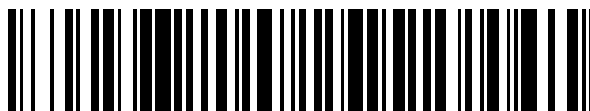


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 010**

51 Int. Cl.:

C07K 14/24

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2006** **PCT/US2006/002474**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.07.2006** **WO06079076**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2006** **E 06719369 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016** **EP 1848732**

54 Título: **Polipéptidos de Yersinia spp. y métodos de uso**

30 Prioridad:

21.01.2005 US 646106 P

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

28.10.2016

73 Titular/es:

**EPITOPIX, LLC (100.0%)
3735 COUNTY ROAD 5
WILLMAR, MN 56201, US**

72 Inventor/es:

**EMERY, DARYLL A.;
STRAUB, DARREN E. y
WONDERLING, LAURA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 588 010 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de *Yersinia* spp. y métodos de uso

5 Antecedentes

Existen tres especies de *Yersinia* que son patógenas para los seres humanos: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, y *Y. enterocolitica*. La *Y. pestis* es el agente causal de la peste, mientras que la *Y. pseudotuberculosis* y serovares específicos de *Y. enterocolitica* producen enfermedades intestinales. Otras especies de *Yersinia*, que incluyen, *Y. rohdei*, *Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, y *Y. moolaretti*, se consideran patógenos oportunistas tipo enterocolitica con la capacidad para producir enfermedad diarreica en individuos susceptibles (Agbonlahor, J Clin Microbiol, 23, 891-6, (1986), Cafferkey, et al., J Hosp Infect, 24, 109-15, (1993), Loftus, et al., Dig Dis Sci, 47, 2805-10, (2002)). Las *Yersinia* pueden infectar también otras especies animales produciendo varias enfermedades. La mayoría de las especies animales silvestres y domésticas de mamíferos son propensas a infecciones por la *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* enteropatógenas, aunque la mayoría de estas infecciones son subclínicas y dichos animales habitualmente solo sirven de portadores asintomáticos de los agentes patógenos para la transmisión a los seres humanos (Fantasia, et al., J Clin Microbiol, 22, 314-5, (1985), Fantasia, et al., Vet Rec, 132, 532-4, (1993), Fukushima, et al., J Clin Microbiol, 18, 981-2, (1983), Kageyama, et al., J Med Primatol, 31, 129-35, (2002), Kato, et al., Appl Environ Microbiol, 49, 198-200, (1985), Poelma, et al., Acta Zool Pathol Antwerp, 3-9, (1977), Shayegani, et al., Appl Environ Microbiol, 52, 420-4, (1986), Yanagawa, et al., Microbiol Immunol, 22, 643-6, (1978)). Sin embargo, hay informes de que las *Yersinia* enteropatógenas se han asociado a enfermedad diarreica y malestar general en animales domésticos tales como ovejas, ganado bovino, cabras, cerdos, perros, aves y ciervos de granja (Jerrett, I. V., et al., Aust Vet J, 67, 212-4, (1990), Slee, K. J., et al., Aust Vet J, 65, 271-5, (1988), Slee, K. J. y C. Button, Aust Vet J, 67, 396-8, (1990), Slee, K. J. y C. Button, Aust Vet J, 67, 320-2, (1990), Zheng, X. B., J Appl Bacteriol, 62, 521-5, (1987)). La *Y. pestis* puede producir enfermedades en varias especies de roedores así como en primates no humanos (Davis, K. J., et al., Arch Pathol Lab Med, 120, 156-63, (1996), Meyer, K. F., et al., J Infect Dis, 129, Suppl: S85-12, (1974)). La *Y. pestis* también se asocia a infecciones potencialmente graves en gatos domésticos (Gasper, P. W., et al., J Med Entomol, 30, 20-6, (1993)) y se ha informado de unos cuantos casos de infección por *Y. pestis* en perros (Orloski, K. A. y M. Eidson, J Am Vet Med Assoc, 207, 316-8, (1995)). Además, la *Yersinia ruckeri* es un agente patógeno en peces, que produce la enfermedad de boca roja en los salmónidos (Furones, M. D., et al., Ann. Rev. Fish Dis., 3, 105-125, (1993)).

La peste es indudablemente una de las enfermedades infecciosas agudas más devastadoras registradas en la historia del hombre, se estima que ha matado entre 100 y 200 millones de personas en todo el mundo (Perry, R. D. y J. D. Fetherston, Clin Microbiol Rev, 10, 35-66, (1997)). En los últimos años los brotes de peste han sido relativamente poco comunes en los EE. UU. y otros países industrializados, aunque existen focos endémicos en todos los continentes excepto en Australia. El seguimiento mundial indica entre 2000 y 5000 casos anuales de peste comunicados en los últimos varios años, aunque los epidemiólogos sospechan que muchos casos humanos de peste no se comunican. Los brotes de *Y. pseudotuberculosis* son extremadamente raros, y han ocurrido primariamente en Finlandia, Japón, y en la antigua Unión Soviética (Inoue, M., et al., Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [B], 186, 504-511, (1988), Nuorti, J. P., et al., J Infect Dis, 189, 766-774, (2004), Rodina, L. V., et al., Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 116-118, (1998), Toyokawa, Y., et al., Kansenshogaku Zasshi, 67, 36-44, (1993)). Se asume que la mayoría de las infecciones por *Y. pseudotuberculosis* se transmiten por la vía oral-fecal; sin embargo, no se ha identificado un vehículo de transmisión en muchos de los casos. En los Estados Unidos, las infecciones por *Y. enterocolitica* son más comunes que las de *Y. pseudotuberculosis*, y se asocian normalmente al consumo de productos de cerdo contaminados (Ray, S. M., et al., Clin Infect Dis, 38 Suppl 3, S181-189, (2004)). La incidencia de la enfermedad en seres humanos producida por la *Y. enterocolitica* en los EE. UU. es difícil de determinar, simplemente porque las infecciones asociadas a este organismo normalmente son autolimitantes y porque las insuficientes técnicas de detección tienen una capacidad limitada para diagnosticar correctamente el agente causal. Sin embargo, la vigilancia de FoodNet estimaba entre 1996-1999 aproximadamente 1 caso de infección por *Y. enterocolitica* por 100.000 en los Estados Unidos (Ray, S. M., et al., Clin Infect Dis, 38 Suppl 3, S181-189, (2004)).

La peste es una enfermedad infecciosa de los animales y seres humanos que tiene componentes de transmisión tanto enzoóticos como epizooticos. El medio de transmisión que se produce más naturalmente es a partir de los reservorios roedores infectados a las pulgas, que sirven de vectores naturales para la transmisión a los seres humanos. Sin embargo, la transmisión de ser humano a ser humano también se puede producir por el contacto directo o la inhalación de gotículas contaminadas (forma neumónica). No obstante, en las infecciones naturales la *Y. pestis* entra en la corriente sanguínea de los seres humanos por vía subcutánea, por la que viaja hacia los ganglios linfáticos y empieza a multiplicarse. Las manifestaciones clínicas de la peste incluyen grandes masas hinchadas cerca de los ganglios linfáticos, a los que se hace referencia como bubones. Ocasionalmente, la *Y. pestis* se multiplica rápidamente en la corriente sanguínea, lo que induce una septicemia con un malestar general concomitante que incluye fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, y ocasionalmente molestias gastrointestinales. Estos síntomas, precozmente se diagnostican erróneamente, y por lo tanto, la terapia se administra demasiado tarde para una intervención eficaz. La infección septicémica por *Y. pestis* tiene una tasa de mortalidad del 50 % (Perry, R. D. y J. D. Fetherston, Clin Microbiol Rev, 10, 35-66, (1997)), y puede dar lugar a infección pulmonar. La forma neumónica

de la peste es extremadamente infecciosa por vía de aerosol y se caracteriza por una rápida aparición de la enfermedad y una tasa de mortalidad cercana al 100 %. Por lo tanto, aunque las terapias con antibióticos están disponibles y son eficaces si se administran precozmente, la aparición rápida de la peste neumónica y el diagnóstico erróneo de la peste septicémica son los obstáculos principales en el tratamiento de la enfermedad.

La *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* se consideran agentes enteropatógenos ya que la mayoría de las infecciones humanas se transmiten por vía fecal-oral y se limitan al tracto gastrointestinal. En un huésped normal, la *Y. enterocolitica* produce una enfermedad diarreica, que se acompaña de fiebre y un dolor en el cuadrante inferior que se parece a la apendicitis. La *Y. pseudotuberculosis*, normalmente no produce enfermedad diarreica, y es más probable que produzca linfadenitis mesentérica que se puede diagnosticar erróneamente como apendicitis. Después de la ingestión, ambos organismos atacan los tejidos linfoides intestinales y atraviesan la capa mucosa, donde posteriormente se multiplican en los ganglios linfáticos mesentéricos y migran al bazo e hígado (Lian, C. J., et al., J Med Microbiol, 24, 219-226, (1987), Une, T., Microbiol Immunol, 21, 505-516, (1977)). La *Y. pseudotuberculosis* y algunos serotipos de *Y. enterocolitica* también se pueden diseminar por el sistema vascular y producir casos fatales de septicemia (Bottone, E. J., Clin. Microbiol. Rev., 10, 257-276, (1997), Lenz, T., et al., J Infect Dis, 150, 963, (1984)), aunque estas infecciones más invasivas se limitan normalmente a individuos susceptibles. La *Y. enterocolitica* también se ha asociado a septicemia después de transfusiones sanguíneas; en estos casos, el suministro de sangre estaba contaminado con el organismo, que puede sobrevivir y crecer a temperaturas de refrigeración (Natkin, J. B., KG, Clin Lab Med, 19, 523-536, (1999)). Además, las infecciones intestinales por *Yersinia* pueden dar lugar a secuelas retardadas tales como artritis reactiva y tiroiditis (Bottone, E. J., Clin. Microbiol. Rev., 10, 257-276, (1997), Gaston, J. S., et al., Arthritis Rheum., 42, 2239-2242, (1999), Taccetti, G., et al., Clin Exp Rheumatol, 12, 681-684, (1994)). No se ha demostrado que la terapia con antibióticos reduzca la gravedad o duración de enfermedad gastrointestinal producida por estos dos agentes patógenos (Hoogkamp-Korstanje, J., J Antimicrob Chemother, 20, 123, (1987), Pai, C. H., et al., J Pediatr, 104, 308-11, (1984)). Sin embargo, un huésped susceptible se trata normalmente con antibióticos para evitar manifestaciones clínicas más serias de la enfermedad. La septicemia producida por estos agentes enteropatógenos también se trata en general con antibióticos, y dichas terapias frecuentemente son satisfactorias contra *Y. enterocolitica* (Gayraud, M., et al., Clin Infect Dis, 17, 405-10, (1993)). Por el contrario, la terapia con antibióticos tradicionalmente ha sido menos eficaz en pacientes cuando la septicemia está producida por *Y. pseudotuberculosis*, y la tasa de mortalidad asociada a la septicemia por *Y. pseudotuberculosis* aproximadamente es del 75 % (Natkin, J. B., KG, Clin Lab Med, 19, 523-536, (1999)).

