

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 352 946**

21 Número de solicitud: 200801129

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

A01K 39/02 (2006.01)

C07K 14/29 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **16.04.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **24.02.2011**

Fecha de la concesión: **11.01.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **23.01.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
23.01.2012

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (Titular al 50%)**

SERRANO, 117

28006 MADRID, ES y

UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA

(Titular al 50%)

72 Inventor/es:

FUENTE GARCÍA, JOSÉ DE LA y

CANALES GARCÍA-MENOCAL, MARIO MANUEL

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **SISTEMA PARA LA EXPRESIÓN DE PÉPTIDOS SOBRE LA SUPERFICIE BACTERIANA.**

57 Resumen:

Sistema de expresión de péptidos sobre la superficie bacteriana caracterizado porque se utiliza como región de anclaje a la membrana la secuencia conservada de la proteína MSP1a de Anaplasma marginale.

ES 2 352 946 B1

DESCRIPCIÓN

Sistema para la expresión de péptidos sobre la superficie bacteriana.

5 La presente invención se encuentra dentro de los sectores biotecnológico, bioquímico, y químico-farmacéutico. El objeto de la invención es un método para exponer polipéptidos recombinantes expresados sobre la superficie bacteriana. Podrá ser aplicado en investigaciones básicas o aplicadas en biología molecular, bioquímica, biotecnología o en la producción de proteínas recombinantes para diversos fines.

10 **Estado de la técnica anterior**

La tecnología que permite la expresión de una proteína o péptido, uniéndola a la superficie celular, por ejemplo de microorganismos como bacterias o levaduras, tiene numerosas aplicaciones dependiendo del tipo de proteína expresada en la superficie, y por tanto, un enorme interés industrial.

15 Por eso, el interés por exponer proteínas o péptidos sobre la superficie de bacterias vivas ha ido en aumento en áreas de investigación bioquímica, de biología molecular y biotecnología. La exposición de proteínas heterólogas empleando motivos de anclaje a membrana de proteínas como los LamB, OmpA, PhoE, TraT, OprF, OprI, FHA, INP, fimbrias, y AIDA-I y el sistema de auto-exposición han servido ya para expresar antígenos y enzimas. La proteína que se desea exponer tiene que ser fusionada con la proteína o proteínas de anclaje, que son a menudo proteínas de la superficie celular o fragmentos de éstas (“*carrier proteins*”), mediante una fusión N-terminal, una fusión C-terminal, o una fusión sándwich. Las características de la proteína de anclaje, la proteína expuesta y el método de fusión afecta la eficiencia de la expresión en la superficie de proteínas.

25 La expresión de proteínas en superficie tiene múltiples aplicaciones, incluyendo:

- a. el desarrollo de vacunas vivas, al exponer epítomos heterólogos de comensales humanos o células bacterianas patogénicas atenuadas para elicitación de anticuerpos antígeno-específicos,
- 30 b. la búsqueda de librerías de péptidos por unión secuencial y elusión o, más eficientemente por clasificación celular por fluorescencia (*Fluorescence-activated cell-sorting*, FACS),
- c. producción de anticuerpos expresando antígenos de superficie para obtener anticuerpos policlonales en animales,
- 35 d. bioadsorventes para eliminar compuestos químicos perjudiciales y metales pesados,
- e. biocatálisis por inmovilización de enzimas,
- 40 f. desarrollo de biosensores por anclaje de enzimas, receptores u otros componentes sensibles a señales para el diagnóstico, propósitos industriales o medioambientales,
- g. detección de cambios de aminoácidos en péptidos diana tras mutagénesis al azar.

45 *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) es un patógeno transmitido por garrapatas que causa la anaplasmosis bovina, una enfermedad que ocasiona pérdidas económicas importantes en la producción ganadera. La proteína MSP1a (por sus siglas del inglés *Major Surface Protein 1a*) es una de las cinco proteínas principales de superficie conocidas de *A. marginale* y está involucrada en la adhesión del patógeno a los hospedadores y en las interacciones del patógeno con las garrapatas. Esta proteína ha evolucionado bajo una presión selectiva positiva y su tamaño molecular es diferente entre cepas de distintas áreas geográficas. Las variaciones se deben a que una secuencia de 23 a 31 aminoácidos consecutivos se repite distinto número de veces, en el extremo N-terminal, de la región que la proteína expone sobre la superficie bacteriana.

55 Se ha demostrado que MSP1a permite a la bacteria adherirse a los eritrocitos bovinos y a las células de garrapatas. El dominio de adhesión de la proteína ha sido identificado precisamente en la región variable del extremo N-terminal que contiene los péptidos repetidos. La MSP1a también está involucrada en la transmisión de *A. marginale* por las garrapatas del género *Dermacentor spp.* y los péptidos repetidos del extremo N-terminal, que poseen epítomos celulares B, podrían estar involucrados en la respuesta protectora del ganado frente a las infecciones por *A. marginale*.

60 La garrapata *Boophilus microplus* (recientemente reclasificada como *Rhipicephalus microplus*) afecta considerablemente al ganado bovino de las regiones tropicales y subtropicales del planeta. El antígeno BM86, codificado por el gen Bm86, es una glicoproteína aislada de las células intestinales de *R. microplus* que ha sido utilizada en una vacuna contra las infestaciones por estas garrapatas. Un gen homólogo al Bm86, el Bm95, fue aislado también de una cepa de *R. microplus* (Cepa A) y su proteína codificante, la BM95, mostró capacidad protectora frente a un mayor número de cepas de garrapatas de diferentes regiones geográficas. Los primeros experimentos realizados por los inventores, caracterizaron la presencia de péptidos inmunogénicos en la proteína BM86. Posteriormente se demostró que estos péptidos eran los responsables de inducir la respuesta protectora del ganado vacunado frente a las infestaciones por garrapatas.

En la presente invención se demuestra que una proteína recombinante, compuesta por los péptidos inmunogénicos de BM95 fusionados con la región N-terminal de la proteína MSP1a de *A. marginale*, se expone sobre la superficie de células vivas de *E. coli* y es reconocida por anticuerpos anti-BM86 y anti-MSP1a. Este sistema aporta un modelo novedoso de exposición de proteínas heterólogas sobre células vivas de bacterias y además sugiere la posibilidad de emplear bacterias recombinantes en estudios de inmunización del ganado frente a infestaciones de garrapatas.

Para el éxito de la expresión de la proteína en la superficie celular, el motivo de anclaje es el elemento más importante. Constituye el núcleo de esta tecnología la elección de un motivo capaz de expresar una proteína o péptido heterólogo en la superficie celular de forma efectiva. Una proteína de anclaje adecuada debe poseer los siguientes cuatro requerimientos: debe tener un transportador que permita a la proteína de fusión prematura pasar a través de la membrana interna; debe tener una fuerte estructura de anclaje para sostener las proteínas de fusión en la superficie celular; debe ser compatible con las secuencias externas a ser insertadas o fusionadas, y por último, debe ser resistente al ataque de las proteasas presentes en el medio o espacio periplásmico.

Los sistemas de expresión conocidos hasta el momento presentan desventajas, siendo la fundamental la limitación para la presentación en membrana de polipéptidos con diferente número y composición de aminoácidos, uno de los aspectos principales que aborda el objeto de la presente invención.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere al empleo de una porción de la proteína MSP1a de *A. marginale* para dirigir la exposición de otros péptidos sobre la superficie celular, mediante su fusión N-terminal con esta proteína. Teniendo en cuenta el rango de tamaño natural de los péptidos repetidos en la región N-terminal de MSP1a (28-289 amino ácidos) y los ejemplos de realización expuestos en esta memoria, una ventaja de usar la proteína MSP1a en lugar de otros motivos de anclaje de proteínas de membrana para exponer péptidos sobre la superficie celular, es la posibilidad de exponer polipéptidos de diferentes tamaños y composición de aminoácidos.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema de expresión de péptidos sobre la superficie bacteriana, de aquí en adelante sistema de expresión de la invención, caracterizado porque comprende una región de anclaje a la membrana bacteriana y el péptido expuesto, donde se utiliza como región de anclaje a la membrana bacteriana cualquiera de las siguientes secuencias:

a. Péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

b. Una secuencia aminoacídica con una identidad de al menos 99%, 98%, 95%, 90%, o un 80% con la SEQ ID NO: 1.

De aquí en adelante, por “secuencia aminoacídica de la invención” se entiende la secuencia de aminoácidos de la porción de la proteína MSP1a de *Anaplasma marginale*, o una proteína con una identidad de, al menos, el 80%, y más preferiblemente el 90%, el 95%, el 98%, y aún más preferiblemente el 99% con dicha porción de la proteína MSP1a, recogida en la SEQ ID NO: 1. Y se entenderá por “péptido expuesto” la secuencia de aminoácidos que se quiere expresar sobre la superficie bacteriana, y que está unida o fusionada a la secuencia aminoacídica de la invención.

El término “péptido”, tal como se usa en la presente invención, incluye tanto la proteína de longitud completa, como las secuencias de polipéptidos y péptidos más cortas.

El término “polinucleótido” o “secuencia polinucleotídica”, como aquí se usa, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, bien ribonucleótidos o bien desoxirribonucleótidos. Este término sólo se refiere a la estructura primaria de la molécula. Así, este término incluye ADN de cadena doble o sencilla, al igual que ARN de cadena doble o sencilla. También incluye todos los tipos de modificaciones conocidas (marcadores conocidos en la técnica, metilación, remates, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleótidas como, por ejemplo, aquellas con uniones sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, triésteres de fósforo, amidatos de fósforo, carbamatos, etc.) y con uniones cargadas (por ejemplo, tioatos de fósforo, ditioatos de fósforo, etc.), aquellos que contienen mitades colgantes, como, por ejemplo, proteínas (incluyendo por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con uniones modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anómicos, etc.), al igual que formas no modificadas del polinucleótido. Por “secuencia polinucleotídica de la invención” se entiende la secuencia polinucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica de la invención, y que puede ser, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la bacteria en cuya superficie se expresa el péptido de interés es *Escherichia coli* (*E. coli*). *Escherichia coli* (*E. coli*), una bacteria gram negativa, anaerobia facultativa y no esporulada, con un genoma de aproximadamente 4,6 kb, es quizá el organismo procarionta más estudiado por el hombre. Algunas cepas de esta bacteria son enormemente versátiles en laboratorio, tolerando muy bien la manipulación genética e incluso perdiendo su capacidad patogénica, por lo que se emplea como “organismo modelo” para el estudio de las estructuras, los mecanismos genéticos y fisiológicos y su extrapolación a gran número de microorganismos, incluida la célula eucariota.

En otra realización de este aspecto de la invención, el péptido expuesto no es MSP1.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una construcción genética, de aquí en adelante construcción genética de la invención, que dirigirá la transcripción *in vitro* o intracelular de las secuencias polinucleotídicas del sistema de expresión de la invención, y comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias:

- a. secuencia de nucleótidos, preferentemente de doble cadena, que codifica la secuencia aminoacídica del sistema de expresión de la invención, o
- b. moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c. moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d. secuencia de nucleótidos de a), b), ó c), preferentemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc...

Este método incluye los vectores de clonación y expresión que comprenden las moléculas de ácidos nucleicos del sistema de expresión de la invención. Tales vectores de expresión incluyen secuencias de control adecuadas, tales como, por ejemplo, elementos de control de la traducción (como códigos de iniciación y de parada) y de la transcripción (por ejemplo, regiones de promotor-operador, sitios de unión). Los vectores conforme a la invención pueden incluir plásmidos y virus (comprendiendo bacteriófagos y virus eucarióticos), de acuerdo con procedimientos bien conocidos y documentados en la técnica, y pueden expresarse en una variedad de sistemas de expresión diferentes, asimismo bien conocidos y documentados en la técnica. Los vectores virales adecuados incluyen, baculovirus y también adenovirus y virus vacunales. Muchos otros vectores virales y no virales están descritos y son conocidos en la técnica.

Se conoce, así mismo, una variedad de técnicas que pueden utilizarse para introducir tales vectores en células procarióticas o eucarióticas para su expresión. Técnicas adecuadas de transformación o transfección están bien descritas en la bibliografía.

