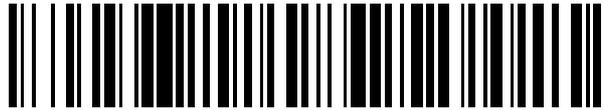


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 094**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/102** (2006.01)  
**A61K 39/295** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.1998 E 04077590 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 1518558**

54 Título: **Vacuna contra la infección por Actinobacillus pleuropneumoniae que comprende la toxina ApxIV purificada**

30 Prioridad:

**10.04.1997 EP 97201032**

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

**17.02.2014**

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)  
Wim de Körverstraat 31  
5831 AN Boxmeer , NL**

72 Inventor/es:

**FREY, JOACHIM y  
SEGRS, RUUD PHILIP ANTOON MARIA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 443 094 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Vacuna contra la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* que comprende la toxina ApxIV purificada

5 La presente invención se refiere a bacterias vivas atenuadas del género *Actinobacillus pleuropneumoniae*, que tienen una mutación en el gen que codifica una toxina, a los procedimientos para la producción de tal bacteria, a las vacunas que comprenden tal bacteria, a los procedimientos para la producción de tales vacunas, a las vacunas que comprenden una toxina, a los procedimientos para la producción de tales vacunas y procedimientos para la protección de animales contra la infección por bacterias del género *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Las bacterias que pertenecen al género *Actinobacillus* producen todas las denominadas toxinas RTX (permanece RTX para repetirse en toxina).

10 La presencia de estas toxinas RTX es lo que contribuye sobre todo al carácter patógeno de estas bacterias.

Las toxinas RTX han sido extensamente revisadas por Braun y col. (Critical Rev. in Microbiol. 18(2): 115-158 (1991)). También se han revisado las toxinas RTX de las cepas Gram-negativas por Welch, R.A. (Molecular Microbiology 5/3: 521-528 (1991)) y por Welch y col. (Inf. Agents and Disease 4: 254-272 (1995)).

15 Todas las toxinas RTX conocidas muestran algún tipo de actividad citotóxica o citolítica. Sin embargo, las células diana y la especificidad del huésped difieren, dependiendo de la toxina y de las diferencias en la acilación (McWhinney y col.; J. Bact. 174: 291-297 (1992) and Hackett y col.; J. Biol. Chem. 270: 20250-20253 (1995)). Por el resultado en las diferentes células diana, las diferentes toxinas de la familia de las toxinas RTX se conocen por ejemplo como hemolisina, citolisina o citotoxina.

20 El género *Actinobacillus* comprende varias especies diferentes, entre ellas, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *A. actinomycetemcomitans*, *A. suis*, *A. rossii*, *A. equuli* y *A. lignieresii*.

25 El *Actinobacillus pleuropneumoniae* produce toxinas RTX dependientes del serotipo que son citotóxicas/citolíticas para los eritrocitos del cerdo, caballo, bovinos y ser humano, para los neutrófilos del conejo y porcinos y para los macrófagos alveolares porcinos. (Rosendal y col; Am. J. Vet. Res. 49: 1053-1058 (1988), Maudsley J.R. y Kadis S; Can. J. Microbiol. 32: 801-805 (1986), Frey J. y Nicolet J.; Inf. & Imm, 56:2570-2575 (1988), Bendixon y col; Inf. & Imm, 33: 673-676 (1981), Kamp, E.M. y van Leengoed, L.A.M.G.; J. Clin. Microbiol. 27: 1187-1191 (1989)).

Las infecciones por *Actinobacillus* en cerdos son la causa de enormes pérdidas económicas para la industria porcina, debido a la mortalidad aguda en cerdos jóvenes y a la reducción de la ganancia de peso en los mayores.

30 La organización genética de los operones implicados en la síntesis, activación y transporte de las toxinas RTX en bacterias Gram-negativas ha sido revisada recientemente por Coote, J.G. (FEMS Microbiology reviews 88: 137-162 (1992)). Frey ha revisado específicamente las tres toxinas RTX conocidas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en Bacterial Protein Toxins, Zbl Bakt. Suppl. 24, p. 322-, Freer y coll. (Eds.), Gustaf Fischer, Stuttgart, Jena, New York, 1994.

35 En el *Actinobacillus pleuropneumoniae*, este tipo de operón RTX contiene cuatro genes: el gen real de la toxina (A), un gen activador (C), y dos genes (B y D) que codifican las proteínas implicadas en la secreción de la toxina en el medio circundante. El primer producto de la traducción del gen real de la toxina (A) no es una proteína tóxica, la actividad tóxica se activa por un producto del gen-activador (C).

Hasta hace poco, se asumía que solamente existían tres toxinas RTX en las especies de *Actinobacillus*, y que todas ellas tenían la organización genética descrita anteriormente o al menos que tenían el gen de la toxina (A) y el gen activador (C).

40 Estas tres toxinas RTX, ApxI, Apx-II, y Apx-III tenían respectivamente, una pronunciada actividad hemolítica (ApxI), una actividad hemolítica media (Apx-II) o una actividad citotóxica para los macrófagos (Apx-III).

Las distintas actividades tóxicas están divididas más o menos aleatoriamente en los serotipos. Hay cuatro subgrupos:

45 un subgrupo A, representado por los serotipos 1, 5, 9 y 11, que producen ApxI y Apx-II,  
un subgrupo B, representado por los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8, que producen Apx-II y Apx-III,  
un subgrupo C, representado por el serotipo 10, que produce solo ApxI  
un subgrupo D, representado por los serotipos 7 y 12, que produce solamente Apx-II.

50 Se sabe que ApxI, -II y -III, son todas elementos esenciales de las vacunas universales contra la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae*: una vacuna que no comprende al menos ApxI, -II, y -III no proporcionará protección contra todos los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Igualmente, una vacuna que no comprenda al menos las toxinas Apx de un serotipo específico ni siquiera inducirá protección contra ese único serotipo.

Se han descrito anteriormente subunidades vacunales basadas en toxinas RTX sintetizadas *in vitro* a partir de *A. pleuropneumoniae* que han perdido su toxicidad, por ejemplo en la Patente Europea EP N° 0.354.628, en la que se desvelan subunidades vacunales que se basan en una hemolisina y una citotoxina de *A. pleuropneumoniae* y en la Patente Europea EP 0.453.024, en la que se desvelan subunidades vacunales de *A. pleuropneumoniae* basadas en hemolisinas, citotoxinas y proteínas de la membrana externa.

Sin embargo hay cuatro desventajas importantes en las subunidades vacunales en general:

- se necesitan grandes cantidades de material antigénico para que se active adecuadamente del sistema inmunitario,
- normalmente, sólo se activa la inmunidad de células B,
- varios agentes protectores solo se activan *in vivo*, y por tanto no pueden estar presentes en las subunidades vacunales.
- una bacteria patógena viva tiene muchas moléculas inmunogénicas importantes, tales como las Proteínas de Membrana Externa y polisacáridos capsulares, que son todas ellas potencialmente importantes para la protección y por tanto para incluirse en una vacuna sub-unitaria eficaz.

Como en los problemas obvios mencionados en los puntos uno y dos, especialmente el cuarto punto hace que sea difícil fabricar una vacuna sub-unitaria eficaz.

Esto está, por ejemplo, ilustrado para la vacuna sub-unitaria de *A. pleuropneumoniae* desvelada en la Patente Europea EP N° 0.453.024, mencionada anteriormente, en la que se combinan cuatro subunidades distintas (tres toxinas RTX y una proteína de membrana externa) en una vacuna.

Está claro que, con el fin de superar las desventajas de las subunidades vacunales contra las infecciones por *Pasteurellaceae*, sería muy deseable una vacuna viva atenuada.

Una vacuna viva atenuada tiene las siguientes ventajas

- puede administrarse en dosis bajas (es autorreplicante)
- imita fielmente la infección por el natural / tipo silvestre
- proporciona todos los antígenos posibles inmunológicamente importantes al mismo tiempo.

Sin embargo, a pesar de las claras ventajas, no hay disponible comercialmente ninguna vacuna viva basada en *Actinobacillus pleuropneumoniae* anterior a la presente invención.

La razón para ello está en la siguiente paradoja: como se mencionó antes, las ApxI, -II y -III, son todas elementos esenciales de las vacunas universales contra la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Por tanto las vacunas vivas tienen que producir estas tres toxinas RTX. Estas tres toxinas RTX sin embargo son factores de alta virulencia en todas las especies de *Actinobacillus* (véase por ejemplo, Coote, J.G.; FEMS Microbiology reviews 88: 137-162 (1992), Tascon y col.; Mol. Microbiol. 14: 207-216 (1994), Jansen y col.; Inf. & Imm. 63: 27-37 (1995)).

La delección de las toxinas RTX con el fin de atenuar la virulencia de las cepas vivas de App es técnicamente posible, pero esto no proporciona una solución al dilema: tales cepas RTX negativas serían inútiles como cepas para una vacuna viva atenuada puesto que no inducirían inmunidad a largo plazo en el huésped contra la actividad hemolítica/citotóxica de las cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* de campo.

Sin embargo, no se conocen actualmente factores de virulencia que, aunque siendo importantes para la inducción de la inmunidad, tengan un papel menos importante en construir la inmunidad que ApxI, -II, y -III, y que por tanto se podrían eliminar.

Por tanto, sería muy deseable tener un sitio en el genoma de App que contribuyera a la virulencia y de esta manera al modificarse produjera una cepa de App atenuada, mientras que al mismo tiempo fuera, aunque útil para desencadenar inmunidad, prescindible desde el punto de vista de una vacuna. Sin embargo tales sitios no se conocen actualmente. Además, sería muy deseable que tal sitio estuviera presente universalmente en todas las cepas de App, en vez de estar restringido a ciertos serotipos. Tal sitio permitiría entonces atenuar todos los diferentes serotipos por la delección de ese mismo sitio.

Uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar tal sitio de atenuación, presente universalmente en todas las cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* independientemente de su serotipo.

Recientemente se encontró un nuevo gen en una cepa serotipo 1 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Tesis T.J. Anderson Nov. 1995).

Aunque este gen no se parece a los genes conocidos de ApxI, -II, y -III, tiene parecido a los genes de toxinas RTX que se conocen de bacterias que pertenecen a *Neisseria meningitidis*, por esta razón es que se le llamó gen RTX *apxIV*. Sin embargo, el gen difiere en casi todos los aspectos de los tres genes de toxinas RTX conocidos *apxI*, -II, y -III presentes en las distintas especies de la familia *Actinobacillus* como se describió anteriormente. En primer lugar,

la organización genómica es completamente diferente. En segundo lugar, no hay un mecanismo activador como el que se encuentra en las toxinas Apx conocidas. En tercer lugar, hasta ahora no se pudo atribuir una actividad hemolítica o citotóxica *in vivo* al gen, o su posible producto génico.

5 Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que este gen, totalmente al contrario que los tres genes RTX conocidos, está presente en todas las bacterias de las especies *Actinobacillus pleuropneumoniae*, independientemente de su serotipo. Esto se determinó por hibridación de una sonda que comprendía secuencias *apxIV* codificantes con fragmentos de restricción de ADN de *Actinobacillus pleuropneumoniae* de todos los serotipos como se describe en el Ejemplo 6 y el 7.

10 Se ha descubierto ahora, sorprendentemente, que los mutantes con delección de *apxIV* eran viables, pero que eran menos virulentos cuando se comparaban con sus cepas parentales que poseían *apxIV*.

15 Por tanto, se determinó que el producto génico, la toxina ApxIV es un factor de virulencia en todas las cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Esta es una conclusión inesperada ya que hasta ahora, no se había atribuido ningún efecto, considerando solo los efectos que influenciaran en la virulencia, al producto génico *in vivo*. De hecho, hasta ahora no había ninguna prueba de que el gen se expresara en *Actinobacillus pleuropneumoniae* de alguna manera, ni *in vivo*, ni *in vitro*.

Por lo tanto uno de los méritos de la invención es que se ha descubierto que:

- el gen *apxIV* está presente en todas las cepas de *A. pleuropneumoniae* independientemente del serotipo,
- el producto del gen *apxIV* es un factor de virulencia en todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae*,
- las cepas de *A. pleuropneumoniae* con una delección en el gen *apxIV* son aún viables pero tienen una virulencia menor sin que se afecten significativamente las propiedades inmunológicas de las cepas,

Por lo tanto, por primera vez se proporcionan unas bacterias vivas atenuadas de la especie *Actinobacillus pleuropneumoniae* que no producen una toxina ApxIV funcional.

25 Una toxina ApxIV funcional se considera que es una proteína que tiene todas las características de la toxina ApxIV que se expresa en la bacteria silvestre, y que se expresa al nivel de la silvestre. Por tanto, una toxina ApxIV no funcional se considera que es una toxina que carece de alguna o todas las características de la toxina ApxIV que se expresa en una bacteria silvestre, y/o que se expresa al nivel insuficiente para obtener los efectos de la toxina ApxIV silvestre.

30 La incapacidad para producir toxina ApxIV, puede deberse, por ejemplo, a modificaciones en la secuencia codificante que codifica la toxina ApxIV. También puede ser por ejemplo, el resultado de modificaciones en regiones que se conoce que están implicadas en la transcripción del gen *apxIV*, tales como la región promotora, o de modificaciones en regiones que están implicadas en la traducción, tales como el sitio de unión al ribosoma.

La estructura completa del gen *apxIV* se muestra en la figura 1.

35 En esta figura, las regiones de repetición directa, características de la toxina ApxIV están indicadas por marcos de líneas discontinuas, mientras que las regiones nonapeptídicas ricas en glicina también específicas de ApxIV se indican por flechas negras. Las repeticiones se encuentran en la parte del extremo C de ApxIV. Estas imágenes características están presentes en todos los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. La secuencia de ácidos nucleicos y la secuencia aminoacídica de dos serotipos están representadas en la SEC. ID. N° 1-4. La SEC. ID. N° 1 muestra la secuencia de ácidos nucleicos del gen *apxIV* del serotipo 1 de App, y la SEC. ID. N° 2 muestra la secuencia de aminoácidos de coincidencia de la toxina ApxIV del serotipo 1. La SEC. ID. N° 3 muestra la secuencia de nucleótidos del gen *apxIV* del serotipo 3 de App, mientras que la SEC. ID. N° 4 muestra la secuencia aminoacídica de coincidencia de la toxina ApxIV del serotipo 3. La figura 2 muestra el sorprendente alto nivel de conservación a nivel aminoacídico, especialmente en los 650 aminoácidos del extremo N, entre las toxinas Apx de los distintos serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Esto también es una característica remarcable de los genes *apxIV*. Está claro a la vista de la figura 1, que se puede producir una variación en el número de repeticiones en la parte del extremo C de la toxina, dependiendo del serotipo. Esta variación explica la diferencia de tamaño de los genes y las toxinas codificadas por los diferentes serotipos.

45 Puede haber alguna variación en la secuencia de ácidos nucleicos incluso entre genes *apxIV* aislados de diferentes aislados de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pertenecientes al mismo serotipo. Esto es debido a la variación natural bien conocida en la técnica que existe en todos los organismos. Es posible que algunos aminoácidos de la toxina ApxIV codificada por el gen *apxIV* se sustituyan por otros de la toxina ApxIV de otro serotipo, sin que el polipéptido se altere en su función. Por ejemplo, un polipéptido que contenga Asp en un cierto sitio, y su variante que contenga Asn en el sitio comparable siguen teniendo las mismas propiedades. Este proceso en el cual un aminoácido se sustituye por un aminoácido funcionalmente análogo se llama desplazamiento funcional. En este caso las proteínas que varían se llaman variantes funcionales. Otra causa de variación es el fenómeno de degeneración del código genético. En resumen, significa, que por ejemplo el aminoácido ácido glutámico es codificado tanto por GAT como por GAA. Este fenómeno se mantiene en todos los aminoácidos, excepto en Met y Trp. Por tanto, es obvio, que por ejemplo, la toxina ApxIV del serotipo 1, como se da en la presente invención puede no solo codificarse por la

secuencia de nucleótidos dada en SEC. ID. N° 1, sino también por una gran variedad de otras secuencias, que siguen dando todas ellas los mismos o funcionalmente los mismos polipéptidos.

Por lo tanto, una variante de la secuencia *apxIV* que codifica un polipéptido que es funcionalmente comparable a la toxina ApxIV, se encuentra comprendida en el ámbito de la presente invención.

5 Las bacterias vivas atenuadas se pueden obtener de varias maneras. Una forma posible de obtención de tales bacterias es por medio de procedimientos clásicos tales como el tratamiento de bacterias del tipo silvestre de *Actinobacillus pleuropneumoniae* con agentes mutagénicos tales como análogos de bases, tratamiento con luz ultravioleta o tratamiento por temperatura. Las cepas que no producen una toxina ApxIV funcional no inducen anticuerpos anti-toxina ApxIV o los inducen en menor cantidad, y por tanto se pueden seleccionar fácilmente en ensayos animales.

10 El antisuero necesario se puede obtener como se describe a continuación en el Ejemplo 3.

Otra posibilidad es introducir deliberadamente, utilizando tecnología de ADN recombinante, una mutación bien definida en el gen que codifica la toxina ApxIV. Tal mutación puede ser una inserción, una delección, una sustitución de un nucleótido por otro o una combinación de las mismas, con la única previsión de que el gen mutado no codificará ya una toxina ApxIV funcional.

15 Se puede apreciar fácilmente, que especialmente las mutaciones que introducen un codón de terminación en la fase de lectura abierta, o las mutaciones que producen un desplazamiento en la fase de lectura abierta son muy adecuadas para obtener una cepa que no codifique ya una toxina ApxIV funcional. Tales mutaciones pueden, por ejemplo, fabricarse por medio de mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* utilizando el kit Transformer® que comercializa Clontech. Se pueden aplicar, igualmente, muchas otras técnicas de referencia de ADN recombinante tales como digestión del gen con una enzima de restricción seguida de un tratamiento con endonucleasa y volviendo a unir.

20 Por tanto, en una forma preferida, esta realización se refiere a bacterias vivas atenuadas en las que el gen que codifica la toxina ApxIV comprende una mutación.

25 Las mutaciones bien definidas que implican la delección de fragmentos del gen *apxIV* o incluso del gen entero, o la inserción de fragmentos de ADN heterólogos, cuando se comparan con las mutaciones inducidas clásicamente, tienen la ventaja de que no revierten a la situación silvestre.

Así, en una forma más preferida, esta realización se refiere a bacterias vivas atenuadas en las que el gen que codifica la toxina ApxIV comprende una inserción y/o una delección.

30 Dada la gran cantidad de vacunas que se ponen hoy en día a los cerdos, está claro que sería deseable la administración combinada de varias vacunas, aunque solo sea por razones de reducción de costes de vacunación. Por tanto es muy atractivo utilizar cepas vacunales atenuadas como vehículos recombinantes para genes heterólogos, que codifiquen antígenos seleccionados de otros microorganismos o virus patógenos. La administración de tal vehículo recombinante tiene la ventaja de que tras la administración de tal vehículo, se induce la inmunidad contra dos o más enfermedades al mismo tiempo. Las bacterias vivas atenuadas proporcionan un vehículo muy adecuado para genes heterólogos, puesto que el gen que codifica la toxina ApxIV se puede utilizar como un sitio de inserción para tales genes heterólogos. El uso del gen *apxIV* como un sitio de inserción tiene la ventaja de que al mismo tiempo se inactiva el gen *apxIV*, y el nuevo gen heterólogo que se introduce puede expresarse conforme a los genes homólogos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. La construcción de tales vehículos recombinantes se puede hacer de manera rutinaria, utilizando las técnicas de referencia de biología molecular tales como la recombinación homóloga. Por lo tanto, en una realización aún más preferida, la bacteria viva atenuada de la especie *Actinobacillus pleuropneumoniae* que no produce toxina ApxIV funcional, tiene un gen heterólogo insertado en el gen *apxIV*. Tal gen heterólogo puede, como se ha mencionado anteriormente, por ejemplo, ser un gen que codifica un antígeno seleccionado de otros microorganismos o virus patógenos. Otra posibilidad es insertar un gen que codifique una proteína implicada en la activación del sistema inmunitario, tales como una interleucina o un interferón.

45 En una forma aún incluso más preferida, el gen heterólogo codifica uno o más antígenos seleccionados de entre el grupo que consiste en virus del Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino (SRRP), virus de la Pseudorrabia, virus de la Influenza porcina, Parvovirus porcino, virus de la Gastroenteritis Transmisible, rotavirus, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis* y *Streptococcus suis*.

50 Sin embargo hay un serio inconveniente en la expresión de genes heterólogos en vehículos recombinantes: se sabe que varias proteínas son tóxicas si se expresan en bacterias heterólogas. Por tanto, los genes que codifican tales proteínas nunca se introducen en los vehículos heterólogos, ya que los recombinantes satisfactorios eventualmente morirán como resultado de la expresión de cierta cantidad del gen heterólogo. La proteína P2 de *Haemophilus influenzae*, por nombrar un ejemplo, puede simplemente no expresarse en *E. coli* (Munson y col., Infect. & Immun. 57: 88-94 (1989)). Sorprendentemente se descubrió que aunque el gen *apxIV* se expresa eficazmente *in vivo* (véase el Ejemplo 5), no se expresa *in vitro* (véase el Ejemplo 4). Esto se concluyó por el fracaso al demostrar la presencia de toxina ApxIV en los cultivos en crecimiento *in vitro* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Esto significa que la

expresión de ApxIV se activa o se desactiva, dependiendo del entorno en el que crece *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Esta característica ofrece una ventaja inesperada sobre los vehículos vivos recombinantes conocidos: si la expresión del gen heterólogo se lleva a cabo bajo el control del promotor *apxIV*, el vehículo *Actinobacillus pleuropneumoniae* vivo atenuado de acuerdo con la invención puede cultivarse *in vitro* en altas cantidades, independientemente del gen heterólogo insertado, ya que el gen ajeno no se expresa bajo estas condiciones. Después de administrar una cantidad de bacterias al huésped, comenzará la expresión del gen heterólogo y durante el tiempo de replicación o tras la muerte de la bacteria estará disponible para el sistema inmunitario del huésped. El gen heterólogo que se va a expresar puede estar ligado funcionalmente al promotor *apxIV* por ejemplo sustituyendo la secuencia codificante del gen *apxIV* por la secuencia codificante del gen heterólogo. No es necesario sustituir todo el gen *apxIV*: es suficiente con sustituir el codón ATG del gen bajo influencia del promotor *apxIV* del gen heterólogo incluyendo su codón de terminación. También es posible expresar un gen heterólogo bajo la influencia del promotor *apxIV* haciendo una construcción de fusión. Esta puede hacerse insertando el gen heterólogo en fase con la fase de lectura *apxIV* corriente abajo del codón ATG *apxIV*.

La expresión "ligado funcionalmente al promotor *apxIV*" significa que la transcripción del gen heterólogo comienza en el promotor *apxIV*.

Ni que decir tiene que cada lugar en el que está insertado el gen heterólogo que está ligado funcionalmente al promotor *apxIV* se encuentra dentro del ámbito de la invención

Por lo tanto, la forma más preferida de esta realización se refiere a bacterias vivas atenuadas, que tienen un gen heterólogo que está ligado funcionalmente a la región promotora del gen *apxIV*.

El hallazgo sorprendente de que el promotor *apxIV* nativo es un promotor cambiante que se desactiva *in vitro* y se activa *in vivo* hace que sea una herramienta de expresión muy versátil en su huésped natural y como promotor heterólogo en otras bacterias. Cuando se utiliza como promotor heterólogo en otras bacterias, el ADN que comprende el promotor se puede aislar de su huésped y transferirse a una bacteria distinta de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Otra opción que ahora es factible, es la clonación de varias copias del promotor *apxIV* cada una de las cuales controla la expresión de otro gen. Esto puede hacerse en la bacteria huésped *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pero este principio de múltiples copias es igualmente aplicable a otras bacterias. Como se ha mencionado anteriormente, el promotor se puede utilizar para la expresión selectiva *in vivo* de uno o más genes heterólogos que codifican antígenos seleccionados de otros microorganismos o virus patógenos. El promotor también puede utilizarse para la expresión de una secuencia de ADN heteróloga que codifique una citoquina tal como una interleucina, un Factor de Necrosis Tumoral o un interferón. Varias citoquinas, por ejemplo los interferones se sabe que tienen un papel importante como moduladores inmunitarios. Por tanto puede ser ventajoso expresar tal información genética bajo el control del promotor *apxIV*.

Por tanto, otra realización se refiere a una secuencia de nucleótidos que alberga el promotor que controla la expresión del gen *apxIV*.

Se ha descubierto ahora que el promotor cambiante que en la situación nativa controla la expresión del gen *apxIV*, está localizado en el fragmento de ADN entre la posición 451 y 1132 de la SEC. ID. N° 5. Está claro, que las partes de este fragmento de ADN que no son elementos promotores esenciales, no necesitan necesariamente estar presentes en el fragmento. Por lo tanto, los fragmentos cortos de este fragmento de ADN en los que se retiene la actividad promotora, son igualmente adecuados para la expresión de genes heterólogos. Por lo tanto, una forma más preferida de esta realización se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende el fragmento de ADN de la posición 451 a 1132 de la SEC. ID. N° 5 o un subfragmento del mismo que aún retenga la actividad promotora.

Todos los promotores bacterianos comparten dos regiones consenso, las denominadas región -10, y región -35. Aunque la secuencia que flanquea estas regiones consenso puede hasta cierto punto influir en la eficacia del promotor, puede ser ventajoso utilizar solamente la parte de la región promotora que comprende el fragmento de ADN entre la región -35 y el codón ATG. Este fragmento de ADN está localizado entre la posición 617 y la posición 641 de la SEC. ID. N° 5. Por lo tanto, en una forma más preferida de esta realización la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende el fragmento de ADN desde la posición 617 a la 641 de la SEC. ID. N° 5.

La presente invención se refiere a la toxina ApxIV como un componente de una vacuna sub-unitaria.

Las subunidades vacunales comprenderán lo más probablemente las tres toxinas Apx conocidas. Esto se mencionó anteriormente. Como se descubrió inesperadamente sin embargo, que la toxina ApxIV está presente en todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae* como se mencionó anteriormente, es deseable que sea un componente adicional de las subunidades vacunales: los anticuerpos neutralizadores que aparecen contra la toxina ApxIV proporciona protección contra la toxina ApxIV producida por todas y cada una de las cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, independientemente del serotipo. Por lo tanto, otra realización de la invención se refiere a subunidades vacunales para la protección de animales contra la infección con una bacteria de la especie *Actinobacillus pleuropneumoniae*, que comprende toxina purificada ApxIV. La toxina ApxIV se puede administrar sola, o en combinación con cualquiera de o todas las toxinas ApxI, -II, y -III mencionadas anteriormente y/o por ejemplo, en combinación con Proteínas de la Membrana Externa (PME) de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Tales vacunas se pueden preparar fácilmente

mezclando toxina ApxIV en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La producción de toxina ApxIV es posible introduciendo el gen ApxIV en un vector de expresión adecuado, expresión del gen y aislamiento de la toxina. Se conocen muchos sistemas versátiles de expresión, tales como sistemas de expresión bacteriana, sistemas de expresión basados en baculovirus y sistemas de expresión en células de mamíferos. En el Ejemplo 3 se describe como obtener la toxina ApxIV por expresión del gen en *E. coli*.

Otra realización más de la invención se refiere a vacunas vivas atenuadas que comprenden bacterias vivas atenuadas como se describió anteriormente para la protección de animales contra la infección por una bacteria de la especie *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Tales vacunas se pueden obtener mezclando bacterias vivas atenuadas con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas vacunas comprenden al menos una cantidad inmunogénicamente eficaz de la bacteria viva atenuada que se produce de acuerdo con la invención. Inmunogénicamente eficaz significa que la cantidad de bacteria viva atenuada que se administra en el momento de la vacunación es suficiente para inducir en el huésped una respuesta inmune eficaz para las formas virulentas de bacteria que producen toxina RTX. La dosificación útil a administrarse variará dependiendo de la edad, el peso y el animal vacunado, el modo de administración y el tipo de patógenos contra el que se desea vacunar. La vacuna puede comprender cualquier dosis de bacterias, suficiente para evocar una respuesta inmune. Dosis muy adecuadas son por ejemplo, las dosis que oscilan entre  $10^3$  y  $10^{10}$  bacterias.

