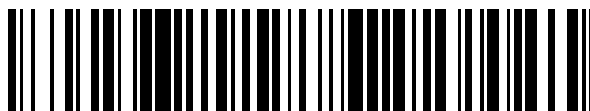


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 115**

51 Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2003 E 03742308 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 1546357**

54 Título: **Polipéptidos inmunogénicos de mycoplasma hyopneumoniae**

30 Prioridad:

28.06.2002 US 392632 P

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

28.10.2013

73 Titular/es:

**IOWA STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION, INC. (50.0%)**

310 Lab of Mechanics

Ames, IA 50011-2131, US y

**DEPARTMENT OF AGRICULTURE FOR AND ON
BEHALF OF THE STATE OF NEW SOUTH WALES
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**MINION, CHRIS F. y
DJORDJEVIC, STEVEN P.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 427 115 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

Polipéptidos inmunogénicos de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Antecedentes

1. Campo técnico

- 5 En la presente memoria se describen los métodos y materiales implicados en la protección de un animal contra neumonía enzoótica.

2. Información sobre antecedentes

10 La neumonía enzoótica en cerdos, también denominada neumonía micoplasmática, está provocada por *Mycoplasma hyopneumoniae*. La enfermedad es crónica y no fatal, afectando a cerdos de todas las edades. Aunque los cerdos infectados muestran únicamente síntomas ligeros de tos y fiebre, la enfermedad tiene un impacto económico significativo debido a una reducción de la eficacia de la alimentación y una reducción de la ganancia de peso. La neumonía enzoótica se transmite a través de organismos transportados por el aire expelidos de los pulmones de los cerdos infectados. La infección primaria de *M. hyopneumoniae* puede venir seguida de una infección secundaria de otras especies de *Mycoplasma*, p. ej., *Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma flocculare*, así como de otros patógenos bacterianos.

15 La *M. hyopneumoniae* infecta los conductos respiratorios de los cerdos, colonizando la tráquea, los bronquios y los bronquiolos. El patógeno produce un factor ciliostático que hace que los cilios que recubren los pasillos respiratorios dejen de moverse. Finalmente, los cilios degeneran, dejando a los cerdos con propensión a infecciones de patógenos secundarios. En los cerdos infectados se observan lesiones características de áreas de consolidación de color púrpura a gris. Muestreos en cerdos llevados a matadero revelaron lesiones en entre el 30% y el 80%. Los resultados de 37 piaras de 13 estados indicaron que el 99% de las piaras tenía cerdos con lesiones de neumonía típicas de la neumonía enzoótica. Por lo tanto, existe una necesidad por medidas efectivas preventivas y de tratamiento.

25 Los *Mycoplasmas* varían su estructura superficial mediante una serie compleja de eventos genéticos para presentar un mosaico estructural al sistema inmune del hospedante. El cambio de fase de las moléculas superficiales se produce a través de una variedad de mecanismos tales como cambios en el número de unidades repetitivas durante la replicación de ADN, inversiones genómicas, eventos de transposición y/o conversión génica. Véase, por ejemplo, Zhang y Wise, 1997, *Mol. Microbiol.*, 25: 859-69; Theiss y Wise, 1997, *J. Bacteriol.*, 179: 4013-22; Sachse et al., 2000, *Infect. Immun.*, 68: 680-7; Dybvig y Uy, 1994, *Mol. Microbiol.*, 12: 547-60; y Lysnyansky et al., 1996, *J. Bacteriol.*, 178: 5395-5401. Todos los genes identificados de variable de fase y cambio de fase en micoplasmas que codifican para proteínas superficiales son lipoproteínas.

Sumario

35 Se describen materiales y métodos para proteger un animal de la neumonía enzoótica. Se han descubierto ácidos nucleicos de *Mycoplasma hyopneumoniae* que codifican polipéptidos de superficie celular que pueden usarse para inducir una respuesta inmune protectora en un animal susceptible a la neumonía. Más específicamente, se describen polipéptidos inmunogénicos purificados de estos polipéptidos para uso como antígenos para provocar una respuesta inmune en un animal, p. ej. un cerdo. Adicionalmente, se describen ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos inmunogénicos para uso en la generación de una respuesta inmune en un animal. Los polipéptidos purificados y aislados descritos en la presente memoria pueden combinarse con vehículos farmacéuticamente aceptables para introducirlos en un animal. Se discuten los materiales y métodos para determinar si un animal tiene un anticuerpo reactivo a los polipéptidos descritos en la presente memoria.

40 En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido inmunogénico purificado de 8 a 30 aminoácidos de longitud, cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos ocho residuos consecutivos de una secuencia de SEQ ID NO: 8.

45 En otro aspecto, la invención proporciona mutantes del polipéptido inmunogénico descrito anteriormente, donde dichos polipéptidos mutantes retienen la inmunogenicidad y presentan una variación de aminoácido conservativa en comparación con el polipéptido natural.

Los polipéptidos inmunogénicos y los polipéptidos inmunogénicos mutantes de la invención incluyen al menos 8 residuos consecutivos (p. ej., al menos 10, 12, 15, 20 ó 25) de SEQ ID NO: 8.

50 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que incluye uno o más de los polipéptidos inmunogénicos o de los polipéptidos inmunogénicos mutantes de la invención descritos anteriormente.

En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende los polipéptidos inmunogénicos o los polipéptidos inmunogénicos mutantes descritos anteriormente de la invención para uso en provocar una respuesta

inmune en un animal. Dicha composición puede administrarse oralmente, intranasalmente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutáneamente o intravenosamente. Un animal representativo en el que se pueden introducir las composiciones de la invención es un cerdo.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido inmunogénico de 8 a 30 aminoácidos de longitud, cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos ocho residuos consecutivos de una secuencia de SEQ ID NO: 8 ó un mutante del polipéptido inmunogénico en el que el mutante presenta una variación de aminoácido conservativa en comparación con el polipéptido natural, y en el que el polipéptido mutante retiene la inmunogenicidad. Un ácido nucleico representativo que codifica dichos polipéptidos inmunogénicos presenta una secuencia de nucleótidos que es un fragmento de
10 SEQ ID NO: 7.

La invención también proporciona un vector que contiene un ácido nucleico de la invención. Un vector puede incluir además una secuencia de control de expresión ligada operativamente al ácido nucleico. La invención proporciona adicionalmente células hospedantes que comprenden dichos vectores. La invención además proporciona una composición que incluye dichos vectores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 En otro aspecto adicional, la invención proporciona una composición de la invención para uso en provocar una respuesta inmune en un animal. Dichas composiciones se pueden administrar oralmente, intranasalmente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutáneamente o intravenosamente. Generalmente, el animal es un cerdo.

20 En otro aspecto adicional, la invención proporciona un método para determinar si un animal tiene un anticuerpo reactivo frente a un polipéptido inmunogénico de la invención o no, comprendiendo dicho método: poner en contacto una muestra de ensayo procedente de dicho animal con el polipéptido inmunogénico en condiciones permisibles para la unión específica del polipéptido inmunogénico con el anticuerpo; y detectar la presencia o la ausencia de la unión específica, donde la presencia de unión específica indica que el animal tiene el anticuerpo, y la ausencia de la unión específica indica que el animal no tiene el anticuerpo.

25 Generalmente, una muestra de ensayo apropiada es un fluido biológico tal como sangre, fluido nasal, fluido de la garganta o fluido pulmonar. En algunas realizaciones, el polipéptido inmunogénico está unido a un soporte sólido tal como una placa de microtitulación, o bolitas de poliestireno. En algunas realizaciones, el polipéptido inmunogénico es marcado. A modo de ejemplo, la etapa de detección puede ser mediante radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo enzimático (EIA) o ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA).

30 En otro aspecto, la invención proporciona un kit de diagnóstico para detectar la presencia de un anticuerpo en una muestra de ensayo, donde dicho anticuerpo reacciona con un polipéptido inmunogénico de la invención, comprendiendo dicho kit uno o más de los polipéptidos inmunogénicos de la invención.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado entendido habitualmente por los especialistas en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o en la evaluación de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen más adelante. En caso de conflicto, la presente especificación, que incluye definiciones, será la que controle. Adicionalmente, los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y no pretender ser limitantes.

40 A partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones, se harán evidentes otras características y ventajas de la invención.

Descripción de las figuras

FIGURA 1: es la secuencia de ácido nucleico que codifica C2-mhp210 (SEQ ID NO: 1), un parálogo de P102 procedente de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

45 FIGURA 2: es la secuencia de polipéptido de C2-MHP210 (SEQ ID NO: 2) de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

FIGURA 3: es la secuencia de ácido nucleico que codifica C2-mhp211 (SEQ ID NO: 3) procedente de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

FIGURA 4: es la secuencia de polipéptido de C2-MHP211 (SEQ ID NO: 4) de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

50 FIGURA 5: es la secuencia de ácido nucleico que codifica C27-mhp348 (SEQ ID NO: 5), un parálogo de P102 procedente de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

FIGURA 6: es la secuencia de polipéptido de C27-MHP348 (SEQ ID NO: 6) de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

FIGURA 7: es la secuencia de ácido nucleico que codifica C28-mhp545 (SEQ ID NO: 7) procedente de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

FIGURA 8: es la secuencia de polipéptido de C28-MHP545 (SEQ ID NO: 8) de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

5 FIGURA 9: es la secuencia de ácido nucleico que codifica C28-mhp662 (SEQ ID NO: 9) procedente de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

FIGURA 10: es la secuencia de polipéptido de C28-MHP662 (SEQ ID NO: 10) de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

FIGURA 11: es la secuencia de ácido nucleico que codifica C28-mhp663 (SEQ ID NO: 11), un parálogo de P102 procedente de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

FIGURA 12: es la secuencia de polipéptido de C28-MHP663 (SEQ ID NO: 12) de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

10 FIGURA 13: es la secuencia de ácido nucleico que codifica C2-mhp036 (SEQ ID NO: 13), un parálogo de P102 procedente de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

FIGURA 14: es la secuencia de polipéptido de C2-MHP036 (SEQ ID NO: 14) de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

FIGURA 15: es la secuencia de ácido nucleico que codifica C2-mhp033 (SEQ ID NO: 15), un parálogo parcial de P102 procedente de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

15 FIGURA 16: es la secuencia de polipéptido de C2-MHP033 (SEQ ID NO: 16) de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

FIGURA 17: es la secuencia de ácido nucleico que codifica C2-mhp034 (SEQ ID NO: 17), un parálogo parcial de P102 procedente de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

FIGURA 18: es la secuencia de polipéptido de C2-MHP034 (SEQ ID NO: 18) de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*.

20 FIGURA 19: es la secuencia de ácido nucleico que codifica C28-mhp545 (SEQ ID NO: 19) procedente de la cepa J de *M. hyopneumoniae*.

FIGURA 20: es la secuencia de polipéptido de C28-MHP545 (SEQ ID NO: 20) de la cepa J de *M. hyopneumoniae*.

FIGURA 21: es la estructura de los parálogos de P102 y su organización en el cromosoma.

25 FIGURA 22: muestra un mapa y una representación de hidrofiliidad de P216. El panel superior representa un diagrama esquemático de la secuencia de proteína P216. Los asteriscos indican localizaciones de péptidos usadas para clonar el gen (izquierda, aminoácidos 94-105) y usados para fabricar antisueros específicos para P130 (derecha, aminoácidos 1654-1668). La flecha indica la posición del evento de ruptura principal. La caja gris indica la posición del fragmento de 30 kDa clonado y expresado (aminoácidos 1043-1226). Los triángulos sólidos invertidos son localizaciones de residuos de triptófano codificados por codones TGA. Las cajas con trama son la localización de los dominios de espiral enrollada. La caja blanca indica la localización del BNBD (aminoácidos 1012-1029). La caja negra representa el dominio transmembrana (aminoácidos 7-30). El panel inferior representa el gráfico de hidrofiliidad.

Descripción detallada

35 En esta solicitud se usan las siguientes abreviaturas: aa, aminoácido(s); Ab, anticuerpo(s); pb, par(es) base; CHEF, campo eléctrico homólogo fijado; H., *Haemophilus*; Kb, kilobase(s) ó 1.000 pb; Kn, canamicina; LB, medio Luria-Bertoni; M., *Mycoplasma*; mAb, Ab monoclonal; ORF, marco de lectura abierto; PCR, reacción en cadena de polimerasa; ^R, resistente/resistencia; Tn, transposón(es); ::, nueva unión (fusión o inserción). En la Tabla 1 se muestran los códigos de designación de una letra y de tres letras correspondientes a aminoácidos.

TABLA 1

Códigos de designación de aminoácidos					
Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra	Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	Ala	A	Leucina	Leu	L
Arginina	Arg	R	Lisina	Lys	K
Asparagina	Asn	N	Metionina	Met	M
Ácido Aspártico	Asp	D	Fenilalanina	Phe	F
Cisteína	Cys	C	Prolina	Pro	P

Códigos de designación de aminoácidos					
Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra	Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
Ácido Glutámico	Glu	E	Serina	Ser	S
Glutamina	Gln	Q	Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	G	Triptófano	Trp	W
Histidina	His	H	Tirosina	Tyr	Y
Isoleucina	Ile	I	Valina	Val	V

Polipéptidos y ácidos nucleicos de M. hyopneumoniae

- 5 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "polipéptido" se refiere a un polímero de tres o más aminoácidos ligados covalentemente mediante enlaces de amida. Un polipéptido puede ser modificado post-traduccionalmente o no. Tal como se usa en la presente memoria, el término "polipéptido purificado" se refiere a una
- 10 preparación de polipéptidos que está sustancialmente libre de material celular u otros polipéptidos contaminantes procedentes de la fuente celular o tisular de la cual deriva el polipéptido, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Por ejemplo, una preparación de polipéptido está sustancialmente libre de material celular cuando el polipéptido se separa de los componentes de la célula a partir de la cual se obtiene el polipéptido o se produce recombinantemente. Por tanto, una preparación de
- 15 polipéptido que está sustancialmente libre de material celular incluye, por ejemplo, una preparación que tiene menos de aproximadamente 30%, 20%, 10% ó 5% (en peso seco) de polipéptidos heterólogos (también denominados en la presente memoria "polipéptidos contaminantes"). Cuando un polipéptido se produce recombinantemente, el polipéptido también está preferiblemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20%, 10%, 5% del volumen de la preparación de polipéptido. Cuando un
- 20 polipéptido se produce mediante síntesis química, preferiblemente está sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, está separado de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis del polipéptido. Por consiguiente, dichas preparaciones de polipéptidos tienen menos de aproximadamente el 30%, 20%, 10%, 5% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos diferentes al polipéptido de interés.
- 25 Tal como se usa en la presente memoria, el término "mutante" se refiere a un polipéptido, o a un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que tiene una o más variaciones de aminoácidos conservativas u otras modificaciones menores tales que (1) el polipéptido correspondiente tiene una función sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido natural o (2) un anticuerpo levantado contra el polipéptido es inmunorreactivo con el polipéptido natural.
- 30 El término "variación conservativa" denota el reemplazamiento de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o el reemplazamiento de un nucleótido de una secuencia de ácido nucleico de tal modo que el residuo de aminoácido codificado no cambia o es otro residuo biológicamente similar. Los ejemplos de variaciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo hidrofóbico tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro residuo hidrofóbico, o la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por aspártico, o glutamina por Asparagina, y otros similares. El término "variación conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido de origen no sustituido siempre que los anticuerpos elevados para el polipéptido sustituido también inmunorreacten con el polipéptido no sustituido.
- 35 Se puede usar cualquier capa de *M. hyopneumoniae* como material de partida para producir los polipéptidos y ácidos nucleicos de la presente invención. Las cepas adecuadas de *M. hyopneumoniae* pueden obtenerse a partir de una variedad de fuentes, que incluyen repositorios tales como la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Va.) y la NRRL Culture Collection (Agricultural Research Service, Departamento de Agricultura de EE.UU., Peoria, Ill.). Las cepas de *M. hyopneumoniae* también pueden obtenerse a partir de secreciones o tejidos pulmonares de animales enfermos seguidos de la inoculación del medio de cultivo adecuado.
- 40 Un polipéptido inmunogénico de la presente invención tiene una longitud de 8-30 aminoácidos y comprende al menos 8 residuos consecutivos de la secuencia mostrada en la Figura 8. Un polipéptido inmunogénico de la presente invención puede ser un fragmento de un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 8. Un polipéptido inmunogénico de la invención tiene ocho o más aminoácidos de longitud. Por ejemplo, un polipéptido inmunogénico puede tener 10, 12, 15, 20, 25, 30 aminoácidos de longitud. Un polipéptido de la presente
- 45 invención también puede ser un mutante de un polipéptido de 8-30 aminoácidos de longitud y que comprende al menos 8 residuos consecutivos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 8. Las mutaciones a nivel de aminoácido o de ácido nucleico pueden ser útiles para mejorar el rendimiento de los polipéptidos, su inmunogenicidad o antigenicidad, o su compatibilidad con varios sistemas de expresión, adyuvantes y modos de

administración. Los fragmentos sintéticos o recombinantes de polipéptidos naturales o mutados se caracterizan por uno o más de los sitios antigénicos de los polipéptidos de *M. hyopneumoniae* nativos, cuyas secuencias se ilustran en las Figuras 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20.

Los polipéptidos de la presente invención pueden obtenerse a partir de células de *M. hyopneumoniae* o pueden producirse en células hospedantes transformadas con ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos. Los polipéptidos recombinantes producidos a partir de células hospedantes transformadas pueden incluir residuos que no están relacionados con *M. hyopneumoniae*. Por ejemplo, un polipéptido recombinante puede ser un polipéptido de fusión que contiene una porción de aminoácidos derivada de un vector de expresión, o de otra fuente, además de la porción derivada de *M. hyopneumoniae*. Un polipéptido recombinante también puede incluir una metionina de partida. Los polipéptidos recombinantes de la invención presentan la antigenicidad de un polipéptido de *M. hyopneumoniae*, cuya secuencia se ilustra en la Figura 8.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 8 de longitud completa se muestra en la Figura 7. La presente invención abarca secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos inmunogénicos de la invención, es decir, capaces de activar anticuerpos u otras respuestas inmunes (p. ej., respuestas de células T del sistema inmune) que reconocen epítomos del polipéptido que tiene una secuencia ilustrada en la Figura 8.

El término "ácido nucleico" tal como se usa en la presente memoria abarca ARN y ADN, que incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético (p. ej., sintetizado químicamente). El ácido nucleico puede ser de cadena doble o de cadena sencilla. Cuando es de cadena sencilla, el ácido nucleico puede ser la cadena sentido o la cadena antisentido. Adicionalmente, el ácido nucleico puede ser circular o lineal.

El término "aislado" tal como se usa en la presente memoria con referencia a ácido nucleico se refiere a un ácido nucleico natural que no es inmediatamente contiguo a ambas secuencias con las que es inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y otra en el extremo 3') en el genoma natural del organismo del cual deriva. Por ejemplo, un ácido nucleico puede ser, sin limitación, una molécula de ADN recombinante de cualquier longitud, siempre que se elimine o esté ausente una de las secuencias de ácido nucleico que normalmente se encuentran flanqueando inmediatamente a la molécula de ADN recombinante en un genoma natural. Así, un ácido nucleico aislado incluye, sin limitación, un ADN recombinante que existe como una molécula separada (p. ej., un ADNc o un fragmento de ADN producido mediante PCR o tratamiento de endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias, así como ADN recombinante que se incorpora en un vector, un plásmido replicante autónomamente, un virus (p. ej., un retrovirus, adenovirus o herpesvirus), o en el ADN genómico de un procarionte o un eucarionte. Además, un ácido nucleico aislado puede incluir una molécula de ADN recombinante que es parte de una secuencia de ácido nucleico híbrida o de fusión.

El término "aislado" tal como se usa en la presente memoria en referencia a ácido nucleico también incluye cualquier ácido nucleico no natural, ya que las secuencias de ácido nucleico no naturales no se dan en la naturaleza y no tienen secuencias inmediatamente contiguas en un genoma natural. Por ejemplo, se considera que un ácido nucleico no natural tal como un ácido nucleico modificado es un ácido nucleico aislado.

Se puede fabricar ácido nucleico modificado usando técnicas habituales de clonación molecular o de síntesis química de ácido nucleico. El ácido nucleico no natural aislado puede ser independiente de otras secuencias, o puede estar incorporado en un vector, un plásmido replicante autónomamente, un virus (p. ej., un retrovirus, adenovirus o herpesvirus), o el ADN genómico de un procarionte o un eucarionte. Adicionalmente, un ácido nucleico no natural puede incluir una molécula de ácido nucleico que es parte de una secuencia de ácido nucleico híbrida o de fusión.

Será evidente para los especialistas en la técnica que un ácido nucleico que existe entre cientos a millones de otras moléculas de ácido nucleico dentro de, por ejemplo, bibliotecas de ADNc o genómicas, o en tiras de gel que contienen digesto de restricción de ADN genómico, no debe considerarse un ácido nucleico aislado.

El término "exógeno" tal como se usa en la presente memoria en referencia a ácido nucleico y una célula particular se refiere a cualquier ácido nucleico que no tenga su origen en dicha célula particular tal como se encuentra en la naturaleza. Por tanto, el ácido nucleico no natural se considera exógeno para una célula una vez introducido en la célula. Es importante destacar que el ácido nucleico no natural puede contener secuencias o fragmentos de ácido nucleico de secuencias de ácido nucleico que se encuentran en la naturaleza siempre que el ácido nucleico completo no exista en la naturaleza. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de ADN genómico dentro de un vector de expresión es un ácido nucleico no natural, y por tanto es exógeno para una célula una vez introducido en la célula, ya que la molécula de ácido nucleico en su totalidad (ADN genómico más ADN vector) no existe en la naturaleza. De este modo, cualquier vector, plásmido replicante autónomamente o virus (p. ej., retrovirus, adenovirus o herpesvirus) que como un todo no exista en la naturaleza se considera que es un ácido nucleico no natural. Se deduce que los fragmentos de ADN genómico producidos mediante PCR o tratamiento de endonucleasa de restricción, así como de ADNc son considerados como ácido nucleico no natural, ya que existen como moléculas separadas no encontradas en la naturaleza. También se deduce que cualquier ácido nucleico que contenga una secuencia promotora y una secuencia codificadora de polipéptido (p. ej., ADNc o ADN genómico) en una disposición que no se da en la naturaleza es un ácido nucleico no natural.

Un ácido nucleico que existe en la naturaleza puede ser exógeno para una célula particular. Por ejemplo, un cromosoma completo aislado a partir de una célula de la persona X es un ácido nucleico con respecto a una célula de la persona Y una vez que el cromosoma ha sido introducido en una célula de Y.

También se proporcionan las moléculas de ácido nucleico recombinante que son útiles para la preparación de los polipéptidos mencionados anteriormente. Las moléculas de ácido nucleico recombinantes preferidas incluyen, sin limitación, (1) las que codifican polipéptidos inmunogénicos de la invención que tienen una secuencia de ácido nucleico que es un fragmento de la secuencia de la Figura 7; (2) vectores de clonación o de expresión que contienen secuencias que codifican polipéptidos recombinantes de la presente invención; (3) secuencias de ácido nucleico que se hibridan con las secuencias que codifican polipéptidos de *M. hyopneumoniae* de la invención; (4) secuencias de ácido nucleico degeneradas que codifican polipéptidos de la invención.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden insertarse en cualquiera de una amplia variedad de vectores de expresión mediante una variedad de procedimientos, generalmente a través del uso de un sitio apropiado de endonucleasa de restricción. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que consisten en segmentos de secuencias cromosomales, no cromosomales y de ácido nucleico sintético, tal como varios derivados conocidos de SV40; plásmidos bacterianos conocidos, p. ej., plásmidos de *E. coli* que incluyen colE1, pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados; plásmidos de espectro más amplio de hospedantes, p. ej., RP4; ADNs de fago, p. ej., los numerosos derivados del fago λ , p. ej., NM 989, y otros fagos de ADN tales como M13 o fagos de ADN de cadena sencilla filamentosos; plásmidos de levadura tales como el plásmido 2 μ o derivados del mismo; ADN vírico tal como baculovirus, vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar o pseudo-rabia; y vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADNs de fago, tales como los plásmidos que han sido modificados para emplear ADN de fago u otras secuencias de control de la expresión.

Dentro de cada vector de clonación o expresión específico, se pueden seleccionar varios sitios para la inserción de los ácidos nucleicos de la invención. Estos sitios normalmente son designados por la endonucleasa de restricción que los corta, y existen varios métodos conocidos para insertar ácidos nucleicos en dichos sitios para formar moléculas recombinantes. Estos métodos incluyen, por ejemplo, marcado con colas dG-dC o dA-dT, ligación directa, ligandos sintéticos, reacciones de reparación ligadas a exonucleasa y polimerasa seguidas de ligación, o extensión de la cadena de ácido nucleico con ADN polimerasa y una plantilla de cadena sencilla apropiada seguida de ligación. Debe entenderse que un vector de clonación o expresión útil en esta invención no necesita tener un sitio de endonucleasa de restricción para la inserción del fragmento de ácido nucleico elegido, y que la inserción se puede producir por medios alternativos.

Para la expresión de los ácidos nucleicos de esta invención, estas secuencias de ácido nucleico son ligadas operativamente a una o más secuencias de control de la expresión del vector de expresión. Dicha ligación operativa, que puede ser efectuada antes o después de que el ácido nucleico elegido sea insertado en un vehículo de clonación, permite a las secuencias de control de la expresión controlar y promover la expresión del ácido nucleico insertado.

Se puede usar cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión –secuencias que controlan la expresión de un ácido nucleico cuando están ligados operativamente a él– en estos vectores para expresar las secuencias de ácido nucleico de esta invención. Dichas secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, los sistemas lac o trp, el sistema TAC o TRC, el operador principal y las regiones promotoras de λ , las regiones de control de proteína de cubierta fd, el promotor para fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas, los promotores de ácido fosfatasa, p. ej. Pho5, los promotores de los factores de emparejamiento α de levadura, y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes en células procarióticas o eucarióticas o sus virus, y combinaciones diversas de los mismos. El vector de expresión también incluye una secuencia no codificadora para un sitio de unión a ribosoma para el inicio de la traducción y un terminador de transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión. En células de mamífero, adicionalmente es posible amplificar las unidades de expresión ligando el gen al que codifica para deshidrofolato reductasa y aplicando una selección para albergar células de ovario de hámster chino.

El vector o vehículo de expresión, y en particular los sitios elegidos en él para la inserción del fragmento de ácido nucleico seleccionado, y la secuencia de control de la expresión empleada en esta invención se determinan a través de una serie de factores, p. ej., el número de sitios susceptibles a una enzima de restricción particular, el tamaño del polipéptido que va a ser expresado, características de expresión tales como la localización de los codones de inicio y parada respecto a las secuencias de vector, y otros factores reconocidos por los especialistas en la técnica. La elección de un vector, secuencia de control de la expresión y/o sitio de inserción se determina mediante un equilibrio de estos factores, ya que no todas las selecciones son igualmente efectivas para un caso dado.

A continuación se puede emplear la molécula de ácido nucleico recombinante que contiene la secuencia codificadora deseada ligada operativamente a una secuencia de control de la expresión para transformar una amplia variedad de hospedantes apropiados de tal modo que permita a dichos hospedantes (transformantes) expresar la secuencia codificadora, o fragmento de la misma, y producir el polipéptido, o porción del mismo, para el cual codifica el ácido nucleico híbrido. La molécula de ácido nucleico recombinante también se puede emplear para transformar

un hospedante de tal modo que permita que se hospede en la replicación para producir moléculas adicionales de ácido nucleico recombinante como fuente de secuencias codificadoras de *M. hyopneumoniae* y fragmentos de las mismas.