Las células hospedadoras eucarióticas o procarióticas transformadas o transfectadas, que contienen una molécula de ácido nucleico conforme a la invención, como se definió anteriormente, también forman parte de este aspecto de la invención.

Dado que las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del sistema de expresión de la invención son afines en cuanto a su evolución, puede esperarse que la identidad global de los genomas al nivel de los aminoácidos, obtenidos de distintas cepas, poblaciones y/o individuos de *Anaplasma marginale*, y más concretamente a nivel de la secuencia aminoacídica que se recoge en la SEQ ID NO: 1, sea de un 80% o mayor, y más preferiblemente de un 90% o mayor y más preferiblemente de un 95, un 98 o un 99% o mayor. La correspondencia entre la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1 y la secuencia perteneciente a otro individuo u organismo se puede determinar por métodos conocidos en la técnica.

Múltiples de estos sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook *et al.*, 1989) y forman parte de la presente invención.

En una realización particular de este aspecto de la invención, la construcción genética de la invención está incluida en un plásmido.

Los péptidos expuestos también pueden prepararse por expresión en una célula hospedadora que contiene una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que se transcribe a los péptidos, unida operativamente a una secuencia de control de la expresión, o un vehículo o vector de clonación de ADN recombinante que contiene tal molécula de ADN recombinante. Alternativamente, los péptidos pueden expresarse por inyección directa de una simple molécula de ADN en una célula hospedadora.

En otro aspecto de la invención se proporciona un método para elaborar el sistema de expresión de la invención, que comprende los siguientes pasos:

- a. Introducir la construcción genética de la invención, o un plásmido de la invención, en una célula hospedante.
- b. Incubar la célula hospedante según a. en un medio de reacción adecuado.

En una realización particular de este aspecto de la invención, la célula hospedante es *E. coli*.

En otro aspecto de la invención se proporciona un péptido recombinante, de ahora en adelante péptido recombinante de la invención, obtenible u obtenido a partir del sistema de expresión de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el péptido recombinante se obtiene a partir de la lisis de la célula hospedante que comprende el sistema de expresión de la invención, y su posterior purificación.

Los péptidos expuestos, pueden ser, por ejemplo pero sin limitarnos a ellos, péptidos antigénicos que actúan como vacunas para proteger contra futuras infecciones o para potenciar la respuesta inmune contra la infección en sujetos o animales ya infectados.

Como se ha comentado anteriormente, una posible ventaja de usar la proteína MSP1a sobre lo descrito anteriormente acerca de emplear motivos de anclaje de proteínas de membrana para exponer proteínas sobre la superficie bacteriana, si se tiene en cuenta el rango de tamaño natural de los péptidos repetidos de MSP1a (de 28 a 289 aminoácidos) y los resultados reportados en esta memoria, es la posibilidad de expresar y exponer sobre la superficie de las bacterias, péptidos de diferentes tamaños y composiciones.

Los péptidos expresados pueden presentar secuencias antigénicas protectoras.

La expresión “antígeno protector”, tal como se usa en la presente invención, define aquellos antígenos capaces de generar una respuesta inmune (inmunogénica) protectora del hospedador, es decir, una respuesta del hospedador, que conduce a la generación de moléculas efectoras inmunes, anticuerpos o células que esterilizan o reducen la tasa de reproducción del organismo invasor o lo dañan, inhiben o matan, “protegiendo” así al hospedador de una enfermedad clínica o subclínica y de una pérdida de productividad. Tal respuesta inmune protectora puede manifestarse comúnmente por la generación de anticuerpos que son capaces de inhibir la función metabólica del organismo invasor, conduciendo a un impedimento de su crecimiento normal, falta de reproducción y/o muerte.

El polipéptido así expresado puede ser un polipéptido de fusión que comprende una porción que despliega la inmunogenicidad, y un péptido adicional codificado por el ADN de la molécula recombinante fusionado a él, y que se traduce a la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1.

Los péptidos expuestos se pueden, por tanto, usar como inmunógeno. Estos inmunógenos pueden también ser usados como vacunas en animales, y más particularmente en mamíferos, incluyendo humanos, o producir una respuesta en la producción de anticuerpos en animales. Para ello, una cantidad efectiva inmunológicamente de al menos uno de estos péptidos recombinantes es administrado a mamíferos incluyendo humanos.

Un método alternativo de la producción de vacunas es el uso de técnicas de biología molecular para producir una proteína de fusión que contiene una o varias de las secuencias aminoacídicas de la presente invención y un péptido o proteína altamente inmunogénico/a, frente a una determinada infección o infestación.

Otro aspecto de la invención se refiere al sistema de expresión de la invención, la construcción genética de la invención, el plásmido de la invención o el péptido recombinante de la invención, para su uso como medicamento. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medicamento es una vacuna.

En otra realización preferida de la invención, la proteína fusionada o el péptido recombinante es BM95-MSP1. El péptido BM95 podría ser utilizado para inducir respuesta inmune protectora contra las infestaciones por garrapatas *Rhipicephalus microplus*, en el ganado bovino.

El sistema de expresión, objeto de esta realización preferida de la invención, consta de un vector plasmídico con sistema de replicación para *E. coli* y marcador de selección mediante resistencia a antibiótico, preferiblemente ampicilina. En este vector se inserta un promotor eficiente en *E. coli*, como los derivados del operón lactosa (*lac*) y triptofano (*trp*). Frente al promotor se inserta el gen codificante para un mutante de MSP1a que carece de seis aminoácidos que preceden a los péptidos repetidos y los propios péptidos repetidos, pero que contiene los diez aminoácidos anteriores a la primera región transmembranal de la proteína comenzando con un codón de iniciación ATG. Finalmente se insertan los sitios de restricción XhoI y EcoRI para el clonaje de polipéptidos en fase con MSP1 a para la expresión expuesta sobre la membrana de *E. coli*. (Fig. 1). El sistema constituye un sistema novedoso de expresión de polipéptidos expuestos sobre células vivas de *E. coli* para diverso uso.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias aminoacídicas que se comparan.

Un “vector” es un replicón al que se ha unido otro segmento polinucleótido, para realizar la replicación y/o expresión del segmento unido.

Un “replicón” es cualquier elemento genético que se comporta como una unidad autónoma de replicación polinucleótida dentro de una célula; esto es, capaz de replicarse bajo su propio control.

“Secuencia de control” se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias codificadoras a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión ribosomal, y señales de terminación; en eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores y, en ocasiones, silenciadores. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

“Unidos de forma operativa” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a una secuencia codificadora está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Un “marco de lectura libre” (ORF) es una región de una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido; esta región puede representar una porción de una secuencia codificadora o una secuencia codificadora completa.

Una “secuencia codificadora” es una secuencia de polinucleótidos que se transcribe a ARNm y/o se traduce a un polipéptido cuando está bajo control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificadora se determinan mediante un codón de inicio de traducción en el extremo 5’ y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3’. Una secuencia codificadora puede incluir, pero no se limita a ARNm, ADNc, y secuencias de polinucleótidos recombinantes.

Tal y como se usa en esta memoria, el término “transfección” se refiere a la introducción o transferencia de una molécula de ácido nucleico exógena en una célula eucariota, incluyendo, pero no limitándose a ella, una molécula de ácido ribonucleico o desoxirribonucleico (por ejemplo, ARN ó ADN desnudo).

El término “plásmido” se refiere a fragmento circular de ADN bicatenario, que se encuentra en el interior de casi todas las bacterias, y que actúan y se replican de forma independiente al ADN cromosómico bacteriano y pueden transferirse de unas bacterias a otras. Se utilizan como vectores en manipulación genética.

En el contexto de la presente invención el término “vacuna” se refiere a una preparación antigénica empleada para establecer la respuesta del sistema inmune a una enfermedad. Son preparados de antígenos que una vez dentro del organismo provocan la respuesta del sistema inmunitario, mediante la producción de anticuerpos, y generan memoria inmunológica produciendo inmunidad permanente o transitoria.

El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere, también, al sistema de expresión de la invención, la construcción genética de la invención, el plásmido de la invención o el péptido recombinante de la invención, capaz de generar una respuesta inmune frente a un organismo dado, que está causando dicha enfermedad en el hombre o los animales. Incluye, por tanto, lo que se conoce como vacuna, tal y como se ha definido previamente en esta memoria.

El término “antígeno” en esta memoria se refiere a una molécula (generalmente una proteína o un polisacárido) de superficie celular, que puede inducir la formación de anticuerpos. Hay muchos tipos de moléculas diferentes que pueden actuar de antígenos, como las proteínas o péptidos, los polisacáridos y, más raramente, otras moléculas como los ácidos nucleicos.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de péptidos o construcciones genéticas que permitan su expresión calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos péptidos, secuencias y construcciones y el efecto terapéutico a conseguir. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia. Las composiciones proporcionadas por esta invención puede ser facilitada por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Construcción del vector de expresión de la proteína fusionada BM95-MSP1a (A). Representación esquemática del procedimiento usado para sintetizar la quimera BM95 y fusionarla a la mutante de MSP1a de *A. marginale*, que carece de las secuencias repetidas en el extremo N-terminal, en el plásmido pAFOR1 (SEQ ID NO: 9) para generar la proteína fusionada en el vector de expresión pMBXAF3 (SEQ ID NO: 10). (B) Predicción de la secuencia (SEQ ID NO: 11) y estructura de la proteína fusionada MSP1a-BM95 expuesta sobre la membrana de *E. coli*. Las secuencias

de la quimera bm95/BM95, msp1a/MSP1a y del plásmido se muestran en rojo, naranja y negro respectivamente. Se muestra la posición de los aminoácidos (aa) de BM95 incluidos en la quimera.

Figura 2. Expresión de las proteínas recombinantes MSP1a, MSP1b y de la proteína fusionada BM95-MSP1a en *E. coli*. Las cepas de *E. coli* transformadas y la cepa control se indujeron con IPTG y se cultivaron durante 3.5 horas para la expresión de las proteínas recombinantes MSP1a, MSP1b y BM95-MSP1a fusionada (flechas). El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie y como marcador de peso molecular en la electroforesis se usó el ColorBurst (Sigma, Aldrich).

Figura 3. Cinética de expresión de la proteína fusionada BM95-MSP1a en *E. coli*. (A) Las cepas fueron transformadas con el vector pMBXAF3, cultivadas en el fermentador e inducidas con IPTG para la expresión de la proteína fusionada BM95-MSP1a (flecha). Se tomaron muestras equivalentes a 10 μ g de proteínas totales a diferentes tiempos después de la inducción con IPTG y se corrieron en un gel de policacrilamida al 10%. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie y como control se incluyó una cepa *E. coli* transformada sólo con el vector e inducida en las mismas condiciones. El marcador ColorBurst (Sigma, Aldrich) se usó como patrón de pesos moleculares en el gel de electroforesis. (B) El crecimiento celular se monitoreó midiendo la densidad óptica ($OD_{600\text{ nm}}$) del cultivo durante la fermentación. La concentración de proteínas se determinó mediante el sistema de electroforesis automatizado Experion (Bio-Rad, Hércules, CA, USA) y la concentración de las proteínas de interés se expresó como porcentaje de las proteínas totales (línea roja). El momento de inducción con IPTG se indica en la figura.

Figura 4. Localización de la proteína recombinante BM95-MSP1a en la fracción de proteínas insolubles asociadas a las membranas de *E. coli*. Muestras equivalentes a 10 μ g de proteínas totales de *E. coli* transformadas sólo con el vector (C-) ó con los vectores de expresión de MSP1a o BM95-MSP1a (C+), después de 3.5 h. de inducción, se cargaron en cada pocillo de un gel de poli(acrilamida) al 10%. Las células de *E. coli* que expresaron las proteínas recombinantes MSP1a y BM95-MSP1a fueron lisadas por sonicación y las fracciones de proteínas solubles e insolubles asociadas a membranas se separaron por centrifugación. 5 μ g de proteínas totales de la fracción insoluble (P) fueron cargados en los pocillos del gel. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie y como marcador de pesos moleculares en la electroforesis se usó el patrón ColorBurst (Sigma, Aldrich). La posición de las proteínas recombinantes se indica con flechas.