El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser tan simple como el agua, pero también puede comprender, por ejemplo, fluido del cultivo en el que se cultivaron las bacterias. Otro vehículo aceptable es por ejemplo una solución con una concentración salina fisiológica. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables o diluyentes útiles en la presente invención incluyen estabilizadores tales como SPGA, carbohidratos (por ejemplo sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas tales como albúmina o caseína, agentes que contienen proteína tales como suero bovino o leche desnatada y tampones (por ejemplo, tampón fosfato).

Opcionalmente, se pueden añadir a la vacuna uno o más compuestos que tienen actividad adyuvante. Los adyuvantes son estimulantes no específicos del sistema inmunitario. Aumentan la respuesta inmune del huésped contra el patógeno invasor. Ejemplos de adyuvantes conocidos en la técnica son los adyuvantes Completo e Incompleto de Freund, la vitamina E, polímeros no iónicos en bloque, muramildipéptidos, ISCOM (complejos inmunoestimulantes, cf. por ejemplo, en la Patente Europea EP 109942), saponinas, aceite mineral, aceite vegetal, y Carbopol (un homopolímero). Adyuvantes especialmente adecuados para aplicación mucosa son, por ejemplo, toxina termolábil de *E. coli* (TL) o toxina del Cólera (TC).

Otros adyuvantes adecuados son por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato u óxido, emulsiones oleosas (por ejemplo de Bayol F®, o Marcol 52®, saponinas o solubilizado de vitamina E).

Por lo tanto, en una forma preferida, las vacunas de acuerdo con la presente invención comprenden un adyuvante.

Para la administración a los animales, la vacuna de acuerdo con la presente invención se puede dar entre otras, por vía intranasal, intradérmica, subcutánea, por aerosol o por vía intramuscular.

Hay varias formas de almacenar tanto las subunidades como los organismos vivos. El almacenamiento en un refrigerador, por ejemplo, es un procedimiento bien conocido. También se utilizan a menudo almacenamientos a  $-70$  °C en un tampón que contenga glicerol. Las bacterias se pueden guardar también en nitrógeno líquido. La liofilización es otra forma de conservación. Las bacterias liofilizadas se pueden almacenar y mantener viables durante muchos años. Las temperaturas de almacenamiento para las bacterias liofilizadas pueden estar bien por encima de los cero grados, sin que haya un perjuicio de su viabilidad. La liofilización es igualmente aplicable para las subunidades.

La liofilización se puede hacer según todos los procedimientos de liofilización de referencia bien conocidos. Se pueden añadir aditivos beneficiosos opcionales en el proceso de liofilización, tales como por ejemplo, la leche desnatada, trehalosa, gelatina, o albúmina de suero bovino.

Por lo tanto, en una realización más preferida, la vacuna de acuerdo con la presente invención está en forma liofilizada.

En una forma más preferida de esta realización. La vacuna comprende adicionalmente uno o más antígenos seleccionados de entre otros microorganismos o virus patógenos.

Tal vacuna se puede obtener añadiendo uno o más antígenos seleccionados de entre otras bacterias o virus patógenos a la bacteria viva atenuada de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable como se describió anteriormente.

Por supuesto, es posible añadir no solamente uno o más antígenos, sino también uno o más de los patógenos enteros tal cual, en forma viva o inactivada.

Se puede obtener alternativamente clonando la información genética que codifica uno o más antígenos seleccionados de otros microorganismos o virus patógenos en la bacteria viva atenuada, utilizando la tecnología de ADN recombinante conocida como se describió anteriormente.

5 Tales vacunas son por supuesto menos estresantes para el animal que se va a vacunar que las vacunaciones separadas con cada uno de los patógenos, tanto desde el punto de vista médico como físico.

En una forma más preferida, estos antígenos se seleccionan de entre el grupo que consiste en virus del Síndrome Respiratorio Reprodutor Porcino (SRRP), virus de la Pseudorrabia, virus de la Influenza Porcina, Parvovirus Porcino, virus de la Gastroenteritis Transmisible, rotavirus, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis* y *Streptococcus suis*.

10 La invención también describe procedimientos para la preparación de una bacteria viva atenuada de la especie *Actinobacillus pleuropneumoniae* que no es capaz de producir una toxina ApxIV funcional. Este procedimiento comprende la introducción de una mutación en el gen que codifica la proteína ApxIV. Son aplicables tanto las técnicas clásicas de mutación, que utilizan agentes mutagénicos, como las técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica para la inserción, sustitución o delección de información genética en el gen *apxIV*.

15 En una forma preferida, los procedimientos mencionados anteriormente se utilizan para la introducción de una delección.

También están descritos por la invención los procedimientos para la preparación de una vacuna viva atenuada, que comprende la mezcla de bacterias de acuerdo con la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 También se encuentran en el ámbito de la invención procedimientos para la preparación de una vacuna sub-unitaria. Tales procedimientos comprenden la mezcla de toxina ApxIV purificada y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro problema conocido generalmente en el campo de la vacunación con vacunas vivas es el siguiente: La presencia de anticuerpos contra ciertos patógenos en el suero de un animal huésped indica que el huésped ha sido infectado con el patógeno, sea en una forma virulenta o atenuada. Sin embargo es imposible discriminar entre los animales infectados por una cepa de campo y los animales vacunados con una cepa vacunal viva. El *Actinobacillus pleuropneumoniae* vivo atenuado de acuerdo con la presente invención ofrece una solución a este problema como se muestra a continuación:

30 Como se describe en el Ejemplo 3, el gen *apxIV* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 se ha aislado y expresado en una célula huésped heteróloga. Este producto de expresión se sometió a electroforesis en gel PAGE y luego se utilizó para transferencia de Western. Las transferencias se incubaron con el suero en fase de convalecencia obtenido de cerdos infectados con *Actinobacillus pleuropneumoniae* deliberadamente, y suero de cepas de campo. Se descubrió que el gen *apxIV* se expresa *in vivo* en todas las cepas de campo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* ensayadas. Esto implica, que los cerdos infectados por *Actinobacillus pleuropneumoniae* siempre tendrán anticuerpos contra la cepa por la que fueron infectados, independientemente del serotipo de la cepa infecciosa.

35 Las bacterias vivas atenuadas de acuerdo con la presente invención pueden, debido a la delección del gen *apxIV*, no producir más toxina ApxIV. Por lo tanto los animales vacunados con una cepa viva atenuada de *Actinobacillus pleuropneumoniae* de acuerdo con la invención no tendrán anticuerpos contra la toxina ApxIV en su suero.

40 En un ensayo comparativo, por ejemplo un ensayo ELISA, tales sueros por tanto reaccionarán con todas las proteínas inmunogénicas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* tales como por ejemplo ApxI, -II, y -III, pero no con ApxIV. Los sueros de cerdos infectados con una cepa de campo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sin embargo reaccionarán con todas las proteínas inmunogénicas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, incluyendo la ApxIV. Por lo tanto, el *Actinobacillus pleuropneumoniae* vivo atenuado de acuerdo con la presente invención resulta ser una vacuna marcadora muy adecuada, es decir, una cepa vacunal que puede discriminarse de la cepa de campo.

45 Un ensayo diagnóstico para la discriminación entre cepas vacunales y cepas de campo puede ser un simple ensayo ELISA en el que la toxina ApxIV purificada recubre la pared de los pocillos de una placa de ELISA. La incubación con suero de los cerdos que se van a ensayar, seguido por, por ejemplo, incubación con un anticuerpo anti-cerdo marcado puede entonces revelar la presencia o ausencia de anticuerpos contra la toxina ApxIV.

50 Otro ejemplo de un sistema de ensayo diagnóstico es por ejemplo, la incubación de una transferencia de Western que comprende toxina ApxIV purificada con suero de cerdos a ser ensayados, seguido por la detección de los anticuerpos específicos anti- ApxIV.

Por tanto, el ensayo diagnóstico para la discriminación entre sueros de cerdos infectados con cepas de campo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y de cerdos vacunados con una vacuna que comprende una vacuna viva atenuada de cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* de acuerdo con la invención, que comprende la toxina ApxIV purificada, también se encuentra dentro del ámbito de la invención.

Otro problema más que se ha visto en sanidad porcina es el siguiente: Es difícil determinar de manera rápida y no ambigua si un cerdo está infectado por *Actinobacillus pleuropneumoniae* o por *A. suis*, o posiblemente por una combinación de ambos. Los ensayos diagnósticos para la detección de *A. suis* no están disponibles actualmente. Esto es principalmente debido al hecho de que *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *A. suis* comparten demasiados antígenos. Como ejemplo puede servir, que dos toxinas Apx altamente antigénicas: la ApxI y ApxII tienen homólogos altamente conservados en por ejemplo *A. suis* (Van Ostaayen y col., enviado para publicación).

Los genes RTX conocidos, que codifican toxinas ApxI, -II, y -III o sus homólogos se encuentran en prácticamente todos los miembros del género *Actinobacillus*, tales como *A. pleuropneumoniae*, *A. suis*, *A. rossii* y *A. equuli*. Por tanto, se asumió inicialmente por los inventores, que la nueva toxina RTX ApxIV también sería común a todos los miembros del género *Actinobacillus*.

Si embargo se descubrió después de ensayar un *Actinobacillus* patógeno porcino, de nuevo sorprendentemente al contrario que los tres genes RTX conocidos, que este nuevo gen RTX *apxIV* solamente está presente en el patógeno porcino *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Está ausente en todas las otras especies patógenas porcinas de *Actinobacillus*, y por tanto también está ausente en *Actinobacillus suis*. Véanse los Ejemplos 6 y 7.

Por lo tanto, se apreció sorprendentemente que la presencia de anticuerpos contra ApxIV en el suero de un cerdo es una prueba rápida y no ambigua de que el cerdo ha sido infectado con *A. pleuropneumoniae* y no con *A. suis* o cualquier otra especie patógena porcina de *Actinobacillus*.

0087 Por tanto la presente invención también proporciona un ensayo diagnóstico basado en la presencia o ausencia de anticuerpos contra ApxIV, y por tanto un ensayo discriminatorio para distinguir específicamente una infección por *A. pleuropneumoniae* de una infección por *A. suis*. Tal ensayo puede ser por ejemplo, un ensayo ELISA que comprende en pocillos separados las toxinas ApxI y -II, presentes tanto en *A. pleuropneumoniae* como en *A. suis* y la toxina ApxIV purificada. El suero de animales infectados con *A. suis* reaccionará solamente con los pocillos que comprendan la ApxI y -II, mientras que los animales infectados por *A. pleuropneumoniae* también reaccionarán con el pocillo que comprende la toxina ApxIV purificada.

#### Ejemplo 1:

##### Clonación y análisis del gen *apxIV* del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae*

Se llevaron a cabo los procedimientos biológicos moleculares de referencia (aislamiento de plásmido ADN, digestión por restricción, electroforesis en gel de agarosa, transferencia de Southern, unión, transformación, electroporación), a menos de que se establezca otra cosa, esencialmente como se describe en Sambrook y col. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) o Ausubel y col., (Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, N.Y., 1987). La PCR se llevó a cabo esencialmente como se describe en Innis y col., (PCR protocols, A guide to Methods and Applications, Academic Press Inc., San Diego, 1990). El aislamiento de ADN cromosómico se llevó a cabo de acuerdo con Pitcher y col., (Lett. Appl. Microbiol., 8;151-156, 1989). El origen de todas las cepas de *A. pleuropneumoniae* de referencia serotipo 1: cepa 4074; serotipo 2: cepa S1536; serotipo 3: S1421; serotipo 4 M62; serotipo 5a: K17; serotipo 5b: L20; serotipo 6: femø; serotipo 7: WF83; serotipo 8: 405; serotipo 9: CV113261; serotipo 10: 13039; serotipo 11: 56153 and serotipo 12: 8329) se describen en Frey y Nicolet, (J. Clin. Microbiol., 28;232-236, 1990). La cepa HV114 del serotipo 3 es un aislado de campo (es decir una de las cepas del serotipo 3 ensayados en Beck y col., J. Clin. Microbiol., 32;2749-2754, 1994). Otras cepas de *Actinobacillus* que se utilizaron fueron; *A.rossii*: ATCC 27072; *A. equuli*: ATCC 19392; *A. suis*: ATCC 15558. Se utilizó también la cepa de *Pasteurella haemolytica* tipo 1 cepa ATCC 14003.

Las cepas huésped *E. coli* que se utilizaron: XL1-blue (Stratagene, La Yolla, Ca; genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacZ*DM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)] y HMS174(DE3) (AMS Biotechnology Ltd, Suiza; genotipo: F- *recA* (*r<sub>K12</sub>*- *m<sub>K12+</sub>*) *rif<sup>r</sup>* IDE3).

Basándose en los datos de la secuencia preliminar obtenida de la tesis de T.J. Anderson (University of Guelph, 1995), se sintetizaron dos cebadores designados APXIVA-1L (5'-TGGCACTGACGGTGATGA-3') y APXIVA-1R (5'-GGCCATCGACTCAACCAT-3'). Estos cebadores se utilizaron en una amplificación PCR, con ADN cromosómico del serotipo 3 de *A. pleuropneumoniae* cepa HV114 y el serotipo 1 de referencia cepa 4074 como matriz. Con ambas cepas se amplificó un fragmento de 442 pb. El fragmento derivado del ADN cromosómico del serotipo 3 se marcó con Digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim) de acuerdo con el protocolo del fabricante (este fragmento se designó sonda APXIVA, véase fig. 4). La sonda marcada se utilizó posteriormente para hibridar una transferencia Southern que contenía ADN cromosómico digerido por *ClaI* de la cepa 4074. La sonda se hibridó con un fragmento de aproximadamente 8,0 kb. El gen *apxIV* de la cepa 4074 serotipo 1 se aisló uniéndolo con el ADN cromosómico digerido por *ClaI* en el pBluescript II SK con el digerido por *ClaI* (Stratagene EE.UU.). La cepa de *E. coli* XL-1-blue se transformó con el ADN unido y se seleccionaron los transformantes en una placa LB con 100 mg/ml de ampicilina. Los clones que albergaban el *apxIV* se seleccionaron por hibridación de la colonia con una réplica de nitrocelulosa de la placa con la sonda APXIVA. Así, se aisló un plásmido designado pROK7 y se demostró que albergaba un *ClaI* insertado de aproximadamente 8 kb. Las primeras 6736 pb de la inserción *ClaI* se secuenció (SEC. ID. 1) y se identificó una fase de lectura abierta de 4971 nucleótidos que codificaba una proteína de 1657 de

restos aminoacídicos (SEC. ID 2) con un tamaño predicho de aproximadamente 186 kD. El gen se denominó *apxIV\_var1* (véase fig.3).

### Ejemplo 2:

#### Clonación y análisis del gen *apxIV* del serotipo 3 de *A. pleuropneumoniae*

5 La sonda marcada APXIVA (mencionada en el Ejemplo 1) se utilizó para hibridar una transferencia de Southern que contenía el ADN cromosómico digerido por *Clal* de la cepa HV114. La sonda se hibridó con un fragmento de aproximadamente 7,0 kb. El ADN cromosómico aislado de HV114 se digirió con *Clal*, y se unió con el pBluescript II SK<sup>-</sup> (Stratagene EE.UU.) digerido con *Clal*. La cepa de *E. coli* XL-1-blue se transformó con el ADN unido y los transformantes se seleccionaron en una placa LB con 100 mg/ml de ampicilina. Los clones que albergaban el *apxIV* se seleccionaron por hibridación de la colonia con una réplica de nitrocelulosa de la placa con la sonda APXIVA. Así, se aisló un plásmido denominado pROK5 y se demostró que albergaba un *Clal* insertado de aproximadamente 7 kb. La inserción se analizó por análisis de la secuencia (SEC. ID. 3). Se identificó una fase de lectura abierta de 4146 pb que codificaba una proteína de 1382 restos aminoacídicos (SEC. ID. 4), con un tamaño predicho de aproximadamente 154 kD. El gen se designó *apxIV\_var3* (véase la fig. 3).

### 15 Ejemplo 3

#### Expresión de las proteínas de fusión ApxIV-polihistidina en *E. coli*

A partir del plásmido pROK5, se fabricó un clon de delección que contenía el extremo 3' del gen *apxIV*, empezando en el sitio *Bam*HI (nucleótido N° 2747 de la SEC. ID. N° 3) hasta el sitio *Clal* al final de la inserción corriente abajo del gen *apxIV*. Este plásmido se designó pROK1. Utilizando los oligonucleótidos APXIVAHIS1-L (5'-AGCCATATGGGCGATTAAATTCAG-3') y APXIVAHIS1-R (5'-TATGGATCCTCCGTGCTTCTGAGC-3') y el ADN del plásmido pROK1 como matriz, se amplificó un fragmento de ADN de 2,1 kb (véase fig. 4) que contenía la región desde la 3520 a 5643 pb en *apxIV\_var3* (SEC. ID. 3) flanqueado por los sitios de restricción *Nde*I y *Bam*HI en los extremos 5' y 3', respectivamente. Después de la clonación del fragmento PCR digerido *Nde*I/*Bam*HI en el vector de expresión pETHIS-1, digerido con las mismas enzimas, se obtuvo un plásmido designado pJFFapxIV6/10his-1. El plásmido pETHIS-1 es un derivado del pET14b (Novagen Inc., Madison, Wi.) en el que se ha extendido el sitio de clonación múltiple y se ha insertado una región que codifica un decámero de histidina. En consecuencia, el plásmido pJFFapxIV6/10his-1 contiene una fusión traduccional que codifica un hexámero de histidina, seguido por los restos 653 a 1360 de la SEC. ID. 4, seguido por un decámero histidina, bajo el control de un promotor T7. El plásmido se transfirió a la cepa HMS174(DE3) de *E. coli* con el pLysS, el cual contiene un gen T7 ARN polimerasa inducible por IPTG, así como el gen T7 de la lisozima para aumentar la estabilidad. La cepa se cultivó en medio LB que contenía 25 mg/ml de cloranfenicol y 100 mg/ml de ampicilina, hasta una DO<sub>650</sub> de 0,5, se indujo con isopropil-b-D-tiogalactopiranosido a una concentración de 10 mM. Después de la adición de IPTG, las células se incubaron a 37 °C durante 2,5 horas, las células se recolectaron por centrifugación, y se aisló la proteína esperada de 80 kD en forma de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron en una solución de hidrócloruro de guanidina, ClNa 300 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 8,0 y posteriormente se purificó la proteína de fusión de 80 kD por Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC) (Schmitt y col., Molecular Biology Reports 18;223-230, 1993) utilizando columnas de Ni<sup>2+</sup> quelado (Qiagen AG, Basel). La proteína pura se eluyó de la columna a pH 5,0. Las fracciones agrupadas se dializaron contra una solución de NaCl 300 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM a pH 8,0. Se inmunizó un conejo con 500 mg del producto polihistidina de fusión, mezclado con 1 volumen de adyuvante completo de Freund (Difco Labs, Detroit, MI). Se aplicó una dosis de refuerzo de la misma cantidad, mezclada con adyuvante incompleto de Freund 3 semanas más tarde. Cuatro semanas después del refuerzo se sacó la sangre del conejo y se obtuvo un suero hiperinmune que comprendía anticuerpos anti- toxina ApxIV, que se denominó suero 522-409.

### Ejemplo 4:

#### Expresión de los genes *apxIV* en crecimiento *in vitro* de *A. pleuropneumoniae*

La cepa de *A. pleuropneumoniae* de referencia del serotipo 1 se cultivó en caldo Columbia suplementado con 10 mg/ml de b-NAD y se recolectó como se había descrito (Beck y col., J. Clin. Microbiol., 32;2749-2754, 1994). Adyacente a los carriles que comprendían proteínas de fusión ApxIA, ApxIIA, y ApxIVA-polihistidina se separó el sobrenadante del cultivo concentrado por electroforesis de gel de poliacrilamida (Laemmli, Nature 227:680-685, 1970) y se sometió a un procedimiento de transferencia de Western (Towbin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354, 1979). La transferencia de Western reaccionó con los anticuerpos monoclonales anti-ApxIA y anti-ApxIIA como describe Beck y col., (J. Clin. Microbiol., 32;2749-2754, 1994), y con el suero anti-ApxIV 522-409 (véase el Ejemplo 3). La fracción de toxina RTX del serotipo 1 contenía claramente ApxIA y ApxIIA. La presencia de ApxIVA no se pudo demostrar (véase la fig. 5).

55

**Ejemplo 5:**Expresión de los genes *apxIV* en *A. pleuropneumoniae* in vivo durante la infección

Un gel de poliacrilamida que contenía la proteína de fusión polihistidina-ApxIV\_var3 de 80kD (véase el ejemplo 3) se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se dividió en tiras que se hicieron reaccionar con  
 5 (diluciones de 100 veces de) sueros de convalecientes de serotipo 1 de campo, o sueros de un cerdo infectado con la cepa de referencia del serotipo 1 (Frey y Nicolet, Vet. Microbiol., 28:61-73, 1991). La reacción se visualizó utilizando un conjugado marcado de fosfatasa alcalina contra la IgG de conejo (Kirkegaard Perry Inc., Gaithers-burg, Md.) y el desarrollo de color de NBT (cloruro de 4-Nitrotetrazolio azul) y BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolil-fosfato) (véase la fig. 6). Los sueros del serotipo 1 de campo, así como el suero del cerdo infectado experimentalmente  
 10 reaccionaron con la proteína polihistidina-ApxIV\_var3 de 80 kD. Esto indicaba que la proteína ApxIV que se expresaba en ese momento, es antigénica e induce anticuerpos anti toxina ApxIV durante la infección por *A. pleuropneumoniae* en cerdos.

**Ejemplo 6:**

Presencia de genes *apxIV* en todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae* y ausencia de los mismos en cepas de *Actinobacillus* no *pleuropneumoniae* utilizando transferencia de Southern  
 15

Para investigar la presencia del gen *apxIV* en los distintos serotipos de *A. pleuropneumoniae* y bacterias relacionadas, se hicieron tres sondas (véase la fig. 4). La sonda APXIVA se describe en el ejemplo 1. La sonda APXIVA2 contiene el fragmento de ADN de 2015 pb entre los sitios *Bam*HI y *Nru*I. Se construyó la sonda APPIVA1 de 758 pb por amplificación PCR con los oligonucleótidos APPIV1-L (5'-GGGACAGTGGCTCAATTAAG-3') y APPIV1-R (5'-AGCTGTAACTCCACCAACG-3'). Todas las sondas se marcaron con Digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se hibridaron con las transferencias de Southern del ADN cromosómico digerido con *Clal* de todas las cepas de *A. pleuropneumoniae* de referencia y la cepa de campo HV114, *Actinobacillus suis* (ATCC 15558), *Actinobacillus rossii* (ATCC 27072) y *Actinobacillus equuli* (ATCC 19392). Las tres sondas reaccionaron similarmente (véase la fig. 7 para los resultados con la sonda APXIVA2). Todas las cepas de *A. pleuropneumoniae* reaccionaron, mientras que no se observó hibridación con las cepas de *A. suis*, *A. equuli* y *A. rossii*.  
 20  
 25

**Ejemplo 7:**Presencia de genes *apxIV* en *A. pleuropneumoniae* y cepas relacionadas utilizando amplificación PCR

Se llevó a cabo la amplificación PCR con 50 ng de ADN cromosómico de distintos serotipos de *A. pleuropneumoniae*, otras especies de *Actinobacillus* y *P. haemolytica* como matrices, y los cebadores APXIVA-1 L (5'-TGGCACTGACGGTGATGA-3') y APXIVA-1R (5'-GGCCATCGACTCAACCAT-3'). Después de los análisis de los productos en gel de agarosa, se observaron los productos con el tamaño esperado de 442 pb en todas las muestras de *A. pleuropneumoniae*, pero en ninguna de las otras especies de *Actinobacillus* (fig. 8). Esto indica que además de los resultados del ejemplo 6, la PCR también se podía utilizar para discriminar *A. pleuropneumoniae* de otras especies de *Actinobacillus*.  
 30  
 35

**Ejemplo 8:**Sobre-expresión de la proteína de fusión ApxIV-var1 polihistidina

Se amplificó un fragmento por PCR comenzando con el plásmido pROK-7 (véase el ejemplo 1) como matriz y los oligonucleótidos APX4/115-L (5'-CGCCATATGACAAAATTAATGCAAG) y APX4116-R (5'-CGCGAATTCAGCGACACAAGAGATAT) como cebadores de PCR. Se digirió entonces una cantidad suficiente de este fragmento con las enzimas de restricción *Nde*I y *Eco*RI y se clonó en el vector de expresión pETHIS-1, digerido con las mismas enzimas que las descritas en el Ejemplo 3. A partir del plásmido resultante, designado pJFFApxIVA1His1, se sobre-expresó en *E. coli* una proteína de fusión polihistidina de 206 kD (PM determinado por PAGE) de 1841 restos aminoacídicos como se describe en el Ejemplo 3. La proteína se codifica en la región codificante que abarca desde el ácido nucleico nº 1132 al 6546 como se presenta en la SEC. ID Nº 5. La secuencia aminoacídica de la proteína se da en la SEC. ID. Nº 6. Se demostró en la transferencia de Western que este producto reacciona con suero específico anti- ApxIV 522-409 (el antisuero descrito en el ejemplo 3).  
 40  
 45

**Ejemplo 9:**Protección de ratones contra el desafío con APP por vacunación con ApxIV

La proteína de fusión polihistidina-ApxIV de 206 kD que se describe en el Ejemplo 8 y una proteína de fusión polihistidina ApxIA de 108 kD comparable, ambas derivadas de material genómico de la cepa 4074 serotipo 1 de referencia, se sobre-expresaron como se describió en el ejemplo 3. El aglomerado celular de las células *E. coli* inducidas se resuspendió en tampón PBS (1 g. de aglomerado celular en 6 ml de tampón) y se sonicó en hielo durante dos veces de 45 segundos para la destrucción de las células. Después de la centrifugación durante 20  
 50

minutos a 22.000x g a 4 °C, se descargó el sobrenadante y el aglomerado resultante se lavó con una solución de urea 3 M (pH 6,3). La urea se eliminó tras la centrifugación durante 20 minutos a 22.000x g. y se solubilizó el aglomerado resultante en HCl de guanidinio 6 M (pH 8,0). Las muestras de proteínas se normalizaron según su contenido de proteína específica tras la densitometría de los geles de PAGE. Las muestras se disolvieron en PBS y se formularon con un adyuvante oleoso.

Se inmunizaron por vía intraperitoneal tres grupos de 15 ratones cada uno, con el antígeno ApxIV (36,3 microgramos), el antígeno ApxIA (36,3 microgramos), o el adyuvante solo. Las vacunas se administraron con un volumen de 0,4 ml. Veinticuatro días después de la primera vacunación, cada grupo de ratones se dividió en dos grupos de 7 y 8 ratones a los que se les hizo un refuerzo con la mitad de dosis de antígeno. A los grupos de 7 ratones se les reforzó por vía intraperitoneal con un volumen de 0,2 ml y los grupos de 8 ratones se vacunaron por vía intramuscular en la pata trasera con 0,1 ml cada uno. Trece días después del refuerzo, los ratones se desafiaron por vía intraperitoneal con  $1,5 \cdot 10^8$  ufc del serotipo 1 de una cepa virulenta.

