

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

ES 2 632 429 T3

Ile Asp Tyr Ile Asn Thr Ile Val Gln Thr Met Thr Pro Arg His Arg
 305 310 315 320

Ala Ile Tyr Pro Glu Gly Trp Met Leu Arg Tyr Ala
 325 330

<210> 92
 <211> 2208
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ORF completo de VP4 en el GenBank (M74218)

<400> 92

20 atggcgtcct cactttatca gcagttaatt tcacaaaatt attattctat tggaaacgaa 60
 atattaacag atcaacagac aacagaaact gtagtagatt atgtagatgc tggtaattat 120
 acatacgcgc aattaccacc tactaaatgg ggagcacgtg ggacttttaa gtctgcattt 180
 25 aatgtatcaa atataactgg acctcatagc aatacaataa tagaatggag taatttacta 240
 aattctaacg gatgggtcat ttatcaaaaa ccggccaata ctacaaaatt atttaaacad 300
 30 ggaccagaaa cttataacag taacttggca gcatttgaat tatgggtatgg taaagctggg 360
 acatcagtta catcagacta ttattcttca ttacagaata atgaaaaaac tgtgacagct 420
 acttcagatt cattgatact attttggaa gaaggatcta cagtgttagc taataaaaag 480
 35 gtaaatttta gctgggacat ggggtggatg ttaataaaac ctacgagagg caatagagtg 540
 gacatctgca tggcaaacat gaatgatttc aatagtagca tatttaattg ggaagaatgg 600
 40 aaacatgaat ttccacgcag tgatgttaat ataaatgtta atatgtatac agattattat 660
 cttgagagtg aagatcctta tactgaactt aaagcactac agcaaccaa cattacaact 720
 tttgagatga aaatgatgaa aataatccgt aatgggtcaa taaacttgaa tgaagtagta 780
 45 agtaaagact cactatggca ggaggtgaag tatgctaggg atataacgtt agagtgtgaag 840
 atagaatcag aagtagtcaa aggtgggtgga tgggggttatg actacacgag tgtagctttt 900
 50 aaaactgtta atcatacata cacgtatact cgagctgggtg aaatagtaaa tgcacatggt 960
 accattagtt ttaataatat gaaagaacga tcatacgggg gttcattacc gactgatttc 1020
 aaaataggaa ggtttgatgt aattgatact gatacttata tgtatataga ttattgggac 1080
 55 gattcagaaa ttttcaaaaa tatgggtgat gtgcgtgatt taagtgttaa cattgggtgg 1140
 ttcttttatt atgctgaaat gtcataattt tttcaaattc ctgtaggtgc acatccagga 1200
 60 ttacattcat caggagtaag atttgtatat gaaagatgtc ttttatcaca acaattcact 1260
 gaccaagtgt cacttaactc tatgaggttc atatttagag tgacagaatc aaatgggttg 1320
 tttatgacat caggtaatat taatactaga cggatagcat caggaaactgg atttgcatat 1380
 65 gcagacgggc atactttctca aacagttgga aatattactt tcatatcatt gatcccaagt 1440
 aatccaaatt atcagacacc aatagcatca tcaagcacag tcaggatgga tttagaaagg 1500

ES 2 632 429 T3

aagataaatg atttacgtaa tgattttaat cagctagcta attcagtcgc attaggtgac 1560
 attctatctt tggcaacttc accactaact tttgctaatt tgcttgaatc agtgcctgct 1620
 5 atcgcttcat cagttaaaga tgttgcagct aatgtaatga aaaaatttag aaacactaaa 1680
 atgtttaaaa aagctacaaa agctaaatat agtgagttta ttattggaga tttgttgga 1740
 10 gatgtaacga atgttgcacg aaattcaa at ggcatgaatt ttgatgacat tacatccgct 1800
 gtgatggtat caactactaa taaactacaa cttactgacg tagacacact ctgagagatt 1860
 gtcgctagat cagctgataa ttttatccct aacagatctt acagaatgat agaagacggt 1920
 15 attgtgtatg aagcaacacc aaaacgaact ttctcatagc atcttacaac attgcaacag 1980
 aggggaatttg acatagataa gttcatgcga ttggcatcta aatcaccagt aatatctgca 2040
 20 atagtagatt ttgcaacatt aaaggctatg agagaaacat atggtgtagg aacggacgta 2100
 atatacaa at tagtagcctc agatgctcca acgatattat cattcatcga taacaacaat 2160
 ccgttgatta aaagtagaat tgaggaacta ttaagacaat gcagatta 2208
 25

<210> 93
 <211> 736
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ORF completo de VP4 en el GenBank (M74218)

35 <400> 93

Met Ala Ser Ser Leu Tyr Gln Gln Leu Ile Ser Gln Asn Tyr Tyr Ser
 1 5 10 15

Ile Gly Asn Glu Ile Leu Thr Asp Gln Gln Thr Thr Glu Thr Val Val
 20 25 30

Asp Tyr Val Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Tyr Ala Gln Leu Pro Pro Thr
 35 40 45

Lys Trp Gly Ala Arg Gly Thr Phe Lys Ser Ala Phe Asn Val Ser Asn
 50 55 60

Ile Thr Gly Pro His Thr Asn Thr Ile Ile Glu Trp Ser Asn Leu Leu
 65 70 75 80

Asn Ser Asn Gly Trp Val Ile Tyr Gln Lys Pro Ala Asn Thr Thr Lys
 85 90 95

Leu Phe Lys His Gly Pro Glu Thr Tyr Asn Ser Asn Leu Ala Ala Phe
 100 105 110

Glu Leu Trp Tyr Gly Lys Ala Gly Thr Ser Val Thr Ser Asp Tyr Tyr
 115 120 125

ES 2 632 429 T3

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

ES 2 632 429 T3

Leu His Ser Ser Gly Val Arg Phe Val Tyr Glu Arg Cys Leu Leu Ser
 405 410 415
 5 Gln Gln Phe Thr Asp Gln Val Ala Leu Asn Ser Met Arg Phe Ile Phe
 420 425 430
 10 Arg Val Thr Glu Ser Asn Gly Trp Phe Met Thr Ser Gly Asn Ile Asn
 435 440 445
 15 Thr Arg Arg Ile Ala Ser Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Ala Asp Gly His
 450 455 460
 Thr Ser Gln Thr Val Gly Asn Ile Thr Phe Ile Ser Leu Ile Pro Ser
 465 470 475 480
 20 Asn Pro Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Ala Ser Ser Ser Thr Val Arg Met
 485 490 495
 25 Asp Leu Glu Arg Lys Ile Asn Asp Leu Arg Asn Asp Phe Asn Gln Leu
 500 505 510
 30 Ala Asn Ser Val Ala Leu Gly Asp Ile Leu Ser Leu Ala Thr Ser Pro
 515 520 525
 35 Leu Thr Phe Ala Asn Leu Leu Glu Ser Val Pro Ala Ile Ala Ser Ser
 530 535 540
 Val Lys Asp Val Ala Ala Asn Val Met Lys Lys Phe Arg Asn Thr Lys
 545 550 555 560
 40 Met Phe Lys Lys Ala Thr Lys Ala Lys Tyr Ser Glu Phe Ile Ile Gly
 565 570 575
 45 Asp Leu Leu Glu Asp Val Thr Asn Val Ala Arg Asn Ser Asn Gly Met
 580 585 590
 50 Asn Phe Asp Asp Ile Thr Ser Ala Val Met Val Ser Thr Thr Asn Lys
 595 600 605
 55 Leu Gln Leu Thr Asp Val Asp Thr Leu Ser Glu Ile Val Ala Arg Ser
 610 615 620
 Ala Asp Asn Phe Ile Pro Asn Arg Ser Tyr Arg Met Ile Glu Asp Gly
 625 630 635 640
 60 Ile Val Tyr Glu Ala Thr Pro Lys Arg Thr Phe Ser Tyr Asp Leu Thr
 645 650 655
 65 Thr Leu Gln Gln Arg Glu Phe Asp Ile Asp Lys Phe Met Arg Leu Ala
 660 665 670

ES 2 632 429 T3

	Ser	Lys	Ser	Pro	Val	Ile	Ser	Ala	Ile	Val	Asp	Phe	Ala	Thr	Leu	Lys	
			675					680					685				
5	Ala	Met	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gly	Thr	Asp	Val	Ile	Tyr	Lys	Leu	
		690					695					700					
10	Val	Ala	Ser	Asp	Ala	Pro	Thr	Ile	Leu	Ser	Phe	Ile	Asp	Asn	Asn	Asn	
	705					710					715					720	
15	Pro	Leu	Ile	Lys	Ser	Arg	Ile	Glu	Glu	Leu	Leu	Arg	Gln	Cys	Arg	Leu	
					725					730					735		
	<210> 94																
	<211> 2229																
	<212> ADN																
20	<213> Secuencia artificial																
	<220>																
	<223> Triple fusión de NSP4-VP4-VP6 de Rota C																
25	<400> 94																
	atcacctcaa	aaactgtgat	tgaaagattt	aaaactgaaa	acaatactaa	tgatcaaagc											60
	ggtaatat	atgaagaata	tgaagaggta	atgaaacaaa	tgcgtgagat	gaaaattcat											120
30	ttgactg	gcgc	tatttaataa	tatacacaaa	gataatatgg	agtgaggat	gagtgaatca										180
	attcgca	gag	aaaagaaacg	tgaaatgaaa	gcgaatacag	ccgagaatgt	aattaaaaat										240
	gatgtaa	ata	atgttaacat	atgtgatacg	tcaggactgg	agacggaagt	ttgtctaagg										300
35	gcgtcct	cac	tttatcagca	attaatctca	caaaattatt	attcaactgg	taatgaaatt										360
	ttgtttg	gata	gacagactac	cagaaccact	aaagattacg	tagaagctgg	aaattataca										420
40	tatgctca	aat	taccaccaac	ggagtgggga	gcaggggtcaa	cctttgaatc	tacattcaaa										480
	tcatcaa	ata	taactggtcc	acacaataac	acagtcattg	aatggagtaa	tttaattgaat										540
	tctgatatt	tt	ggttattgta	tcaaaaacca	ttggatataa	ctgcaccaat	cagattatta										600
45	aaacatg	gac	cggaaaatca	tgctgatgta	gcagcttttg	aattatggta	tggtaaagct										660
	ggtcata	accg	tgacatcaat	atattattca	gcaatatcta	atcctaataa	tactgttacg										720
50	ttaacgt	tcgg	attcattagt	tctatttttg	aacgaagggtc	aaacgatact	ggatacaaa										780
	acagtca	aatt	ttaattggaa	tatgggtggt	atattagtta	gaccgtcaag	aggtacacgt										840
	gtggaca	ttt	gtatgtctga	tatggacaat	acagatggta	ctaattttta	ttggattcaa										900
55	tggaagc	atg	agttcccccg	tagtagtagt	aatgctaata	ttagtatgta	tggtgaatat										960
	tatctag	caa	gtagtgatcc	ataccatgaa	ctcaaagagt	tgcaaagacc	agcagtaaca										1020
60	actataa	ata	tgagaatgat	gggtgtagac	gtgctgtttt	caattgcaaa	gactgtttca										1080
	gatctca	aaga	agaaagttgt	agttggtact	atttatacaa	atgtagaaga	tataattcaa										1140
	cagacta	acg	aattgattag	aacttttaaat	ggcaacacat	tccatactgg	tggaattgga										1200
65	acacaac	ctc	aaaaagaatg	gaactttcag	ctaccacagc	taggtacaac	actcttgaat										1260
	ttggatg	ata	actatgttca	agcaactaga	agtattattg	attacttagc	ctcattcata										1320

ES 2 632 429 T3

```

gaagcagtgt gtgatgacga aattgttaga gaagcgtcaa gaaatggaat gcaacctcaa      1380
5  tcccctgcat ttatagcatt atcttcatca aaatttaaga ctattaattt taacaatagt      1440
   tcgcaatcca ttaaaaattg gagtgctcaa tcaagacgtg agaatccagt ttatgaatac      1500
   aaaaatccga tgggtatttg atatagaaat tcgtacattc ttcagcgtgc taatgcacaa      1560
10  tttgggaacg taatgggact gagatattac acagccagca atgtctgtca gattgcagct      1620
   tttgattcaa ctcttgctga aaatgctcct aatggcgctc aacggtttat ctataatgga      1680
   agacttaaga gaccaatttc taatgtgttg atgaaaattg aagcaggcgc tccaaatatt      1740
15  aataatccaa caatactacc tgatccagca aaccaaacta catgggttatt taatccagtg      1800
   cagataatga atggaacgtt cactattgaa ttttacaaca atggacaatt ggtcgatttg      1860
20  attagaaata tgggagtggt tactgttaga acgtttgata catacagaat tacaattgat      1920
   atgattagac cagcagccat gacacagtat gtacaaagac tgttcccaca aggtggccca      1980
   tatcaacatc aagctgcata tatgatgaca cttagtatat tagatgctac aacagaatca      2040
25  gttatgtgcg attcacattc agtagactat tcaattgttg caaatgtcag aagagattca      2100
   gcgatgccag ctggaacagt atttcagcca ggctttccat gggaacagac gttatccaac      2160
30  tacactgttg ctcaggaaga caatttagaa agacttttat tggttgcgtc tgtgaagaga      2220
   atggtgatg                                     2229

```

```

35  <210> 95
    <211> 743
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

```

```

40  <220>
    <223> Triple fusión de NSP4-VP4-VP6 de Rota C
    <400> 95

```

```

45  Ile Thr Ser Lys Thr Val Ile Glu Arg Phe Lys Thr Glu Asn Asn Thr
    1      5      10      15

```

```

50  Asn Asp Gln Ser Gly Asn Ile His Glu Glu Tyr Glu Glu Val Met Lys
    20      25      30

```

```

55  Gln Met Arg Glu Met Lys Ile His Leu Thr Ala Leu Phe Asn Asn Ile
    35      40      45

```

```

His Lys Asp Asn Met Glu Trp Arg Met Ser Glu Ser Ile Arg Arg Glu
    50      55      60

```

```

60  Lys Lys Arg Glu Met Lys Ala Asn Thr Ala Glu Asn Val Ile Lys Asn
    65      70      75      80

```

```

65  Asp Val Asn Asn Val Asn Ile Cys Asp Thr Ser Gly Leu Glu Thr Glu
    85      90      95