Figura 5. Exposición de la proteína fusionada BM95-MSP1a sobre la superficie de *E. coli*. En la inmunofluorescencia de células vivas de las cepas de *E. coli* transformadas que expresaron las proteínas MSP1a (A-E), MSP1b (F-J) y la proteína fusionada BM95-MSP1a (K-O) estas reaccionaron con el anticuerpo primario o el suero pre-inmune (B, G, L), MSP1a (C, H, M), BM86 (D, I, N) y BM95-MSP1a (E, J, O), seguido por una reacción secundaria con un anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de conejo marcado con peroxidasa (Aumento 1000X).

Figura 6. Reconocimiento de la proteína fusionada BM95-MSP1a por anticuerpos anti-BM86. Muestras equivalentes a 10 μ g de proteínas totales de *E. coli*, después de 3.5 h de inducción con IPTG para expresar las proteínas recombinantes MSP1a o BM95-MSP1a, se cargaron en cada pocillo, en un gel de poli(acrilamida) al 10%. Como control positivo se usaron 6 μ g de la proteína recombinante BM86. Para el análisis de Western-blot, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, expuestas a anticuerpos de conejo contra BM86 y reveladas con el conjugado anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano. La posición de la proteína fusionada y de la BM86 se indica con flechas. En la electroforesis de proteínas se usó como marcadores de peso molecular: β -galactosidasa: 125 kDa; fosforilasa: 101 kDa y albúmina sérica bovina: 56.2 kDa (BioRad, Richmond, CA, USA).

Ejemplos de realización de la invención

Ejemplo 1

50 Construcción del vector de expresión de la proteína fusionada a MSP1a

El plásmido pAF0R1 se construyó para expresar una proteína mutante de MSP1a que no contiene las secuencias repetidas de aminoácidos. El gen msp1 α que proviene del clon per1, del aislado Oklahoma se amplificó mediante PCR. Este gen codifica para una mutante MSP1a que carece de seis aminoácidos antes de las secuencias repetidas; pero que contiene los 10 aminoácidos anteriores a la primera región transmembranal de la proteína. Los primeros introdujeron un codón de iniciación ATG y los sitios de restricción EcoRI y BglII para la clonación en fase de la secuencia que codifica para el polipéptido recombinante, todo en un vector para la expresión en *E. coli*.

La proteína quimera de Bm95 se construyó mediante una PCR para resultar en un gen codificante de manera que la proteína tuviera los tres péptidos inmunogénicos (SEQ ID NO: 3) que corresponden a las secuencias de aminoácidos 21 a 35; 132 a 147 y 397 a 410 de BM95 respectivamente (SEQ ID NO: 4) (Figs. 1A y 1B).

Primero se sintetizaron dos oligonucleótidos, el Bmtin5 (SEQ ID NO: 5) y el Bmtin3 (SEQ ID NO: 6) y se hibridaron en la región central de solapamiento (región de solapamiento $T_m=92^\circ\text{C}$) (Fig. 1A). Posteriormente se realizó una reacción de PCR con los oligonucleótidos B5 (SEQ ID NO: 7) y B3 (SEQ ID NO: 8) para amplificar la quimera de Bm95 e introducir un codón de iniciación ATG y los sitios para las enzimas de restricción XhoI y EcoRI para la clonación en el vector pAF0R1 (Fig. 1A).

La reacción de PCR se realizó usando 10 pmol de cada primer en un volumen final de 50 μ l (1.5 mM MgSO₄, 1 X tampón RT/*Thermus flavus* (Tfl) del virus de la mieloblastosis aviaria (AMV), 0.2 mM de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTP), 5 unidades de AMV RT, y 5 unidades de Tfl ADN polimerasa) empleando el sistema RT-PCR Access (Promega, Madison; WI, EU). Las reacciones tuvieron lugar en un termociclador automático Techne (modelo TC-512, Cambridge, Inglaterra) durante 35 ciclos. Después de un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, cada ciclo consistió de una etapa de desnaturalización a 94°C durante de 30 segundos y una etapa de anillamiento/extensión de 1 min a 68°C. Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se comparó el tamaño de los fragmentos amplificados con un patrón de bandas (1 Kb Plus DNA Ladder, Promega). El producto de PCR (amplicón) se purificó en columnas de resina (Wizard, Promega), y fue digerido con las enzimas XhoI y EcoRI para clonarlo en el vector pAFOR1 y generar el vector pMBXAF3 para la expresión de la proteína fusionada BM95-MSP1a (Fig. 1A).

La proteína MSP1a contiene péptidos repetidos en la región N-terminal que se exponen sobre la superficie de *A. marginale* y que están involucrados en la interacción del patógeno con los receptores de las células hospedadoras. El tamaño de las regiones repetidas de MSP1a varía entre 28 y 289 aminoácidos. Estas regiones también se exponen sobre la superficie de la bacteria cuando la proteína recombinante es expresada en *E. coli*.

El plásmido pAFOR1 codificante para una mutante de MSP1a que carece de 6 aminoácidos antes de las secuencias repetidas; pero que contiene 10 aminoácidos antes de la primera región transmembranal de la proteína putativa se usó como vector para la expresión de los péptidos de BM95 expuestos sobre la superficie de *E. coli*. La quimera BM95 expresada en este estudio presentó 29 aminoácidos (Fig. 1B), lo que la sitúa dentro del rango de tallas de las secuencias repetidas de MSP1a. Adicionalmente, el promotor tac del vector pAROR1, que es altamente inducible, permitió altos niveles de expresión de las proteínas recombinantes MSP1a nativa, MSP1a mutante y MSP1b.

Ejemplo 2

Expresión y purificación de la proteína fusionada BM95-MSP1a

Los plásmidos fueron transformados en la cepa JM109 de *E. coli* para la inducción de la expresión de la proteína recombinante BM95-MSP1a, tal y como ocurre con las proteínas nativas MSP1a y MSP1b, usadas como control en los experimentos. En las construcciones, los genes expresados estuvieron bajo el control del promotor de inducción tac. Las cepas de *E. coli* transformadas se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani) suplementado con 50 μ g/ml de ampicilina y 0.4% (p/v) de glucosa, a 37°C hasta una densidad óptica de 0.4 uDO600 nm. Para inducir la expresión de las proteínas recombinantes se adicionó Isopropil- β -D-tio-galactósido (IPTG) hasta una concentración final de 0.5 mM y la incubación se continuó durante 3.5 horas.

Para producir las proteínas recombinantes, las cepas de *E. coli* transformadas se cultivaron en 10 ml de medio LB durante 2 horas en un agitador orbital a 37°C y 200 rpm. Posteriormente los cultivos se inocularon en 250 ml de medio, se incubaron en las mismas condiciones durante 4 h hasta alcanzar 1 uDO600 nm y se usaron para inocular un fermentador Biostast Bplus (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemania) con 4 L de medio de cultivo. Las fermentaciones se realizaron a 37°C y pH 7.0 controlado por adición de HCl 1M ó NaOH 4M y a una concentración de oxígeno disuelto en el medio superior al 30%, controlada mediante agitación a flujo de aire constante de 0.5 l/min. El cultivo se creció hasta 0.4 uDO600 nm, se le añadió IPTG hasta una concentración final de 0.5 mM y se continuó la fermentación durante 3.5 h más para inducir la expresión de las proteínas recombinantes. El crecimiento celular se monitoreó a lo largo de todo el proceso midiendo la densidad óptica a 600 nm.

Las células se cosecharon por centrifugación a 3,800 x g durante 10 min a 4°C y posteriormente muestras de 1 g de las células precipitadas se resuspendieron en 5 ml de solución tampón de ruptura (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, MgCl₂ x 6H₂O 5 mM y Tritón X-100 0.1% (v/v)). Para romper las células se empleó un sonicador Heidolph DIAx 900 (Bandelin Sonopuls, Berlin, Alemania) equipado con una micropunta de titanio, modelo MS73, de 3 mm de diámetro y 192 mm de longitud que se sumergió 10 mm en la suspensión de células. La frecuencia del equipo se fijó en 20 kHz y la potencia acústica en 70 kW. Durante la ruptura, la suspensión de células en tubos de 15 ml se mantuvo en un baño helado para prevenir el sobrecalentamiento. El ciclo de ruptura consistió de intervalos de 5 segundos de actuación y 5 segundos de descanso hasta completar 10 minutos de tiempo de ruptura total. Después de la ruptura la fracción de proteínas insolubles asociadas a membrana se separó de las proteínas solubles por centrifugación a 12,500 x g durante 15 min a 4°C y se almacenó a -20°C. Posteriormente esta fracción se resolvió en un gel de electroforesis como se describe más adelante, y la banda de la proteína de interés se extrajo del gel para usarla en los experimentos de inmunización en conejos.

Los niveles de expresión de las proteínas recombinantes y las concentraciones de proteínas durante la fermentación y en los pasos de purificación se determinaron usando el sistema semiautomático para electroforesis Experion (Bio-Rad, Hércules, CA, EU). Para hacer las determinaciones se cargaron 4 μ l de las muestras en el Chip Pro 260 (Experion, Bio-Rad) y se analizaron en el Experion siguiendo las instrucciones del fabricante.

La expresión de las proteínas recombinantes se detectó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (Criterion XT, Bio-Rad). Las muestras, de 10 μ g de proteínas totales, fueron aplicadas en cada pocillo y las corridas electroforéticas se realizaron a corriente constante de 20 mA durante 4 h. Los geles se tiñeron con azul brillante

de Coomassie R250 o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa PROTRAN BA85 (Schleicher and Schuell, Dassel, Alemania) en una unidad de transferencia semi-seca Minie-Genie Electrobloetter (Idea Scientific, Corvallis, OR, E.U.) siguiendo las instrucciones del fabricante, para luego ser analizadas por Western blot.

5 Para el análisis por Western blot, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con una solución de leche semi-desnatada al 5% (p/v) durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron tres veces en solución de tris tamponada (TBS, Tris·HCl 25 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, pH 7.6) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el suero de los conejos inmunizados previamente con Gavac (Revetmex, México) o con las vacunas que contenían las proteínas recombinantes.

10 Los antisueros de conejo fueron diluidos a concentraciones de 1:1000 o 1:5000 respectivamente en una solución al 3% (p/v) de albúmina sérica bovina (BSA) en solución tampón TBS. Posteriormente, las membranas se lavaron otras tres veces TBS y se incubaron nuevamente con un anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase, HRP, Sigma-Aldrich) diluido 1:1000 en TBS. Después de lavar nuevamente las
15 membranas se reveló el color empleando el sustrato 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB, Promega, EUA) durante 20 minutos.

El ensayo de inmunofluorescencia de células vivas, para detectar la expresión de la proteína recombinante fusionada BM95-MSP1a, se hizo usando los anticuerpos policlonales contra MSP1a, BM86 y la proteína fusionada BM95-MSP1a producidos en conejos. Como controles positivos y negativos se incluyeron las proteínas recombinantes MSP1a y MSP1b expresadas en *E. coli*.

Las células inducidas de 1 ml de cultivo (aproximadamente 3×10^8) se separaron por centrifugación a 5000 x g durante 5 min. y se lavaron con 1 ml de solución tamponada de fosfatos (PBS). Se colectaron nuevamente por centrifugación, se resuspendieron en 100 μ l de suero de conejo preinmune o inmune y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, fueron nuevamente separadas, lavadas con PBS y resuspendidas en 100 μ l de solución de IgG de cabra anti-conejo marcado con fluoresceína (KPL, Inc., Gaithersburg, MD, USA) diluida 1:100 en suero de cabra al 3% (Sigma Aldrich) en PBS. Se incubaron nuevamente, durante 30 minutos a temperatura ambiente, y el complejo célula-anticuerpos se separó por centrifugación, se lavó con PBS y se resuspendió en 100 μ l de suero de cabra al 3% en PBS. Finalmente las células fueron extendidas en laminillas de vidrio y secadas al aire, antes de ser fijadas en metanol y lavadas con PBS. Las extensiones de células secas se montaron sobre un portaobjetos con Mowiol/glicerol/1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano (DAPCO, Sigma) y se examinaron con un microscopio de epifluorescencia (Eclipse 50i, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA).