### Ejemplo 10:

#### Capacidad de formación de poros de ApxIV:

Se utilizaron células de *E. coli* recién inducidas que expresaban ApxIV como fuente de proteínas para ensayar la formación de poros en bicapas lipídicas artificiales como describen Maier y col., Infect. Immun., 64; 4415-4423(1996). Los procedimientos utilizados por los experimentos en bicapa lipídica negra se habían descrito anteriormente (Benz t col.; Biochim. Biophys. Acta 511: 305-319 (1978)). Se formaron membranas a partir de una solución de asolectina al 1% (lecitina de soja tipo IV-S de Sigma, St. Louis, MO) en n-decano. Se midieron los potenciales de membrana cero en ese momento con un electrómetro Keithley 610 C después de que se estableciera un gradiente de sal de 10 veces a través de las membranas (Benz y col.; Biochim. Biophys. Acta 551: 238-247 (1979)). La presencia de ApxIV dio como resultado en una alta frecuencia de formación de poros en presencia de colesterol al 0,5%, con una media de conductancia de único canal (G) de 4 ns.

Estos resultados indican que la ApxIV induce poros en las bicapas artificiales y por tanto es tóxica para células eucariotas y por tanto es un factor de virulencia de *A. pleuropneumoniae*.

#### Leyenda de las figuras:

Figura 1: Comparación de ApxIVavar1 y ApxIVavar3 (var permanece por el serotipo). Representación gráfica de las diferentes características encontradas en el extremo C. Los cuadros discontinuos representan las regiones de repetición directa en ApxIVA. Las barras verticales en negrita indican la posición de nonapéptidos ricos en glicina, y las firmas de la familia B de la ADN polimerasa se indican por triángulos negros. La secuencia aminoacídica YSDSANSKK representa la secuencia espaciadora en el gen ApxIVavar3. El segmento de la secuencia de ApxIVavar1 que se deleciona en ApxIVavar3 también se indica en la figura.

Figura 2: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de repetición directa 1 (A), repetición directa 2 (B) y repetición directa 3 (C) de ApxIVvar3. Las copias de cada una de las repeticiones directas 1, 2 y 3 se marcan con letras para distinguirlas de la secuencia de comparación. Los restos de las variantes se muestran en negrita.

Figura 3: Mapas de restricción parcial de pBLac7 (Tesis de T.J. Anderson Universidad de Guelph, 1995), pROK7 y pROK5. Las diferentes fases de lectura abiertas (ORF) se indican con flechas. La flecha interrumpida de lacZ en pROK7 indica la secuencia parcial del gen. Los terminadores de la transcripción potenciales dependientes de rho se indican por (W), los sitios potenciales de comienzo de la transcripción se indican con un triángulo. Sitios de restricción: A=Asp700; B=BamHI; C= Clal; E=EcoRV; Ec=EcoRI; H=hindIII; N= NruI; Nd=NdeI; Nh=NheI; P= PstI; S= SpeI; Sm=SmaI.

Figura 4: Localización de los distintos oligonucleótidos y sondas en el mapa del gen apxIVavar3.

Figura 5: Expresión de ApxIV *in vitro* en el serotipo 1 de la cepa 4074 de referencia cultivada. El panel A reaccionó con el anticuerpo monoclonal anti-ApxIA, en el panel B con el anticuerpo monoclonal anti-ApxIIA y en el panel C reaccionó con suero 522-409 anti-ApxIVA. calle El carril 1 contiene la proteína de fusión ApxIA-polihistidina, el carril 2 contiene la proteína de fusión ApxIIA-polihistidina, el carril 3 contiene el sobrenadante concentrado del cultivo de la cepa 4074, el carril 4 contiene la proteína de fusión ApxIVA- polihistidina.

Figura 6: Inmunotransferencia que muestra las reactividades de sueros de cerdos que fueron infectados experimentalmente con la cepa de referencia de serotipo 1 (carril 1) o sueros de cerdo de las infecciones del serotipo 1 de campo (carril 2-4) con la proteína de fusión ApxIV-polihistidina. Como control positivo (+), se utilizó el suero 522-409, como control negativo (-), se utilizó el suero policlonal de conejo contra ApxI y ApxII (Frey y col., Infect. Immun.. 57;2050-2056, 1989) con una dilución de 1000 veces.

Figura 7: Transferencia de Southern del ADN genómico digerido por Clal hibridado con la sonda APXIVA2. Carriles 1-13: Cepas de referencia de *A. pleuropneumoniae*; 1: serotipo 1; 2: serotipo 2; 3: Serotipo 3; 4:

serotipo 4 ; 5: serotipo 5a; 6: serotipo 5b; 7: serotipo 6; 8: serotipo 7; 9: serotipo 8; 10: serotipo 9; 11: serotipo 10; 12: serotipo 11; 13: serotipo 12; 14: cepa de campo HV114; 15: *A. suis* (ATCC 15558); 16: *A. rossii* (ATCC 27072); 17: *A. equuli* (ATCC 19392). El tamaño molecular de los marcadores se indica a la izquierda (en kilopares de bases).

5 Figura 8: amplificación por PCR de *apxIV* usando los cebadores APXIVA-1 L y APXIVA-1 R. Asignaciones de carriles: los carriles 1 a 13 contienen las cepas de referencia de *A. pleuropneumoniae* de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 respectivamente; carril 14: cepa HV114; carril 15: *A. suis* ATCC 15558; carril 16: *A. rossii* ATCC 27072; carril 17: *A. equuli* ATCC 19392; carril 18: *A. lignieresii* ATCC 49236; carril 19: *P. haemolytica* de tipo 1 ATCC 14003. A la izquierda se indican los marcadores de tamaño molecular (en pares de kilobases).

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: AKZO Nobel N.V.
- (B) CALLE: Velperweg 76
- (C) CIUDAD: Arnhem
- (E) PAÍS: The Netherlands
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 6824 BM

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: *Actinobacillus pleuropneumoniae* vivo atenuado

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) TIPO MEDIO: Disco flexible
- (B) ORDENADOR: PC IBM compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30 (EPO)

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: 1

- (A) LONGITUD: 6736 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Actinobacillus pleuropneumoniae*
- (B) CEPA: 4074 (cepa de referencia serotipo 1)

(vii) FUENTE INMEDIATA:

- (B) CLON: pROK7

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 1576..6549
- (D) OTRA INFORMACIÓN: /codón de inicio= 1576  
/función= "toxina RTX"  
/producto= "ApxIV-var1"

/gen= "apxIV\_var1"  
 /número= 1

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS: SEC ID Nº: 1:

5

ATCGATATGC	CGCCGGGTAC	GGGCGATATC	CAACTTACTC	TTTCGCAACA	AATFCCGGTT	60
ACCGGTGCGG	TGGTGGTAAC	CACTCCGCAA	GATATTGCGT	TATTAGATGC	GGTGAAAGGT	120
ATTTCAATGT	TCCAAAAGT	GTCGGTACCG	GTCTTAGGTA	TCATTGAAAA	TATGAGCGTA	180
CATATCTGCC	AAAATTGCGG	TCACCACGAA	GATATTTTCG	GCACCGGCGG	TGCGGAGAAA	240
GTGGCGAAGA	AATACGGTAC	TAAAGTATTA	GGACAAATGC	CGTTGCATAT	TCGCTTACGT	300
CAAGATTTGG	ATGCCGGCAC	ACCGACCGTC	GTTGCGGCAC	CGGAACACGA	AACCAGCCGA	360

GCCTATATTG AATTAGCGGC AAAAGTCGCT TCGGAATTAT ACTGGCAAGG TTCGGTTATC	420
CCGTCTGAAA TTATGATTCG TGAAGTAAAA TAAGTTTTAA TAACCACGAA AACACAAAGA	480
ACACAAGCGG TAGAATTTGC AGAAAAATTT GCAAATCCTA CCGCTTTTTT ATTAGTACGA	540
TTCGCTGTTG GACTGCTATT TGATTTGGTT TGTCAGGATA TTATGTTATT GTAATGAAAT	600
GTTAGTGAAT TATTTTTATT AATTTGAAAG GAAACAAAAT GAAAATAAAA AACCGTTACA	660
TTGCGCTGTT GGTCTTAGGT GTCGTTATCA GCTATGCCTG GTATCAAAAT TATCAATGGG	720
AACAGCTGAT GTTAAGCGGT TATTGTGAAA AGGACGGAAG TTATTTTGAT GATAGGCATA	780
CGAAGCAAGA ACTGATTGAT AGGGCAATTA ACTATATGCT GGAGCATCAA TCTAAAAAAA	840
CATACGATGC TTATACTGAT GAACCTTTAG AAATAAAACC ATATTTAACA ATAGAGGAAT	900
TTAAAAAACT CAATCCAAAT TGTTGTGAAA TTACCTCATG GCCAGCAGAT GCAGTTCAC	960
AAGATTGGGA TGTTTCGTGTG GAAGGTAAGG CATATAGGTA TGTAATCGTA AAATATTTAA	1020
GAACCTTAGC AAATAGAGAA CCTGAACGAT GGGAAACTAG TATTGTTTTT GATAATTGCG	1080
GCAATCCTAA AAGAGCAAGC TACTTATATT ATTTAAAGAG AGAAATTTAT TATGACAAAA	1140
TTAACTATGC AAGATGTGAC CAATTTATAT TTATATAAAA CGAAAACCTCT ACCTAAAGAT	1200
AGATTGGATG ATTCACTTAT TTCTGAAATA GGAAAAGGAG ATGATGATAT TGATAGAAAA	1260
GAATTTATGG TGGGGCCGGG ACGTTTTGTG ACCGCTGATA ACTTTAGCGT TGTAAGAGAT	1320
TTTTTTAATG CTGGGAAATC ACGCATTATT GCGCCGCAAG TCCCGCCTAT TCGTTCACAG	1380
CAGGAAAAAA TCTTGGTCGG TTTAAAACCG GGCAAATATT CCAAAGCGCA GATATTGGAA	1440
ATGCTGGGTT ATACGAAAGG CGGAGAAGTG GTAANTGGCA TGTTTGCCGG TGAAGTCCAG	1500
ACATTAGGCT TTTATGACGA TGGCAAAGGG GATTTACTCG AACGCGCCTA TATCTGGAAT	1560
ACCACAGGAT TTAAA ATG AGC GAC AAT GCC TTT TTT GTT ATA GAA GAA TCA	1611
Met Ser Asp Asn Ala Phe Phe Val Ile Glu Glu Ser	
1 5 10	
GGC AAA CGC TAT ATT GAA AAC TTT GGT ATT GAA CCT CTT GGT AAG CAA	1659
Gly Lys Arg Tyr Ile Glu Asn Phe Gly Ile Glu Pro Leu Gly Lys Gln	
15 20 25	
GAA GAT TTT GAT TTT GTC GGC GGC TTT TGG TCT AAC TTA GTG AAT CGT	1707
Glu Asp Phe Asp Phe Val Gly Gly Phe Trp Ser Asn Leu Val Asn Arg	
30 35 40	
GGT TTG GAA AGT ATT ATC GAC CCA TCC GGT ATC GGT GGA ACG GTA AAC	1755
Gly Leu Glu Ser Ile Ile Asp Pro Ser Gly Ile Gly Gly Thr Val Asn	
45 50 55 60	
CTT AAC TTT ACC GGC GAG GTG GAA ACC TAC ACG TTA GAC GAA ACA AGG	1803
Leu Asn Phe Thr Gly Glu Val Glu Thr Tyr Thr Leu Asp Glu Thr Arg	
65 70 75	
TTT AAA GCG GAA GCG GCG AAG AAA AGC CAT TGG AGT TTA GTG AAT GCG	1851
Phe Lys Ala Glu Ala Ala Lys Lys Ser His Trp Ser Leu Val Asn Ala	
80 85 90	
GCG AAA GTA TAC GGC GGT TTA GAC CAA ATT ATT AAA AAA CTA TGG GAC	1899
Ala Lys Val Tyr Gly Gly Leu Asp Gln Ile Ile Lys Lys Leu Trp Asp	
95 100 105	

AGT GGC TCA ATT AAG CAT TTA TAT CAA GAT AAA GAT ACG GGC AAA TTA Ser Gly Ser Ile Lys His Leu Tyr Gln Asp Lys Asp Thr Gly Lys Leu 110 115 120	1947
AAA CCG ATT ATT TAC GGC ACG GCC GGC AAC GAC AGT AAG ATT GAA GGC Lys Pro Ile Ile Tyr Gly Thr Ala Gly Asn Asp Ser Lys Ile Glu Gly 125 130 135 140	1995
ACT AAA ATC ACC CGT AGG ATT GCG GGT AAA GAA GTT ACG CTT GAT ATT Thr Lys Ile Thr Arg Arg Ile Ala Gly Lys Glu Val Thr Leu Asp Ile 145 150 155	2043
GCC AAT CAG AAA ATT GAA AAA GGC GTG TTA GAG AAA TTG GGG CTG TCT Ala Asn Gln Lys Ile Glu Lys Gly Val Leu Glu Lys Leu Gly Leu Ser 160 165 170	2091
GTT AGT GGT TCG GAT ATC ATT AAA TTG TTG TTT GGA GCA TTG ACT CCA Val Ser Gly Ser Asp Ile Ile Lys Leu Leu Phe Gly Ala Leu Thr Pro 175 180 185	2139
ACT TTA AAT AGA ATG TTG CTA TCA CAA CTT ATC CAG TCT TTT TCC GAT Thr Leu Asn Arg Met Leu Leu Ser Gln Leu Ile Gln Ser Phe Ser Asp 190 195 200	2187
AGC TTG GCT AAA CTT GAT AAT CCC TTA GCC CCT TAC ACT AAA AAT GGC Ser Leu Ala Lys Leu Asp Asn Pro Leu Ala Pro Tyr Thr Lys Asn Gly 205 210 215 220	2235
GTG GTT TAT GTC ACC GGC AAA GGG AAT GAT GTG CTT AAA GGA ACT GAA Val Val Tyr Val Thr Gly Lys Gly Asn Asp Val Leu Lys Gly Thr Glu 225 230 235	2283
CAT GAG GAT TTG TTT CTC GGT GGT GAG GGG AAT GAT ACT TAT TAT GCG His Glu Asp Leu Phe Leu Gly Gly Glu Gly Asn Asp Thr Tyr Tyr Ala 240 245 250	2331
AGA GTA GGC GAT ACA ATT GAA GAC GCC GAC GGC AAA GGT AAA GTC TAT Arg Val Gly Asp Thr Ile Glu Asp Ala Asp Gly Lys Gly Lys Val Tyr 255 260 265	2379
TTT GTG AGA GAA AAA GGG GTA CCT AAG GCG GAT CCT AAG CGG GTA GAG Phe Val Arg Glu Lys Gly Val Pro Lys Ala Asp Pro Lys Arg Val Glu 270 275 280	2427
TTT AGC GAG TAC ATA ACG AAA GAA GAA ATA AAA GAG GTT GAA AAG GGG Phe Ser Glu Tyr Ile Thr Lys Glu Glu Ile Lys Glu Val Glu Lys Gly 285 290 295 300	2475
TTA TTA ACT TAC GCA GTT TTA GAA AAT TAT AAT TGG GAA GAG AAA ACG Leu Leu Thr Tyr Ala Val Leu Glu Asn Tyr Asn Trp Glu Glu Lys Thr 305 310 315	2523
GCG ACT TTC GCT CAT GCG ACT ATG CTT AAT GAG CTT TTT ACT GAT TAT Ala Thr Phe Ala His Ala Thr Met Leu Asn Glu Leu Phe Thr Asp Tyr 320 325 330	2571
ACT AAT TAT CGT TAT GAA GTT AAA GGA CTA AAA TTG CCC GCC GTT AAA Thr Asn Tyr Arg Tyr Glu Val Lys Gly Leu Lys Leu Pro Ala Val Lys 335 340 345	2619
AAG TTA AAA AGT CCG TTG GTG GAG TTT ACA GCT GAT TTA TTA ACT GTT Lys Leu Lys Ser Pro Leu Val Glu Phe Thr Ala Asp Leu Leu Thr Val 350 355 360	2667
ACG CCT ATT GAC GAA AAC GGA AAA GCA CTT AGC GAA AAA AGT ATT ACG Thr Pro Ile Asp Glu Asn Gly Lys Ala Leu Ser Glu Lys Ser Ile Thr 365 370 375 380	2715

GTT AAA AAT TTT AAA AAT GGT GAT TTA GGA ATA AGG TTG TTG GAT CCT	2763
Val Lys Asn Phe Lys Asn Gly Asp Leu Gly Ile Arg Leu Leu Asp Pro	
385 390 395	
AAT AGC TAT TAT TAT TTC CTT GAA GGC CAA GAT ACG GGT TTT TAT GGT	2811
Asn Ser Tyr Tyr Tyr Phe Leu Glu Gly Gln Asp Thr Gly Phe Tyr Gly	
400 405 410	
CCT GCT TTT TAT ATT GAA CGA AAA AAC GGT GGC GGC GCT AAA AAT AAC	2859
Pro Ala Phe Tyr Ile Glu Arg Lys Asn Gly Gly Gly Ala Lys Asn Asn	
415 420 425	
TCG TCG GGA GCA GGA AAT AGC AAA GAT TGG GGC GGG AAC GGG CAT GGA	2907
Ser Ser Gly Ala Gly Asn Ser Lys Asp Trp Gly Gly Asn Gly His Gly	
430 435 440	
AAT CAC CGA AAT AAT GCC TCC GAC CTG AAT AAA CCG GAC GGA AAT AAT	2955
Asn His Arg Asn Asn Ala Ser Asp Leu Asn Lys Pro Asp Gly Asn Asn	
445 450 455 460	
GGG AAT AAC CAA AAT AAC GGA AGC AAT CAA GAT AAT CAT AGC GAT GTG	3003
Gly Asn Asn Gln Asn Asn Gly Ser Asn Gln Asp Asn His Ser Asp Val	
465 470 475	
AAT GCG CCA AAT AAC CCG GGA CGT AAC TAT GAT ATT TAC GAT CCT TTA	3051
Asn Ala Pro Asn Asn Pro Gly Arg Asn Tyr Asp Ile Tyr Asp Pro Leu	
480 485 490	
GCT TTA GAT TTA GAT GGA GAT GGG CTT GAA ACC GTG TCG ATG AAC GGG	3099
Ala Leu Asp Leu Asp Gly Asp Gly Leu Glu Thr Val Ser Met Asn Gly	
495 500 505	
CGA CAA GGC GCG TTA TTC GAT CAT GAA GGA AAA GGT ATT CGT ACC GCA	3147
Arg Gln Gly Ala Leu Phe Asp His Glu Gly Lys Gly Ile Arg Thr Ala	
510 515 520	
ACG GGC TGG CTC GCT GCG GAT GAC GGT TTT TTA GTG TTA GAT CGT AAC	3195
Thr Gly Trp Leu Ala Ala Asp Asp Gly Phe Leu Val Leu Asp Arg Asn	
525 530 535 540	
CAA GAC GGC ATT ATT AAT GAT ATA AGC GAG TTA TTT AGT AAT AAA AAT	3243
Gln Asp Gly Ile Ile Asn Asp Ile Ser Glu Leu Phe Ser Asn Lys Asn	
545 550 555	
CAA CTT TCC GAC GGC AGT ATT TCT GCA CAC GGT TTT GCG ACA TTA GCC	3291
Gln Leu Ser Asp Gly Ser Ile Ser Ala His Gly Phe Ala Thr Leu Ala	
560 565 570	
GAT TTG GAT ACA AAC CAA GAT CAG CGT ATC GAC CAA AAT GAT AAG CTG	3339
Asp Leu Asp Thr Asn Gln Asp Gln Arg Ile Asp Gln Asn Asp Lys Leu	
575 580 585	
TTT TCT AAA CTC CAA ATT TGG CGG GAT TTA AAT CAA AAC GGT TTT AGT	3387
Phe Ser Lys Leu Gln Ile Trp Arg Asp Leu Asn Gln Asn Gly Phe Ser	
590 595 600	
GAA GCG AAT GAG CTG TTT AGC TTA GAA AGT TTG AAT ATT AAA TCT TTA	3435
Glu Ala Asn Glu Leu Phe Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ile Lys Ser Leu	
605 610 615 620	
CAT ACC GCC TAT GAA GAG CGT AAT GAT TTT CTA GCG GGC AAT AAT ATC	3483
His Thr Ala Tyr Glu Glu Arg Asn Asp Phe Leu Ala Gly Asn Asn Ile	
625 630 635	
CTT GCT CAG CTT GGG AAG TAT GAA AAA ACG GAC GGT ACT TTT GCA CAA	3531
Leu Ala Gln Leu Gly Lys Tyr Glu Lys Thr Asp Gly Thr Phe Ala Gln	
640 645 650	

ATG GGC GAT TTA AAT TTC AGT TTT AAC CCG TTT TAT AGC CGA TTT ACC Met Gly Asp Leu Asn Phe Ser Phe Asn Pro Phe Tyr Ser Arg Phe Thr 655 660 665	3579
GAA GCG TTA AAT TTA ACC GAG CAA CAA CGT CGC ACA ATT AAT CTA ACC Glu Ala Leu Asn Leu Thr Glu Gln Gln Arg Arg Thr Ile Asn Leu Thr 670 675 680	3627
GGC ACC GGT CGG GTT CGG GAT TTG CGT GAA GCC GCC GCA CTT TCT GAG Gly Thr Gly Arg Val Arg Asp Leu Arg Glu Ala Ala Ala Leu Ser Glu 685 690 695 700	3675
GAG TTG GCT GCT TTA TTA CAA CAG TAC ACT AAG GCC TCC GAT TTT CAG Glu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Gln Tyr Thr Lys Ala Ser Asp Phe Gln 705 710 715	3723
GCA CAA CGA GAA TTA TTG CCT GCC ATT TTA GAT AAA TGG GCG GCA ACG Ala Gln Arg Glu Leu Leu Pro Ala Ile Leu Asp Lys Trp Ala Ala Thr 720 725 730	3771
GAT TTA CAG TAT CAA CAT TAT GAT AAA ACA TTA CTT AAA ACG GTA GAA Asp Leu Gln Tyr Gln His Tyr Asp Lys Thr Leu Leu Lys Thr Val Glu 735 740 745	3819
AGT ACC GAT AGT AGT GCT TCT GTC GTT AGA GTC ACC CCT TCT CAA TTA Ser Thr Asp Ser Ser Ala Ser Val Val Arg Val Thr Pro Ser Gln Leu 750 755 760	3867
AGT AGT ATA CGC AAT GCA AAG CAT GAT CCT ACC GTT ATG CAA AAC TTT Ser Ser Ile Arg Asn Ala Lys His Asp Pro Thr Val Met Gln Asn Phe 765 770 775 780	3915
GAA CAG AGT AAG GCA AAA ATT GCG ACT TTA AAT TCG CTC TAC GGG TTA Glu Gln Ser Lys Ala Lys Ile Ala Thr Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Leu 785 790 795	3963
AAT ATC GAT CAA CTT TAT TAC ACG ACG GAT AAA GAC ATT CGC TAT ATT Asn Ile Asp Gln Leu Tyr Tyr Thr Thr Asp Lys Asp Ile Arg Tyr Ile 800 805 810	4011
ACT GAT AAA GTG AAT AAT ATG TAT CAA ACA ACC GTA GAA CTT GCC TAC Thr Asp Lys Val Asn Asn Met Tyr Gln Thr Thr Val Glu Leu Ala Tyr 815 820 825	4059
CGT TCT TTA CTT TTA CAA ACG CGT TTG AAG AAA TAT GTT TAT AGC GTT Arg Ser Leu Leu Leu Gln Thr Arg Leu Lys Lys Tyr Val Tyr Ser Val 830 835 840	4107
AAT GCG AAA CAA TTC GAA GGG AAA TGG GTA ACC GAT TAT TCT CGT ACT Asn Ala Lys Gln Phe Glu Gly Lys Trp Val Thr Asp Tyr Ser Arg Thr 845 850 855 860	4155
GAA GCC TTA TTT AAC TCT ACT TTT AAA CAA TCG CCT GAA AAT GCA TTA Glu Ala Leu Phe Asn Ser Thr Phe Lys Gln Ser Pro Glu Asn Ala Leu 865 870 875	4203
TAT GAT TTA AGC GAA TAC CTT TCT TTC TTT AAC GAT CCT ACG GAA TGG Tyr Asp Leu Ser Glu Tyr Leu Ser Phe Phe Asn Asp Pro Thr Glu Trp 880 885 890	4251
AAA GAA GGG CTA TTA CTG TTA AGC CGT TAT ATA GAT TAT GCT AAA GCA Lys Glu Gly Leu Leu Leu Leu Ser Arg Tyr Ile Asp Tyr Ala Lys Ala 895 900 905	4299
CAA GGA TTT TAT GAA AAC TGG GCG GCT ACT TCT AAC TTA ACT ATT GCC Gln Gly Phe Tyr Glu Asn Trp Ala Ala Thr Ser Asn Leu Thr Ile Ala 910 915 920	4347

CGT TTA AGA GAG GCT GGA GTA ATT TTT GCA GAA TCG ACG GAT TTA AAA Arg Leu Arg Glu Ala Gly Val Ile Phe Ala Glu Ser Thr Asp Leu Lys 925 930 935 940	4395
GGC GAT GAA AAA AAT AAT ATT TTG TTA GGT AGC CAA AAA GAT AAT AAC Gly Asp Glu Lys Asn Asn Ile Leu Leu Gly Ser Gln Lys Asp Asn Asn 945 950 955	4443
TTA TCG GGT AGT GCA GGT GAT GAT CTA CTT ATC GGC GGA GAG GGT AAT Leu Ser Gly Ser Ala Gly Asp Asp Leu Leu Ile Gly Gly Glu Gly Asn 960 965 970	4491
GAT ACG TTA AAA GGC AGC TAC GGT GCA GAC ACC TAT ATC TTT AGC AAA Asp Thr Leu Lys Gly Ser Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile Phe Ser Lys 975 980 985	4539
GGA CAC GGA CAG GAT ATC GTT TAT GAA GAT ACC AAT AAT GAT AAC CGC Gly His Gly Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn Asn Asp Asn Arg 990 995 1000	4587
GCA AGA GAT ATC GAC ACC TTA AAA TTT ACC GAT GTG AAT TAT GCG GAA Ala Arg Asp Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Val Asn Tyr Ala Glu 1005 1010 1015 1020	4635
GTG AAG TTT CGA CGA GTA GAT AAT GAC TTA ATG TTA TTC GGT TAT CAT Val Lys Phe Arg Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu Phe Gly Tyr His 1025 1030 1035	4683
GAT ACG GAT TCG GTC ACG GTA AAA TCC TTC TAC AGC CAT GTA GAT TAT Asp Thr Asp Ser Val Thr Val Lys Ser Phe Tyr Ser His Val Asp Tyr 1040 1045 1050	4731
CAA TTT GAC AAA TTG GAG TTT GCT GAC CGC AGT ATA ACT CGC GAT GAA Gln Phe Asp Lys Leu Glu Phe Ala Asp Arg Ser Ile Thr Arg Asp Glu 1055 1060 1065	4779
CTG ATT AAA GCA GGG CTT CAT CTA TAC GGC ACC GAT GGC AAT GAT GAT Leu Ile Lys Ala Gly Leu His Leu Tyr Gly Thr Asp Gly Asn Asp Asp 1070 1075 1080	4827
ATA AAG GAT CAT GCG GAT TGG GAC AGC ATT TTG GAA GGC GGC AAA GGC Ile Lys Asp His Ala Asp Trp Asp Ser Ile Leu Glu Gly Gly Lys Gly 1085 1090 1095 1100	4875
AAC GAT ATT CTA AGA GGT GGC TAC GGT GCG GAC ACC TAT ATC TTT AGC Asn Asp Ile Leu Arg Gly Gly Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile Phe Ser 1105 1110 1115	4923
AAA GGA CAC GGA CAG GAT ATC GTT TAT GAA GAT ACC AAT AAT GAT AAC Lys Gly His Gly Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn Asn Asp Asn 1120 1125 1130	4971
CGC GCA AGA GAT ATC GAC ACC TTA AAA TTT ACT GAT GTG AAT TAT GCG Arg Ala Arg Asp Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Val Asn Tyr Ala 1135 1140 1145	5019
GAA GTG AAA TTC CGA CGA GTA GAT AAT GAC TTA ATG TTA TTC GGT TAT Glu Val Lys Phe Arg Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu Phe Gly Tyr 1150 1155 1160	5067
CAT GAT ACG GAT TCG GTC ACG ATA AAA TCC TTC TAC AAC CAT GTA GAT His Asp Thr Asp Ser Val Thr Ile Lys Ser Phe Tyr Asn His Val Asp 1165 1170 1175 1180	5115
TAT CAA TTT GAC AAA TTG GAA TTT GCT GAC CGC AGT ATA ACT CGT GAT Tyr Gln Phe Asp Lys Leu Glu Phe Ala Asp Arg Ser Ile Thr Arg Asp 1185 1190 1195	5163