Aunque la infección natural por *Y. pestis* es rara en este país, existe el temor de que el organismo se convierta en un agente de bioterrorismo. Como herramienta de infección en masa deliberada, el organismo *Y. pestis* es un candidato primordial debido a varias características. Primero, el organismo es altamente infeccioso cuando se disemina por aerosol, un método conveniente de diseminación en masa. Segundo, hay una alta tasa de mortalidad asociada a la infección por *Y. pestis* que no se trata, y la forma neumónica de peste se distingue por una rápida aparición de los síntomas que se pueden reconocer demasiado tarde para una intervención eficaz. Finalmente, la *Y. pestis*, tiene un sistema genético bien definido, por lo tanto es relativamente fácil modificar genéticamente cepas resistentes a los antibióticos.

Se han investigado varias vacunas para la peste con distintos niveles de eficacia y seguridad. Una de las vacunas más antiguas consistían en células enteras de *Y. pestis* destruidas (KWC); este tipo de vacuna se utilizó por primera vez a finales de los 90 y confería una protección contra la forma bubónica de la peste. Sin embargo, hay pruebas de que las inmunizaciones con KWC ofrecen poca protección contra la peste neumónica (Cohen, R. J. y J. L. Stockard, JAMA, 202, 365-366, (1967), Meyer, K. F., Bull World Health Organ, 42, 653-666, (1970)), y un inconveniente adicional de estas vacunas es que se necesitan múltiples inyecciones durante varios meses para una inmunidad protectora. Se ha estudiado una cepa atenuada de *Y. pestis*, la cepa EV76, como vacuna viva para la peste. En estudios con ratones, esta vacuna ha demostrado que protege contra desafíos tanto subcutáneos como por inhalación y se necesita solo una dosis para la protección (Russell, P., et al., Vaccine, 13, 1551-1556, (1995)). Sin embargo, la cepa EV76 no es totalmente avirulenta, produciendo la muerte en aproximadamente un 1 % de los ratones vacunados (Russell, P., et al., Vaccine, 13, 1551-1556, (1995)). De manera interesante, se han hecho varios intentos infructuosos para crear una cepa avirulenta de *Y. pestis* adecuada para su uso como vacuna viva (Titball, R. W. y E. D. Williamson, Vaccine, 19, 4175-4184, (2001)).

Las subunidades vacunales se consideran el tipo más prometedor de vacuna para la prevención segura y eficaz de la peste, primeramente debido a que no se teme que tengan efectos adversos en un huésped humano. Se han ensayado varias proteínas de superficie asociadas a la virulencia de *Yersinia* en cuanto a su inmunogenicidad; todas estas proteínas inducían una respuesta de anticuerpo pero solo la F1 de la cápsula y el antígeno V secretado daban lugar a una buena protección contra un desafío (Titball, R. W. y E. D. Williamson, Vaccine, 19, 4175-4184, (2001)). Tanto la F1 como el antígeno V proporcionan protección como antígenos individuales en modelos animales, aunque la combinación de los dos agentes proporciona una protección superior. Muchos estudios recientes han ensayado las vacunas F1/V formuladas con adyuvantes alternativos en un intento para encontrar el mejor sistema de suministro de los antígenos F1 y V (Alpar, H. O., et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 51, 173-201, (2001), Eyles, J. E., et al., J Control Release, 63, 191-200, (2000), Jones, S. M., et al., Vaccine, 19, 358-366, (2001), Reddin, K. M., et al., Vaccine, 16, 761-767, (1998), Williamson, E. D., et al., Vaccine, 19, 566-571, (2000), Williamson, E. D., et al., Vaccine, 14, 1613-9, (1996)).

Otras estrategias innovadoras han utilizado cepas de *Salmonella* atenuadas como portadores vacunales para los antígenos de *Y. pestis*. Cuando se utilizó una *Salmonella* aroA mutante que expresaba una proteína de fusión F1/V como cepa vacunal, el 86 % de los ratones sobrevivían a una dosis letal de desafío posterior de *Y. pestis* (Leary, S. E., et al., Microb Pathog, 23, 167-179, (1997)). De manera similar, una vacuna que consistía en un plásmido de ADN que albergaba un gen que codificaba una F1 de cápsula truncada proporcionaba un 80 a 100 % de protección en diferentes cepas de ratones (Grosfeld, H., et al., Infect Immun, 71, 374-383, (2003)). Además, un grupo de investigadores mapearon los epítomos del antígeno F1 para células B y T y utilizaban los péptidos inmunorreactivos en formulaciones vacunales (Sabhnani, L., et al., FEMS Immunol Med Microbiol, 38, 215-29, (2003)). Sus resultados indicaban que una mezcla de péptidos epitópicos protegían al 83 % de los ratones contra una dosis letal de *Y. pestis*.

Al contrario de la búsqueda extensiva de vacunas protectoras contra la peste, se han enfocado muy pocos esfuerzos de investigación en la prevención de infecciones por especies de *Yersinia* enteropatógenas. Sin embargo, unos cuantos estudios han demostrado resultados prometedores. Por ejemplo, la administración de cepas de *Y. enterocolitica* atenuada administradas por vía oral a ratones presentaba efectos protectores, reduciendo la carga bacteriana en el bazo y el hígado tras el desafío oral (Igwe, E. I., et al., Infect Immun, 67, 5500-5507, (1999)). Sin embargo, estas cepas se modificaron primariamente como portadores vacunales vivos orales, y no se han comunicado ensayos adicionales de estas cepas para la prevención de la yersiniosis. Se demostró que dos subunidades vacunales eran eficaces en modelos animales de infección. La primera consistía en extractos celulares de *Y. enterocolitica* y se administraba por vía intranasal a los ratones. Los ratones inmunizados demostraron un mayor aclaramiento de los pulmones de una dosis de desafío intranasal de *Y. enterocolitica* (Di Genaro, M. S., et al., Microbiol. Immunol., 42, 781-788, (1998)). Una segunda subunidad vacunal se formuló utilizando una proteína de choque térmico HSP60 de *Y. enterocolitica* adyuvada con interleucina-12 (Noll, A. y Autenriethlb, Infect Immun, 64, 2955-2961, (1996)). Las inmunizaciones con esta vacuna daban como resultado significativamente menos bacterias en los bazo de los ratones después del desafío, lo que ilustraba un efecto protector. Un trabajo adicional utilizaba una vacuna que consistía en ADN que codificaba la HSP60 de *Y. enterocolitica* en inmunizaciones intramusculares de ratones (Noll, A., et al., Eur J Immunol, 29, 986-996, (1999)). Este estudio demostraba que el ARNm de hsp60 estaba presente en varios tejidos del huésped después de la inmunización, pero la protección contra el desafío por *Y. enterocolitica* era limitado en el bazo y no se observó protección en la mucosa intestinal.

Las similitudes y diferencias entre las enfermedades producidas por las especies patógenas de *Yersinia* han sido el foco de muchas investigaciones en la pasada década. Esto se debe parcialmente a varias observaciones que sugieren que las *Yersinia* patógenas proporcionan un modelo útil de evolución patógena. Primero, los estudios de hibridación de ADN y las comparaciones genómicas recientes de cepas de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* con secuencias completas han indicado que estos dos agentes patógenos están altamente relacionados (Chain, P. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 13826-13831, (2004), Ibrahim, A., et al., FEMS Microbiol Lett, 114, 173-177, (1993)), y se ha estimado que *Y. pestis* evolucionó a partir de *Y. pseudotuberculosis*, recientemente, hace unos 1.500 a 20.000 años (Achtman, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14043-14048, (1999)). Sin embargo, a pesar de su estrecha relación evolutiva, la *Y. pseudotuberculosis* y la *Y. pestis* producen enfermedades muy diferentes en los seres humanos. Adicionalmente, estudios de secuenciación parcial e hibridación de ARN 16s sugieren que la *Y. enterocolitica* está relacionada más distantemente con las otras especies patógenas de este género (Ibrahim, A., et al., FEMS Microbiol Lett, 114, 173-177, (1993), Moore, R. L. y R. R. Brubaker, Int J Syst Bacteriol, 25, 336-339, (1975)), aunque la *Y. enterocolitica* produce infecciones gastrointestinales similares a las que se observan con la *Y. pseudotuberculosis*. Las investigaciones recientes se han enfocado por lo tanto en los genes de virulencia de las tres especies patógenas de *Yersinia* en un intento para aclarar los diferentes mecanismos que emplean para producir la enfermedad. Los modelos con ratones han sido particularmente instructivos en el estudio de la patogénesis de *Yersinia*, ya que las tres especies producen enfermedades similares en ratones cuando se inyectan por vía intravenosa, y se pueden simular eficazmente infecciones más naturales por medio de vías de desafío orales y neumónicas en ratones.