35 Con el plásmido pMBXAF3 construido se logró un alto nivel de expresión de la proteína fusionada BM95-MSP1a en *E. coli*. En el fermentador, la proteína fusionada BM95-MSP1a comenzó a acumularse después de las 0.5 h. de inducción con IPTG y su concentración final alcanzó el 2.8% de la proteína total producida por las células a las 3.5 h. de inducción (Figs. 3A y 3B).

40 El peso molecular de la proteína fusionada BM95-MSP1a se estimó entre 65 y 70 kDa por SDS-PAGE (Figs. 2 y 3A). Este valor estuvo en concordancia con la estimación teórica de 67 kDa, de los cuales, 62 kDa corresponden a los 5 primeros aminoácidos que preceden a la proteína quimera BM95 y a la región de MSP1a y 5 kDa a la quimera BM95 (Fig. 1B).

45 Se realizó un experimento para caracterizar y purificar a la proteína fusionada BM95-MSP1a. Las células de *E. coli* se rompieron por sonicación y, las fracciones de proteínas solubles e insolubles asociadas a membranas se separaron por centrifugación. Los resultados mostraron que, tanto la proteína fusionada BM95-MSP1a como la proteína recombinante MSP1a, se localizan en la fracción insoluble asociada a las membranas y no hubo evidencias de su acumulación en el citoplasma (Fig. 4).

50

Ejemplo 3

Inmunización de conejos y preparación de antisueros

55

Tres grupos de dos conejos de raza Nueva Zelanda se inmunizaron en las semanas 0, 3 y 6 con dosis de 1 ml que contenían 50 μ g de las proteínas purificadas MSP1a y de fusión BM95-MSP1a, adyuvadas en Montanide ISA 50 V2 (Seppic, Paris, Francia), y BM86 (Gavac, Revetmex, México). Las vacunas se suministraron por vía subcutánea usando una jeringa de tuberculina con aguja de 27 $\frac{1}{2}$ G. Dos semanas después de la última inmunización se tomaron muestras de sangre de cada conejo en tubos estériles, se trasladaron al laboratorio, se obtuvieron los sueros por centrifugación y posteriormente se almacenaron a -20°C. Los conejos se mantuvieron y cuidaron de acuerdo con las normas de Uso de Animales de Laboratorio.

65 Se hizo un estudio de inmunofluorescencia con células vivas (IFA) para analizar si la proteína fusionada BM95-MSP1a estaba expuesta sobre la superficie de *E. coli* (Fig. 5). Empleando como controles células de *E. coli* que expresaron las proteínas recombinantes MSP1a y MSP1b y usando los sueros de conejo pre-inmune se obtuvieron los resultados esperados (Figs. 5A-L). Además de ello, la IFA de la cepa de *E. coli* que expresó la proteína de fusión BM95-MSP1a mostró que la proteína estaba expuesta sobre la superficie de las células (Figs. 5K-O).

La caracterización antigénica de la proteína de fusión BM95-MSP1a se realizó por inmunofluorescencia de células vivas. La proteína BM95-MSP1a no sólo fue reconocida por los anticuerpos específicos de conejo inmunizado con la proteína fusionada (Fig. 5O), sino también por anticuerpos contra la proteína MSP1a (Fig. 5M) y contra BM86 (Fig. 5N). Además, los sueros de conejos inmunizados con la proteína recombinante reconocieron a la proteína fusionada mediante Western-blot (Fig. 6). Estos resultados indicaron que los epítomos de la proteína fusionada que son expuestos sobre la superficie de la célula se reconocieron por anticuerpos anti-BM86 y demostraron que los epítomos de BM95 se tradujeron correctamente y mantuvieron su antigenicidad aún después de la fusión.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sistema de expresión de péptidos sobre la superficie bacteriana **caracterizado** porque comprende una región de anclaje a la membrana bacteriana y el péptido expuesto, donde la región de anclaje a la membrana bacteriana es cualquiera de las siguientes secuencias:
- 10 a. Péptido que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1; o
- b. Una secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 99%, 98%, 95%, 90%, o un 80% con la SEQ ID NO: 1.
- 15 2. Sistema de expresión de péptidos según la reivindicación anterior, donde la bacteria es *E. coli*.
3. Construcción genética que comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias:
- 20 a. secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia aminoacídica según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o
- b. moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- 25 c. moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d. secuencia de nucleótidos de a), b), ó c), preferentemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.
- 30 4. Plásmido que comprende la construcción genética según la reivindicación 3.
5. Método para elaborar el sistema de expresión de péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende los siguientes pasos:
- 35 a. Introducir una construcción genética según la reivindicación, 3 o un plásmido según la reivindicación 4, en una célula hospedante.
- 40 b. Incubar la célula hospedante según a. en un medio de reacción adecuado.
6. Método según la reivindicación anterior, donde la célula hospedante es *E. coli*.
- 45 7. Péptido recombinante que comprende la secuencia aminoacídica de la invención y la secuencia de aminoácidos del péptido expuesto, obtenido a partir del sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, de la construcción genética según la reivindicación 3, o del plásmido según la reivindicación 4.
8. Sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, construcción genética según la reivindicación 3, plásmido según la reivindicación 4 o péptido recombinante según la reivindicación 7, para su uso como medicamento.
- 50 9. Sistema de expresión según la reivindicación anterior, donde el medicamento es una vacuna.
10. Sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la secuencia de aminoácidos del péptido expuesto comprende la SEQ ID NO: 3.
- 55 11. Uso del sistema de expresión según la reivindicación anterior para la elaboración de una vacuna para inmunizar frente a garrapatas del género *Rhipicephallus*.
- 60 12. Uso del péptido recombinante según la reivindicación 7 como inmunógeno.
- 65