GAA CTA GGT AAA CAA GGT ATG GCA TTA TTT GGC ACT GAC GGT GAT GAT Glu Leu Gly Lys Gln Gly Met Ala Leu Phe Gly Thr Asp Ala Gly Asp Asp 1200 1205 1210	5211
AAT ATC AAC GAC TGG GGA CGT AAC TCG GTG ATT GAT GCC GGT GCG GGT Asn Ile Asn Asp Trp Gly Arg Asn Ser Val Ile Asp Ala Gly Ala Gly 1215 1220 1225	5259
AAT GAT ACG GTT AAT GGC GGT AAT GGC GAT GAC ACC CTC ATC GGC GGC Asn Asp Thr Val Asn Gly Gly Asn Gly Asp Asp Thr Leu Ile Gly Gly 1230 1235 1240	5307
AAA GGT AAT GAT ATT CTA AGA GGT GGC TAC GGT GCG GAC ACC TAT ATC Lys Gly Asn Asp Ile Leu Arg Gly Gly Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile 1245 1250 1255 1260	5355
TTT AGC AAA GGA CAC GGA CAG GAT ATC GTT TAT GAA GAT ACC AAT AAT Phe Ser Lys Gly His Gly Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn Asn 1265 1270 1275	5403
GAT AAC CGC GCA AGA GAT ATC GAC ACC TTA AAA TTT ACC GAT GTG AAT Asp Asn Arg Ala Arg Asp Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Val Asn 1280 1285 1290	5451
TAT GCG GAA GTG AAA TTC CGA CGA GTA GAT AAT GAC TTA ATG TTA TTC Tyr Ala Glu Val Lys Phe Arg Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu Phe 1295 1300 1305	5499
GGT TAT CAT GAT ACG GAT TCG GTC ACG GTA AAA TCC TTC TAC AGC CAT Gly Tyr His Asp Thr Asp Ser Val Thr Val Lys Ser Phe Tyr Ser His 1310 1315 1320	5547
GTA GAT TAT CAA TTT GAC AAA TTG GAG TTT GCT GAC CGC AGT ATA ACT Val Asp Tyr Gln Phe Asp Lys Leu Glu Phe Ala Asp Arg Ser Ile Thr 1325 1330 1335 1340	5595
CGC GAT GAA CTG ATT AAA GCA GGG CTT CAT CTA TAC GGC ACC GAT GGC Arg Asp Glu Leu Ile Lys Ala Gly Leu His Leu Tyr Gly Thr Asp Gly 1345 1350 1355	5643
AAT GAT GAT ATA AAG GAT CAT GCG GAT TGG GAC AGC ATT TTG GAA GGC Asn Asp Asp Ile Lys Asp His Ala Asp Trp Asp Ser Ile Leu Glu Gly 1360 1365 1370	5691
GGC AAA GGC AAC GAT ATT CTA AGA GGT GGC TAC GGT GCG GAC ACC TAT Gly Lys Gly Asn Asp Ile Leu Arg Gly Gly Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr 1375 1380 1385	5739
ATC TTT AGC AAA GGA CAC GGA CAG GAT ATC GTT TAT GAA GAT ACC AAT Ile Phe Ser Lys Gly His Gly Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn 1390 1395 1400	5787
AAT GAT AAC CGA GCA AGA GAT ATC GAC ACC TTA AAA TTT ACT GAT GTG Asn Asp Asn Arg Ala Arg Asp Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Val 1405 1410 1415 1420	5835
AAT TAT GCG GAA GTG AAA TTC CGA CGA GTA GAT AAT GAC TTA ATG TTA Asn Tyr Ala Glu Val Lys Phe Arg Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu 1425 1430 1435	5883
TTC GGT TAT CAT GAT ACG GAT TCG GTC ACG ATA AAA TCC TTC TAC AAC Phe Gly Tyr His Asp Thr Asp Ser Val Thr Ile Lys Ser Phe Tyr Asn 1440 1445 1450	5931
CAT GTA GAT TAT CAA TTT GAC AAA TTG GAA TTT GCT GAC CGC AGT ATA His Val Asp Tyr Gln Phe Asp Lys Leu Glu Phe Ala Asp Arg Ser Ile 1455 1460 1465	5979

ACT CGT GAT GAA CTA GGT AAA CAA GGT ATG GCA TTA TTT GGC ACT GAC Thr Arg Asp Glu Leu Gly Lys Gln Gly Met Ala Leu Phe Gly Thr Asp 1470 1475 1480	6027
GGT GAT GAT AAT ATC AAC GAC TGG GGA CGT AAC TCG GTG ATT GAT GCC Gly Asp Asp Asn Ile Asn Asp Trp Gly Arg Asn Ser Val Ile Asp Ala 1485 1490 1495 1500	6075
GGT GCG GGT AAT GAT ACG GTT AAT GGC GGT AAT GGC GAT GAC ACC CTC Gly Ala Gly Asn Asp Thr Val Asn Gly Gly Asn Gly Asp Asp Thr Leu 1505 1510 1515	6123
ATC GGC GGC AAA GGT AAT GAT ATT CTA AGA GGT GGC TAC GGT GCG GAC Ile Gly Gly Lys Gly Asn Asp Ile Leu Arg Gly Gly Tyr Gly Ala Asp 1520 1525 1530	6171
ACC TAT ATC TTT AGC AAA GGA CAC GGA CAG GAT ATC GTT TAT GAA GAT Thr Tyr Ile Phe Ser Lys Gly His Gly Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp 1535 1540 1545	6219
ACC AAT AAT GAT AAC CGC GCA AGA GAT ATC GAC ACC TTA AAA TTT ACT Thr Asn Asn Asp Asn Arg Ala Arg Asp Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr 1550 1555 1560	6267
GAT ATT AAT TTA TCC GAA CTT TGG TTT AGC CGA GAA AAT AAC GAT TTG Asp Ile Asn Leu Ser Glu Leu Trp Phe Ser Arg Glu Asn Asn Asp Leu 1565 1570 1575 1580	6315
ATT ATT AAA TCA TTA TTA AGT GAG GAT AAA GTC ACG GTT CAA AAT TGG Ile Ile Lys Ser Leu Leu Ser Glu Asp Lys Val Thr Val Gln Asn Trp 1585 1590 1595	6363
TAT TCA CAC CAA GAT CAT AAA ATA GAA AAT ATT CGT TTA TCG AAT GAG Tyr Ser His Gln Asp His Lys Ile Glu Asn Ile Arg Leu Ser Asn Glu 1600 1605 1610	6411
CAA ACG TTG GTG AGC ACT CAG GTG GAG AAG ATG GTT GAG TCG ATG GCC Gln Thr Leu Val Ser Thr Gln Val Glu Lys Met Val Glu Ser Met Ala 1615 1620 1625	6459
GGC TTT GCT CAG AAG CAC GGA GGA GAG ATA TCT CTT GTG TCG CTT GAA Gly Phe Ala Gln Lys His Gly Gly Glu Ile Ser Leu Val Ser Leu Glu 1630 1635 1640	6507
GAG GTA AAA CAA TAT ATC AAT AGC TTA ACA GCT GCT TTA TAA Glu Val Lys Gln Tyr Ile Asn Ser Leu Thr Ala Ala Leu * 1645 1650 1655	6549
CATACGAAAG AAATCGGCAC AGTTTTTTTG AACTGTGCCG ATTTGATTTT AGTGTAAGAA	6609
TATAGCCTGA TTTTAAGAAA TTTACTCTTG GCTAATAACT APTTCCCATTT TTATAAGTTA	6669
TTGACGGATG GTTTTATCAA ATATGAGATC AAATCTTATT TTAAATTCGC TTTCCATTAA	6729
GCGATAT	6736

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA SEC ID Nº: 2:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1658 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 2:

Met Ser Asp Asn Ala Phe Phe Val Ile Glu Glu Ser Gly Lys Arg Tyr  
 1 5 10 15  
 Ile Glu Asn Phe Gly Ile Glu Pro Leu Gly Lys Gln Glu Asp Phe Asp  
 20 25 30  
 Phe Val Gly Gly Phe Trp Ser Asn Leu Val Asn Arg Gly Leu Glu Ser  
 35 40 45  
 Ile Ile Asp Pro Ser Gly Ile Gly Gly Thr Val Asn Leu Asn Phe Thr  
 50 55 60  
 Gly Glu Val Glu Thr Tyr Thr Leu Asp Glu Thr Arg Phe Lys Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Ala Ala Lys Lys Ser His Trp Ser Leu Val Asn Ala Ala Lys Val Tyr  
 85 90 95  
 Gly Gly Leu Asp Gln Ile Ile Lys Lys Leu Trp Asp Ser Gly Ser Ile  
 100 105 110  
 Lys His Leu Tyr Gln Asp Lys Asp Thr Gly Lys Leu Lys Pro Ile Ile  
 115 120 125  
 Tyr Gly Thr Ala Gly Asn Asp Ser Lys Ile Glu Gly Thr Lys Ile Thr  
 130 135 140  
 Arg Arg Ile Ala Gly Lys Glu Val Thr Leu Asp Ile Ala Asn Gln Lys  
 145 150 155 160  
 Ile Glu Lys Gly Val Leu Glu Lys Leu Gly Leu Ser Val Ser Gly Ser  
 165 170 175  
 Asp Ile Ile Lys Leu Leu Phe Gly Ala Leu Thr Pro Thr Leu Asn Arg  
 180 185 190  
 Met Leu Leu Ser Gln Leu Ile Gln Ser Phe Ser Asp Ser Leu Ala Lys  
 195 200 205  
 Leu Asp Asn Pro Leu Ala Pro Tyr Thr Lys Asn Gly Val Val Tyr Val  
 210 215 220  
 Thr Gly Lys Gly Asn Asp Val Leu Lys Gly Thr Glu His Glu Asp Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Leu Gly Gly Glu Gly Asn Asp Thr Tyr Tyr Ala Arg Val Gly Asp  
 245 250 255  
 Thr Ile Glu Asp Ala Asp Gly Lys Gly Lys Val Tyr Phe Val Arg Glu  
 260 265 270  
 Lys Gly Val Pro Lys Ala Asp Pro Lys Arg Val Glu Phe Ser Glu Tyr  
 275 280 285  
 Ile Thr Lys Glu Glu Ile Lys Glu Val Glu Lys Gly Leu Leu Thr Tyr  
 290 295 300  
 Ala Val Leu Glu Asn Tyr Asn Trp Glu Glu Lys Thr Ala Thr Phe Ala  
 305 310 315 320

His Ala Thr Met Leu Asn Glu Leu Phe Thr Asp Tyr Thr Asn Tyr Arg  
 325 330 335  
 Tyr Glu Val Lys Gly Leu Lys Leu Pro Ala Val Lys Lys Leu Lys Ser  
 340 345 350  
 Pro Leu Val Glu Phe Thr Ala Asp Leu Leu Thr Val Thr Pro Ile Asp  
 355 360 365  
 Glu Asn Gly Lys Ala Leu Ser Glu Lys Ser Ile Thr Val Lys Asn Phe  
 370 375 380  
 Lys Asn Gly Asp Leu Gly Ile Arg Leu Leu Asp Pro Asn Ser Tyr Tyr  
 385 390 395 400  
 Tyr Phe Leu Glu Gly Gln Asp Thr Gly Phe Tyr Gly Pro Ala Phe Tyr  
 405 410 415  
 Ile Glu Arg Lys Asn Gly Gly Gly Ala Lys Asn Asn Ser Ser Gly Ala  
 420 425 430  
 Gly Asn Ser Lys Asp Trp Gly Gly Asn Gly His Gly Asn His Arg Asn  
 435 440 445  
 Asn Ala Ser Asp Leu Asn Lys Pro Asp Gly Asn Asn Gly Asn Asn Gln  
 450 455 460  
 Asn Asn Gly Ser Asn Gln Asp Asn His Ser Asp Val Asn Ala Pro Asn  
 465 470 475 480  
 Asn Pro Gly Arg Asn Tyr Asp Ile Tyr Asp Pro Leu Ala Leu Asp Leu  
 485 490 495  
 Asp Gly Asp Gly Leu Glu Thr Val Ser Met Asn Gly Arg Gln Gly Ala  
 500 505 510  
 Leu Phe Asp His Glu Gly Lys Gly Ile Arg Thr Ala Thr Gly Trp Leu  
 515 520 525  
 Ala Ala Asp Asp Gly Phe Leu Val Leu Asp Arg Asn Gln Asp Gly Ile  
 530 535 540  
 Ile Asn Asp Ile Ser Glu Leu Phe Ser Asn Lys Asn Gln Leu Ser Asp  
 545 550 555 560  
 Gly Ser Ile Ser Ala His Gly Phe Ala Thr Leu Ala Asp Leu Asp Thr  
 565 570 575  
 Asn Gln Asp Gln Arg Ile Asp Gln Asn Asp Lys Leu Phe Ser Lys Leu  
 580 585 590  
 Gln Ile Trp Arg Asp Leu Asn Gln Asn Gly Phe Ser Glu Ala Asn Glu  
 595 600 605  
 Leu Phe Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ile Lys Ser Leu His Thr Ala Tyr  
 610 615 620  
 Glu Glu Arg Asn Asp Phe Leu Ala Gly Asn Asn Ile Leu Ala Gln Leu  
 625 630 635 640  
 Gly Lys Tyr Glu Lys Thr Asp Gly Thr Phe Ala Gln Met Gly Asp Leu  
 645 650 655  
 Asn Phe Ser Phe Asn Pro Phe Tyr Ser Arg Phe Thr Glu Ala Leu Asn  
 660 665 670  
 Leu Thr Glu Gln Gln Arg Arg Thr Ile Asn Leu Thr Gly Thr Gly Arg  
 675 680 685

Val Arg Asp Leu Arg Glu Ala Ala Ala Leu Ser Glu Glu Leu Ala Ala  
 690 695 700  
 Leu Leu Gln Gln Tyr Thr Lys Ala Ser Asp Phe Gln Ala Gln Arg Glu  
 705 710 715 720  
 Leu Leu Pro Ala Ile Leu Asp Lys Trp Ala Ala Thr Asp Leu Gln Tyr  
 725 730 735  
 Gln His Tyr Asp Lys Thr Leu Leu Lys Thr Val Glu Ser Thr Asp Ser  
 740 745 750  
 Ser Ala Ser Val Val Arg Val Thr Pro Ser Gln Leu Ser Ser Ile Arg  
 755 760 765  
 Asn Ala Lys His Asp Pro Thr Val Met Gln Asn Phe Glu Gln Ser Lys  
 770 775 780  
 Ala Lys Ile Ala Thr Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Leu Asn Ile Asp Gln  
 785 790 795 800  
 Leu Tyr Tyr Thr Thr Asp Lys Asp Ile Arg Tyr Ile Thr Asp Lys Val  
 805 810 815  
 Asn Asn Met Tyr Gln Thr Thr Val Glu Leu Ala Tyr Arg Ser Leu Leu  
 820 825 830  
 Leu Gln Thr Arg Leu Lys Lys Tyr Val Tyr Ser Val Asn Ala Lys Gln  
 835 840 845  
 Phe Glu Gly Lys Trp Val Thr Asp Tyr Ser Arg Thr Glu Ala Leu Phe  
 850 855 860  
 Asn Ser Thr Phe Lys Gln Ser Pro Glu Asn Ala Leu Tyr Asp Leu Ser  
 865 870 875 880  
 Glu Tyr Leu Ser Phe Phe Asn Asp Pro Thr Glu Trp Lys Glu Gly Leu  
 885 890 895  
 Leu Leu Leu Ser Arg Tyr Ile Asp Tyr Ala Lys Ala Gln Gly Phe Tyr  
 900 905 910  
 Glu Asn Trp Ala Ala Thr Ser Asn Leu Thr Ile Ala Arg Leu Arg Glu  
 915 920 925  
 Ala Gly Val Ile Phe Ala Glu Ser Thr Asp Leu Lys Gly Asp Glu Lys  
 930 935 940  
 Asn Asn Ile Leu Leu Gly Ser Gln Lys Asp Asn Asn Leu Ser Gly Ser  
 945 950 955 960  
 Ala Gly Asp Asp Leu Leu Ile Gly Gly Glu Gly Asn Asp Thr Leu Lys  
 965 970 975  
 Gly Ser Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile Phe Ser Lys Gly His Gly Gln  
 980 985 990  
 Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn Asn Asp Asn Arg Ala Arg Asp Ile  
 995 1000 1005  
 Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Val Asn Tyr Ala Glu Val Lys Phe Arg  
 1010 1015 1020  
 Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu Phe Gly Tyr His Asp Thr Asp Ser  
 1025 1030 1035 1040  
 Val Thr Val Lys Ser Phe Tyr Ser His Val Asp Tyr Gln Phe Asp Lys  
 1045 1050 1055

Leu Glu Phe Ala Asp Arg Ser Ile Thr Arg Asp Glu Leu Ile Lys Ala  
 1060 1065 1070  
 Gly Leu His Leu Tyr Gly Thr Asp Gly Asn Asp Asp Ile Lys Asp His  
 1075 1080 1085  
 Ala Asp Trp Asp Ser Ile Leu Glu Gly Gly Lys Gly Asn Asp Ile Leu  
 1090 1095 1100  
 Arg Gly Gly Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile Phe Ser Lys Gly His Gly  
 1105 1110 1115 1120  
 Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn Asn Asp Asn Arg Ala Arg Asp  
 1125 1130 1135  
 Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Val Asn Tyr Ala Glu Val Lys Phe  
 1140 1145 1150  
 Arg Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu Phe Gly Tyr His Asp Thr Asp  
 1155 1160 1165  
 Ser Val Thr Ile Lys Ser Phe Tyr Asn His Val Asp Tyr Gln Phe Asp  
 1170 1175 1180  
 Lys Leu Glu Phe Ala Asp Arg Ser Ile Thr Arg Asp Glu Leu Gly Lys  
 1185 1190 1195 1200  
 Gln Gly Met Ala Leu Phe Gly Thr Asp Gly Asp Asp Asn Ile Asn Asp  
 1205 1210 1215  
 Trp Gly Arg Asn Ser Val Ile Asp Ala Gly Ala Gly Asn Asp Thr Val  
 1220 1225 1230  
 Asn Gly Gly Asn Gly Asp Asp Thr Leu Ile Gly Gly Lys Gly Asn Asp  
 1235 1240 1245  
 Ile Leu Arg Gly Gly Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile Phe Ser Lys Gly  
 1250 1255 1260  
 His Gly Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn Asn Asp Asn Arg Ala  
 1265 1270 1275 1280  
 Arg Asp Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Val Asn Tyr Ala Glu Val  
 1285 1290 1295  
 Lys Phe Arg Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu Phe Gly Tyr His Asp  
 1300 1305 1310  
 Thr Asp Ser Val Thr Val Lys Ser Phe Tyr Ser His Val Asp Tyr Gln  
 1315 1320 1325  
 Phe Asp Lys Leu Glu Phe Ala Asp Arg Ser Ile Thr Arg Asp Glu Leu  
 1330 1335 1340  
 Ile Lys Ala Gly Leu His Leu Tyr Gly Thr Asp Gly Asn Asp Asp Ile  
 1345 1350 1355 1360  
 Lys Asp His Ala Asp Trp Asp Ser Ile Leu Glu Gly Gly Lys Gly Asn  
 1365 1370 1375  
 Asp Ile Leu Arg Gly Gly Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile Phe Ser Lys  
 1380 1385 1390  
 Gly His Gly Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn Asn Asp Asn Arg  
 1395 1400 1405  
 Ala Arg Asp Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Val Asn Tyr Ala Glu  
 1410 1415 1420

Val Lys Phe Arg Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu Phe Gly Tyr His  
 1425 1430 1435 1440

Asp Thr Asp Ser Val Thr Ile Lys Ser Phe Tyr Asn His Val Asp Tyr  
 1445 1450 1455

Gln Phe Asp Lys Leu Glu Phe Ala Asp Arg Ser Ile Thr Arg Asp Glu  
 1460 1465 1470

Leu Gly Lys Gln Gly Met Ala Leu Phe Gly Thr Asp Gly Asp Asp Asn  
 1475 1480 1485

Ile Asn Asp Trp Gly Arg Asn Ser Val Ile Asp Ala Gly Ala Gly Asn  
 1490 1495 1500

Asp Thr Val Asn Gly Gly Asn Gly Asp Asp Thr Leu Ile Gly Gly Lys  
 1505 1510 1515 1520

Gly Asn Asp Ile Leu Arg Gly Gly Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile Phe  
 1525 1530 1535

Ser Lys Gly His Gly Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn Asn Asp  
 1540 1545 1550

Asn Arg Ala Arg Asp Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Ile Asn Leu  
 1555 1560 1565

Ser Glu Leu Trp Phe Ser Arg Glu Asn Asn Asp Leu Ile Ile Lys Ser  
 1570 1575 1580

Leu Leu Ser Glu Asp Lys Val Thr Val Gln Asn Trp Tyr Ser His Gln  
 1585 1590 1595 1600

Asp His Lys Ile Glu Asn Ile Arg Leu Ser Asn Glu Gln Thr Leu Val  
 1605 1610 1615

Ser Thr Gln Val Glu Lys Met Val Glu Ser Met Ala Gly Phe Ala Gln  
 1620 1625 1630

Lys His Gly Gly Glu Ile Ser Leu Val Ser Leu Glu Glu Val Lys Gln  
 1635 1640 1645

Tyr Ile Asn Ser Leu Thr Ala Ala Leu \*  
 1650 1655

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA SEC ID N°: 3:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 7004 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: doble
- 10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

15 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Actinobacillus pleuropneumoniae*
- (B) CEPA: HV114 (cepa de campo de serotipo 3)

(vii) FUENTE INMEDIATA:

- 25 (B) CLON: pROK5

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS  
 (B) LOCALIZACIÓN: 1566..5714  
 (D) OTRA INFORMACIÓN:/codón de inicio= 1566  
 /función= "toxina-RTX"  
 /producto= "ApxIV\_var3"  
 /gen= "apxIV\_var3"  
 /número= 1

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 3:

ATCGATATGC	CGCCGGGTAC	GGGCGATATC	CAACTTACTC	TTTCGCAACA	AATTCGGTT	60
ACCGGTGCGG	TAGTGGTAAC	TACTCCGCAA	GATATTGCGT	TATTAGATGC	GGTGAAGGT	120
ATTTCAATGT	TCCAAAAAGT	GTCGGTACCG	GTCTTAGGTA	TCATTGAAAA	TATGAGCGTG	180
CATATCTGCC	AAAATTGCGG	TCACCACGAA	GATATTTTCG	GCACCGGCGG	TGCGGAGAAA	240
GTGGCGAAGA	AATACGGTAC	TAAAGTATTA	GGACAAATGC	CGTTGCATAT	TCGCTTACGT	300
CAAGATTTGG	ATGCCGGCAC	ACCGACCGTC	GTTGCCGGCAC	CGGAACACGA	CACCAGCAGA	360
GCCTATATTG	AATTAGCGGC	AAAAGTCGCT	TCGGAATTAT	ACTGGCAAGG	TTCGGTTATC	420
CCGTCTGAAA	TTATGATTCG	TGAAGTAAAA	TAAGCCTACA	TAACCACGGA	ATACCAGATA	480
ACACAGAAGG	AAAACAAGCG	GTAGAATTTG	CAGAAAAAGT	TGCAAATTCT	ACCGCTTTTT	540
TATTAGTACG	ATTCGCTGTT	GGA CTGCCAT	TTGATTTGGT	TTGTCAGGAT	ATTATGTTAT	600
TGTAATGAAA	TGTTAGTGAA	TTATTTTAT	TAATTTGAAA	GGAGACAAAA	TGAAAATAAA	660
AAAACGTTAC	ATTGCCGCTGC	TAGCTTTAGG	CAGTGTATT	GGCTATGCCT	GGTATCAAAA	720
TTATCAATGG	GAACAGTTGA	TGTTAAGTGG	CTATTGTGAA	AAGGACGGAA	GCTATTGTGA	780
TGATAGGCAT	ACGAAGCAGG	AACTGATTGA	TAGGGCAATT	AACTATGTGC	TGGAAAATCA	840
AATTC AACAG	ACATATGAAG	GTGATGACCT	TGTGGATATA	AAACAATATT	CAACAATAGA	900
GGAAATTTAAA	AAACTAAATC	CGAATTGTTG	TAAGGTAGAT	TCTTGGCCGG	ATGATGCTGT	960
TCGTGAGGAT	GCTGATTAC	AGCGAGAGGG	CAAAGCGTAT	AAATACGTAA	AAGTCAAATA	1020
TTTAAGAACC	TATTTAGCGA	ATAGAGAACC	TGAACAATGG	GAAAATTACA	TAGTATTTGA	1080

TAATTGCAGT GGAATTAAAG AAAGACACCA ACTGTATTAA AAATAGATTA GATGGAGACA	1140
ACACGATGAC AAAACTAACT ATCCAAGATG TGACTIONTTT ATATTTATAT AAGCAAAGAA	1200
CTTTACTAC GGATAGGTTA GATGATTCGC TTATTAGCAA AACAGGAAAA GGGGAAAATA	1260
TTGATAAAAA GGAATTTATG GCGGGGCCGG GACGTTTTGT GACGGCCGAT AATTTTAGTG	1320
TTGTAAAAGA CTTTTTFACT GCAAAGGATT CATTATAAAA CCTAAGCTTG CAGACTCGTA	1380
TATTAGCGAA TTTAAAGCCG GGCAAATATT CCAAAGCGCA GATATTAGAA ATGTTGGGCT	1440
ATACGAAAAA TGGAGAAAAG GTAGATGGCA TGTTTACCGG TGAAGTCCAG ACATTAGGCT	1500
TTTATGACGA TGGCAAAGGG GATTTACTCG AACGCGCCTA TATCTGAAAT ACCACAGGAT	1560
TTAAA ATG AGC GAC AAT GCC TTT TTT GTT ATA GAA GAA TCA GGC AAA	1607
Met Ser Asp Asn Ala Phe Phe Val Ile Glu Glu Ser Gly Lys	
1660 1665 1670	
CGC TAT ATT GAA AAC TTT GGT ATT GAA CCT CTT GGT AAG CAA GAA GAT	1655
Arg Tyr Ile Glu Asn Phe Gly Ile Glu Pro Leu Gly Lys Gln Glu Asp	
1675 1680 1685	
TTT GAT TTT GTC GGC GGC TTT TGG TCT AAC TTA GTG AAT CGT GGT TTG	1703
Phe Asp Phe Val Gly Gly Phe Trp Ser Asn Leu Val Asn Arg Gly Leu	
1690 1695 1700	
GAA AGT ATT ATC GAC CCA TCC GGT ATC GGT GGA ACG GTA AAC CTT AAC	1751
Glu Ser Ile Ile Asp Pro Ser Gly Ile Gly Gly Thr Val Asn Leu Asn	
1705 1710 1715 1720	
TTT ACC GGC GAG GTG GAA ACC TAC ACG TTA GAC GAA ACA AGG TTT AAA	1799
Phe Thr Gly Glu Val Glu Thr Tyr Thr Leu Asp Glu Thr Arg Phe Lys	
1725 1730 1735	
GCG GAA GCG GCG AAG AAA AGC CAT TGG AGT TTA GTG AAT GCG GCG AAA	1847
Ala Glu Ala Ala Lys Lys Ser His Trp Ser Leu Val Asn Ala Ala Lys	
1740 1745 1750	
GTA TAC GGC GGT TTA GAC CAA ATT ATT AAA AAA CTA TGG GAC AGT GGC	1895
Val Tyr Gly Gly Leu Asp Gln Ile Ile Lys Lys Leu Trp Asp Ser Gly	
1755 1760 1765	
TCA ATT AAG CAT TTA TAT CAA GAT AAA GAT ACG GGC AAA TTA AAA CCG	1943
Ser Ile Lys His Leu Tyr Gln Asp Lys Asp Thr Gly Lys Leu Lys Pro	
1770 1775 1780	
ATT ATT TAC GGC ACG GCC GGC AAC GAC AGT AAG ATT GAA GGC ACT AAA	1991
Ile Ile Tyr Gly Thr Ala Gly Asn Asp Ser Lys Ile Glu Gly Thr Lys	
1785 1790 1795 1800	
ATC ACC CGT AGG ATT GCG GGT AAA GAA GTT ACG CTT GAT ATT GCC AAT	2039
Ile Thr Arg Arg Ile Ala Gly Lys Glu Val Thr Leu Asp Ile Ala Asn	
1805 1810 1815	
CAG AAA ATT GAA AAA GGC GTG TTA GAG AAA TTG GGG CTG TCT GTT AGT	2087
Gln Lys Ile Glu Lys Gly Val Leu Glu Lys Leu Gly Leu Ser Val Ser	
1820 1825 1830	
GGT TCG GAT ATC ATT AAA TTG TTG TTT GGA GCA TTG ACT CCA ACT TTA	2135
Gly Ser Asp Ile Ile Lys Leu Leu Phe Gly Ala Leu Thr Pro Thr Leu	
1835 1840 1845	
AAT AGA ATG TTG CTA TCA CAA CTT ATC CAG TCT TTT TCC GAT AGC TTG	2183
Asn Arg Met Leu Leu Ser Gln Leu Ile Gln Ser Phe Ser Asp Ser Leu	
1850 1855 1860	