Una amplia variedad de hospedantes también son útiles para producir polipéptidos y ácidos nucleicos de esta invención. Estos hospedantes incluyen, por ejemplo, bacterias tales como *E. coli*, *Bacillus* y *Streptomyces*, hongos tales como levaduras y células animales o vegetales en cultivos de tejido. La selección de un hospedante apropiado para estos usos está controlada por una serie de factores. Éstos incluyen, por ejemplo, la compatibilidad con el vector elegido, la toxicidad de los co-productos, la facilidad para recuperar el polipéptido deseado, las características de expresión, la bioseguridad y el coste. No se puede hacer una elección absoluta de hospedante para una molécula de ácido nucleico o polipéptido recombinante en particular a partir de uno solo de estos factores. En su lugar, se aplica un compromiso de estos factores evidenciando que no todos los hospedantes pueden ser igualmente efectivos para la expresión de una molécula de ácido nucleico recombinante particular.

También se entiende que las secuencias de ácido nucleico que son insertadas en el sitio seleccionado de un vector de clonación o de expresión pueden incluir nucleótidos que no son parte de la secuencia codificadora real para el polipéptido deseado o pueden incluir solo un fragmento de la secuencia codificadora completa para dicho polipéptido. Solo se requiere que, cualquiera que sea la secuencia de ADN empleada, el hospedante transformado produce un polipéptido que tiene la antigenicidad de los polipéptidos de *M. hyopneumoniae* nativos.

Por ejemplo, en un vector de expresión de esta invención, se puede fusionar un ácido nucleico de esta invención en el mismo marco de lectura a una porción de una secuencia de ácido nucleico que codifica para al menos un polipéptido vehículo eucariótico o procariótico o una secuencia de ácido nucleico que codifica para al menos una secuencia señal eucariótica o procariótica, o combinaciones de los mismos. Dichas construcciones pueden ayudar en la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada o a mejorar la purificación, permitir la secreción y preferiblemente la maduración del polipéptido deseado desde la célula hospedante. Alternativamente, la secuencia de ácido nucleico puede incluir un codón de inicio ATG, solo o junto a otros codones, fusionado directamente a la secuencia que codifica el primer aminoácido de un polipéptido deseado. Dichas construcciones permiten la producción, por ejemplo, de un metionilo u otro polipéptido de peptidilo que es parte de esta invención. Esta metionina o péptido N-terminal puede someterse entonces a ruptura intracelularmente o extracelularmente a través de una variedad de procesos conocidos, o el polipéptido se puede usar junto con la metionina u otra fusión unidad a ella en las composiciones y métodos de esta invención.

La secuencia de ácido nucleico apropiada presente en el vector cuando es introducido en un hospedante puede expresar parte o solo una porción del polipéptido que es codificado, siendo suficiente que el polipéptido expresado sea capaz de activar un anticuerpo u otra respuesta inmune que reconozca un epítipo de la secuencia de aminoácido mostrada en la Figura 8. Por ejemplo, al emplear *E. coli* como organismo hospedante, el codón UGA es un codón de parada de tal modo que el polipéptido expresado solo puede ser un fragmento del polipéptido codificado por el vector, y por lo tanto, generalmente se prefiere que todos los codones UGA se la secuencia de ácido nucleico apropiada sean convertidos en codones no de parada. Alternativamente, se puede introducir en el hospedante una secuencia de ácido nucleico adicional que codifica un ARN-t que traduce el codón UGA en un residuo de triptófano.

El polipéptido expresado por el hospedante transformado por el vector puede ser recolectado por métodos conocidos por los especialistas en la técnica, y usado para la protección de un animal no humano tal como cerdo, ganado vacuno, etc., contra neumonía enzoótica causada por *M. hyopneumoniae*. El polipéptido se usa en una cantidad efectiva para proporcionar protección contra neumonía enzoótica causada por *M. hyopneumoniae* y puede usarse en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable adecuado como se describe más adelante.

Detección de *M. hyopneumoniae*

Los polipéptidos de la presente invención también se pueden usar como antígenos para fines diagnósticos para determinar si una muestra de ensayo biológico contiene antígenos de *M. hyopneumoniae* o anticuerpos para estos antígenos. Dichos ensayos para infección de *M. hyopneumoniae* en un animal habitualmente implican incubar una muestra biológica que contiene anticuerpos procedente de un animal que se sospecha que padezca dicha afección en presencia de un polipéptido marcado detectablemente de la presente invención, y detectar la unión. El polipéptido inmunogénico generalmente está presente en una cantidad que es suficiente para producir un nivel detectable de unión con un anticuerpo presente en la muestra que contiene anticuerpos.

Por lo tanto, en este aspecto de la invención, el polipéptido se puede unir a un soporte en fase sólida, p. ej., una placa de microtitulación, que sea capaz de inmovilizar células, partículas celulares o polipéptidos solubles. A continuación se puede lavar el soporte con disoluciones tamponantes adecuadas seguido de un tratamiento con la muestra del animal. El soporte de fase sólida puede entonces ser lavado con el tampón una segunda vez para eliminar los anticuerpos no ligados. Se añade polipéptido marcado y se lava el soporte una tercera vez para eliminar los anticuerpos marcados no ligados. La cantidad de marca ligada sobre dicho soporte sólido se puede detectar a continuación empleando medios convencionales.

Con “soporte de fase sólida” se pretende indicar cualquier soporte capaz de ligar antígeno o anticuerpos. Los soportes, o vehículos, bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas (especialmente nitrocelulosa), poliacrilamidas, agarosa y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble en cierta medida o insoluble para los propósitos de la presente invención.

5 El material soporte puede presentar virtualmente cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Así, la configuración del soporte puede ser esférica, como en una bolita, o cilíndrica, con en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana tal como por ejemplo una hoja o tira de ensayo. Los soportes preferidos incluyen bolitas de poliestireno.

10 Los anticuerpos específicos de *M. hyopneumoniae* pueden marcarse de forma detectable ligando los mismos a una enzima y usándolos en un inmunoensayo enzimático (EIA), o en un ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA). Dicha enzima, a su vez, cuando sea expuesta más tarde a su sustrato, reaccionará con el sustrato de tal manera que producirá un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, a través de medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas que pueden usarse para marcar de forma detectable anticuerpos específicos de *M. hyopneumoniae* incluyen, aunque sin limitación, peroxidasa de rábano, malato deshidrogenasa, estafilococo nucleasa, delta-V-esteroide isomerasa, deshidrogenasa de alcohol de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, alcalino fosfatasa, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa.

20 La detección se puede realizar usando cualquiera de una variedad de inmunoensayos. Por ejemplo, marcando radiactivamente la proteína recombinante, es posible detectar la unión de anticuerpos a través de radioinmunoensayo (RIA). El isótopo radiactivo se puede detectar a través de medios tales como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo o mediante autorradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles para el propósito de la presente invención incluyen ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^{14}C , preferiblemente ^{125}I .

25 También es posible marcar el polipéptido recombinante con un compuesto fluorescente. Cuando el polipéptido marcado fluorescentemente es expuesto a luz de la longitud de onda apropiada, su presencia se puede detectar entonces debido a la fluorescencia. Entre los compuestos de marcado fluorescente usados más comúnmente se encuentran el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la ficoeriterina, la ficocianina, la aloficocianina, el o-ftaldehído y la fluorescamina. El polipéptido también puede marcarse de forma detectable usando la fluorescencia que emiten metales como el ^{152}Eu u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales se pueden unir a la proteína usando grupos quelantes de metales tales como el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

35 El polipéptido también se puede marcar de forma detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente o bioluminiscente. La presencia del polipéptido marcado quimioluminiscentemente se determina entonces detectando la presencia de la luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se da en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. Los ejemplos de compuestos de marca quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster teromático de acridinio, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato. Los compuestos bioluminiscentes importantes para los propósitos de marcado son la luciferina, la luciferasa y aequorina.

40 La detección de la marca se puede llevar a cabo mediante un contador de centelleo, por ejemplo, si la marca detectable es un emisor de radiación gamma, o mediante un fluorómetro, por ejemplo, si la marca es un material fluorescente. En el caso de una marca enzimática, la detección se puede llevar a cabo empleando métodos colorimétricos que usan un sustrato para la enzima. La detección también se puede llevar a cabo mediante comparación visual de la extensión de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones preparados de forma similar.

45 La detección de los focos de anticuerpos marcados de forma detectable es indicativa de una enfermedad o estado disfuncional y puede usarse para medir *M. hyopneumoniae* en una muestra. La ausencia de dichos anticuerpos o de otra respuesta inmune indica que el animal no ha sido ni vacunado ni infectado. Para los propósitos de la presente invención, la bacteria que es detectada a través de este ensayo puede estar presente en una muestra biológica. Se puede usar cualquier muestra que la contenga, sin embargo, uno de los beneficios de la presente invención diagnóstica es que se puede evitar la eliminación de tejido invasivo. Por lo tanto, preferiblemente, la muestra es un fluido biológico tal como, por ejemplo, sangre o fluido nasal, de la garganta o pulmonar, pero la invención no está limitada a ensayos que usen estas muestras.

55 La detección *in situ* se puede llevar a cabo eliminando un espécimen histológico de un animal, y proporcionando la combinación de anticuerpos marcados de la presente invención a dicho espécimen. El anticuerpo (o fragmento) preferiblemente se proporciona aplicando o superponiendo el anticuerpo (o fragmento) marcado sobre una muestra biológica. Mediante el uso de dicho procedimiento, es posible determinar no solo la presencia de *M. hyopneumoniae* sino también su distribución en el tejido examinado. Usando la presente invención, los especialistas en la técnica percibirán fácilmente que se puede modificar cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como los procedimientos de tinción) a fin de lograr la detección *in situ*.

Alternativamente, se puede evaluar una muestra (p. ej., una muestra de fluido o de tejido) para determinar la presencia de una secuencia que codifica para un polipéptido de *M. hyopneumoniae* de la invención mediante reacción con una secuencia de ácido nucleico recombinante o sintética contenida dentro de la secuencia mostrada en la Figura 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o cualquier secuencia de ARN equivalente a dicha secuencia de ácido nucleico. La ausencia de la secuencia codificadora indica que el animal no ha sido vacunado ni infectado. Este ensayo implica métodos de síntesis, amplificación o hibridación de secuencias de ácido nucleico que son conocidas por los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; *PCR, A Practical Approach*, Volúmenes 1 y 2, McPherson et al. (eds.), Oxford University Press, 1992 y 1995; y *PCR Strategies*, Innis (ed.), Academic Press, 1995.

Composiciones

La presente invención también contempla una composición (p. ej., una vacuna) que comprende los polipéptidos recombinantes de la presente invención, o secuencias de ácido nucleico que codifican estos polipéptidos, para inmunizar o proteger animales no humanos, preferiblemente cerdos, contra infecciones de *M. hyopneumoniae*, particularmente neumonía enzoótica. Los términos "proteger" o "protección" cuando se usan respecto a la composición para neumonía enzoótica descrita en la presente memoria significan que la composición previene la neumonía enzoótica provocada por *M. hyopneumoniae* y/o reduce la gravedad de la enfermedad. Cuando una composición provoca una respuesta inmunológica en un animal, el animal se considera seropositivo, es decir, el animal produce una cantidad detectable de anticuerpos contra un polipéptido de la invención. Los métodos para detectar una respuesta inmunológica en un animal son bien conocidos.

Las composiciones generalmente incluyen una dosis inmunológicamente efectiva de un polipéptido de la invención. Una dosis "inmunológicamente efectiva" es una cantidad que, cuando se administra a un animal, provoca una respuesta inmunológica en el animal pero no hace que el animal desarrolle síntomas clínicos graves de una infección. Un animal que ha recibido una dosis inmunológicamente efectiva es un animal inoculado o un animal que contiene un inoculante de una cantidad inmunológicamente efectiva de un polipéptido de la invención. Las dosis inmunológicamente efectivas se pueden determinar experimentalmente y pueden variar de acuerdo con el tipo, tamaño, edad y estado de salud del animal vacunado. La vacunación puede incluir una única inoculación o múltiples inoculaciones. Pueden ser útiles otros calendarios y cantidades de vacunación, incluyendo dosis de vacunas de refuerzo.

La composición puede emplearse en combinación con un vehículo, que puede ser cualquiera de una amplia variedad de vehículos. Los vehículos representativos incluyen agua esterilizada, disolución salina, disoluciones tamponadas, aceite mineral, alumbre y polímeros sintéticos. También se pueden usar agentes adicionales para mejorar las propiedades de suspensión y dispersión en una disolución. La selección de un vehículo adecuado depende de la manera en la que la composición vaya a ser administrada. La composición generalmente se emplea en animales no humanos que son susceptibles de contraer neumonía enzoótica, en particular, cerdos.

La composición se puede administrar mediante cualquier método adecuado, tal como inyección intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa. Alternativamente, la composición puede administrarse intranasalmente u oralmente, tal como mezclando los componentes activos con pienso o agua, o proporcionando una forma de comprimido. Son particularmente adecuados para la administración de un ácido nucleico métodos tales como el bombardeo de partículas, la microinyección, la electroporación, la transfección con fosfato cálcico, la transfección liposomal y la transfección vírica. Las composiciones de ácido nucleico y los métodos para su administración son conocidos en la técnica, y se describen en las Patentes de EE.UU. Nº 5.836.905; 5.703.055; 5.589.466 y 5.580.859. Otros medios para la administración de la composición serán evidentes para los especialistas en la técnica a partir de los contenidos de la presente memoria; por consiguiente, el alcance de la invención no está limitado a una forma de administración particular.

La composición también puede incluir componentes activos o adyuvantes (p. ej., adyuvante incompleto de Freund), además de el(los) antígeno(s) o fragmentos descritos anteriormente en la presente memoria. Se pueden usar adyuvantes para potenciar la inmunogenicidad de un antígeno. Entre los adyuvantes que pueden usarse se encuentran las emulsiones de aceite y agua, el adyuvante completo de Freund, el adyuvante incompleto de Freund, *Corynebacterium parvum*, *Hemophilus*, *Mycobacterium butyricum*, hidróxido de aluminio, sulfato de dextrano, óxido de hierro, alginato sódico, Bacto-Adyuvante, determinados polímeros sintéticos tales como poli aminoácidos y co-polímeros de aminoácidos, saponina, carragenina iota, RegressinTM, AvridineTM, Mannite monooleate, aceite de parafina y dipéptido de muramilo.

Las composiciones o vacunas de ácido nucleico o polipéptidos descritas en la presente memoria pueden combinarse con materiales de envasado que incluyan instrucciones de uso para su venta como artículos de fabricación o kits. Los componentes o métodos para producir artículos de fabricación son bien conocidos. Los artículos de fabricación pueden combinar una o más vacunas (p. ej., ácido nucleico o polipéptido) como las descritas en la presente memoria. En dichos kits se pueden incluir instrucciones que describan cómo una vacuna es efectiva para prevenir la incidencia de una infección de *M. hyopneumoniae*, prevenir la aparición de los síntomas clínicos de una infección de *M. hyopneumoniae*, aliviar los síntomas clínicos de una infección de *M. hyopneumoniae*, reducir el riesgo de los

síntomas clínicos de una infección de *M. hyopneumoniae*, reducir la aparición de los síntomas clínicos de una infección de *M. hyopneumoniae* y/o la propagación de infecciones de *M. hyopneumoniae* en animales.

Convenientemente, las vacunas de la invención pueden proporcionarse en una forma pre-ensvasada en cantidades suficientes para una dosis protectora para un único animal o para un número especificado de animales, por ejemplo, en ampollas selladas, cápsulas o cartuchos.

La aplicación de los contenidos de la presente invención a un problema o un entorno específicos se encuentra entre las capacidades del especialista en la técnica. En los siguientes ejemplos se muestran ejemplos de productos y procesos de la presente invención.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplos

A. P102 y sus parálogos

Ejemplo A.1 – Cepas de *Mycoplasma*

Las cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* usadas incluyeron la 232, la J y la Beaufort. La fuente y las condiciones de cultivo usadas para cultivar *M. hyopneumoniae* son como se describen en Scarman et al. (1997) *Microbiology* 143: 663-673.

Ejemplo A.2 – Clonación del gen que codifica P102

El gen que codifica P102 se obtuvo mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) y se clonó en pTrcHis (Invitrogen). Los oligonucleótidos TH130 y TH131 se usaron para amplificar la región que codifica los aminoácidos 33 a 887 de P102 a partir de pISM1217 como se describe en Hsu y Minion ((1998) *Infect. Immun.* 66: 4762-4766). El producto PCR que tenía los sitios de enzima de restricción 5' *Bam*HI y 3' *Pst*I fue digerido secuencialmente con *Bam*HI y *Pst*I, purificado en gel y ligado en ADN plásmido pTrcHis digerido con *Bam*HI/*Pst*I. La mezcla de ligación se transformó en *Escherichia coli* CSH50, y los transformantes fueron seleccionados para resistencia a ampicilina (100 µg por mL). El plásmido resultante se secuenció con el cebador SA1528 para confirmar la inserción y la orientación del injerto.

Se llevó a cabo una mutagénesis dirigida a sitio sobre la secuencia insertada para eliminar codones TGA, que codifican para triptófano en *Mycoplasmas*. Se llevó a cabo mutagénesis dirigida usando el kit *QuikChange Site-Directed Mutagenesis* de Stratagene (Stratagene, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cambiaron cinco codones TGA de la secuencia clonada a TGG usando los siguientes pares de cebadores:

P102.2f: 5'-GAT AAT TTT AAA AAA TGG TCG GCA AAA ACA GTT TTA ACT GCT GCC-3' (SEQ ID NO: 21);
P102.2r: 5'-GGC AGC AGT TAA AAC TGT TTT TGC CGA CCA TTT TTT AAA ATT ATC-3' (SEQ ID NO: 22);

P102.3f: 5'-GAA AGA GGA AGT AAT TGG TTT TCA CGA CTT GAA AGA GC-3' (SEQ ID NO: 23);
P102.3r: 5'-GCT CTT TCA AGT CGT GAA AAC CAA TTA CTT CCT CTT TC-3' (SEQ ID NO: 24);

P102.4f: 5'-CTA AAA TTC TAA AAT CCT GGC TTG AAA CAA ATC TTC AAG GC-3' (SEQ ID NO: 25);
P102.4r: 5'-GCC TTG AAG ATT TGT TTC AAG CCA GGA TTT TAG AAT TTT AG-3' (SEQ ID NO: 26);

P102.5f: 5'-GCC TCT CTG ATT ATT GGT ATG GAT CTC CGA ATT C-3' (SEQ ID NO: 27);
P102.5r: 5'-GAA TTC GGA GAT CCA TAC CAA TAA TCA GAG AGG C-3' (SEQ ID NO: 28);

P102.6f: 5'-GGG ACA AGC ATT TGG ACA GCT TTT AAT TTC G-3' (SEQ ID NO: 29);
P102.6r: 5'-CGA AAT TAA AAG CTG TCC AAA TGC TTG TCC C-3' (SEQ ID NO: 30);

E. coli XL1-Blue MRF⁺ fue el receptor para cada etapa de mutagénesis. Para confirmar la secuencia y los cambios de base individuales, y para determinar si se habían introducido errores durante las etapas de clonación y mutagénesis, se secuenció el producto final usando los cebadores:

P102.2-SEQ: 5'-TCC GAC GAT GAC GAT AAG-3' (SEQ ID NO: 31);

P102.5-SEQ: 5'-TGG AAA ATT AGT TCT TGG-3' (SEQ ID NO: 32);

P102.6-SEQ: 5'-AGT TTC CAC TTC ATC GCC-3' (SEQ ID NO: 33);

La construcción final se designó pISM1316.6.

Ejemplo A.3 – Expresión y purificación de P102

El plásmido pISM1316.6 se transformó en *E. coli* ER1458 (*F*⁻ Δ (*lac*)*U169 lon-100 hsdR araD139 rpsL (Str^R) supF mcrA trp⁺ zjj202::Tn10(Tet^R) hsdR2(*rk-mk*⁺) mcrB1*), un mutante de proteasa Lon, en preparación para la expresión

de proteína. Se diluyó 1:10 un cultivo de una noche en medio de supercaldo fresco (por litro; 32 g de Bacto triptona, 20 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro sódico, pH 7,3) que contiene isopropil tiogalactopiranoside (IPTG) y cóctel inhibidor de proteasa (Sigma P8848) a una dilución 1:200. El cultivo se incubó durante 5 horas a 30°C con agitación. Las células fueron recolectadas mediante centrifugación y resuspendidas en tampón TS (Tris 10 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 7,4) más urea 8 M y 2 mg/mL de lisozima. Tras incubar durante 30 minutos en hielo, la suspensión se congeló en un baño de etanol en hielo seco y se pasó secuencialmente a través de tres ciclos de congelación-descongelación. El ADN cromosomal se cortó haciendo pasar la suspensión a través de una aguja del 18, y los restos celulares insolubles se eliminaron mediante centrifugación. La disolución final se hizo pasar a través de una columna de resina *Talon Metal Affinity* (Clontech Laboratories, Inc., CA). La columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón TS que contenía imidazol 10 mM. La proteína ligada se eluyó con tampón TS que contenía imidazol 500 mM, y el eluyente de columna se dializó durante la noche contra salino tamponado con fosfato (Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4). Se determinó la pureza de las preparaciones de proteína mediante electroforesis de gel de dodecilsulfato sódico y mediante inmunotransferencia usando anticuerpos monoclonales 6xHis (Clontech).

Ejemplo A.4 – Generación de antisueros de P102

Se inmunizaron ratones con 10 µg de P102 purificado mezclado con 200 µL de adyuvante incompleto de Freund, y en el día 21 se administraron las segundas dosis. Se desarrolló ascitis mediante la introducción de células de mieloma Sp2 usando el método de Luo y Lin ((1997) *BioTechniques* 23: 630-632), y el fluido ascítico fue dividido en alícuotas y almacenado a -70°C. Se evaluó la especificidad de anticuerpos mediante análisis de inmunotransferencia usando proteína P102 purificada y antígeno completo de *M. hyopneumoniae*.

Ejemplo A.5 – Análisis microscópico inmunoelectrónico de secciones celulares marcadas con inmuno-oro

Para determinar si P102 está expuesto en la superficie o está asociado con la adhesina de cilio P97, se usó un antisuero anti-P102 policlonal mono específico en los siguientes estudios microscópicos inmunoelectrónicos para determinar la localización de P102 en la célula de *Mycoplasma*.

Las cepas de *M. hyopneumoniae* 90-1 y 60-3 fueron cultivadas en medio de Friis modificado (Friis (1971) *Acta Vet. Scand.* 12: 69-79) hasta la fase mid log según se ha descrito (Hsu *et al.* (1997) *J. Bacteriol.* 179: 1317-1323). Las células fueron peletizadas mediante centrifugación y lavadas una vez disolución salina tamponada de fosfato (PBS) mediante centrifugación. Las células fueron resuspendidas en PBS y a continuación se hicieron reaccionar con fluido ascítico anti-P102 diluido 1:50, o con sobrenadante de cultivo de células F1B6 (Zhang *et al.* (1995) *Infect. Immun.* 63: 1013-1019) diluido 1:10, durante una noche a 4°C. Al siguiente día, las células fueron lavadas cinco veces con PBS y se hicieron reaccionar entonces durante 30 minutos a temperatura ambiente con IgG anti-ratón de cabra + IgM marcado con partículas de oro de 10 nm (EY Laboratories, Inc., San Mateo, Calif.) diluidas 1:25. A continuación las células fueron lavadas cinco veces con PBS y peletizadas mediante centrifugación.

Los pelets celulares finales fueron fijados con glutaraldehído al 3% en tampón de cacodilato sódico 0,1 M (pH 7,2) a 4°C durante una noche. Los pelets fueron lavados tres veces, 15 minutos cada vez, con tampón de cacodilato sódico 0,1 M y post-fijados con tetróxido de osmio al 1% en tampón de cacodilato sódico 0,1 M durante 2 horas a temperatura ambiente. Entonces las partículas fueron lavadas con agua destilada, pasadas a través de una serie de acetona y embebidas en Embed 812 y Araldite (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA).

Para las secciones traqueales, se inocularon cerdos libres de *Mycoplasma* intratraquealmente con la cepa 232 de *M. hyopneumoniae* tal como se describe en Thacker *et al.* ((1997) Potentiation of PRRSV pneumonia by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. En *Conference of Research Workers in Animal Diseases*. Ellis, R.P. (ed.) Chicago, IL: Iowa State University Press, pág. 190). Tras 10 y 21 días, los cerdos fueron sacrificados y se extrajeron las tráqueas. Se fijaron bloques de tejido de un cm con glutaraldehído al 1% durante una noche, se deshidrataron en una serie de acetona y se embebieron como se ha indicado anteriormente. Se tiñeron secciones gruesas (1-2 µm) con azul de metileno policromo y se examinaron mediante microscopía para determinar regiones que contenían epitelio ciliado. A continuación se prepararon secciones finas (80-90 nm) para marcado. Para algunos estudios, se embebieron células cultivadas *in vitro* y se seccionaron antes de la tinción. Las secciones fueron pretratadas con cloruro de amonio (1%) durante 1 hora, glicina 0,05 M en PBS durante 15 minutos, y se bloquearon durante 30 minutos en gelatina de pez al 2% + albúmina de suero bovino al 2% en tampón TS (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5). Los anticuerpos primarios fueron diluidos (1:50) en tampón TS y se hicieron reaccionar con secciones durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las secciones fueron lavadas seis veces con tampón TS, y a continuación se incubaron con IgG anti-ratón de cabra + IgM marcada con partículas de oro de 10 nm (diluido 1:2) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se diluyeron los anticuerpos primarios y el conjugado y se centrifugaron brevemente (12.000 x g durante 5 minutos) para eliminar los agregados de oro antes de su uso. A continuación se lavaron las secciones seis veces con tampón TS, se secaron, se sometieron a contraste con vapores de osmio durante 2 minutos y se tiñeron con acetato de uranilo-citrato de plomo. Las secciones se examinaron en un microscopio electrónico Hitachi 500 a 75 kV.

En las células cultivadas *in vitro*, se observó que las partículas de oro estaban externas respecto a las células y estaban asociadas principalmente a la matriz extracelular. Se observaron resultados similares para las células

teñidas antes o después de la fijación y el seccionamiento. Ocasionalmente, se observaron partículas asociadas con la superficie celular, y en raras ocasiones se observaron partículas intracelularmente. En las células asociadas con cilios porcinos, sin embargo, se observaron partículas de oro intracelularmente con una concentración elevada. También se observó P102 en asociación con cilios porcinos, a menudo en agregados o a elevadas concentraciones. La matriz extracelular que era tan prominente en células cultivadas en caldo no era evidente en las secciones de epitelios de cerdos infectados.