```

ES 2 632 429 T3

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

ES 2 632 429 T3

	Gly	Thr	Ile	Tyr	Thr	Asn	Val	Glu	Asp	Ile	Ile	Gln	Gln	Thr	Asn	Glu
		370					375					380				
5	Leu	Ile	Arg	Thr	Leu	Asn	Gly	Asn	Thr	Phe	His	Thr	Gly	Gly	Ile	Gly
	385					390					395					400
10	Thr	Gln	Pro	Gln	Lys	Glu	Trp	Asn	Phe	Gln	Leu	Pro	Gln	Leu	Gly	Thr
					405					410					415	
15	Thr	Leu	Leu	Asn	Leu	Asp	Asp	Asn	Tyr	Val	Gln	Ala	Thr	Arg	Ser	Ile
				420					425					430		
20	Ile	Asp	Tyr	Leu	Ala	Ser	Phe	Ile	Glu	Ala	Val	Cys	Asp	Asp	Glu	Ile
			435					440					445			
25	Val	Arg	Glu	Ala	Ser	Arg	Asn	Gly	Met	Gln	Pro	Gln	Ser	Pro	Ala	Phe
		450					455					460				
30	Ile	Ala	Leu	Ser	Ser	Ser	Lys	Phe	Lys	Thr	Ile	Asn	Phe	Asn	Asn	Ser
	465					470					475					480
35	Ser	Gln	Ser	Ile	Lys	Asn	Trp	Ser	Ala	Gln	Ser	Arg	Arg	Glu	Asn	Pro
					485					490					495	
40	Val	Tyr	Glu	Tyr	Lys	Asn	Pro	Met	Val	Phe	Glu	Tyr	Arg	Asn	Ser	Tyr
				500					505					510		
45	Ile	Leu	Gln	Arg	Ala	Asn	Ala	Gln	Phe	Gly	Asn	Val	Met	Gly	Leu	Arg
			515					520					525			
50	Tyr	Tyr	Thr	Ala	Ser	Asn	Val	Cys	Gln	Ile	Ala	Ala	Phe	Asp	Ser	Thr
		530					535					540				
55	Leu	Ala	Glu	Asn	Ala	Pro	Asn	Gly	Ala	Gln	Arg	Phe	Ile	Tyr	Asn	Gly
	545					550					555					560
60	Arg	Leu	Lys	Arg	Pro	Ile	Ser	Asn	Val	Leu	Met	Lys	Ile	Glu	Ala	Gly
					565					570					575	
65	Ala	Pro	Asn	Ile	Asn	Asn	Pro	Thr	Ile	Leu	Pro	Asp	Pro	Ala	Asn	Gln
				580					585					590		
70	Thr	Thr	Trp	Leu	Phe	Asn	Pro	Val	Gln	Ile	Met	Asn	Gly	Thr	Phe	Thr
			595					600					605			
75	Ile	Glu	Phe	Tyr	Asn	Asn	Gly	Gln	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	Arg	Asn	Met
		610					615					620				
80	Gly	Val	Val	Thr	Val	Arg	Thr	Phe	Asp	Thr	Tyr	Arg	Ile	Thr	Ile	Asp
	625					630					635					640

ES 2 632 429 T3

	Met Ile Arg Pro Ala Ala Met Thr Gln Tyr Val Gln Arg Leu Phe Pro	
	645 650 655	
5	Gln Gly Gly Pro Tyr Gln His Gln Ala Ala Tyr Met Met Thr Leu Ser	
	660 665 670	
10	Ile Leu Asp Ala Thr Thr Glu Ser Val Met Cys Asp Ser His Ser Val	
	675 680 685	
15	Asp Tyr Ser Ile Val Ala Asn Val Arg Arg Asp Ser Ala Met Pro Ala	
	690 695 700	
	Gly Thr Val Phe Gln Pro Gly Phe Pro Trp Glu Gln Thr Leu Ser Asn	
	705 710 715 720	
20	Tyr Thr Val Ala Gln Glu Asp Asn Leu Glu Arg Leu Leu Leu Val Ala	
	725 730 735	
25	Ser Val Lys Arg Met Val Met	
	740	
30	<210> 96 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador directo de NSP4	
	<400> 96 aagtgaggac gcccttagac aaacttccgt ctcc	34
40	<210> 97 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador directo de VP4	
50	<400> 97 agggcgtcct cactttatc	19
55	<210> 98 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador inverso de VP4	
	<400> 98 tgaaaacagc acgtctaaca ccatcattct c	31
65	<210> 99 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>

<223> Cebador directo de VP6

5

<400> 99

gacgtgctgt tttcaattgc

20

REIVINDICACIONES

1. Composición inmunológica, que comprende:
 - a) polipéptidos de rotavirus NSP4, VP4 y VP6; y
 - b) un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable.
2. Composición, según la reivindicación 1, que comprende un polipéptido de triple fusión NSP4-VP4-VP6 que comprende los polipéptidos de rotavirus NSP4, VP4 y VP6.
3. Composición, según la reivindicación 2, en la que el polipéptido de triple fusión recombinante comprende o consiste esencialmente en un polipéptido de triple fusión NSP4-VP4-VP6 de Rotavirus C.
4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un adyuvante.
5. Composición, según la reivindicación 4, en la que el adyuvante es aceite-en-agua.
6. Composición, según la reivindicación 2 o la reivindicación 4, en la que el polipéptido tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, a lo largo de cada polipéptido NSP4, VP4 y VP6, en comparación con la secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO: 95.
7. Composición, según la reivindicación 6, en la que el polipéptido tiene la secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO: 95.
8. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el polipéptido o polipéptidos comprenden una secuencia codificada por una de las secuencias tal como se expone en SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69 o 71.
9. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además al menos un antígeno adicional asociado con un patógeno distinto del rotavirus.
10. Composición, según la reivindicación 9, en la que al menos un antígeno adicional es capaz de provocar en un animal porcino una respuesta inmunitaria contra *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*), circovirus porcino de tipo 2 (PCV2), virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), virus de la gripe porcina (SIV) u otro patógeno capaz de infectar y causar la enfermedad o susceptibilidad a la enfermedad en un animal porcino.
11. Procedimiento para producir la composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende las etapas de:
 - (a) obtener una muestra biológica de un animal no humano conocido o sospechoso de estar infectado con uno o más tipos de rotavirus;
 - (b) si el estado de infección no se conoce, determinar si el animal no humano está infectado con rotavirus;
 - (c) recoger el ARN del animal no humano infectado con dicho uno o más tipos de rotavirus;
 - (d) realizar la PCR con transcriptasa inversa usando cebadores complementarios a genes de NSP4, VP4 y VP6;
 - (e) insertar el producto de la PCR de la etapa (d) en un vector de expresión adecuado;
 - (f) colocar el vector producido en la etapa (e) en un sistema de expresión de huésped adecuado;
 - (g) recoger los polipéptidos rotavirales; y
 - (h) añadir a los polipéptidos rotavirales cualquiera de los componentes de vacuna adicionales, produciendo de este modo la composición de vacuna.
12. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que los componentes adicionales se seleccionan entre adyuvantes, portadores, diluyentes y antígenos asociados con patógenos distintos de rotavirus.
13. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que el componente adicional es un adyuvante.
14. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que el componente adicional es un antígeno o antígenos capaces de provocar en un animal porcino una respuesta inmunitaria contra *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*), circovirus porcino de tipo 2 (PCV2), virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV), virus de la gripe porcina (SIV) u otro patógeno capaz de infectar y causar la enfermedad y/o susceptibilidad a la enfermedad en un animal porcino.
15. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para usar en terapia.
16. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para usar en la vacunación de un animal.
17. Composición para usar, según la reivindicación 16, en la que el animal es un animal porcino.

18. Composición para usar, según la reivindicación 17, en la que el animal porcino es una cerda de aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 6 semanas antes del parto.

5 19. Composición para usar, según la reivindicación 17, en la que los lechones resultantes de dicho animal porcino presentan una morbilidad y/o mortalidad reducidas en comparación con lechones procedentes de cerdas no vacunadas.