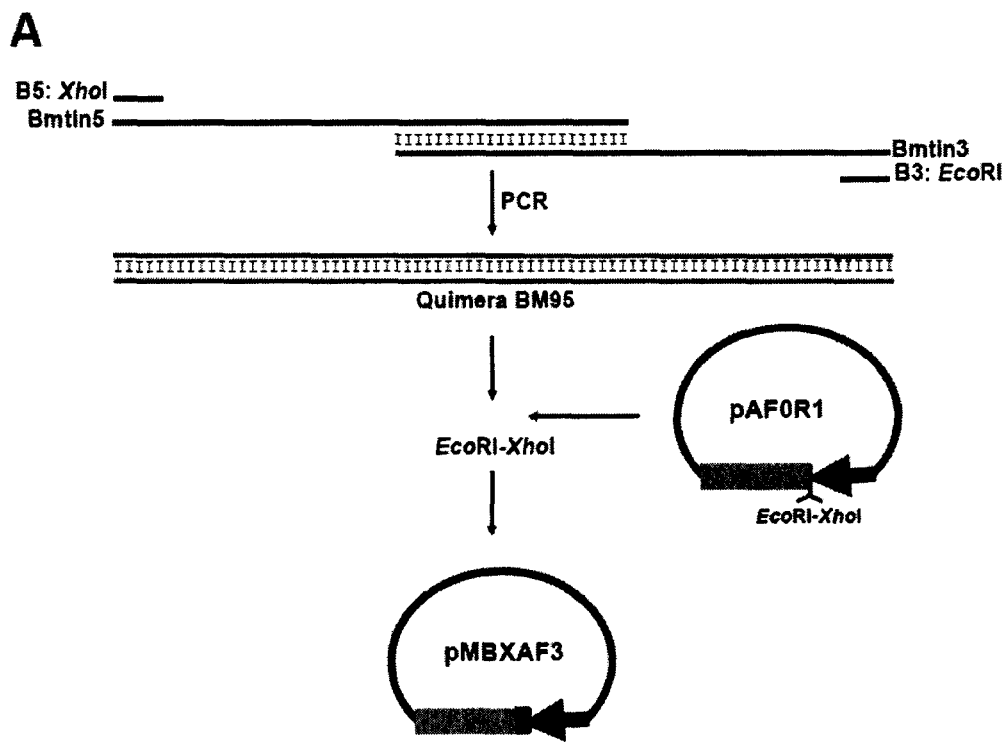


FIG. 1A

B

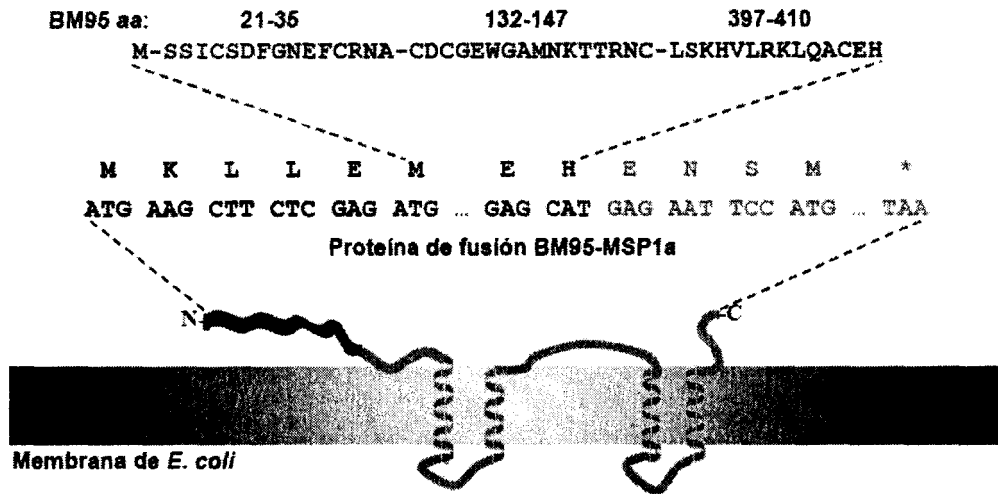


FIG. 1B

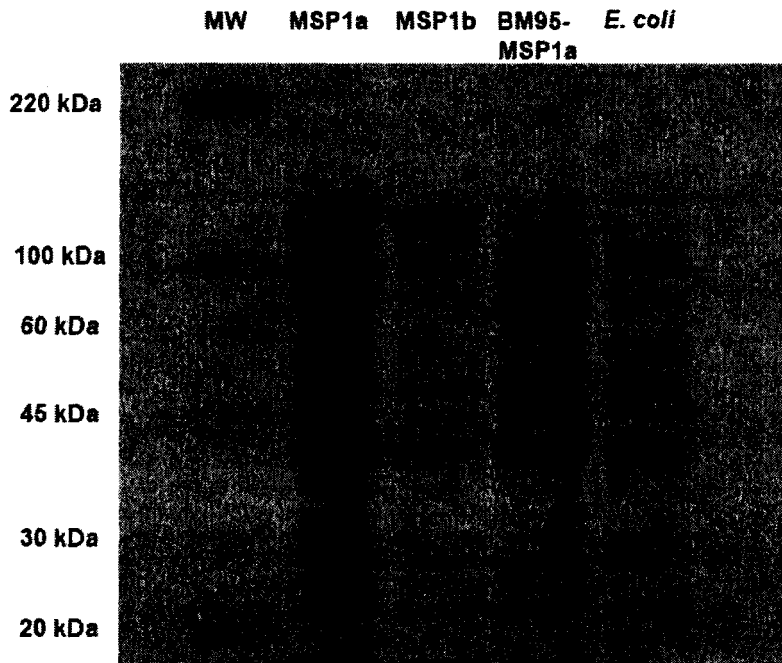


FIG. 2

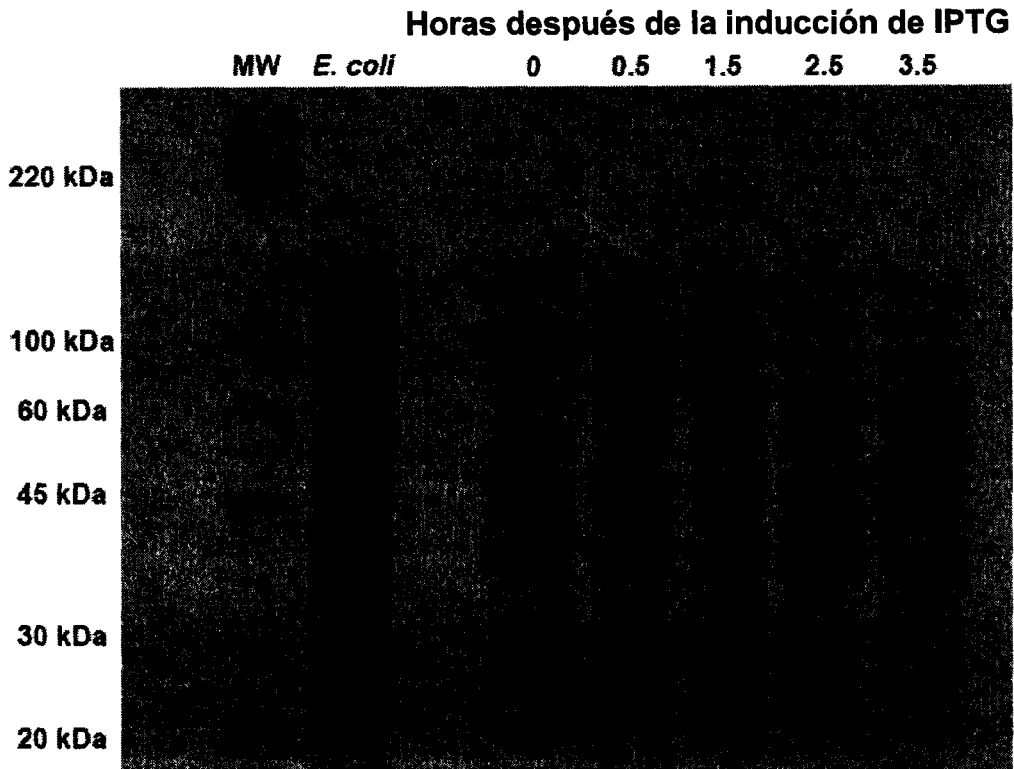


FIG. 3A

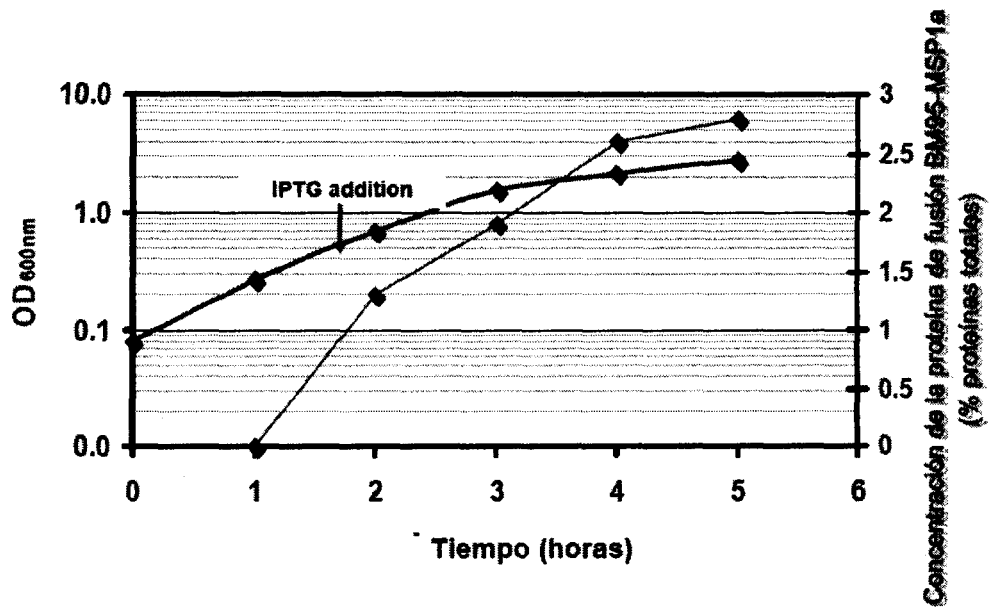


FIG. 3B

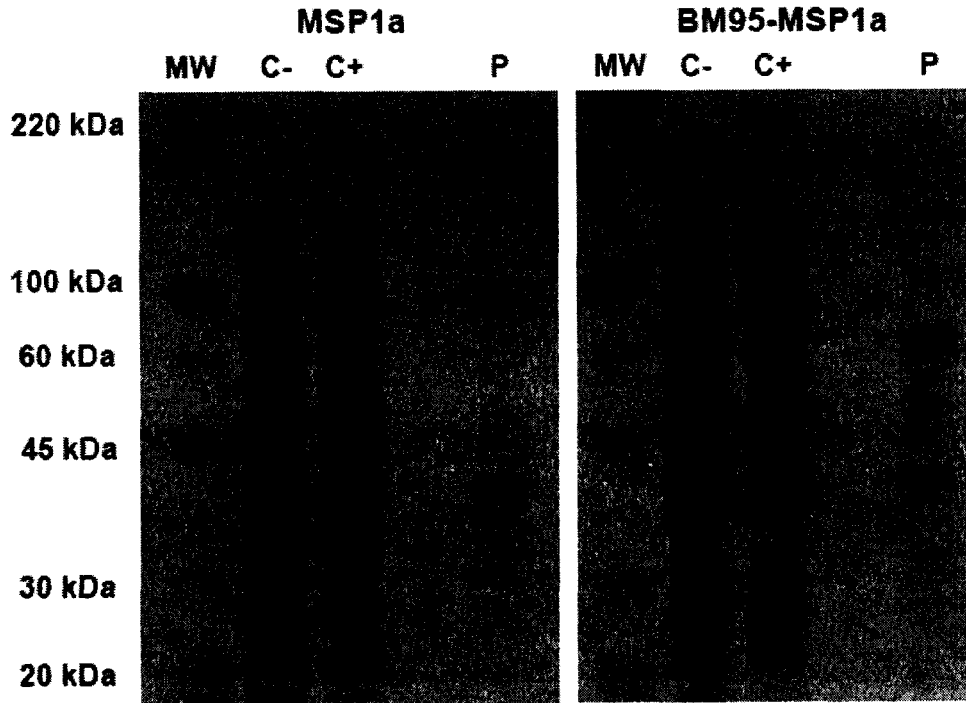


FIG. 4

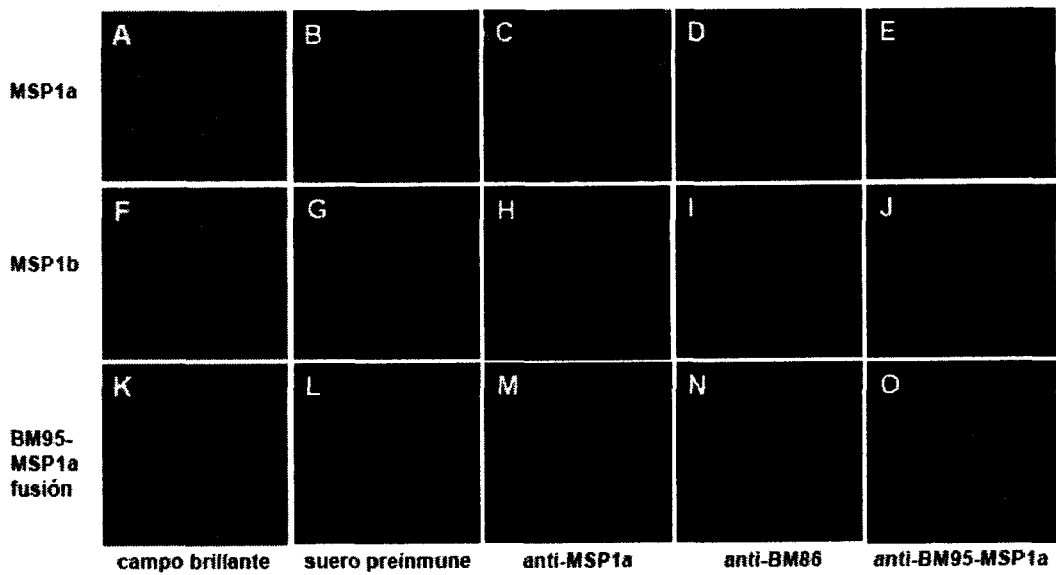


FIG. 5

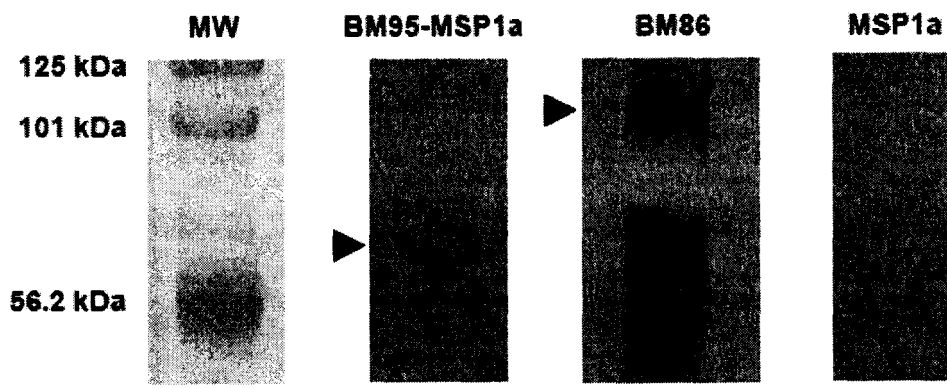


FIG.6

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Universidad de Castilla-La Mancha

5

<120> Sistema para la expresión de péptidos sobre la superficie bacteriana.