Ejemplo A.6 – Electroforesis bi-dimensional

Se llevó a cabo una electroforesis de gel bi-dimensional (2-DGE) esencialmente como se describe en Guerreiro et al. ((1997) *Mol. Plant Microbe Interact.*, 10:506-16). Se prepararon tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) de la primera dimensión (180 mm, pH lineal y no lineal 3-10 y pH lineal 4-7 y 6-11; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) para enfocar para la inmersión en tampón de hidratación (urea 8 M, CHAPS al 0,5% p/v, DTT al 0,2% p/v, Bio-Lyte al 0,52% p/v y una traza de azul de bromofenol) durante una noche. Se diluyó proteína de célula completa de *M. hyopneumoniae* (100 µg para geles analíticos, 0,5-1,0 mg para geles preparativos e inmunotransferencias) con tampón de muestra (urea 8 M, CHAPS al 4% p/v, DTT al 1% p/v, Bio-Lyte 3-10 al 0,8% p/v, Tris 35 mM, y azul de bromofenol al 0,02% p/v) hasta un volumen de 50 a 100 µL para aplicación a un extremo anódico de cada tira IPG. Se llevó a cabo el enfoque isoeléctrico con una unidad de electroforesis Multiphor II (Pharmacia) para 200 kVh a 20°C excepto para las tiras de pH 6-11, que fueron sometidas a electroforesis para 85 kVh. Las tiras IEF fueron reducidas y alquiladas en Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8) que contenía urea 6 M, 30% p/v de glicerol, 2% p/v de dodecilsulfato sódico (SDS), 2% p/v de DTT y 0,02% de azul de bromofenol. Las tiras equilibradas fueron colocadas en ExcelGels de Pharmacia (T = 12 a 14% de acrilamida) para SDS-PAGE usando el Multiphor II. Las condiciones electroforéticas consistieron en 200 voltios durante 1,5 horas seguido de 4 horas a 600 voltios a 5°C. Los geles fueron teñidos en Azul de Coomassie R-250 (Bio-Rad, Hercules, CA) y las proteínas fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) usando una unidad de transferencia Hoefer TE70 Series SemiPhor Semi-Dry (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). La transferencia se llevó a cabo durante 1,5 horas a máximo voltaje y a una corriente medida multiplicando el área del gel (cm²) por 0,8 mA.

Ejemplo A.7 – Análisis post-separación

Las manchas de proteína fueron escindidas de los geles usando un escalpelo esterilizado y se colocaron en una bandeja de 96 pocillos. Las piezas de gel fueron lavadas con bicarbonato amónico 50 mM/acetronitrilo al 100% (60:40 v/v) y a continuación se secaron en una Speed Vac (Savant Instruments, Holbrook, NY) durante 25 minutos. A continuación las piezas de gel se hidrataron en 12 µL de 12 ng µL⁻¹ de tripsina modificada de grado de secuenciación (Promega, Madison, WI) durante 1 hora a 4°C. Se retiró la disolución de tripsina de exceso y las piezas de gel fueron sumergidas en bicarbonato amónico 50 mM e incubadas durante una noche a 37°C. Los péptidos eluidos fueron concentrados y desalinizados usando C₁₈Zip-TipsTM (Millipore Corp., Bedford, MA). Los péptidos fueron lavados en columna con 10 µL de ácido fórmico al 5%. Los péptidos ligados fueron eluidos del Zip-TipTM en disolución de matriz (10 mg mL⁻¹ de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico [Sigma] en acetronitrilo al 70%) directamente en la placa diana. Se adquirieron espectros de masas de espectrometría de masas de tiempo-en-vuelo de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) usando un PerSeptive Biosystems Voyager DE-STR (Framingham, MA) o un Micromass ToFSpec2E (Micromass, Manchester, R.U.). Ambos instrumentos estaban equipados con láseres de nitrógeno de 337 nm. Todos los espectros fueron obtenidos en modo reflectrón/extracción retardada, promediando 256 disparos de láser por muestra. Se llevó a cabo una calibración interna de espectro de dos puntos en base a péptidos de autólisis de tripsina porcina interna (iones [M+H]⁺ 842,5 y 2211,10). Se usó una lista de picos monoisotópicos correspondiente a la masa de péptidos tripticos generados para buscar una versión traducida modificada del genoma de *M. hyopneumoniae*. Las identificaciones exitosas se basaron en el número de masas de péptido coincidentes y en el porcentaje de cobertura de secuencia logrado por esas coincidencias. Se llevó a cabo un secuenciamiento N-terminal de Edman como se ha descrito previamente (Nouwens et al., 2000).

Ejemplo A.8 – P102 se expresa en superficie

Para generar un anticuerpo específico de P102, se expresó proteína P102 recombinante en *E. coli* y a continuación se purificó como se indica a continuación. La secuencia codificadora para P102 se obtuvo del plásmido pISM1217, que contenía la secuencia completa de P102 (Hsu y Minion (1998) *Infect. Immun.* 66: 4762-4766). La región de la secuencia codificadora que codifica los aminoácidos 33-887 se amplificó mediante PCR usando cebadores que tiene los sitios de restricción *Bam*HI y *Pst*I en los extremos 5' para permitir la clonación en pTrcHis. La construcción resultante fue designada pISM1249. Para permitir la expresión de la secuencia codificadora en *E. coli*, se alteraron los codones TGA de la secuencia de pISM1249 mediante mutagénesis dirigida a sitio a codones TGG. La construcción final pISM1316.6 se secuenció para confirmar estos cambios y para buscar errores introducidos mediante PCR durante la etapa de mutagénesis.

La expresión de la secuencia clonada en pISM1316.6 dio como resultado una proteína marcada con poli-histidina de aproximadamente 100 kDa. Los niveles de expresión de P102 fueron bajos en *E. coli* a pesar de la eliminación de los codones de parada de ópalo (TGA). Se usó una columna de resina *Talon Metal Affinity* para eliminar las proteínas de *E. coli* contaminantes durante la purificación. Se usó antisuero hiperinmune de ratón activado contra

esta proteína recombinante en análisis de inmunotransferencia de células completas de *M. hyopneumoniae*. El antisuero anti-P102 mostró tres bandas que indican la presencia de proteínas de reactividad cruzada o que el P102 estaba siendo procesado proteolíticamente. El tratamiento con tripsina de células enteras seguido de inmunotransferencia y desarrollo con el antisuero anti-P102 mostró que el P102 estaba localizado sobre la superficie de la membrana; todas las bandas inmunorreactivas fueron sensibles a tripsina.

Ejemplo A.9 – Se encuentran parálogos de P102 en el genoma de *M. hyopneumoniae*

Los estudios de hibridación indicaron que el P102 o secuencias relacionadas con P102 pueden existir en múltiples copias en el genoma de *M. hyopneumoniae* (Hsu et al. (1997) J. Bacteriol. 179: 1317-1323). Los estudios de secuenciamiento de genoma han identificado cuatro parálogos distintos de P102 (C2-mhp210, C27-mhp348, C28-mhp663 y C2-mhp036) y dos parálogos parciales (C2-mhp033 y C2-mhp034) distribuidos a lo largo del cromosoma (Figura 21). Un análisis adicional de la secuencia de genoma de *M. hyopneumoniae* reveló marcos de lectura abiertos adicionales con homologías variables a P102. Cada una de ellas parecía ser una fusión con un segundo gen, mientras que la secuencia original de P102 había sufrido una evolución significativa. Asimismo, cada parólogo era parte de una estructura genética de dos genes, posiblemente organizada en operones. En cada caso, el parólogo P102 era el segundo gen o más. El análisis de secuencia de ADN de cada uno de los parálogos de P102 demostró que la homología con el P102 era baja, pero la homología de aminoácidos era mucho mayor. Las secuencias de aminoácidos de los parálogos de P102 se muestran en las Figuras 2, 6, 12, 14, 16, 18 y 20.

Ejemplo A.10 – El marcado de biotina de proteínas accesibles superficialmente identificó moléculas que pertenecen a una familia multi-génica

Se llevaron a cabo estudios para identificar todas las proteínas accesibles superficialmente en *M. hyopneumoniae* reconocidas por sueros porcinos convalecientes e hiperinmunes. Combinando biotilación superficial, inmunotransferencia bi-dimensional, análisis genómico y proteómico, se mapeó un subconjunto de estas moléculas superficiales a la secuencia de genoma de *M. hyopneumoniae*.

Inicialmente, la electroforesis de gel bi-dimensional de proteínas biotiniladas identificó grupos de proteínas que estaban expuestas superficialmente, altamente expresadas y que parecían resolverse a lo largo del gradiente de pI como una serie de manchas. Las masas moleculares de estas proteínas oscilaban entre 40 y 130 kDa. Muchas de estas proteínas fueron reconocidas mediante sueros porcinos convalecientes e hiperinmunes. Esto sugiere que estas proteínas fueron expresadas durante la infección de *M. hyopneumoniae* y evocaron una respuesta inmune acompañante.

Se analizaron los fragmentos trípticos de manchas individuales de proteínas mediante huella dactilar de masas de péptido, y los espectros se ajustaron a los productos de ruptura de tripsina teóricos generados a partir de la base de datos del genoma de *M. hyopneumoniae*. Algunas de las manchas de diferentes masas moleculares fueron mapeadas al mismo gen copia individual.

Ejemplo A.11 – Los estudios de huella dactilar de masas de péptidos y de biotilación demuestran que los parálogos de P102 son expresados

Muchas de las proteínas identificadas mediante biotilación y huella dactilar de masas de péptidos se relacionaron con los productos del operón de adhesión de cilios (Hsu y Minion (1998) *Infect. Immun.* 66: 4762-4766). Además de la adhesina P97 de cilios, se identificaron productos génicos que representan P102 y proteínas relacionadas.

A.12 – Resultados

Los resultados indicaron que había un número sorprendente de parálogos de P102 que fueron expresados todos y que estaban localizados sobre la superficie del organismo. Alguno de los parálogos de P102 presentaba un mayor grado de identidad de secuencia con P97, mientras que otros parálogos de P102 no. Ninguna de las secuencias que rodean a los parálogos de P102 eran similares, lo que sugiere que los genes de P102 se duplicaron y se movieron independientemente de las secuencias que los rodeaban. Se observó una tinción diferencial de organismos cultivados *in vitro* y de organismos cultivados *in vivo*, lo que sugiere adicionalmente que el P102 podría estar implicado en las respuestas de tipo hiperinmune observadas durante la infección.

B. Estudios de p216

Ejemplo B.1 – Cepas y cultivo de *Mycoplasma*

La fuente y las condiciones de cultivo usadas para cultivar cepas de *M. hyopneumoniae* J, Beaufort y 232 son como se describe en Scarman et al. ((1997) *Microbiology* 143: 663-673). Los *Mycoplasmas* fueron recolectados mediante centrifugación a 10.000 x g, lavados tres veces con tampón TS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) y los pellets de células finales fueron congelados a -20°C hasta su uso.

Ejemplo B.2 – Electroforesis preparativa

Ensayos preliminares de vacunas en cerdos inmunizados con antígenos fraccionados por tamaño de *M. hyopneumoniae* indicaron que grupos de antígenos que residen en dos fracciones, las fracciones 2 (85-150 kDa) y 3 (70-85 kDa), proporcionaron una protección limitada contra una exposición virulenta (Djordjevic et al. (1997) *Aust Vet J.* 75: 504-511). Para determinar las secuencias de aminoácidos de proteínas que residen en estas fracciones de masa molecular, se separaron lisatos de células enteras de la cepa J de *M. hyopneumoniae* usando columnas de resolución de 5-7% de poliacrilamida cada una con un 4% de gel de relleno usando un BioRad 491 Prep Cell como se describe en Scarman et al. ((1997) *Microbiology* 143: 663-673). Las proteínas que corresponden a las definidas para las fracciones 2 y 3 se agruparon, se concentraron mediante filtración y se resuspendieron en PBS. Las fracciones de proteínas fueron digeridas con tripsina, separadas usando electroforesis en geles premoledados de Tricina con un 8-15% de gradiente (Novex), y a continuación transferidas a membrana de PVDF (BioRad, California, EE.UU.) (Towbin et al. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354). Se analizaron las fracciones de proteínas mediante (1) reacción con sueros hiperinmunes porcinos activados contra la cepa J de *M. hyopneumoniae* y (2) tinción con negro amido. Los fragmentos típicos teñidos con negro amido que reaccionaron con los sueros hiperinmunes fueron analizados mediante secuenciamiento de aminoácidos N-terminales.

Ejemplo B.3 – Clonación del gen que codifica P216

Para clonar los genes que codifican proteínas inmunorreactivas, se diseñaron sondas de oligonucleótidos degenerados a partir de secuencias de péptidos N-terminales determinadas anteriormente y usadas para sondear ADN cromosomal digerido por *EcoRI* mediante inmunotransferencia (Southern (1975) *J. Mol. Biol.* 98: 503-517). El ADN cromosomal digerido por *EcoRI* procedente de la cepa Beaufort fue separado en una columna de agarosa al 1% preparada en 491 Prep Cell según la Nota Técnica de BioRad N° 2203. Se inmunotransfirieron muestras de cada quinta fracción a una membrana de nylon y se sondearon con sondas de oligonucleótidos degenerados derivadas de secuencias N-terminales de fragmentos trípticos. Los fragmentos de ADN de fracciones reactivas fueron incubados con el fragmento Klenow y *Pfu* ADN polimerasa para generar extremos redondeados. Los fragmentos de ADN fueron ligados en pCR Script™ y transformados en XL10-Gold como se indica en las instrucciones del fabricante (Stratagene).

De este modo, el análisis de secuencia N-terminal de un fragmento de péptido tríptico de X kDa reconocido por hiperinmune porcina generó la secuencia ELEDNTKLIAPNIRQ (SEQ ID NO: 34). En base a esta secuencia de aminoácidos, se preparó un oligonucleótido degenerado que tiene la secuencia 5'-GAA (T/C)T(T/A) GAA GAT AAT AC(C/A/T) AAA TTA ATT GC(T/A) CCT AAT-3' (SEQ ID NO: 35) y se usó como sonda para identificar un fragmento de 4,5 kb que se hibride. El clon que contiene este fragmento de 4,5 kilobases se designó p216.

Ejemplo B.4 – Análisis de secuencia de ADN

Para el análisis de secuencia, se usó ADN plásmido purificado (Qiagen) o producto de PCR purificado a partir de agarosa usando el kit BRESA-CLEAN™ (Bresatec, Adelaide, Australia). Se obtuvieron cebadores de oligonucleótido comercialmente (Sigma), y el kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) para reacciones de secuenciamiento. Los resultados fueron analizados con un secuenciador automatizado Applied Biosystems Model 377.

El análisis de secuencia del fragmento clonado en p216 de la cepa Beaufort reveló un ORF grande que no coincidió significativamente con las secuencias depositadas en GenBank. El fragmento fue el extremo carboxi de un ORF de mayor tamaño, ya que el fragmento tenía un codón de parada pero no un codón de inicio ATG. La secuencia adicional en dirección 5' se obtuvo mediante PCR inversa, y la secuencia N-terminal final se obtuvo mediante PCR usando cebadores diseñados a partir de secuencias genómicas de la cepa 232. El ORF completo (C28-mpH545; véase la Figura 7) tenía una longitud de 5.637 pares base y codifica una proteína de 216 kDa designada P216 (C28-MPH545; véase la Figura 8). El ORF contenía 17 codones TGA, 12 de los cuales aparecieron en el extremo carboxi de 85 kDa.

El análisis Blastp de la secuencia génica completa reveló una identidad próxima con la secuencia génica parcial YX2 (N° de Acceso de GenBank AF279292) de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae* y una homología de secuencia limitada con la adhesina de cilio P97 (N° de Acceso de GenBank U50901) con un 21% de identidades, un 38% de positivos y un 19% de huecos (Expect = 4e-18). Se llevaron a cabo comparaciones de las secuencias de nucleótidos y de proteína derivada con la base de datos usando el paquete del Grupo de Genética de la Universidad de Wisconsin (GCG) versión 7, con acceso a través del Australian National Genomic Information Service (ANGIS, Universidad de Sídney) y MacVector (Scientific Imaging Systems, Eastman Kodak Co., New Haven, Conn.).

La secuencia de ADN que codifica el homólogo de P216 de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae* se obtuvo como parte de un proyecto de secuenciamiento de genoma. El análisis de transferencia Southern usando una sonda de oligonucleótido del extremo carboxi demostró que el genoma de *M. hyopneumoniae* contenía una única copia del gen que codifica la proteína de 216 kDa. El análisis Blastn con p216 y la base de datos de genoma de *M. hyopneumoniae* también identificó una única copia. La proteína tiene 1.879 aminoácidos, un pI de 8,51 y es altamente hidrofílica. Una búsqueda de motivos de proteína usando el algoritmo Prosite del servidor ISREC Profilescan (www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html) identificó un dominio de unión nuclear bipartito (BNBD) entre los aminoácidos 1012-1029.

Las secuencias de nucleótidos del gen p216 de *M. hyopneumoniae* de la cepa 232 y la cepa J se muestran en las Figuras 7 y 19, respectivamente.

Ejemplo B.5 – Generación de antisueros contra la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*

5 La preparación de suero hiperinmune porcino contra *M. hyopneumoniae* es como se describe en Scarman et al. (1997) *Microbiology* 143: 663-673. Resumidamente, se expusieron cerdos libres de *M. hyopneumoniae* a una preparación de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae* emulsificada en adyuvante completo de Freund, y dichos cerdos fueron sometidos a una segunda exposición un mes después con la misma preparación en adyuvante incompleto de Freund. Se monitorizaron las respuestas de suero hasta que se confirmó una respuesta anti-*M. hyopneumoniae* mediante ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA).

10 Ejemplo B.6 – Generación de antisueros policlonales de P216

Para generar antisueros policlonales monoespecíficos de P216, se examinó la secuencia de ADN que codifica P216 de la cepa 232 para determinar la presencia de codones TGA, ya que los codones TGA codifican triptófanos en *Mycoplasmas*. Se identificó una región que no contiene codones TGA y que codifica una proteína de 30 kDa (los aminoácidos 1043-1226). Se diseñaron cebadores de PCR para amplificar y clonar esta región en pCR Script™
15 formando el plásmido p216.1. El fragmento clonado a continuación fue clonado direccionalmente en pQE9 (Qiagen) mediante ligación de ADN de p216.1 digerido con *Bam*HI y *Hind*III para formar p216.2 La mezcla de ligación fue transformada en *Escherichia coli* M15[pREP4] según las instrucciones del fabricante (Qiagen). Se usó una hibridación de colonia que usa el sistema DIG (Roche) para identificar transformantes que contienen el fragmento apropiado.

20 Los cultivos de los transformantes que contenían p216.2 fueron cultivados en medio LB (Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) que contenía ampicilina (100 µg/mL) y canamicina (25 µg/mL) a 37°C con agitación. Para la expresión a partir de p216.2, los cultivos fueron tratados con isopropil-β-D-tiogalactopiranoside (IPTG) 1 mM después de alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6. Tras inducción durante 4 horas, las células fueron recolectadas mediante centrifugación a 4.000 x g durante 20 minutos. La purificación de la proteína marcada con His recombinante se logró usando resina Ni-NTA en condiciones desnaturalizantes como se describe en las instrucciones del fabricante (Qiagen).

La proteína recombinante purificada fue sometida a diálisis contra PBS que contenía un 5% de glicerol y se concentró usando polivinil-pirrolidona (Sigma). Se emulsificaron aproximadamente 5 mg de proteína purificada en un volumen de 250 µL con un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund (Sigma). La preparación se administró subcutáneamente a conejos en dos sitios y se administró una inmunización de refuerzo, preparada de forma similar, tres semanas después. La respuesta de suero contra el antígeno de inmunización se confirmó mediante análisis de inmunotransferencia.

De forma similar, se generaron antisueros de conejo dirigidos contra la secuencia N-terminal de P216 mediante inmunización con el péptido DFLTNGRTVLE (SEQ ID NO: 36) (aminoácidos 94-105 de P216) conjugados con hemocianina de lapa californiana. Las inmunizaciones de conejo se llevaron a cabo como se describe en Scarman et al. ((1997) *Microbiology* 143: 663-673).

Ejemplo B.7 – Análisis electroforéticos y de inmunotransferencia

Se llevaron a cabo análisis de electroforesis de gel de poliacrilamida de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y de inmunotransferencia como se describe en Laemmli (1970) *Nature* 227: 680-685 y en Towbin et al. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354, respectivamente. Los geles electroforéticos analíticos que contenían proteínas de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae* fueron teñidos con plata (Rabilloud et al. (1992) *Electrophoresis* 13: 264-266). Se tiñeron geles preparativos con Azul Brillante de Coomassie coloidal G-250 (0,1% de Azul Brillante de Coomassie G-250 p/v, 17% p/v de sulfato amónico, 34% de metanol v/v, 3% v/v de ácido orto-fosfórico). Los geles fueron destañados en ácido acético al 1% v/v durante una hora.

45 Se usó un análisis de inmunotransferencia para determinar si el P216 es reconocido por anticuerpos activados durante la infección natural usando sueros de campo de cerdo que se demostró que contenían anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* (Djordjevic et al. (1994) *Vet. Microbiol.* 39: 261-273). En estos experimentos se usó como antígeno la proteína recombinante de 30 kDa que representa los aminoácidos 1043-1226 de P216. Otros análisis de inmunotransferencia incluían transferencia mono- y bi-dimensionales de células enteras de *M. hyopneumoniae* usando conjuntos de sueros convalecientes de cerdo (transferencias 2D) y sueros de cerdo individuales (transferencias 1D). También se usaron sueros hiperinmunes de cerdo para realizar un escrutinio de proteínas inmunorreactivas en los análisis de inmunotransferencia mono- y bi-dimensionales. También se usaron antisueros de conejo generados contra la proteína recombinante de 30 kDa y el péptido DFLTNGRTVLE (SEQ ID NO: 36) específico para P130 para investigar el procesamiento de P216 en los experimentos de inmunotransferencia mono-
50 dimensionales.
55 dimensionales.

Ejemplo B.8 – Electroforesis de gel bi-dimensional

Se llevó a cabo una electroforesis bi-dimensional esencialmente como se describe en Guerreiro et al. ((1997) *Mol. Plant Microbe Interact* 10: 506-516). Se prepararon tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) de primera la dimensión (180 mm, pH 3-10 lineal y no lineal y pH 4-7 lineal; Pharmacia-Biotechnology, Uppsala, Suecia) se prepararon para enfocar mediante inmersión en tampón de rehidratación (urea 8 M, 0,5% p/v de CHAPS, 0,2% p/v de DTT, 0,52% p/v de Bio-Lyte y una traza de azul de bromofenol) durante una noche. Se diluyeron proteínas de células enteras de *M. hyopneumoniae* 232 (100 µg para geles analíticos, 0,5-1,0 mg para geles preparativos e inmunotransferencias) con tampón de muestra (urea 8 M, 4% p/v de CHAPS, 1% p/v de DTT, 0,8% p/v de Bio-Lyte 3-10, Tris 35 mM y 0,02% p/v de azul de bromofenol) hasta un volumen de 50 a 100 µL para aplicación en el extremo anódico de cada tira IPG. El enfoque isoelectrico se llevó a cabo con el kit Immobiline DryStrip en una unidad de electroforesis Multiphor II (Pharmacia-Biotechnology) para 200 kVh a 20°C. Posteriormente se prepararon tiras IEF para la segunda dimensión de electroforesis de gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) mediante equilibrado en Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8) que contenía urea 6 M, 30% p/v de glicerol, 2% p/v de dodecilsulfato sódico (SDS), 2% p/v de DTT y 0,02% de azul de bromofenol. Las tiras equilibradas fueron colocadas sobre geles ExcelGel de Pharmacia (T = 12 a 14% de acrilamida) para la separación de masas moleculares de proteínas de *M. hyopneumoniae* en una unidad Multiphor II. Las condiciones electroforéticas consistieron en 200 voltios durante 1,5 horas seguido de 4 horas a 600 voltios. Los geles se mantuvieron a 5°C durante todo el proceso.

Ejemplo B.9 – Huella dactilar de masas-espectrometría de masas de péptidos

Las manchas de proteínas fueron escindidas manualmente y colocadas en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las condiciones usadas para la digestión con tripsina y para la generación de huellas dactilares de masas de péptidos se describen en Nouwens et al. (2000) *Electrophoresis* 21: 3797-3809. Se llevó a cabo una etapa de purificación sobre los péptidos tripticos para proteínas con una pobre huella dactilar de péptido tal como se describe en Gobom et al. (1999) *J. Mass Spectrom.* 34: 105-116. Se asignaron identificaciones de proteína comparando las listas de picos generadas a partir de los datos de huellas dactilares de masa de péptidos con una base de datos que contenía los digestos tripticos teóricos de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*. Se usó el paquete Protein-Lynx (Micromass, Manchester, R.U.) para buscar en las bases de datos.

Ejemplo B.10 – Procesamiento de imágenes

Los geles y las inmunotransferencias fueron digitalizadas a 600 dpi con un escáner de lámpara UMAX PS-2400X usando Photoshop 3.0 (Adobe, Mountain View, CA). Se llevó a cabo la detección de manchas y la coincidencia de manchas de proteína gel-a-gel con el software MELANIE II (BioRad, Hercules, CA) ejecutado sobre OpenWindows 3.0. Se determinaron las masas moleculares aparentes mediante co-electroforesis con patrones de proteínas (Pharmacia-Biotechnology).

Ejemplo B.11 – Resultados de los análisis de electroforesis bi-dimensional y huella dactilar de masa de péptidos

Los análisis de electroferogramas bi-dimensionales identificaron dos agrupaciones de manchas que se alineaban a lo largo del gradiente de pI en un modo inusual. El análisis de huella dactilar de masas de péptidos de las manchas de cada agrupación demostró que las manchas tenían huellas dactilares de masas idénticas y por tanto derivaban de la misma molécula. La Agrupación 1 con una masa aproximada de 130 kDa fue mapeada a la región N-terminal de P216 a partir de la secuencia de genoma de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*. La agrupación 2 de aproximadamente 85 kDa fue mapeada al extremo carboxi del mismo ORF. Las proteínas fueron designadas P130 y P85, respectivamente. El pI de la agrupación 1 oscilaba entre 9,5 y 8,0, mientras que el pI de la agrupación 2 oscilaba entre 9,0 y 6,5. El análisis espectrométrico de masas indicó que el P216 fue dividido entre los aminoácidos 1004 y 1090, generando los dos fragmentos de 130 y 85 kDa.

Ejemplo B.12 – Resultados del análisis de inmunotransferencia

Las inmunotransferencias bi-dimensionales reaccionadas con sueros hiperinmunes porcinos revelaron una estructura compleja de manchas, dos de las cuales correspondían a P130 y P85. La P85 también fue fuertemente reconocida por un grupo de sueros convalecientes lo que demuestra que era un antígeno importante durante la enfermedad. Para investigar esto más detenidamente, se expresó una región de 30 kDa que se extiende entre los aminoácidos 1042 y 1226 de la P85, se purificó mediante cromatografía de afinidad de níquel y se transfirió a una membrana PVDF. Los sueros convalecientes individuales procedentes de cerdos que se sabía que eran positivos en un ELISA específico de *M. hyopneumoniae* reaccionaron con la proteína de 30 kDa, confirmando que la P216 es una molécula importante reconocida por la respuesta inmune del hospedante durante el transcurso normal de la infección. Los anticuerpos activados contra un péptido de 30 kDa que se extiende entre los aminoácidos 1042 y 1226 reaccionaron únicamente con el producto de ruptura de 85 kDa, lo que sugiere que la ruptura se produjo entre los aminoácidos 1004 y 1042. Los sueros activados contra el péptido N-terminal de P216 reconocieron solo P130.

Ejemplo B.13 – Procesamiento post-traduccion de P216 entre diferentes cepas de *M. hyopneumoniae*

Para investigar modelos de fragmentos de P216 en diferentes cepas de *M. hyopneumoniae*, se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia con el péptido N-terminal anti-P130 y antisueros anti-P30. Los anticuerpos activados contra el péptido N-terminal reconocieron P139 y varios péptidos de menor masa molecular en inmunotransferencias

mono-dimensionales de lisatos celulares completos de las cepas J y 232. El modelo de proteínas reconocidas por estos antisueros fue diferente entre las dos cepas. El suero activado contra el péptido de 30 kDa reconoció fuertemente un antígeno de 85 kDa en ambas cepas, J y 232, pero también reaccionó con una serie de proteínas débilmente reactivas. De forma similar, el modelo reconocido con el suero anti-30-kDa fue diferente entre J y 232.