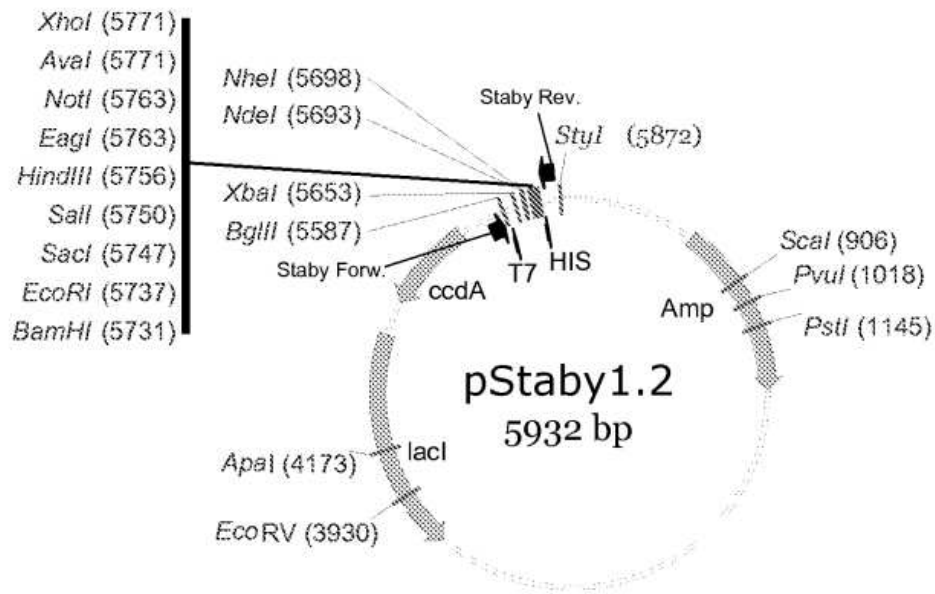


Figura 1

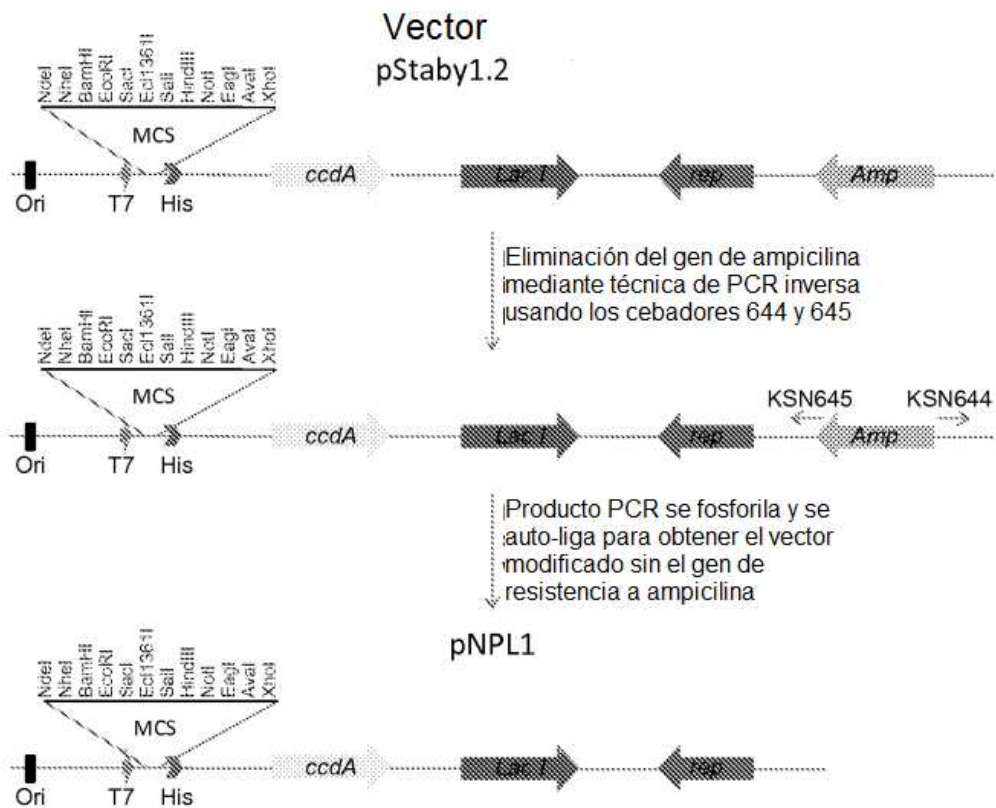


Figura 2

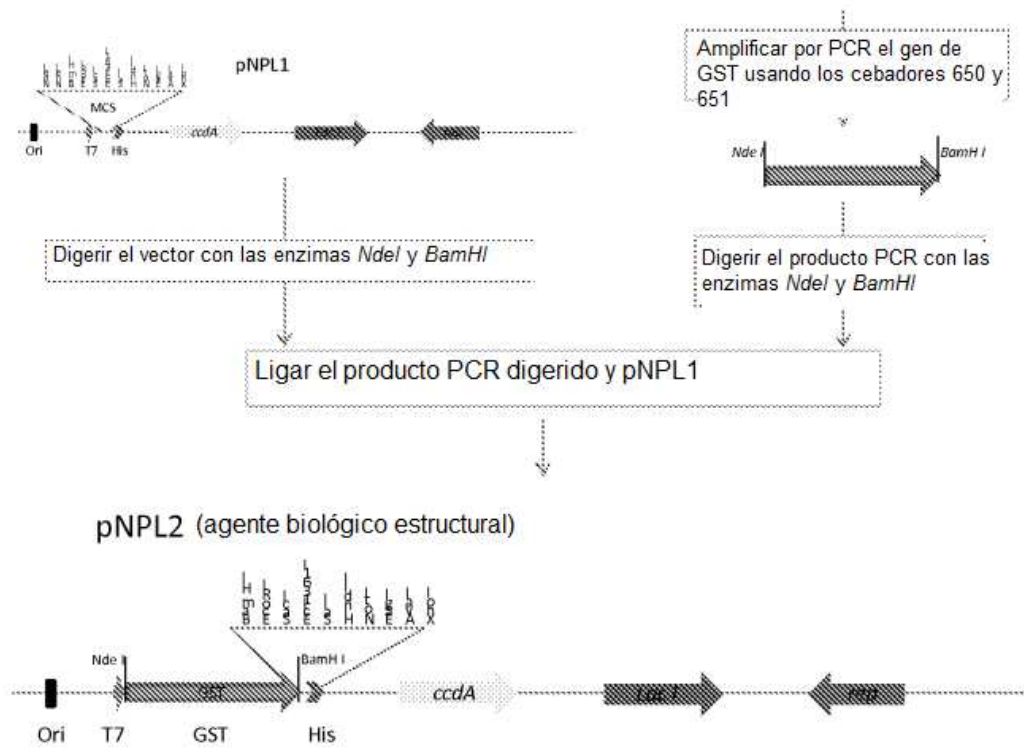


Figura 3

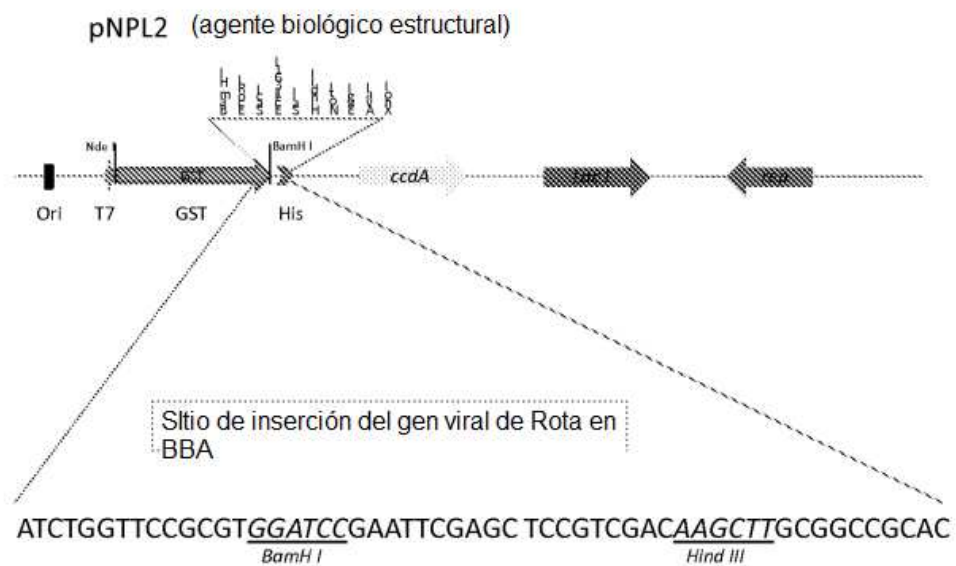
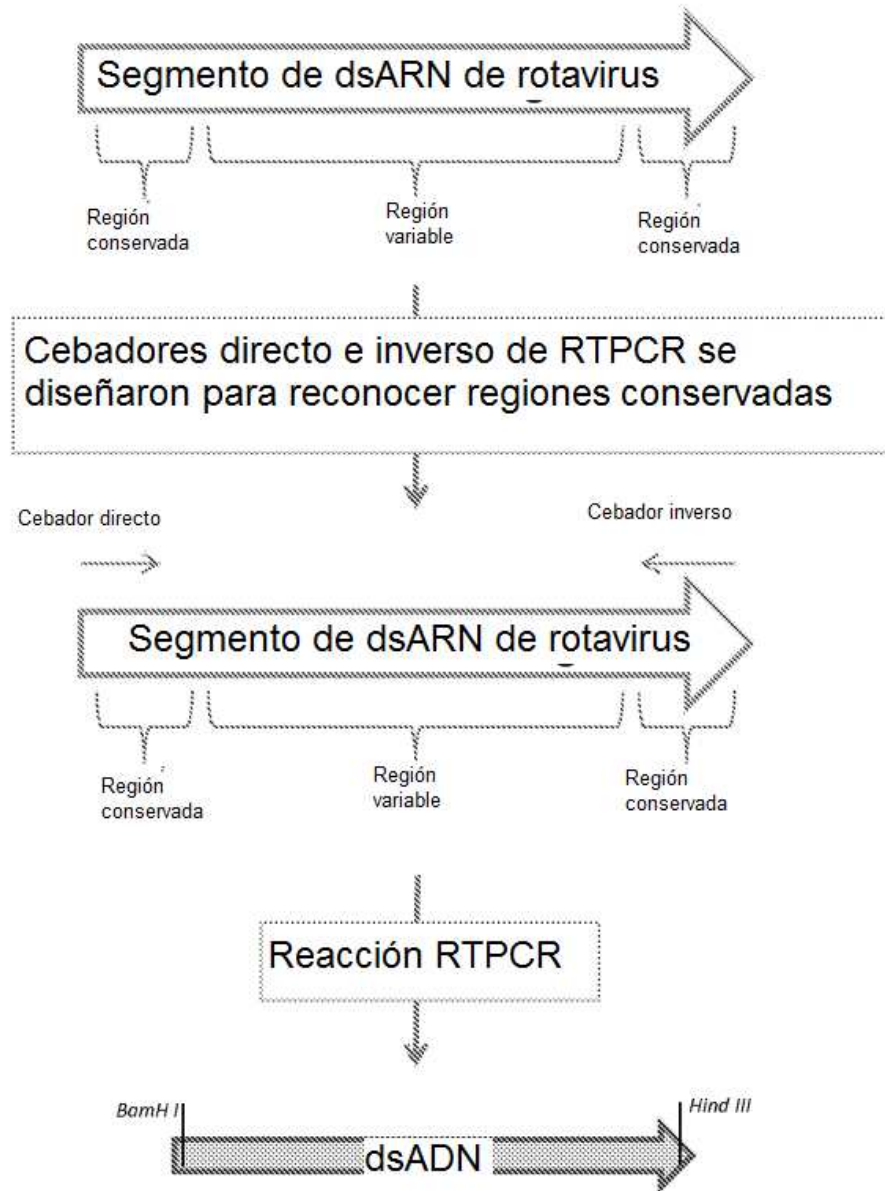


Figura 4



Producto PCR que contiene genes de Rotavirus

Figura 5

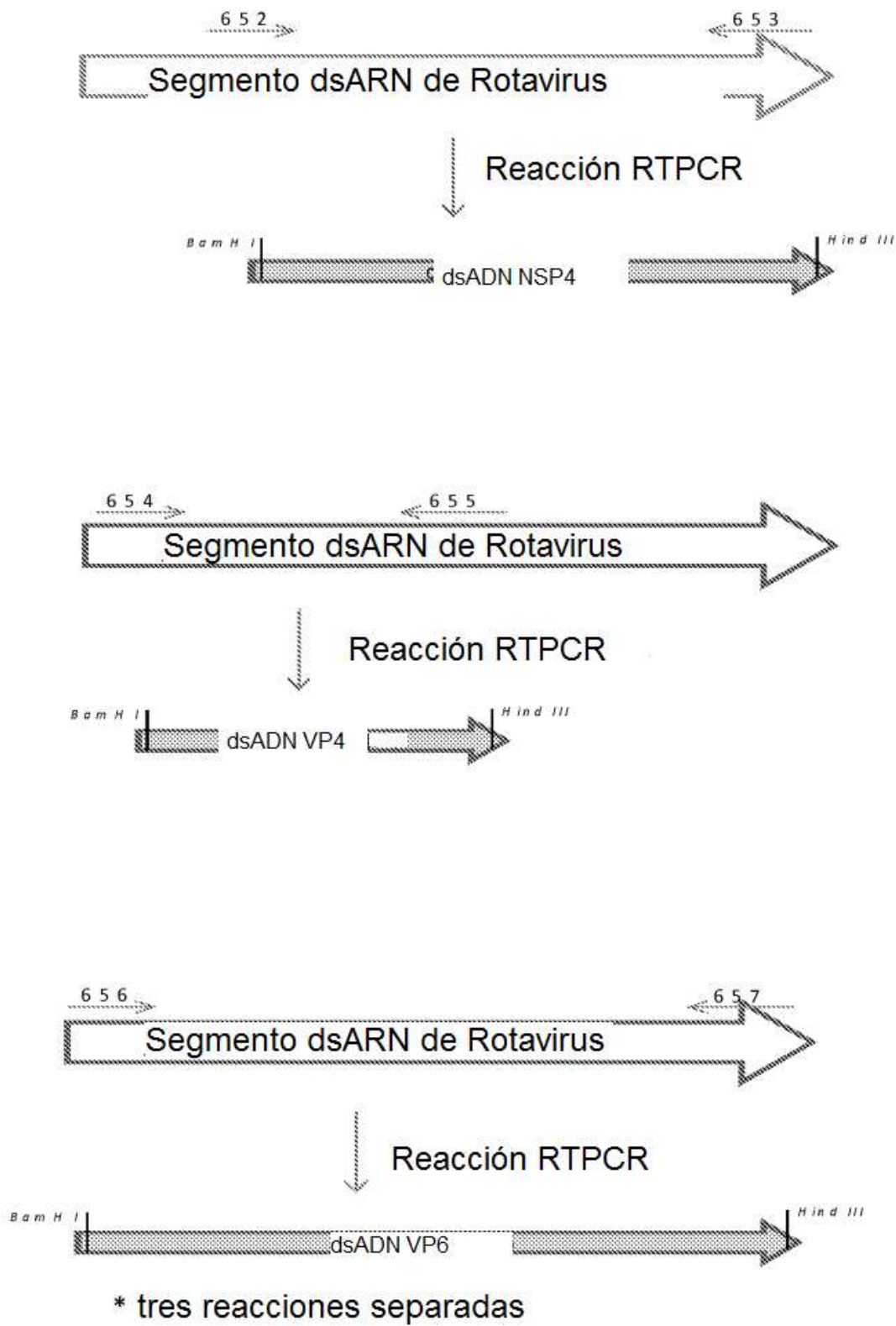


Figura 6

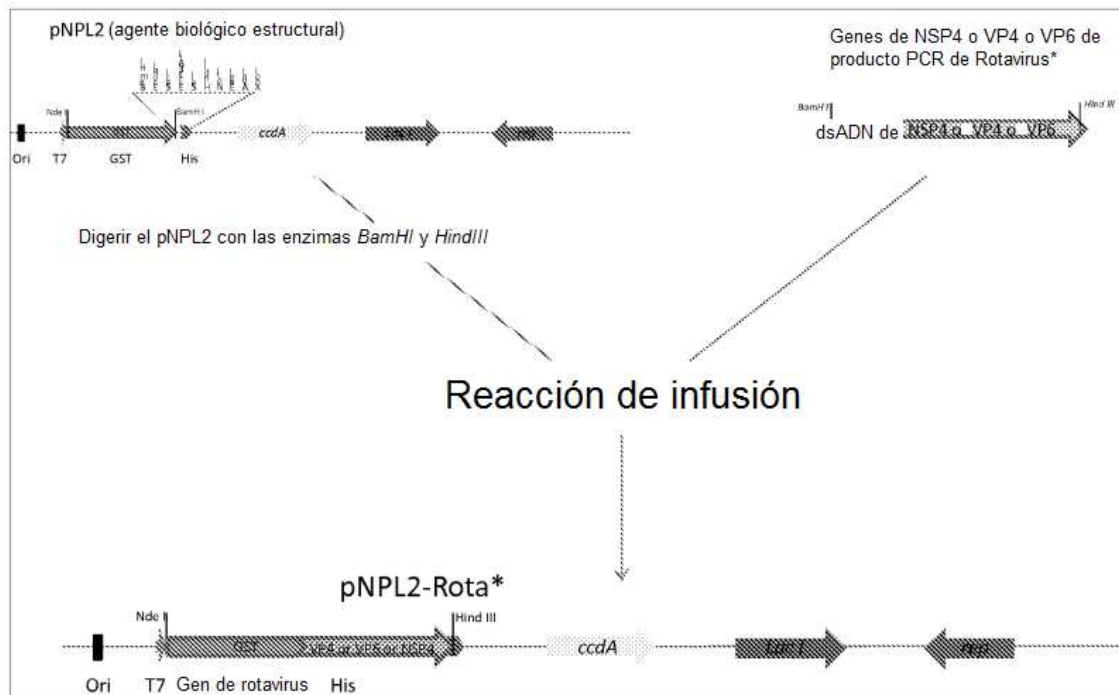


Figura 7

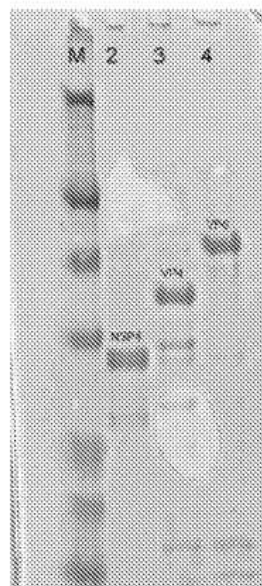


Figura 8

		1	50
SEQ ID 17	(1)	ATCACCTCAAAAACGTGTGATTGGTAAATTCAAGACTGAAAACAATATTAG	
SEQ ID 19	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAAATGACATTAG	
SEQ ID 21	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAAATGACATTAG	
SEQ ID 23	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAAATGACATTAG	
SEQ ID 25	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAAATGACATTAG	
SEQ ID 27	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAAATGACATTAG	
SEQ ID 29	(1)	ATCACCTCGAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAAATGACATTAG	
SEQ ID 31	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAAATGACATTAG	
SEQ ID 33	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAAATGACATTAG	
SEQ ID 35	(1)	ATCACCTCAAAGACTGTGATTAGTAAGTTCAAGACTGAAAAATGACATTAG	
SEQ ID 37	(1)	ATCACCTCAAAAACGTGTGATTGGTAAATTCAAGACTGAAAACAATATTAG	
SEQ ID 39	(1)	ATCACCTCAAAAACGTGTGATTGGTAAATTCAAGACTGAAAAATGACATTAG	
		51	100
SEQ ID 17	(51)	TCATCAGAATGACGACATTCATAAAGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA	
SEQ ID 19	(51)	CCACCAGAACAATGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA	
SEQ ID 21	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA	
SEQ ID 23	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA	
SEQ ID 25	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA	
SEQ ID 27	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA	
SEQ ID 29	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA	
SEQ ID 31	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA	
SEQ ID 33	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA	
SEQ ID 35	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA	
SEQ ID 37	(51)	TCATCAGAATGACGACATTCATAAAGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA	
SEQ ID 39	(51)	CCACCAGAACAACGATATCAATAAGGAATATGAAGAGGTGATGAAACAAA	
		101	150
SEQ ID 17	(101)	TGCGTGACATGAGAGTTCATGTAAGTGCCTATTTAATAGTATACATAAG	
SEQ ID 19	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCAT---ACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA	
SEQ ID 21	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCAT---ACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA	
SEQ ID 23	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCAT---ACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA	
SEQ ID 25	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCAT---ACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA	
SEQ ID 27	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCAT---ACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA	
SEQ ID 29	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCAT---ACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA	
SEQ ID 31	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCAT---ACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA	
SEQ ID 33	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCAT---ACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA	
SEQ ID 35	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCAT---ACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA	
SEQ ID 37	(101)	TGCGTGACATGAGAGTTCATGTAAGTGCCTATTTAATAGTATACATAAG	
SEQ ID 39	(101)	TGCGTGAAATGAGAGTTCAT---ACTGCATTATTTAATAGTATACATAAA	
		151	200
SEQ ID 17	(151)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCGATTCCGAGAGAAAAGAAAGCG	
SEQ ID 19	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATTCGAGAGAAAAGAAAGCG	
SEQ ID 21	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATTCGAGAGAAAAGAAAGCG	
SEQ ID 23	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATTCGAGAGAAAAGAAAGCG	
SEQ ID 25	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATTCGAGAGAAAAGAAAGCG	
SEQ ID 27	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATTCGAGAGAAAAGAAAGCG	
SEQ ID 29	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATTCGAGAGAAAAGAAAGCG	
SEQ ID 31	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATTCGAGAGAAAAGAAAGCG	
SEQ ID 33	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATTCGAGAGAAAAGAAAGCG	
SEQ ID 35	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATTCGAGAGAAAAGAAAGCG	
SEQ ID 37	(151)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCGATTCCGAGAGAAAAGAAAGCG	
SEQ ID 39	(148)	GATAATATGGAGTGGAGAATGAGTGAATCAATTCGAGAGAAAAGAAAGCG	

Figura 9A (1/3)