Pocos factores de virulencia son únicos para *Y. pestis*. Estos incluyen las proteínas codificadas en los plásmidos de *Y. pestis* pPCP y pMT, plásmidos que no se encuentran en *Y. enterocolitica* o *Y. pseudotuberculosis*. El plásmido pPCP codifica el activador del plasminógeno, una proteína que está implicada en la rápida diseminación de las bacterias en tejidos de huéspedes mamíferos tras la inyección subcutánea (Sodeinde, O. A., et al., Science, 258, 1004-1007, (1992)). El plásmido pMT alberga al menos dos genes que ayudan a la infección de huéspedes no humanos. El gen *caf1* codificado por pMT es necesario para el ensamblaje de la F1 de la cápsula, un factor que inhibe la fagocitosis en el huésped murino pero que no es necesario para la virulencia en primates (Friedlander, A. M., et al., Clin. Infect. Dis., 21 Suppl 2, S 178-181, (1995)). La toxina murina también está codificada en el plásmido pMT, y se cree que promueve la supervivencia en la pulga aunque no es un factor de virulencia necesario en huéspedes murinos (Hinnebusch, B. J., et al., Science, 296, 733-735, (2002), Hinnebusch, J., et al., Int J Med Microbiol, 290, 483-487, (2000)). Otras diferencias entre las especies son las estructuras de las moléculas de lipopolisacáridos (LPS) producidas por las *Yersinia*. Tanto la *Y. enterocolitica* como la *Y. pseudotuberculosis* expresan cadenas laterales O-antigénicas variables, de las que se ha teorizado que aumentan la supervivencia en el tracto gastrointestinal (Reeves, P., Trends Microbiol., 3, 381-386, (1995)) y pueden inhibir la lisis mediada por complemento durante la enfermedad invasiva (Karlyshev, A. V., et al., Infect Immun, 69, 7810-7819, (2001)). Por el

contrario, la *Y. pestis* tiene un fenotipo de LPS irregular con cadenas laterales no específicas de O debido a mutaciones en genes de biosíntesis de O-antígenicas (Prior, J. G., et al., Microb. Pathog., 30, 48-57, (2001), Skurnik, M. P., A; Ervela, E, Mol Microbiol, 37, 316-330, (2000)).

- 5 De manera interesante, los proyectos de secuenciación genómica revelaban que varios genes presentes en las tres especies patógenas de *Yersinia* han sufrido mutaciones en *Y. pestis* que los hacía no funcionales (Chain, P. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 13826-13831, (2004), Parkhill, J., et al., Nature, 413, 523-527, (2001)). Algunos de ellos codifican proteínas invasinas que funcionan durante la invasión intestinal en las especies enteropatógenas *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*, en un nicho de huéspedes no colonizados por *Y. pestis* (Simonet, M., et al., Infect Immun, 64, 375-379, (1996)). Otros genes que han perdido su función en *Y. pestis* incluyen los implicados en el metabolismo intermedio, y se ha teorizado que estas pérdidas funcionales son parte de la evolución de *Y. pestis* en una especie parásita obligada con incapacidad para vivir fuera del huésped (Parkhill, J., et al., Nature, 413, 523-527, (2001)). La investigación sobre la patogénesis de *Yersinia* se ha enfocado extensamente en el plásmido de virulencia de 70 kb que se encuentra en todas las especies patógenas de *Yersinia*. La secuencia de este plásmido, llamado pYV en *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica* patógenas y pCD1 en *Y. pestis*, se conserva extraordinariamente entre *Y. pseudotuberculosis* y *Y. pestis* (Chain, P. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 13826-13831, (2004)). En consecuencia, la especie de *Y. enterocolitica* relacionada más distantemente alberga un plásmido pYV más divergente, pero las secuencias de genes de virulencia están altamente conservadas entre las tres especies (Hu, P., et al., J Bacteriol, 180, 5192-5202, (1998), Snellings, N. J., et al., Infect Immun, 69, 4627-38, (2001)). El enfoque sobre este plásmido comenzó cuando los experimentos determinaron que el plásmido pYV era absolutamente necesario para la virulencia de *Yersinia*, aunque el plásmido solo no restaura la virulencia en cepas avirulentas específicas lo que sugiere que también están implicados genes no pYV en la patogénesis (Heesemann, J., et al., Infect Immun, 46, 105-110, (1984), Heesemann, J. y R. Laufs, J Bacteriol, 155, 761-767, (1983)). Un gran locus en este plásmido codifica el sistema Ysc-Yop, un sistema de secreción tipo III y sus proteínas efectoras asociadas. Este sistema fue el primer ejemplo de un aparato de secreción tipo III, que se ha identificado actualmente en muchos microbios patógenos de animales y plantas (para una revisión véase, Cornelis, G. R., Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 3, 742-752, (2002)). El sistema de secreción Yop-Ysc incluye proteínas "inyectisomas", proteínas translocadoras efectoras, y proteínas efectoras Yop. La microscopía electrónica y los estudios por marcaje con varios tipos secretorios tipo III revelaron que las proteínas inyectisomas forman un poro que abarca las membranas citoplasmática y externa de las bacterias y protegen una estructura tipo aguja de la superficie celular (Blocker, A., et al., Mol. Microbiol., 39, 652-663, (2001), Kimbrough, T. G. y S. I. Miller, Proc Natl Acad Sci USA, 97, 11008-11013, (2000), Kubori, T., et al., Science, 280, 602-605, (1998), Sukhan, A., et al., J Bacteriol, 183, 1159-1167, (2001)). Las proteínas translocadoras parece que interactúan con macrófagos del huésped y neutrófilos morfonucleares neutrófilos (PMN), formando una estructura tipo poro en la membrana celular del huésped (Neyt, C. y G. R. Cornelis, Mol Microbiol, 33, 971-981, (1999)). El aparato de secreción ensamblado permite entonces que los Yop efectores se transloquen a través de las membranas celulares bacterianas y se inyecten en la célula huésped, donde funcionan interfiriendo varias rutas de respuesta inmunitaria (Bleves, S. y G. R. Cornelis, Microbes Infect., 2, 1451-1460, (2000), Cornelis, G. R., Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 3, 742-752, (2002)). El gen *yadA* también está presente en el plásmido pYV, codificando la adhesina YadA con la capacidad para unirse y adherirse a células eucariotas (Eitel, J. y P. Dersch, Infect Immun, 70, 4880-91, (2002), Skurnik, M., et al., Infect Immun, 62, 1252-61, (1994)). Esta proteína solo parece ser funcional en las *Yersinia* enteropatógenas, ya que una mutación del marco de lectura en el gen *yadA* de la *Y. pestis* lo hace no funcional (Hu, P., et al., J Bacteriol, 180, 5192-5202, (1998)).

- La implicación del hierro en las infecciones por *Yersinia* ha sido bien establecida. Por ejemplo, los pacientes con sobrecarga de hierro tales como los afectados por β -talasemia son altamente susceptibles a las infecciones por *Yersinia* (Farmakis, D., et al., Med. Sci. Monit., 9, RA19-22, (2003)). Además, se podía restaurar la virulencia en *Y. pestis* mutantes avirulentas específicas añadiendo grupos hemo o compuestos que contenían el grupo hemo (Burrows, T. W. y S. Jackson, Br. J. Exp. Pathol., 37, 577-583, (1956)). Estas primeras observaciones con *Yersinia* y otras bacterias llevaron a los investigadores a estudiar algunos de los mecanismos microbianos de la captación de hierro. En huéspedes mamíferos, el hierro disponible está extremadamente limitado; el hierro intracelular forma complejos con proteínas de almacenamiento, y el hierro extracelular está unido a las proteínas transferrina y lactoferrina del huésped. Estas condiciones de restricción del hierro limitan el crecimiento de los invasores microbianos, actuando de esta manera como una barrera defensiva contra la infección. Muchos agentes patógenos se han implicado con la capacidad de buscar hierro en estas condiciones pobres en hierro, "robando" eficazmente el hierro de los compuestos que contienen transferrina y grupos hemo. Uno de los mecanismos más comunes que utilizan las bacterias es la síntesis y secreción de sideróforos, pequeñas moléculas con alta afinidad por el hierro (Andrews, S. C., et al., FEMS Microbiol. Rev., 27, 215-237, (2003)). Los complejos hierro-sideróforo se unen a receptores de la membrana externa en la superficie celular bacteriana, y por medio de la acción concertada de la membrana externa, periplásmica, y proteínas transportadoras ABC, el hierro es transportado dentro de la célula. Los receptores de membrana externa pueden unirse directamente al grupo hemo y compuestos que contienen grupos hemo, buscando el hierro en estas moléculas. El papel de varios sistemas de captación de hierro de *Yersinia* se han aclarado, aunque se han identificado muchos más sistemas posibles pero no se han caracterizado.

- Aunque la *Yersinia* puede utilizar varios sideróforos producidos por otras bacterias y hongos para obtener hierro, la yersiniabactina es el único sideróforo producido por *Yersinia* que se ha detectado (Baumler, A., et al., Zentralbl. Bakteri., 278, 416-424, (1993), Rabsch, W. y G. Winkelmann, Biol Met, 4, 244-250, (1991), Reissbrodt, R. y W.