5 Para determinar si se estaban produciendo diferentes eventos de ruptura post-traducciona l entre otras cepas de *M. hyopneumoniae*, se examinó mediante inmunotransferencia una colección de cepas procedentes de diferentes orígenes geográficos. El suero anti-30-kDa reaccionó fuertemente con un antígeno de 85 kDa y otras proteínas de menor masa molecular en inmunotransferencias de lisatos celulares completos procedentes de diferentes cepas de *M. hyopneumoniae*. Estas cepas representaron elementos aislados recuperados de diferentes localizaciones
10 geográficas de Australia y de diferentes países que incluyen los EE.UU., Gran Bretaña y Francia. El suero anti-P30, sin embargo, no reaccionó contra antígenos de inmunotransferencias de lisatos celulares completos de *Mycoplasmas* porcinos relacionados, p. ej. *Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma flocculare*, lo que sugiere que P216 es un antígeno específico de *M. hyopneumoniae*. Sueros convalecientes de diferentes cerdos también reconocieron la P30 recombinante purificada, lo que indica que P216 se expresa *in vivo*.

15 Ejemplo B.14 – Estudios de localización superficial

Se adoptaron varias estrategias para determinar si P216 y sus productos de ruptura estaban asociados a la superficie externa de la membrana. Éstas incluyeron digestión con tripsina y biotilación de la superficie celular.

Para los estudios de digestión con tripsina, todas las disoluciones y reservas de células de *M. hyopneumoniae* fueron pre-equilibradas a 37°C. Las células de *M. hyopneumoniae* (200 mg/mL en PBS) fueron divididas en alícuotas
20 (300 µL) en tubos eppendorf esterilizados a 37°C y se añadió tripsina hasta una concentración final que oscila entre 0,1 y 1.000 µg/mL. Las suspensiones fueron invertidas suavemente e incubadas a 37°C durante 20 minutos. Inmediatamente después de la incubación, las células fueron lisadas en tampón de Laemmli, calentadas a 95°C durante 10 minutos y analizadas mediante SDS-PAGE e inmunotinción. La tripsina digirió ambas, P85 y P130, de un modo dependiente de la concentración, pero no digirió la enzima intracelular lactato deshidrogenasa, un control para
25 la lisis espontánea de células (Strasser et al. (1991) *Infect. Immun.* 59: 1217-22). Esto sugiere que ambas porciones de P216 son accesibles superficialmente y sensibles a la digestión con tripsina.

Para aclarar este punto aún más, se llevó a cabo una biotilación superficial de *M. hyopneumoniae*. Se usó el método descrito por Meier et al. ((1992) *Anal. Biochem.* 204: 220-226) con las siguientes modificaciones. Todas las disoluciones fueron pre-congeladas a 4°C y todas las manipulaciones se llevaron a cabo en hielo. Los pellets de *M. hyopneumoniae* (200 mg de peso seco) fueron resuspendidos en 4 mL de tampón BOS (tetaborato sódico 10 mM en NaCl 0,15 M, pH 8,8). Inmediatamente después de la adición de 5 µL de NHS-biotina (10 mg/mL en dimetilsulfóxido), se dejó que la reacción transcurriera durante de 1 a 8 minutos con balanceo. Para determinar el
30 tiempo de reacción más adecuado, se extrajeron alícuotas a intervalos de 1 minuto durante 15 minutos. Se eligió un tiempo de reacción de 5 minutos para todos los estudios posteriores excepto cuando se indica lo contrario. Se detuvo la biotilación mediante la adición de 2 mL de NH₄Cl 0,1 M que sirvió para saturar la NHS-biotina no ligada.
35 Las células fueron recolectadas mediante centrifugación (8.500 x g, 10 minutos) y lavadas dos veces en tampón TKMS (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, KCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM y NaCl 0,15 M en PBS). Los productos fueron resueltos mediante electroforesis bi-dimensional.

Tanto P130 como P85 fueron biotiniladas fácilmente, lo que confirma que todas las partes de P216 eran accesibles
40 superficialmente.

Ejemplo B.15 – Extracciones con Triton X-100 y X-114

Se extrajeron proteínas integrales de membrana de 200 mg de peso húmedo de células completas con TX-114 esencialmente como describe Bordier ((1981) *J. Biol. Chem.* 182: 1356-1363). Las fases acuosa y detergente resultantes fueron recolectadas y analizadas mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. La actividad de partición
45 de fases del Triton X-114 provoca la separación de las moléculas hidrofóbicas en la fase detergente. Cuando se trató con Triton X-114, la P85 se quedó en el pellet insoluble que consistía en estructuras complejas de elevado peso molecular que (1) estaban asociadas a membrana y (2) carecían de la solubilidad de las proteínas citosólicas normales.

Para la extracción con Triton X-100, las células de *M. hyopneumoniae* pelletizadas (cepas J y Beaufort) (200 mg en peso húmedo) fueron resuspendidas en 10 mL de tampón TS que contiene fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM. Las proteínas fueron extraídas mediante la adición de Triton X-100 al 2% (Amersham Pharmacia Biotechnology) e incubadas a 37°C durante 30 minutos como se describe en Stevens y Krause ((1991) *J. Bacteriol.* 173: 1041-1050). Resumidamente, las suspensiones celulares de *M. hyopneumoniae* fueron centrifugadas (14.000 x g, 30 minutos) a 4°C. Se retiró la fase acuosa y el pellet se volvió a extraer como se ha indicado antes. El pellet insoluble y ambas
55 fases acuosas fueron analizadas mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia usando sueros anti-30 kDa activados contra el péptido DFLTNNGRVLE (SEQ ID NO: 36).

Con el fraccionamiento con Triton X-100, las proteínas de tipo citoesqueleto de elevado peso molecular permanecen insolubles, pero no se produce una partición de fases. Cuando se trata con Triton X-100, la P85 se particiona principalmente hacia la fase acuosa que contiene detergente, pero aproximadamente el 30% queda en el pellet. Estos datos indican que P216 puede formar estructuras oligoméricas extracelulares. La presencia de dominios de bobina enrollada en ambos fragmentos de P216 también apoya esta hipótesis.

C. Estudios de p97

Ejemplo C.1 – Cepas y plásmidos bacterianos

Se cultivaron las cepas de *M. hyopneumoniae* 232 (cepa original virulenta), 232_91.3 (clon altamente adherente), 232_60.3 (clon poco adherente) y cepa tipo J (NCTC 10110) en caldo de Friis modificado y se recolectaron como se describe en Zhang et al. ((1995) *Infect Immun* 63: 1013-1019) y Djordjevic et al. ((1994) *Vet Microbiol* 39: 261-273), respectivamente. Todos los medios de caldo fueron esterilizados por filtración a través de filtros de 0,22 µm, lo que eliminó la mayoría de la materia particulada. Los Mycoplasmas fueron recolectados mediante centrifugación y se lavaron intensamente para eliminar los contaminantes de medio remanentes. Se cultivó *Escherichia coli* TOP10 que contenía pISM405 en agar de Luria Bertani (LB) o en caldo LB (Sambrook et al., 1989) que contenía 100 µg mL⁻¹ de ampicilina. Se llevó a cabo la inducción de isopropil-β-D-tiogalactopiranoside (IPTG) mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. Los cultivos bacterianos fueron cultivados rutinariamente a 37°C y los cultivos líquidos se airearon mediante agitación a 200 rpm.

Ejemplo C.2 – Construcción y expresión de proteína de fusión de adhesina

Se construyeron proteínas de fusión hexa-histidil P97 usando el vector de clonación pTrcHis (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se usaron los cebadores FMhp3 (5'-GAA CAA TTT GAT CAC AAG ATC CTG AAT ATA CC-3' (SEQ ID NO: 37)) y RMhp4 (5'-AAT TCC TCT GAT CAT TAT TTA GAT TTT AAT TCC TG-3' (SEQ ID NO: 38)) para amplificar un fragmento de 3013 pb que representa los pares base 315-3321 de la secuencia génica que contiene los aminoácidos 105-1107. El fragmento fue digerido con *BclI* (secuencia subrayada) e insertado en el sitio *BamHI* del vector pTrcHisA. Se identificó una construcción con la orientación de fragmento apropiada mediante digestión de restricción. La proteína de fusión recombinante resultante de 116 kDa de P97-poli-histidina contenía las regiones de repetición R1 y R2, así como el sitio principal de ruptura en el aminoácido 195 de la secuencia de P97.

Ejemplo C.3 – Antisueros

El Mab F1B6 ha sido descrito (Zhang et al. (1995) *Infect. Immun.* 63: 1013-1019). El Mab F1B6 se une a la región R1 de la adhesina de cilios que tiene al menos 3 secuencias de repetición (Minion et al. (2000) *Infect. Immun.* 68: 3056-3060). Se usaron péptidos con las secuencias TSSQKDPST (ΔNP97) (SEQ ID NO: 39) y VNQNFKVKFQAL (NP97) (SEQ ID NO: 40) para activar anticuerpos contra P97/P96 y P22, respectivamente. Los péptidos fueron ligados a hemocianina de lapa californiana con el Kit *Pierce Imjet Maleimide Activated Immunogen Conjugation* (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Estos conjugados fueron usados a continuación para generar antisueros hiperinmunes de ratón mediante el método de Luo y Lin ((1997) *BioTechniques* 23: 630-632). Los antisueros resultantes fueron evaluados mediante ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA) usando conjugado de ovalbúmina-péptido y antígenos de P97 recombinantes purificados, y mediante inmunotransferencia con el antígeno recombinante P97. El antisuero activado contra los 28 kDa C-terminales (suero R2) de la adhesina de cilio de la cepa J ha sido descrito (Wilton et al. (1998) *Microbiology* 144: 1931-1943). Se adquirió comercialmente el Mab 2B6-D4 de ratón activado contra fibronectina humana (BD Biosciences, Pharmingen) como los anticuerpos Ig(H+L) anti-ratón de cabra conjugados a fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL). El IgG + IgM anti-ratón de cabra marcado con partículas de oro coloidal de 10 nm (EY Laboratories, Inc., San Mateo, CA) se usaron en estudios de microscopía electrónica de inmuno-oro.

Ejemplo C.4 – Análisis de inmunotransferencia

Se llevaron a cabo análisis de electroforesis de gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y de inmunotransferencia como se describe en Laemmli ((1970) *Nature* 227: 680-685) y en Towbin et al. ((1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354), respectivamente. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Micron Separations, Inc.). Para los experimentos de control de medios, se incubó P97 recombinante purificada con medios de Friis fresco y usado. Los medios usados se prepararon a partir de cultivo de fase logarítmica temprana que había sido centrifugado y filtrado a través de un filtro de 0,1 µm. Se diluyó P97 recombinante purificada (2,5 µg) en proporción 1:1 con 20 µL de disolución salina tamponada con fosfato en medio fresco o usado y se incubó durante una noche a 37°C. A continuación se cargaron diez µL de la mezcla en geles de SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se desarrollaron con Mab F1B6. Para la transferencia de ligandos, las manchas de PVDF se transfirieron, se bloquearon y se lavaron como se ha descrito previamente (Wilton et al. (1998) *Microbiology* 144: 1931-1943). Las manchas se expusieron a fibronectina humana (5 µg mL⁻¹) disuelta en tampón TS (tampón TS: Tris-HCl 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM) durante 1,5 h, se lavaron y se expusieron a 0,4 µg mL⁻¹ de Mabs de fibronectina anti-humana durante 1 h a temperatura ambiente. Las manchas se lavaron y se desarrollaron como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo C.5 – Tratamiento con tripsina de *M. hyopneumoniae*

Se trataron células de *M. hyopneumoniae* (0,5 g) con tripsina esencialmente como se ha descrito previamente (Wilton et al. (1998) *Microbiology* 144: 1931-1943). Resumidamente, se añadió tripsina a suspensiones celulares de *M. hyopneumoniae* a 0, 0,3, 0,5, 1,0, 3,0, 10, 50, 300 y 500 µg mL⁻¹ a 37°C durante 15 minutos. Inmediatamente después de la incubación, las suspensiones celulares fueron liadas en tampón de Laemmli y se calentaron a 95°C durante 10 minutos. Los lisatos fueron analizados mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia usando Mab F1B6.

Ejemplo C.6 – Electroforesis de gel bi-dimensional

La electroforesis de gel bi-dimensional (2-DGE) se llevó a cabo esencialmente como se describe en Cordwell et al. ((1997) *Electrophoresis* 18: 1393-1398). Se prepararon tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) de primera dimensión (180 mm, pH lineal 6-11; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) para enfoque mediante inmersión en tampón de muestra compatible con 2-DGE (urea 5 M, tiourea 2 M, 0,1% de anfólitos portadores 3-10, 2% p/v de CHAPS, 2% de p/v de sulfobetaina 3-10, tributil fosfina 2 mM (TPB; Bio-Rad, Hercules, EE.UU.)) durante una noche. Se diluyó proteína de célula completa de *M. hyopneumoniae* (250 µg) con tampón de muestra hasta un volumen de 100 µL para aplicación al extremo anódico de cada tira IPG a través de una copa aplicadora. Se llevó a cabo el enfoque isoelectrico con una unidad de electroforesis Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech) para 85 kVh a 20°C. Las tiras IPG fueron intercambiadas con detergente, reducidas y alquiladas en tampón que contenía urea 6 M, 2% de SDS, 20% de glicerol, TBP 5 mM, 2,5% v/v de monómero de acrilamida, cantidades traza de colorante de azul de bromofenol y Tris-HCl 375 mM (pH 8,8) durante 20 minutos antes de cargar la tira IPG sobre la parte superior de un gel de poli(acrilamida) de 20 cm x 20 cm de 8-18% de T, 2,5% de C (diacrilamida de piperacina). La electroforesis de segunda dimensión se llevó a cabo a 4°C usando 3 mA/gel durante 2 horas, seguido de 20 mA/gel hasta que el colorante de azul de bromofenol había atravesado el extremo del gel. Los geles se fijaron en metanol al 40%, ácido acético al 10% durante 1 hora y a continuación se tiñeron durante una noche en Sypro Ruby (Molecular Probes, Eugene, OR). Las imágenes fueron adquiridas usando un Molecular Imager Fx (Bio-Rad). A continuación los geles fueron teñidos doblemente en Azul de Coomassie G-250.

Ejemplo C.7 – Análisis post-separación

Las manchas de proteínas fueron escindidas de los geles usando un escalpelo esterilizado y se colocaron en una bandeja de 96 pocillos (Gobom et al. (1999) *J. Mass. Spectrom.* 34: 105-116). Los trozos de gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM/acrilonitrilo 100% (60:40 v/v) y a continuación se secaron en un Speed Vac (Savant Instruments, Holbrook, NY) durante 25 minutos. A continuación los trozos de gel fueron hidratados en 12 µL de 12 ng µL⁻¹ de tripsina modificada de grado de secuenciación (Promega, Madison, WI) durante 1 h a 4°C. El exceso de disolución de tripsina se eliminó y los trozos de gel se sumergieron en bicarbonato amónico 50 mM y se incubaron durante una noche a 37°C. Los péptidos eluidos fueron concentrados y desalinizados usando C₁₈ Zip-Tips™ (Millipore Corp., Bedford, MA). Los péptidos fueron lavados en una columna con 10 µL de ácido fórmico al 5%. Los péptidos ligados se eluyeron del Zip-Tip™ en disolución de matriz (10 mg mL⁻¹ de ácido α-ciano-4-hidroxycinámico [Sigma] en acetonitrilo al 70%) directamente sobre la placa diana. Se adquirieron espectros de masas de espectrometría de masas de tiempo-en-vuelo de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) usando un PerSeptive Biosystems Voyager DE-STR (Framingham, MA) o un Micromass ToFSpec2E (Micromass, Manchester, R.U.). Ambos instrumentos estaban equipados con láseres de nitrógeno de 337 nm. Todos los espectros fueron obtenidos en modo reflectrón/extracción retardada, promediando 256 disparos de láser por muestra. Se llevó a cabo una calibración interna de espectro de dos puntos en base a péptidos de autólisis de tripsina porcina interna (iones [M+H]⁺ 842,5 y 2211,10). Se usó una lista de picos monoisotópicos correspondiente a la masa de péptidos tripticos generados para buscar una versión traducida modificada del genoma de *M. hyopneumoniae*. Las identificaciones exitosas se basaron en el número de masas de péptido coincidentes y en el porcentaje de cobertura de secuencia logrado por esas coincidencias. Se llevó a cabo un secuenciamiento N-terminal de Edman como se ha descrito previamente (Nouwens et al. (2000) *Electrophoresis* 21: 3797-3809).

Ejemplo C.8 – Microscopía inmunoelectrónica

Se cultivaron células de la cepa 232 de *M. hyopneumoniae* hasta la fase logarítmica media, se peletizaron mediante centrifugación y se lavaron con disolución salina tamponada de fosfato (PBS). Los pellets celulares finales se fijaron con glutaraldehído al 3% en tampón de cacodilato sódico 0,1 M (pH 7,2) a 4°C durante una noche. Los pellets fueron lavados tres veces con tampón de cacodilato sódico 0,1 M, 15 minutos entre los cambios y se post-fijaron con tetróxido de osmio al 1% en tampón de cacodilato sódico 0,1 M durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación los pellets fueron lavados con agua destilada, se hicieron pasar a través de una serie de acetona y se embebieron en Embed 812 y Araldite (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Entonces se lavaron secciones pequeñas (80-90 nm) seis veces con tampón TS, y se hicieron reaccionar con fluido ascítico F1B6 (diluido 1:50), fluido ascítico anti-ΔNP97 (diluido 1:10), fluido ascítico anti-NP97 (diluido 1:10), o fibronectina anti-humana de ratón (diluida 1:25) durante una noche a 4°C. Las rejillas se lavaron cinco veces con tampón TS y a continuación se hicieron reaccionar con IgG anti-ratón de cabra + IgM marcada con partículas de oro coloidal de 10 nm (EY Laboratories, Inc.) diluido 1:25 durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación las células fueron

lavadas 5 veces con tampón TS, secadas, contrastadas con vapores de osmio durante 2 minutos y teñidas con acetato de uranilo-citrato de plomo. Se examinaron las secciones en un Hitachi 500 a 75 kV.

Para las secciones traqueales, se inocularon cerdos libres de micoplasma intratraquealmente con la cepa 232 de *M. hyopneumoniae*. En los días 10 y 21 los cerdos fueron sacrificados, se extrajeron las tráqueas y se fijaron bloques de 1 cm de tejido con glutaraldehído al 1% durante una noche, se deshidrataron en una serie de acetona y se embebieron como se ha indicado antes. Se tiñeron secciones gruesas (1-2 µm) con azul de metileno policromo y se examinaron mediante microscopía para determinar regiones que contenían epitelio ciliado. A continuación se prepararon secciones delgadas (80-90 nm) para marcado. Las secciones fueron pretratadas con cloruro amónico (1%) durante 1 h, glicina 0,05 M en PBS durante 15 minutos, bloqueadas durante 30 minutos en tampón TS (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) con 2% de gelatina de pez + 2% de albúmina de suero bovino. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en tampón TS y se hicieron reaccionar con secciones durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron seis veces con tampón TS, y a continuación se incubaron con IgG anti-ratón de cabra + IgM marcado con partículas de oro de 10 nm (diluido 1:2) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tanto los anticuerpos primarios como el conjugado fueron diluidos y centrifugados brevemente (12.000 x g durante 5 minutos) antes de su uso. Las secciones fueron lavadas a continuación seis veces con tampón TS, secadas, contrastadas con vapores de osmio durante 2 minutos y se tiñeron con acetato de uranilo-citrato de plomo. Las secciones se examinaron en un Hitachi 500 a 75 kV.

Ejemplo C.9 – Ensayo de unión de fibronectina

Placas de 96 pocillos Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Inc.) fueron recubiertas con 100 µL de fibronectina humana (Sigma, F 0895) a una concentración de 5 µg mL⁻¹ en carbonato sódico en 0,1 M. Las placas fueron incubadas a 4°C durante una noche, se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1% en PBS durante 2 h. A continuación las placas fueron incubadas con P97 recombinante purificada con o sin inhibidor a una concentración de 10 µg mL⁻¹. Los inhibidores evaluados fueron fibronectina humana intacta, el fragmento proteolítico de 45 kDa de fibronectina (Sigma, F 0162), el fragmento proteolítico de 30 kDa de fibronectina (Sigma, F 9911) y polímero RGD modificado (Sigma, 5022). Se añadieron a tubos Eppendorf con P97 recombinante purificada (10 µg mL⁻¹) a concentraciones de 37,5 µg mL⁻¹, 7,5 µg mL⁻¹ y 1,5 µg mL⁻¹, y se incubaron a 37°C durante 1 h. A continuación se transfirió la P97 recombinante más inhibidor a una placa recubierta de fibronectina, que entonces fue incubada a 37°C durante 2 h. La unión de P97 a fibronectina se determinó mediante ELISA con Mab F1B6. La densidad óptica a 405 nm era indicativa de la unión de P97 a los pocillos recubiertos de fibronectina. Se ensayaron tres réplicas por tratamiento de los diferentes experimentos. Se determinaron las diferencias estadísticas mediante el Modelo Lineal General con un contraste lineal basado en varianzas agrupadas.

Ejemplo C.10 – Resultados de electroforesis de gel bi-dimensional y espectrometría de masas

Estudios previos han demostrado que el producto génico para la adhesina de cilio de la cepa 232 (preproteína de 126 kDa, 1036 aminoácidos) sufre un evento de ruptura en el aminoácido 195 para producir lo que antes se pensó que era una molécula “madura” (Hsu et al. (1997) *J. Bacteriol.* 179: 1317-1323). Durante los estudios de mapeado de masas de péptido de las proteínas de la cepa J, se identificaron cuatro manchas de 22, 28, 66 y 94 kDa (posteriormente denominadas P22, P28, P66 y P94, respectivamente) que representaban diferentes fragmentos de la adhesina. Las secuencias N-terminales correspondientes a estas proteínas permitieron el alineamiento inequívoco con la preproteína de adhesina de cilios. La P94 de la cepa J, el homólogo de P97 de la cepa 232, se mapeó a una región que comienza inmediatamente por debajo del aminoácido 195 y hasta el final del ORF. Dos proteínas ubicadas próximas la una a la otra en 66 kDa presentaron mapas de masas idénticos y correspondían a una región que empieza inmediatamente por debajo del aminoácido 195 de la adhesina y acaba cerca de la repetición R1. El análisis de secuencia N-terminal de P66 mostró una secuencia de ADEKTSS (SEQ ID NO: 41) que es idéntica a la de P94. Los resultados de inmunotransferencia usando Mab F1B6 confirmaron que la P66 contiene R1. Por tanto, el evento de ruptura debe de producirse inmediatamente por debajo de la región de repetición R1. Estos datos sugieren que se había eliminado un fragmento con un tamaño de aproximadamente 28 kDa del extremo C en algunas moléculas de P94, aunque no en todas. Esta observación fue confirmada cuando se identificó un fragmento de 28 kDa que se mapeó al extremo C de la P94. También, las inmunotransferencias mono- y bi-dimensionales de las proteínas de la cepa J probadas con antisueros activados contra una proteína recombinante de 28 kDa que contenía R2 pero no R1 (Wilton et al. (1998) *Microbiology* 144: 1931-1943) reconocieron las proteínas P28 y P94. Previamente, se demostró que los antisueros activados contra un péptido recombinante C-terminal de 28 kDa de la adhesina reconocía la forma madura de este antígeno (93-97 kDa) en diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* y un fragmento de 28 kDa sólo en la cepa J (Wilton et al. (1998) *Microbiology* 144: 1931-1943). El mapeado de masas de péptido triptico demostró que los péptidos de P22 se mapearon a los primeros 190 aminoácidos de la preproteína de adhesina de 123 kDa. La secuencia N-terminal de P22 (SKKSKTF (SEQ ID NO: 42)) se alineó con los aminoácidos 2-8 del extremo N de la pre-proteína de 123 kDa, lo que sugiere que la ruptura del péptido líder hidrofóbico (aminoácidos 8-22) no es necesaria para la traslocalización de la adhesina de cilio a través de la membrana.

Los estudios de mapeado de masas de péptido comparativos de la cepa 232 identificaron dos manchas de 70 y 97 kDa, identificadas posteriormente como P70 y P97, respectivamente. Los mapas de masas representativos de P97 correspondieron a una región que comienza inmediatamente por debajo del aminoácido 195 y hasta el extremo del ORF y que correspondía al producto más abundante del gen de adhesina de la cepa 232 (Zhang et al. (1995) *Infect.*

Immun. 63: 1013-1019). De forma interesante, los mapas de masas representativos de P70 correspondían a una región que comenzaba inmediatamente por debajo del aminoácido 195 y acababa cerca de la repetición R1, un mapa que era virtualmente idéntico a P66 de la cepa J. La presencia de seis copias extra de la repetición R1 es la explicación más probable para la diferencia de masas entre P66 y P70 en las cepas J y 232, respectivamente. Consistentes con estos datos, las inmunotransferencias probadas con antisueros activados contra una proteína recombinante de 28 kDa que contenía R2 pero no R1 (Wilton et al. (1998) *Microbiology* 144: 1931-1943) reconocieron P97 pero no P70 ó P28. Además, P28 ó P22 no pudieron ser identificados en geles 2D de proteínas 232 resueltas mediante electroforesis de gel 2D en regiones en las que fueron identificadas en la cepa J. Esta variación no se debía a diferencias en la secuencia, ya que las secuencias de P22 eran idénticas en las dos cepas. Sin embargo, esto no era cierto para las secuencias de P28. La masa y el pI predichos para la P28 de la cepa 232 eran 24,6 kDa y 5,88, respectivamente, y para la P28 de la cepa J eran 26,0 kDa y 8,39. Era posible que la P28 no se observara en la cepa 232 debido al cambio de pI que provoca un desplazamiento de la localización de la proteína en el gel. También era posible que en la cepa 232 se produjera una ruptura adicional de P22 que no se daba en la cepa J.

Para descartar la posibilidad de que la ruptura fuera resultado de una actividad proteolítica en el medio usado para cultivar *M. hyopneumoniae*, se incubó P97 recombinante purificada con medio fresco y usado y a continuación se examinó para determinar la ruptura proteolítica mediante inmunotransferencia. Debido a que el medio contenía un 20% de suero porcino, había presentes grandes cantidades de inmunoglobulinas porcinas en las muestras de proteína, produciendo algo de tinción de fondo con el conjugado anti-ratón. Aún así estaba claro que ni el medio fresco ni el usado contenían actividad proteolítica capaz de romper P97 recombinante después de 12 horas de incubación a 37°C. Por tanto, la ruptura de la adhesina de cilio estaba mediada por actividades codificadas por micoplasma y no se debía a suero porcino o a otros componentes del medio.

Ejemplo C.11 – Sensibilidad a tripsina de productos de ruptura que contienen R1

Los análisis de inmunotransferencia de células de cepa J y 232 digeridos con diferentes concentraciones de tripsina se usaron para investigar la localización celular de fragmentos de ruptura que contienen R1. El Mab F1B6 reconoció típicamente proteínas con masas de 35, 66, 88, 94 y 123 kDa en la cepa J, observándose una estructura similar para la cepa 232. La exposición de *M. hyopneumoniae* a concentraciones de tripsina que oscilan entre 0,1 y 10 µg mL⁻¹ demostró una pérdida gradual de proteínas de las mayores masas moleculares. Concentraciones entre 10 y 50 µg mL⁻¹ dieron como resultado la pérdida de todas las proteínas inmunorreactivas (excepto una de 35 kDa), lo que indica que los fragmentos de adhesina que contienen R1 son accesibles superficialmente. La estructura de digestión de fragmentos de adhesina que contienen R1 fue consistente en experimentos repetidos, excepto en que el fragmento de 35 kDa no permanecía fiablemente resistente a tripsina a concentraciones por encima de 10 µg mL⁻¹. Manchas idénticas reaccionadas con antisueros activados contra lactato deshidrogenasa recombinante de *M. hyopneumoniae* (que se ha demostrado previamente que reside citosólicamente) (Strasser et al. (1991) *Infect. Immun.* 59: 1217-1222) y contra antisueros activados contra los fragmentos recombinantes de las subunidades A y D de piruvato deshidrogenasa demostraron que dichas proteínas permanecen detectables con concentraciones de tripsina de hasta 500 µg mL⁻¹. En los experimentos de control en los que las células fueron expuestas a tripsina, la lactato deshidrogenasa y la subunidad D de la piruvato deshidrogenasa se degradaron rápidamente.