201 250

SEQ ID 17 (201) TGAATGAAACAAATACGGTCGAGAATGAAGTTAAGAATCACGTAGATG

SEQ ID 19 (198) TGAATGAAATCAAATACAACCGGGAATGAAGTCAAGAATCACACCAATG

SEQ ID 21 (198) TGAATGAAATCAAATGCAACCGGGAATGAAGTCAAGATTCACACCAATG

SEQ ID 23 (198) TGAATGAAATCAAATGCAACCGGGAATGAAGTCAAGATTCACACCAATG

SEQ ID 25 (198) TGAATGAAATCAAATGCAACCGGGAATGAAGTCAAGAATCACACCAATG

SEQ ID 27 (198) TGAATGAAATCAAATGCAACCGGGAATGAAGTCAAGAATCACACGAATG

SEQ ID 29 (198) TGAATGAAATCAAATGCAACCGGGAATGAAGTCAAGAATCACACCAATG

SEQ ID 31 (198) TGAATGAAATCAAATGCAACCGGGAATGAAGTCAAGAATCACACCAATG

SEQ ID 33 (198) TGAATGAAATCAAATGCAACCGGGAATGAAGTCAAGAATCACACCAATG

SEQ ID 35 (198) TGAATGAAATCAAATGCAACCGGGAATGAAGTCAAGATTCACACCAATG

SEQ ID 37 (201) TGAATGAAACAAATACGGTCGAGAATGAAGTTAAGAATCACGTAGATG

SEQ ID 39 (198) TGAATGAAATCAAATGCAACCGGGAATGAAGTCAAGATTCACACCAATG

251 297

SEQ ID 17 (251) ATGTAAATATATGTGGTACGCTCTGGATTAGAGACGGAAGTTTGTCTA

SEQ ID 19 (248) ATGTAAATGTATGTGATACGCTCTGGATTAGAGACGGAAGTTTGTCTA

SEQ ID 21 (248) ATGTAAATGTATGTGATACGCTCTGGATTAGAGACGGAAGTTTGTCTA

SEQ ID 23 (248) ATGTAAATGTATGTGATACGCTCTGGATTAGAGACGGAAGTTTGTCTA

SEQ ID 25 (248) ATGTAAATGTATGTGATACGCTCTGGATTAGAGATGGAGTTTGTCTA

SEQ ID 27 (248) ATGTAAATGTATGTGATACGCTCTGGATTAGAGACGGAAGTTTGTCTA

SEQ ID 29 (248) ATGTAAATGTATGTGATACGCTCTGGATTAGAGACGGAAGTTTGTCTA

SEQ ID 31 (248) ATGTAAATGTATGTGATACGCTCTGGATTAGAGACGGAAGTTTGTCTA

SEQ ID 33 (248) ATGTAAATGTATGTGATACGCTCTGGATTAGAGACGGAAGTTTGTCTA

SEQ ID 35 (248) ATGTAAATGTATGTGATACGCTCTGGATTAGAGACGGAAGTTTGTCTA

SEQ ID 37 (251) ATGTAAATATATGTGATACGCTCTGGATTAGAGACGGAAGTTTGTCTA

SEQ ID 39 (248) ATGTAAATGTATGTGATACGCTCTGGATTAGAGACGGAAGTTTGTCTA

NSP4 Secuen.	SEQ 17	SEQ 19	SEQ 21	SEQ 23	SEQ 25	SEQ 27	SEQ 29	SEQ 31	SEQ 33	SEQ 35	SEQ 37	SEQ 39
SEQ 17		89	88	89	88	89	88	89	89	89	100	90
SEQ 19			99	99	99	99	99	99	99	99	89	98
SEQ 21				100	99	99	99	99	99	100	89	98
SEQ 23					99	99	99	99	99	100	89	99
SEQ 25						99	99	99	99	99	89	98
SEQ 27							99	99	99	99	89	98
SEQ 29								99	99	99	89	98
SEQ 31									100	99	89	98
SEQ 33										99	89	98
SEQ 35											89	99
SEQ 37												90
SEQ 39												

Figura 9A (2/3)

		1		50
SEQ ID 18	(1)	ITSKTVIGKFKTERNISHQNDIHKYEYEEVMKQMRDMPVHVTALFNSIHK		
SEQ ID 20	(1)	ITSKTVISKFKTENDISHQNDINKEYEEVMKQMRMPVHMTALFNSIHK		
SEQ ID 22	(1)	ITSKTVISKFKTENDISHQNDINKEYEEVMKQMRMPVHMTALFNSIHK		
SEQ ID 24	(1)	ITSKTVISKFKTENDISHQNDINKEYEEVMKQMRMPVHMTALFNSIHK		
SEQ ID 26	(1)	ITSKTVISKFKTENDISHQNDINKEYEEVMKQMRMPVHMTALFNSIHK		
SEQ ID 28	(1)	ITSKTVISKFKTENDISHQNDINKEYEEVMKQMRMPVHMTALFNSIHK		
SEQ ID 30	(1)	ITSKTVISKFKTENDISHQNDINKEYEEVMKQMRMPVHMTALFNSIHK		
SEQ ID 32	(1)	ITSKTVISKFKTENDISHQNDINKEYEEVMKQMRMPVHMTALFNSIHK		
SEQ ID 34	(1)	ITSKTVISKFKTENDISHQNDINKEYEEVMKQMRMPVHMTALFNSIHK		
SEQ ID 36	(1)	ITSKTVISKFKTENDISHQNDINKEYEEVMKQMRMPVHMTALFNSIHK		
SEQ ID 38	(1)	ITSKTVIGKFKTENNISHQNDIHKYEYEEVMKQMRDMPVHVTALFNSIHK		
SEQ ID 40	(1)	ITSKTVIGKFKTENDISHQNDINKEYEEVMKQMRMPVHMTALFNSIHK		
		51		99
SEQ ID 18	(51)	DNMEWRMSESIRREKKREMKTNHTVENEVKNHVDVNIICGTSGLETEVCL		
SEQ ID 20	(51)	DNMEWRMSESIRREKKREMKSNHTTGNEVKNIHTNDVIVCDTSGLETEVCL		
SEQ ID 22	(51)	DNMEWRMSESIRREKKREMKSNATGNEVKNIHTNDVIVCDTSGLETEVCL		
SEQ ID 24	(51)	DNMEWRMSESIRREKKREMKSNATGNEVKNIHTNDVIVCDTSGLETEVCL		
SEQ ID 26	(51)	DNMEWRMSESIRREKKREMKSNATGNEVKNIHTNDVIVCDTSGLETEVCL		
SEQ ID 28	(51)	DNMEWRMSESIRREKKREMKSNATGNEVKNIHTNDVIVCDTSGLETEVCL		
SEQ ID 30	(51)	DNMEWRMSESIRREKKREMKSNATGNEVKNIHTNDVIVCDTSGLETEVCL		
SEQ ID 32	(51)	DNMEWRMSESIRREKKREMKSNATGNEVKNIHTNDVIVCDTSGLETEVCL		
SEQ ID 34	(51)	DNMEWRMSESIRREKKREMKSNATGNEVKNIHTNDVIVCDTSGLETEVCL		
SEQ ID 36	(51)	DNMEWRMSESIRREKKREMKSNATGNEVKNIHTNDVIVCDTSGLETEVCL		
SEQ ID 38	(51)	DNMEWRMSESIRREKKREMKTNHTVENEVKNHVDVNIICGTSGLETEVCL		
SEQ ID 40	(51)	DNMEWRMSESIRREKKREMKSNATGNEVKNIHTNDVIVCDTSGLETEVCL		

NSP4 Secuen.	SEQ 18	SEQ 20	SEQ 22	SEQ 24	SEQ 26	SEQ 28	SEQ 30	SEQ 32	SEQ 34	SEQ 36	SEQ 38	SEQ 40
SEQ 18		87	85	85	85	86	86	86	86	85	99	86
SEQ 20			98	98	98	99	99	99	99	98	88	97
SEQ 22				100	98	99	99	99	99	100	86	99
SEQ 24					98	99	99	99	99	100	86	99
SEQ 26						99	99	99	99	98	86	97
SEQ 28							100	100	100	99	87	98
SEQ 30								100	100	99	87	98
SEQ 32									100	99	87	98
SEQ 34										99	87	98
SEQ 36											86	99
SEQ 38												87
SEQ 40												

Figura 9A (3/3)

		1	50
SEQ ID 41	(1)	AGGGCGTCCTCACTTTATCATCAATTAATTCTCAGAATTATTATTCAAC	
SEQ ID 43	(1)	AGGGCGTCCTCACTTTATCAGCAATTAATTTCACAGAATTATTATTCAAC	
SEQ ID 45	(1)	AGGGCGTCCTCACTTTATCAGCAATTAATCTCACAGAATTATTATTCAAC	
SEQ ID 47	(1)	AGGGCGTCCTCACTTTATCAGCAATTAATCTCACAGAATTATTATTCAAC	
SEQ ID 49	(1)	AGGGCGTCCTCACTTTATCAGCAATTAATCTCACAAAATTATTATTCAAC	
		51	100
SEQ ID 41	(51)	TGGGAATGAGATCTTAAAAGATTTACAAACGACTAAAACACTGTTGACT	
SEQ ID 43	(51)	TGGGAATGATATTTTACTGGATCAGCAAAACAAATAACACAACCTGTTGACT	
SEQ ID 45	(51)	TGGGAATGATATTTTACTGGATCAGCAAAACAAATAACACAACCTGTTGACT	
SEQ ID 47	(51)	TGGGAATGATATTTTACTGGATCAGCAAAACAAATAACACAACCTGTTGACT	
SEQ ID 49	(51)	TGGGAATGNTATATTATTGGATCAGCAAAACGAATAAAACAACCTGTTGATT	
		101	150
SEQ ID 41	(101)	ATGTAGATGCTGGGAATTATACATATGCTCAATTGCCGCCAACGAAGTGG	
SEQ ID 43	(101)	ATATAGATATAGGAAATTATTGCTATACACAATTACCGCCGACATCATGG	
SEQ ID 45	(101)	ATATAGATATAGGAAATTACTGCTATACACAATTACCGCCGACATCATGG	
SEQ ID 47	(101)	ATATAGATATAGGAAATTATTGCTATACACAATTACCGCCGACATCATGG	
SEQ ID 49	(101)	ATGTAGATGTGGGAAATTATTGATATACACAATTACCAACCATCATGG	
		151	200
SEQ ID 41	(151)	GGAGCTGGAGCTACCTTCGAATCAGTCTTTAGCGCAGCTGAAATAACAGG	
SEQ ID 43	(151)	GGAGCAGGAATGACTTTTAAGTCTGCATTTAATGCAGAGGAAATTACAGG	
SEQ ID 45	(151)	GGAGCAGGAATGACTTTTAAGTCTGCATTTAATGCAGAGGAAATTACAGG	
SEQ ID 47	(151)	GGAGCAGGAATGACTTTTACGTCTGCATTTAATGCAGAGGAAATTACAGG	
SEQ ID 49	(151)	GGAGCAGGAATGACTTTTAAGTCTGCATTTAATGCAGAAGAAATGACGGG	
		201	250
SEQ ID 41	(201)	ACCGCACACAAATAGAGTTATAGAGTGGAGAAATTACTAAATTCTGACC	
SEQ ID 43	(201)	ACCCAATACAGGT---GATATAGATTTGAATAATTTGACAAATGCGAATG	
SEQ ID 45	(201)	ACCCAATACAGGT---GATATAGATTTGAATAATTTGACAAATGCGAATG	
SEQ ID 47	(201)	ACCCAATACAGGT---GATATAGATTTGAATAATTTGACAAATGCGAATG	
SEQ ID 49	(201)	ACCTAACACAGGT---GATATAGATCTGAGTAATCTCACAACTGCGAATG	
		251	300
SEQ ID 41	(251)	AGTGGTTGCTGTTTCCAAAACCAAGCTGACACAGTTAAATTACTTAAACAT	
SEQ ID 43	(248)	GGTGGATATTGTATGACAAACCAACTGATACAAAACGATTGTTAAACTA	
SEQ ID 45	(248)	GATGGATATTGTATGACAAACCAACTGATACAAAACGATTGTTAAACTA	
SEQ ID 47	(248)	GGTGGATATTGTATGACAAACCAACTGATACAAAACGATTGTTAAACTA	
SEQ ID 49	(248)	GATGGATATTATATGAGAAAGCCGACAATTACCAAACGGTTATTAATACTA	
		301	350
SEQ ID 41	(301)	GGACCTCAAACATATGATAGCACTTTAGCGGCATGTGAATTGTGGTATGG	
SEQ ID 43	(298)	GGACCAGAAAGTTATGACAGTGTGTACGCAGCATTTCGAATTATGGTATGG	
SEQ ID 45	(298)	GGACCAGAAAGTTATGACAGTGTGTACGCAGCATTTCGAATTATGGTATGG	
SEQ ID 47	(298)	GGACCAGAAAGTTATGACAGTGTATACGCAGCATTTCGAATTATGGTATGG	
SEQ ID 49	(298)	GGGCCAGATGTTTACGATAGTGTATGCGGCATTTCGAATTGTGGTATGG	
		351	400
SEQ ID 41	(351)	GAAGGCTAATACTATAGTGACATCAGAACACTATTTCATCATTAAG-----	
SEQ ID 43	(348)	TAAAGCAAATACTGTAGTCACATCAATATACATTTCATCAGTGCAAACT	
SEQ ID 45	(348)	TAAAGCAAATACTGTAGTCACATCAATATACATTTCATCAGTGCAAACT	
SEQ ID 47	(348)	TAAAGCAAATACTGTAGTCACATCAATATACATTTCATCAGTGCAAACT	
SEQ ID 49	(348)	TAAAGCAAATACAGTAGTTACATCAATATATTATGCATCAGCACAAATT	
		401	450
SEQ ID 41	(396)	-TGATAATCAGGTGAATGTAAATGCCGATTCATTAGTATTATTTTGGAAAT	
SEQ ID 43	(398)	CTGAAAACACTGTAAACAGTACACATGACTCATTAGTGTATTCTTTAAT	
SEQ ID 45	(398)	CTGAAAACACTGTAAACAGTACAGCATGACTCATTAGTGTATTCTTTAAT	
SEQ ID 47	(398)	CTGAAAACACTGTAAACAGTACAGCATGACTCATTAGTGTATTCTTTAAT	
SEQ ID 49	(398)	CTGAGAAATACTGTAAACATTACAGTATGACTCATTAGTATTATTTTCAAT	

Figura 9B (1/3)

ES 2 632 429 T3

```

451
SEQ ID 41 (445) GCTGGAGGGACAAACATTCGATAAACAAATAGTTAATTTTGCTTGGGATAT
SEQ ID 43 (448) GTTGGTTTATACTGGTCTAAGCTAAGCAAATAGTTAAATTTAACTGGAATAT
SEQ ID 45 (448) GTTGGTTTATACTGGTCTAAGCTAAGCAAATAGTTAAATTTAACTGGAATAT
SEQ ID 47 (448) GTTGGTTTATACTGGTCTAAGCTAAGCAAATAGTTAAATTTAACTGGAATAT
SEQ ID 49 (448) GTTGGTTTATACTGGTCTAAGCTAAGCAAATAGTTAAATTTAACTGGAATAT
501
SEQ ID 41 (495) GGGTGGAAATCTGATTAAGCCGTCAGTCAACAACCTAGATTAGATATAT
SEQ ID 43 (498) GGGAGGCATATTAGTTAGACCGACTGCTGATGG---TAGAGTGGATATTT
SEQ ID 45 (498) GGGAGGCATATTAGTTAGACCGACTGCTGATGG---TAGAGTGGATATTT
SEQ ID 47 (498) GGGAGGCATATTAGTTAGACCGACTGCTGATGG---TAGAGTGGATATTT
SEQ ID 49 (498) GGGAGGCATATTAGTTAGGCCAAGTCTGATGG---TAGAGTAGATATCT
551
SEQ ID 41 (545) ACATGGCCAAACATGAATAATTTCAATAGTGATAATTTCAATTGGGAAGAG
SEQ ID 43 (545) GTATGGCTGACATGAATGATTTTAATAGTGATAATTTTAATTGGGAATCT
SEQ ID 45 (545) GTATGGCTGACATGAATGATTTTAGTAGTGATAATTTTAATTGGGAATCT
SEQ ID 47 (545) GCATGGCTGACATGAATGATTTTAATAGTGATAATTTTAATTGGGAATCT
SEQ ID 49 (545) GTATGGCAGACATGAATGATTTTAGCAGCGACAATTTTAATTGGGAGAAA
601
SEQ ID 41 (595) TGGCGTTTCACACTACCTCGCAGTAATGCAACAATTAACATATACACTGA
SEQ ID 43 (595) TGGAAACGTAGTTTTCCACGTAGCAAC-----ATTAACATGTACACTGA
SEQ ID 45 (595) TGGAAACGTAGTTTTCCACGTAGCAAC-----ATTAACATGTACACTGA
SEQ ID 47 (595) TGGAAACGTAGTTTTCCACGTAGCAAC-----ATTAACATGTACACTGA
SEQ ID 49 (595) TGGACTCGTAGCTTTCCACGCAGTAAT-----ATTAATATGTATGCTGA
651
SEQ ID 41 (645) TTATTACCTAGCTAGCAGTGATCCATCAATCAGCTGAAAGAATTACAA
SEQ ID 43 (639) ATATTATTTAGCGAATGTTGATCCATATAATCAACTAAAAATATTAAACC
SEQ ID 45 (639) ATATTATTTAGCGAATGTTGATCCATATAATCAACTAAAAATATTAAACC
SEQ ID 47 (639) ATATTATTTAGCGAATGTTGATCCATATAATCAACTAAAAATATTAAACC
SEQ ID 49 (639) ATATTACTTAGCAAATGTTGACCCGTATAGTCAATTAAGGCATTAAATC
701
SEQ ID 41 (695) AGTCAACTATTACCACATTCGAAATGAGAATG---ATGGTG-----
SEQ ID 43 (689) AACTAACTGCAAAAAATGTAGAAATTAGAATG---AAGGCAATTAAG
SEQ ID 45 (689) AACTAACTGCAAAAAATGTAGAAATTAGAATG---AAGGCAATTAAG
SEQ ID 47 (689) AACTAACTGCAAAAAATGTAGAAATTAGAATGATGAAGGCAATTAAG
SEQ ID 49 (689) ANCTCACAACNNAAAATATAGAAATTAGAATG---AAGTCAATTAAG
747