Rabsch, Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A], 268, 306-317, (1988)). El sistema yersiniabactina está codificado por genes *ybt* presentes en la isla cromosómica de alta patogenicidad (HPI), un locus que se ha asociado a cepas altamente patógenas de *Yersinia* (de Almeida, A. M., et al., Microb. Pathog., 14, 9-21, (1993), Rakin, A., et al., J Bacteriol, 177, 2292-2298, (1995)). Los genes *ybt* codifican proteínas implicadas en la síntesis y secreción del sideróforo yersiniabactina (*ybtS*, *irp1*, *irp2*, *ybtE*, *ybtT*), así como las proteínas citoplasmáticas (*ybtP*, *ybtQ*) y de la membrana externa (*psn/fyuA*) necesarias para la captación de los complejos hierro-yersiniabactina (Carniel, E., Microbes Infect., 3, 561-569, (2001)). Las mutaciones de los genes de la síntesis y/o captación de yersiniabactina daba como resultado la reducción de la virulencia de *Yersinia* en modelos de infección en el ratón (Bearden, S. W., et al., Infect. Immun., 65, 1659-1668, (1997), Brem, D., et al., Microbiology, 147, 1115-1127, (2001), Rakin, A., et al., Mol Microbiol, 13, 253-263, (1994)), lo que indica que este sistema es un factor de virulencia importante en la patogénesis de *Yersinia*. La secuencia de nucleótidos de los genes *ybt* es idéntica al menos en un 97 % entre las tres especies patógenas de *Yersinia* (Carniel, E., Microbes Infect., 3, 561-569, (2001), Chain, P. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 101, 13826-13831, (2004)), y se demostró que los sistemas *ybt* de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* eran intercambiables (Perry, R. D., et al., Microbiology, 145 (Pt 5), 1181-1190, (1999)). Estos análisis indicaron que las funciones de estos homólogos probablemente se conservaban entre las tres especies. Además, se descubrió el HP1 en varias especies patógenas incluyendo algunas cepas de *E. coli*, *Citrobacter* y *Klebsiella* (Bach, S., et al., FEMS Microbiol. Lett., 183, 289-294, (2000)). Las proteínas Ybt que se expresan por estos organismos son bastante similares; además, los anticuerpos que se generan contra varias proteínas Ybt de *Yersinia* reconocen las proteínas correspondientes de los otros agentes patógenos (Bach, S., et al., FEMS Microbiol. Lett., 183, 289-294, (2000), Karch, H., et al., Infect Immun, 67, 5994-6001, (1999)). Estos resultados sugieren que la adquisición del sistema *ybt* es relativamente reciente entre estos agentes patógenos y pueden haber contribuido a los fenotipos invasivos asociados a muchos de estos serotipos.

Se han detectado varios sistemas de captación de hierro independientes de *ybt* en las especies de *Yersinia* que se basan en análisis de mutación, homología con proteínas de adquisición de hierro conocidas, o la presencia de elementos reguladores que responden al hierro. Uno de dichos elementos reguladores es la "caja Fur", una secuencia de nucleótidos que se une a la proteína reguladora Fur cuando forma complejos con el hierro. La unión Fe-Fur reprime la transcripción de promotores corriente abajo, y cuando el hierro se convierte en limitante, el apo-Fur se disocia del ADN y se vuelve a reprimir la transcripción. Fur y sus homólogos se han encontrado en la mayoría de especies de bacterias, y regulan muchos genes además de los sistemas de captación del hierro en diversos organismos (Campoy, S., et al., Microbiology, 148, 1039-1048, (2002), Horsburgh, M. J., et al., Infect Immun, 69, 3744-3754, (2001), Sebastian, S., et al., J Bacteriol, 184, 3965-3974, (2002), Stojiljkovic, I., et al., J Mol Biol, 236, 531-545, (1994)). El análisis del genoma de *Y. pestis* identificaba muchos genes con cajas Fur corriente arriba de sus correspondientes promotores, la mayoría de los cuales codificaban proteínas que tenían una homología con sistemas de captación de hierro conocidos (Panina, E. M., et al., Nucleic Acids Res, 29, 5195-5206, (2001)). Aunque se han estudiado unos cuantos de estos genes en cuanto a su función, parece que varios codifican las proteínas receptoras hierro-sideróforo (*omrA*, *irgA*, *itRA*, *ihaB*, *fauA*) y transportadoras ABC de hierro (*itsTUS*, *itpPTS*). Aunque la *Yersinia* puede utilizar sideróforos producidos por otros organismos, estas proteínas pueden ser responsables de la "piratería de sideróforos" que se observa en *Yersinia*. Dichos métodos de adquisición de hierro son comunes entre agentes patógenos bacterianos.

Varios estudios han aclarado las funciones de otros posibles sistemas de captación de hierro. Por ejemplo, se demostró que el sistema Hmu de *Y. pestis* adquiere hierro por medio de la captación del grupo hemo y compuestos que contenían grupos hemo (Hornung, J. M., et al., Mol Microbiol, 20, 725-39, (1996)). Aunque la capacidad para utilizar el grupo hemo como fuente de hierro parece ventajosa para un agente patógeno, la *Y. pestis* hmu mutante era completamente virulenta en un modelo de infección en el ratón (Thompson, J. M., et al., Infect Immun, 67, 3879-92, (1999)). Se identificó un segundo posible sistema de captación de grupo hemo en *Y. pestis* que se basaba en la homología de secuencia. Los genes *has* de *Y. pestis* son homólogos a los genes de adquisición del grupo hemo dependientes de hemóforos de *Pseudomonas* y *Serratia* (Rossi, M. S., et al., Infect Immun, 69, 6707-6717, (2001)). En estos organismos, se secreta un hemóforo (HasA) que se une al grupo hemo y lo suministra a los receptores de superficie bacterianos (HasR) para transportar el grupo hemo dentro de la célula. Se determinó que la proteína HasA de *Y. pestis* estaba regulada por Fur, se secretaba, y era capaz de unirse al grupo hemo. Sin embargo, una mutación de estos genes no afectaba la virulencia en el ratón, incluso cuando se ensayó una mutante doble (Rossi, M. S., et al., Infect Immun, 69, 6707-6717, (2001)). Por lo tanto, los papeles de supuestos sistemas de captación de grupo hemo en la patogénesis sigue siendo esquivo, y puede indicar que la captación del grupo hemo es más importante durante la infección en huéspedes no murinos.

Las funciones de dos supuestos sistemas ABC de transporte de hierro también se han estudiado en *Yersinia*. El sistema Yfe puede transportar hierro y manganeso en *Y. pestis*, y los mutantes *yfe* demostraban una disminución de la virulencia en modelos de infección en el ratón (Bearden, S. W. y R. D. Perry, Mol. Microbiol., 32, 403-414, (1999)). Las segundas supuestas proteínas ABC transportadoras de hierro están codificadas por genes *yfu*, que se identifican por la presencia de una caja Fur corriente arriba (Gong, S., et al., Infect. Immun., 69, 2829-2837, (2001)). Cuando se expresaban en *E. coli*, los genes *yfu* restauraban el crecimiento en medios pobres en hierro; sin embargo, estudios comparables en *Y. pestis* fallaban en la determinación de un papel de Yfu en la adquisición de hierro, y las mutantes en *yfu* no mostraban una falta de virulencia en el ratón (Gong, S., et al., Infect. Immun., 69, 2829-2837, (2001)).

Sumario de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones y proporciona una composición que se puede obtener por un proceso que comprende: proporcionar un cultivo que comprende una cepa 27729 de la ATCC de *Yersinia enterocolitica*, en el que la *Yersinia enterocolitica* se cultiva a 37 °C en un caldo de soja tríptico (TSB) que comprende 160 µM de 2,2'-dipiridilo; destruir la *Yersinia enterocolitica* para dar lugar a una mezcla que comprende membranas celulares destruidas; solubilizar la mezcla añadiendo a la mezcla un detergente biológico para dar como resultado una preparación que comprende proteínas solubilizadas y no solubilizadas; y aislar los polipéptidos no solubilizados. La presente invención proporciona también una composición que se puede obtener por un proceso que comprende: proporcionar un cultivo que comprende una cepa KIM6+ de *Yersinia pestis*, en el que la *Yersinia pestis* se cultiva a 37 °C en medio TSB que comprende 160 µM de 2,2'-dipiridilo; destruir la *Yersinia pestis* para dar lugar a una mezcla que comprende membranas celulares destruidas; solubilizar la mezcla añadiendo a la mezcla un detergente biológico para dar como resultado una preparación que comprende proteínas solubilizadas y no solubilizadas; y aislar los polipéptidos no solubilizados.

La presente divulgación también proporciona una composición que incluye dos polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 83 kDa, 70 kDa, 66 kDa, o una combinación de los mismos, y dos polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 40 kDa, 38 kDa, o 37 kDa, o una combinación de los mismos, en los que el peso molecular se determina por electroforesis en un gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida. Los polipéptidos que tienen un peso molecular de 83 kDa, 70 kDa, o 66 kDa son aislables a partir de *Yersinia enterocolitica* cuando se incubaba en medios que contenían un quelante del hierro y no aislables cuando se cultivaba en un medio sin quelante de hierro. En algunas divulgaciones, la composición puede incluir dos polipéptidos diferentes de 83 kDa aislables de una *Y. enterocolitica* cuando se incubaba en un medio que comprende un quelante del hierro. La composición protege un ratón contra el desafío con la cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica*. La composición puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los polipéptidos pueden ser aislables, o en algunos aspectos se aíslan de la cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica*. La composición puede incluir además un polipéptido aislado que tenga un peso molecular de 268 kDa, 92 kDa, 54 kDa, 45 kDa, 31 kDa, 28 kDa, o una combinación de los mismos y que sea aislable de *Y. enterocolitica* cuando se cultiva en el medio sin el quelante del hierro.