Ejemplo C.12 – Resultados de microscopía electrónica de inmuno-oro

Estudios de microscopía electrónica de transmisión han demostrado que las cepas de alta y baja adherencia de *M. hyopneumoniae* difieren en su estructura de membrana exterior. Los clones altamente adherentes poseían fibrilos en la superficie exterior que parecían interconectarse con las células adyacentes; dichos fibrilos eran difíciles de detectar en los clones de baja adherencia (Young et al. (1994) "Isolation and characterization of high and low adherent clones of *Mycoplasma hyopneumoniae*". En IOM Letters. 10th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Volumen 3, Burdeos, Francia, pág. 684-685). Los antisueros generados contra regiones específicas de la adhesina permitieron el análisis de la ruptura in vivo usando microscopía electrónica de inmuno-oro. En estos estudios se usó la cepa virulenta 232 porque los resultados tendrían el máximo impacto en la comprensión de los mecanismos patogénicos. En estos estudios se usaron Mab F1B6 específicos de R1 y antisueros activados contra los péptidos TSSQKDPST (antisuero ΔNP97) (SEQ ID NO: 39) y VNQNFKVKFQAL (antisuero NP97) (SEQ ID NO: 40). Los Mab F1B6 permanecieron asociados a la membrana de micoplasma, pero no asociados íntimamente a la célula, lo que confirma una publicación previa (Zhang et al. (1995) *Infect. Immun.* 63: 1013-1019) y los estudios anteriores con tripsina. El antisuero ΔNP97 demostró que esta porción de la molécula está localizada distal respecto a la membrana en asociación con material extracelular de composición desconocida. En algunos casos, los anticuerpos parecieron definir estructura de tipo fibril unidas todavía a la membrana de la célula de micoplasma. Los anticuerpos de NP97 se agrupaban en agregados en localizaciones citosólicas, íntimamente con la superficie de la membrana, y también se observaron en sitios distantes de la superficie extracelular de la membrana celular.

Ejemplo C.13 – Resultados de unión de fibronectina

Puesto que la ruptura de la adhesina de cilios se produce en la posición de aminoácido 195 (Hsu et al. (1997) *J. Bacteriol.* 179: 1317-1323), no era fácilmente evidente cómo el resto de la adhesina podía permanecer asociada a la

célula y dirigir la unión a los cilios porcinos. Estudios de inmuno-oro demostraron que todos los cilios que se unen a epítomos de R1 permanecieron asociados a la célula en ausencia de la secuencia N-terminal hidrofóbica, pero aparentemente no insertados directamente en la membrana. Esto no es sorprendente, ya que ninguna otra región de la proteína tenía una hidrofobicidad suficiente para dirigir la inserción de la membrana (Hsu et al. (1997) *J. Bacteriol.* 179: 1317-13123). Se examinó la posibilidad de que otras proteínas desempeñen una función en la unión de fragmentos de proteína que contienen R1 de la adhesina de cilios a la membrana a través de interacciones proteína-proteína. El análisis de la secuencia de proteína predicha de la preproteína de adhesina de 123 kDa con el programa de ordenador COILS (<http://www.ch.embnet.org>) reveló que la proteína contenía tres dominios de bobina enrollada. Uno de éstos residía entre los aminoácidos 180 y 195 de P22 (ajustes de ventana de los aminoácidos 14, 21 y 28) y dos estaban localizados en P97 entre los aminoácidos 367 y 387 (ajuste de ventana 14) y 780-805 (ajuste de ventana 14 y 21). Se sabe que estos dominios median en las interacciones proteína-proteína. Adicionalmente, se pensó que los dominios R1 y R2 también podrían desempeñar una función en las interacciones con otras proteínas. Una proteína obvia para evaluar era la fibronectina, una proteína que se da en abundancia en todo el hospedante y que se ha demostrado que participa en otras interacciones bacteria-hospedante (Probert et al. (2001) *Infect. Immun.* 69: 4129-4133; Talay et al. (2000) *Cell Microbiol.* 2: 521-535; Rocha y Fischetti (1999) *Infect. Immun.* 67: 2720-2728; y Schorey et al. (1996) *Mol. Microbiol.* 21: 321-329).

Los estudios de transferencia de ligando confirmaron que la P97 recombinante ligaba fibronectina porcina. También se identificaron otras proteínas de unión de fibronectina en lisatos de variantes de *M. hyopneumoniae* de baja adherencia (banda 1) y de alta adherencia (banda 2) de la cepa 232 y en la cepa J (banda 3). Las cepas de 232 de baja y alta adherencia difieren en la ausencia de una banda de unión de fibronectina a aproximadamente 50 kDa, que también estaba presente en la cepa J.

También se llevaron a cabo ensayos de unión de fibronectina con fibronectina humana y adhesina de cilio recombinante purificada. La máxima inhibición se produjo con el dominio RGD modificado a las tres concentraciones evaluadas ($p < 0,001$). Como era de esperar, también se produjo una inhibición con fibronectina intacta ($p < 0,001$). De forma interesante, el fragmento purificado de fibronectina de 45 kDa potenció la unión a la máxima concentración evaluada.

Para investigar la(s) función(es) que puede tener la fibronectina en la unión de *M. hyopneumoniae* a células epiteliales respiratorias porcinas, se aplicaron anticuerpos anti-fibronectina a secciones de pulmón que muestran la cepa 232 de *M. hyopneumoniae* en estrecha asociación con cilios epiteliales respiratorios. Las partículas de oro se localizaron en regiones en las que las células de *M. hyopneumoniae* estaban íntimamente asociadas con cilios, sobre la superficie de cilios y sobre la superficie de células de *M. hyopneumoniae*.

D. Detección de la infección y composiciones inmunogénicas

Ejemplo D.1 – Detección de la infección de *M. hyopneumoniae* en cerdos

Los polipéptidos que muestran antigenicidad de *M. hyopneumoniae* de esta invención se pueden usar en métodos y kits diseñados para detectar la presencia de la infección de *M. hyopneumoniae* en piaras de cerdos, y por lo tanto para reconocer cerdos de una piara que han sido infectados con esta bacteria. Por ejemplo, los antígenos producidos por hospedantes transformados por moléculas de ácido nucleico recombinantes de esta invención, o anticuerpos activados contra ellos, se pueden usar en RIA o ELISA para estos propósitos. En un tipo de radioinmunoensayo, los anticuerpos contra uno o más de los antígenos de esta invención, activados en un animal de laboratorio (p. ej., conejos), se une a una fase sólida, por ejemplo, el interior de un tubo de ensayo. A continuación se añade el antígeno al tubo para unirse con el anticuerpo.

Una muestra de suero porcino, tomada de 1 de cada 10 a 20 cerdos por piara, junto con una cantidad conocida de anticuerpo de antígeno marcado con un isótopo de radioactivo, tal como yodo radiactivo, a continuación se añade al tubo recubierto con el complejo antígeno-anticuerpo. Cualquier anticuerpo de antígeno (un marcador para la infección de *M. hyopneumoniae*) del suero porcino competirá con el anticuerpo marcado por los tres sitios de unión del complejo antígeno-anticuerpo. Una vez que se ha permitido que el suero interaccione, el líquido de exceso es eliminado, se lava el tubo y se mide la cantidad de radiactividad. Un recuento radiactivo bajo indica un resultado positivo, es decir, que el suero porcino ensayado contiene anticuerpos de *M. hyopneumoniae*.

En un tipo de ensayo ELISA, se recubre una placa de microtitulación con uno o más antígenos de esta invención y a ésta se añade una muestra de suero porcino, de nuevo, de 1 de cada 10 ó 20 cerdos de la piara. Tras un periodo de incubación que permita la interacción de cualquier anticuerpo presente en el suero con el antígeno, la placa se lava y se añade una preparación de anticuerpos de antígeno, activada en un animal de laboratorio y ligada a una marca enzimática, se incuba para permitir que se produzca la reacción, y a continuación se vuelve a lavar la placa. Después de ello, se añade el sustrato enzimático a una placa de microtitulación y se incuba durante un periodo de tiempo para permitir que la enzima trabaje sobre el sustrato, y se mide la adsorbancia de la preparación final. Un cambio grande de la adsorbancia indica un resultado positivo, es decir, el suero porcino evaluado tenía anticuerpos para *M. hyopneumoniae* y estaba infectado con dicha bacteria.

Ejemplo D.2 – Composiciones inmunogénicas

5 Se pueden usar métodos estándares conocidos por los especialistas en la técnica para preparar composiciones inmunogénicas de polipéptidos y ácidos nucleicos de la presente invención para la administración a cerdos. Por ejemplo, el polipéptido de elección se puede disolver en disolución salina esterilizada. Para el almacenamiento a largo plazo, el polipéptido puede liofilizarse y a continuación reconstituirse con disolución salina esterilizada poco antes de la administración. Antes de la liofilización, se pueden añadir conservantes y otros aditivos estándares tales como los que proporcionan volumen, p. ej., glicina o cloruro sódico. También se puede administrar un adyuvante compatible con la composición.

10 Adicionalmente, se pueden preparar composiciones usando anticuerpos activados contra los polipéptidos de esta invención en animales de laboratorio, tal como conejos. Esta vacuna "pasiva" puede administrarse entonces a cerdos para protegerlos frente a la infección de *M. hyopneumoniae*. También se puede usar la incorporación directa de secuencias de ácido nucleico en células de hospedante para introducir las secuencias en las células del animal para la expresión de antígeno *in vivo*.

15 La descripción, figuras y ejemplos anteriores son solo ilustrativos de las realizaciones preferidas que encarnan los objetivos, características y ventajas de la presente invención. No se pretende que la presente invención esté limitada por las realizaciones ilustradas.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un polipéptido inmunogénico purificado con una longitud de 8 a 30 aminoácidos, cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos ocho residuos consecutivos de la secuencia de SEQ ID NO: 8 ó un mutante de dicho polipéptido inmunogénico, donde dicho mutante tiene una variación conservativa de aminoácido en comparación con el polipéptido de tipo natural y donde el polipéptido mutante retiene la inmunogenicidad.
- 2.** El polipéptido inmunogénico de la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 10 residuos consecutivos de una secuencia de SEQ ID NO: 8.
- 3.** El polipéptido inmunogénico de la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 12 residuos consecutivos de una secuencia de SEQ ID NO: 8.
- 10 **4.** El polipéptido inmunogénico de la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 15 residuos consecutivos de una secuencia de SEQ ID NO: 8.
- 5.** El polipéptido inmunogénico de la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 20 residuos consecutivos de una secuencia de SEQ ID NO: 8.
- 15 **6.** El polipéptido inmunogénico de la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos comprende al menos 25 residuos consecutivos de una secuencia de SEQ ID NO: 8.
- 7.** Una composición que comprende el polipéptido inmunogénico o el mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 8.** Un ácido nucleico aislado que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido inmunogénico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 20 **9.** El ácido nucleico de la reivindicación 8, donde dicha secuencia de nucleótidos es un fragmento de SEQ ID NO: 7.
- 10.** Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8 ó 9.
- 11.** El vector de la reivindicación 10, donde dicho ácido nucleico está ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión.
- 12.** Una célula hospedante que comprende el vector de la reivindicación 10 u 11.
- 25 **13.** Una composición que comprende el vector de la reivindicación 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 14.** La composición de la reivindicación 7 ó 13 para uso en la activación de una respuesta inmune en un animal.
- 15.** La composición de la reivindicación 14, donde dicha composición es para administración oral, intranasal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o intravenosa.
- 16.** La composición de la reivindicación 14 ó 15, donde dicho animal es un cerdo.
- 30 **17.** Un polipéptido inmunogénico purificado como el reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso como un antígeno para activar una respuesta inmune en un animal.
- 18.** Un ácido nucleico como el reivindicado en la reivindicación 8 ó 9 para uso en la generación de una respuesta inmune.
- 35 **19.** Un método para determinar si un animal tiene o no un anticuerpo reactivo con el polipéptido inmunogénico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo dicho método:

poner en contacto una muestra de ensayo procedente de dicho animal con dicho polipéptido inmunogénico en condiciones que permitan la unión específica de dicho polipéptido inmunogénico con dicho anticuerpo; y

detectar la presencia o la ausencia de dicha unión específica, donde dicha presencia de unión específica indica que dicho animal tiene dicho anticuerpo, y donde dicha ausencia de unión específica indica que dicho animal no tiene dicho anticuerpo.
- 40 **20.** El método de la reivindicación 19, donde dicha muestra de ensayo es un fluido biológico.
- 21.** El método de la reivindicación 20, donde dicho fluido biológico se selecciona del grupo que consiste en sangre, fluido nasal, fluido de garganta y fluido pulmonar.
- 22.** El método de la reivindicación 19, donde dicho polipéptido inmunogénico está unido a un soporte sólido.

23. El método de la reivindicación 22, donde dicho soporte sólido es una placa de microtitulación, o bolitas de poliestireno.

24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, donde dicho polipéptido inmunogénico está marcado.

5 **25.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, donde dicha detección es por radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo enzimático (EIA) o ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA).

26. Un kit diagnóstico para detectar la presencia de un anticuerpo en una muestra de ensayo, donde dicho anticuerpo es reactivo con el polipéptido inmunogénico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo dicho kit el polipéptido inmunogénico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

10

```

ATGAAAAAAA TACCTAATTT TAAAGGATTT TTTAATAAAC CAGCAAAAAAT TGTAAGTAGC ATTTTGCTTC TAAGTGGTAT TATAACTATT
TCAACTGCAA TTCCTTTAGG TATTTGGTCA TATAATCGCG CTTATTATCA AAAATTAAAT GAAAAATCAC AAAATTTAAG TATTAGTCAA
ACTGAAAAATC CCTTTGAAAA TAATCTTGGA AAATTCCTTG ATAATTTTATT CATTAGTAAT CAATTCAAAG AATTATCAGC TAGTACAGCA
TTTGAATTAG CAAAAAGCAA GATTTATAAT CTTGACCTTT TAACGTTAAT TAATCTTGAT AAATATATCC AAAAAAATTA CCAAAATTAGT
TATGATCTAA GTAATGCAAC AGCAAGTGA ACTGCAATTA AAAATATTGT ATTTTTTATA AGAACTAGCG ATCAACGGCA AATTTTTTCA
AAAGCAGTTG AAATTAAAGG TTTTCTGAT AAAAATATTG AAAAAAATCT TGCTAAATTT GAAATTGATG AAAAAAATC ATCAATTTCA
ATTAAACCGC AAAATTTTTT AAGTTTTGCT GAGTTTAGCA AGGAATTACA AAATCAATTT ATTAATACTA GCAAAACCCA AAAACAAACA
TTTATTGCTT TTGAAGAGGC GCTTATTCAA CTTGGAGGTT CGTATAATTT AGTTAACAGT CTCGGCTTAC CAATCTTTAT TCATAAAGGC
CAAAATTTAG AACCAAAAT TTTTGATAAT AATCTTAATT TTACAAACCA AGGGAATAAA AATTACCTTA ATTTTATCTT CACAAATGAA
GGAAAAAAA CAGAAATTC CTTAGAAATT AACGGAATA CCCCTGATT AGACATTAAA AATGAAATAA TTAAGTGAAT AAAAGCGGAA
CTAGAAGAAA AAATCAAGCT CAAGGAAAGT ATTCAAGCTG AATTAAATTAG GGAAAAATTA TCACCTTGCAA AATCATTTTA TGTGTATAAA
AATAATAATC CTTTGATATC AACACAAAAA AATTTTGAAA ACTTATTTGA TTATGTACAA AGCGAGCATC TAATTAATAC TAATAAAATA
AAAAATTATA TCACAAACAT AAATTTTAAA ATCAAAAAAA ATAGTGAAT ACCTGCTTTA GAACCTAATA ATTTGCTAAA AGATGATAAA
ATTGCGCTTG AAATAAATGT TGATATCTCA AAGTGAGTCC AACAAAAACT AATTAAAATT TTAATTTTAA AGTTTGATTG GGACCTAAAA
CCAGACCTTG ATCAGTATGC CAGGATTTTT GCACAAATC TACCCGAGCC AAAATCTGAG GTATTCTTAC TAAAAAAGA TGAAAAATCA
GCAGCGTGA CTAGTAAAAA ACTAGTAAAT ATAATAAATA AAATTAAGGA ATTTAACAAAT GAATTAGACC CAGAAAAATCC TGATATAAAG
CTAGTTAGCC AACTTTTATTT ACTTGATTTT GGCAAAAATG GTGATGAAT TGCTATAGAA AATTATAAAA GAGAATTAAT AATACTGCT
AAAAATCCTTA AAAATCAACT AGTTAAAGTC CAAGAATTTA GTGATGATCA GGTTAATAAA GCACAAAACA ATGAAAAAAG TTTAGGAAAA
GCAATTTGAA AAGTGCTTAA TATTCAAGCT AATTAAATA ATGATGATAT AAGCTCTGAT TTTATCCTTG ATAAATAAGGA AGGTGATTTT
ACTATCGAAT TTAGTCTAAT TTCAAAATAA AATAAGCAAA AATTAGCCAC AAGAAAGATT AAAATTTCAA ATATTGTGAG TTTCTGAAATG
AGCGCTTTTG ATGATGCAGC TAAATTTTAT CCAACTTTTT TTCTTGATGG CAAGTCATCT TTTTCAAAAT CAGACAATAA AAAAGGCTAT
GAAATTATAG ATTTATCTGA TAATAATATT CATTTGAGG ATGATTTAGA TAGTAAAAAT CAACCTAATC AAGAAGGTTT TAACTAACA
AATCCGATTA AATTTAGCA AAACCAATCA AAAACAAAAG AAAATATTGC CAGAACAGTC AATATAAGTA GCCCAAGTTT CAAATCAGCA
CCATTTTCAC GCGCTGATTC ACGGCTAATT TATTTAGCAT TTAACCAAAA AAATATCAAT GACTATAAAA AACATTACCT ACTTGCAGAC
TCAGATGGAA ACGGCTTTTT TATTCAAAAG ATTAATAAAT TTAATTTTAT AAATAAAAAAT ACCACAAATCC AAGGGATTGC AGGACTAAAA
ACTGAAAAAA CTACGCAAAA TTCCGATATT ACCTTTATCA AACCCGAAAA TTTAGACCAA AAAAACAAAAG ATGAAACACA ACAAAAACAA
GTTGATGGTT ATTTTATCGG ACTTGACITT AAACAGATAA AAAATTTTAA ATCAATTCAG TCATAATTGT ACCAGAACA AAAAAGCCTT
TATTCTTAG CTAATTTATT CCCACCTGAA TTAATGATA AGCAAGCAGT AATTCCTTGG CCTAATTCCT GAAAGCCAAT AAAAAATTTT
AGCGCTGAAA TAAATCAAAA TTTAGACAAT CTAGCCATAG TTGAACCTGC AAATCGAATT GCGGAAAATC GTTTTTATCG CCAGGAACTA
AGAAATCTA GTCCTTTTTT ACTTGAAAAA AGTAAAGAAA TAATCGAAGA AGACCAAGAT ATTGCTCTTG AAATTATCAA AACTCCGTGA
TCAGTTGAAA TTAGTGCTTT TTCATCATCA AATTATCAAC TAAATTCAAA AACATCACTT AATTTAAATG GAAAAACTAT CTATAATATT
AACCTGTAA GTCAAAAATG GTCACCAATT CCGAATTATC TAAATCTTGA CTGGGCCCAA ATTGGGCCAA ATCCAAAAA AACACGGAT
AAAAATGGT CTAACACGA AAAAATTAAC AAAAATAGCA GCATAATTTT AAAAGGAATA GCAGTTTATA ACGATCCAGA ATTAACACA
AAGACAAGAA ATTTTGCCCG CGATCAATA AGAAACGCTT TTATTAAAGC ATATATAAAA (SEQ ID NO:1)

```

Figura 1

```

MKKIPNFKGF FNKPAKIPTS ILLSGIITI STAIPGIWS YNRAYYQKLN EKSQNLISIQ TENPFENNLC KFFDNLFISN QFKELSASTA
FELAKSKIYN LDLLTLINLD KLYQKNYQIS YDLSNATASG TAIKNIVFFI RTSDQRQIFS KAVEIKGFSD KNIKQNLAKF EIDEKKSSIS
IKPQNFLSFA EFSKELQWQF IKTSKTQKQT FIAFEEALIQ LGGSYNLVNS LGLPTFIHKG QILEPKIFDN NLNFTNQGNK NYLNFIFTNE
GKKTETPLEI NGITPDLEIK NEIIKWIKAE LEEKIKLKES IQAELIRENL SLAKSFYVDK NNNPLISTTK NFENLFDYVQ SEHLINTNKI
KNYITNINFR IKQNSEIPAL ELNNLLKDDK IRLEINVDIS KVVQOKLIKI LNFKFDWDLK FDLNQYARIF AQNLPEPKSE VFLLKKDENS
AAWTSKKLVN IINKIKEFNN ELDPENPDYK LVSQLYLLDF GKIGDEIAIE NYKRELIITA KILKNQLVKV QEFSDQVHK AQNNEKSLGR
AIWKVLNIQR NLINDDISSD FILDNKEGDF TIEFSLISNK NKQKLATRKI KISNIVSSEM SAFDDAAKFY PTFFLDGKSS FSKSDNKGGY
EIIDLSDNNI HFEDDLDSKN QLTQEGFKLT NPIKFQONQS KTKENIARTV NISSP5FKSA PFSRLDSGLI YLAFKPKNIN DYKQHYLLAD
SDGNGLFIOK IKNFKFINKN TTIQGIAGLR TEKTQNSDI TFIKPENLDQ KKKDETQOKQ VDGYFIGLDF KQIKQFKSPQ SYLYQNKKSL
YSLANLFPPE LIDKQAVILG PNSWKPIKNF SAEINQNLDN LAIVELANRI GENRFYRQEL RNSSPFSLEK SKEIIEEDQO IVLEIITPW
SVEISAFSSS NYQLNSKTSI NLNGKTIYNI NPVSQKWSFF PNYLNLWQAG IGFNPKKTTD KNGSNNEKIN KNSSIILKGI AVYNDPELTT
KTRNFARDQI RNAFIRAYIR (SEQ ID NO:2)

```

Figura 2

```

ATGCAGGCTA ATTGATTGG CAGATTATC AAAAAATAAA AAGCAATTTT GGTACTAGCT TCAACTTTTG CTGGGTAAAT TTTATTTACT
ACTTCTGTGG GAATTAGTTT AACAAATTAAT TATAATGGTT CTCACCCGCG GGCAAAAGTT AATGAATTTG CACAAAAAAT TAGTTTTGTT
AGTTTTAAAC CTGAGCAAAAT TAGTAAAAAT AGTAATTTCT GAAAAATAAA AGAAAAATTG TTTCCGGTG ATCAGCTTAA AAAAGAAATA AAAAGAAATA
AATCTTGAAG AGTATCTCCA ATTTTATATT TTTGATAAAA ATTCTAATGA TTTGGTTAAA TTCTCAAAAG ATTCAAATCC TTTTCTTATT
GAATTTGAAT TTAGTGATTT AAAATTTGAT GATTTAAACC AAAATTTTAA TCITAAATTT CGTGTTAGGC AAAAACAAAA AAATAATCAA
TATGCATATT CGGATTTTTT CAGCCAAACCA ATTACATTTT ATGAATCAAA TAAATTTTTT AAAGCAGATT TTAACCTTGT TCTTCAAAAA
ATGTTTCGCC AAATTAATGA AAATATTTTA AATATAGGTA ATTTTACCAC AAATTTTTCT GATCAAACTA GTAAAAAAAT ATTAATAAAG
TTATACAGAG CAATTGATTT TGCACAAGAA GTTAATAAAA TTGAAAAATCC AAACGAGGTT GAGGTCAAAA TAAATGAAT TTTCCCTGAA
TTATCTAACT TGATTTTACA AGCACGCGAA TCGAAAGATA ATAAAAATGG AAAAAACAGAA AATCCGATTT TTAGCTTAA ATTTATAAAA
AATAAACTA ATAATCAATT TGTAAATCTA CAAGATAATA TCCCAACTAT GTATCTTGAG GCAAAATTA CTGATCAAGC CGCAAAAAATG
TTAGGTGATA TTGGTCAAAA CTTTAGCGAA AAAATCTTTG AAATTAGATT TGAAACTAAT GATAAAAAAT CATTTATTTT CAATGTTGAG
AATTTTTTTC AAAATATTA ACTAAACCA CTAAATTTA ACCTGAAGA AAAAGACGGA AATTAATAA TAACTAACT GAATCCTTTT
GACATATTTT CAAAAATTA ATCCGGAATT TTATCTGCCA ATACTAACCA AAATTACATA AAAGGGGTTA TTAATCTTTT ATTAGAAGAG
GATTTAGCTC TAGATTTTGG GCGGACTTCA AACTAATTC CACAAAAATCA AAACGGAATT AGTTTTGAAA TTATCCAAAC AAATGCTAAA
TTAAAAATG AAAATGATA TTATAATAAT GAAATTCCT ATAAAAATTT CCTTAGAGAA TCCTTATTTA AACCTGGTTC ACAAAAATT
ATCTATGAAA AAGAGTTGTT TTTAAGTATT GCGGCTTTG GTATATCAAA TAAAAATGGT CAAAAATCTA TAATTCAGG AAGCCAGAAA
GCTTTAATTT ATCGGAGAAA TTCACTTTTT AATGATGAGG AAAGTCTCGA AAATAAATTT ATTTCAACTT TTGGTCAACC GGTCAATTTG
AATAATCCCT TAAAAAAGA AGAAATNGAT ARTTTATTAT TGCAACAAGA TTATAAAGGT TTGAAAGAC AGCTAAATTC ATTATCAGG
TATAATTTTA ATTTTGATAA TTTTGAGGCC AAAGTTCCGG CTTGATCTGG TAAGACATAC TTACCTAGTT TAACAGAAAT TGCAAAATTT
CGATTAATC AACAAAAAT TGATATAAAT TCACAAATC AAGAGCAAAA AATTGAACATA AAAACACTAC ATTCACAAAG TTTTMTTATA
AATCCTTCGG ATGTAACAGC TTTTTTGTCT GATTTAATTC AGAAAAAACC AAGCCAAATA GCARATAGTT TTTTCTTAA TTGCAAGGCT
TTTGGACTTT TAAATCAAAA TCGGACTGCT TCGCAATTT TTAATAACCT GGCTGGAGAA AATATCTTTG AAGCTAGTTT AAAAAATGAT
TTTGATAATA AACTACAAA TATTTTAAGT TTTAATAATC ATTTCTGCTGA TTTTATAAAT CAAGGGTTTT TTTCTCCCT TTTTCTTCCA
AATCAATAA AAGATAAAT CAATAATCTA AAAAGCAAGT CAATTTCTGA TGTAATTAGT ATTTTAGAAG ACCAAGAAT TTTTAAAGAA
ACAGCTAGAA AATTTACAAG ACAACAAAT GAGGAAACCC TAAATCAAG TGTTAAATTC ACAACATTGG CCGACCTTCT TTTAGCTTTT
TATTATAAGG CTAGTCAACT TGATAATTTT TTAGGGTGA CAAATTAGA TACCAATTTA GATTATCAAA TTGTGTTTCA AAAAGAAAAAT
GAAATTTCAA AAGCTCGTTA TGATTCTGAA ATTCAGAAGC TAAAAAACC CGAATTAAT TCTTTAGAAA AACAGGAAAA CTTAAATAAA
AATTTCTGAA TTCAACAGAA ATCTAAAAAT TTAGACTCTG ATAATAACAT AAAAAATCA ATAAATGGAA ATTTAGAAAA AGATAATACT
TATAATGCCA ATGTTGATAA TGAATATCTA ACATTAATTT TTTACTATAT TATTGGTGAT TCTAGTCAGA AAAAAATTTT CTTTCAAGC
CCAAATCAAA AAATTTTAAT AAATTTCTCA ACTCAAAAA TTGATGAAAA TTCTAAATA CAAGAAAAAT TCGATAAGGT AGTTGAAAGT
GTTCCGGCTC ATTTGTTAAA TTATAGTCTC AGTGAAGAAA ATTTTAAAAA AATTAAGGAA AAATTAACAA ATAAGCATTC ACCTGAACCA
AAAAATAATG ACAAATAATA CGATTTAGAT TTATATTTTA AAGAAACTTC CATAAATATT GATAAAATTA GTTCTTATTT TAAAGAACAA
TTTCCCAAG AGGAGACAAA ATTTTACTCT GAACCAAGTT TTGAAAACTC ACTAAATACG GATAAACTAA CCTTTTAAAT AAGTTTTTAT
CTTAATAAGA AGGATAAAAA TCCCAAGAT TTAAGCTG ATAATAAAA TGATGAAAT AGCCCGATAA ATCCAATTAT TGCAAGGCAG
AAATTAATAA TTATAATAAC AAAAAATCT AAAAA (SEQ ID NO:3)