```

VP4 Secuen.	SEQ 41	SEQ 43	SEQ 45	SEQ 47	SEQ 49
SEQ 41		69	69	69	67
SEQ 43			99	99	86
SEQ 45				99	86
SEQ 47					86
SEQ 49					

Figura 9B (2/3)

```

1
50
SEQ ID 42 (1) RASSLYHOLISQNYYSTGNEILKELQTTKTTVDYVDAGNYTYAQLPPTKW
SEQ ID 44 (1) RASSLYOOLISQNYYSTGNDILLDOOTNNNTTVDYIDIGNYSYTQLPPTSW
SEQ ID 46 (1) RASSLYOOLISQNYYSTGNDILLDOOTNNNTTVDYIDIGNYSYTQLPPTSW
SEQ ID 48 (1) RASSLYOOLISQNYYSTGNDILLDOOTNNNTTVDYIDIGNYSYTQLPPTSW
SEQ ID 50 (1) RASSLYOOLISQNYYSTGNXILLDOOTNKTTVDYVDVGNYSYTQLPPTSW
51
100
SEQ ID 42 (51) GAGATFESVFSAAEITGPHTNRVIEWKNELNSDQWLLFPKPADTVKLLKH
SEQ ID 44 (51) GAGMTFKSAFNAAEITGPNTG-DIDLNNLTNANGWILYDKPTDTKRLLKL
SEQ ID 46 (51) GAGMTFKSAFNAAEITGPNTG-DIDLNNLTNANGWILYDKPTDTKRLLKL
SEQ ID 48 (51) GAGMTFTSAFNAAEITGPNTG-DIDLNNLTNANGWILYDKPTDTKRLLKL
SEQ ID 50 (51) GAGMTFKSAFNAAEITGPNTG-DIDLNNLTNANGWILYDKPTDTKRLLKL
101
150
SEQ ID 42 (101) GPQTYDSTLACELWYGKANTIVTSEHYSSLS--DNQVNVNADSLVLEFN
SEQ ID 44 (100) GPESYDSVYAAFELWYGKANTVVTISIYSSVQNSENTVTVQHDSLVLFFN
SEQ ID 46 (100) GPESYDSVYAAFELWYGKANTVVTISIYSSVQNSENTVTVQHDSLVLFFN
SEQ ID 48 (100) GPESYDSVYAAFELWYGKANTVVTISIYSSVQNSENTVTVQHDSLVLFFN
SEQ ID 50 (100) GPDVYDSVYAAFELWYGKANTVVTISIYSSVQNSENTVTVQHDSLVLFFN
151
200
SEQ ID 42 (149) AGGTTTFDQIIVNEFANDMGGILIKPSSQQPRLDIYMANNNHNFNSDNFNWEE
SEQ ID 44 (150) VGYTGLTKQIVKENNNMGGILVRPTADG-RVDICMADMHDFSSDNFNWES
SEQ ID 46 (150) VGYTGLTKQIVKENNNMGGILVRPTTDG-RVDICMADMHDFSSDNFNWES
SEQ ID 48 (150) VGYTGLTKQIVKENNNMGGILVRPTTDG-RVDICMADMHDFSSDNFNWES
SEQ ID 50 (150) VGYTGLTKQIVRFNNDMGGILVRPTADG-RVDICMADMHDFSSDNFNWEEK
201
249
SEQ ID 42 (199) WRFTLPRSNATINIYTDYLLASSDPYNQLKEIQOSTITTFEMRMV---
SEQ ID 44 (199) WKRSFPRS--NINMYTEYYLANVDPYNQLKIENQLTAKNVEIRMMKAIK
SEQ ID 46 (199) WKRSFPRS--NINMYTEYYLANVDPYNQLKIENQLTAKNVEIRMMKAIK
SEQ ID 48 (199) WKRSFPRS--NINMYTEYYLANVDPYNQLKIENQLTAKNVEIRMMKAIK
SEQ ID 50 (199) WTRSFPRS--NINMYAEYYLANVDPYSOLKALNXLTXNIEIRMMKSIX

```

VP4 Secuen.	SEQ 42	SEQ 44	SEQ 46	SEQ 48	SEQ 50
SEQ 42		64	64	64	62
SEQ 44			99	99	88
SEQ 46				99	88
SEQ 48					87
SEQ 50					

Figura 9B (3/3)

		1	50
SEQ ID 51	(1)	GACCTGCTGTTTTCGAATTGCCAAAACCTGTATCTTAACTCAAAACAAAAGT	
SEQ ID 53	(1)	GATGTGCTGTTCTCCATTGCCAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAACAAGT	
SEQ ID 55	(1)	GATGTGCTGTTCTCCATTGCCAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAACAAGT	
SEQ ID 57	(1)	GATGTGCTGTTTTCGAATTGCCAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAACAAGT	
SEQ ID 59	(1)	GATGTGCTGTTTTCGAATTGCCAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAACAAGT	
SEQ ID 61	(1)	GATGTGCTGTTCTGTATTGCCAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAACAAGT	
SEQ ID 63	(1)	GATGTGCTGTTCTCCATTGCCAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAACAAGT	
SEQ ID 65	(1)	GATGTGCTGTTCTCCATTGCCAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAACAAGT	
SEQ ID 67	(1)	GATGTGCTGTTCTCCATTGCCAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAACAAGT	
SEQ ID 69	(1)	GATGTGCTGTTCTCCATTGCCAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAACAAGT	
SEQ ID 71	(1)	GATGTGCTGTTCTCCATTGCCAAGACTGTCTCAGATCTTAAGAACAAGT	
		51	100
SEQ ID 51	(51)	TGTAGTTGTTACTATTTACACTAATTTACAAGCATATAATCCAAACAACCA	
SEQ ID 53	(51)	TGTAGTTGTTACTATTTATACAAATTTACAAGCATATAATCCAAACAGACTA	
SEQ ID 55	(51)	TGTAGTTGTTACTATTTATACAAATTTACAAGCATATAATCCAAACAGACTA	
SEQ ID 57	(51)	TGTAGTTGTTACTATTTACACTAATTTACAAGCATATAATCCAAACAACCA	
SEQ ID 59	(51)	TGTAGTTGTTACTATTTATACAAATTTACAAGCATATAATCCAAACAGACTA	
SEQ ID 61	(51)	TGTAGTTGTTACTATTTATACAAATTTACAAGCATATAATCCAAACAACCA	
SEQ ID 63	(51)	TGTAGTTGTTACTATTTATACAAATTTACAAGCATATAATCCAAACAGACTA	
SEQ ID 65	(51)	TGTAGTTGTTACTATTTATACAAATTTACAAGCATATAATCCAAACAGACTA	
SEQ ID 67	(51)	TGTAGTTGTTACTATTTATACAAATTTACAAGCATATAATCCAAACAGACTA	
SEQ ID 69	(51)	TGTAGTTGTTACTATTTATACAAATTTACAAGCATATAATCCAAACAGACTA	
SEQ ID 71	(51)	TGTAGTTGTTACTATTTATACAAATTTACAAGCATATAATCCAAACAGACTA	
		101	150
SEQ ID 51	(101)	ATCAACTGATTACAACCTTTCGAATGCTAATACTGTTTCATAACAGCTGCTAT	
SEQ ID 53	(101)	ATGAATTGATTACAACCTTTCGAATGCCAACACATTCCTACTTGTGCAAT	
SEQ ID 55	(101)	ATGAATTGATTACAACCTTTCGAATGCCAACACATTCCTACTTGTGCAAT	
SEQ ID 57	(101)	ATGAATTAAATTACAACCTTTCGAATGCCAACACGTTTCATAACAGCTGCTAT	
SEQ ID 59	(101)	ATGAATTGATTACAACCTTTCGAATGCCAACACATTCCTACTTGTGCAAT	
SEQ ID 61	(101)	ATGAATTGATTACAACCTTTCGAATGCCAACACATTCCTACTTGTGCAAT	
SEQ ID 63	(101)	ATGAATTGATTACAACCTTTCGAATGCCAACACATTCCTACTTGTGCAAT	
SEQ ID 65	(101)	ATGAATTGATTACAACCTTTCGAATGCCAACACATTCCTACTTGTGCAAT	
SEQ ID 67	(101)	ATGAATTGATTACAACCTTTCGAATGCCAACACATTCCTACTTGTGCAAT	
SEQ ID 69	(101)	ATGAATTAAATTACAACCTTTCGAATGCCAACACATTCCTACTTGTGCAAT	
SEQ ID 71	(101)	ATGAATTAAATTACAACCTTTCGAATGCCAACACATTCCTACTTGTGCAAT	
		151	200
SEQ ID 51	(151)	GGAAACACAGCCTCAGGAAGACGCGGAATTTTCGAATACCGCAGCTACGTTAC	
SEQ ID 53	(151)	GGAAACACAACCTCAGAAAGCAATGGAATTTTCAACTACCACAGCTACGTTAC	
SEQ ID 55	(151)	GGAAACACAACCTCAGAAAGCAATGGAATTTTCAACTACCACAGCTACGTTAC	
SEQ ID 57	(151)	GGAAAGCAGCCTCAAAAAGCGGAATTTTCGAATACCGCAGCTACGTTAC	
SEQ ID 59	(151)	GGAAACACAACCTCAGAAAGCAATGGAATTTTCAACTACCACAGCTACGTTAC	
SEQ ID 61	(151)	GGAAACACAACCTCAGAAAGCAATGGAATTTTCAACTACCACAGCTACGTTAC	
SEQ ID 63	(151)	GGAAACACAACCTCAGAAAGCAATGGAATTTTCAACTACCACAGCTACGTTAC	
SEQ ID 65	(151)	GGAAACACAACCTCAGAAAGCAATGGAATTTTCAACTACCACAGCTACGTTAC	
SEQ ID 67	(151)	GGAAACACAACCTCAGAAAGCAATGGAATTTTCAACTACCACAGCTACGTTAC	
SEQ ID 69	(151)	GGAAACACAACCTCAGAAAGCAATGGAATTTTCAACTACCACAGCTACGTTAC	
SEQ ID 71	(151)	GGAAACACAACCTCAGAAAGCAATGGAATTTTCAACTACCACAGCTACGTTAC	
		201	250
SEQ ID 51	(201)	GACACTCTTAATTTAGATGACAACTATGTTCAAGCCACTAGAACTGTTA	
SEQ ID 53	(201)	AACACTTTTGAATTTAGATGATAACTATGTTCAAGCAACTAGAACTATCA	
SEQ ID 55	(201)	AACACTTTTGAATTTAGATGATAACTATGTTCAAGCAACTAGAACTATCA	
SEQ ID 57	(201)	AACACTCTTGAATTTAGATGATAACTATGTTCAAGCTACTAGAACTGTTA	
SEQ ID 59	(201)	AACACTTTTGAATTTAGATGATAACTATGTTCAAGCAACTAGAACTATCA	
SEQ ID 61	(201)	AACACTTTTGAATTTAGATGATAACTATGTTCAAGCAACTAGAACTATCA	
SEQ ID 63	(201)	AACACTTTTGAATTTAGATGATAACTATGTTCAAGCAACTAGAACTATCA	
SEQ ID 65	(201)	AACACTTTTGAATTTAGATGATAACTATGTTCAAGCAACTAGAACTATCA	
SEQ ID 67	(201)	AACACTTTTGAATTTAGATGATAACTATGTTCAAGCAACTAGAACTATCA	
SEQ ID 69	(201)	AACACTTTTGAATTTAGATGATAACTATGTTCAAGCAACTAGAACTATCA	
SEQ ID 71	(201)	AACACTTTTGAATTTAGATGATAACTATGTTCAAGCAACTAGAACTATCA	

Figura 9C (1/7)