GCT AAA CTT GAT AAT CCC TTA GCC CCT TAC ACT AAA AAT GGC GTG GTT Ala Lys Leu Asp Asn Pro Leu Ala Pro Tyr Thr Lys Asn Gly Val Val 1865 1870 1875 1880	2231
TAT GTC ACC GGC AAA GGG AAT GAT GTG CTT AAA GGA ACT GAA CAT GAG Tyr Val Thr Gly Lys Gly Asn Asp Val Leu Lys Gly Thr Glu His Glu 1885 1890 1895	2279
GAT TTG TTT CTC GGT GGT GAG GGG AAT GAT ACT TAT TAT GCG AGA GTA Asp Leu Phe Leu Gly Gly Glu Gly Asn Asp Thr Tyr Tyr Ala Arg Val 1900 1905 1910	2327
GGC GAT ACA ATT GAA GAC GCC GAC GGC AAA GGT AAA GTC TAT TTT GTG Gly Asp Thr Ile Glu Asp Ala Asp Gly Lys Gly Lys Val Tyr Phe Val 1915 1920 1925	2375
AGA GAA AAA GGG GTA CCT AAG GCG GAT CCT AAG CGG GTA GAG TTT AGC Arg Glu Lys Gly Val Pro Lys Ala Asp Pro Lys Arg Val Glu Phe Ser 1930 1935 1940	2423
GAG TAC ATA ACG AAA GAA GAA ATA AAA GAG GTT GAA AAG GGG TTA TTA Glu Tyr Ile Thr Lys Glu Glu Ile Lys Glu Val Glu Lys Gly Leu Leu 1945 1950 1955 1960	2471
ACT TAC GCA GTT TTA GAA AAT TAT AAT TGG GAA GAG AAA ACG GCG ACT Thr Tyr Ala Val Leu Glu Asn Tyr Asn Trp Glu Glu Lys Thr Ala Thr 1965 1970 1975	2519
TTC GCT CAT GCG ACT ATG CTT AAT GAG CTT TTT ACT GAT TAT ACT AAT Phe Ala His Ala Thr Met Leu Asn Glu Leu Phe Thr Asp Tyr Thr Asn 1980 1985 1990	2567
TAT CGT TAT GAA GTT AAA GGA CTA AAA TTG CCC GCC GTT AAA AAG TTA Tyr Arg Tyr Glu Val Lys Gly Leu Lys Leu Pro Ala Val Lys Lys Leu 1995 2000 2005	2615
AAA AGT CCG TTG GTG GAG TTT ACA GCT GAT TTA TTA ACT GTT ACG CCT Lys Ser Pro Leu Val Glu Phe Thr Ala Asp Leu Leu Thr Val Thr Pro 2010 2015 2020	2663
ATT GAC GAA AAC GGA AAA GCA CTT AGC GAA AAA AGT ATT ACG GTT AAA Ile Asp Glu Asn Gly Lys Ala Leu Ser Glu Lys Ser Ile Thr Val Lys 2025 2030 2035 2040	2711
AAT TTT AAA AAT GGT GAT TTA GGA ATA AGG TTG TTG GAT CCT AAT AGC Asn Phe Lys Asn Gly Asp Leu Gly Ile Arg Leu Leu Asp Pro Asn Ser 2045 2050 2055	2759
TAT TAT TAT TTC CTT GAA GGC CAA GAT ACG GGT TTT TAT GGT CCT GCT Tyr Tyr Tyr Phe Leu Glu Gly Gln Asp Thr Gly Phe Tyr Gly Pro Ala 2060 2065 2070	2807
TTT TAT ATT GAA CGA AAA AAC GGT GGA GGC TCT AAA AAT AAC TCG TCG Phe Tyr Ile Glu Arg Lys Asn Gly Gly Gly Ser Lys Asn Asn Ser Ser 2075 2080 2085	2855
GGA GCA GGA AAT AGC AAA GAT TGG GGC GGG AAC GGG CAT GGA AAT CAC Gly Ala Gly Asn Ser Lys Asp Trp Gly Gly Asn Gly His Gly Asn His 2090 2095 2100	2903
CGA AAT AAT GCC TCC GAC CTG AAT AAA CCG GAC GGA AAT AAT GGG AAT Arg Asn Asn Ala Ser Asp Leu Asn Lys Pro Asp Gly Asn Asn Gly Asn 2105 2110 2115 2120	2951
AAC CAA AAT AAC GGA AGC AAT CAA GAT AAT CAT AGC GAT GTG AAT GCG Asn Gln Asn Asn Gly Ser Asn Gln Asp Asn His Ser Asp Val Asn Ala 2125 2130 2135	2999

CCA AAT AAC CCG GGA CGT AAC TAT GAT ATT TAC GAT CCT TTA GCT TTA Pro Asn Asn Pro Gly Arg Asn Tyr Asp Ile Tyr Asp Pro Leu Ala Leu 2140 2145 2150	3047
GAT TTA GAT GGA GAT GGG CTT GAA ACC GTG TCG ATG AAC GGG CGA CAA Asp Leu Asp Gly Asp Gly Leu Glu Thr Val Ser Met Asn Gly Arg Gln 2155 2160 2165	3095
GGC GCG TTA TTC GAT CAT GAA GGA AAA GGT ATT CGT ACC GCA ACG GGC Gly Ala Leu Phe Asp His Glu Gly Lys Gly Ile Arg Thr Ala Thr Gly 2170 2175 2180	3143
TGG CTC GCT GCG GAT GAC GGT TTT TTA GTG TTA GAT CGT AAC CAA GAC Trp Leu Ala Ala Asp Asp Gly Phe Leu Val Leu Asp Arg Asn Gln Asp 2185 2190 2195 2200	3191
GGC ATT ATT AAT GAT ATA AGC GAG TTA TTT AGT AAT AAA AAT CAA CTT Gly Ile Ile Asn Asp Ile Ser Glu Leu Phe Ser Asn Lys Asn Gln Leu 2205 2210 2215	3239
TCC GAC GGG AGT ATT TCT GCA CAC GGT TTT GCG ACA TTA GCC GAT TTG Ser Asp Gly Ser Ile Ser Ala His Gly Phe Ala Thr Leu Ala Asp Leu 2220 2225 2230	3287
GAT ACA AAC CAA GAT CAG CGT ATC GAC CAA AAT GAT AAG CTG TTT TCT Asp Thr Asn Gln Asp Gln Arg Ile Asp Gln Asn Asp Lys Leu Phe Ser 2235 2240 2245	3335
AAA CTC CAA ATT TGG CGG GAT TTA AAT CAA AAC GGT TTT AGT GAA GCG Lys Leu Gln Ile Trp Arg Asp Leu Asn Gln Asn Gly Phe Ser Glu Ala 2250 2255 2260	3383
AAT GAG CTG TTT AGC TTA GAA AGT TTG AAT ATT AAA TCT TTA CAT ACC Asn Glu Leu Phe Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ile Lys Ser Leu His Thr 2265 2270 2275 2280	3431
GCC TAT GAA GAG CGT AAT GAT TTT CTA GCG GGC AAT AAT ATC CTT GCT Ala Tyr Glu Glu Arg Asn Asp Phe Leu Ala Gly Asn Asn Ile Leu Ala 2285 2290 2295	3479
CAG CTT GGG AAG TAT GAA AAA ACG GAC GGT ACT TTT GGA CAA ATG GGC Gln Leu Gly Lys Tyr Glu Lys Thr Asp Gly Thr Phe Gly Gln Met Gly 2300 2305 2310	3527
GAT TTA AAT TTC AGT TTT AAC CCG TTT TAT AGC CGA TTT ACC GAA GCG Asp Leu Asn Phe Ser Phe Asn Pro Phe Tyr Ser Arg Phe Thr Glu Ala 2315 2320 2325	3575
TTA AAT TTA ACC GAG CAA CAA CGT CGC ACA ATT AAT CTA ACC GGC ACC Leu Asn Leu Thr Glu Gln Gln Arg Arg Thr Ile Asn Leu Thr Gly Thr 2330 2335 2340	3623
GGT CGG GTT CGG GAT TTG CGT GAA GCC GCC GCA CTT TCT GAG GAG TTG Gly Arg Val Arg Asp Leu Arg Glu Ala Ala Ala Leu Ser Glu Glu Leu 2345 2350 2355 2360	3671
GCT GCT TTA TTA CAA CAG TAC ACT AAG GGC TCC GAT TTT CAG GCA CAA Ala Ala Leu Leu Gln Gln Tyr Thr Lys Gly Ser Asp Phe Gln Ala Gln 2365 2370 2375	3719
CGA GAA TTA TTG CCT GCC ATT TTA GAT AAA TGG GCG GCA ACG GAT TTA Arg Glu Leu Leu Pro Ala Ile Leu Asp Lys Trp Ala Ala Thr Asp Leu 2380 2385 2390	3767
CAG TAT CAA CAT TAT GAT AAA ACA TTA CTT AAA ACG GTA GAA AGT ACC Gln Tyr Gln His Tyr Asp Lys Thr Leu Leu Lys Thr Val Glu Ser Thr 2395 2400 2405	3815

GAT AGT AGT GCT TCT GTC GTT AGA GTC ACG CCT TCT CAA TTA AGT AGT Asp Ser Ser Ala Ser Val Val Arg Val Thr Pro Ser Gln Leu Ser Ser 2410 2415 2420	3863
ATA CGC AAT GTA AAG CAT GAT CCT ACC GTT ATG CAA AAC TGT GAA CAA Ile Arg Asn Val Lys His Asp Pro Thr Val Met Gln Asn Cys Glu Gln 2425 2430 2435 2440	3911
AGT AAG GCA AAA ATT GCG ACT TTA AAT TCG CTC TAC GGG TTA AAT ATT Ser Lys Ala Lys Ile Ala Thr Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Leu Asn Ile 2445 2450 2455	3959
GAT CAA CTT TAT TAT ACG ACG GAT AAA GAC ATT CGT TAT ATT ACT GAC Asp Gln Leu Tyr Tyr Thr Thr Asp Lys Asp Ile Arg Tyr Ile Thr Asp 2460 2465 2470	4007
AAA GTG AAT AAT ATG TAT CAA ACA ACC GGA GAA CTC GGC TAT CGT TCT Lys Val Asn Asn Met Tyr Gln Thr Thr Gly Glu Leu Gly Tyr Arg Ser 2475 2480 2485	4055
TTA CTT TTA CAA ACG CGT GTG AAG AAA TAT GTT TAT AGC GTT AAT GCG Leu Leu Leu Gln Thr Arg Val Lys Lys Tyr Val Tyr Ser Val Asn Ala 2490 2495 2500	4103
AAA CAA TTC GAA GGG AAA TGG GTA GCC GAT TAT TCT CGT ACT GAA GCC Lys Gln Phe Glu Gly Lys Trp Val Ala Asp Tyr Ser Arg Thr Glu Ala 2505 2510 2515 2520	4151
TTA TTT AAC TCT ACT TAT AAA CAA TCG CCC GAA AAT GTA TTA TAT GAT Leu Phe Asn Ser Thr Tyr Lys Gln Ser Pro Glu Asn Val Leu Tyr Asp 2525 2530 2535	4199
TTA CGC GAA TAC CTT TCT TTC TAT AAC GAC CCT ACG GAA TGG AAA GAA Leu Arg Glu Tyr Leu Ser Phe Tyr Asn Asp Pro Thr Glu Trp Lys Glu 2540 2545 2550	4247
GGG CTA TTA CTG TTA AGC CGT TAT ATA GAT TAT GCT AAA GCA CAA GGA Gly Leu Leu Leu Leu Ser Arg Tyr Ile Asp Tyr Ala Lys Ala Gln Gly 2555 2560 2565	4295
TTT TAT GAA AAC TGG GCG GCT ACT TCT AAC TTA ACT ATT GCC CGT TTA Phe Tyr Glu Asn Trp Ala Ala Thr Ser Asn Leu Thr Thr Ile Ala Arg Leu 2570 2575 2580	4343
AGA GAG GCT GGA GTA ATT TGT GCA GAA TCG ACG GAT TTA AAA GGC GAT Arg Glu Ala Gly Val Ile Cys Ala Glu Ser Thr Asp Leu Lys Gly Asp 2585 2590 2595 2600	4391
GAA AAA AAT AAT ATT GTG TTA GGT AGC CAA AAA GAT AAT AAC TTA TCG Glu Lys Asn Asn Ile Val Leu Gly Ser Gln Lys Asp Asn Asn Leu Ser 2605 2610 2615	4439
GGT AGT GCA GGT GAT GAT CTA CTT ATC GGC GGA GAG GGT AAT GAT ACG Gly Ser Ala Gly Asp Asp Leu Leu Ile Gly Gly Glu Gly Asn Asp Thr 2620 2625 2630	4487
TTA AAA GGC AGC TAC GGT GCA GAC ACC TAT ATC TTT AGC AAA GGG CAT Leu Lys Gly Ser Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile Phe Ser Lys Gly His 2635 2640 2645	4535
GGA CAA GAT GTA ATT TAT GAA TAT TCC GAC AGT GCA AAC TCT AAA AAA Gly Gln Asp Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Asp Ser Ala Asn Ser Lys Lys 2650 2655 2660	4583
GAT ATT GAT ACC TTA AAA TTT ACC GAT GTG AAT TAT GCG GAA GTG AAG Asp Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Val Asn Tyr Ala Glu Val Lys 2665 2670 2675 2680	4631

TTT CGA CGA GTA GAT AAT GAC TTA ATG TTA TTC GGT TAT CAT GAT ACG Phe Arg Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu Phe Gly Tyr His Asp Thr 2685 2690 2695	4679
GAT TCG GTC ACG GTA AAA TCC TTC TAC AGC CAT GTA GAT TAT CAA TTT Asp Ser Val Thr Val Lys Ser Phe Tyr Ser His Val Asp Tyr Gln Phe 2700 2705 2710	4727
GAC AAA TTG GAG TTT GCT GAC CGC AGT ATA ACT CGC GAT GAA CTG ATT Asp Lys Leu Glu Phe Ala Asp Arg Ser Ile Thr Arg Asp Glu Leu Ile 2715 2720 2725	4775
AAA GCA GGG CTT CAT CTA TAC GGC ACC GAT GGC AAT GAT GAT ATA AAG Lys Ala Gly Leu His Leu Tyr Gly Thr Asp Gly Asn Asp Asp Ile Lys 2730 2735 2740	4823
GAT CAT GCG GAT TGG GAC AGC ATT GTG GAA GGC GGC AAA GGC AAC GAT Asp His Ala Asp Trp Asp Ser Ile Val Glu Gly Gly Lys Gly Asn Asp 2745 2750 2755 2760	4871
ATT CTA AGA GGT GGC TAC GGT GCG GAC ACC TAT ATC TTT AGC AAA GGA Ile Leu Arg Gly Gly Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile Phe Ser Lys Gly 2765 2770 2775	4919
CAC GGA CAG GAT ATC GTT TAT GAA GAT ACC AAT AAT GAT AAC CGA GCA His Gly Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn Asn Asp Asn Arg Ala 2780 2785 2790	4967
AGA GAT ATC GAC ACC TTA ACA TTT ACT GAT GTG AAT TAT GCG GAA GTG Arg Asp Ile Asp Thr Leu Thr Phe Thr Asp Val Asn Tyr Ala Glu Val 2795 2800 2805	5015
AAA TTC CGA CGA GTA GAT AAT GAC TTA ATG TTA TTC GGT TAT CAT GAT Lys Phe Arg Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu Phe Gly Tyr His Asp 2810 2815 2820	5063
ACG GAT TCG GTC ACG ATA AAA TCC TTC TAC AAC CAT GTA GAT TAT CAA Thr Asp Ser Val Thr Ile Lys Ser Phe Tyr Asn His Val Asp Tyr Gln 2825 2830 2835 2840	5111
TGT GAC AAA TTG GAC TTT GCT GAC CGC AGT ATA ACT CGT GAT GAA CTA Cys Asp Lys Leu Asp Phe Ala Asp Arg Ser Ile Thr Arg Asp Glu Leu 2845 2850 2855	5159
GGT AAA CAA GGT ATG GCA TTA TTT GGC ACT GAC GGC GAT GAT AAT ATC Gly Lys Gln Gly Met Ala Leu Phe Gly Thr Asp Gly Asp Asp Asn Ile 2860 2865 2870	5207
AAC GAC TGG GGA CGT AAC TCG GTG ATT GAT GCC GGT GCG GGT AAT GAT Asn Asp Trp Gly Arg Asn Ser Val Ile Asp Ala Gly Ala Gly Asn Asp 2875 2880 2885	5255
ACG GTT AAT GGC GGT AAT GGC GAT GAC ACC CTC ATC GGC GGC AAA GGT Thr Val Asn Gly Gly Asn Gly Asp Asp Thr Leu Ile Gly Gly Lys Gly 2890 2895 2900	5303
AAT GAT ATT CTA AGA GGT GGC TAC GGT GCG GAC ACC TAT ATC TTT AGC Asn Asp Ile Leu Arg Gly Gly Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile Phe Ser 2905 2910 2915 2920	5351
AAA GGA CAC GGA CAG GAT ATC GTT TAT GAA GAT ACC AAT AAT GAT AAC Lys Gly His Gly Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn Asn Asp Asn 2925 2930 2935	5399
CGC GCA AGA GAT ATC GAC ACC TTA AAA TTT ACT GAT ATT AAT TTA TCC Arg Ala Arg Asp Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Ile Asn Leu Ser 2940 2945 2950	5447

GAA CTT TGG TTT AGC CGA GAA AAT AAC GAT TTG ATT ATT AAA TCA TTA Glu Leu Trp Phe Ser Arg Glu Asn Asn Asp Leu Ile Ile Lys Ser Leu 2955 2960 2965	5495
TTA AGT GAG GAT AAA GTC ACG GTT CAA AAT TGG TAT TCA CAC CAA GAT Leu Ser Glu Asp Lys Val Thr Val Gln Asn Trp Tyr Ser His Gln Asp 2970 2975 2980	5543
CAT AAA ATA GAA AAT ATT CGT TTA TCG AAT GAG CAA ATG TTG GTG AGC His Lys Ile Glu Asn Ile Arg Leu Ser Asn Glu Gln Met Leu Val Ser 2985 2990 2995 3000	5591
ACT CAG GTG GAG AAG ATG GTT GAG TCG ATG GCC GGC TTT GCT CAG AAG Thr Gln Val Glu Lys Met Val Glu Ser Met Ala Gly Phe Ala Lys 3005 3010 3015	5639
CAC GGA GGA GAG ATA TCT CTT CTG TCG CCT GAA GAG GTA AAA CAA TAT His Gly Gly Glu Ile Ser Leu Leu Ser Pro Glu Glu Val Lys Gln Tyr 3020 3025 3030	5687
ATC AAT AGC TTA ACA GCT GCT TTA TAA CATACGAAAG AAATCGGCAC Ile Asn Ser Leu Thr Ala Ala Leu * 3035 3040	5734
AGTTTTTGTG AACTGTGCCG ATTTGATTTT AGTGTAAGAA TATAGCCTGA TTTTAAGAAA	5794
TTTACTCTTG GCTAATAACT ATTTCCCATT TTATAAGTTA TTGACGGATG GTTTTTATCAA	5854
ATATGAGATC AAATCTTATT TTAAATTCGC TTTCCATTAA GCGATATTGA TCTTTTAAGT	5914
TTGGGGCCGC ATGAGTTTGG AACCGATACC ACTCATTGTG GGAATCAATA CACAATACGC	5974
TGTAATCGGA CTCTTGCACT TCATAATAAT GCFTTCTCTC CGTTAATTCT TCTTGCGTAT	6034
ATGGCGAGAG ATTAAAGCTG AATGGCTGGT TCGCACTAAC AAACAGGTTT TCCGATTTCA	6094
GATATTCACA ACCGTAATGG CTACCGGTTT CCTGCGGTTT TACATAATTG GTATGATTTT	6154
GTTTAGCTGT TATACGGTAG ATGCCTAATT GTGGTAAATT GCGTGTGTCA ATATAGCTTT	6214
CTTGTTCTCC GTAACCGAAA TACTCAATGG CGTTTTCTGT TTTAGCTAAG AAGAAACGTA	6274
AGCCGAAGCG GGTAAATAC GGTAATTCGA TCGGGCGAAT AGCGTTAATT TCAACCGAAA	6334
GTTGTCCGTC ATTGAAGATA CGATAACGAA TATCCAGTGT TAAAATGCGA CCGCGAGAAA	6394
TTGACACAAT TGCAGATTTT ACTGAAAATT CGACCGCTTG TTCGCTTTCG TGCCACTGAA	6454
TTTCATACGC TCTGGTATAG GCTTTATCGT AGCCGGCATT TTGGCACGCC TCACGAATGA	6514
GGCGATCATT GTCGGTTGGC GCACGCCAAA TATTAAAATC TAACGATTGT TGGATAATCG	6574
CTTTACCGGC TTTTCAATA CGGGTGAAAA TCCCTTCTCG TTTATCTAAT TGATAACTAA	6634
ATTGACCGTT GTGTACGTTA ATGTGGAAGC GATCTTCTTG TACTTCAAAT GCACTGTTCT	6694
CAATGTGAA TTGTGGTAAT ACTAATTTAT TTTGCTAAA TAAATTGAGC TGCTCGAAGC	6754
CAAGTGAATG TGCTTCGTCT AATAATTCGA CCGCGGTATT TAAGCGATAA TTTAAATTC	6814
GTAGCCATAA ATGCCCGTTA TTTTTGGTA ACTCAATCGG TAATACTACG CTGCCGTGCC	6874
GTTGGCAAGA AACGGATAAA TTCCCACCGC TGTCCACCAC GCCGTTTTCG ACAAAATCGT	6934
AATCAATCGT TAAATAATCG GCAAGATCAG TGAATCCAA GTAGTTGTGG ATCACAATTT	6994
GGTTATCGAT	7004

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA SEC ID Nº: 4:

## (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1383 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 4:

```

Met Ser Asp Asn Ala Phe Phe Val Ile Glu Glu Ser Gly Lys Arg Tyr
  1           5           10           15
Ile Glu Asn Phe Gly Ile Glu Pro Leu Gly Lys Gln Glu Asp Phe Asp
          20           25           30
Phe Val Gly Gly Phe Trp Ser Asn Leu Val Asn Arg Gly Leu Glu Ser
          35           40           45
Ile Ile Asp Pro Ser Gly Ile Gly Gly Thr Val Asn Leu Asn Phe Thr
  50           55           60
Gly Glu Val Glu Thr Tyr Thr Leu Asp Glu Thr Arg Phe Lys Ala Glu
  65           70           75           80
Ala Ala Lys Lys Ser His Trp Ser Leu Val Asn Ala Ala Lys Val Tyr
          85           90           95
Gly Gly Leu Asp Gln Ile Ile Lys Lys Leu Trp Asp Ser Gly Ser Ile
          100          105          110
Lys His Leu Tyr Gln Asp Lys Asp Thr Gly Lys Leu Lys Pro Ile Ile
          115          120          125
Tyr Gly Thr Ala Gly Asn Asp Ser Lys Ile Glu Gly Thr Lys Ile Thr
          130          135          140
Arg Arg Ile Ala Gly Lys Glu Val Thr Leu Asp Ile Ala Asn Gln Lys
          145          150          155          160
Ile Glu Lys Gly Val Leu Glu Lys Leu Gly Leu Ser Val Ser Gly Ser
          165          170          175
Asp Ile Ile Lys Leu Leu Phe Gly Ala Leu Thr Pro Thr Leu Asn Arg
          180          185          190
Met Leu Leu Ser Gln Leu Ile Gln Ser Phe Ser Asp Ser Leu Ala Lys
          195          200          205
Leu Asp Asn Pro Leu Ala Pro Tyr Thr Lys Asn Gly Val Val Tyr Val
          210          215          220
Thr Gly Lys Gly Asn Asp Val Leu Lys Gly Thr Glu His Glu Asp Leu
          225          230          235          240
Phe Leu Gly Gly Glu Gly Asn Asp Thr Tyr Tyr Ala Arg Val Gly Asp
          245          250          255
Thr Ile Glu Asp Ala Asp Gly Lys Gly Lys Val Tyr Phe Val Arg Glu
          260          265          270
Lys Gly Val Pro Lys Ala Asp Pro Lys Arg Val Glu Phe Ser Glu Tyr
          275          280          285
Ile Thr Lys Glu Glu Ile Lys Glu Val Glu Lys Gly Leu Leu Thr Tyr
          290          295          300
Ala Val Leu Glu Asn Tyr Asn Trp Glu Glu Lys Thr Ala Thr Phe Ala
          305          310          315          320