La presente divulgación también proporciona una composición que incluye dos polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 83 kDa, 70 kDa, 66 kDa, o una combinación de los mismos, y dos polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 268 kDa, 79 kDa, o 45 kDa, o una combinación de los mismos, en los que el peso molecular se determina por electroforesis sobre un gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida. Los polipéptidos que tienen un peso molecular de 83 kDa, 70 kDa, o 66 kDa son aislables a partir de una *Yersinia enterocolitica* cuando se incubaba en un medio que comprende un quelante del hierro y no aislables cuando se cultivaba en un medio sin el quelante de hierro. La composición protege un ratón contra un desafío con la cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica*. La composición puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los polipéptidos pueden ser aislables, o en algunos aspectos se aíslan a partir de una cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica*.

La presente divulgación proporciona una composición que incluye los polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 268 kDa, 92 kDa, 83 kDa, 79 kDa, 70 kDa, 66 kDa, 54 kDa, 45 kDa, 40 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 31 kDa, y 28 kDa, en los que se determina el peso molecular por electroforesis en dodecil sulfato sódico-poliacrilamida. Los polipéptidos son aislables a partir de *Yersinia enterocolitica*, y la composición protege un ratón contra un desafío con la cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica*. Los polipéptidos pueden ser aislables, o en algunos aspectos se aíslan de la cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica*.

La presente divulgación proporciona una composición que incluye dos polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 94 kDa, 88 kDa, 77 kDa, 73 kDa, o 64 kDa, o una combinación de los mismos, y dos polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 46 kDa, 37 kDa, o una combinación de los mismos, en los que el peso molecular se determina por electroforesis en un gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida. Los polipéptidos que tienen un peso molecular de 94 kDa, 88 kDa, 77 kDa, 73 kDa, o 64 kDa son aislables a partir de *Yersinia pestis* cuando se incubaba en medios que comprenden un quelante del hierro y no aislables cuando se cultivaba en un medio sin quelante del hierro. La composición protege un ratón contra un desafío con la cepa KIM6+ de *Y. pestis*. La composición puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los polipéptidos pueden ser aislables, o en algunos aspectos aislarse a partir de la cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica*. La composición puede incluir además un polipéptido aislable que tiene un peso molecular de 254 kDa, 46 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 31 kDa, 28 kDa, o 20 kDa, y es aislable a partir de una *Y. pestis* cuando se cultivaba en los medios sin quelante de hierro. Los polipéptidos pueden ser aislables, o en algunos aspectos se aíslan de la cepa KIM6+ de *Y. pestis*.

La presente divulgación también proporciona una composición que incluye dos polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 94 kDa, 88 kDa, 77 kDa, 73 kDa, o 64 kDa, o una combinación de los mismos, y dos polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 254 kDa, 46 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 31 kDa, 28 kDa, 20 kDa, o una combinación de los mismos, en los que el peso molecular se determina por electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida. Los polipéptidos que tienen un peso molecular de 94 kDa, 88 kDa, 77 kDa, 73 kDa, o 64 kDa, son aislables a partir de *Yersinia pestis* cuando se incubaba en medios que comprenden un quelante del hierro

y no aislables cuando se cultiva en los medios sin quelantes del hierro. La composición protege un ratón de un desafío con la cepa KIM6+ de *Y. pestis*. La composición puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los polipéptidos pueden ser aislables, o en algunos aspectos se aíslan de la cepa KIM6+ de *Y. pestis*.

La presente divulgación proporciona además una composición que incluye polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 254 kDa, 104 kDa, 99 kDa, 94 kDa, 88 kDa, 77 kDa, 73 kDa, 64 kDa, 46 kDa, 44 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 31 kDa, 28 kDa, y 20 kDa en los que el peso molecular se determina por electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida. Los polipéptidos son aislables a partir de *Yersinia pestis*, y la composición protege un ratón contra un desafío con la cepa KIM6+ de *Y. pestis*. Los polipéptidos pueden ser aislables, o en algunos aspectos se aíslan de la cepa KIM6+ de *Y. pestis*.

La presente invención proporciona un método para tratar una infección en un sujeto que incluye la administración de una cantidad eficaz de una composición de la presente invención a un sujeto que está en riesgo de tener una infección producida por una *Yersinia* spp. El sujeto puede ser un animal, tal como un pez, o un mamífero, tal como un ser humano. La *Yersinia* spp. puede ser por ejemplo, *Y. enterocolitica* o *Y. pestis*, o *Y. ruckeri*.

La presente divulgación también proporciona un método para tratar un síntoma en un sujeto que incluye la administración de una cantidad eficaz de una composición de la presente invención a un sujeto que tiene una infección producida por *Yersinia* spp. El sujeto puede ser un animal, tal como un pez, o un mamífero, tal como un ser humano. La *Yersinia* spp. puede ser, por ejemplo, *Y. enterocolitica*, o *Y. pestis*, o *Y. ruckeri*. El síntoma puede ser, por ejemplo, diarrea, enteritis, peste, enfermedad de la boca roja, o una combinación de los mismos.

La presente divulgación se proporciona además para tratar una infección en un sujeto que incluye la administración de una cantidad eficaz de una composición a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una infección producida por una *Yersinia* spp., en el que la composición incluye un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de la presente divulgación. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. En un ejemplo, el anticuerpo se une específicamente a dos polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 83 kDa, 70 kDa, 66 kDa, o una combinación de los mismos, en el que los polipéptidos son aislables de una *Yersinia enterocolitica* cuando se incuba en medios que comprenden un quelante del hierro y no aislables cuando se cultiva en los medios sin quelante del hierro. En otro ejemplo, el anticuerpo se une específicamente a dos polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 94 kDa, 88 kDa, 77 kDa, 73 kDa, o 64 kDa, o una combinación de los mismos, en los que los polipéptidos son aislables de *Yersinia pestis* cuando se incuba en medios que comprenden un quelante del hierro y no aislables cuando se cultiva en los medios sin el quelante del hierro.

La presente divulgación también proporciona un método para tratar un síntoma en un sujeto que incluye la administración de una cantidad eficaz de una composición al sujeto que tiene una infección producida por una *Yersinia* spp., en el que la composición incluye un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de la presente divulgación. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. En un ejemplo, el anticuerpo se une específicamente a dos polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 83 kDa, 70 kDa, 66 kDa, o una combinación de los mismos, en los que el peso molecular se determina por electroforesis en un gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida, en el que los polipéptidos son aislables a partir de *Yersinia enterocolitica* cuando se incuba en medios que comprenden un quelante del hierro y no aislables cuando se cultiva en los medios sin el quelante del hierro. En otro ejemplo, el anticuerpo se une específicamente a dos polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 94 kDa, 88 kDa, 77 kDa, 73 kDa, o 64 kDa, o una combinación de los mismos, en los que los polipéptidos son aislables de una *Yersinia pestis* cuando se incuba en medios que comprenden un quelante del hierro y no aislables cuando se cultiva en el medio sin el quelante de hierro.

La presente divulgación proporciona además kits para la detección de anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de la presente divulgación. El kit incluye un polipéptido aislado de la presente divulgación, y un reactivo que detecta un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido. El polipéptido y el reactivo están presentes normalmente en envases separados. En un ejemplo, el polipéptido puede tener un peso molecular de 83 kDa, 70 kDa, o 66 kDa, o una combinación de los mismos, en el que el polipéptido es aislable de una *Yersinia enterocolitica* cuando se incuba en medios que comprenden un quelante del hierro y no aislables cuando se cultiva en medios sin el quelante del hierro. En otro ejemplo, el polipéptido puede tener un peso molecular de 94 kDa, 88 kDa, 77 kDa, 73 kDa, o 64 kDa, o una combinación de los mismos, en los que el polipéptido es aislable de una *Yersinia pestis* cuando se incuba en medios que comprenden un quelante del hierro y no aislable cuando se cultiva en los medios sin el quelante del hierro.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Extractos enriquecidos de proteína insoluble en detergente de la cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica* y cepa KIM6+ de *Y. pestis* rediseñados por electroforesis sobre un gel de dodecil sulfato sódico - poliacrilamida al 10 %. Los números de la izquierda de la imagen del gel representan los pesos moleculares en kDa de las referencias que se muestran en la Calle 1. Calle 1, referencias de pesos moleculares; Calle 2, cepa KIM6+ de *Y. pestis* cultivada en medios suplementados con 300 μ M de FeCl₃; Calle 3, cepa KIM6+ de *Y. pestis* cultivada en medios suplementados con 160 μ M de 2,2-dipiridilo; Calle 4, cepa 27729 de la ATCC de *Y.*

enterocolitica cultivada en medios suplementados con 160 µM de 2,2-dipiridilo; Calle 5, cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica* cultivada en medios suplementados con 300 µM de FeCl₃.

Figura 2. Supervivencia de ratones vacunados y no vacunados después del desafío con *Y. enterocolitica*. El gráfico muestra el análisis de supervivencia de ratones después de la inmunización con proteínas de membrana derivadas de la cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica* cultivada en condiciones limitantes de hierro y el posterior desafío vivo con la cepa 27729. Se registró la mortalidad durante 7 días después del desafío.

Figura 3. Secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1-23.

Descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención

La presente invención proporciona composiciones como se definen en las reivindicaciones.