		251	300
SEQ ID 51	(251)	TTGAT TATTGGGCTTCATTTATAGAATCACTATCTGATCATCAAAATGCTC	
SEQ ID 53	(251)	TCCAT TATTGGGCTTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATGCT	
SEQ ID 55	(251)	TCCAT TATTGGGCTTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATGCT	
SEQ ID 57	(251)	TTGAT TATTGGGCTTCATTTATAGAAGCTATCTGATCATCAAAATGCTC	
SEQ ID 59	(251)	TCCAT TATTGGGCTTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATGCT	
SEQ ID 61	(251)	TCCAT TATTGGGCTTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATGCT	
SEQ ID 63	(251)	TCCAT TATTGGGCTTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATGCT	
SEQ ID 65	(251)	TCCAT TATTGGGCTTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATGCT	
SEQ ID 67	(251)	TCCAT TATTGGGCTTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATGCT	
SEQ ID 69	(251)	TCCAT TATTGGGCTTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATGCT	
SEQ ID 71	(251)	TCCAT TATTGGGCTTCATTTATAGAAGCTGTGTGTGATGACGAAATGCT	
		301	350
SEQ ID 51	(301)	AGAGAACCATCTAGAAGTGAATGCCAGCCACAGTGGGAGGACCTTATAAG	
SEQ ID 53	(301)	AGAGAACGCTCAAGAAATGGAATGCCAAGCTCAATCTCGTGCACCTTATAGC	
SEQ ID 55	(301)	AGAGAACGCTCAAGAAATGGAATGCCAAGCTCAATCTCGTGCACCTTATAGC	
SEQ ID 57	(301)	AGAGAACCATCTAGAAGTGAATGCCAGCCACATCACTGACCTTATAGC	
SEQ ID 59	(301)	AGAGAACGCTCAAGAAATGGAATGCCAAGCTCAATCTCGTGCACCTTATAGC	
SEQ ID 61	(301)	AGAGAACGCTCAAGAAATGGAATGCCAAGCTCAATCTCGTGCACCTTATAGC	
SEQ ID 63	(301)	AGAGAACGCTCAAGAAATGGAATGCCAAGCTCAATCTCGTGCACCTTATAGC	
SEQ ID 65	(301)	AGAGAACGCTCAAGAAATGGAATGCCAAGCTCAATCTCGTGCACCTTATAGC	
SEQ ID 67	(301)	AGAGAACGCTCAAGAAATGGAATGCCAAGCTCAATCTCGTGCACCTTATAGC	
SEQ ID 69	(301)	AGAGAACGCTCAAGAAATGGAATGCCAAGCTCAATCTCGTGCACCTTATAGC	
SEQ ID 71	(301)	AGAGAACGCTCAAGAAATGGAATGCCAAGCTCAATCTCGTGCACCTTATAGC	
		351	400
SEQ ID 51	(351)	GCTGTCATCATCAAAAGTTAAGACTATCAACTTTAATAACAGTTTCAAAAT	
SEQ ID 53	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTTCAAAAT	
SEQ ID 55	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTTCAAAAT	
SEQ ID 57	(351)	GCTGTCATCATCAAAAGTTAAGACTATTAATTTTAAATAACAGTTTCAAAAT	
SEQ ID 59	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTTCAAAAT	
SEQ ID 61	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTTCAAAAT	
SEQ ID 63	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTTCAAAAT	
SEQ ID 65	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTTCAAAAT	
SEQ ID 67	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTTCAAAAT	
SEQ ID 69	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTTCAAAAT	
SEQ ID 71	(351)	GTTATCTTCAGCAAAATTTAAGACTATTAATTTTAACAATAGTTTCAAAAT	
		401	450
SEQ ID 51	(401)	CAATTAAAAATTCGAGTGGCTCAATCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA	
SEQ ID 53	(401)	CCATTAAAGAAATTCGAGTGGCTCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA	
SEQ ID 55	(401)	CCATTAAAGAAATTCGAGTGGCTCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA	
SEQ ID 57	(401)	CTATTAAAAATTCGAGTGGCTCAATCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA	
SEQ ID 59	(401)	CCATTAAAGAAATTCGAGTGGCTCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA	
SEQ ID 61	(401)	CCATTAAAGAAATTCGAGTGGCTCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA	
SEQ ID 63	(401)	CCATTAAAGAAATTCGAGTGGCTCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA	
SEQ ID 65	(401)	CCATTAAAGAAATTCGAGTGGCTCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA	
SEQ ID 67	(401)	CCATTAAAGAAATTCGAGTGGCTCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA	
SEQ ID 69	(401)	CCATTAAAGAAATTCGAGTGGCTCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA	
SEQ ID 71	(401)	CCATTAAAGAAATTCGAGTGGCTCAGTCAAGACGTGAAAATCCAGTGTATGAA	
		451	500
SEQ ID 51	(451)	TACAGAAATCCAAATGATATTCGAATATAGAAATTCATATATTCTTCACGG	
SEQ ID 53	(451)	TATATAAATCCAAATGGGTTTGGTATAGAAATTCATATATTCTTCACGG	
SEQ ID 55	(451)	TATATAAATCCAAATGGGTTTGGTATAGAAATTCATATATTCTTCACGG	
SEQ ID 57	(451)	TACAGAAATCCGATGATATTCGAATATAGAAATTCATATATTCTTCACGG	
SEQ ID 59	(451)	TATATAAATCCAAATGGGTTTGGTATAGAAATTCATATATTCTTCACGG	
SEQ ID 61	(451)	TATATAAATCCAAATGGGTTTGGTATAGAAATTCATATATTCTTCACGG	
SEQ ID 63	(451)	TATATAAATCCAAATGGGTTTGGTATAGAAATTCATATATTCTTCACGG	
SEQ ID 65	(451)	TATATAAATCCAAATGGGTTTGGTATAGAAATTCATATATTCTTCACGG	
SEQ ID 67	(451)	TATATAAATCCAAATGGGTTTGGTATAGAAATTCATATATTCTTCACGG	
SEQ ID 69	(451)	TATATAAATCCAAATGGGTTTGGTATAGAAATTCATATATTCTTCACGG	
SEQ ID 71	(451)	TATATAAATCCAAATGGGTTTGGTATAGAAATTCATATATTCTTCACGG	

Figura 9C (2/7)

		501	550
SEQ ID 51	(501)	TGCTAATCCACAATTTCGAATCGTAATCGGATTGAGCTATTATACAACTG	
SEQ ID 53	(501)	TGCCAATCCACAATATCGGAACGTAATCGGGCTGAGATATTACACAGGCA	
SEQ ID 55	(501)	TGCCAATCCACAATATCGGAACGTAATCGGGCTGAGATATTACACAGGCA	
SEQ ID 57	(501)	CGCTAATCCACAATTTCGAATCTAATCGGGTTGAGCTATTATACAACTA	
SEQ ID 59	(501)	TGCTAATCCACAATATCGGAATGTAATCGGGCTGAGATATTACACAGGGA	
SEQ ID 61	(501)	TGCCAATCCACAATATCGGAACGTCATCGGGCTGAGATATTACACAGGTA	
SEQ ID 63	(501)	TGCCAATCCACAATATCGGAACGTAATCGGGCTGAGATATTACACAGGCA	
SEQ ID 65	(501)	TGCCAATCCACAATATCGGAACGTAATCGGGCTGAGATATTACACAGGCA	
SEQ ID 67	(501)	TGCCAATCCACAATATCGGAATGTAATCGGGCTGAGATATTATACAGGCA	
SEQ ID 69	(501)	TGCCAATCCACAATATCGGAATGTAATCGGGCTGAGATATTACACAGGCA	
SEQ ID 71	(501)	TGCCAATCCACAATATCGGAATGTAATCGGGCTGAGATATTACACAGGCA	
		551	600
SEQ ID 51	(551)	GTAAACCTGTCAAGTTCAGCTTTTTCATTCAACATTTCTGAAAATGCT	
SEQ ID 53	(551)	GCAATGCTGTGAGATTCAGCTTTTTCATTCAACATTTAGCTGAAAATGCT	
SEQ ID 55	(551)	GCAATGCTGTGAGATTCAGCTTTTTCATTCAACATTTAGCTGAAAATGCT	
SEQ ID 57	(551)	GTAAACCTGTCAAAATCCAGCTTTTTCATTCAACATTTCTGAGAATGCT	
SEQ ID 59	(551)	GTAAATGCTGTGAGATTCAGCTTTTTCATTCAACATTTAGCTGAAAATGCC	
SEQ ID 61	(551)	GCAATGCTGTGAGATTCAGCTTTTTCATTCAACATTTAGCTGAAAATGCC	
SEQ ID 63	(551)	GCAATGCTGTGAGATTCAGCTTTTTCATTCAACATTTAGCTGAAAATGCC	
SEQ ID 65	(551)	GCAATGCTGTGAGATTCAGCTTTTTCATTCAACATTTAGCTGAAAATGCC	
SEQ ID 67	(551)	GTAAATGCTGTGAGATTCAGCTTTTTCATTCAACATTTAGCTGAAAATGCC	
SEQ ID 69	(551)	GTAAATGCTGTGAGATTCAGCTTTTTCATTCAACATTTAGCTGAAAATGCC	
SEQ ID 71	(551)	GTAAATGCTGTGAGATTCAGCTTTTTCATTCAACATTTAGCTGAAAATGCC	
		601	650
SEQ ID 51	(601)	CCTAAATAACTCAACGTTTATCTATAATGGAGACTTAAAGAGACCAAC	
SEQ ID 53	(601)	CCTAATGGCACTCAACGTTTATTTATAATGGAAGACTTAAAGACCAAT	
SEQ ID 55	(601)	CCTAATGGCACTCAACGTTTATTTATAATGGAAGACTTAAAGACCAAT	
SEQ ID 57	(601)	CCTAAATAACTCAACGTTTCAATCATAAATGGAAGACTTAAAGACCAAT	
SEQ ID 59	(601)	CCTAATGGTACTCAACGTTTATTTATAATGGAAGACTTAAAGACCAAT	
SEQ ID 61	(601)	CCTAATGGTACTCAACGTTTATTTATAATGGAAGACTTAAAGACCAAT	
SEQ ID 63	(601)	CCTAATGGCACTCAACGTTTATTTATAATGGAAGACTTAAAGACCGAT	
SEQ ID 65	(601)	CCTAATGGCACTCAACGTTTATTTATAATGGAAGACTTAAAGACCAAT	
SEQ ID 67	(601)	CCTAATGGTACTCAACGTTTATTTATAATGGAAGACTTAAAGACCAAT	
SEQ ID 69	(601)	CCTAATGGTACTCAACGTTTATTTATAATGGAAGACTTAAAGACCAAT	
SEQ ID 71	(601)	CCTAATGGTACTCAACGTTTATTTATAATGGAAGACTTAAAGACCAAT	
		651	700
SEQ ID 51	(651)	TTCTAATGCTATGATGAAAATTCAGGCGGCTGCTCAGAACATCAGTATTC	
SEQ ID 53	(651)	TTCTAATGTGTGATGAAAATTCAGGCGGCTGCTCAGAACATCAGTATTC	
SEQ ID 55	(651)	TTCTAATGTGTGATGAAAATTCAGGCGGCTGCTCAGAACATCAGTATTC	
SEQ ID 57	(651)	TTCTAATGTGTGATGAAAATTCAGGCGGCTGCTCAGAACATCAGTATTC	
SEQ ID 59	(651)	TTCTAATGTGTGATGAAAATTCAGGCGGCTGCTCAGAACATCAGTATTC	
SEQ ID 61	(651)	TTCTAATGTGTGATGAAAATTCAGGCGGCTGCTCAGAACATCAGTATTC	
SEQ ID 63	(651)	TTCTAATGTGTGATGAAAATTCAGGCGGCTGCTCAGAACATCAGTATTC	
SEQ ID 65	(651)	TTCTAATGTGTGATGAAAATTCAGGCGGCTGCTCAGAACATCAGTATTC	
SEQ ID 67	(651)	TTCTAATGTGTGATGAAAATTCAGGCGGCTGCTCAGAACATCAGTATTC	
SEQ ID 69	(651)	TTCTAATGTATGATGAAAATTCAGGCGGCTGCTCAGAACATCAGTATTC	
SEQ ID 71	(651)	TTCTAATGTATGATGAAAATTCAGGCGGCTGCTCAGAACATCAGTATTC	
		701	750
SEQ ID 51	(701)	CAACACTTTTGGCTGATCTGGCAAAATCAACAACATGGCTATTTAATCCA	
SEQ ID 53	(701)	CAACAACTACTACCTGATCCAGCAAAATCAGACAACATGGCTATTTAATCCA	
SEQ ID 55	(701)	CAACAACTACTACCTGATCCAGCAAAATCAGACAACATGGCTATTTAATCCA	
SEQ ID 57	(701)	CAACACTCCTACCTGATCCGACAAATCAACAACATGGCTATTTAATCCA	
SEQ ID 59	(701)	CAACAACTACTACCTGATCCAGCAAAATCAGACAACATGGCTATTTAATCCA	
SEQ ID 61	(701)	CAACAACTACTACCTGATCCAGCAAAATCAGACAACATGGCTATTTAATCCA	
SEQ ID 63	(701)	CAACAACTACTACCTGATCCAGCAAAATCAGACAACATGGCTGTTTAAATCCA	
SEQ ID 65	(701)	CAACAACTACTACCTGATCCAGCAAAATCAGACAACATGGCTATTTAATCCA	
SEQ ID 67	(701)	TAACAACTACTACCTGATCCAGCAAAATCAGACAACATGGCTATTTAATCCA	
SEQ ID 69	(701)	CAACAACTACTACCTGATCCAGCAAAATCAGACAACATGGCTATTTAATCCA	
SEQ ID 71	(701)	CAACAACTACTACCTGATCCAGCAAAATCAGACAACATGGCTATTTAATCCA	

Figura 9C (3/7)

		751	800
SEQ ID 51	(751)	GTGCACTAATGAATGGAACATTCTCTATTGAATTTTATAACAATGGACA	
SEQ ID 53	(751)	GTGCACTAATGAATGGAACATTTACTATTGAGTTTATAATAATGGCCA	
SEQ ID 55	(751)	GTGCACTAATGAATGGAACATTTACTATTGAGTTTATAATAATGGCCA	
SEQ ID 57	(751)	GTACAGCTAATGAATGGAACATTTACTATTGAGTTTATAATAATGGACA	
SEQ ID 59	(751)	GTACAGCTAATGAATGGAACATTTACTATTGAGTTTATAATAATGGCCA	
SEQ ID 61	(751)	GTACAGCTAATGAATGGAACATTTACTATTGAGTTTATAATAATGGCCA	
SEQ ID 63	(751)	GTGCACTAATGAATGGAACATTTACTATTGAGTTTATAATAATGGCCA	
SEQ ID 65	(751)	GTGCACTAATGAATGGAACATTTACTATTGAGTTTATAATAATGGCCA	
SEQ ID 67	(751)	GTACAGCTAATGAATGGAACATTTACTATTGAGTTTATAATAATGGCCA	
SEQ ID 69	(751)	GTACAGCTAATGAATGGAACATTTACTATTGAGTTTATAATAATGGCCA	
SEQ ID 71	(751)	GTACAGCTAATGAATGGAACATTTACTATTGAGTTTATAATAATGGCCA	
		801	850
SEQ ID 51	(801)	ACTAGTTGATATGATTAGAAATATGGGACTAGTTACTGTTAGAACTTTTG	
SEQ ID 53	(801)	GTTAGTTGATTTGATTAGAAATATGGGACTAGTTACTGTTAGAACTTTTG	
SEQ ID 55	(801)	GTTAGTTGATTTGATTAGAAATATGGGACTAGTTACTGTTAGAACTTTTG	
SEQ ID 57	(801)	ATTAGTTGATATGATTAGAAATATGGGACTAGTTACTGTTAGAACTTTTG	
SEQ ID 59	(801)	GTTAGTTGATTTGATTAGAAATATGGGACTAGTTACTGTTAGAACTTTTG	
SEQ ID 61	(801)	GTTAGTTGATTTGATTAGAAATATGGGACTAGTTACTGTTAGAACTTTTG	
SEQ ID 63	(801)	GTTAGTTGATTTGATTAGAAATATGGGACTAGTTACTGTTAGAACTTTTG	
SEQ ID 65	(801)	GTTAGTTGATTTGATTAGAAATATGGGACTAGTTACTGTTAGAACTTTTG	
SEQ ID 67	(801)	GTTAGTTGATTTGATTAGAAATATGGGACTAGTTACTGTTAGAACTTTTG	
SEQ ID 69	(801)	GTTAGTTGATTTGATTAGAAATATGGGACTAGTTACTGTTAGAACTTTTG	
SEQ ID 71	(801)	GTTAGTTGATTTGATTAGAAATATGGGACTAGTTACTGTTAGAACTTTTG	
		851	900
SEQ ID 51	(851)	ATTETTTACAGCAATTAACATCGATGTGATTAGACCAGCAGCTATGCACAA	
SEQ ID 53	(851)	ATAAGTACAGCAATTAACATCGATGTGATTAGACCAGCAGCTATGCACAG	
SEQ ID 55	(851)	ATAAGTACAGCAATTAACATCGATGTGATTAGACCAGCAGCTATGCACAG	
SEQ ID 57	(851)	ATTETTTACAGCAATTAACATCGATGTGATTAGACCAGCAGCTATGCACAA	
SEQ ID 59	(851)	ATAAGTACAGCAATTAACATCGATGTGATTAGACCAGCAGCTATGCACAG	
SEQ ID 61	(851)	ATAAGTACAGCAATTAACATCGATGTGATTAGACCAGCAGCTATGCACAG	
SEQ ID 63	(851)	ATAAGTACAGCAATTAACATCGATGTGATTAGACCAGCAGCTATGCACAG	
SEQ ID 65	(851)	ATAAGTACAGCAATTAACATCGATGTGATTAGACCAGCAGCTATGCACAG	
SEQ ID 67	(851)	ATAAGTACAGCAATTAACATCGATGTGATTAGACCAGCAGCTATGCACAG	
SEQ ID 69	(851)	ATAAGTACAGCAATTAACATCGATGTGATTAGACCAGCAGCTATGCACAG	
SEQ ID 71	(851)	ATAAGTACAGCAATTAACATCGATGTGATTAGACCAGCAGCTATGCACAG	
		901	950
SEQ ID 51	(901)	TACTTTACAGCAACATTCCTGGCAAGTTGGTCTTATCCATACCAAGCTGG	
SEQ ID 53	(901)	TATCTACAAAGACTGTTTCCACAGGGTGGCCCATATCAACATCAAGCCCG	
SEQ ID 55	(901)	TATCTACAAAGACTGTTTCCACAGGGTGGCCCATATCAACATCAAGCCCG	
SEQ ID 57	(901)	TACTTTACAGCAACATTCCTGGCAAGTTGGTCTTATCCATACCAAGCTGG	
SEQ ID 59	(901)	TATCTACAAAGACTGTTTCCACAGGGTGGCCCATATCAACATCAAGCCCG	
SEQ ID 61	(901)	TATCTACAAAGACTGTTTCCACAGGGTGGCCCATATCAACATCAAGCCCG	
SEQ ID 63	(901)	TATCTACAAAGACTGTTTCCACAGGGTGGCCCATATCAACATCAAGCCCG	
SEQ ID 65	(901)	TATCTACAAAGACTGTTTCCACAGGGTGGCCCATATCAACATCAAGCCCG	
SEQ ID 67	(901)	TATCTACAAAGACTGTTTCCACAGGGTGGCCCATATCAACATCAAGCCCG	
SEQ ID 69	(901)	TATCTACAAAGACTGTTTCCACAGGGTGGCCCATATCAACATCAAGCCCG	
SEQ ID 71	(901)	TATCTACAAAGACTGTTTCCACAGGGTGGCCCATATCAACATCAAGCCCG	
		951	1000
SEQ ID 51	(951)	ATACATGTTGACGGTCACTGTATTAGATGGGACCAACGCAATCTGTCCAT	
SEQ ID 53	(951)	ATATATGATAAATCTTACTATATTTGGATGCCACAACACAATCAGTCAAGT	
SEQ ID 55	(951)	ATATATGATAAATCTTACTATATTTGGATGCCACAACACAATCAGTCAAGT	
SEQ ID 57	(951)	ATACATGTTGACACTCACTGTATTAGATGGTACAACACAATCTGTCCAT	
SEQ ID 59	(951)	ATATATGATAAATCTTACTATATTTGGATGCCACAACACAATCAGTCAAGT	
SEQ ID 61	(951)	ATATATGATAAATCTTACTATATTTGGATGCCACAACACAATCAGTCAAGT	
SEQ ID 63	(951)	ATATATGATAAATCTTACTATATTTGGATGCCACAACACAATCAGTCAAGT	
SEQ ID 65	(951)	ATATATGATAAATCTTACTATATTTGGATGCCACAACACAATCAGTCAAGT	
SEQ ID 67	(951)	ATATATGATAAATCTTACTATATTTGGATGCCACAACACAATCAGTCAAGT	
SEQ ID 69	(951)	ATATATGATAAATCTTACTATATTTGGATGCCACAACACAATCAGTCAAGT	
SEQ ID 71	(951)	ATATATGATAAATCTTACTATATTTGGATGCCACAACACAATCAGTCAAGT	