<130> 1641.27

10

<160> 11

<170> PatentIn version 3.4

15

<210> 1

<211> 529

<212> PRT

20

<213> *Anaplasma marginale*

<400> 1

25

Met Leu Ala Ala Asn Trp Arg Gln Glu Met Arg Ser Lys Val Ala Ser
1 5 10 15

30

Val Glu Tyr Ile Leu Ala Ala Arg Ala Leu Ile Ser Val Gly Val Tyr
20 25 30

Ala Ala Gln Gly Glu Ile Ala Lys Ser Gln Gly Cys Ala Pro Leu Arg
35 40 45

35

Val Ala Glu Val Glu Glu Ile Val Arg Asp Gly Leu Val Arg Ser His
50 55 60

40

Phe His Asp Ser Gly Leu Ser Leu Gly Ser Ile Arg Leu Val Leu Met
65 70 75 80

Gln Val Gly Asp Lys Leu Gly Leu Gln Gly Leu Lys Ile Gly Glu Gly
85 90 95

45

Tyr Ala Thr Tyr Leu Ala Gln Ala Phe Ala Asp Asn Val Val Val Ala
100 105 110

50

Ala Asp Val Gln Ser Gly Gly Ala Cys Ser Ala Ser Leu Asp Ser Ala
115 120 125

55

Ile Ala Asn Val Glu Thr Ser Trp Ser Leu His Gly Gly Leu Val Ser
130 135 140

Lys Asp Phe Asp Arg Asp Thr Lys Val Glu Arg Gly Asp Leu Glu Ala
145 150 155 160

60

Phe Val Asp Phe Met Phe Gly Gly Val Ser Tyr Asn Asp Gly Asn Ala
165 170 175

65

Ser Ala Ala Arg Ser Val Leu Glu Thr Leu Ala Gly His Val Asp Ala

ES 2 352 946 B1

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

ES 2 352 946 B1

Ala Glu Glu Cys Asp Ser Lys Cys Ala Thr Ala Arg Thr Ala Gln Ala
 450 455 460

5 Val Pro Gly Gly Gln Gln Gln Pro Arg Ala Thr Glu Gly Val Val Ser
 465 470 475 480

10 Gly Gly Ser Gln Glu Gly Gly Ala Gly Val Pro Gly Thr Ser Val Pro
 485 490 495

15 Ser Ala Gly Ser Gly Ser Val Pro Pro Ala Thr Ile Met Val Ser Val
 500 505 510

20 Asp Pro Gln Leu Val Ala Thr Leu Gly Ala Gly Val Ala Gln Ala Ala
 515 520 525

Ala

<210> 2

25 <211> 1612

<212> DNA

<213> *Anaplasma marginale*

30 <400> 2

atgaagcttc tcgaggaatt ccatgttagc ggctaattgg cggcaagaga tgcgctccaa
 60

35 ggttgcgagt gttgagtaca ttttggctgc tcgtgccctt atttctgtag gggctctatgc
 120

40 tgctcagggg gagatcgcga aatcgcaagg gtgtgctccc ctgctgttg cagaagtcga
 180

45 agaaatcgtg agggatggcc ttgtacgcag ccactttcat gatagtggcc tttcactagg
 240

50 ctccatacga ctcgtgctta tgcaggttgg ggataagttg gggctacaag gtttgaagat
 300

55 tggcgaaggg tacgccacct atctcgcgca agcgtttgct gacaacgtgg tggttgcggc
 360

60 tgatgttcaa agtggtggtg cgtgctctgc cagccttgac agcgcgatcg caaacgttga
 420

65 gacgtcgtgg tccctgcacg gcggcctggt aagcaaagat tttgaccgtg ataccaaagt
 480

70 agaaaggggc gaccttgagg cttttgtcga cttcatgttt ggcggtgtgt cgtacaatga
 540

75 tgggaacgcg tctgcggtta ggagcgtatt ggaaacgctt gccgggcacg tcgatgcact
 600

80 tggatatatcg tacaatcagc tggataagct tgatgctgac actttgtata gtgtcgtatc
 660

85 gtttagtgcc ggttccgcaa tagacagagg tgcggttagc gatgctgctg acaagttccg
 720

ES 2 352 946 B1

780 tgtgatgatg tttggtggtg ctctgcggg gcaagagaaa actgccgaac ctgagcatga
 840 ggctgcgacc ccgtcagcta gtagcgttcc gtcaactgtg catggtaagg tcgttgatgc
 900 agttgaccgt gcaaaagaag cggctaagca ggcctatgca ggcgtgcgta agcggtatgt
 960 ggcgaagcct tcggacacta ctacacagct tgtttagct atcacggcgc tgcttatcac
 1020 ggcgtttgct atctgtcgt gtttgaacc taggcttata ggggcgtccg gtccgctgat
 1080 ttggggctgc ctggcactag tagcactgct gccattactt ggtatggctg tgcatacggc
 1140 agtgagtgct tcgagtcaaa agaaggctgc cggtggtgcg caacggggtg ctgctcagga
 1200 gaggtctagg gaattgtccc gtgcgagaca ggaagatcag cagaagttgc atgttcccgc
 1260 gatactgacc gggttgagcg tgcttgtgtt tattgctgcc gtcgtggctt gtattgctgt
 1320 tgacgcgagg cgcgggacgt ggcagggcag catatgtttc ctagccgat ttgtgttgtt
 1380 tgccgatcagt gccgctgttg taatggcaac acgtgaccaa tcgttggcag aagagtgtga
 1440 tagcaagtgt gctacagctc gtacggctca agctgtaccc ggtggccagc agcagccgcg
 1500 tgctaccgag ggcgttgta gcggtggcag ccaagaaggc ggggctggtg ttcccggaac
 1560 ttccgtgccg tcagccgggt ctgggtccgt acctcctgct accattatgg tcagtgtgga
 1612 tccacaactt gttgctactt tgggagcagg tgtggcgcag gcggcggcgt aa

45 <210> 3
 <211> 46
 <212> PRT
 50 <213> Artificial

<220>
 <223> Proteína quimera BM95

<400> 3
 Met Ser Ser Ile Cys Ser Asp Phe Gly Asn Glu Phe Cys Arg Asn Ala
 1 5 10
 Cys Asp Cys Gly Glu Trp Gly Ala Met Asn Lys Thr Thr Arg Asn Cys
 20 25 30
 Leu Ser Lys His Val Leu Arg Lys Leu Gln Ala Cys Glu His
 35 40 45

ES 2 352 946 B1

<210> 4

<211> 569

<212> PRT

5 <213> *Rhipicephalus microplus* (*Boophilus microplus*)

<400> 4

10 Met Arg Gly Ile Ala Leu Phe Val Ala Ala Val Ser Leu Ile Val Glu
1 5 10 15

15 Gly Thr Ala Glu Ser Ser Ile Cys Ser Asp Phe Gly Asn Glu Phe Cys
20 25 30

20 Arg Asn Ala Glu Cys Glu Val Val Pro Gly Ala Glu Asp Asp Phe Val
35 40 45

25 Cys Lys Cys Pro Arg Asp Asn Met Tyr Phe Asn Ala Ala Glu Lys Gln
50 55 60

30 Cys Glu Tyr Lys Asp Thr Cys Lys Thr Arg Glu Cys Ser Tyr Gly Arg
65 70 75 80

35 Cys Val Glu Ser Asn Pro Ser Lys Gly Ser Cys Val Cys Glu Arg Ser
85 90 95

40 Asp Asp Leu Thr Leu Gln Cys Lys Ile Lys Asn Asp Tyr Ala Thr Asp
100 105 110

45 Cys Arg Asn Arg Gly Gly Thr Ala Lys Leu Arg Thr Asp Gly Phe Ile
115 120 125

50 Gly Ala Thr Cys Asp Cys Gly Glu Trp Gly Ala Met Asn Lys Thr Thr
130 135 140

55 Arg Asn Cys Val Pro Thr Thr Cys Leu Arg Pro Asp Leu Thr Cys Lys
145 150 155 160

60 Asp Leu Cys Glu Lys Asn Leu Leu Gln Arg Asp Ser Arg Cys Cys Gln
165 170 175

65 Gly Trp Asn Thr Ala Asn Cys Ser Ala Ala Pro Pro Ala Asp Ser Tyr
180 185 190

70 Cys Ser Pro Gly Ser Pro Lys Gly Pro Asp Gly Gln Cys Lys Asn Ala
195 200 205

75 Cys Arg Thr Lys Glu Ala Gly Phe Val Cys Lys His Gly Cys Arg Ser
210 215 220

65

ES 2 352 946 B1

Thr Asp Lys Ala Tyr Glu Cys Thr Cys Pro Ser Gly Ser Thr Val Ala
 225 230 235 240
 5
 Glu Asp Gly Ile Thr Cys Lys Ser Ile Ser Tyr Thr Val Ser Cys Thr
 245 250 255
 10
 Val Glu Gln Lys Gln Thr Cys Arg Pro Thr Glu Asp Cys Arg Val Gln
 260 265 270
 15
 Lys Gly Thr Val Leu Cys Glu Cys Pro Trp Asn Gln His Leu Val Gly
 275 280 285
 20
 Asp Thr Cys Ile Ser Asp Cys Val Asp Lys Lys Cys His Glu Glu Phe
 290 295 300
 25
 Met Asp Cys Gly Val Tyr Met Asn Arg Gln Ser Cys Tyr Cys Pro Trp
 305 310 315 320
 30
 Lys Ser Arg Lys Pro Gly Pro Asn Val Asn Ile Asn Glu Arg Leu Leu
 325 330 335
 35
 Asn Glu Tyr Tyr Tyr Thr Val Ser Phe Thr Pro Asn Ile Ser Phe Asp
 340 345 350
 40
 Ser Asp His Cys Lys Arg Tyr Glu Asp Arg Val Leu Gly Ala Ile Arg
 355 360 365
 45
 Thr Ser Ile Gly Lys Glu Val Phe Lys Val Glu Ile Leu Asn Cys Thr
 370 375 380
 50
 Gln Asp Ile Lys Ala Arg Leu Ile Ala Glu Lys Pro Leu Ser Lys Tyr
 385 390 395 400
 55
 Val Leu Arg Lys Leu Gln Ala Cys Glu His Pro Ile Gly Glu Trp Cys
 405 410 415
 60
 Met Met Tyr Pro Lys Leu Leu Ile Lys Lys Asn Ser Ala Thr Glu Ile
 420 425 430
 65
 Glu Glu Glu Asn Leu Cys Asp Ser Leu Leu Lys Asn Gln Glu Ala Ala
 435 440 445
 Tyr Lys Gly Gln Asn Lys Cys Val Lys Val Asp Asn Leu Phe Trp Phe
 450 455 460
 70
 Gln Cys Ala Asp Gly Tyr Thr Thr Thr Tyr Glu Met Thr Arg Gly Arg
 465 470 475 480
 75
 Leu Arg Arg Ser Val Cys Lys Ala Gly Val Ser Cys Asn Glu Asn Glu
 485 490 495

ES 2 352 946 B1

Gln Leu Glu Cys Ala Asn Lys Gly Gln Ile Cys Val Tyr Glu Asn Gly
500 505 510

5 Lys Ala Asn Cys Gln Cys Pro Pro Asp Thr Lys Pro Gly Glu Ile Gly
515 520 525

10 Cys Ile Glu Arg Thr Thr Cys Asn Pro Lys Glu Ile Gln Glu Cys Gln
530 535 540

15 Asp Lys Lys Leu Glu Cys Val Tyr Lys Asn His Lys Ala Glu Cys Lys
545 550 555 560

Cys Pro Asp Asp His Glu Cys Ser Arg
565

20

<210> 5

<211> 83

25 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

30 <223> oligonucleótido Bmtin5

<400> 5

35 atgcatcca tttgctctga cttcggaac gagttctgtc gcaacgcttg tgactgtggt
60

gaatggggtg cgatgaacaa gac
83

40

<210> 6

<211> 85

45 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

50 <223> oligonucleótido Bmtin3

<400> 6

55 atgctcgcat gcttgtagtt tcctgagcac gtgttttgac agacagttcc gtgtggtctt
60

gttcatcgca cccattcac cacag
85

60

<210> 7

<211> 33

65 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido B5

5 <400> 7

ccctcgagat gtcattcatt tgctctgact tcg
33

10

<210> 8

<211> 38

<212> DNA

15

<213> Artificial

<220>

20

<223> oligonucleótido B3

<400> 8

25

ccggaattct catgctcgca tgctttagt ttcctgag
38

30

<210> 9

<211> 6950

<212> DNA

<213> Artificial

35

<220>

<223> plásmido pAF0R1

40

45

50

55

60

65

<400> 9

5 catcataacg gttctggcaa atattctgaa atgagctggt gacaattaat catcggctcg
 60
 tataatgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca ggagatatca tatgaaaaag
 120
 10 acagctatcg cgattgcagt ggcactggct ggtttcgcta ccgttgcgca agcttatgaa
 180
 gcttctcgag gaattccatg ttagcggcta attggcggca agagatgcmc tccaagggtg
 240
 15 cgagtgttga gtacattttg gctgctcgtg cccttatttc tgtaggggtc tatgctgctc
 300
 agggagagat cgcgaaatcg caagggtgtg ctcccctgcm tgttgcmgaa gtcgaagaaa
 20 360
 tcgtgagggg tggccttgta cgcagccact ttcatgatag tggcctttca ctaggctcca
 420
 25 tacgactcgt gcttatgcmg gttggggata agttggggct acaaggtttg aagattggcm
 480
 aagggtacgc cacctatctc gcmgaaagcm ttgctgcmgaa cmgtggtggtt gcmgctgatg
 540
 30 ttcaaagtgg tggtgcmgtc tctgccagcc ttgacagcmg gatcmgaaac gttgagacgt
 600
 cmgtgctcct gcmgcmgcmg cmgtgtaagcm aagattttga cmgtgatacc aaagtagaaa
 35 660
 ggggcmgacct tgaggctttt gtcgacttca tgtttgcmgcmg tgtgctgctac aatgatgggcm
 720
 40 acmcmgtctgc ggctaggagc gtattggaaa cmgttgcmgcmg gcmgcmgcmg gcmgcttggtcm
 780
 tatcmgtacaa tcagctggat aagcttgatg cmgacacttt gtatagtgct gctatcmgtta
 840
 45 gtgcmggttc cmgcaatagac agagggtgcmg ttagcmgatg ggctgcmgaa ttcmgctgtgcm