La presente divulgación también proporciona polipéptidos y composiciones que incluyen polipéptidos. Como se utiliza en el presente documento, "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Por lo tanto, por ejemplo, los términos péptido, oligopéptido, proteína, y enzima están incluidos en la definición de polipéptido. Este término incluye también las modificaciones post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, y similares. El término polipéptido no implica una longitud específica del polímero de aminoácidos. Un polipéptido se puede aislar directamente de una fuente natural, o se puede preparar con la ayuda de técnicas recombinantes, enzimáticas, o químicas. En el caso de un polipéptido que sea de origen natural, dicho polipéptido normalmente estará aislado. Un polipéptido "aislado" es el que se ha extraído de su entorno natural. Por ejemplo, un polipéptido aislado es un polipéptido que se ha retirado del citoplasma o de la membrana externa de una célula, y muchos polipéptidos, ácidos nucleicos, y otro material celular de su entorno natural no están presentes. Un polipéptido "aislable" es un polipéptido que se podría aislar de una fuente en particular. Un polipéptido "purificado" es el que está libre al menos en un 60 %, preferentemente libre al menos en un 75 %, y más preferentemente libre al menos en un 90 % de otros componentes a los que se asocia de modo natural. Los polipéptidos que se producen fuera del organismo en el que existe naturalmente, por ejemplo, por medios químicos o recombinantes, se consideran aislados y purificados por definición, ya que nunca estuvieron presentes en un entorno natural. Como se utiliza en el presente documento, un "fragmento polipeptídico" se refiere a una parte de un polipéptido que resulta de la digestión de un polipéptido con una proteasa. A menos de que se especifique otra cosa, "un", "una", "el" y "al menos uno" se utilizan de manera intercambiable y significa uno o más de uno. El término "comprende" y las variaciones del mismo no tienen un significado limitante, cuando aparecen estos términos en la descripción y las reivindicaciones.

Un polipéptido de la presente divulgación se puede caracterizar por el peso molecular, la huella de masa, o una combinación de los mismos. El peso molecular de un polipéptido, que se expresa normalmente en kilodaltons (kDa), se puede determinar utilizando métodos de rutina que incluyen, por ejemplo, filtración en gel, electroforesis en gel que incluye la electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico (SDS) poliacrilamida (PAGE), electroforesis por capilaridad, espectrometría de masas, y cromatografía líquida que incluye la HPLC. Preferentemente, el peso molecular se determina redisolviendo un polipéptido utilizando un gel SDS poliacrilamida que tiene aproximadamente un 4 % de un gel de relleno y aproximadamente un 10 % de un gel redisolución en condiciones reductoras y desnaturizantes. A menos de que se indique otra cosa, el peso molecular se refiere a un peso molecular que se determina por SDS-PAGE. Como se utiliza en el presente documento, una "huella de masa" se refiere a una población de fragmentos de polipéptido que se obtiene a partir de un polipéptido tras la digestión con una proteasa. Normalmente, los fragmentos de polipéptido que resultan de una digestión se analizan utilizando un método espectrométrico de masas. Cada fragmento de polipéptido se caracteriza por una masa, o por la relación de una masa (m) respecto a la carga (z), a la que se hace referencia como "relación m/z" o un "valor m/z". Los métodos para generar una huella de masa de un polipéptido son rutinarios. Un ejemplo de dicho método se desvela en el Ejemplo 9.

Los polipéptidos de la presente divulgación pueden ser polipéptidos regulados por metales. Como se utiliza en el presente documento, un "polipéptido regulado por metales" es un polipéptido que expresa un microbio que tiene un mayor nivel cuando el microbio se cultiva en condiciones metálicas bajas en comparación con el cultivo del mismo microbio en condiciones metálicas altas. Las condiciones metálicas bajas y altas se describen en el presente documento. Por ejemplo, una clase de polipéptido regulado por metales producido por *Yersinia* spp. no se expresa a niveles detectables durante el cultivo del microbio en condiciones metálicas altas pero se expresa a niveles detectables durante el cultivo en condiciones metálicas bajas. Ejemplos de dichos polipéptidos regulados por metales aislables de *Yersinia enterocolitica* tienen pesos moleculares de 83 kDa, 70 kDa, o 66 kDa. En algunos aspectos, la *Y. enterocolitica* puede producir dos polipéptidos que tienen cada uno un peso molecular de 83 kDa y cada uno se expresa a niveles detectables durante el cultivo del microbio en condiciones metálicas bajas y no se expresa a niveles detectables durante el cultivo en condiciones metálicas altas. Ejemplos de tales polipéptidos regulados por metales aislables de *Yersinia pestis* tienen pesos moleculares de 94 kDa, 88 kDa, 77 kDa, 73 kDa, o 64 kDa.

Otro tipo de polipéptido regulado por metales producido por *Yersinia* spp. se expresa a niveles detectables durante el cultivo del microbio en condiciones metálicas altas pero se expresa significativamente más del polipéptido durante el cultivo en condiciones metálicas bajas. Se hace referencia a la expresión de dichos polipéptidos en el presente documento como "aumentada" durante el crecimiento en condiciones metálicas bajas. Normalmente, la expresión de un polipéptido durante un cultivo en condiciones metálicas bajas es al menos un 10 % o al menos un 50 % mayor que la expresión del polipéptido durante el cultivo en condiciones metálicas altas. Ejemplos de polipéptidos regulados por metales que presentan una expresión aumentada y son aislables a partir de *Y. enterocolitica* tienen pesos moleculares de 268 kDa, 79 kDa, o 45 kDa. Ejemplos de polipéptidos regulados por metales que presentan una expresión aumentada y son aislables a partir de *Y. pestis* tienen un peso molecular de 254 kDa, 46 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 31 kDa, 28 kDa, o 20 kDa. En algunos aspectos, la *Y. pestis* puede producir dos polipéptidos diferentes que tienen cada uno un peso molecular de 31 kDa y cada uno presenta una expresión aumentada.

La expresión de algunos polipéptidos de la presente divulgación no está influenciada significativamente por la presencia de un metal. Ejemplos de tales polipéptidos aislables de *Y. enterocolitica* tienen pesos moleculares de 92 kDa, 54 kDa, 40 kDa, 38 kDa, 31 kDa, o 28 kDa. En algunos aspectos, la *Y. enterocolitica* puede producir dos polipéptidos diferentes que cada uno tiene un peso molecular de 31 kDa y cada uno no está significativamente influenciado por la presencia de un metal. Ejemplos de dichos polipéptidos aislables de *Y. pestis* tienen pesos moleculares de 104 kDa, 99 kDa, 60 kDa, o 44 kDa.

Si un polipéptido es un polipéptido regulado por metales o no, se puede determinar por métodos útiles para comparar la presencia de polipéptidos, que incluyen, por ejemplo, filtración en gel, electroforesis en gel que incluye electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE), electroforesis por capilaridad, espectrometría de masas, y cromatografía líquida incluyendo HPLC. Se cultivan por separado los cultivos de un microbio en condiciones metálicas altas y en condiciones metálicas bajas, los polipéptidos de la presente divulgación se aíslan como se describe en el presente documento, y se comparan y redisuelven los polipéptidos presentes en cada cultivo. Normalmente, se utiliza una cantidad igual de polipéptidos de cada cultivo. Preferentemente, los polipéptidos se redisuelven utilizando un gel de SDS poliácridamida que tiene aproximadamente un 4 % de un gel de relleno y aproximadamente un 10 % de un gel de redisolución en condiciones reductoras y desnaturizantes. Por ejemplo, se pueden utilizar 30 microgramos (µg) de polipéptido total de cada cultivo y se cargan en pocillos de un gel. Tras procesar el gel y teñir los polipéptidos con Azul Coomassie brillante, se pueden comparar las dos calles. Cuando se determina si un polipéptido se expresa o no en un nivel detectable, se redisuelven 30 µg de polipéptido total de un cultivo en un gel SDS-PAGE y se tiñe con Azul Coomassie Brillante utilizando métodos conocidos en la técnica. Un polipéptido que se puede visualizar a simple vista se considera que se expresa a un nivel detectable, mientras que un polipéptido que no se puede visualizar a simple vista se considera que no se expresa a un nivel detectable.

Los polipéptidos de la presente divulgación pueden tener actividad inmunogénica. "Actividad inmunogénica" se refiere a la capacidad de un polipéptido para desencadenar una respuesta inmunológica en un animal. Una respuesta inmunológica contra un polipéptido es el desarrollo en un animal de una respuesta inmunitaria mediada por células y/o anticuerpos contra el polipéptido. Habitualmente, una respuesta inmunológica incluye pero no se limita a uno o más de los siguientes efectos: producción de anticuerpos, células B, células T auxiliares, células T supresoras, y/o células T citotóxicas, que se dirigen contra un epítipo o epítopos del polipéptido. "Epítipo" se refiere al sitio en un antígeno al que responden las células B y/o células T específicas de manera que se producen anticuerpos. La actividad inmunogénica puede ser protectora. "Actividad inmunogénica protectora" se refiere a la capacidad de un polipéptido para desencadenar una respuesta inmunológica en un animal que evita o inhibe la infección por *Yersinia* spp., por ejemplo, *Y. enterocolitica* o *Y. pestis*. Se puede determinar si un polipéptido tiene una actividad inmunogénica protectora por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en el ejemplo 4 o el ejemplo 7. Por ejemplo, un polipéptido de la presente divulgación, o combinación de polipéptidos de la presente divulgación, protegen un roedor tal como un ratón contra un desafío con una *Yersinia* spp. Un polipéptido de la presente divulgación puede tener una actividad serorreactiva. "Actividad serorreactiva" se refiere a la capacidad de un polipéptido candidato para reaccionar con anticuerpos presentes en el suero convaleciente de un animal infectado con una *Yersinia* spp., preferentemente *Y. enterocolitica* o *Y. pestis*. Los polipéptidos de la presente divulgación pueden tener actividad inmunorreguladora. "Actividad inmunorreguladora" se refiere a la capacidad de un polipéptido para actuar de manera no específica para aumentar una respuesta inmunitaria contra un antígeno en particular. Los métodos para determinar si un polipéptido tiene actividad inmunorreguladora se conocen en la técnica.