Figura 9C (4/7)

1001 1050

SEQ ID 51 (1001) GCGATTACACTCTGTGCAATTATTCAATTGTTGCAGACGTTAGAAGAGAG

SEQ ID 53 (1001) GTCATTACATTTCAGTAGATTATTCAATCGTCGCAATGTTCAGAGAGAG

SEQ ID 55 (1001) GTCATTACATTTCAGTAGATTATTCAATCGTCGCAATGTTCAGAGAGAG

SEQ ID 57 (1001) GCGATTACACTCTGTGCAATTATTCAATTGTTGCAGACGTTAGAAGAGAG

SEQ ID 59 (1001) GTCATTACATTTCAGTAGATTATTCAATCGTCGCAATGTTCAGAGAGAG

SEQ ID 61 (1001) GTCATTACATTTCAGTAGATTATTCAATCGTCGCAATGTTCAGAGAGAG

SEQ ID 63 (1001) GTCATTACATTTCAGTAGATTATTCAATCGTCGCAATGTTCAGAGAGAG

SEQ ID 65 (1001) GTCATTACATTTCAGTAGATTATTCAATCGTCGCAATGTTCAGAGAGAG

SEQ ID 67 (1001) GTCATTACATTTCAGTAGATTATTCAATCGTCGCAATGTTCAGAGAGAG

SEQ ID 69 (1001) GTCATTACATTTCAGTAGATTATTCAATCGTCGCAATGTTCAGAGAGAG

SEQ ID 71 (1001) GTCATTACATTTCAGTAGATTATTCAATCGTCGCAATGTTCAGAGAGAG

1051 1100

SEQ ID 51 (1051) TCAGCAATGCCAGCTGGAACAGTATTTCAACCAGGCTTTCCATGGCAACA

SEQ ID 53 (1051) TCAGCAATGCCAGCTGGAACAGTATTTCAACCAGGCTTTCCATGGCAACA

SEQ ID 55 (1051) TCAGCAATGCCAGCTGGAACAGTATTTCAACCAGGCTTTCCATGGCAACA

SEQ ID 57 (1051) TCAGCAATGCCAGCTGGAACAGTATTTCAACCAGGCTTTCCATGGCAACA

SEQ ID 59 (1051) TCAGCAATGCCAGCTGGAACAGTATTTCAACCAGGCTTTCCATGGCAACA

SEQ ID 61 (1051) TCAGCAATGCCAGCTGGAACAGTATTTCAACCAGGCTTTCCATGGCAACA

SEQ ID 63 (1051) TCAGCAATGCCAGCTGGAACAGTATTTCAACCAGGCTTTCCATGGCAACA

SEQ ID 65 (1051) TCAGCAATGCCAGCTGGAACAGTATTTCAACCAGGCTTTCCATGGCAACA

SEQ ID 67 (1051) TCAGCAATGCCAGCTGGAACAGTATTTCAACCAGGCTTTCCATGGCAACA

SEQ ID 69 (1051) TCAGCAATGCCAGCTGGAACAGTATTTCAACCAGGCTTTCCATGGCAACA

SEQ ID 71 (1051) TCAGCAATGCCAGCTGGAACAGTATTTCAACCAGGCTTTCCATGGCAACA

1101 1150

SEQ ID 51 (1101) CACATTATCCAACACTACACTGTTTCTCAGCAGGATAATTTAGAAAGACTTT

SEQ ID 53 (1101) CACATTATCCAACACTACACTGTTTCTCAGCAGGATAATTTAGAAAGACTTT

SEQ ID 55 (1101) CACATTATCCAACACTACACTGTTTCTCAGCAGGATAATTTAGAAAGACTTT

SEQ ID 57 (1101) CACATTATCCAACACTACACTGTTTCTCAGCAGGATAATTTAGAAAGACTTT

SEQ ID 59 (1101) CACATTATCCAACACTACACTGTTTCTCAGCAGGATAATTTAGAAAGACTTT

SEQ ID 61 (1101) CACATTATCCAACACTACACTGTTTCTCAGCAGGATAATTTAGAAAGACTTT

SEQ ID 63 (1101) CACATTATCCAACACTACACTGTTTCTCAGCAGGATAATTTAGAAAGACTTT

SEQ ID 65 (1101) CACATTATCCAACACTACACTGTTTCTCAGCAGGATAATTTAGAAAGACTTT

SEQ ID 67 (1101) CACATTATCCAACACTACACTGTTTCTCAGCAGGATAATTTAGAAAGACTTT

SEQ ID 69 (1101) CACATTATCCAACACTACACTGTTTCTCAGCAGGATAATTTAGAAAGACTTT

SEQ ID 71 (1101) CACATTATCCAACACTACACTGTTTCTCAGCAGGATAATTTAGAAAGACTTT

1151 1182

SEQ ID 51 (1151) TACTAGTTGCGTCTGTGAACAGAAATGGTCATG

SEQ ID 53 (1151) TGTTAGTTGCGTCTGTGAACAGAAATGGTCATG

SEQ ID 55 (1151) TGTTAGTTGCGTCTGTGAACAGAAATGGTCATG

SEQ ID 57 (1151) TACTAGTTGCGTCTGTGAACAGAAATGGTCATG

SEQ ID 59 (1151) TGTTAGTTGCGTCTGTGAACAGAAATGGTCATG

SEQ ID 61 (1151) TGTTAGTTGCGTCTGTGAACAGAAATGGTCATG

SEQ ID 63 (1151) TGTTAGTTGCGTCTGTGAACAGAAATGGTCATG

SEQ ID 65 (1151) TGTTAGTTGCGTCTGTGAACAGAAATGGTCATG

SEQ ID 67 (1151) TGTTAGTTGCGTCTGTGAACAGAAATGGTCATG

SEQ ID 69 (1151) TGTTAGTTGCGTCTGTGAACAGAAATGGTCATG

SEQ ID 71 (1151) TGTTAGTTGCGTCTGTGAACAGAAATGGTCATG

	SEQ 51	SEQ 53	SEQ 55	SEQ 57	SEQ 59	SEQ 61	SEQ 63	SEQ 65	SEQ 67	SEQ 69	SEQ 71
SEQ 51		86	86	92	86	85	85	85	86	86	86
SEQ 53			100	87	99	99	100	100	99	99	99
SEQ 55				87	99	99	100	100	99	99	99
SEQ 57					87	86	86	86	87	87	87
SEQ 59						99	98	99	99	99	99
SEQ 61							98	99	98	98	98
SEQ 63								100	99	99	99
SEQ 65									99	99	99
SEQ 67										99	99
SEQ 69											100
SEQ 71											

Figura 9C (5/7)

		1	50
SEQ ID 52	(1)	DVLFSIAKTVDLKKKVVVGTYITNVEDIIOQTNELIATLNGNTTFHTGGI	
SEQ ID 54	(1)	DVLFSIAKTVDLKKKVVVGTYITNVEDIIOQTNELIATLNGNTTFHTGGI	
SEQ ID 56	(1)	DVLFSIAKTVDLKKKVVVGTYITNVEDIIOQTNELIATLNGNTTFHTGGI	
SEQ ID 58	(1)	DVLFSIAKTVDLKKKVVVGTYITNVEDIIOQTNELIATLNGNTTFHTGGI	
SEQ ID 60	(1)	DVLFSIAKTVDLKKKVVVGTYITNVEDIIOQTNELIATLNGNTTFHTGGI	
SEQ ID 62	(1)	DVLFSIAKTVDLKKKVVVGTYITNVEDIIOQTNELIATLNGNTTFHTGGI	
SEQ ID 64	(1)	DVLFSIAKTVDLKKKVVVGTYITNVEDIIOQTNELIATLNGNTTFHTGGI	
SEQ ID 66	(1)	DVLFSIAKTVDLKKKVVVGTYITNVEDIIOQTNELIATLNGNTTFHTGGI	
SEQ ID 68	(1)	DVLFSIAKTVDLKKKVVVGTYITNVEDIIOQTNELIATLNGNTTFHTGGI	
SEQ ID 70	(1)	DVLFSIAKTVDLKKKVVVGTYITNVEDIIOQTNELIATLNGNTTFHTGGI	
SEQ ID 72	(1)	DVLFSIAKTVDLKKKVVVGTYITNVEDIIOQTNELIATLNGNTTFHTGGI	
		51	100
SEQ ID 52	(51)	GTQPKKWNFQLPQLGTTLLNLDNYVQATRSVIDYLASFIEAVCDDEIV	
SEQ ID 54	(51)	GTQPKKWNFQLPQLGTTLLNLDNYVQATRSIIDYLASFIEAVCDDEIV	
SEQ ID 56	(51)	GTQPKKWNFQLPQLGTTLLNLDNYVQATRSIIDYLASFIEAVCDDEIV	
SEQ ID 58	(51)	GTQPKKWNFQLPQLGTTLLNLDNYVQATRSVIDYLASFIEAVCDDEIV	
SEQ ID 60	(51)	GTQPKKWNFQLPQLGTTLLNLDNYVQATRSIIDYLASFIEAVCDDEIV	
SEQ ID 62	(51)	GTQPKKWNFQLPQLGTTLLNLDNYVQATRSIIDYLASFIEAVCDDEIV	
SEQ ID 64	(51)	GTQPKKWNFQLPQLGTTLLNLDNYVQATRSIIDYLASFIEAVCDDEIV	
SEQ ID 66	(51)	GTQPKKWNFQLPQLGTTLLNLDNYVQATRSIIDYLASFIEAVCDDEIV	
SEQ ID 68	(51)	GTQPKKWNFQLPQLGTTLLNLDNYVQATRSIIDYLASFIEAVCDDEIV	
SEQ ID 70	(51)	GTQPKKWNFQLPQLGTTLLNLDNYVQATRSIIDYLASFIEAVCDDEIV	
SEQ ID 72	(51)	GTQPKKWNFQLPQLGTTLLNLDNYVQATRSIIDYLASFIEAVCDDEIV	
		101	150
SEQ ID 52	(101)	REASRNCMPQSPALIALSSAKPKTINFNNSSQSIKNWSAQSRRENPVYE	
SEQ ID 54	(101)	REASRNCMPQSPALIALSSAKPKTINFNNSSQSIKNWSAQSRRENPVYE	
SEQ ID 56	(101)	REASRNCMPQSPALIALSSAKPKTINFNNSSQSIKNWSAQSRRENPVYE	
SEQ ID 58	(101)	REASRNCMPQSPALIALSSAKPKTINFNNSSQSIKNWSAQSRRENPVYE	
SEQ ID 60	(101)	REASRNCMPQSPALIALSSAKPKTINFNNSSQSIKNWSAQSRRENPVYE	
SEQ ID 62	(101)	REASRNCMPQSPALIALSSAKPKTINFNNSSQSIKNWSAQSRRENPVYE	
SEQ ID 64	(101)	REASRNCMPQSPALIALSSAKPKTINFNNSSQSIKNWSAQSRRENPVYE	
SEQ ID 66	(101)	REASRNCMPQSPALIALSSAKPKTINFNNSSQSIKNWSAQSRRENPVYE	
SEQ ID 68	(101)	REASRNCMPQSPALIALSSAKPKTINFNNSSQSIKNWSAQSRRENPVYE	
SEQ ID 70	(101)	REASRNCMPQSPALIALSSAKPKTINFNNSSQSIKNWSAQSRRENPVYE	
SEQ ID 72	(101)	REASRNCMPQSPALIALSSAKPKTINFNNSSQSIKNWSAQSRRENPVYE	
		151	200
SEQ ID 52	(151)	YKNPMVEFYRNSYILQRANAYGNVMGLRYYTASNACQIAAFDSTLAENA	
SEQ ID 54	(151)	YKNPMVEFYRNSYILQRANAYGNVMGLRYYTASNACQIAAFDSTLAENA	
SEQ ID 56	(151)	YKNPMVEFYRNSYILQRANAYGNVMGLRYYTASNACQIAAFDSTLAENA	
SEQ ID 58	(151)	YKNPMVEFYRNSYILQRANAYGNVMGLRYYTASNACQIAAFDSTLAENA	
SEQ ID 60	(151)	YKNPMVEFYRNSYILQRANAYGNVMGLRYYTASNACQIAAFDSTLAENA	
SEQ ID 62	(151)	YKNPMVEFYRNSYILQRANAYGNVMGLRYYTASNACQIAAFDSTLAENA	
SEQ ID 64	(151)	YKNPMVEFYRNSYILQRANAYGNVMGLRYYTASNACQIAAFDSTLAENA	
SEQ ID 66	(151)	YKNPMVEFYRNSYILQRANAYGNVMGLRYYTASNACQIAAFDSTLAENA	
SEQ ID 68	(151)	YKNPMVEFYRNSYILQRANAYGNVMGLRYYTASNACQIAAFDSTLAENA	
SEQ ID 70	(151)	YKNPMVEFYRNSYILQRANAYGNVMGLRYYTASNACQIAAFDSTLAENA	
SEQ ID 72	(151)	YKNPMVEFYRNSYILQRANAYGNVMGLRYYTASNACQIAAFDSTLAENA	
		201	250
SEQ ID 52	(201)	ENGTORFIYNGRLKRPISNVLKIEAGAPNISNPILPDANQTTWLFNE	
SEQ ID 54	(201)	ENGTORFIYNGRLKRPISNVLKIEAGAPNISNPILPDANQTTWLFNE	
SEQ ID 56	(201)	ENGTORFIYNGRLKRPISNVLKIEAGAPNISNPILPDANQTTWLFNE	
SEQ ID 58	(201)	ENGTORFIYNGRLKRPISNVLKIEAGAPNISNPILPDANQTTWLFNE	
SEQ ID 60	(201)	ENGTORFIYNGRLKRPISNVLKIEAGAPNISNPILPDANQTTWLFNE	
SEQ ID 62	(201)	ENGTORFIYNGRLKRPISNVLKIEAGAPNISNPILPDANQTTWLFNE	
SEQ ID 64	(201)	ENGTORFIYNGRLKRPISNVLKIEAGAPNISNPILPDANQTTWLFNE	
SEQ ID 66	(201)	ENGTORFIYNGRLKRPISNVLKIEAGAPNISNPILPDANQTTWLFNE	
SEQ ID 68	(201)	ENGTORFIYNGRLKRPISNVLKIEAGAPNISNPILPDANQTTWLFNE	
SEQ ID 70	(201)	ENGTORFIYNGRLKRPISNVLKIEAGAPNISNPILPDANQTTWLFNE	
SEQ ID 72	(201)	ENGTORFIYNGRLKRPISNVLKIEAGAPNISNPILPDANQTTWLFNE	