```

10

His Ala Thr Met Leu Asn Glu Leu Phe Thr Asp Tyr Thr Asn Tyr Arg  
 325 330 335  
 Tyr Glu Val Lys Gly Leu Lys Leu Pro Ala Val Lys Lys Leu Lys Ser  
 340 345 350  
 Pro Leu Val Glu Phe Thr Ala Asp Leu Leu Thr Val Thr Pro Ile Asp  
 355 360 365  
 Glu Asn Gly Lys Ala Leu Ser Glu Lys Ser Ile Thr Val Lys Asn Phe  
 370 375 380  
 Lys Asn Gly Asp Leu Gly Ile Arg Leu Leu Asp Pro Asn Ser Tyr Tyr  
 385 390 395 400  
 Tyr Phe Leu Glu Gly Gln Asp Thr Gly Phe Tyr Gly Pro Ala Phe Tyr  
 405 410 415  
 Ile Glu Arg Lys Asn Gly Gly Gly Ser Lys Asn Asn Ser Ser Gly Ala  
 420 425 430  
 Gly Asn Ser Lys Asp Trp Gly Gly Asn Gly His Gly Asn His Arg Asn  
 435 440 445  
 Asn Ala Ser Asp Leu Asn Lys Pro Asp Gly Asn Asn Gly Asn Asn Gln  
 450 455 460  
 Asn Asn Gly Ser Asn Gln Asp Asn His Ser Asp Val Asn Ala Pro Asn  
 465 470 475 480  
 Asn Pro Gly Arg Asn Tyr Asp Ile Tyr Asp Pro Leu Ala Leu Asp Leu  
 485 490 495  
 Asp Gly Asp Gly Leu Glu Thr Val Ser Met Asn Gly Arg Gln Gly Ala  
 500 505  
 Leu Phe Asp His Glu Gly Lys Gly Ile Arg Thr Ala Thr Gly Trp Leu  
 515 520 525  
 Ala Ala Asp Asp Gly Phe Leu Val Leu Asp Arg Asn Gln Asp Gly Ile  
 530 535 540  
 Ile Asn Asp Ile Ser Glu Leu Phe Ser Asn Lys Asn Gln Leu Ser Asp  
 545 550 555 560  
 Gly Ser Ile Ser Ala His Gly Phe Ala Thr Leu Ala Asp Leu Asp Thr  
 565 570 575  
 Asn Gln Asp Gln Arg Ile Asp Gln Asn Asp Lys Leu Phe Ser Lys Leu  
 580 585 590  
 Gln Ile Trp Arg Asp Leu Asn Gln Asn Gly Phe Ser Glu Ala Asn Glu  
 595 600 605  
 Leu Phe Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ile Lys Ser Leu His Thr Ala Tyr  
 610 615 620  
 Glu Glu Arg Asn Asp Phe Leu Ala Gly Asn Asn Ile Leu Ala Gln Leu  
 625 630 635 640  
 Gly Lys Tyr Glu Lys Thr Asp Gly Thr Phe Gly Gln Met Gly Asp Leu  
 645 650 655  
 Asn Phe Ser Phe Asn Pro Phe Tyr Ser Arg Phe Thr Glu Ala Leu Asn  
 660 665 670  
 Leu Thr Glu Gln Gln Arg Arg Thr Ile Asn Leu Thr Gly Thr Gly Arg  
 675 680 685

Val Arg Asp Leu Arg Glu Ala Ala Ala Leu Ser Glu Glu Leu Ala Ala  
 690 695 700  
 Leu Leu Gln Gln Tyr Thr Lys Gly Ser Asp Phe Gln Ala Gln Arg Glu  
 705 710 715 720  
 Leu Leu Pro Ala Ile Leu Asp Lys Trp Ala Ala Thr Asp Leu Gln Tyr  
 725 730 735  
 Gln His Tyr Asp Lys Thr Leu Leu Lys Thr Val Glu Ser Thr Asp Ser  
 740 745 750  
 Ser Ala Ser Val Val Arg Val Thr Pro Ser Gln Leu Ser Ser Ile Arg  
 755 760 765  
 Asn Val Lys His Asp Pro Thr Val Met Gln Asn Cys Glu Gln Ser Lys  
 770 775 780  
 Ala Lys Ile Ala Thr Leu Asn Ser Leu Tyr Gly Leu Asn Ile Asp Gln  
 785 790 795 800  
 Leu Tyr Tyr Thr Thr Asp Lys Asp Ile Arg Tyr Ile Thr Asp Lys Val  
 805 810 815  
 Asn Asn Met Tyr Gln Thr Thr Gly Glu Leu Gly Tyr Arg Ser Leu Leu  
 820 825 830  
 Leu Gln Thr Arg Val Lys Lys Tyr Val Tyr Ser Val Asn Ala Lys Gln  
 835 840 845  
 Phe Glu Gly Lys Trp Val Ala Asp Tyr Ser Arg Thr Glu Ala Leu Phe  
 850 855 860  
 Asn Ser Thr Tyr Lys Gln Ser Pro Glu Asn Val Leu Tyr Asp Leu Arg  
 865 870 875 880  
 Glu Tyr Leu Ser Phe Tyr Asn Asp Pro Thr Glu Trp Lys Glu Gly Leu  
 885 890 895  
 Leu Leu Leu Ser Arg Tyr Ile Asp Tyr Ala Lys Ala Gln Gly Phe Tyr  
 900 905 910  
 Glu Asn Trp Ala Ala Thr Ser Asn Leu Thr Ile Ala Arg Leu Arg Glu  
 915 920 925  
 Ala Gly Val Ile Cys Ala Glu Ser Thr Asp Leu Lys Gly Asp Glu Lys  
 930 935 940  
 Asn Asn Ile Val Leu Gly Ser Gln Lys Asp Asn Asn Leu Ser Gly Ser  
 945 950 955 960  
 Ala Gly Asp Asp Leu Leu Ile Gly Gly Glu Gly Asn Asp Thr Leu Lys  
 965 970 975  
 Gly Ser Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile Phe Ser Lys Gly His Gly Gln  
 980 985 990  
 Asp Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Asp Ser Ala Asn Ser Lys Lys Asp Ile  
 995 1000 1005  
 Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Val Asn Tyr Ala Glu Val Lys Phe Arg  
 1010 1015 1020  
 Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu Phe Gly Tyr His Asp Thr Asp Ser  
 1025 1030 1035 1040  
 Val Thr Val Lys Ser Phe Tyr Ser His Val Asp Tyr Gln Phe Asp Lys  
 1045 1050 1055

Leu Glu Phe Ala Asp Arg Ser Ile Thr Arg Asp Glu Leu Ile Lys Ala  
 1060 1065 1070  
 Gly Leu His Leu Tyr Gly Thr Asp Gly Asn Asp Asp Ile Lys Asp His  
 1075 1080 1085  
 Ala Asp Trp Asp Ser Ile Val Glu Gly Gly Lys Gly Asn Asp Ile Leu  
 1090 1095 1100  
 Arg Gly Gly Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile Phe Ser Lys Gly His Gly  
 1105 1110 1115 1120  
 Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn Asn Asp Asn Arg Ala Arg Asp  
 1125 1130 1135  
 Ile Asp Thr Leu Thr Phe Thr Asp Val Asn Tyr Ala Glu Val Lys Phe  
 1140 1145 1150  
 Arg Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu Phe Gly Tyr His Asp Thr Asp  
 1155 1160 1165  
 Ser Val Thr Ile Lys Ser Phe Tyr Asn His Val Asp Tyr Gln Cys Asp  
 1170 1175 1180  
 Lys Leu Asp Phe Ala Asp Arg Ser Ile Thr Arg Asp Glu Leu Gly Lys  
 1185 1190 1195 1200  
 Gln Gly Met Ala Leu Phe Gly Thr Asp Gly Asp Asp Asn Ile Asn Asp  
 1205 1210 1215  
 Trp Gly Arg Asn Ser Val Ile Asp Ala Gly Ala Gly Asn Asp Thr Val  
 1220 1225 1230  
 Asn Gly Gly Asn Gly Asp Asp Thr Leu Ile Gly Gly Lys Gly Asn Asp  
 1235 1240 1245  
 Ile Leu Arg Gly Gly Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile Phe Ser Lys Gly  
 1250 1255 1260  
 His Gly Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn Asn Asp Asn Arg Ala  
 1265 1270 1275 1280  
 Arg Asp Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Ile Asn Leu Ser Glu Leu  
 1285 1290 1295  
 Trp Phe Ser Arg Glu Asn Asn Asp Leu Ile Ile Lys Ser Leu Leu Ser  
 1300 1305 1310  
 Glu Asp Lys Val Thr Val Gln Asn Trp Tyr Ser His Gln Asp His Lys  
 1315 1320 1325  
 Ile Glu Asn Ile Arg Leu Ser Asn Glu Gln Met Leu Val Ser Thr Gln  
 1330 1335 1340  
 Val Glu Lys Met Val Glu Ser Met Ala Gly Phe Ala Gln Lys His Gly  
 1345 1350 1355 1360  
 Gly Glu Ile Ser Leu Leu Ser Pro Glu Glu Val Lys Gln Tyr Ile Asn  
 1365 1370 1375  
 Ser Leu Thr Ala Ala Leu \*  
 1380

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA SEC ID Nº: 5:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 6736 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: doble  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

10 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Actinobacillus pleuropneumoniae*  
(B) CEPA: 4074 (cepa de referencia de serotipo 1)

15 (vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: pROK7

20 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS  
(B) LOCALIZACIÓN: 1132..6549  
(C) PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: experimental  
(D) OTRA INFORMACIÓN:/codón de inicio= 1132  
/función= "toxina RTX"  
/producto= "ApxIV" /  
/prueba= EXPERIMENTAL  
/gen= "ApxIV\_v1"

30 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS  
(B) LOCALIZACIÓN: 639..1178  
(D) OTRA INFORMACIÓN:/codón de inicio= 639  
/función= "desconocida"  
/producto= "ORF1"  
/gen= "orf1"

40 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS  
(B) LOCALIZACIÓN: 1..453  
(D) OTRA INFORMACIÓN:/parcial  
/producto= "Met-G"  
/gen= "mrp"  
/nombre convencional= "mrp"  
/marcador= mrp

50 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: - señal 10  
(B) LOCALIZACIÓN: 617..623  
(D) OTRA INFORMACIÓN:/nombre convencional = "-10"  
/marcador= -10\_s

55 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: - señal 35  
(B) LOCALIZACIÓN: 594..599  
(D) OTRA INFORMACIÓN:/nombre convencional= "-35 s"  
(D) OTRA INFORMACIÓN: nombre= "-35\_s"  
/marcador= -35\_s

60 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: promotor

65

(B) LOCALIZACIÓN: 454..1131  
 (D) OTRA INFORMACIÓN:/función= "Promotor"  
 /nombre convencional = "promotor ApxIV"  
 /marcador= promotor

5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 5:

ATC	GAT	ATG	CCG	CCG	GGT	ACG	GGC	GAT	ATC	CAA	CTT	ACT	CTT	TCG	CAA	48
Ile	Asp	Met	Pro	Pro	Gly	Thr	Gly	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Leu	Ser	Gln	
1				5					10					15		
CAA	ATT	CCG	GTT	ACC	GGT	GCG	GTG	GTG	GTA	ACC	ACT	CCG	CAA	GAT	ATT	96
Gln	Ile	Pro	Val	Thr	Gly	Ala	Val	Val	Val	Thr	Thr	Pro	Gln	Asp	Ile	
			20				25						30			
GCG	TTA	TTA	GAT	GCG	GTG	AAA	GGT	ATT	TCA	ATG	TTC	CAA	AAA	GTG	TCG	144
Ala	Leu	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	Gly	Ile	Ser	Met	Phe	Gln	Lys	Val	Ser	
		35					40					45				
GTA	CCG	GTC	TTA	GGT	ATC	ATT	GAA	AAT	ATG	AGC	GTA	CAT	ATC	TGC	CAA	192
Val	Pro	Val	Leu	Gly	Ile	Ile	Glu	Asn	Met	Ser	Val	His	Ile	Cys	Gln	
	50					55					60					

AAT TGC GGT CAC CAC GAA GAT ATT TTC GGC ACC GGC GGT GCG GAG AAA	240
Asn Cys Gly His His Glu Asp Ile Phe Gly Thr Gly Gly Ala Glu Lys	
65 70 75 80	
GTG GCG AAG AAA TAC GGT ACT AAA GTA TTA GGA CAA ATG CCG TTG CAT	288
Val Ala Lys Lys Tyr Gly Thr Lys Val Leu Gly Gln Met Pro Leu His	
85 90 95	
ATT CGC TTA CGT CAA GAT TTG GAT GCC GGC ACA CCG ACC GTC GTT GCG	336
Ile Arg Leu Arg Gln Asp Leu Asp Ala Gly Thr Pro Thr Val Val Ala	
100 105 110	
GCA CCG GAA CAC GAA ACC AGC CGA GCC TAT ATT GAA TTA GCG GCA AAA	384
Ala Pro Glu His Glu Thr Ser Arg Ala Tyr Ile Glu Leu Ala Ala Lys	
115 120 125	
GTC GCT TCG GAA TTA TAC TGG CAA GGT TCG GTT ATC CCG TCT GAA ATT	432
Val Ala Ser Glu Leu Tyr Trp Gln Gly Ser Val Ile Pro Ser Glu Ile	
130 135 140	
ATG ATT CGT GAA GTA AAA TAA GTTTAATAA CCACGAAAAC ACAAAGAACA	483
Met Ile Arg Glu Val Lys * 150	
145 150	
CAAGCGGTAG AATTTGCAGA AAAATTTGCA AATCCTACCG CTTTTTTATT AGTACGATTC	543
GCTGTTGGAC TGCTATTTGA TTTGGTTTGT CAGGATATTA TGTTATTGTA ATGAAATGTT	603
AGTGAATTAT TTTTATTAAT TTGAAAGGAA ACAAATGAA AATAAAAAAA CGTTACATTG	663
CGCTGTTGGT CTTAGGTGTC GTTATCAGCT ATGCCCTGGTA TCAAAATTAT CAAIGGGAAC	723
AGCTGATGTT AAGCGTTTAT TGTGAAAAGG ACGGAAGTTA TTTTGATGAT AGGCATACGA	783
AGCAAGAACT GATTGATAGG GCAATTA ACT ATATGCTGGA GCATCAATCT AAAAAACAT	843
ACGATGCTTA TACTGATGAA CCTTAGAAA TAAACCATA TTTAACAATA GAGGAATTTA	903
AAAAACTCAA TCCAAATTGT TGTGAAATTA CCTCATGGCC AGCAGATGCA GTTCCACAAG	963
ATTGGGATGT TCGTGTGGAA GGTAAAGCAT ATAGGTATGT AATCGTAAA TATTTAAGAA	1023
CCTTAGCAAA TAGAGAACCT GAACGATGGG AACTAGTAT TGTTTTTGAT AATTGCGGCA	1083
ATCCTAAAAG AGCAAGCTAC TTATATTATT TAAAGAGAGA AATTTATT ATG ACA AAA	1140
Met Thr Lys	
1	
TTA ACT ATG CAA GAT GTG ACC AAT TTA TAT TTA TAT AAA ACG AAA ACT	1188
Leu Thr Met Gln Asp Val Thr Asn Leu Tyr Leu Tyr Lys Thr Lys Thr	
5 10 15	
CTA CCT AAA GAT AGA TTG GAT GAT TCA CTT ATT TCT GAA ATA GGA AAA	1236
Leu Pro Lys Asp Arg Leu Asp Asp Ser Leu Ile Ser Glu Ile Gly Lys	
20 25 30 35	
GGA GAT GAT GAT ATT GAT AGA AAA GAA TTT ATG GTG GGG CCG GGA CGT	1284
Gly Asp Asp Asp Ile Asp Arg Lys Glu Phe Met Val Gly Pro Gly Arg	
40 45 50	
TTT GTG ACC GCT GAT AAC TTT AGC GTT GTA AGA GAT TTT TTT AAT GCT	1332
Phe Val Thr Ala Asp Asn Phe Ser Val Val Arg Asp Phe Phe Asn Ala	
55 60 65	
GGG AAA TCA CGC ATT ATT GCG CCG CAA GTC CCG CCT ATT CGT TCA CAG	1380
Gly Lys Ser Arg Ile Ile Ala Pro Gln Val Pro Pro Ile Arg Ser Gln	
70 75 80	
CAG GAA AAA ATC TTG GTC GGT TTA AAA CCG GGC AAA TAT TCC AAA GCG	1428
Gln Glu Lys Ile Leu Val Gly Leu Lys Pro Gly Lys Tyr Ser Lys Ala	
85 90 95	
CAG ATA TTG GAA ATG CTG GGT TAT ACG AAA GGC GGA GAA GTG GTA AAT	1476
Gln Ile Leu Glu Met Leu Gly Tyr Thr Lys Gly Gly Glu Val Val Asn	
100 105 110 115	
GGC ATG TTT GCC GGT GAA GTC CAG ACA TTA GGC TTT TAT GAC GAT GGC	1524
Gly Met Phe Ala Gly Glu Val Gln Thr Leu Gly Phe Tyr Asp Asp Gly	
120 125 130	
AAA GGG GAT TTA CTC GAA CGC GCC TAT ATC TGG AAT ACC ACA GGA TTT	1572
Lys Gly Asp Leu Leu Glu Arg Ala Tyr Ile Trp Asn Thr Thr Gly Phe	
135 140 145	
AAA ATG AGC GAC AAT GCC TTT TTT GTT ATA GAA GAA TCA GGC AAA CGC	1620

Lys	Met	Ser	Asp	Asn	Ala	Phe	Phe	Val	Ile	Glu	Glu	Ser	Gly	Lys	Arg	
		150				155						160				
TAT	ATT	GAA	AAC	TTT	GGT	ATT	GAA	CCT	CTT	GGT	AAG	CAA	GAA	GAT	TTT	1668
Tyr	Ile	Glu	Asn	Phe	Gly	Ile	Glu	Pro	Leu	Gly	Lys	Gln	Glu	Asp	Phe	
		165				170					175					
GAT	TTT	GTC	GGC	GGC	TTT	TGG	TCT	AAC	TTA	GTG	AAT	CGT	GGT	TTG	GAA	1716
Asp	Phe	Val	Gly	Gly	Phe	Trp	Ser	Asn	Leu	Val	Asn	Arg	Gly	Leu	Glu	
		180			185					190					195	
AGT	ATT	ATC	GAC	CCA	TCC	GGT	ATC	GGT	GGA	ACG	GTA	AAC	CTT	AAC	TTT	1764
Ser	Ile	Ile	Asp	Pro	Ser	Gly	Ile	Gly	Gly	Thr	Val	Asn	Leu	Asn	Phe	
				200					205					210		
ACC	GGC	GAG	GTG	GAA	ACC	TAC	ACG	TTA	GAC	GAA	ACA	AGG	TTT	AAA	GCG	1812
Thr	Gly	Glu	Val	Glu	Thr	Tyr	Thr	Leu	Asp	Glu	Thr	Arg	Phe	Lys	Ala	
			215					220					225			
GAA	GCG	GCG	AAG	AAA	AGC	CAT	TGG	AGT	TTA	GTG	AAT	GCG	GCG	AAA	GTA	1860
Glu	Ala	Ala	Lys	Lys	Ser	His	Trp	Ser	Leu	Val	Asn	Ala	Ala	Lys	Val	
		230					235					240				
TAC	GGC	GGT	TTA	GAC	CAA	ATT	ATT	AAA	AAA	CTA	TGG	GAC	AGT	GGC	TCA	1908
Tyr	Gly	Gly	Leu	Asp	Gln	Ile	Ile	Lys	Lys	Leu	Trp	Asp	Ser	Gly	Ser	
		245				250					255					
ATT	AAG	CAT	TTA	TAT	CAA	GAT	AAA	GAT	ACG	GGC	AAA	TTA	AAA	CCG	ATT	1956
Ile	Lys	His	Leu	Tyr	Gln	Asp	Lys	Asp	Thr	Gly	Lys	Leu	Lys	Pro	Ile	
					265					270					275	
ATT	TAC	GGC	ACG	GCC	GCC	AAC	GAC	AGT	AAG	ATT	GAA	GGC	ACT	AAA	ATC	2004
Ile	Tyr	Gly	Thr	Ala	Gly	Asn	Asp	Ser	Lys	Ile	Glu	Gly	Thr	Lys	Ile	
				280					285					290		
ACC	CGT	AGG	ATT	GCG	GGT	AAA	GAA	GTT	ACG	CTT	GAT	ATT	GCC	AAT	CAG	2052
Thr	Arg	Arg	Ile	Ala	Gly	Lys	Glu	Val	Thr	Leu	Asp	Ile	Ala	Asn	Gln	
			295					300					305			
AAA	ATT	GAA	AAA	GGC	GTG	TTA	GAG	AAA	TTG	GGG	CTG	TCT	GTT	AGT	GGT	2100
Lys	Ile	Glu	Lys	Gly	Val	Leu	Glu	Lys	Leu	Gly	Leu	Ser	Val	Ser	Gly	
		310					315					320				
TCG	GAT	ATC	ATT	AAA	TTG	TTG	TTT	GGA	GCA	TTG	ACT	CCA	ACT	TTA	AAT	2148
Ser	Asp	Ile	Ile	Lys	Leu	Leu	Phe	Gly	Ala	Leu	Thr	Pro	Thr	Leu	Asn	
		325				330					335					
AGA	ATG	TTG	CTA	TCA	CAA	CTT	ATC	CAG	TCT	TTT	TCC	GAT	AGC	TTG	GCT	2196
Arg	Met	Leu	Leu	Ser	Gln	Leu	Ile	Gln	Ser	Phe	Ser	Asp	Ser	Leu	Ala	
		340			345					350					355	
AAA	CTT	GAT	AAT	CCC	TTA	GCC	CCT	TAC	ACT	AAA	AAT	GGC	GTG	GTT	TAT	2244
Lys	Leu	Asp	Asn	Pro	Leu	Ala	Pro	Tyr	Thr	Lys	Asn	Gly	Val	Val	Tyr	
				360				365						370		
GTC	ACC	GGC	AAA	GGG	AAT	GAT	GTG	CTT	AAA	GGA	ACT	GAA	CAT	GAG	GAT	2292
Val	Thr	Gly	Lys	Gly	Asn	Asp	Val	Leu	Lys	Gly	Thr	Glu	His	Glu	Asp	
			375					380					385			
TTG	TTT	CTC	GGT	GGT	GAG	GGG	AAT	GAT	ACT	TAT	TAT	GCG	AGA	GTA	GGC	2340
Leu	Phe	Leu	Gly	Gly	Glu	Gly	Asn	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Arg	Val	Gly	
		390					395					400				
GAT	ACA	ATT	GAA	GAC	GCC	GAC	GGC	AAA	GGT	AAA	GTC	TAT	TTT	GTG	AGA	2388
Asp	Thr	Ile	Glu	Asp	Ala	Asp	Gly	Lys	Gly	Lys	Val	Tyr	Phe	Val	Arg	
		405				410					415					
GAA	AAA	GGG	GTA	CCT	AAG	GCG	GAT	CCT	AAG	CGG	GTA	GAG	TTT	AGC	GAG	2436
Glu	Lys	Gly	Val	Pro	Lys	Ala	Asp	Pro	Lys	Arg	Val	Glu	Phe	Ser	Glu	
					425					430					435	
TAC	ATA	ACG	AAA	GAA	GAA	ATA	AAA	GAG	GTT	GAA	AAG	GGG	TTA	TTA	ACT	2484
Tyr	Ile	Thr	Lys	Glu	Glu	Ile	Lys	Glu	Val	Glu	Lys	Gly	Leu	Leu	Thr	
				440				445						450		
TAC	GCA	GTT	TTA	GAA	AAT	TAT	AAT	TGG	GAA	GAG	AAA	ACG	GCG	ACT	TTC	2532
Tyr	Ala	Val	Leu	Glu	Asn	Tyr	Asn	Trp	Glu	Glu	Lys	Thr	Ala	Thr	Phe	
			455					460					465			
GCT	CAT	GCG	ACT	ATG	CTT	AAT	GAG	CTT	TTT	ACT	GAT	TAT	ACT	AAT	TAT	2580
Ala	His	Ala	Thr	Met	Leu	Asn	Glu	Leu	Phe	Thr	Asp	Tyr	Thr	Asn	Tyr	
			470				475					480				
CGT	TAT	GAA	GTT	AAA	GGA	CTA	AAA	TTG	CCC	GCC	GTT	AAA	AAG	TTA	AAA	2628
Arg	Tyr	Glu	Val	Lys	Gly	Leu	Lys	Leu	Pro	Ala	Val	Lys	Lys	Leu	Lys	

485				490				495								
AGT Ser 500	CCG Pro	TTG Leu	GTG Val	GAG Glu	TTT Phe 505	ACA Thr	GCT Ala	GAT Asp	TTA Leu	TTA Leu 510	ACT Thr	GTT Val	ACG Thr	CCT Pro	ATT Ile 515	2676
GAC Asp	GAA Glu	AAC Asn	GGA Gly	AAA Lys 520	GCA Ala	CTT Leu	AGC Ser	GAA Glu	AAA Lys 525	AGT Ser	ATT Ile	ACG Thr	GTT Val	AAA Lys 530	AAT Asn	2724
TTT Phe	AAA Lys	AAT Asn	GGT Gly 535	GAT Asp	TTA Leu	GGA Gly	ATA Ile	AGG Arg 540	TTG Leu	TTG Leu	GAT Asp	CCT Pro	AAT Asn 545	AGC Ser	TAT Tyr	2772
TAT Tyr	TAT Tyr	TTC Phe 550	CTT Leu	GAA Glu	GGC Gly	CAA Gln	GAT Asp 555	ACG Thr	GGT Gly	TTT Phe	TAT Tyr	GGT Gly 560	CCT Pro	GCT Ala	TTT Phe	2820
TAT Tyr 565	ATT Ile	GAA Glu	CGA Arg	AAA Lys	AAC Asn	GGT Gly 570	GGC Gly	GGC Gly	GCT Ala	AAA Lys	AAT Asn	AAC Asn	TCG Ser	TCG Ser	GGA Gly	2868
GCA Ala 580	GGA Gly	AAT Asn	AGC Ser	AAA Lys	GAT Asp 585	TGG Trp	GGC Gly	GGG Gly	AAC Asn	GGG Gly 590	CAT His	GGA Gly	AAT Asn	CAC His	CGA Arg 595	2916
AAT Asn	AAT Asn	GCC Ala	TCC Ser	GAC Asp 600	CTG Leu	AAT Asn	AAA Lys	CCG Pro	GAC Asp 605	GGA Gly	AAT Asn	AAT Asn	GGG Gly	AAT Asn 610	AAC Asn	2964
CAA Gln	AAT Asn	AAC Asn	GGA Gly 615	AGC Ser	AAT Asn	CAA Gln	GAT Asp	AAT Asn	CAT His	AGC Ser	GAT Asp	GTG Val	AAT Asn	GCG Ala	CCA Pro	3012
AAT Asn	AAC Asn	CCG Pro 630	GGA Gly	CGT Arg	AAC Asn	TAT Tyr	GAT Asp 635	ATT Ile	TAC Tyr	GAT Asp	CCT Pro	TTA Leu 640	GCT Ala	TTA Leu	GAT Asp	3060
TTA Leu 645	GAT Asp	GGA Gly	GAT Asp	GGG Gly	CTT Leu	GAA Glu 650	ACC Thr	GTG Val	TCG Ser	ATG Met	AAC Asn 655	GGG Gly	CGA Arg	CAA Gln	GGC Gly	3108
GCG Ala 660	TTA Leu	TTC Phe	GAT Asp	CAT His	GAA Glu 665	GGA Gly	AAA Lys	GGT Gly	ATT Ile	CGT Arg 670	ACC Thr	GCA Ala	ACG Thr	GGC Gly	TGG Trp 675	3156
CTC Leu	GCT Ala	GCG Ala	GAT Asp	GAC Asp 680	GGT Gly	TTT Phe	TTA Leu	GTG Val	TTA Leu	GAT Asp 685	CGT Arg	AAC Asn	CAA Gln	GAC Asp 690	GGC Gly	3204
ATT Ile	ATT Ile	AAT Asn	GAT Asp 695	ATA Ile	AGC Ser	GAG Glu	TTA Leu	TTT Phe	AGT Ser	AAT Asn	AAA Lys	AAT Asn	CAA Gln	CTT Leu	TCC Ser	3252
GAC Asp	GGC Gly	AGT Ser 710	ATT Ile	TCT Ser	GCA Ala	CAC His	GGT Gly 715	TTT Phe	GCG Ala	ACA Thr	TTA Leu	GCC Ala 720	GAT Asp	TTG Leu	GAT Asp	3300
ACA Thr 725	AAC Asn	CAA Gln	GAT Asp	CAG Gln	CGT Arg	ATC Ile 730	GAC Asp	CAA Gln	AAT Asn	GAT Asp	AAG Lys 735	CTG Leu	TTT Phe	TCT Ser	AAA Lys	3348
CTC Leu 740	CAA Gln	ATT Ile	TGG Trp	CGG Arg	GAT Asp 745	TTA Leu	AAT Asn	CAA Gln	AAC Asn	GGT Gly 750	TTT Phe	AGT Ser	GAA Glu	GCG Ala	AAT Asn 755	3396
GAG Glu	CTG Leu	TTT Phe	AGC Ser	TTA Leu 760	GAA Glu	AGT Ser	TTG Leu	AAT Asn	ATT Ile 765	AAA Lys	TCT Ser	TTA Leu	CAT His	ACC Thr 770	GCC Ala	3444
TAT Tyr	GAA Glu	GAG Glu	CGT Arg 775	AAT Asn	GAT Asp	TTT Phe	CTA Leu	GCG Ala 780	GGC Gly	AAT Asn	AAT Asn	ATC Ile	CTT Leu 785	GCT Ala	CAG Gln	3492
CTT Leu	GGG Gly	AAG Lys 790	TAT Tyr	GAA Glu	AAA Lys	ACG Thr	GAC Asp 795	GGT Gly	ACT Thr	TTT Phe	GCA Ala	CAA Gln	ATC Met	GGC Gly	GAT Asp	3540
TTA Leu 805	AAT Asn	TTC Phe	AGT Ser	TTT Phe	AAC Asn	CCG Pro 810	TTT Phe	TAT Tyr	AGC Ser	CGA Arg	TTT Phe 815	ACC Thr	GAA Glu	GCG Ala	TTA Leu	3588
AAT Asn 820	TTA Leu	ACC Thr	GAG Glu	CAA Gln	CAA Gln 825	CGT Arg	CGC Arg	ACA Thr	ATT Ile	AAT Asn 830	CTA Leu	ACC Thr	GGC Gly	ACC Thr	GGT Gly 835	3636