Un polipéptido de la presente divulgación tiene las características de un polipéptido que expresa un microbio de referencia. Las características incluyen tanto el peso molecular como la huella de masa. El microbio de referencia puede ser *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Y. ruckeri*, *Y. rohdei*, *Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, o *Y. moolaretti*, preferentemente *Y. enterocolitica*, por ejemplo, la cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica*, o *Y. pestis*, por ejemplo, la cepa KIM6+ de *Y. pestis* (Gong et al., Infect. Immun., 69:2829-2837 (2001)).

Cuando el microbio de referencia es *Y. enterocolitica*, por ejemplo, la cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica*, se considera que un polipéptido candidato es un polipéptido de la presente divulgación si tiene un peso molecular de

268 kDa, 83 kDa, 79 kDa, 70 kDa, 66 kDa, o 45 kDa, y tiene una huella de masa que es similar a la huella de masa de un polipéptido regulado por un metal que expresa el microbio de referencia y tiene un peso molecular de 268 kDa, 83 kDa, 79 kDa, 70 kDa, 66 kDa, o 45 kDa, respectivamente. Preferentemente, dichos polipéptidos están regulados por metales. Por ejemplo, un polipéptido candidato es un polipéptido de la presente divulgación si tiene un peso molecular de 83 kDa y tiene una huella de masa similar a la huella de masa de uno de los polipéptidos regulados por metales de 83 kDa producidos por la cepa de referencia 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica*. Un polipéptido candidato también se considera que es un polipéptido de la presente invención si tiene un peso molecular de 92 kDa, 54 kDa, 40 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 31 kDa, o 28 kDa y tiene una huella de masa que es similar a la huella de masa de un polipéptido que expresa el microbio de referencia y tiene un peso molecular de 92 kDa, 54 kDa, 40 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 31 kDa, o 28 kDa, respectivamente.

Cuando el microbio de referencia es *Y. pestis*, por ejemplo, la cepa KIM6+ de *Y. pestis*, un polipéptido candidato se considera un polipéptido de la presente divulgación si tiene un peso molecular de 254 kDa, 94 kDa, 88 kDa, 77 kDa, 73 kDa, 64 kDa, 46 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 31 kDa, 28 kDa, o 20 kDa, y una huella de masa que es similar a la huella de masa de un polipéptido regulado por metales que expresa el microbio de referencia y tiene un peso molecular de 254 kDa, 94 kDa, 88 kDa, 77 kDa, 73 kDa, 64 kDa, 46 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 31 kDa, 28 kDa, o 20 kDa, respectivamente. Preferentemente, dichos polipéptidos están regulados por metales. Por ejemplo, un polipéptido candidato es un polipéptido de la presente divulgación si tiene un peso molecular de 94 kDa y tiene una huella de masa similar a la huella de masa de uno de los polipéptidos regulados por metales de 94 kDa producidos por la cepa de referencia cepa KIM6+ de *Y. pestis*. Un polipéptido candidato también se considera que es un polipéptido de la presente divulgación si tiene un peso molecular de 104 kDa, 99 kDa, 60 kDa, o 44 kDa y tiene una huella de masa que es similar a la huella de masa de un polipéptido que expresa el microbio de referencia y tiene un peso molecular de 104 kDa, 99 kDa, 60 kDa, o 44 kDa, respectivamente.

Los polipéptidos que expresa un microbio de referencia y a los que se ha hecho referencia anteriormente por peso molecular se pueden obtener cultivando el microbio de referencia en condiciones metálicas bajas y aislando posteriormente un polipéptido por los procesos desvelados en el presente documento. Un polipéptido candidato es aislable de un microbio, preferentemente, un microbio gram negativo, más preferentemente, un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, preferentemente un miembro del género *Yersinia*, tal como *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, o *Y. pestis*. Un polipéptido candidato también se puede producir utilizando técnicas recombinantes, enzimáticas, o químicas.

Un polipéptido candidato puede evaluarse por análisis de espectrometría de masas para determinar si el polipéptido candidato tiene una huella de masa similar a la de los polipéptidos que expresa un microbio de referencia y a los que se hace referencia anteriormente por peso molecular. Normalmente, el polipéptido candidato se aísla, por ejemplo, resolviendo el polipéptido candidato por electroforesis en gel y escindiendo la parte de gel que contenga el polipéptido candidato. Se puede utilizar cualquier método de electroforesis en gel que separe polipéptido basándose en la diferenciación de características, incluyendo electroforesis en gel de 1 dimensión o 2 dimensiones, así como separación cromatográfica líquida, basada por ejemplo, en hidrofobia, pl, o tamaño. El polipéptido candidato se fragmenta, por ejemplo, por digestión con una proteasa. Preferentemente, la proteasa escinde el enlace peptídico en el lado el extremo carboxilo del aminoácido lisina y el aminoácido arginina, excepto cuando el aminoácido siguiente de la lisina o la arginina es una prolina. Un ejemplo de tal proteasa es la tripsina. Los métodos para digerir un polipéptido con tripsina son de rutina y se conocen en la técnica. Un ejemplo de dicho método se desvela en el Ejemplo 9.

Los métodos para el análisis espectrométrico de polipéptidos son de rutina y se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, espectroscopia de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS). Normalmente, una mezcla que contiene los fragmentos de polipéptido que se obtiene a partir de un polipéptido candidato se mezcla con una matriz que funciona transformando la energía láser hacia la muestra y produce fragmentos de polipéptido ionizados, preferentemente monoisotópicos. Ejemplos de matrices que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, ácido sinapínico o ácido ciano-4-hidroxicinámico. Un ejemplo de un método para el análisis de polipéptidos por MALDI-TOF MS se describe en el Ejemplo 9. Los fragmentos de polipéptido ionizados se separan según su relación m/z, y se detectan porque dan como resultado un espectro de la relación m/z frente a la intensidad. El espectro incluye valores de m/z que representan los fragmentos de polipéptido derivados del polipéptido candidato. Para cualquier polipéptido determinado, la cantidad de cada fragmento de polipéptido que resulta de una digestión por tripsina debería ser equimolar. Sin embargo, se sabe que la digestión con tripsina no siempre es eficaz al 100 %, por ejemplo, algunos sitios se escinden más eficazmente. Por lo tanto, cuando se utiliza la MALDI-TOF MS para determinar valores m/z, la intensidad de cada valor m/z normalmente no es idéntica. En general, un espectro tiene un nivel de ruido de fondo presente a lo largo de la mayoría del eje X (es decir, el eje que tiene los valores de las relaciones m/z). Este nivel de ruido de fondo varía dependiendo de las condiciones de ejecución y la máquina que se utiliza, y es fácilmente identificable por inspección visual del espectro. Un valor m/z generalmente se considera que representa un fragmento de polipéptido cuando la intensidad es al menos 2 veces mayor, 3 veces mayor, o 4 veces mayor que el nivel de ruido de fondo. El espectro incluye habitualmente otros valores m/z que son artefactos que resultan de, por ejemplo, la digestión incompleta, sobre digestión, otros polipéptidos que pueden estar presentes en la mezcla, o la proteasa utilizada para digerir el polipéptido incluyendo los valores m/z que resultan de la autólisis de la proteasa. Se reconoce en la técnica que este

método para digerir un polipéptido con una proteasa da como resultado una huella de masa de gran especificidad y que se puede utilizar para caracterizar con precisión el polipéptido y lo distingue de otros polipéptidos.

En este aspecto de la divulgación, cuando un polipéptido candidato se analiza por espectrometría de masas, preferentemente ambos polipéptidos, el candidato y el polipéptido del microbio de referencia, se preparan y analizan juntos, disminuyendo de esta manera cualquier artefacto potencial que resulte de las diferencias de las condiciones de manipulación y ejecución de la muestra. Preferentemente, todos los reactivos que se utilizan para preparar y analizar los dos polipéptidos son los mismos. Por ejemplo, el polipéptido del microbio de referencia y el polipéptido candidato se aíslan sustancialmente en las mismas condiciones, se fragmentan sustancialmente en las mismas condiciones, y se analizan por MALDI-TOF MS en la misma máquina sustancialmente en las mismas condiciones. Una huella de masa de un polipéptido candidato se considera que es similar a la huella de masa de un polipéptido de un microbio de referencia cuando al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o sustancialmente todos los valores m/z presentes en el espectro del polipéptido del microbio de referencia y por encima del nivel de ruido de fondo están también presentes en el espectro del polipéptido candidato.

En otro aspecto, se considera que un polipéptido es un polipéptido de la presente divulgación si tiene un peso molecular de un polipéptido de referencia descrito en la Tabla 1 o la Tabla 2 y tiene una huella de masa que incluye la población de fragmentos polipeptídicos del polipéptido de referencia que se enumeran en la Tabla 1 o Tabla 2. Por ejemplo, un polipéptido de la presente divulgación incluye un polipéptido de 83 kDa y una huella de masa que incluye fragmentos de polipéptido que tienen masas de 686,37, 975,45, 1000,53, 1015,46, 1140,65, 1169,68, 1170,64, 1197,57, 1342,55, 1356,74, 1394,67, 1452,73, 1476,72, 1520,76, 1692,77, 1715,75, 1828,79, 1960,91, 2013,02, 2018,95, 2040,97, 2163,05, 2225,03, 2416,19, y 3174,44, o una huella de masa que incluye fragmentos de polipéptido que tienen masas de 1001,49, 1103,57, 1139,57, 1154,51, 1170,49, 1208,59, 1213,67, 1337,70, 1452,86, 1567,84, 1633,85, 1650,82, 1659,91, 1708,77, 1748,95, 1849,92, 1986,98, 2103,95, 2111,03, 2163,11, 2386,19, 2452,09, 2537,34, y 3422,66. La huella de masa de un polipéptido candidato se puede determinar por un método espectrométrico de masas, por ejemplo por MALDI-TOF MS. La huella de masa de un polipéptido candidato generalmente tendrá fragmentos de polipéptido adicionales y por lo tanto valores de m/z adicionales distintos de los enumerados para un polipéptido de la Tabla 1 o Tabla 2. Preferentemente, cuando el polipéptido candidato se compara con un polipéptido de la Tabla 1 o Tabla 2, el polipéptido candidato se obtiene de una *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, o *Y. enterocolitica*, más preferentemente, *Y. enterocolitica* o *Y. pestis*. Un polipéptido candidato puede obtenerse cultivando un microbio en condiciones metálicas bajas y aislando posteriormente un polipéptido por los procesos que se describen en el presente documento.