```

Figura 3

```

MQANLIGRFI  KNKKAILVLA  STFAGLILFT  TSVGISLTIK  YNGSHPRAKV  NEFAQKISFV  SFKPEQISKV  SNFWKIKEKL  FSGDQLKKEI
NLEEYLQFYI  FDKNSNDLVK  FSKDSNPFSI  EFEFSDLKFD  DLNQNFNLKF  RVRQKQKNQ  YAYSDFFSQP  ITFYESNKFL  KADFNVLQK
MFRQINENIL  NIGNFTTNFS  DQTSKKLKK  LYRAIDFAQE  VNKIENPNEV  EVKINEIFPE  LSNLILQARE  SKDNKIGKTE  NPIFSLKFIK
NKTNQFVNL  QDNIPMTYLE  AKLTDQAAKM  LGDIGONFSE  KIFEIRFETN  DKKSLFFNVE  NEFQNTKLKP  LKFNTEEDG  KLIITKLNPF
DIFSKIRSGI  LSANTNQNYI  KGVINSLLEE  DLALDFGPTS  KLIPONQNGI  SFEIIQONAK  LQWENDNYII  EIPYKIFLRE  SLFKPGSQKI
IYEKELFLSI  GGFGISNKNQ  QNLIIPGSQK  ALIYRRNSLF  NDEESPENKF  ISTFGQPVIS  NNPLKKEEID  NLLQQDYKG  LERQLNSLSR
YNFNFDFEA  KVRWSGKTY  LPSLTELANF  RLNQOKIDIN  SONQEQKIEL  KTLHSQSFFI  NPSDVTAFFA  DLIQKKPSQI  ANSFFLIJKA
FGLLNQNRTA  SQIFNNLAGE  NIFEASSKID  FDNKTTNLS  FNNHFADFYN  QGFFSSLFLP  KSIKDKFNNL  KSKSISDVIS  ILEDQELFKE
TARFTTROQI  EENLASSVKF  TTLADLLAF  YYKASQLDNF  LGWTKLDTNL  DYQIVFQKEN  EISKARYDSE  IQKLKCPEN  SLEKQENLNK
NSEIQPESKN  LDSDNNIKKS  INGNLEKDNT  YNANVDNEYL  TLFYFYIIGD  SSQKFFFFQS  PIQKILINFS  TQKIDENSKI  QEKFDKVVES
VPADLLNYSV  SEENFKKIKE  KLTNKHSPFP  KNNDNNNDLD  LYFKETSINI  DKISSYFKEQ  FPKEETKFL  EPSFENSLNT  DKLTTLISFY
LNKKQKNEKD  LKADNKNDEN  SPINPIIARQ  KLKIIITKNS  KN  (SEQ ID NO:4)

```

Figura 4

```

ATGAACCAAT TTGACGAAAA AGAGAAACAA CATAATAAAG CAAAAGCAAT TCTTTCAACC GGATTTTCGG TTACATCAAT TGCAACTACA
GTTGTAGCAG TCCCAATTGG ACTAACCAATT TTTGAGAAAT CATTTAGTTC CCAAGTTTCA GGAGGAGTCG ATAAGAACAA AGTTGTGGAT
TTAAAAATCAG ATTCAGATCA AATCTTCTCA GAAGAAGATT TTATAAGAGC AGTTGAGAAT CTTAAACTTT TTGATAAATA TAGACATCTA
ACAGCAAGAA TGGCATTAGG TCTTGCCAGG GAAGCAGCTA ATGCCTTTAA CTTTTTAGAT ACTTACGACT ACACCCCAAT TACAAAGCAT
TCATTTAAGA TTTCTTTGGA TATTTCCGAT GCCTTTGCGG CTAATAAAGA AGTAAAAGCG GTAGTAGTTA GTGCATATTC CCAAAAATAT
CAAGTTACCT ATTCAGACT AACTTCTCTA AAAGGTTGAA AAGAAGAA GAATTTTGGC GATGATATTA TAGATTATCA AATTAATCAA
GAGCTTTCAG GTCTATCACT TTCTTCCCTA GCCCTTGAAA GCGCGCATCT TTTAGCCTCA GAAATGGCTT TTCCGCTTGA TAATGACTTT
CAAGTTGCAT ATAAAAAAC AGGATCAAGA CCCGAGGCTT TTCCGCAAGC CTTCATAAAA AATTATCTTC GTTATAACTT AGTTAACCCG
CAAGGTTTGC CCACTATGCT CCAAAAGGGT TATGTGCTAG CCCCCAAAC AATTGAAAAAT AAAAAATGCAA CCGAAGAAAA ATTAGTAAAT
ATAAATGAAA ATGACCGTGC AAGGGTTAAT AAACCTACAA AACTACAAA TCTAGCCTTT AAAAACTTAA CCGATCCAAA TGGAAACGCTT
TCTATTACTT TTGAACCTG AGATCCAAAT GGTAAATTAG TATCCGAATA CGATTTTAAA ATTAAGGCAA TCAAAAAACT TGATTTTGAT
CTTAAAAAAC AAGAGGAAAA AGTACTTCAA AAGGTAACGT AATTGTGTGA GATTAAACCT TATGTTCAAT TAGGTTTAAT CCGTGATAAT
TTATCATTTGT CTGAAATAT CTATAAAGT GATAATAAT CGGAGTATCT TAGGAAAAATA TTAGCTAAAC TAAAAAGACA CAATAACAC
AAAAGGGTGC ATAATAATAC ATCCACTACT AAATTTCAG AAGAGGATCT TAAAAACGAA CCAAAATCTA ATGGATCAGA ACAAGATTCT
TTCCGAGAAAG CAAAGGAAAA TTTCCTTAGT TTTTGTGATC TAAGATCGAG ACTAATTCCA ATTCGCCGATC TTCTTTATA TTATCTTAAA
TCTATTACTT TTGAACCTG TAGAAATATT GAAGAAATG AAAAAAGAAA ATTATTAAAA AATGAACAAG TAGTACTCAA AGTAGATTTT
AGTCTTAAAA AAGTTGTAG CGATATTAGA GCCCCTTAT TAGTTTCTAG TCAGGTTAGA TCAAAATTATC CCCCCGTTTT GAAAGCTTCG
CTAGCAAAAA TAGGTAAGGG GTCAAATTCA AAAGTTGTCT TTTTAGATCT TGGAATTTA TCTTCAAGAT TTAAAGTTCA ACTTGATTAT
AGTGCAAAAC AAAGAGAAAT AATTAATACT TTATTAAAGG AAAATCCAGA AAGAGAAAAA GAATTACAAG CTAAAATTGA AAGTAAGACG
TTTAGTCCAA TAGATCTTAA CAATGATGAT CTATTAGCAA TCGAATTTCA ATATGAGGAT AACCTGAAAG GAGATTGAAT AACTTTAGGG
AGAAATGAAA AGTTAGTCAA AGAGGTTATC CAATATAAAA AGGAAGGTAA AACCTTCTTA GATGATGAAG TCCTAAAAAC ACTTTATTAT
TTAGATTTC ATCATCTACC TCAAAGTAA AAAGACCTCG AAGAAATATA AGAAAAACAC AAAAAACAAG TTATTAACGA AATAAAACCT
GCTACACCAG CAAGTCAAGC AAAACCAAGT CAAGCAAAAA ATGAAAAAGA AGTAAACCT GAATCAGCCC AAGCAGATC TTCTCTTCA
AATTCTAATG ATTCTAATAG TAAAAACACT TCCTCTTCAA GTATGATGCG GGGTACAACC CAAACAAATA ATTCCTCTAC AGAAACAACA
AATTCAAAT CAGCAACAC AACCTCAACA ACAACACAAG CAGCAGCAAC TTCAGCCTCT TCGGCTAAAG TAAAAACAAC TAAATTTCAA
GAACAAGTAA AAGAACAAGA ACAAAAAACA GAAAAAGCAA AAGAAACTAA CCAATTATTA GATACATAAA GAAATAAAGA AGACTCAGGG
CTTGATTTAA TTTCTTGGGA TTTCTAGTA AATTCAAAT ATAAAACTCT ACCAGGAACCT ACCTGAGATT TCCATGTTGA ACCAGATAAT
TTCAATGATC GTCTAAAAAT AACAGCGATT CTAAAGAA ATACATCCCA GGCAAAAGTCA AATCCAGATA GTAAAAACCT AACTTCCCTA
TCGCGAAACC TTATAATAAA CGAAAGAGAA GGACAACATA TTTGAAATCA GTTAGCTTCC CTTAGTCCAA GAAGATCCAG TACTTCTTGT AGATTATACA
AGAAAGAAC AGATTAAAA CACCGAGGAA GGACTCCGTG TTAAAAAGG TGGCACTAAG ATAAAAAGAGA CAAGAAAAAG CAEAAACGAG
AATGCTAAAA GCAATACATA CTCCAAACCA AATAAAAGT TAGTCTACT AAAAGGGTCT AAAAAAACCC CGGGAACAAA AAAGGAATGA
ATTCTTGTAG GATCTGGGAA TAAAGGCCACC AAAAAACGAA GCTCCAGCAA CAACTCCAAT ACCCAAATAT GAATAACCAG ACTAGGAACA
TCTGTTGGTT CATTAATAAAC CGAAGGTGAG ACAGTCTTG GAATTTCAA TAATAATTCC CAAGGTGAAG TTCTCTGAAC TACTATTAAA
TCCAACTCG AAAACGAAAA TCATCAGAT AACATCAA TCCAATATCT CCCAAGTAG CATAGTTTAA CAACCAATTC TCGATCAAAT
ACCCAACAAT CAGGGCGAAA TCAAAATTA AATACAAACA CTCAAAGAAA AACAACTACT TCGCCGGCCC AAAGCCCAAT ACAAAATCTT
GATCCGAACC AAATGTATGT AAGACTTGGT CTACTAGTAC AAGACAAAA ACTTCATCTT TGGTGGATTG CTAATGATAG CTCTGATGAG
CCTGAGCATA TAACAATTGA TTTGCTGAA GGGACAAAA TTAATTATGA TGATTTAAAT TATGTGCGAG GGCTTTTAAA AAATACTACA
AATAATCCA ATACCCAAGC CCAAGACGAT GAAGGTGATG GATATCTGCG CCTAAAGGA TTAGGGATCT ATGAATTTCC TGATGATGAA
AGTATTGATC AAGCCGCTAC TGTGAAAAA GCAGAGAGAT TATATAACA CTTTATGGG CTATTTAGGG AA (SEQ ID NO:5)

```

Figura 5

```

MNQFDEKEKQ HNKAKAILST GFSVTSIATT VVAVPIGLTI FEKSFS SQVS GGVDKKNKVD LKSDSDQIFS EEDFIRAVEN LKLFDKYRHL
TARMALGLAR EAANAFNFLD TYDYTPITKH SFKISLDISD AFAANKEVKA VVVSAYSQKY QVTYSRLTSL KGWKEEDDFG DDIDYQINQ
ELSGLSLSSL APESAHLAS ENAFRLDND FQVAYKKTGSR AEAFRQALIK NYLGYNLVNR QGLPTMLQKG YVLAPKTIEK KNASEEKLVN
INENDRARVN KLQKVENLAF KNLSDPNGTL SITFELWDPN GKLVSEYDFK IKGIKKLD F LKKQEEKVLQ KVTEFVEIKP YVQLGLIRDN
LSLSEIIYKS DNNPEYLRKI LAKLKEHNNN KRVDNNTSTT KFQEE DLQNE PMSNGSEQDS FEKAKENFLS FFDLRSRLIP IPDLPLYTLK
VNSINFDRNI EENEKEKLLK NEQVVLKVDF SLKKVVS DIR APYLVSSQVR SNYP PVLKAS LAKIGKGSNS KVVLLDLGNL SSRFKVQLDY
SAKQREIINT LLKENPEREK ELQAKIESKT FSPIDLNNDD LLAIEFQYED NPEGDWITLG RMEKLVKEVI QYKKEGKTFL DDEVAKTLYY
LDFHHL PQSK KDLEEYKEKH KKKFINEIKP ATPASQAKPD QAKNEKEVKP ESAQAESSSS NSNDSNSKTT SSSSMAGTT QTNNSTETT
NSNSATTTST TTQAAATSAS SAKVKTTFQ EQVKEQEQKQ EKAKETNQLL DTKRNKEDSG LGLILWDFLV NSKYKTLPGT TWDHFVEPDN
FNDRLKITAI LKENTSQAKS NPD SKNLTSL SRNLIIGVM ANKYIDYLVQ EDPVLLVDYT RRNQIKTERE GQLIWNQLAS PQMASPETSP
EKAKLEITEE GLRVKGGTK IKETRKSTTS NAKSINTNSKP NKQLVLLKGS IKNPGTKKEW ILVSGNNAT KNGSSSNNSN TQIWTIRLGT
SVGSLKTEGE TVLGISNNNS QGEVLWTTIK SKLENENQSD NNQIQYSPST HSLTTNSRSN TQOQSGRNQIK ITNTORAKTTT SPAQSPIQNP
DPNQIDVRLG LLVQDKKLHL WNIANDSSDE PEHITIDFAE GTFKNYDDL N YVGGLLKNTT NNTNTQAQDD EGDGYLA LKG LGIYEFPDDE
SIDQAATVEK AERLYCHFMG LFRE (SEQ ID NO:6)

```

Figura 6

DTGAAALAA	AAAAATCM	ATTACTAT	GGCAGCGG	CAGCAATT	TGTTTCAA	GTTTGTGA	CAGTGTGG	TTTGCTTC	AGTTAAAT	ATCGGGTG
AAATCCAACT	CAGAGGTAA	TATCTCAATT	AGGAGCTAGT	GAGTCTGGT	CATTAAACAT	TTCGATGCA	AAATTTACAA	CGGATATCA	AGGTGTTC	AAAGCACTTT
TAAATGGGAA	AACCTTTGAT	CCAAAAGAGT	CATGAATAT	TGATTTTTCG	TCAAAATAGT	ACTTTTGCAC	TAAATAGCTG	AGCAACCGTT	TGGAGATTC	GA AAAAATAT
CAGGTGGTTA	TTCGCGAAAT	TAGCCCCGAG	GAGATTAAC	AACGTTTTCG	TCTGTGGTGT	CATCTAAAGG	AAATATCTGA	AGATGGAAAT	ATAGCTCAAT	CAGCAACATA
ATTATTTTAT	CTTTTACAC	TGATATGCC	CAAAGCGGCC	CTGGGTCAAT	ATTCTTATAT	CGTTGATAAA	AAATTTTAAT	AGCTTTTGAT	TTTATCTGTT	AAAAITTTT
CTCTCAATC	TAAAGAGGCC	CTGTCACGTA	CCCGTTCGAG	TGATTTTATA	GCAMAACTTA	ATCAGTTTAA	CAATCAGGAC	TTGATTTGAT	TTTATCTGTT	AAAAITTTT
GAZCTTAAAG	CTCTAAAGAG	CAATATTCGC	TATACAGACG	CGGATTTTAC	TTTGTAAAAA	GGCAATTTAG	TGCATCTCTT	TTTGTATTCT	TTTATAGGAA	ATCCGCAAAA
TCAAAAGAG	TGAGCTATGT	TATATTAACA	TAAAGCAAAA	ACTGTGCAGC	TTTATCTTCG	ACCAAGTAAT	AGTCTCCAGG	GTAAACCTAT	TTTAAAGAAC	TATTAATACA
AAGATGAGAC	TTTCTTAAGT	AGTATCGATT	TAAAGCAAGT	TATAGGAAT	AGTTTATTGT	TATATGAAA	TGATCTTAA	CATCAACTAG	ATTGTGATCT	TTTAGATGCT
TCGTATTAAT	TGAGGAGCCA	ATCAGAGACA	ATTACTAGTA	ATTTCCGAAT	TAAACCTCTG	CTCGCTAGTG	AGAGATCTTT	AAAGAGCCGT	GTAAATCTG	AAAAAGTCA
TAAGAAACCA	AGATTTAGTA	AAATTTAGTT	ATATGAATAT	GATGCTCTAA	TTTCTTTATC	CCCACTCTAT	GAATTAAGTT	CTCAAACTTA	TTCAATTA	GATTTAGTGA
ATGCAACTAT	AGCTCTGTAAT	CTCTCGGTTT	CATTAGGAAT	ATAATTAAT	CTTTTGTATG	ATTATGGCAG	TGATCTTGAT	TATACTTTTT	TAGTTTCAAA	AGGMAAAT
AAACAAAGTT	CAATCTACAA	AAAAATATTC	ATAGTAATC	CAATCAAAAT	TAGTCTTAAA	TCTTCAAT	TAGGTGATGA	AGCACTTAAT	ATTAAAGACT	TTTGTGAAA
AGAGTGTACT	TTTAAATTAG	AAZACTTCGG	TGATGTGAA	AGTCAAAAG	CTTTTGGACT	TTTATATCCA	GGTGTTTATG	AGAACTATG	ACAGACCCGA	AAAGCTCAAA
GAGCAAGTAT	TGAAAAGAGA	AGATCTGAAA	AGAAGTTTGA	AGAAATTTAGT	CAACAAAAG	AGAAATATC	AAAGAGCTA	ACAACTCAAG	AGGGTCTGA	GAAGAGTGAT
AAATATTTAT	AAAGACTTCC	TGAGATATCC	CCGATCTCAAT	ATCAGCAAG	AAATGCGGAT	TTAGGTGCA	CTTCGGATTA	ACCTTATATG	ATTAAGGTAT	TCGAAATATC
ACGTTATATC	TACGACAAAT	CCCAAAATCCA	AGAACTAAAT	AAAGGCCAAG	ATTATACCAA	ATTAGCCAAA	GTTTATATCA	ATAGACATAT	TTTAATTAAT	TCITTAAGAT
TAAAGTACCA	ACCTTTTGTAT	GTAAATCCAA	GAATTTCGAG	CTCTAGACAT	ATGAAAGAGG	CAAAATTTGT	TCCTGTATGA	ACCGAAAGAT	ATRAATAGT	CGAGATTTAT
TCCTAGTCT	CTCTGTTTAT	CCAAAATAAA	TGACACTCTT	TGGATATTA	CGGTTAATTA	TCTTAAAGAT	ATCCAAACAA	ACRAATCCAC	GAATTAGTAA	AATTAGGACA
AAAGCGGGGT	CTTCAATCTT	AGGGATATGA	AAATCTTCCT	TGATTTTCTA	ATCTTGAGGA	TTTAAAGAT	ATTAGGATTA	AAACACCTTT	ATTATGTCAA	AAAGTATTA
TCNAATATC	CTTACTTGAT	TTTAAATTAAT	ATTATGACAG	TGAATTAATA	CGCCGAGAT	TGTGCTTTCT	TTTATTTTGT	CAACAAAGAT	TAGAGAAATA	TGTTTCAAA
TCGTGTGGTT	CTCAAAATCT	TATAGGCCCT	TGAGAACAG	MAATTAATTA	CCAAATTTAA	GATCAAAAT	TTCTTCAAT	GGATCAATCA	GCCCCGAT	GTACTAAAT
CTGGGAAATC	ATCATTTGGT	ATGAAAAGGA	ATTGTGATCA	AAATACAGAC	TCAGTATATA	TTTCTTAA	GATCTTAAG	ATATCTTGGT	TAAATAAACT	CGOGNATATC
TTTATTTGAC	TTATCTAGAT	GATAAACTAT	AAATTAACCC	AAAAAATAAT	TTAGAGGCTA	AAATTTAGCA	AAATTTCCAT	TTACAAAGCT	TTTAAATCTG	TTTTTAAGT
TCAGCTGTCT	TTTCTAAGT	CTGAATATAT	TATCAAGTAT	CAGGAGGATA	CTCAACTAT	TTTGTGAG	AAATAGCTGA	CGTAGATCCA	AAAGTAAJAG	AAAGTAAJAG
AGCTCAATGTT	TATCAATATA	ATTTCCCTTA	TGCAATCGGT	TTTGTATGTA	ATGCTGTGTA	ATGCAATCTA	GAATGATAT	GTCTTTCAAG	TTTAACTATG	TATCTTAA
CTTCAGGAGG	TTTCCAAATTA	GAGGACGATA	CAATTCATGA	ACTTATACAT	CGAGTATAAA	ATGCACTTT	AGGCTTCTAA	AGTTTITTAAT	TGTACTAGTA	AGGATTTGG
AAATCCAGTA	AATTGCCCAA	TTCTTTAGCA	CTTCAACATA	CAAAJAGGA	AAJAAACATA	CTTAAJAAAC	TAAJATAGCA	CGGCTTATAT	TGATTTCAAT	ATAACTTGA
TAACTGAGTC	CCCTTATATTT	TACCTTCAAG	TCCGAJAAAA	GACTGAATGA	AGGATTAATTA	AAACCAAAAC	CGGCAAGCT	AAAGTGTAAA	TTGATTTCAAT	CTTGAGGACA
GGCTCTTTAA	AGATTAATTT	ATCATTAATAT	TCCJAGJAGA	TGCTGACTTA	GACCAAGATTA	CAGACAGAT	TGAJAGACJA	CGAAATATA	CTCAAGATTT	AGJAGGCTTC
AGAGCTTTAGT	AAACAAAATCT	GGCAATTTTA	TATGOTTAAT	ATATTTACCA	ATATTTATCA	CAAJAATGATA	ATTTGCAAT	ATTTGCAAT	ATTAATGTTT	AATACTAGCA
TTGAAJAAAT	AACTGAAATG	ATTTTAAAT	AGCAAAJAGT	CTTGAAGACA	ACGGAAJAAAC	ATTTGCGATT	TATTCAGAT	ATTCAGATG	ATTAATGTTT	AGCAATGTTT
TTGAAJAAAT	AACTGAAATG	ATTTTAAAT	AGCAAAJAGT	CTTGAAGACA	ACGGAAJAAAC	ATTTGCGATT	TATTCAGAT	ATTCAGATG	ATTAATGTTT	AGCAATGTTT
TTGAAJAAAT	AACTGAAATG	ATTTTAAAT	AGCAAAJAGT	CTTGAAGACA	ACGGAAJAAAC	ATTTGCGATT	TATTCAGAT	ATTCAGATG	ATTAATGTTT	AGCAATGTTT
TTGAAJAAAT	AACTGAAATG	ATTTTAAAT	AGCAAAJAGT	CTTGAAGACA	ACGGAAJAAAC	ATTTGCGATT	TATTCAGAT	ATTCAGATG	ATTAATGTTT	AGCAATGTTT
TTGAAJAAAT	AACTGAAATG	ATTTTAAAT	AGCAAAJAGT	CTTGAAGACA	ACGGAAJ					

Figura 7

```

MOMKSTLLL ATAAAIIGST VFTVUGLAS KVKYRGVNP QOVISQLGLI DSVAFKPSLA NPTSDYQSVK KALLNGKTFD PKSSIFTDFV SKFDPLTHNG RTVLEIPKXY
QVWSEFSPE DDNERFALGF ELKEKLEDGN IAQSATRFY LPLDMPKAA LGQYSYIVDK NFNLLIHP L SNTSAQSIKP LALTRASDFI AKLANQPMNQD ELAVYLEKFF
OLEALKANIR LQADDFSEK GNLYVPPVYS FIRNPQNKKE WASDLNODOK TVRLYLRTF SPQAKTILKD YKXCDTFLE SIDLRASNGT SLFANENDLK DQLOVDLLOV
SDYFGQOSET ITSNSQVKPV PASERSLKDR VIKKODQOKP RIEKFSLEY DALSPYSQIQ ELVEXPHSIX OLVRATLARN LRFSLGKYNF LFDOLASHLD YTFVSKAKI
KQSSITHQLF IELPIRISLK SSILGDQEPN IKTLFEKEVT FRLEDMFADVE IETQFGLLYP GVNEELEQAR KAORASTFKE KSKKGLKEFS QOKKNSKAI WQKGLSEDD
NITERLPENS PIQYQOENAG LGASPKPFYM IKDVQNRYY LAKSQIQELI KAKDYTLAJ LLSNRYTYNI SLRLKEQLFD VNPRIPESRD IEMAKFVLDK TEKNTWQIY
SSASPVFQNK WSLFGYTRYL LGLDPKQTIH ELVKLGQKAG LQFEGYENLF SDPMLDGLN IRIKTFLSQ KDNFKLSLLD FNNYVIGELK APEFGPLPL PRELRANSN
SGGSONSNP WEQETISQFX DQNLNODQL AQFSTKIMEK IIGDENEFDO NNRLOYKLLX DLOESWINK RONLYWTLG DKLKVKPKDN LEAKFRQISM LQELATAPYT
SAALSNWNY YQDSGAKSTI IFEEIAELDP KVKKVGADV YQLKFNIAIG FDDNAGKTHQ EVIRSSRTI YLRTSGKSKL EADTIDOLNO AVONAPLGLQ SFYLDTERFG
VFOKLATSLA VOKKOKENTL PKKLNNDGYT LIHOKLKKPV LPQISSPEK DMFEGKLNON GGSQWNVST FGSIIESPYT STNPFQDADL DODGCDSDRQ QNNSLDNQEA
GLLKOKLAIL LGNQFIQYD QNDKEIEFI INVEKSELS FRVEFKLAKT LEDNGKTIRV LSDETHSLIV HTTEKTPEM SAVPEVFDK WVEQYDPRF LAARTKFLK
FKDOIFVDGS GNISDKVLAS IPLVTHOOL RLSPVVKIIR ELGLKTEGOO QOQOQOQOQ POKKAVRKEE ELITYNPKDE PHLLNPLTKA HULTLSNLVN NDPNTKIEDL
KVIKVLGAGH OLAFSLRANN IKRLMNTFIT PADYNPIFFY NEDWASIDRY LMKGNVSSK OQQAAGGHC SGLIQRLNKH IKPFTTFL ZALKRDNTHY LSNYSKXIM
IKPKYLVERS IGVPMSTGLD GYIGSEOTKD GTSSSSQWQ FRQDFICALG LKRTYHMKL GLSIRIFDPG KELAKIKDAS NKKGESEKLLK STOLFKNTHL EYKKSFKIA
KCMTHIHPDQ KEYPHNOKL PENYLNVLN OPMKVLYNS SDFITNLFVE FEGSDAGSGT KKKQVIQKQV NNNYADWSSA YLTFWYDFKI ITNQPNTVTA NIADVTIKDV
KELENTKLI APNTQMWEN ISGSKEKFK PTVTFQWEN ENSSNSQAG TPTWFKIREG FALQALKSSF DQKTRTFVLT TNAPLFLMKY GPLGFQHCYN FETQDMRLVT
QNDHQJLAL RVQEQDRPEK SSEDKQKQW IKFKVVPSE MPMHGNIRFV GVHQIGFNT LMLPVINSV IYDFYKCTGD SMDVARIWA PMQVCTIAPT NNAFRNVTKE
PNISEKIVE (SEQ ID NO:8)