Figura 9C (6/7)

251 300

SEQ ID 52 (251) VQVMNGTETIEFYNNQGLVBLIRNMGVTVRTFESYRITIDMIRPAAMTQ

SEQ ID 54 (251) VQIMNGTETIEFYNNQGLVBLIRNMGVTVRTFETIYRITIDMIRPATMTQ

SEQ ID 56 (251) VQIMNGTETIEFYNNQGLVBLIRNMGVTVRTFETIYRITIDMIRPAAMTQ

SEQ ID 58 (251) VQVMNGTETIEFYNNQGLVBLIRNMGVTVRTFESYRITIDMIRPAAMTQ

SEQ ID 60 (251) VQIMNGTETIEFYNNQGLVBLIRNMGVTVRTFETIYRITIDMIRPAAMTQ

SEQ ID 62 (251) VQIMNGTETIEFYNNQGLVBLIRNMGVTVRTFETIYRITIDMIRPAAMTQ

SEQ ID 64 (251) VQIMNGTETIEFYNNQGLVBLIRNMGVTVRTFETIYRITIDMIRPATMTQ

SEQ ID 66 (251) VQIMNGTETIEFYNNQGLVBLIRNMGVTVRTFETIYRITIDMIRPATMTQ

SEQ ID 68 (251) VQIMNGTETIEFYNNQGLVBLIRNMGVTVRTFETIYRITIDMIRPAAMTQ

SEQ ID 70 (251) VQIMNGTETIEFYNNQGLVBLIRNMGVTVRTFETIYRITIDMIRPAAMTQ

SEQ ID 72 (251) VQIMNGTETIEFYNNQGLVBLIRNMGVTVRTFETIYRITIDMIRPAAMTQ

301 350

SEQ ID 52 (301) YVQRTFFQGGPYPYCAAYMLTISVLDATEESVLCDSHSVDYSIVANVRRO

SEQ ID 54 (301) YVQRLFPQGGPYQHCAAYMITLSILDATEESVMCDSHSVDDYSIVANVRRO

SEQ ID 56 (301) YVQRLFPQGGPYQHCAAYMITLSILDATEESVMCDSHSVDDYSIVANVRRO

SEQ ID 58 (301) YVQRTFFQGGPYPYCAAYMLTISVLDATEESVLCDSHSVDYSIVANVRRO

SEQ ID 60 (301) YVQRLFPQGGPYQHCAAYMITLSILDATEESVMCDSHSVDDYSIVANVRRO

SEQ ID 62 (301) YVQRLFPQGGPYQHCAAYMITLSILDATEESVMCDSHSVDDYSIVANVRRO

SEQ ID 64 (301) YVQRLFPQGGPYQHCAAYMITLSILDATEESVMCDSHSVDDYSIVANVRRO

SEQ ID 66 (301) YVQRLFPQGGPYQHCAAYMITLSILDATEESVMCDSHSVDDYSIVANVRRO

SEQ ID 68 (301) YVQRLFPQGGPYQHCAAYMITLSILDATEESVMCDSHSVDDYSIVANVRRO

SEQ ID 70 (301) YVQRLFPQGGPYQHCAAYMITLSILDATEESVMCDSHSVDDYSIVANVRRO

SEQ ID 72 (301) YVQRLFPQGGPYQHCAAYMITLSILDATEESVMCDSHSVDDYSIVANVRRO

351 394

SEQ ID 52 (351) SAMPAGTVFPQGFPPWECILSNYTVAGEDNLERLLLVASVKRMVM

SEQ ID 54 (351) SAMPAGTVFPQGFPPWECILSNYTVAGEDNLERLLLVASVKRMVM

SEQ ID 56 (351) SAMPAGTVFPQGFPPWECILSNYTVAGEDNLERLLLVASVKRMVM

SEQ ID 58 (351) SAMPAGTVFPQGFPPWECILSNYTVAGEDNLERLLLVASVKRMVM

SEQ ID 60 (351) SAMPAGTVFPQGFPPWECILSNYTVAGEDNLERLLLVASVKRMVM

SEQ ID 62 (351) SAMPAGTVFPQGFPPWECILSNYTVAGEDNLERLLLVASVKRMVM

SEQ ID 64 (351) SAMPAGTVFPQGFPPWECILSNYTVAGEDNLERLLLVASVKRMVM

SEQ ID 66 (351) SAMPAGTVFPQGFPPWECILSNYTVAGEDNLERLLLVASVKRMVM

SEQ ID 68 (351) SAMPAGTVFPQGFPPWECILSNYTVAGEDNLERLLLVASVKRMVM

SEQ ID 70 (351) SAMPAGTVFPQGFPPWECILSNYTVAGEDNLERLLLVASVKRMVM

SEQ ID 72 (351) SAMPAGTVFPQGFPPWECILSNYTVAGEDNLERLLLVASVKRMVM

	SEQ 52	SEQ 54	SEQ 56	SEQ 58	SEQ 60	SEQ 62	SEQ 64	SEQ 66	SEQ 68	SEQ 70	SEQ 72
SEQ 52		91	91	96	91	91	91	91	91	91	91
SEQ 54			100	93	100	99	100	100	99	100	100
SEQ 56				93	100	99	100	100	100	100	100
SEQ 58					93	93	93	93	93	93	93
SEQ 60						99	100	100	100	100	100
SEQ 62							99	99	99	99	99
SEQ 64								100	99	100	100
SEQ 66									99	100	100
SEQ 68										100	100
SEQ 70											100
SEQ 72											

Figura 9C (7/7)

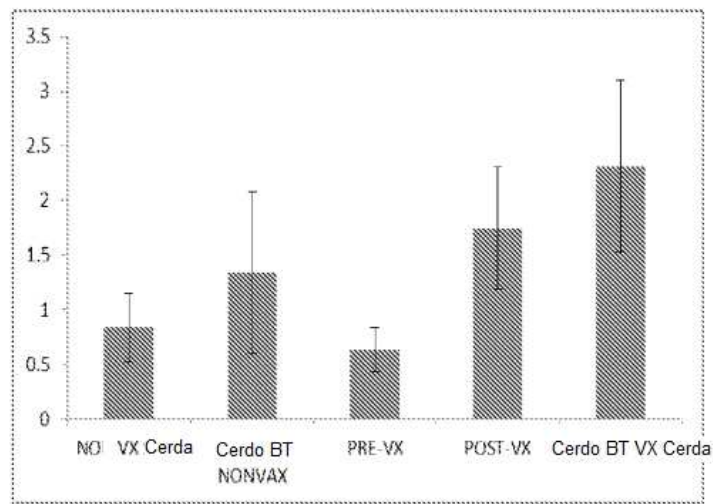


Figura 10

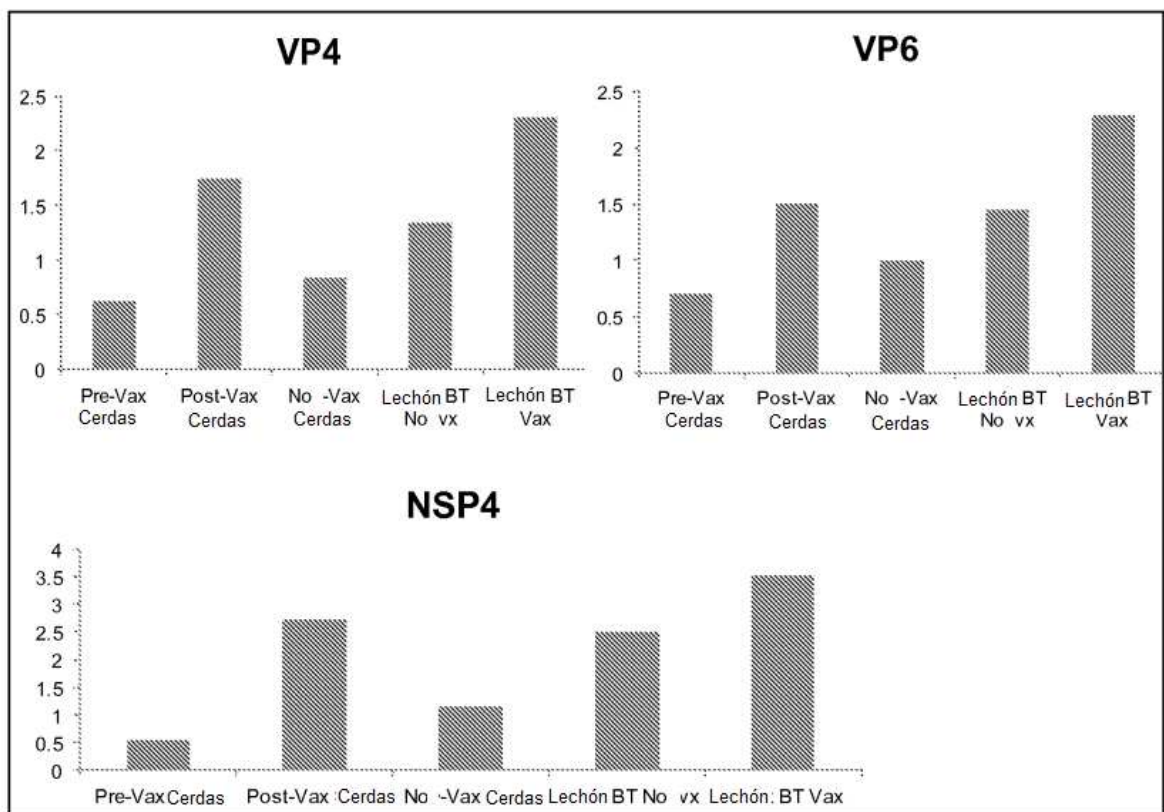


Figura 11

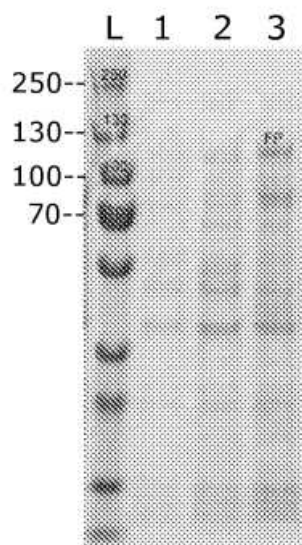


Figura 12

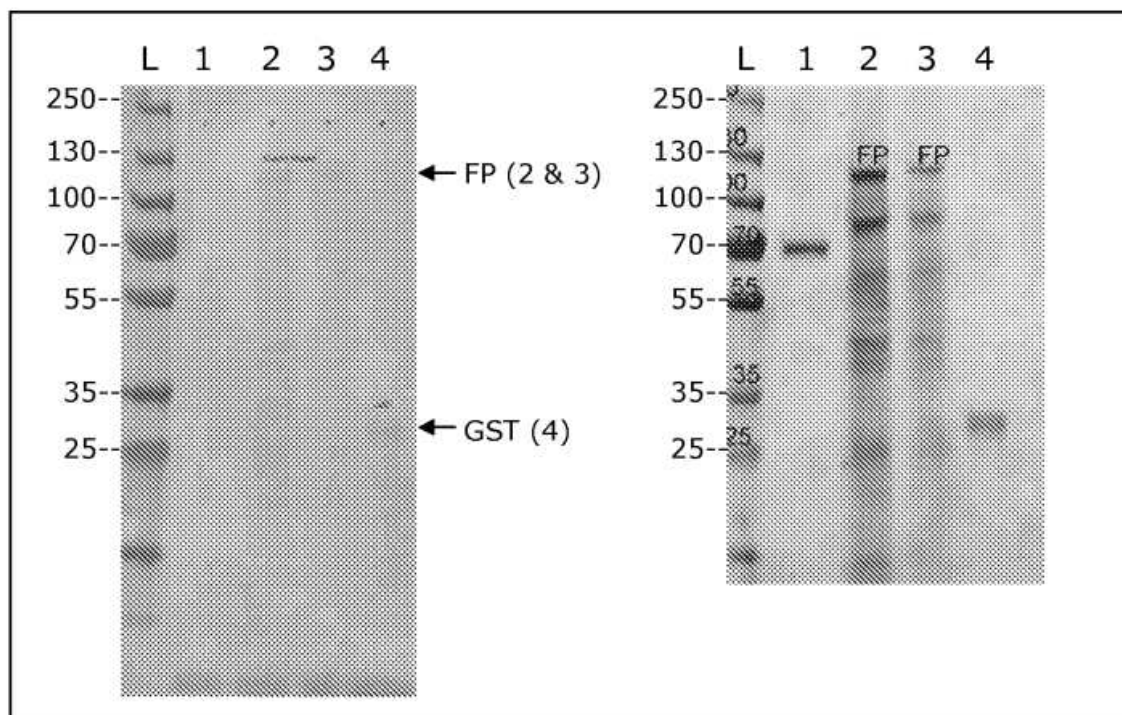


Figura 13