CGG	GTT	CGG	GAT	TTG	CGT	GAA	GCC	GCC	GCA	CTT	TCT	GAG	GAG	TTG	GCT	3684
Arg	Val	Arg	Asp	Leu	Arg	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu	Glu	Leu	Ala	
				840					845					850		
GCT	TTA	TTA	CAA	CAG	TAC	ACT	AAG	GCC	TCC	GAT	TTT	CAG	GCA	CAA	CGA	3732
Ala	Leu	Leu	Gln	Gln	Tyr	Thr	Lys	Ala	Ser	Asp	Phe	Gln	Ala	Gln	Arg	
			855					860					865			
GAA	TTA	TTG	CCT	GCC	ATT	TTA	GAT	AAA	TGG	GCG	GCA	ACG	GAT	TTA	CAG	3780
Glu	Leu	Leu	Pro	Ala	Ile	Leu	Asp	Lys	Trp	Ala	Ala	Thr	Asp	Leu	Gln	
		870					875					880				
TAT	CAA	CAT	TAT	GAT	AAA	ACA	TTA	CTT	AAA	ACG	GTA	GAA	AGT	ACC	GAT	3828
Tyr	Gln	His	Tyr	Asp	Lys	Thr	Leu	Leu	Lys	Thr	Val	Glu	Ser	Thr	Asp	
	885					890					895					
AGT	AGT	GCT	TCT	GTC	GTT	AGA	GTC	ACG	CCT	TCT	CAA	TTA	AGT	AGT	ATA	3876
Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Val	Arg	Val	Thr	Pro	Ser	Gln	Leu	Ser	Ser	Ile	
900				905					910						915	
CGC	AAT	GCA	AAG	CAT	GAT	CCT	ACC	GTT	ATG	CAA	AAC	TTT	GAA	CAG	AGT	3924
Arg	Asn	Ala	Lys	His	Asp	Pro	Thr	Val	Met	Gln	Asn	Phe	Glu	Gln	Ser	
				920					925					930		
AAG	GCA	AAA	ATT	GCG	ACT	TTA	AAT	TCG	CTC	TAC	GGG	TTA	AAT	ATC	GAT	3972
Lys	Ala	Lys	Ile	Ala	Thr	Leu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Gly	Leu	Asn	Ile	Asp	
			935					940						945		
CAA	CTT	TAT	TAC	ACG	ACG	GAT	AAA	GAC	ATT	CGC	TAT	ATT	ACT	GAT	AAA	4020
Gln	Leu	Tyr	Tyr	Thr	Thr	Asp	Lys	Asp	Ile	Arg	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	
		950					955						960			
GTG	AAT	AAT	ATG	TAT	CAA	ACA	ACC	GTA	GAA	CTT	GCC	TAC	CGT	TCT	TTA	4068
Val	Asn	Asn	Met	Tyr	Gln	Thr	Thr	Val	Glu	Leu	Ala	Tyr	Arg	Ser	Leu	
	965					970					975					
CTT	TTA	CAA	ACG	CGT	TTG	AAG	AAA	TAT	GTT	TAT	AGC	GTT	AAT	GCG	AAA	4116
Leu	Leu	Gln	Thr	Arg	Leu	Lys	Lys	Tyr	Val	Tyr	Ser	Val	Asn	Ala	Lys	
980					985				990						995	
CAA	TTC	GAA	GGG	AAA	TGG	GTA	ACC	GAT	TAT	TCT	CGT	ACT	GAA	GCC	TTA	4164
Gln	Phe	Glu	Gly	Lys	Trp	Val	Thr	Asp	Tyr	Ser	Arg	Thr	Glu	Ala	Leu	
				1000					1005					1010		
TTT	AAC	TCT	ACT	TTT	AAA	CAA	TCG	CCT	GAA	AAT	GCA	TTA	TAT	GAT	TTA	4212
Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Lys	Gln	Ser	Pro	Glu	Asn	Ala	Leu	Tyr	Asp	Leu	
			1015					1020						1025		
AGC	GAA	TAC	CTT	TCT	TTC	TTT	AAC	GAT	CCT	ACG	GAA	TGG	AAA	GAA	GGG	4260
Ser	Glu	Tyr	Leu	Ser	Phe	Phe	Asn	Asp	Pro	Thr	Glu	Trp	Lys	Glu	Gly	
		1030					1035					1040				
CTA	TTA	CTG	TTA	AGC	CGT	TAT	ATA	GAT	TAT	GCT	AAA	GCA	CAA	GGA	TTT	4308
Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Arg	Tyr	Ile	Asp	Tyr	Ala	Lys	Ala	Gln	Gly	Phe	
		1045				1050					1055					
TAT	GAA	AAC	TGG	GCG	GCT	ACT	TCT	AAC	TTA	ACT	ATT	GCC	CGT	TTA	AGA	4356
Tyr	Glu	Asn	Trp	Ala	Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Thr	Ile	Ala	Arg	Leu	Arg	
1060					1065					1070					1075	
GAG	GCT	GGA	GTA	ATT	TTT	GCA	GAA	TCG	ACG	GAT	TTA	AAA	GCC	GAT	GAA	4404
Glu	Ala	Gly	Val	Ile	Phe	Ala	Glu	Ser	Thr	Asp	Leu	Lys	Gly	Asp	Glu	
				1080					1085					1090		
AAA	AAT	AAT	ATT	TTG	TTA	GGT	AGC	CAA	AAA	GAT	AAT	AAC	TTA	TCG	GGT	4452
Lys	Asn	Asn	Ile	Leu	Leu	Gly	Ser	Gln	Lys	Asp	Asn	Asn	Leu	Ser	Gly	
			1095					1100						1105		
AGT	GCA	GGT	GAT	GAT	CTA	CTT	ATC	GGC	GGA	GAG	GGT	AAT	GAT	ACG	TTA	4500
Ser	Ala	Gly	Asp	Asp	Leu	Leu	Ile	Gly	Gly	Glu	Gly	Asn	Asp	Thr	Leu	
		1110					1115						1120			
AAA	GGC	AGC	TAC	GGT	GCA	GAC	ACC	TAT	ATC	TTT	AGC	AAA	GGA	CAC	GGA	4548
Lys	Gly	Ser	Tyr	Gly	Ala	Asp	Thr	Tyr	Ile	Phe	Ser	Lys	Gly	His	Gly	
		1125				1130					1135					
CAG	GAT	ATC	GTT	TAT	GAA	GAT	ACC	AAT	AAT	GAT	AAC	CGC	GCA	AGA	GAT	4596
Gln	Asp	Ile	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Asn	Asp	Asn	Arg	Ala	Arg	Asp	
1140					1145					1150					1155	
ATC	GAC	ACC	TTA	AAA	TTT	ACC	GAT	GTG	AAT	TAT	GCG	GAA	GTG	AAG	TTT	4644
Ile	Asp	Thr	Leu	Lys	Phe	Thr	Asp	Val	Asn	Tyr	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	
				1160				1165						1170		
CGA	CGA	GTA	GAT	AAT	GAC	TTA	ATG	TTA	TTC	GGT	TAT	CAT	GAT	ACG	GAT	4692

Arg	Arg	Val	Asp	Asn	Asp	Leu	Met	Leu	Phe	Gly	Tyr	His	Asp	Thr	Asp	
			1175					1180					1185			
TCG	GTC	ACG	GTA	AAA	TCC	TTC	TAC	AGC	CAT	GTA	GAT	TAT	CAA	TTT	GAC	4740
Ser	Val	Thr	Val	Lys	Ser	Phe	Tyr	Ser	His	Val	Asp	Tyr	Gln	Phe	Asp	
			1190				1195					1200				
AAA	TTG	GAG	TTT	GCT	GAC	CGC	AGT	ATA	ACT	CGC	GAT	GAA	CTG	ATT	AAA	4788
Lys	Leu	Glu	Phe	Ala	Asp	Arg	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Glu	Leu	Ile	Lys	
			1205			1210					1215					
GCA	GGG	CTT	CAT	CTA	TAC	GGC	ACC	GAT	GGC	AAT	GAT	GAT	ATA	AAG	GAT	4836
Ala	Gly	Leu	His	Leu	Tyr	Gly	Thr	Asp	Gly	Asn	Asp	Asp	Ile	Lys	Asp	
					1225					1230					1235	
CAT	GCG	GAT	TGG	GAC	AGC	ATT	TTG	GAA	GGC	GGC	AAA	GGC	AAC	GAT	ATT	4884
His	Ala	Asp	Trp	Asp	Ser	Ile	Leu	Glu	Gly	Gly	Lys	Gly	Asn	Asp	Ile	
				1240					1245					1250		
CTA	AGA	GGT	GGC	TAC	GGT	GCG	GAC	ACC	TAT	ATC	TTT	AGC	AAA	GGA	CAC	4932
Leu	Arg	Gly	Tyr	Gly	Ala	Asp	Thr	Tyr	Ile	Phe	Ser	Lys	Gly	His		
			1255					1260					1265			
GGA	CAG	GAT	ATC	GTT	TAT	GAA	GAT	ACC	AAT	AAT	GAT	AAC	CGC	GCA	AGA	4980
Gly	Gln	Asp	Ile	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Asn	Asp	Asn	Arg	Ala	Arg	
			1270			1275						1280				
GAT	ATC	GAC	ACC	TTA	AAA	TTT	ACT	GAT	GTG	AAT	TAT	GCG	GAA	GTG	AAA	5028
Asp	Ile	Asp	Thr	Leu	Lys	Phe	Thr	Asp	Val	Asn	Tyr	Ala	Glu	Val	Lys	
		1285				1290					1295					
TTC	CGA	CGA	GTA	GAT	AAT	GAC	TTA	ATG	TTA	TTC	GGT	TAT	CAT	GAT	ACG	5076
Phe	Arg	Arg	Val	Asp	Asn	Asp	Leu	Met	Leu	Phe	Gly	Tyr	His	Asp	Thr	
			1300			1305				1310					1315	
GAT	TCG	GTC	ACG	ATA	AAA	TCC	TTC	TAC	AAC	CAT	GTA	GAT	TAT	CAA	TTT	5124
Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Lys	Ser	Phe	Tyr	Asn	His	Val	Asp	Tyr	Gln	Phe	
				1320					1325					1330		
GAC	AAA	TTG	GAA	TTT	GCT	GAC	CGC	AGT	ATA	ACT	CGT	GAT	GAA	CTA	GGT	5172
Asp	Lys	Leu	Glu	Phe	Ala	Asp	Arg	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Glu	Leu	Gly	
			1335					1340					1345			
AAA	CAA	GGT	ATG	GCA	TTA	TTT	GGC	ACT	GAC	GGT	GAT	GAT	AAT	ATC	AAC	5220
Lys	Gln	Gly	Met	Ala	Leu	Phe	Gly	Thr	Asp	Gly	Asp	Asp	Asn	Ile	Asn	
			1350			1355						1360				
GAC	TGG	GGA	CGT	AAC	TCG	GTG	ATT	GAT	GCC	GGT	GCG	GGT	AAT	GAT	ACG	5268
Asp	Trp	Gly	Arg	Asn	Ser	Val	Ile	Asp	Ala	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	
		1365				1370					1375					
GTT	AAT	GGC	GGT	AAT	GGC	GAT	GAC	ACC	CTC	ATC	GGC	GGC	AAA	GGT	AAT	5316
Val	Asn	Gly	Gly	Asn	Gly	Asp	Asp	Thr	Leu	Ile	Gly	Gly	Lys	Gly	Asn	
					1385					1390					1395	
GAT	ATT	CTA	AGA	GGT	GGC	TAC	GGT	GCG	GAC	ACC	TAT	ATC	TTT	AGC	AAA	5364
Asp	Ile	Leu	Arg	Gly	Gly	Tyr	Gly	Ala	Asp	Thr	Tyr	Ile	Phe	Ser	Lys	
				1400					1405					1410		
GGA	CAC	CGA	CAG	GAT	ATC	GTT	TAT	GAA	GAT	ACC	AAT	AAT	GAT	AAC	CGC	5412
Gly	His	Gly	Gln	Asp	Ile	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Asn	Asp	Asn	Arg	
			1415			1420							1425			
GCA	AGA	GAT	ATC	GAC	ACC	TTA	AAA	TTT	ACC	GAT	GTG	AAT	TAT	GCG	GAA	5460
Ala	Arg	Asp	Ile	Asp	Thr	Leu	Lys	Phe	Thr	Asp	Val	Asn	Tyr	Ala	Glu	
			1430			1435						1440				
GTG	AAA	TTC	CGA	CGA	GTA	GAT	AAT	GAC	TTA	ATG	TTA	TTC	GGT	TAT	CAT	5508
Val	Lys	Phe	Arg	Arg	Val	Asp	Asn	Asp	Leu	Met	Leu	Phe	Gly	Tyr	His	
			1445			1450						1455				
GAT	ACG	GAT	TCG	GTC	ACG	GTA	AAA	TCC	TTC	TAC	AGC	CAT	GTA	GAT	TAT	5556
Asp	Thr	Asp	Ser	Val	Thr	Val	Lys	Ser	Phe	Tyr	Ser	His	Val	Asp	Tyr	
				1465						1470				1475		
CAA	TTT	GAC	AAA	TTG	GAG	TTT	GCT	GAC	CGC	AGT	ATA	ACT	CGC	GAT	GAA	5604
Gln	Phe	Asp	Lys	Leu	Glu	Phe	Ala	Asp	Arg	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Glu	
				1480					1485					1490		
CTG	ATT	AAA	GCA	GGG	CTT	CAT	CTA	TAC	GGC	ACC	GAT	GGC	AAT	GAT	GAT	5652
Leu	Ile	Lys	Ala	Gly	Leu	His	Leu	Tyr	Gly	Thr	Asp	Gly	Asn	Asp	Asp	
			1495				1500						1505			
ATA	AAG	GAT	CAT	GCG	GAT	TGG	GAC	AGC	ATT	TTG	GAA	GGC	GGC	AAA	GGC	5700
Ile	Lys	Asp	His	Ala	Asp	Trp	Asp	Ser	Ile	Leu	Glu	Gly	Gly	Lys	Gly	

1510				1515				1520									
AAC	GAT	ATT	CTA	AGA	GGT	GGC	TAC	GGT	GCG	GAC	ACC	TAT	ATC	TTT	AGC	5748	
Asn	Asp	Ile	Leu	Arg	Gly	Gly	Tyr	Gly	Ala	Asp	Thr	Tyr	Ile	Phe	Ser		
1525				1530				1535									
AAA	GGA	CAC	GGA	CAG	GAT	ATC	GTT	TAT	GAA	GAT	ACC	AAT	AAT	GAT	AAC	5796	
Lys	Gly	His	Gly	Gln	Asp	Ile	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Asn	Asp	Asn		
1540				1545				1550				1555					
CGA	GCA	AGA	GAT	ATC	GAC	ACC	TTA	AAA	TTT	ACT	GAT	GTG	AAT	TAT	GCG	5844	
Arg	Ala	Arg	Asp	Ile	Asp	Thr	Leu	Lys	Phe	Thr	Asp	Val	Asn	Tyr	Ala		
1560				1565				1570									
GAA	GTG	AAA	TTC	CGA	CGA	GTA	GAT	AAT	GAC	TTA	ATG	TTA	TTC	GGT	TAT	5892	
Glu	Val	Lys	Phe	Arg	Arg	Val	Asp	Asn	Asp	Leu	Met	Leu	Phe	Gly	Tyr		
1575				1580				1585									
CAT	GAT	ACG	GAT	TCG	GTC	ACG	ATA	AAA	TCC	TTC	TAC	AAC	CAT	GTA	GAT	5940	
His	Asp	Thr	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Lys	Ser	Phe	Tyr	Asn	His	Val	Asp		
1590				1595				1600									
TAT	CAA	TTT	GAC	AAA	TTG	GAA	TTT	GCT	GAC	CGC	AGT	ATA	ACT	CGT	GAT	5988	
Tyr	Gln	Phe	Asp	Lys	Leu	Glu	Phe	Ala	Asp	Arg	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp		
1605				1610				1615									
GAA	CTA	GGT	AAA	CAA	GGT	ATG	GCA	TTA	TTT	GGC	ACT	GAC	GGT	GAT	GAT	6036	
Glu	Leu	Gly	Lys	Gln	Gly	Met	Ala	Leu	Phe	Gly	Thr	Asp	Gly	Asp	Asp		
1620				1625				1630				1635					
AAT	ATC	AAC	GAC	TGG	GGA	CGT	AAC	TCG	GTG	ATT	GAT	GCC	GGT	GCG	GGT	6084	
Asn	Ile	Asn	Asp	Trp	Gly	Arg	Asn	Ser	Val	Ile	Asp	Ala	Gly	Ala	Gly		
1640				1645				1650									
AAT	GAT	ACG	GTT	AAT	GGC	GGT	AAT	GGC	GAT	GAC	ACC	CTC	ATC	GGC	GGC	6132	
Asn	Asp	Thr	Val	Asn	Gly	Gly	Asn	Gly	Asp	Asp	Thr	Leu	Ile	Gly	Gly		
1655				1660				1665									
AAA	GGT	AAT	GAT	ATT	CTA	AGA	GGT	GGC	TAC	GGT	GCG	GAC	ACC	TAT	ATC	6180	
Lys	Gly	Asn	Asp	Ile	Leu	Arg	Gly	Gly	Tyr	Gly	Ala	Asp	Thr	Tyr	Ile		
1670				1675				1680									
TTT	AGC	AAA	GGA	CAC	GGA	CAG	GAT	ATC	GTT	TAT	GAA	GAT	ACC	AAT	AAT	6228	
Phe	Ser	Lys	Gly	His	Gly	Gln	Asp	Ile	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Asn	Asn		
1685				1690				1695									
GAT	AAC	CGC	GCA	AGA	GAT	ATC	GAC	ACC	TTA	AAA	TTT	ACT	GAT	ATT	AAT	6276	
Asp	Asn	Arg	Ala	Arg	Asp	Ile	Asp	Thr	Leu	Lys	Phe	Thr	Asp	Ile	Asn		
1700				1705				1710				1715					
TTA	TCC	GAA	CTT	TGG	TTT	AGC	CGA	GAA	AAT	AAC	GAT	TTG	ATT	ATT	AAA	6324	
Leu	Ser	Glu	Leu	Trp	Phe	Ser	Arg	Glu	Asn	Asn	Asp	Leu	Ile	Ile	Lys		
1720				1725				1730									
TCA	TTA	TTA	AGT	GAG	GAT	AAA	GTC	ACG	GTT	CAA	AAT	TGG	TAT	TCA	CAC	6372	
Ser	Leu	Leu	Ser	Glu	Asp	Lys	Val	Thr	Val	Gln	Asn	Trp	Tyr	Ser	His		
1735				1740				1745									
CAA	GAT	CAT	AAA	ATA	GAA	AAT	ATT	CGT	TTA	TCG	AAT	GAG	CAA	ACG	TTG	6420	
Gln	Asp	His	Lys	Ile	Glu	Asn	Ile	Arg	Leu	Ser	Asn	Glu	Gln	Thr	Leu		
1750				1755				1760									
GTG	AGC	ACT	CAG	GTG	GAG	AAG	ATG	GTT	GAG	TCG	ATG	GCC	GGC	TTT	GCT	6468	
Val	Ser	Thr	Gln	Val	Glu	Lys	Met	Val	Glu	Ser	Met	Ala	Gly	Phe	Ala		
1765				1770				1775									
CAG	AAG	CAC	GGA	GGA	GAG	ATA	TCT	CTT	GTG	TCG	CTT	GAA	GAG	GTA	AAA	6516	
Gln	Lys	His	Gly	Gly	Glu	Ile	Ser	Leu	Val	Ser	Leu	Glu	Glu	Val	Lys		
1780				1785				1790				1795					
CAA	TAT	ATC	AAT	AGC	TTA	ACA	GCT	GCT	TTA	TAA	CATACGAAAG	AAATCGGCAC				6569	
Gln	Tyr	Ile	Asn	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Leu	*							
1800				1805													
AGTTTTTTTTG AACTGTGCCG ATTTGATTTT AGTGTAAGAA TATAGCCTGA TTTTAAGAAA																6629	
TTTACTCTTG GCTAATAACT ATTTCCATT TTATAAGTTA TTGACGGATG GTTTTATCAA																6689	
ATATGAGATC AAATCTTATP TTAAATTCCG TTTCCATTAA GCGATAT																6736	