```

Figura 8

```

TTGATTTTAA TTGAAGAAAT TAAGGAAATC AAAAAATTTA TGGAAAAACAC CAACTTGCAC TACAAAAAAA AAAAAAAAAA
AAGCACTAAC CTTTCTAGAA AAAATCTTTT AACAAATGGG GCCGCAGTTT TTTTCGGAAT TGCAATAATC ACAATTCGCG
TTGTCACCGT TGCTAATTGA AAGATCAAAG ATCCACGACT TCAAGTACAA AATCAAGCAA AATTAATTAC AAATATTCAA
CTAAAAAGATG AGTATCAAAA TGGAAATTTA AGCTATTTTG ATCTTAAAAA ACAGCTTTTT AATGCTGATA ATACTAAAAA
AACTGGGATT GACTATAGCC AGTTTTTTGA TTTTACCAC AAAAAAACA CGAGCCTACC AATTAATTTT GCCACTGATT
ATGGCTGAAA TCGTTACAAA CTTGATGTTT TTGATCTAAA ACCACTTGAT CAAGAACAAAT CTTTGAATTT TTATTATCGT
TTAGTATATC AACTACCCTGA TGATAAAAAG GCAATTTCTG ATCTTTTAAC CCAAAAAAGT ATCTGAAATTT ATCTCCCTGA
TTATTCACTT GCTAATTTTCG CTAATTTTTC AAGTTCAAAA TTGGAAAAAC TAAGAGCTTA TACCAACAAG GAAITTAGTT
TATCAACCAA AAAAGAACTT ACAAAAATTAG TAAAAATTAGA AGACTTTGAA AAGCAAGTAA ACTGGGCAAT AAATAATAAT
GAAGCCCGCA AAATTATTAA TAAATATTTT AATTTAGAAG AAATTATTGC CGAGATTCTT AATAATAAAG AATTTTCTTA
TCTAGATGAA AGTGGAATAT GAAATCCGCA ATATCAGATT GAACTTGTA GAGATCAAAT TTTAGGTCAG GATTTTTTAG
CAAAAACAGG TCAAAAAGGA ATTTATAAAT TAACATTTTA TGCTGCTTTT TCGCCGAAT TTGCTAAAAA AATTCGGGCT
GATCTCAATA AAAGTTCAAA GTTTCATTTT GGAATTAACA TTGATCTTAA TAATCTTTTC CTTGATAAAA CAGTCGCTGA
AAATATTAAA ATAACCTGAAT TTCTGAAGA TGATTATTAC CCACAAATAA ATTTTGAAAA AAATTTAGAA GCCGAAATTA
ATGGTTGAGA TTTTCTAAAT TATTACAATA ACCAAATTTT TGCAACTCAA AACGAGAGAG AAGATTTTCT CAAGAACCTT
ATAGCAAAAA TTGTTAGAAC TCCGCTTCTG AAAAAAGTTG AATTTGAAAA TAAATTATCC GGTATTGATT ATGCAAAATT
TTTAAAAAT TTA AAAATTAG ATATTA AAT AGATGCTAAT TCAACTAAAT TGGCTTTTAA AAATAACCAA ATTGTTGCCA
AAATTTTCGG AAAAAATTAT CTTAGAAATG CTGAAAATCA AATTGTCGCT GAAAAAACT TTTCCAAAC TATTGAACAT
CTAAACCGTC TCGGGCAAAA TGATGCTGAA TTAGTAAAGC AAATTAAACA GACAAAATTT GAATTTAAAC CAGAACTAG
AAAAAAATTC GCAAAACAAA AGGGTGCGCC AAAATCAGAA ATCTTGCAC TCTTAAATGC CAATAAATTT GATAAATTA
AAAAATATCCT TGAAAAATGGT GATTATTATG GCTATGAATT TAACGAAGAT CGCTTAAAT TATTAGTTCA TAATTCACAA
TTACCTAATG TTGAAGAAAT TGCAAAATTA AGTGTAGTTC ATTTTATCT TTACTTGCAA AAAGGGATAT CAGTTTGTG GCAAAATATT
GTCATTTAAA ACAAATCAAG AGGTAGTAC ATTTTATCT TTACTTGCAA AAAGGGATAT CAGTTTGTG GCAAAATATT
GATATGATCT TTTAAATAAA TTTAAATPAA TTGATCCAAA AACACAATGG CCTGAAAAATC TTAGCTGCTT TTTTATTCG
AAACATTTAA GTCAAAATAAA AATTCAGCCT CCTGAGAAAA AAGCAGTTTC ACTGACCTCC GATTTTGTAC TTTTTCATT
AAATAATGAC TACCTAATTT CCCCTGATTA TCTTAATAAT AGTTTTTACC TTACTCAAAA TTTA AAAAAAT ACTTTGGACT
TAATCAAAAC TGAAAGCGCA TTTAACACGA GAGATTTGT CGAACATATA AGAGAACTTG CAAAATCAAT TAAACCAAAA
GATTTTATCC AAGAAAAAGG TAAAAATCCA ATTAACAAATC TTAGTGAATT TCTAGTTGCT TTTTATTCGC TTATTTATTC
AAAGGATCAA GGACTTCTTG CTGAATCACT CGGGCAAAAT TTAGACTATA AAATTCAGTT TGAACCTGAA CCTATAAGCC
TAAATGTAGC AGTTAGTCAG GAAAAAATA ATCCAAATAA TAATTTAAGA TTAATAATAA ATTTAAGATT AAAATATTGA
TATAAAATTG GTTCAGTTGA TCAAAATGGG AATTTAATTC AAGTGATTTA CCAACAAAAA AAAGAACTT TGGATCTTGT
AGTTAATGAA AATAATAAAT TGCTTAGTGA AGATGTAGAA AAATTTAAATG AAATTGCTAC TAATTTTCCÀ AGTGCAGACC
AAATTATTTT CCTTAAAAA GAAGATTATA CCCAACTTGT TGATAGTATA AAACAAGTAA TTAAAAACGGA AAATACTCCA
GTTAAATTTG ATAATCAGAT CAAAAATCTA CCTTTTAGTC AATTTTGTGA AAATAATTAC CCAGATTATG GTTTTATAT
AATAAAACA AGTAAAAATT TAGAAAGTAG TAAACCTGAA GCAGCAAAAG TTGCTGCAAA ACCTTCAGCA GCCAAGCCAG
TAGCAGCTAA ACCAGAACAA CAAGAAATTC ATCAAAGCGA AGAAATTTCC GGAGTTCTTA CTAATACAAT ATCTCAACTT
GGCAATCAGA TACGACATAA TTTTGATTTA TATGTATACA AAAAAGATCA GCCACAGATT CACTCAAGTA AGCCAGTTAG
GGTAATTATT ATTGAAAGTT CAGAATCACT ATTTGCTTTA AAA (SEQ ID NO:9)

```

Figura 9

```

MILIEEIKEI KKFMMENTNLH YKKKKKKSTN LSRKNLLTIG AAVFFGIAII TIPLVTVANW KIKDPRLOVQ NQAKLITNIQ
LKDEYQNGNL SYFDLKKQLF NADNTKKTGI DYSQFFDFYQ KNNTSLPINF ATDYGWNRYK LDVFDLKPLD QEQSFEIYYR
LVYQLPDDKK AISDLLTQKV IWNYPDYSL ANFANFSSSK LEKLRAYTNK EFSLSTKKEL TKLVKLEDFE KQVNWAINNN
-EARKIINKYF NLEEIIAEIL NNKEFSYLDE SGIWN PQYQI ELVRDQILGQ DFLAKTGQKG IYKLTFFYAF SPNFAKKIAA
DLNKSSKFHF GINIDLNNLF LDKTVAENIK ITEFSEDDYY PQINFEKNLE AEINGWDFLN YYNNQIFATQ NEREDFLKNL
IAKIVRTPLL KKVEFENKLS GIDYAKFLKY LKLDIKLDAN STKLAFQNNQ IVAKIFGKII LRNAENQIVA EKNFSQTIEH
LNRLGONDAE LVKQIKQTKF EFKPETRKKI ANQKGAPKSE ILALLNANKF DKLKNILENG DYYGYEFNED RLKLLVHNSQ
LPNVEEFACL SVVPEKMSEG IINLWNKSFK TNQEVSTFLS LLAKRDISFV AKYWYDLLNK FKLIDPKTQW PENLDQNSLF
KHLSQLIKQP PEKKAVALTS DFWLFSLNND YLISPDYLN SFYLHSNLKN TLDLIKTESA FNTRDFVEHI RELAKSIKPK
DFIQEKGNP ITNLSEFLVA FYSLIYSKQ GLLAESLGQN LDYKIQFELE PISLNVAVSQ EKTNPNNNLR LNNNLRLKYW
YKIGSVDQNG NLIQVIYQTK KETLDLVVNE NNKLLSEDVE KLNELATNFP SADQIIFLKK EDYTQLVDSI KQVIKTENTP
VKIDNQIKNL PFSQFFENNY PDYGFYIIKT SKNLESSKPE AAKVAAKPSA AKPVAAKPEQ QEIHQSEEIP GVLNTNISQL
GNQIRHNF DL VYVKKDQ PQI HSSKPVRVII IESSESLFAL K (SEQ ID NO:10)

```

Figura 10

```

ATGAAAAAAA ACAAGCTAAA ATATTTAATT TTCTCAATTA TTGGAATTAG TACAATTATA AGTCTTGCTG TTACAATTCC TTATGCACTT
TCATCCCAAG CCGAAAAATA TAATCTAGAA CTAAATTCCT ATAACATTGA TCTTGAAAAA GCACAAAAAT TGAACCTCAAG AACTAATTTT
AATAGTGCTG AATTTGATAA ATTAGTTGCA AATTTAAAGG TAAAACCTAA ATTTGCCAAG CGACTAAACG CTTTGTGATGC TCTAAATTTT
CACTTTGATA AATCTTATAG TTTCGATCTA GCTGATGCAG TTGATTTAAG TAGTCTAAGT CAAAAATATC CTGATCTAAG TTTTAAATTG
GTTATCCCTG ATAATAAATC CAGGTTTGAA ATCAAAGAAA ATAAGCTAAA AAATATCGGA CTTAATGTAA CTAACACTTC AAAAACCTA
AATTATACAG CAAAATTCGA CCTTGATTTT TCAGGTCAAG AAAAGTCTTT CCAATTTCTA CCCGAAAAAT TCACGTGCCA AATTAGTCTT
AGAAATCTTG AATCACTTAA AGGAAAAACC GCAACTGAAA TAGCAATTTT ATTTTATAAT GCTTGACTAA AACGGTTTAA TAAACTTTCT
GATTCAAAAA TTGCCCTATA TGAAACTTTT GGCGAATTTG GTGGGGCTTC CTTTAGCCTA AATTCTGAAC CAATTTTAT CTCTCCAGAA
AATTTTGAAA TCAAACCGGA TCTAAAAGAT AATAAAGTAC TTTTTCGAAG TATAAATGAT GAAAAAAATG AGCTTGTCT TAATATGGTT
TTATATGATA AAACAGCTAA AACTGAGAAA ATTTTCCCTC TTAGATTTGT TGATCTCCCA AAAACAAATC AGAAATATGG GGAATAATTT
TTAGCAAGTT TTTTGAAAAA CTATGAATTT AATAGTGAAA TTTCAAAAATA TCTAGCCAAA AATAACTTAG ATATTGCACA ATTATTTTCA
TTACCTTCTG ATCCAAAAAG TCTTGATTTA ACTAAATTTG AGTCTCTGATT TATTCAAAAA TCAGTGCCAA ATACAACCTT TTTTGTGTAT
ATTAAAGGTT TAAATCTTAA TTTTGAGACC AAAAAGCAG CTTTTTTAGT TAAAAAACCT GAAAAAGTTG GTCAGATTA GAATTTTATTA
ACTATTAAAT TAAAATTAGA AGGAACCTTTT TTAGTAAATG ATCAAGTTCC TGCAGGTCTA AATTTGACTC AGGATAAACA CTATCTTAT
AATTTGCACT TTGACTACGA TGCAACACAA GAAATTTATT CTGGATTTT TCGAAATGCG CTTGAATTTT TTGATGTCTAG AACGGCAAAA
AATCTTGATA ATTTAAACT TGAGGTCAAA AACGATCTTC CAGTAACGGT TTTCGCCCTCA ACAATTAATA CAAAAATGTC CCATCTTTTA
AATAAACCCC TTGAACCTTA GGAATTAATG AAAAAATGA GTCTTTTATT TGATTTTCTT AATTTTTCAA CAAGTAAAAA TGAAAAATTA
GAAACAAAAA TGGCTCCACC AAATGCTAAG ATGCAAAATG TTGGTGAAT TTTATTTAAT GAAGGGTAA AACACCAAGA AAGTCAGGTA
AAGGATCAGG CAAAACAGGA AAAATCAAGT AAAGATTCCC AAAGTAAACA AACTGATCAA AGTGAAAAAG AACCAAAAGT TGAACCTAAA
ACAAATCCAGG CAGAAAAATGG AGGAACCTTAT TTATCTAAAC TTTTGGAAAA TTTAGAAAAA ACTAGTTTCC CAACAAACAC TCTATTATAT
TTATCAACTT TTTATCGGGA TAAATTTATT TTAATTTAG AACTAAAAAGC TGAAGGAATA ACAAAAGAAA CACTTGAGAT TAAATTTGAC
AAAGTTGCTC CTGATAATAA AGCTTATCAA GCATTAGTCC AAAGTACAAA TACGGATTTA TTCCTTGATT GACCATCAA TATAACCA
ACAACAGAAA AATACCAAAA TAAACAGTA ATTGATCGA TTAGCGCACT AAATAATCCG AATTTAAAAAT TTAAGGTAAA TCCAGAACCT
TCAATTAAT CGCAGCAAAA AGTACATCTA GATCAAGCCG GTATTTTATT AGCCGAAGGG GGAATAAGTC TTGAAAACTT AAGTCAAGAA
CAAGCAAAAA ATCTTAAACT TGATGAAGGC AAGACAATTT TTTATGCCTT TAAACCCACT AAATTATCAC GAAGATCACT TTTAAGATAT
TTCTATTAA GCGCAAGTGA TAATCTAGT TCAAAATCA GTTTATTAAAT CGAACCAGAA ATATTACTAA CCGGGTTTAA TAAATTTGGT
GCTGATTTTG AAAAGGTAGA GCAAAATAAT AAAAAATCA TAAATTTGAC CGATGCCTCA GGTGGGCTGC AAAAAACTTT TAACGGGACT
TATCAAGATA TTTATTATT CTTTTCACAA CTCTCCAAC ATAATAAAGT TGCGCTTTAT CCTAAAAATC AATCAGATAA ATCAGATGAT
TTCTCAAG CTCCGGCTGC TACAATGGTT CTAGTGGCAA CAGTTGAAG CGAAAAATACA GAAAAATACC TTAATAATGAA GCTTTTTC
AGTGATTATC AAAATGGGAA AAAGGAAAT TTTACCTGAA AAACCAAAAT TGAGAGCCAA TTTCAAAATC TCGATCTAGC TAAAAATCTA
ACTTTAGGTA CAACAAAAAG CAATTAATCAA GAAAAATATG ACAAAGAACA ACAAGATGAT AGTAGAAAC CGACCGGAAT AACACTAAAA
GGTTTGGCCC TCTTGATAA ACCAAAAGAT AATCAAAAT ATAATAATAT CCTTGAAAAA TTCCTTAGCG AATATATGGA A

```

(SEQ ID NO:11)

Figura 11

```

NKKQKLYLI FSIIGISTII SLAVTIPYAL SSQAKEYNLE LNSYNIDLGR AQNLNSRTNF NSAEFDKIVA NLKVKPKFAX RLNAFDALNF
HFDKSYFDL ADAVDLSSL OKYPDLSEKL VIPDNKSFE IKENKLNIG LNVNTSKTI NYTAKFDLDF SGQKSFQFL PENFTQGISL
RNLESKGT ATEIAILFYN AWLKRFNLS DSKIALYET GEFGGASFSL NSEPIFILPE NFEIKFDLKD NKLVFASIND EKNEVLNMV
LYDKTAKTEK IFPLRFVDLP KTNQYGEKF LASFLKNYEF NSEISKYLAK NNLDIAQLFS LPSPKSLDL TKFESWFIQK SVPMTTFAD
IKGLIPNFET KKAAPLVKCP EKVQGNKLL TINLKLEGT LVNDQVPAGL NLTDQKHYYT NFDYDYDATQ EIYSGYFRNA LELFDARTAK
NLDNLKLEVK NDLFVTVFAS TINTKIAHLL NKPLELKGIT KCMSPFLDFL NFSTSKNEKL ETKMAPPNK MQNVGAILFN EEVKQESQV
KQAKQEKSS KDSQSKQTDQ SEKEPKVETK TIQAENGCTY LSKLFENLEK TSFPTNTLLY LSTFYRDKFI LKLELKAEGI TKETLEIKID
KVAPDNKAYQ ALVQSTNTDL FLDWRSNITT TTEKYONKPV IASISALNPF NLKFKVNPPE SNKSQKQVHL DQAGIYLAEG GISLENLSQE
QAKNLKLEDEG KTIFYAFKPT KLSRRSLRY FLLSASDNSS SKFSLLEPE ILLTGFKKIG ADFEKVEQNN KNQLKWTAS GGLQKTFNGT
YQDIYYFLLQ LLQHNKVALY PKNQSDKSHD FLNAPAATMV LVATVESENT EKYLKOKLFS SDYQNGKKEI FTWTKIESQ FQNLDAKNL
TLGTTKSNQ ENIDKEQQDD SRKPTGITLK CFALFDKPKD NQKYNILEK FLSEYME (SEQ ID NO:12)

```

Figura 12

ATGAAGTTAGCAAAATTACTTAAAAACCTTTTTGATTAAATAACAACAATTGCCGGAATTAGTCTTAGT
 TTATCAGCCGCTGTTGGTATAGTTGTGCGGAATTAATCTTATAATAAATCATATTATTCTTATCTAAAT
 GAAAATCCAAGTCAGCTAAAACTACTAAAACAACAAAAATATCCCAGCAAGATTTTGATAAAATAGTC
 TCAAATTTAAAAATTAGGGATAATTTTAAGAAAATATCAGCAAAAACAGCTTTATCAGCGGTAAAAAAT
 GATTTATACCGGTATGACTTAGTTTCGGGCTTTTGAAATTTCAAGTTTAGAACTAACAACTATCAAATT
 AGTTTTGATTTAGAAAATGCAGTAGTTGATCAAAATTCAAATAAAAATGTGCTAGTTTTTGCAAAATCT
 GAAAAAGATCAAGTAACATATTCAAAACAAATTGAACCTAAAGGGTTTGCTCAAGATGATGAAGCTGCA
 GGCGATCTTGTTAAATTCCAAATTGATCAAAGAAAATCCTTTGTTAATCTTTATAAAATTTGATTATTCT
 TTTTCTGAATTTCAAAGAATTCTTAGCGAAAATTCGACAAAATTAGAAATACAAATCTTTTACAAGG
 TTGGCAAAATGCTTTGATTTCTCAAAAGCGAGTCTTTCACTTTATAATTCTTTAGGGCAACCAGTATTT
 TTAGATGAAAATTATCGCTTAGAACCAGTTTTGAATCAAAAAAGAATTAAATTTACTAGAAAAAAT
 AAGAAATTGTATTTAGAACTTAATTTAGTTGAAAAAGAGAGCCAAAAGAAAATTAATTTAACTAGAA
 ATCCGTCATTATTAACAAATCAAGAATTTACTAGTGAGTTAAAACTTTATTTGAATCAAATTTAGAC
 CAAAATCTTAGCCTAAATCTTGAACAAAAATGCTCTTTTCCATGATAGAACCAGTTTTTCTGAGTAT
 TTATATGGAAGTCCACAGCAAAGAACTAAACTGATGAAGTAAACAGAAAGCTAAGGAATTAAGGAT
 CTTTTTGTTAGATCAGCAAAATCTGACAGGATACAAAATTTGGAACCTTTTATGTAATAATTAAG
 CCCCACCTTTTAGATCCTGCAAAAATTAGTCAAGAAGATAAGAAAAAACTTTTAGCTGATAAAAAAATC
 CGTTTTGAAGTTCTAACTACCTTAAAAAGAAAAGCGCTTGATCAACAAGATGTTCTCACTGATCTTCCA
 GTTTTAGTCGATCTAAGCCTTGATTCTAATAAATACGAAAACAGCCATAAGTCAAATTTTAAATTAACA
 AAGACAACCAAGAAATTTAAATGCAAGAATATGAAGATAGAGCGAAGTTATCAACCAAGAAATCAAA
 GAAACAATTGATAAATTAGCAAACTTTCGCGCAAAAGTTAGTAATTTATCCGAACCAAGTGATGAAGTT
 GTTCGTGCTGCTATTTATTAATACAGGGAAATATCTTTTGATGATGAGATCCAGCAAGAAAAAACT
 AATCTTAAAAAATAATAGAACAAAGCCGAATGAAAGCTGACACCAAGAATTTGGCTCCAAAAGTACCT
 AGTCCTATTTCAAAAACCAACTACATCTGCAACTCTAGTGAACCTACTAAGACATCAACAGGGACAGAA
 AAAAAAGTTTTAGTAAGTGCTTTTTCTGATATAATTTAGTATGAAAAACCAACCTGAACAAAACAACTAAG
 AACGGTCAGGTCCAAGCTTCTTCTACAAGTCAGAGTCCAAAATCAAGTCTTAGCCAAAACAGCGGACAA
 AATTCATAACTTTAGAAAGAAAAATTTGGACATACAATTTGAAAGTTACTAAATACATCACAATTTAT
 AATTTTGAAAACACCCAAGGGCAATATACAATCTCAATAGAGGATGATAAATTAGTTTTTGACTTTAAG
 CTTGTATCAAAAGCAGATCGAGCAATTATTTATCAAGGATCTAAAATAGTCTTGGTGGTCTAATTAAT
 TCTGATAAGTCTGCCCTATGATGAGATTAACAATTTAGCCAGATCTTTTCTTGATGCAACAATAGGA
 GAACAATCTGATTATAAAAAACAAGCAAAAAAAGATTATACTTTAAAATCGTTAAGAGATTTAATGGGT
 AATGGCTTTGTTTATAAACCCAGAACTAAATCGAATCCACAAGAAAATGTACTAAAATTACAAACAGGA
 TCAGAGCAAAAAAACCTCTACCAGGGCTTAGATCAGGATTAATTTATATTGCATTTACCGTTAATAAT
 ATCAATAAAAATGATTATAAACCTCATTATCTAATAAGAGATAAAAAATGATAAAGGTGTCTTCATTAG
 AGATATCAAGATAAGGAAGAACCAACGCTTTTGAGATTAGAATTGATTATATGAGCTGATGACTTC
 AGGGATAAACAATTTAGGCTGCTGATACGATATTAGATGCAAGTGGTTCAATTGATCTCGATCAAAG
 AAAAAATTTATCTCCGTCAAAACGCTGATTATTTATAGTAGTTTATAAGTCAAAAAAAGATATTGTA
 ACAGAGCTTTATTTACTACCTTCAGCACAAAGATAATAACAAAGAAAAGATTGTTAAAAATAAAAAATAGA
 AAATCATTTCCCTCTCAAGGTTATACAGTTCAAGGTTCAATTATTATTTCTTTATTAGTCCTAATAAA
 ATTGGAGATAGTCAGAAAGCCAGCCCAACAACCGCCAGCTGTAAGTATAAAAGCAATAGCATTATTTGAT
 AAAAAATCATTTACAAACGATACAGAAAAATGCGTTTAAATAAATGCTTTTATTAGTAATTATATA
 AAACAA (SEQ ID NO:13)

Figura 13

MKLAKLLKKPFWLITTIAGISLSLSAAVGIVVGINSYKSYSSYLNENPSQLKTTKTTKISQQDFDKIVSN
 LKIRDNFKKISAKTALSAVKNDLYRYDLVRAFEFSSLETNNYQISFDLENVVDQNSIKNVLVFAKSEKDQ
 VTYSKQIELKGFAQDDEAAGDLVKFQIDQRKSFVNLYKFDYSFSEFQRILSENYRQIRNTNSFTRLANALI
 SSKASLSLYNSLGQPVFLDENYRLEPVLNSKKELNLLEKNKKLYLELNLVEKESQKKINLTLEIRPLLTNQ
 EFTSELKTLFESNLDQNLNLELKNALFHDRTSFSEYLYGSPQORTKTDEVKQKAKELKDLFGFRSAKFW
 QDTKFGTFYVIIKPQLLPAKISQEDKKLLADKKIRFEVLTTLKRKALDQQDVLTDLPVLVDLSLDSNKY
 ETAISQIFNSTKTTKEFKMQEYEDRAKLSTKEIKETIDKLANLAAKVSNLSEPSDEVVRVYLLNTGKYL
 DDEIQQEKTNLKKIIEQARMKADTKNLAPKVPSPIQKPTTSATSSGTTKTSTGTEKKVSVSAFSDIISMKN
 QPEQTTKNGQVQASSTSQSPKSSLSQNSGQNSITLEEKFGHTIWKLNTSQIYNFENTQGQYTTISIEDDKL
 VFDFKLVSADRAIIYQGSKISLGGILNSDKSAYDEIKQFSPDLFLDATIGEQSDYKNKQKKDYTLKSLRD
 LMNGNFVYKPEKSNPQENVLKLQGTGSEQKKPLPGLRSGLIYIAFTVNNINKNDYKPHYLIRDKNKGVFI
 QRYQDKEEPNAFEIRIDSYPDDFRDKQFQAADTILDASGSIDPRSKKKIILRONADYLLVVYKSKKDIVT
 ELYSLPSAQDNNKEKIVKIKNRKSFPSQGYTVQGSLLYSLFSPNKIGDSQKPAQQPPAVSIKAIALFDKKS
 FTNDTEKMRLINNAFISNYIKQ (SEQ ID NO: 14)