50

55

60

65

ES 2 352 946 B1

900

tgatgtttgg tggtgctcct gcggggcaag agaaaactgc cgaacctgag catgaggctg
960

5 cgacccccgtc agctagtagc gttccgtcaa ctgtgcatgg taaggctggt gatgcagttg
1020

10 accgtgcaaa agaagcggct aagcaggcct atgcaggcgt gcgtaagcgg tatgtggcga
1080

agccttcgga cactactaca cagcttggtg tagctatcac ggcgctgctt atcacggcgt
1140

15 ttgctatctg tgcgtgtttg gaacctaggc ttataggggc gtccggtccg ctgatttggg
1200

gctgcctggc actagtagca ctgctgcat tacttggtat ggctgtgcat acggcagtg
1260

20 gtgcttcgag tcaaaagaag gctgccggtg gtgcgcaacg gtttgctgct caggagaggt
1320

25 ctagggaatt gtcccgtgcg agacaggaag atcagcagaa gttgcatggt cccgcgatac
1380

tgaccgggtt gagcgtgctt gtgtttattg ctgccgtcgt ggcttgatt gctgttgacg
1440

30 cgaggcgcgg gacgtggcag ggcagcatat gttcctagc cgcatttggtg ttgtttgcga
1500

tcagtgccgc tgttgtaatg gcaacacgtg accaatcgtt ggcagaagag tgtgatagca
1560

35 agtgtgctac agctcgtacg gctcaagctg taccgggtgg ccagcagcag ccgcgtgcta
1620

ccgagggcgt tgtagcggg ggcagccaag aaggcggggc tgggtttccc ggaacttccg
1680

40 tgccgtcagc cgggtctggg tccgtacctc ctgctacat tatggtcagt gtggatccac
1740

45 aacttgttgc tactttggga gcagggtggtg cgcaggcggc ggcgtaatga agatcgatct
1800

ctcgatcgag tgagagaaga ttttcagcct gatacagatt aatcagaag cggctcgata
1860

50 aaacagaatt tgccctggcgg cagtagcgcg gtgggtccac ctgaccccat gccgaactca
1920

gaagtgaaac gccgtagcgc cgatggtagt gtgggggtctc cccatgagag agtagggaac
1980

55 tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac tgggcctttc gttttatctg
2040

60 ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag gacaaatccg ccgggagcgg atttgaacgt
2100

tgccaagcaa cggccccggag ggtggcgggc aggaccccg ccataaactg ccaggcatca
2160

65 aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg ctttttgcg tttctacaaa ctcttttgtt

2220

5 ttttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc
2280

ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc
2340

10 ctttttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa
2400

aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg
2460

15 gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaag
2520

ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtg ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc
2580

20 gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta
2640

25 cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataaactg
2700

cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca
2760

30 acatggggga tcatgtaact cgccatgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac
2820

caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat
2880

35 taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg
2940

ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt attgctgata
3000

aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta
3060

45 agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa
3120

atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggttaactg tcagaccaag
3180

50 tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaa aggatctagg
3240

tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact
3300

55 gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg
3360

60 taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc
3420

aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaata
3480

65 ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta

ES 2 352 946 B1

3540

5 catacctcgc tctgctaadc ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc
3600

ttaccggggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg
3660

10 ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac
3720

agcgtgagca ttgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg
3780

15 taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct tccaggggga aacgcctggt
3840

atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct
3900

20 cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggctttttta cggttcctgg
3960

25 ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttctgctggt atcccctgat tctgtggata
4020

accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca
4080

30 gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcac
4140

tgtgcggtat ttcacaccgc agatcctgac gcgccctgta gcggcgcatt aagcgcggcg
4200

35 ggtgtgggtg ttacgcgcag cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gcccgtcct
4260

40 ttcgctttct tcccttcctt tctcgccacg ttcgccggct ttccccgtca agctctaaat
4320

cgggggctcc ctttaggggtt ccgatttagt gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt
4380

45 gattagggtg atggttcacg tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgcccttg
4440

acgttggagt ccacgttctt taatagtgga ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac
4500

50 cctatctcgg tctattcttt tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattggtta
4560

aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgtttaca
4620

55 ggatctggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagtatacac
4680

60 tccgctatcg ctacgtgact gctcgacctg cagcaattca acgccatcaa aaataattcg
4740

cgtctggcct tcctgtagcc agctttcatc aacattaaat gtgagcgagt aacaacccgt
4800

65 cggattctcc gtgggaacaa acggcggatt gaccgtaatg ggataggtta cgttgggtga

ES 2 352 946 B1

4860

5 gatgggcgca tcgtaaccgt gcatctgcc a gtttgagggg acgacgacag t atcggcctc
4920

aggaagatcg cactccagcc agctttccgg caccgcttct ggtgccggaa accaggcaaa
4980

10 gcgccattcg ccattcaggc tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcgggtgc gggcctcttc
5040

gctattacgc cagctggcga aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc
5100

15 agggttttcc cagtcacgac gttgtaaac gacggccagt gaatccgtaa tcatggtc at
5160

agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa
5220

20 gcataaagtg taaagcctgg ggtgccta at gagtgagcta actcacatta attgcgttgc
5280

25 gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcc a gctgcattaa tgaatcggcc
5340

aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgccaggg tggtttttct tttcaccagt
5400

30 gagacgggca acagctgatt gcccttcacc gcctggccct gagagagttg cagcaagcgg
5460

tccacgctgg tttgccccag caggcgaaaa tcctgtttga tggtggttga cggcgggata
5520

35 taacatgagc tgtcttcggt atcgtcgtat cccactaccg agatatccgc accaacgcgc
5580

40 agccccgact cggtaatggc gcgcattgcg cccagcgcca tctgatcgtt ggcaaccagc
5640

atcgcagtgg gaacgatgcc ctcatcagc atttgcatgg tttgttgaaa accggacatg
5700

45 gcactccagt cgccttcccc ttccgctatc ggctgaattt gattgcgagt gagatattta
5760

tgccagccag ccagacgcag acgcgccgag acagaactta atgggcccgc taacagcgcg
5820

50 atttgctggt gacccaatgc gaccagatgc tccacgcca gtcgcgtacc gtcttcatgg
5880

55 gagaaaataa tactgttgat ggggtgtctg t cagagacat caagaaataa cgccggaaca
5940

ttagtgcagg cagcttccac agcaatggca tcctggtcat ccagcggata gttaatgatc
6000

60 agcccactga cgcgttgccg gagaagattg tgcaccgccg ctttacaggc ttcgacgccg
6060

cttcgttcta ccatcgacac caccacgctg gcaccagtt gatcggcgcg agatttaatc
6120

65 gccgcgacaa tttgcgacgg cgcgtgcagg gccagactgg aggtggcaac gccaatcagc

ES 2 352 946 B1

6180

aacgactggt tgcccgccag ttgtttgtgcc acgcggttgg gaatgtaatt cagctccgcc
6240

5 atcgccgctt ccactttttc ccgcggtttc gcagaaacgt ggctggcctg gttcaccacg
6300

10 cgggaaacgg tctgataaga gacaccggca tactctgcga catcgtataa cgttactggt
6360

ttcacattca ccaccctgaa ttgactctct tccgggcgct atcatgccat accgcgaaaag
6420

15 gttttgcacc attccatggt gtcgaattgc tgcaggtcga gggggtcattg gctgcgcccc
6480

gacacccgcc aacacccgct gacgcgcctt gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt
6540

20 acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac
6600

cgaaacgcgc gaggcagcaa ggagatggcg cccaacagtc ccccggccac gggcctgcca
6660

25 ccataccac gccgaaaca gcgctcatga gcccgaaagt ggcgagcccga tcttccccat
6720

cggtgatgtc ggcgatatag gcgccagcaa ccgcacctgt ggcgccggtg atgccggcca
6780

30 cgatgcgtcc ggcgtagagg atccggagct tatcgactgc acggtgcacc aatgcttctg
6840

gcgtcaggca gccatcgaa gctgtggtat ggctgtgcag gtcgtaaadc actgcataat
6900

35 tcgtgtcgtc caaggcgcac tcccgttctg gataatgttt tttgcgccga
6950

<210> 10

40 <211> 7090

<212> DNA

<213> Artificial

45 <220>

<223> plásmido pMBXAF3

<400> 10

50 catcataacg gttctggcaa atattctgaa atgagctggt gacaattaat catcggctcg
60

tataatgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca ggagatatca tatgaaaaag
55 120

acagctatcg cgattgcagt ggcactggct ggtttcgcta ccgttgcgca agcttatgaa
180

60 gcttctcgag atgtcatcca tttgctctga cttcgggaac gagttctgtc gcaacgcttg
240

tgactgtggt gaatggggtg cgatgaaca gaccacacgg aactgtctgt caaaacacgt
300

65

ES 2 352 946 B1

360 gctcaggaaa ctacaagcat gcgagcatga gaattccatg ttagcggcta attggcggca
 420 agagatgctc tccaaggttg cgagtgttga gtacattttg gctgctcgtg cccttatttc
 5 480 tgtaggggtc tatgctgctc agggagagat cgcgaaatcg caaggggtgtg ctcccctgcg
 540 tgttgacagaa gtcgaagaaa tcgtgagggg tggccttgta cgcagccact ttcattgatag
 600 tggcctttca ctaggctcca tacgactcgt gcttatgcag gttggggata agttggggct
 15 660 acaaggtttg aagattggcg aagggtacgc cacctatctc gcgcaagcgt ttgctgacaa
 720 cgtgggtggtt gcggctgatg ttcaaagtgg tggtgctgctc tctgccagcc ttgacagcgc
 20 780 gatcgcaaac gttgagacgt cgtggtcctt gcacggcggc ctggttaagca aagattttga
 840 ccgtgatacc aaagtagaaa ggggcgacct tgaggctttt gtcgacttca tgtttggcgg
 900 tgtgtcgtac aatgatggga acgcgtctgc ggctaggagc gtattgaaa cgcttgccgg
 30 960 gcacgtcgtg gcaacttgga tatcgtacaa tcagctggat aagcttgatg ctgacacttt
 1020 gtatagtgtc gtatcgttta gtgccggttc cgcaatagac agaggtgcgg ttagcgtatc
 35 1080 ggctgacaag ttccgtgtga tgatgtttgg tggtgctcct gcggggcaag agaaaactgc
 1140 cgaacctgag catgaggctg cgaccccgtc agctagtagc gttccgtcaa ctgtgcatgg
 40 1200 taaggtcgtt gatgcagttg accgtgcaaa agaagcggct aagcaggcct atgcaggcgt
 45 1260 gcgtaagcgg tatgtggcga agccttcgga cactactaca cagcttggtg tagctatcac
 1320 ggcgctgctt atcacggcgt ttgctatctg tgcgtgtttg gaacctagge ttataggggc
 50 1380 gtccgggtccg ctgatttggg gctgcctggc actagtagca ctgctgcat tacttggtat
 1440 ggctgtgcat acggcagtga gtgcttcgag tcaaaagaag gctgccggtg gtgcgcaacg
 55 1500 ggttgctgct caggagaggt ctaggaatt gtcccgtgcg agacaggaag atcagcagaa
 60 1560 gttgcatggt cccgcgatac tgaccgggtt gagcgtgctt gtgtttattg ctgccgtcgt
 1620 ggcttgatt gctgttgacg cgaggcgcgg gacgtggcag ggcagcatat gtttcctagc
 65

ES 2 352 946 B1

cgcatttgtg ttgtttgcca tcagtgccgc tgttgtaatg gcaacacgtg accaatcgtt
 1680
 5 ggcagaagag tgtgatagca agtgtgctac agctcgtacg gctcaagctg tacccggtgg
 1740
 ccagcagcag ccgcgtgcta ccgagggcgt tgtagcggg ggcagccaag aaggcggggc
 1800
 10 tgggtgttccc ggaacttccg tgccgtcagc cgggtctggg tccgtacctc ctgctacat
 1860
 tatggtcagt gtggatccac aacttgttgc tactttggga gcaggtgtgg cgcaggcggc
 1920
 15 ggcgtaatga agatcgatct ctcgatcagc tgagagaaga ttttcagcct gatacagatt
 1980
 20 aaatcagaag cggctcgata aaacagaatt tgcctggcgg cagtagcgcg gtgggtcccac
 2040
 ctgaccccat gccgaactca gaagtgaaac gccgtagcgc cgatggtagt gtgggggtctc
 2100
 25 cccatgagcag agtagggaac tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac
 2160
 tgggcctttc gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag gacaaatccg
 2220
 30 ccgggagcgg atttgaacgt tgcaagcaa cggcccggag ggtggcgggc aggacgcccg
 2280
 ccataaactg ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg cttttttgcg
 2340
 35 tttctacaaa ctcttttggt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag
 2400
 40 acaataaacc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca
 2460
 tttccgtgtc gcccttattc cttttttgct ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc
 2520
 45 agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat
 2580
 cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc
 2640
 50 aatgatgagc acttttaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtg ttgacgccgg
 2700
 55 gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc
 2760
 agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat
 2820
 60 aaccatgagt gataaactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga
 2880
 65 gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccatgatc gttgggaacc
 2940