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 151 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 6:

```

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

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1806 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 7:

20

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

Leu Asn Phe Thr Gly Glu Val Glu Thr Tyr Thr Leu Asp Glu Thr Arg  
 210 215 220  
 Phe Lys Ala Glu Ala Ala Lys Lys Ser His Trp Ser Leu Val Asn Ala  
 225 230 235 240  
 Ala Lys Val Tyr Gly Glu Leu Asp Gln Ile Ile Lys Lys Leu Trp Asp  
 245 250 255  
 Ser Gly Ser Ile Lys His Leu Tyr Gln Asp Lys Asp Thr Gly Lys Leu  
 260 265 270  
 Lys Pro Ile Ile Tyr Gly Thr Ala Gly Asn Asp Ser Lys Ile Glu Gly  
 275 280 285  
 Thr Lys Ile Thr Arg Arg Ile Ala Gly Lys Glu Val Thr Leu Asp Ile  
 290 295 300  
 Ala Asn Gln Lys Ile Glu Lys Gly Val Leu Glu Lys Leu Gly Leu Ser  
 305 310 315 320  
 Val Ser Gly Ser Asp Ile Ile Lys Leu Leu Phe Gly Ala Leu Thr Pro  
 325 330 335  
 Thr Leu Asn Arg Met Leu Leu Ser Gln Leu Ile Gln Ser Phe Ser Asp  
 340 345 350  
 Ser Leu Ala Lys Leu Asp Asn Pro Leu Ala Pro Tyr Thr Lys Asn Gly  
 355 360 365  
 Val Val Tyr Val Thr Gly Lys Gly Asn Asp Val Leu Lys Gly Thr Glu  
 370 375 380  
 His Glu Asp Leu Phe Leu Gly Gly Glu Gly Asn Asp Thr Tyr Tyr Ala  
 385 390 395 400  
 Arg Val Gly Asp Thr Ile Glu Asp Ala Asp Gly Lys Gly Lys Val Tyr  
 405 410 415  
 Phe Val Arg Glu Lys Gly Val Pro Lys Ala Asp Pro Lys Arg Val Glu  
 420 425 430  
 Phe Ser Glu Tyr Ile Thr Lys Glu Glu Ile Lys Glu Val Glu Lys Gly  
 435 440 445  
 Leu Leu Thr Tyr Ala Val Leu Glu Asn Tyr Asn Trp Glu Glu Lys Thr  
 450 455 460  
 Ala Thr Phe Ala His Ala Thr Met Leu Asn Glu Leu Phe Thr Asp Tyr  
 465 470 475 480  
 Thr Asn Tyr Arg Tyr Glu Val Lys Gly Leu Lys Leu Pro Ala Val Lys  
 485 490 495  
 Lys Leu Lys Ser Pro Leu Val Glu Phe Thr Ala Asp Leu Leu Thr Val  
 500 505 510  
 Thr Pro Ile Asp Glu Asn Gly Lys Ala Leu Ser Glu Lys Ser Ile Thr  
 515 520 525  
 Val Lys Asn Phe Lys Asn Gly Asp Leu Gly Ile Arg Leu Leu Asp Pro  
 530 535 540  
 Asn Ser Tyr Tyr Tyr Phe Leu Glu Gly Gln Asp Thr Gly Phe Tyr Gly  
 545 550 555 560  
 Pro Ala Phe Tyr Ile Glu Arg Lys Asn Gly Gly Gly Ala Lys Asn Asn  
 565 570 575  
 Ser Ser Gly Ala Gly Asn Ser Lys Asp Trp Gly Gly Asn Gly His Gly  
 580 585 590  
 Asn His Arg Asn Asn Ala Ser Asp Leu Asn Lys Pro Asp Gly Asn Asn  
 595 600 605  
 Gly Asn Asn Gln Asn Asn Gly Ser Asn Gln Asp Asn His Ser Asp Val  
 610 615 620  
 Asn Ala Pro Asn Asn Pro Gly Arg Asn Tyr Asp Ile Tyr Asp Pro Leu  
 625 630 635 640  
 Ala Leu Asp Leu Asp Gly Asp Gly Leu Glu Thr Val Ser Met Asn Gly  
 645 650 655  
 Arg Gln Gly Ala Leu Phe Asp His Glu Gly Lys Gly Ile Arg Thr Ala

660				665				670							
Thr	Gly	Trp	Leu	Ala	Ala	Asp	Asp	Gly	Phe	Leu	Val	Leu	Asp	Arg	Asn
		675					680					685			
Gln	Asp	Gly	Ile	Ile	Asn	Asp	Ile	Ser	Glu	Leu	Phe	Ser	Asn	Lys	Asn
	690					695					700				
Gln	Leu	Ser	Asp	Gly	Ser	Ile	Ser	Ala	His	Gly	Phe	Ala	Thr	Leu	Ala
	705				710					715					720
Asp	Leu	Asp	Thr	Asn	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Asp	Gln	Asn	Asp	Lys	Leu
				725					730					735	
Phe	Ser	Lys	Leu	Gln	Ile	Trp	Arg	Asp	Leu	Asn	Gln	Asn	Gly	Phe	Ser
			740					745					750		
Glu	Ala	Asn	Glu	Leu	Phe	Ser	Leu	Glu	Ser	Leu	Asn	Ile	Lys	Ser	Leu
		755					760						765		
His	Thr	Ala	Tyr	Glu	Glu	Arg	Asn	Asp	Phe	Leu	Ala	Gly	Asn	Asn	Ile
	770					775					780				
Leu	Ala	Gln	Leu	Gly	Lys	Tyr	Glu	Lys	Thr	Asp	Gly	Thr	Phe	Ala	Gln
	785				790					795					800
Met	Gly	Asp	Leu	Asn	Phe	Ser	Phe	Asn	Pro	Phe	Tyr	Ser	Arg	Phe	Thr
				805					810					815	
Glu	Ala	Leu	Asn	Leu	Thr	Glu	Gln	Gln	Arg	Arg	Thr	Ile	Asn	Leu	Thr
			820						825				830		
Gly	Thr	Gly	Arg	Val	Arg	Asp	Leu	Arg	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu
		835					840						845		
Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Gln	Gln	Tyr	Thr	Lys	Ala	Ser	Asp	Phe	Gln
	850					855					860				
Ala	Gln	Arg	Glu	Leu	Leu	Pro	Ala	Ile	Leu	Asp	Lys	Trp	Ala	Ala	Thr
	865				870					875					880
Asp	Leu	Gln	Tyr	Gln	His	Tyr	Asp	Lys	Thr	Leu	Leu	Lys	Thr	Val	Glu
				885					890					895	
Ser	Thr	Asp	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Val	Arg	Val	Thr	Pro	Ser	Gln	Leu
			900						905				910		
Ser	Ser	Ile	Arg	Asn	Ala	Lys	His	Asp	Pro	Thr	Val	Met	Gln	Asn	Phe
		915					920					925			
Glu	Gln	Ser	Lys	Ala	Lys	Ile	Ala	Thr	Leu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Gly	Leu
	930					935					940				
Asn	Ile	Asp	Gln	Leu	Tyr	Tyr	Thr	Thr	Asp	Lys	Asp	Ile	Arg	Tyr	Ile
	945				950					955					960
Thr	Asp	Lys	Val	Asn	Asn	Met	Tyr	Gln	Thr	Thr	Val	Glu	Leu	Ala	Tyr
				965					970					975	
Arg	Ser	Leu	Leu	Leu	Gln	Thr	Arg	Leu	Lys	Lys	Tyr	Val	Tyr	Ser	Val
			980						985				990		
Asn	Ala	Lys	Gln	Phe	Glu	Gly	Lys	Trp	Val	Thr	Asp	Tyr	Ser	Arg	Thr
		995					1000					1005			
Glu	Ala	Leu	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Lys	Gln	Ser	Pro	Glu	Asn	Ala	Leu
	1010					1015					1020				
Tyr	Asp	Leu	Ser	Glu	Tyr	Leu	Ser	Phe	Phe	Asn	Asp	Pro	Thr	Glu	Trp
	1025				1030					1035					1040
Lys	Glu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Arg	Tyr	Ile	Asp	Tyr	Ala	Lys	Ala
			1045						1050					1055	
Gln	Gly	Phe	Tyr	Glu	Asn	Trp	Ala	Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Thr	Ile	Ala
			1050						1065					1070	
Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Gly	Val	Ile	Phe	Ala	Glu	Ser	Thr	Asp	Leu	Lys
			1075				1080						1085		
Gly	Asp	Glu	Lys	Asn	Asn	Ile	Leu	Leu	Gly	Ser	Gln	Lys	Asp	Asn	Asn
	1090					1095					1100				
Leu	Ser	Gly	Ser	Ala	Gly	Asp	Asp	Leu	Leu	Ile	Gly	Gly	Glu	Gly	Asn
					1110					1115					1120

Asp Thr Leu Lys Gly Ser Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile Phe Ser Lys  
 1125 1130 1135  
 Gly His Gly Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn Asn Asp Asn Arg  
 1140 1145 1150  
 Ala Arg Asp Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Val Asn Tyr Ala Glu  
 1155 1160 1165  
 Val Lys Phe Arg Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu Phe Gly Tyr His  
 1170 1175 1180  
 Asp Thr Asp Ser Val Thr Val Lys Ser Phe Tyr Ser His Val Asp Tyr  
 1185 1190 1195 1200  
 Gln Phe Asp Lys Leu Glu Phe Ala Asp Arg Ser Ile Thr Arg Asp Glu  
 1205 1210 1215  
 Leu Ile Lys Ala Gly Leu His Leu Tyr Gly Thr Asp Gly Asn Asp Asp  
 1220 1225 1230  
 Ile Lys Asp His Ala Asp Trp Asp Ser Ile Leu Glu Gly Gly Lys Gly  
 1235 1240 1245  
 Asn Asp Ile Leu Arg Gly Gly Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile Phe Ser  
 1250 1255 1260  
 Lys Gly His Gly Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn Asn Asp Asn  
 1265 1270 1275 1280  
 Arg Ala Arg Asp Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Val Asn Tyr Ala  
 1285 1290 1295  
 Glu Val Lys Phe Arg Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu Phe Gly Tyr  
 1300 1305 1310  
 His Asp Thr Asp Ser Val Thr Ile Lys Ser Phe Tyr Asn His Val Asp  
 1315 1320 1325  
 Tyr Gln Phe Asp Lys Leu Glu Phe Ala Asp Arg Ser Ile Thr Arg Asp  
 1330 1335 1340  
 Glu Leu Gly Lys Gln Gly Met Ala Leu Phe Gly Thr Asp Gly Asp Asp  
 1345 1350 1355 1360  
 Asn Ile Asn Asp Trp Gly Arg Asn Ser Val Ile Asp Ala Gly Ala Gly  
 1365 1370 1375  
 Asn Asp Thr Val Asn Gly Gly Asn Gly Asp Asp Thr Leu Ile Gly Gly  
 1380 1385 1390  
 Lys Gly Asn Asp Ile Leu Arg Gly Gly Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr Ile  
 1395 1400 1405  
 Phe Ser Lys Gly His Gly Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn Asn  
 1410 1415 1420  
 Asp Asn Arg Ala Arg Asp Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Val Asn  
 1425 1430 1435 1440  
 Tyr Ala Glu Val Lys Phe Arg Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu Phe  
 1445 1450 1455  
 Gly Tyr His Asp Thr Asp Ser Val Thr Val Lys Ser Phe Tyr Ser His  
 1460 1465 1470  
 Val Asp Tyr Gln Phe Asp Lys Leu Glu Phe Ala Asp Arg Ser Ile Thr  
 1475 1480 1485  
 Arg Asp Glu Leu Ile Lys Ala Gly Leu His Leu Tyr Gly Thr Asp Gly  
 1490 1495 1500  
 Asn Asp Asp Ile Lys Asp His Ala Asp Trp Asp Ser Ile Leu Glu Gly  
 1505 1510 1515 1520  
 Gly Lys Gly Asn Asp Ile Leu Arg Gly Gly Tyr Gly Ala Asp Thr Tyr  
 1525 1530 1535  
 Ile Phe Ser Lys Gly His Gly Gln Asp Ile Val Tyr Glu Asp Thr Asn  
 1540 1545 1550  
 Asn Asp Asn Arg Ala Arg Asp Ile Asp Thr Leu Lys Phe Thr Asp Val  
 1555 1560 1565  
 Asn Tyr Ala Glu Val Lys Phe Arg Arg Val Asp Asn Asp Leu Met Leu

ES 2 443 094 T3

1570					1575					1580					
Phe	Gly	Tyr	His	Asp	Thr	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Lys	Ser	Phe	Tyr	Asn
1585					1590					1595					1600
His	Val	Asp	Tyr	Gln	Phe	Asp	Lys	Leu	Glu	Phe	Ala	Asp	Arg	Ser	Ile
				1605					1610						1615
Thr	Arg	Asp	Glu	Leu	Gly	Lys	Gln	Gly	Met	Ala	Leu	Phe	Gly	Thr	Asp
			1620					1625						1630	
Gly	Asp	Asp	Asn	Ile	Asn	Asp	Trp	Gly	Arg	Asn	Ser	Val	Ile	Asp	Ala
			1635				1640					1645			
Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Val	Asn	Gly	Gly	Asn	Gly	Asp	Asp	Thr	Leu
	1650					1655						1660			
Ile	Gly	Gly	Lys	Gly	Asn	Asp	Ile	Leu	Arg	Gly	Gly	Tyr	Gly	Ala	Asp
1665					1670					1675					1680
Thr	Tyr	Ile	Phe	Ser	Lys	Gly	His	Gly	Gln	Asp	Ile	Val	Tyr	Glu	Asp
				1685					1690					1695	
Thr	Asn	Asn	Asp	Asn	Arg	Ala	Arg	Asp	Ile	Asp	Thr	Leu	Lys	Phe	Thr
			1700					1705					1710		
Asp	Ile	Asn	Leu	Ser	Glu	Leu	Trp	Phe	Ser	Arg	Glu	Asn	Asn	Asp	Leu
		1715					1720					1725			
Ile	Ile	Lys	Ser	Leu	Leu	Ser	Glu	Asp	Lys	Val	Thr	Val	Gln	Asn	Trp
	1730					1735						1740			
Tyr	Ser	His	Gln	Asp	His	Lys	Ile	Glu	Asn	Ile	Arg	Leu	Ser	Asn	Glu
1745					1750					1755					1760
Gln	Thr	Leu	Val	Ser	Thr	Gln	Val	Glu	Lys	Met	Val	Glu	Ser	Met	Ala
				1765					1770					1775	
Gly	Phe	Ala	Gln	Lys	His	Gly	Gly	Glu	Ile	Ser	Leu	Val	Ser	Leu	Glu
			1780					1785					1790		
Glu	Val	Lys	Gln	Tyr	Ile	Asn	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Leu	*		
		1795					1800					1805			

**REIVINDICACIONES**

1. Una vacuna sub-unitaria para la protección de animales contra la infección por una bacteria de la especie *Actinobacillus pleuropneumoniae*, **caracterizada porque** dicha vacuna comprende toxina ApxIV purificada y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 2. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** comprende un adyuvante.
3. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizada porque** la vacuna está en forma liofilizada.
4. La vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, **caracterizada porque** comprende adicionalmente uno o más antígenos de microorganismos o virus patógenos para el cerdo.
- 10 5. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizada porque** comprende adicionalmente uno o más antígenos seleccionados de entre el grupo que consiste en virus del Síndrome Respiratorio Reproductor Porcino (SRRP), virus de la Pseudorrabia, virus de la Influenza Porcina, Parvovirus porcino, virus de la Gastroenteritis Transmisible, rotavirus, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis* y *Streptococcus suis*.
- 15 6. Un procedimiento de preparación de una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, comprendiendo dicho procedimiento la mezcla de toxina ApxIV purificada con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Un ensayo diagnóstico para distinguir la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en cerdos de la infección por *A. suis* en cerdos, **caracterizado porque** dicho ensayo comprende toxina ApxIV purificada.
8. Un procedimiento de detección de la presencia o ausencia de todos los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en cerdos que comprende las etapas de:
  - 20 - proporcionar toxina ApxIV purificada,
  - proporcionar una muestra de un cerdo, en que la muestra es suero,
  - incubar la toxina ApxIV con la muestra, y
  - detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra la toxina ApxIV.
- 25 9. Un ensayo diagnóstico para distinguir entre cerdos infectados con cepas de campo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y cerdos vacunados con una vacuna que tiene una bacteria viva atenuada de la especie *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en el que la vacuna no produce toxina ApxIV funcional, comprendiendo el ensayo toxina ApxIV purificada revestida sobre los pocillos de una placa de ELISA.
10. El ensayo de diagnóstico de la reivindicación 9 que comprende además un anticuerpo anti-cerdo marcado que puede revelar la presencia o ausencia de anticuerpos contra la toxina ApxIV.

30

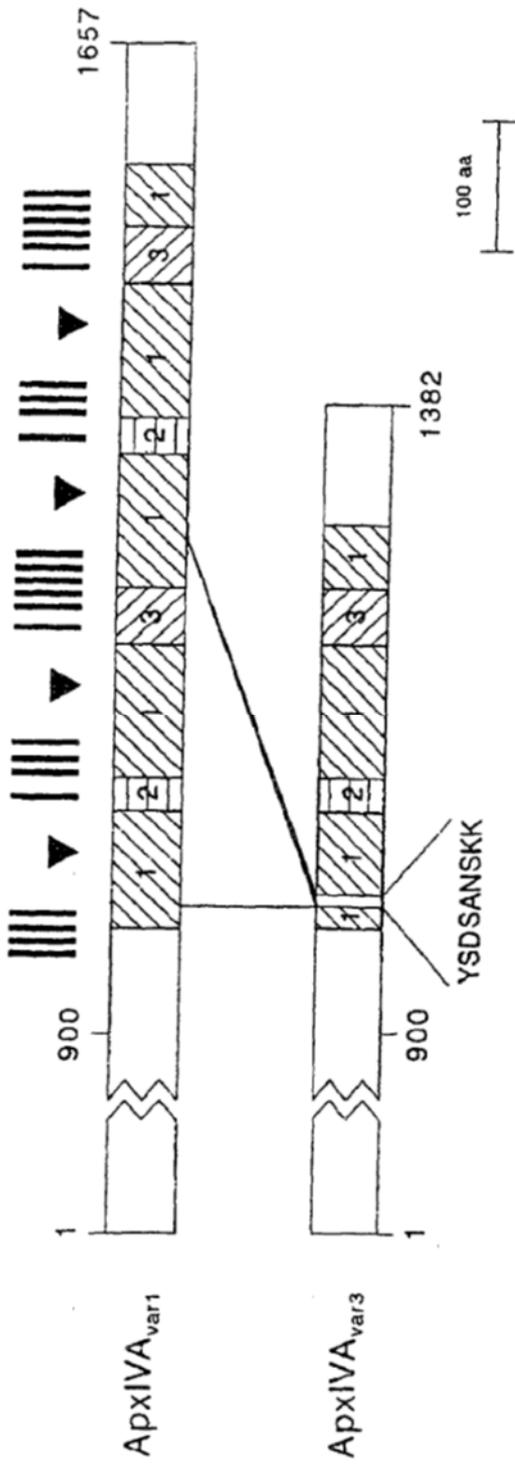


Figura 1

**A**

	1					60
REP1 <sub>var1</sub> :A	.....	.YGADTYIFS	KHGGQDIVYE	DTNNDNRARD	IDTLKFTDVN	YAEVKFRRVD
REP1 <sub>var1</sub> :B	GGKGNLILRG	GYGADTYIFS	KHGGQDIVYE	DTNNDNRARD	IDTLKFTDVN	YAEVKFRRVD
REP1 <sub>var1</sub> :C	GGKGNLILRG	GYGADTYIFS	KHGGQDIVYE	DTNNDNRARD	IDTLKFTDVN	YAEVKFRRVD
REP1 <sub>var1</sub> :D	GGKGNLILRG	GYGADTYIFS	KHGGQDIVYE	DTNNDNRARD	IDTLKFTD..	.....
REP1 <sub>var1</sub> :E	GGKGNLILRG	GYGADTYIFS	KHGGQDIVYE	DTNNDNRARD	IDTLKFTD..	.....
REP1 <sub>var1</sub> :A	.....	.YGADTYIFS	KHGGQDIVYE	.....	.....	.....
REP1 <sub>var1</sub> :B	.....	.....	.....	.....	D IDTLKFTDVN	YAEVKFRRVD
REP1 <sub>var1</sub> :C	GGKGNLILRG	GYGADTYIFS	KHGGQDIVYE	DTNNDNRARD	IDTLKFTDVN	YAEVKFRRVD
REP1 <sub>var1</sub> :D	GGKGNLILRG	GYGADTYIFS	KHGGQDIVYE	DTNNDNRARD	IDTLKFTD..	.....

	61					102
REP1 <sub>var1</sub> :A	NDLMLFGYHD	TDSVTVKSFY	SHVDYQFDKL	EFADRSITRD	EL	
REP1 <sub>var1</sub> :B	NDLMLFGYHD	TDSVTIKSFY	NHVDYQFDKL	EFADRSITRD	EL	
REP1 <sub>var1</sub> :C	NDLMLFGYHD	TDSVTVKSFY	SHVDYQFDKL	EFADRSITRD	EL	
REP1 <sub>var1</sub> :D	NDLMLFGYHD	TDSVTIKSFY	NHVDYQFDKL	EFADRSITRD	EL	
REP1 <sub>var1</sub> :E	.....	.....	.....	.....	.....	.....
REP1 <sub>var1</sub> :A	.....	.....	.....	.....	.....	.....
REP1 <sub>var1</sub> :B	NDLMLFGYHD	TDSVTVKSFY	SHVDYQFDKL	EFADRSITRD	EL	
REP1 <sub>var1</sub> :C	NDLMLFGYHD	TDSVTIKSFY	NHVDYQFDKL	EFADRSITRD	EL	
REP1 <sub>var1</sub> :D	.....	.....	.....	.....	.....	.....

**B**

	1			27
REP2 <sub>var1</sub> :A	IKAGLHLYGT	DGDDIKDHA	DWDSILE	
REP2 <sub>var1</sub> :B	IKAGLHLYGT	DGDDIKDHA	DWDSILE	
REP2 <sub>var1</sub> :A	IKAGLHLYGT	DGDDIKDHA	DWDSIVE	

**C**

	1				44
REP3 <sub>var1</sub> :A	GKQGMALFGT	DGDDNINDWG	RNSVIDAGAG	NDTVNGGNGD	DTLI
REP3 <sub>var1</sub> :B	GKQGMALFGT	DGDDNINDWG	RNSVIDAGAG	NDTVNGGNGD	DTLI
REP3 <sub>var1</sub> :A	GKQGMALFGT	DGDDNINDWG	RNSVIDAGAG	NDTVNGGNGD	DTLI

Figura 2

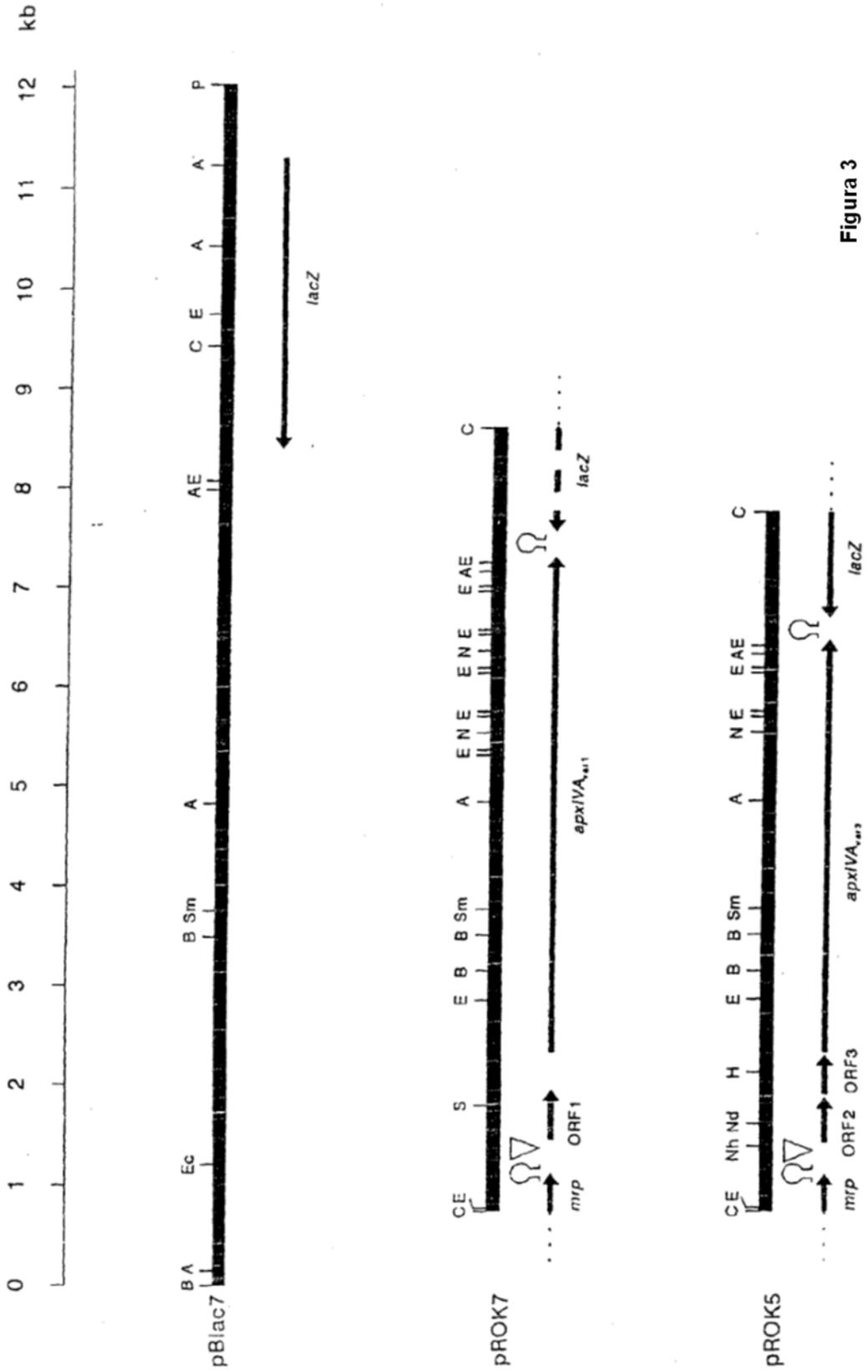
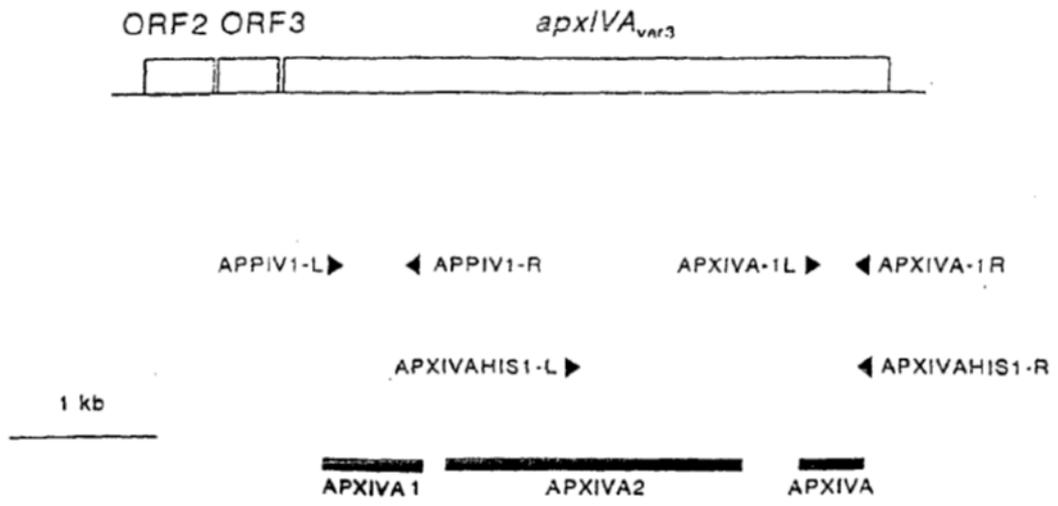


Figura 3



**Figura 4**

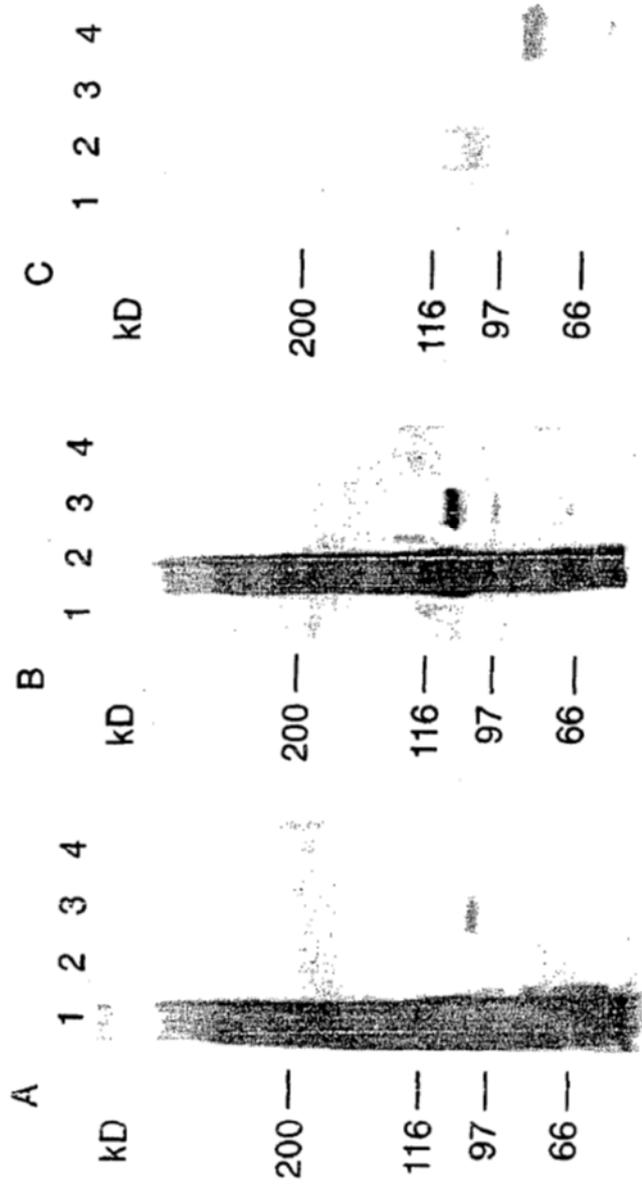
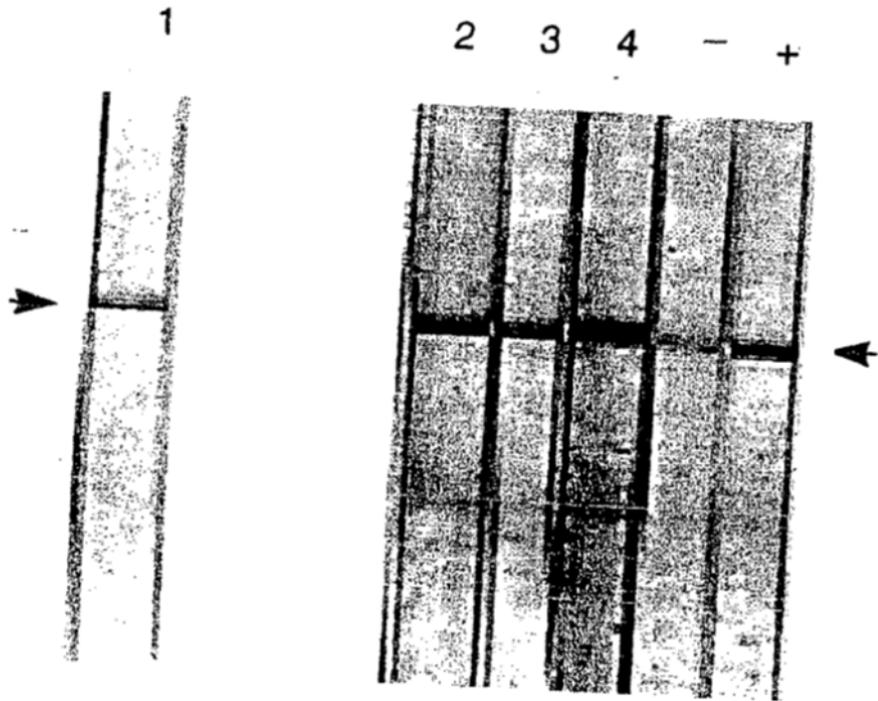


Figura 5



**Figura 6**

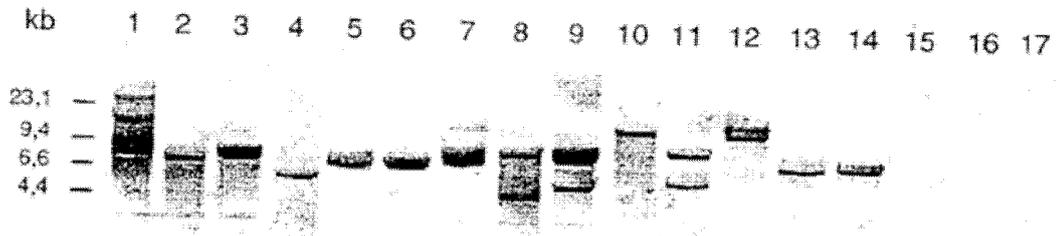


Figura 7

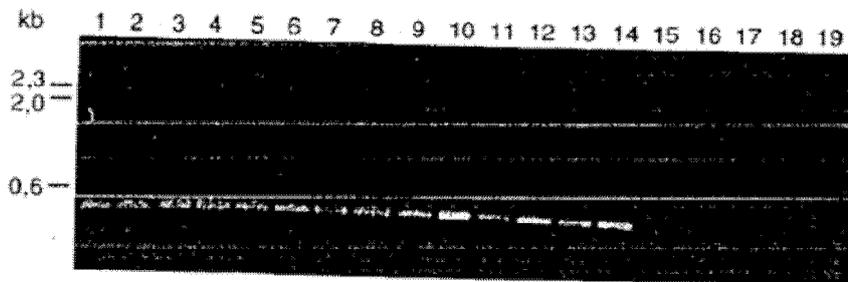


Figura 8