Figura 14

GTGATTGAGGGCTTAAAAATCAAAGGCAAATACTCAAAAAACAGAAAAAATAGCCCCACACAACCGAAAAA
 ACCAGAGGTTTCACTAGCTAAAACAACAGAAAATTTCAGCAAAAAACAGTCAAGGTAAGCACTTTTGCGAGAAG
 AAGCTAAGGGTCAAAGTCAAAGTCAGCAAAACACAACCAAGTTTCCACTTCATCGCCTCAAACCTAGTCAAAAT
 TCAGTTTCTAATTCCACAAGCAGTACGAATTTAGCCTTAGAAAAATGAAAAATTTGGGACAAGCATTGTGAAC
 AGCTTTTAATTTTCGCTAATATTTATAATCTTGAAAAATACAAAAAGCGAATATGAGATCTCAACTTTAGGAA
 ATAAGCTATTTTTTGATTTTAAATTAGTTGATAAACTAATCAAAATCTAATTTTGGCTCAGTCCAAAATT
 AGTCTTAATAATATTATTAATTCTAATAAATCTGCCTATGATATAATTAAGAAATTCAATCCCGATGTATT
 TCTAGATGGAACAATTAATTATCAAGATCAAGGAAAAGATAAAAAAGAATTTATCCTAAAAAGATTTAAGTG
 ATAATAAATTAATATTTAAATCAGAAGATGCAATTCAACTGATCAAGGTTTAGAGCTAAAGAAACCTTTG
 AAATTAAGCCCGACAACGAACCTCTTCTTCTACTACTTCACAAAAGACTAATAAAAAGGATGATATTGGAGT
 GTTTTGACTAGCGCTTCAAGTTAATAATATAACAGATTTCAAAAATCATCATCTAATATCCGATGGAAAAG
 GAAATGGAATAATCTTAACAAATACAAGGTCAAGGATGAACTGGTTATCAATTAGGACTAGAAATATCCT
 GGAAGGAATGAAAATAATTTTATTACTGATATTGTTGATCTAGTCGACGGTTTTATCAAATTTATTTTTGG
 ATGAAAACAAGACCAAAATAATAGTAGTTTTTTGGACACACCCTCACTTTTAATTGATTTTAACAAGTATA
 AAAACAAAAAAATACTGAATTTATCAAGGCGAATACAAAAATCTTTTAGAGGTTGTAGAAAACAATGAT
 CGACTTTCTGTTTCAGTATTTTCTTCTCAAGCAGGAAAAAATCATAAACAAATTATAGAAAATAGAATGCA
 TAGAAGTTTACATTATAAAAAAGCAGACAAAGCCAAAGAAGGTGTAAGCCCAATCCCAAGTTTTACTGATA
 TTTTAAATGAATTACAAATTGGAGCTACTGATAGCGATCCAAAACTCAAAAGGCACCAGTAACATTCAAA
 GCGTTTATGATGTCAAATGATAAAAATCTAGTATTTGGATCAAACATTAATAATCAAGAAATTCGCCAAGC
 GCTTATTGACGCTTATATAGTTGATAAGAAT (SEQ ID NO: 15)

Figura 15

VIEGLKSKANTQKTEKNSPTQPKKPEVSLAKTTENSAKTVKVSTFAEEAKGQSQSQQTQPVSTSSPQTSQN
SVSNSTSSTNLALENEKFGTSIWTA FN FANIYNLENTKSEYEISTLG NKLFFDFKLVDKTNQNLILAQSKI
SLNNIINSNKSAYDIIKKFNPDVFLDGTINYQDQGD KKEFILKDLSDNKLIFKSEDAIQTDQGLELKKPL
KLSPTTNSSSTTSQKTNKKDDIGVFWLALQVNNITDFKNHHLISDGKGNGIILNKYKVKDE TGYQLGLEYP
GRNENNFITDIVDLVDGFIKFIFGWKQDQNNSSFLDTPSLLIDFNKYKNKKNTEFIKANTKILLEVENND
RLSVSVFSSQAGKNHKQIIENRMHRS LHYKKADKAKEGVSPISFTDILNELQIGATDSDPKTQKAPVTFK
AFMMSNDKNLVFGSNINNQEIRQALIDAYIVDKN (SEQ ID NO: 16)

Figura 16

ATGAAGTTAGCAAAATTACTTAAAAACCTTTTTGATTAATAACAACAATTGCCGGAATTAGTCTTAGTTT
 ATCAGCCGCTGTTGGTACAGTTGTCGGAATTAATTCTTATAATAAATCATATTATTCTTATCTAAATCAGA
 TCCCGAGTCAGCTAAAAGTAGCAAAAAATGCTAAAAATTAGTCAGGAAAAATTTGATTCAATTGTTTTAAAT
 CTTAAAATTAAAGATAATTTTAAAAAATGATCGGCAAAAACAGTTTAACTGCTGCCAAAAGTGATCTTTA
 TCGTTATAATCTTGTTTCTGCTTTTGATTTAAGTGAACATAAAACAATGATTATTTAGTAAGTTTTGATC
 TTGAAAATGCAGTAGTTGATCAAAATTCAATTAAAAAATGTTGTTATTTATGCAAAATCTGATAAGGATCAA
 ATAACCTATTCAAAACAAATTGTACTTAAAGGCTTTGGAAATACAGAACAAGCGAGAACTAATTTTGATTT
 TAGCCAAATTGATTCAAGCAAGTCTTTTGTTGATCTTCAAGGGCAAATCTAACTTTGACGGAATTCCAAA
 TTTTACTTGCCCAAAATTTTGAAAATGAAAGAGGAAGTAATTGATTTTCACGACTTGAAAGAGCTTTGGTT
 GCATCAAAAGCGAGTCTTTCACCTTTATAATTCCTTAGGAGAACCCGTATTTTTAGGCCCCAGATTATCAATT
 AGACCCAGTTTTGGACCGAAAAAATTATTAACCTTTGTTAAATAAAGATGGAAAATTAGTTCTTGGACTTA
 ATTTAGTGCAATTTCACTAAAAAACTATGAATTTAAATCTTGAAGTTCGCGGCGCGATTTCAAATCAG
 GAAATTTCTAAAATTTCTAAAATCCTGACTTGAAACAAATCTTCAAGGCAAATTA AAAACCAAAGATGATTT
 GCAAATGGCACTAGTAAAAGATAAAATTAGCCTCTCTGATTATTGATATGGATCTCCGAATTCAAAAGTAA
 ATACATCCCAAATTTTAAACAAAAAGTAAAGAATTTAAAGATCTTTTGATTTAAGTGAGACAAATTTTTTT
 CTTAATACCAAAATCGGAACTGTCTATTTAAGTATTATTCCCAAATTTTAGATCCAAGTCAGATTTCTGT
 TGTTGATAAGAAAAAACTAGTTGAAAATCAAAAAATTCGCTTTGAAATTACTGCTTCTTTAAAACGAAAAG
 CTATTGATAAAAAATTTATCATCCAGGATCTTCCAGTTTTTGTTGATCTAAAAGTTGATTTTAATAAATAC
 CAAGCCGCTGTTGCCCAAATGTTTGAACGATAAAAGCAGTTAAAGAATTTCAATGCCTGAAGATCAAGA
 TGCA (SEQ ID NO: 17)

Figura 17

MKLAKLLKKPFWLITTIAGISLSLSAAVGTVVGINSYNSYSSYLNQIPSQLKVAKNAKISQEKFDSIVLN
LKIKNFKKWSAKTVLTAAKSDLRYNLVSAFDLSELINNDYLVSFLENNAVVDQNSIKNVVIYAKSDKDQ
ITYSKQIVLKGFGNTEQARTNFDFSQIDSSKSFVDLSRANLTLTEFQILLAQNENERGSNWFSRLERALV
ASKASLSLYNSLGEPVFLGPDYQLDPVLDKRLTLNKGKLVGLNLVQISTKKTMLNLEVRGAISNQ
EISKILKSWLETNLQGKLTQDDLQMALVKDKISLSDYWYGSPNSKVNTSQILTKSKEFKDLFDLSETNFF
LNTKIGTVYLSIIPKLLDPSQISVVDKKLVENQKIRFEITASLKRKAIDKKFIIQDLPVFVDLKVDFNKY
QAAVAQMFGTIKAVKEFSMPEDQDA (SEQ ID NO: 18)

Figura 18

ATGAAAAACAAAAATCAACATTACTATTAGCCACAGCGGCGGCAATTATTGGTTCAACTGTTTTTGGGAC
 AGTTGTTGGCTTGGCTTCAAAAGTTAAATATCGGGGTGTAAATCCAACCTCAAGGAGTAATATCTCAATTAG
 GACTGATTGATTCTGTTGCATTTAAACCTTCGATTGCAAATTTTACAAGCGATTATCAAAGTGTAAAAAA
 GCACTTTTAAATGGGAAAACCTTTGATCCAAAAAGTTCAGAATTTACTGATTTTGTCTCAAAATTTGACTT
 TTTGACTAATAATGGGAGAACCCTTTGGAGATCCCGAAAAAATATCAGGTGGTTATCTCGGAATTTAGCC
 CCGAGGATGATAAAGAACGTTTTCGTCTTGGATTTCATCTAAAAGAAAACTTGAAGATGGAAATATAGCT
 CAATCAGCAACTAAATTTATTTATCTTTTACCCTTGATATGCCCAAAGCGGCCCTGGGTCAATATTCTTA
 TATCGTTGATAAAAAATTTAATAATTTAATTATCCATCCTTTATCTAATTTTTCTGCTCAATCAATAAGC
 CGCTGCACTGACCCGTTCAAGTGATTTTATAGCAAACTTAATCAGTTTAAAAATCAGGACGAACCTTTGA
 GTTTATCTTGAAAAATTTCTTGATCTTGAAGCTCTAAAAGCAAATATTGTTTGCAGACAGCCGATTTTAG
 TTTTGAAAAAGGCAATTTAGTTGATCCTTTTGTATTCTTTTATTAGAAATCCGCAAAATGGAAAAAGAT
 GAGCTAGTGATCTTAATCAAGATCAAAAAACCGTCAGACTTTATCTTCGAACCGAATTTAGTCCTCAGGCT
 AAAACCATTTTAAAAGACTATAAATACAAAGATGAGACTTTCTTAAGTAGTATCGATTTAAAAGCAAGTAA
 TGGAACTAGTTTATTTGCTAATGAAAATGATCTAAAAGATCAATTAGATGTTGATCTTTTAGATGCTCTG
 ATTATTTTGGAGGCCAATCAGAGACAATTACTAGTAATTTCCCAAGTTAAACCTGTCCCTGCTAGTGAGAGA
 TCTTTAAAAGATCGGGTTAAATTTAAAAAGATCAGCAAAAACCAAGAATTGAGAAATTTAGTTTATATGA
 ATATGATGCTCTAAGTTTTTATTCCCACTTCAGGAATTAGTTTCTAAACCTAATTTCAATTAAAGATTTAG
 TTAATGCAACTTTAGCTCGTAATCTTCGGTTTTTCATTAGGAAAAATATAATTTTCTTTTTGATGATTTAGCC
 AGTCATCTTGATTATACTTTTTTAGTTTCAAAAGCAAAAATTAACCAAAGTTCAATTACAAAAAATTATT
 CATTTGAATTACCAATCAAAATTAGTCTTAAATCTTCAATTTTAGGTGATCAAGAACCTAATATTAAACTT
 TATTCGAAAAAGAAGTAACCTTTTAAATTAGATAACTTCCCGTGATGTTGAAATCGAAAAAGCTTTTGGACTT
 TTATATCCAGGTGTTAATGAAGAATTTGAACAAGCCCCGAAGAGAGCAAGAGCAAGTTTGGAAAAAGAAAA
 AGCGAAAAAGGGTCTTAAAGAATTTAGCCAGCAAAAAGATGAGAATTTAAAAGCAATAAATAATCAAGATG
 GTCTTGAAGAAGATGATAATATTACTGAAAGACTTCTTGAGAATTTCCCGATTCAATATCAGCAAGAAAAAG
 GCCGGTTTAGGTTCAAGTCCGATAAACCTTATATGATAAAGGATGTCCAAATCAACGTTATTATCTAGC
 AAAATCACAAATTCAAGAATAATTAAAGGCCAAAGATTATACCAAATTAGCCAACTTTTATCTCAATAGAC
 ATACTTATAATATTTCTTTAAGATTAAAAGAACAACTTTTGAAGTAAATCCAAGAATTTCAAGCTCTAGA
 GATATAGAAAATGCAAAATTTGTTCTAGATAAAACCGAAAAAATAAATACTGGCAGATTTATTCAAGTGC
 TTCTCCTGCTTTCCAAATAAATGATCACTTTTTGGATATTACCGTTATTTATTAGGTCTTGATCCAAAC
 AAACAATCCACGAATTAGTAAATTTAGGACAAAAAGCGGGTCTTCAATTTGAAGGATATGAAAACTTCTCT
 TCTGATTTCAATCTTGAAGATCTTAAGAATATTAGGATTAAAACACCTTTATTTAGTCAAAAAGATAATTT
 CAAATTATCTTTACTTGATTTTAAATAATTATTATGATGGTGAAATTAAGCCCCAGAAATTTGGTCTTCTCTT
 TATTTTACCAAAAGAAATTAAGAAAAATAGTTCAAATATTGGTAGTTCTCAAACTCTAATAGCCCTTGA
 GAACAAGAAATTTATAGCCAATTTAAAGATCAAAATCTATCTAATCAGGATCAGTTAGCCAGTTTAGTAC
 TAAAATCTGGGAAAAAATCATTTGGTGATGAAAACGAATTTGATCAAAATAACAGGCTTCAGTATAAACTTT
 TAAAAGATCTTCAAGAATCTTGAATTAACAAAACCTCGCGATAATCTTTATTGGACTTATCTAGGTGATAAA
 CTTAAAGTTAAACCAAAAAATAATTTAGATGCTAAATTTAGACAAATTTCCAATTTACAAGAGCTTTTAAAC
 TGCTTTTTTATACCTCAGCTGCTCTTTCTAATAACTGAAATTTATTATCAAGATTCAGGGGCAAGTCAACTA
 TTATTTTTGAAGAAATAGCTGAGCTAGATCCAAAAGTAAAGAAAAAGTAGGAGCTGATGTTTATCAATTA
 AAATTCATTATGCAATCGGTTTTGATGATAATGCTGGCAAGTTTAAATCAAGAAGTAATTCGTTCTTCAAG
 TAGAACAATTTATCTTAAACCTCAGGGAAATCCAAATTAGAAGCAGATACAATTGATCAACTTAATCAAG
 CAGTTGAAAAATGCACCTTTAGGTCTTCAAAGTTTTATCTTGATACTGAAAGATTTGGGGTTTTCCAAAAA
 TTAGCAACTTCCTTAGCAGTTCAACATAAAACAAAAAGAAAAACCACTACCTAAAAAACTAAATAATGATGG
 CTATACTTTAATTCATGATAAACTTAAAAAACCAAGTAATTTCCCAATTAGTTCAAGTCCCGAAAAAGATT
 GATTTGAAGGTAAATTAATCAAAACGGGCAAGCCAAATGTAAATGTCTCAACTTTTGGTTCAATAATC
 GAGTCCCTTATTTTAGTACTAATTTCCAAGAAGAAGCTGATTTAGACCAAGAAGGACAAGATGATTCAAA
 ACAAGGAAATAAGAGCCTAGATAATCAAGAAGCAGGTCTTTTAAACAAAAACTGGCAATTTTATTAGGGA
 ATCAATTTATCCAATATTATCAACAAAAATGATAAAGAAATTGAATTCGAGATTATCAATGTTGAGAAAGTT
 TCAGAGCTTAGTTTCCGCGTTGAATTTAAATTAGCAAAAACTCTTGAAGACAACGGAAAAACTATTTCGAGT
 TTTATCAGATGAGACAATGTCATTAATGTGTAATACTACAATTGAAAAAGCACCAGAAATGAGTGCTGCTC
 CCGAAGTATTCGATACTAAATGGGTTGAGCAATATGATCCAAGAACCCCGCTTGCGGCTAAGACAAAGTTT
 GTCTTAAATTTCAAAGATCAAAATACCAGTTGATGCCAGCGGAAATATTCTGATAAATGACTAGCAAGTAT
 TCCTTTGGTGATTCACCAGCAAATGTTGCGTCTTAGCCCGGTAGTTAAACAAATAAGAGAGCTTGGTCTAA
 AAAGTGAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAGAGCTGTTAGAAAAGAAGAAGAACTGGAA

Figura 19 (1 de 2)

ACCTATAATCCAAAAGACGAGTTTAATATTCTTAATCCTTTAACAAAAGCTCACCGTCTTACCTTATCAAA
 TTTAGTAAATAATGATCCAAATTATAAAATTGAAGATTTAAAAGTAATCAAAAATGAAGCAGGTGATCATC
 AATTAGAATTTTCTCTAAGAGCTAATAATATCAAAAGATTAAATGAATACACCAATTACTTTTGCTGATTAT
 AATCCCTTTTTCTATTTTAATGAGGACTGAAGAAATATAGATAAATATTTAAATAATAAGGAAATGTGAG
 TTCTCAACAACAACAACAACAACAACAACCAGGCGGGGTAATCAAGGCTCGGGTCTAATCCAAAGAC
 TTAATAAAAAATATTAAGCCCCGAAACTTTTACCCCCGCACTCATAGCTCTTAAACGAGATAATAATACTAAT
 CTTTCTAACTATTCTGATAAAATAATAATGATCAAACCAAATATTTGGTTGAACGATCAATTGGTGTTCC
 CTGATCAACCGGCCTTGATGGTTATATTGGTTCAGAACAACTCAAGGGCGGAACCTCCTCAAACGGTCAAA
 AGCGATTTAAGCAAGATTTTATTAGGCTTTAGGTCTTAAAAACACTGAATATCATGGTAACTAGGTCTT
 TCAATTAGAATTTTTGATCCTGGAAATGAACTAGCAAAAATTAAGGATGCTTCAAATAAAAAAGGGGAAGA
 AAAACTGTTAAAATCATATGATTTATTTAAAAACTATTTAAATGAATATGAGAAAAATCCCCTAAAATTG
 CTAAGGGATGAACAAATATTCATCCTGATCAAAAAGAATATCCAAATCCAAATCAAAAACCTACCTGAAAAT
 TATCTTAACCTAGTTTTAAATCAACCTTGAAAGGTTACTTTATATAATTCAAGTGATTTTATTACTAATTT
 ATTTGTTGAACCTGAAGGCTCAGATCGGGGATCTGGAGCAAAATTTAAACAAGTAATCCAGAAGCAAGTTA
 ATAATAACTATGCTGACTGGGGTCTGCATATCTCACGTTCTGGTATGATAAAGATATCATTACCAATCAG
 CCAAATGTTATAACTGCTAACATTGCTGATGTCTTTATTAAAGATGTAAAGGAACCTGAAGATAATACAAA
 ACTAATTGCTCCAAATATTACTCAATGATGGCCAAATATTAGCGGCTCAAAGGAGAAATTTTATAAGCCAA
 CAGTGTTTTTTGGTAATTGAGAAAATGAAAACAGCAATATGAATCCCAGGGGCAGACCCCTACCTGGGAG
 AAGATCAGAGAAGGATTTGCTCTCCAAGCGCTTAAATCCAGCTTTGATCAAAAACAAGGACATTTGTCTT
 TACAACAAATGCTCCTTTACCTTTATGAAAATACGGACCATTAGGTTTCCAAATGGGCCGAATTTCAAAA
 CACAAGATTGAAGGCTTGTTTTCCAAATGATGATAACCAAATAGCCGCGCTAAGAGTCCAGGAGCAAGAT
 CGCCCAGAAAAATCAAGCGAAGATAAAGACAAGCAAAAATGGATTAAATTTAAAGTTGTTATCCCTGAAGA
 AATGTTTAATTCCGGTAATATACGTTTTGTTGGGGTAATGCAGATCCAAGGTCCTAATACTTTATGACTTC
 CAGTGATTAATTCTTCGGTTATCTATGACTTCTATCGCGGAACAGGAGATTCTAACGATGTCGCCAATCTT
 AATGTAGCTCCTTGACAGGTTAAAACAATCGCATTACAAATAACGCCTTTAATAATGTTTTCAAAGAGTT
 TAATATCTCTAAAAAATAGTAGAATAA (SEQ ID NO:19)

Figura 19 (2 de 2)

MKNKKSTLLLATAAAIIGSTVFGTVVGLASKVKYRGVNPTQGVISQLGLIDSVAFKPSIANFTSDYQSVKK
 ALLNGKTFDPKSSEFTDFVSKFDFTNNGRTVLEIPKKYQVVISSEFSPEDDKERFRLGFHLKEKLEDGNIA
 QSATKFIYLLPLDMPKAALGQYSYIVDKNFNNLIHPLSNFSAQSIKPLALTRSSDFIAKLNQFKNQDELW
 VYLEKFFDLEALKANIRLQTADFSFEKGNLVDPFVYSFIRNPQNGKEWASDLNQDQKTVRLYLRTFSPQA
 KTIKDYKYKDETFLLSSIDLKASNGTSLFANENDLKDQLDVLDDVSDYFGGQSETITSNSQVKPVPASER
 SLKDRVFKKDKQKPRIEKFSLEYDALSFYSQLQELVSKPNSIKDLVNATLARNLRFSLGKYNFLFDDLA
 SHLDYTFVLVSKAKIKQSSITKKLFIELPIKISLKSSILGDQEPNIKTLEKEVTFKLDNFRDVEIEKAFGL
 LYPGVNEELEQARREQRASLEKEKAKKGLKEFSQQKDENLKAINNQDGLEEDDNITERLPENSPIQYQQEK
 AGLGSSPDKPYMIKDVQNRYYLAKSQIQELIKAKDYTKLAKLLSNRHTYNISLRLKEQLFEVNPRIIPSSR
 DIENAKFVLDKTEKNKYWQIYSSASPAFQNKWSLFGYYRYLLGLDPKQTIHELVLKLGQKAGLQFEGYENLP
 SDFNLEDLKNIRIKTPLFSQKDNFKLSLLDFNNYYDGEIKAPEFGLPLFLPKELRKNSNIGSSQNSNSPW
 EQEIIISQFKDQNLNNDQLAQFSTKIWEKIIDGENEFDQNNRLQYKLLKDLQESWINKTRDNLYWTYLGDK
 LKVKPKNNLDKFRQISNLQELLTAFYTSAAALSNNWNYQDSGAKSTIIFEEIAELDPKVKEKVGADVYQL
 KFHYAIGFDDNAGKFNQEVIRSSSRTIYKTSKSKLEADTIDQLNQAVENAPLGLQSFYLDTERFGVFQK
 LATSLAVQHKQKEKPLPKLNNDGYTLIHDKLKKPVIPQISSSPEKDWFEGLNQNQSQNVNVSTFGSII
 ESPYFSTNFQEEADLDQEGQDDSKQGNKSLDNQEAGLLKQKLAILLGNQFIQYYQNDKEIEFEIINVEKV
 SELSFRVEFKLAKTLEDNGKTIRVLSDETMSLIVNTTIEKAPEMSAAPEVFDTKWVEQYDPRTPLAATKF
 VLKFKDQIPVDASGNISDKWLASIPLVIHQMLRLSPVVKTIRELGLKTEQQQQQQQQQKKAVERKEEELE
 TYNPKDEFNINPLTKAHLTLNVLNNDPNYKIEDLKVIKNEAGDHQLEFSLRANNIKRLMNTPTITFADY
 NPFFYFNEDWRNIDKYLNNKGNVSSQQQQQQQQPGGGNQSGLIQRLNKNIKPETFTPALIALKRDNTN
 LSNYSDKIIMIKPKYLVERSIGVPWSTGLDGYIGSEQLKGGTSSNGQKRFKQDFIQALGLKNTHEYHGLGL
 SIRIFDPGNELAKIKDASNKKGEEKLLKSYDLFKNYLNEYEKSPKIAKGWTNIHPDQKEYPNPNQKLPEN
 YLNLVLNQPWKVTLYNSSDFITNLFVEPEGS DRGSGAKLKQVIQKQVNNNYADWGSAYLTFWYDKDIIITNQ
 PNVITANIADVFIKDVKELEDNTKLIAPNITQWWPNISGSKEKFYKPTVFFGNWENENSNMNSQGQTPTWE
 KIREGFALQALKSSFDQKTRTFVLTTNAPLPLWKYGPLGFQNGPNFKTQDWRLVFQNDNQIAALRVQEQD
 RPEKSSDKDKQKWKIKFVVIPEEMFNSGNIRFVGVMQIQGPNTLWLPVINSSVIYDFYRGTDGSDNDVANL
 NVAPWQVKTIIFTNNAFNNVFKEFNISKKIVE (SEQ ID NO: 20)

Figura 20

Figura 21

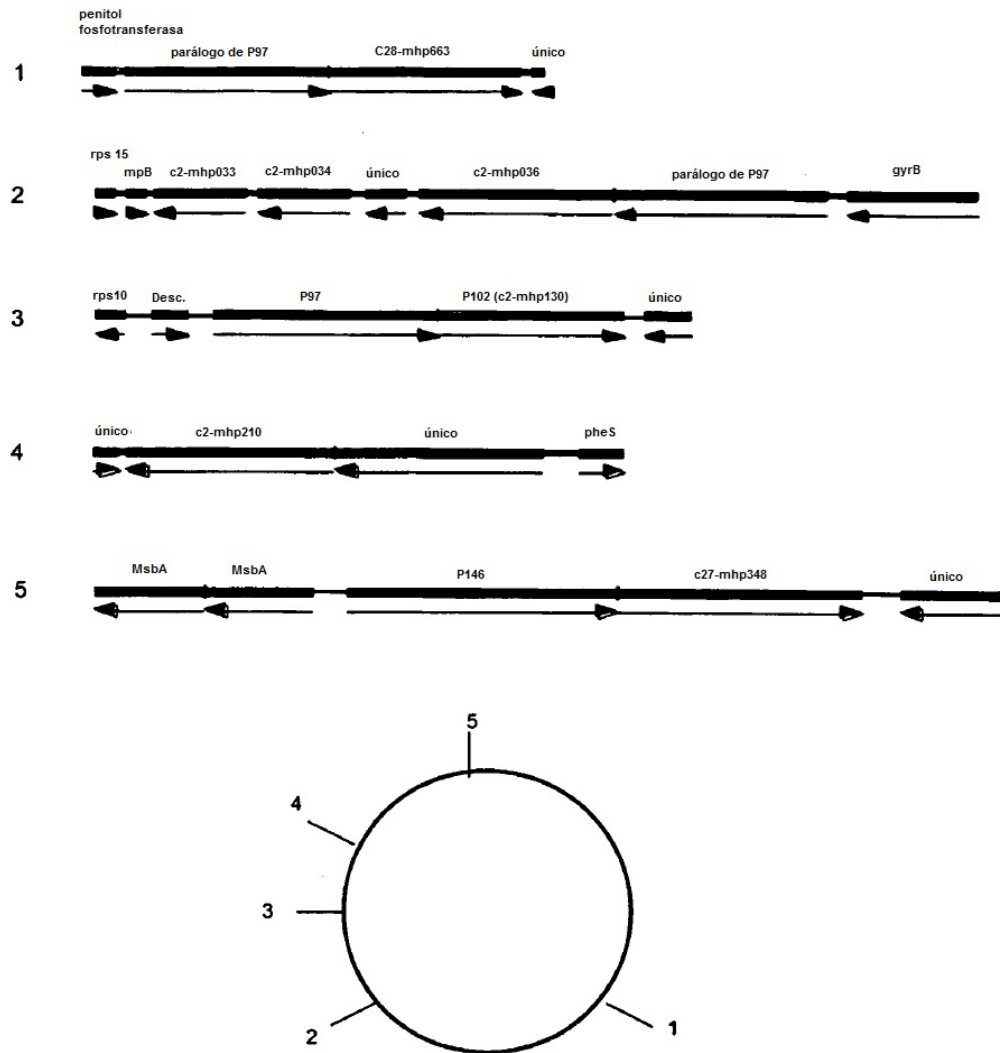


Figura 22