ES 2 352 946 B1

ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc
 3000
 5 aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt
 3060
 aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc
 3120
 10 tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgc gtatcattgc
 3180
 agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca
 3240
 15 ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca
 3300
 ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt
 3360
 20 ttaatttaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccccta
 3420
 25 acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg
 3480
 agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaccac cgctaccagc
 3540
 30 ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag
 3600
 cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa
 3660
 35 gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaadc ctgttaccag tggctgctgc
 3720
 40 cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccggggt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc
 3780
 gcagcggctg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc gaacgaccta
 3840
 45 caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag
 3900
 aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgca cgagggagct
 3960
 50 tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga
 4020
 55 gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc
 4080
 ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttctgcgtt
 4140
 60 atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcggc
 4200
 cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcctgatgcg
 4260
 65

gtatTTTctc cttacgcac tgtgcggtat ttcacaccgc agatcctgac gcgccctgta
4320

5 gcggcgcat t aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag cgtgaccgct acacttgcca
4380

gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttcctt tctcgccacg ttcgccggct
4440

10 ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttaggggt ccgatttagt gctttacggc
4500

acctcgaccc caaaaaactt gattaggggt atggttcacg tagtgggcca tcgccctgat
4560

15 agacggtttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt taatagtgga ctcttgttcc
4620

20 aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt tgatttataa gggattttgc
4680

cgatttcggc ctattggtta aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac gcgaatttta
4740

25 acaaaatatt aacgtttaca ggatctggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc
4800

atagttaagc cagtatacac tccgctatcg ctacgtgact gctcgacctg cagcaattca
4860

30 acgccatcaa aaataattcg cgtctggcct tctgttagcc agctttcatc aacattaaat
4920

35 gtgagcgagt aacaaccgt cggattctcc gtgggaacaa acggcggatt gaccgtaatg
4980

ggataggtta cgttgggtga gatgggcgca tcgtaaccgt gcacttgcca gtttgagggg
5040

40 acgacgacag tatcggcctc aggaagatcg cactccagcc agctttccgg caccgcttct
5100

ggtgccggaa accaggcaa gcgccattcg ccattcaggc tgcgcaactg ttgggaaggg
5160

45 cgatcgggtc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga aagggggatg tgctgcaagg
5220

cgattaagtt gggtaacgcc agggTTTTcc cagtcacgac gttgtaaaac gacggccagt
5280

50 gaatccgtaa tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc
5340

55 acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta
5400

actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgctgtgcca
5460

60 gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagagggcgt ttgcgtattg ggcgccaggg
5520

65 tggTTTTct tttcaccagt gagacgggca acagctgatt gcccttcacc gcctggccct
5580

ES 2 352 946 B1

gagagagttg cagcaagcgg tccacgctgg tttgccccag caggcgaaaa tcctgtttga
 5640
 5 tggtagttga cggcgggata taacatgagc tgtcttcggt atcgtcgtat cccactaccg
 5700
 agatatccgc accaacgcgc agcccggact cggtaatggc gcgcattgcg cccagcgcca
 5760
 10 tctgatcggt ggcaaccagc atcgcagtgg gaacgatgcc ctcatcagc atttgatgg
 5820
 tttgttgaaa accggacatg gcactccagt cgccttcccg ttccgctatc ggctgaattt
 5880
 15 gattgagagt gagatattta tgccagccag ccagacgcag acgcgcccag acagaactta
 5940
 atgggccccg taacagcgcg atttgctggg gacccaatgc gaccagatgc tccacgcccc
 6000
 20 gtcggtacc gtcttcatgg gagaaaataa tactgttgat ggggtgtctgg tcagagacat
 6060
 25 caagaaataa cgccggaaca ttagtgcagg cagcttcac agcaatggca tcctggatc
 6120
 ccagcggata gttaatgatc agcccactga cgcgttgcgc gagaagattg tgcaccgccc
 6180
 30 ctttacaggc ttcgacgccg cttcgttcta ccatcgacac caccacgctg gcaccagtt
 6240
 gatcggcgcg agatttaatc gccgcgacaa tttgcgacgg cgcgtgcagg gccagactgg
 6300
 35 aggtggcaac gccaatcagc aacgactggt tgcccgccag ttgttgtgcc acgcggttgg
 6360
 40 gaatgtaatt cagctccgcc atcgcgcgtt ccaacttttc ccgcttttc gcagaaacgt
 6420
 ggctggcctg gttcaccacg cgggaaacgg tctgataaga gacaccggca tactctgcga
 6480
 45 catcgtataa cgttactggt ttcacattca ccaccctgaa ttgactctct tccgggcgct
 6540
 atcatgccat accgcgaaag gttttgcacc attccatggt gtcgaattgc tgcaggtcga
 6600
 50 gggggtcatg gctgcgcccc gacaccgcc aacaccgct gacgcgccct gacgggcttg
 6660
 55 tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca
 6720
 gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagcaa ggagatggcg cccaacagtc
 6780
 60 ccccgccac gggcctgcca ccatacccac gccgaaaca gcgctcatga gcccgaagt
 6840
 65 gcgagcccga tcttccccat cggatgatgc ggcgatatag gcgccagcaa ccgcacctgt
 6900

ES 2 352 946 B1

ggcgccggtg atgccggcca cgatgcgtcc ggcgtagagg atccggagct tatcgactgc
6960

5 acggtgcacc aatgcttctg gcgtcaggca gccatcggaa gctgtggtat ggctgtgcag
7020

gtcgtaaatc actgcataat tcgtgtcgct caaggcgcac tcccgttctg gataatgttt
7080

10 tttgcgccga
7090

15 <210> 11

<211> 583

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> proteína fusionada BM95-MSP1a

25 <400> 11

Met Lys Leu Leu Glu Met Ser Ser Ile Cys Ser Asp Phe Gly Asn Glu
1 5 10 15

30

Phe Cys Arg Asn Ala Cys Asp Cys Gly Glu Trp Gly Ala Met Asn Lys
20 25 30

35

Thr Thr Arg Asn Cys Leu Ser Lys His Val Leu Arg Lys Leu Gln Ala
35 40 45

40

Cys Glu His Glu Asn Ser Met Leu Ala Ala Asn Trp Arg Gln Glu Met
50 55 60

45

Arg Ser Lys Val Ala Ser Val Glu Tyr Ile Leu Ala Ala Arg Ala Leu
65 70 75 80

Ile Ser Val Gly Val Tyr Ala Ala Gln Gly Glu Ile Ala Lys Ser Gln
85 90 95

50

Gly Cys Ala Pro Leu Arg Val Ala Glu Val Glu Glu Ile Val Arg Asp
100 105 110

55

Gly Leu Val Arg Ser His Phe His Asp Ser Gly Leu Ser Leu Gly Ser
115 120 125

Ile Arg Leu Val Leu Met Gln Val Gly Asp Lys Leu Gly Leu Gln Gly
130 135 140

60

Leu Lys Ile Gly Glu Gly Tyr Ala Thr Tyr Leu Ala Gln Ala Phe Ala
145 150 155 160

65

Asp Asn Val Val Val Ala Ala Asp Val Gln Ser Gly Gly Ala Cys Ser
165 170 175



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200801129

②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.04.2008

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DE LA FUENTE J. et al., "Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia Anaplasma marginale to host cells". Veterinary Microbiology (2003), 91, 265-283, todo el documento.	1-6
Y		7-12
Y	GARCIA-GARCIA J.C. et al., "Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with recombinant antigen Bm95 isolated from cattle tick, Boophilus microplus". Vaccine (2000), 18, 2275-2287, todo el documento.	7-12
Y	WO 0182957 A1 (UNIV FEDERAL VISCOSA) 08.11.2001	7-12
Y	DE LA FUENTE J. et al., "Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of Anaplasma marginale (Rickettsiaceae: Ehrlichieae)". Veterinary Parasitology (2001), 97, 65-76, todo el documento.	7-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.12.2010

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/63 (01.01.2006)

C12N15/70 (01.01.2006)

A01K39/02 (01.01.2006)

C07K14/29 (01.01.2006)

C07K14/435 (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A01K, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC,WPI,CAPLUS,MEDLINE,BIOSIS,EMBASE,EBI SEQUENCES DATABASES

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DE LA FUENTE J. ET AL., "Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia <i>Anaplasma marginale</i> to host cells". <i>Veterinary Microbiology</i> (2003), 91, 265-283, todo el documento	
D02	GARCIA-GARCIA J.C. ET AL., "Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with recombinant antigen Bm95 isolated from cattle tick, <i>Boophilus microplus</i> ". <i>Vaccine</i> (2000), 18, 2275-2287, todo el documento.	
D03	0182957 A1 (UNIV FEDERAL VISCOSA)	08.11.2001
D04	DE LA FUENTE J. ET AL., "Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of <i>Anaplasma marginale</i> (Rickettsiaceae: Ehrlichieae)". <i>Veterinary Parasitology</i> (2001), 97, 65-76, todo el documento.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención de la presente solicitud se refiere a un sistema de expresión de polipéptidos recombinantes sobre la superficie bacteriana, en particular de *E. coli*. Este sistema está caracterizado porque se utiliza como región de anclaje a la membrana la secuencia conservada N-terminal de la proteína MSP1a de *Anaplasma marginale*. En una realización preferente de la invención el polipéptido recombinante está formado por la fusión de la proteína quimera Bm95 a la región N-terminal de la proteína MSP1a mutante. El sistema de expresión se utiliza para elaborar vacunas.

1.- NOVEDAD

Las reivindicaciones 1-12 cumplen con el requisito de novedad.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

El documento D01 se refiere a la caracterización del dominio funcional de MSP1a implicado en la adhesión de *Anaplasma marginale* a las células huésped. Este documento describe el plásmido pAF0R1 que se utiliza para la expresión en *E. coli* de una proteína mutante MSP1a que carece de las repeticiones en tandem (figura 1). De acuerdo con este documento la estructura primaria deducida de MSP1a es consistente con proteínas de membrana. Según los resultados obtenidos por los autores parece que el motivo de dirección de la secreción y de anclaje a la membrana de *E. coli* se localiza en los diez aminoácidos situados a continuación de la primera repetición y antes de la primera región transmembrana. Esta es la única región que contiene pAF0R1. En este sentido los 10 aminoácidos situados antes de la primera región transmembrana pueden contener una señal de secreción y anclaje de *A. marginale*.

El documento D02 describe el aislamiento del gen Bm95 de la cepa A de *Boophilus microplus*. Este gen se utiliza para producir una proteína recombinante empleada como antígeno de una vacuna capaz de proteger al ganado frente a infecciones causadas por cepas de garrapatas sensibles y resistentes a Bm86. Este hecho sugiere que el antígeno Bm95 de la cepa A podría ser un antígeno de carácter más universal para proteger al ganado frente a infecciones causadas por cepas *Boophilus microplus* procedentes de diversas áreas geográficas.

El documento D03 describe el inmunógeno sintético de *Boophilus microplus* SBm7462 (SEQ ID Nº 2) cuya secuencia presenta una homología del 100% con la SEQ ID Nº 3 de la solicitud.

El documento D04 es un estudio molecular filogenético y biogeográfico de aislados norteamericanos de *Anaplasma marginale*. Una de las secuencias divulgadas en este documento presenta una homología del 100% con la SEQ ID Nº 1 de la solicitud.

A la luz del estado de la técnica definido por los documentos D01-D04 esta Oficina considera que las reivindicaciones 1-12 no cumplen el requisito de actividad inventiva.