Es bien conocido en la técnica que pueden introducirse accidentalmente modificaciones de aminoácidos durante la manipulación de la muestra, tales como oxidación, y formación de derivados carbamidometilo. Además, estos tipos de modificaciones alteran el valor m/z de un fragmento de polipéptido. Por ejemplo, si un fragmento de polipéptido contiene una metionina que está oxidada el valor m/z se multiplicará por 16 con respecto al mismo fragmento que no contiene la metionina oxidada. En consecuencia, los fragmentos de polipéptido de las Tablas 1 y 2 que tienen la notación "oxidación (M)" tienen un valor m/z que está multiplicado por 16 con respecto al mismo fragmento que no contiene la metionina oxidada. Se entiende que los fragmentos de polipéptido de la Tabla 1 y la Tabla 2 se pueden modificar durante la manipulación de la muestra.

Tabla 1. Características de los polipéptidos obtenidos de *Y. enterocolitica*.

Denominación de polipéptidos	Peso molecular aproximado en kilodaltons (kDa) ¹	Masa de los fragmentos de polipéptido que resultan de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos prevista del fragmento de polipéptido (Números de SEQ ID enumerados entre paréntesis)
Lw545	268	928,45	FHQLDNR (SEQ ID No: 24)
		1139,57	VNFTAGVGGYR (SEQ ID No: 25)
		1311,65	NSVSIGHESLNR (SEQ ID No: 26)
		1439,69	ASTSDTGVAVGFNSK (SEQ ID No: 27)
		1525,73	SAETLASANVYADSK (SEQ ID No: 28)
		1554,69	EAFDLSNDALDMAK + Oxidación (M) (SEQ ID No: 29)
		1580,77	SAEVLGIANNYTDSK (SEQ ID No: 30)
		1595,78	ALGDSAVTYGAGSTAQK (SEQ ID No: 31)
		1682,78	EAFDLSNDALDMAKK + Oxidación (M) (SEQ ID No: 32)
		2109,18	AAVAVGAGSIATGVNSVAIGPLSK (SEQ ID No: 33)
Lw391A	83	686,37	DIGNIR (SEQ ID No: 34)

ES 2 588 010 T3

		975,45	FFVSYQW (SEQ ID No: 35)
		1000,53	VNGQDVTLR (SEQ ID No: 36)
		1015,46	ASYFDTNAK (SEQ ID No: 37)
		1140,65	DLPVSILAGTR (SEQ ID No: 38)
		1169,68	QGVLTLDVGIR (SEQ ID No: 39)
		1170,64	NIPGLTVTGSGR (SEQ ID No: 40)
		1197,57	YYNNSALEPK (SEQ ID No: 41)
		1342,55	APTMGEMYNSDK (SEQ ID No: 42)
		1356,74	IDQIQSLSANLR (SEQ ID No: 43)
		1394,67	TDDVDGILSFGTR (SEQ ID No: 44)
		1452,73	GMTTTVVLGNAFDK (SEQ ID No: 45)
		1476,72	IADTMVVTATGNER (SEQ ID No: 46)
		1520,76	FGSGWLQDEITLR (SEQ ID No: 47)
		1692,77	NPQTSAASTNLMTDR (SEQ ID No: 48)
		1715,75	FNDLMMMAEDDLQFK (SEQ ID No: 49)
		1828,79	GSSEGYADVADKWSSR (SEQ ID No: 50)
		1960,91	QEQTSGATESFPQADIR (SEQ ID No: 51)
		2013,02	QGTDTGHLNSTFLDPALVK (SEQ ID No: 52)
		2018,95	QSDGFNAPNDETISNVLAK (SEQ ID No: 53)
		2040,97	VYSAAATGDHSFGLGASAFGR (SEQ ID No: 54)
		2163,05	LFTDSFASHLLTYGTEAYK (SEQ ID No: 55)
		2225,03	VSSSGTPQAGYGVNDFYVSYK (SEQ ID No: 56)
		2416,19	GAVSVTPTDWLMLFGSYAQAFR (SEQ ID No: 57)
		3174,44	SSFEAPMMVTWEADTPTSETATSATDMLR (SEQ ID No: 58)
Lw391B	83	1001,49	NDASVQNVNR (SEQ ID No: 59)
		1103,57	IGFLGQQDAR (SEQ ID No: 60)
		1139,57	VNLGYAANYR (SEQ ID No: 61)
		1154,51	GYGNPSQNYR (SEQ ID No: 62)
		1170,49	YGDDDQFGVR (SEQ ID No: 63)
		1208,59	GHFDTGPITHK (SEQ ID No: 64)
		1213,67	LLASATWLDPK (SEQ ID No: 65)
		1337,70	NVPFNVIGYTSK (SEQ ID No: 66)
		1452,86	LKPWTRLDLGVR (SEQ ID No: 67)
		1567,84	VSLYANHIEALGPGK (SEQ ID No: 68)
		1633,85	GIELNVFGEPVFGTR (SEQ ID No: 69)
		1650,82	TNDTITVGAQETFR (SEQ ID No: 70)
		1659,91	VTPIYGIMVKPWEK (SEQ ID No: 71)
		1708,77	NFDSGVPNSAGSLDAMK (SEQ ID No: 72)
		1748,95	LYVPYVADSVAGLGGR (SEQ ID No: 73)
		1849,92	VTVDYGSASQVGGALDVGR (SEQ ID No: 74)
		1986,98	AGGNDLIPTYLDGQVANGGR (SEQ ID No: 75)
		2103,95	SEYDVSQNWTVYGSVGASR (SEQ ID No: 76)
		2111,03	GYNLDGDDISFGGLFGVLPR (SEQ ID No: 77)
		2163,11	SGSQYANEANTLKLKPWTR (SEQ ID No: 78)
		2386,19	GANAFINGISPSGSGVGGMINLEPK (SEQ ID No: 79)
		2452,09	NEETGQYGAPMLTNNNGDATISR (SEQ ID No: 80)

ES 2 588 010 T3

		2537,34	SAPYQYNGKPVVNAGQIPGIIHSK (SEQ ID No: 81)
		3422,66	YGGTLALFEITRPTGMVDPATNVYGFYGEQR (SEQ ID No: 82)
Lw392	79	836,44	YDTVALR (SEQ ID No: 83)
		1017,59	VLLGVDFQK (SEQ ID No: 84)
		1070,48	FDDVWSFR (SEQ ID No: 85)
		1085,50	SVQATVGYDF (SEQ ID No: 86)
		1131,59	ADLGTWAASLK (SEQ ID No: 87)
		1188,55	QWADDANTLR (SEQ ID No: 88)
		1214,63	VNSQGLELEAR (SEQ ID No: 89)
		1235,65	AVPATYYVPAGK (SEQ ID No: 90)
		1255,66	LSVIAGYTYNR (SEQ ID No: 91)
		1263,65	VPSYTLGDASVR (SEQ ID No: 92)
		1360,66	RPQFTSEGHFR (SEQ ID No: 93)
		1496,67	GFFDGESNHNVFK (SEQ ID No: 94)
		1501,79	GAFVQLNVNNIADK (SEQ ID No: 95)
		1614,75	WQQIYSYEFCHK (SEQ ID No: 96)
		1652,77	GFFDGESNHNVFKR (SEQ ID No: 97)
		1717,82	GFHGGDVNNTFLDGLR (SEQ ID No: 98)
		1770,85	RWQQIYSYEFCHK (SEQ ID No: 99)
		1819,86	AGHEADLPTSGYTATTTK (SEQ ID No: 100)
		1827,01	TDQPLILTAQSVSVVTR (SEQ ID No: 101)
		2004,92	DPSGGYHSAVPADGSIYGQK (SEQ ID No: 102)
		2066,02	GPSSALYGQSIPGGVMMTSK (SEQ ID No: 103)
		2119,91	KYVAACYSTSYCYWGAER (SEQ ID No: 104)
		2299,22	YAIAPSLWQPDENTSLLLR (SEQ ID No: 105)
		2307,15	LLSDGGSYNVLQVDPWFLE (SEQ ID No: 106)
		2782,23	QNASYTHSNTQLEQVYQGGWNSDR (SEQ ID No: 107)
		2911,35	LTAGNNNTQVAAFDYTDASEHWAFR (SEQ ID No: 108)
		3023,42	RYEQSGVYLQDEMTLDNWHNLNLSGR (SEQ ID No: 109)
		3286,53	QQMDDQNVATVNQALNYTPGVFTGFSGGATR (SEQ ID No: 110)
Lw393	70	713,42	VPFVPR (SEQ ID No: 111)
		759,42	TVGINTR (SEQ ID No: 112)
		806,41	YGALMPR (SEQ ID No: 113)
		819,42	FDIGGGVR (SEQ ID No: 114)
		919,48	GPQGTLYGK (SEQ ID No: 115)
		1023,50	GYIEGGVSSR (SEQ ID No: 116)
		1051,53	SINYELGTR (SEQ ID No: 117)
		1186,57	WNQDVQELR (SEQ ID No: 118)
		1199,60	TVDMVFGLYR (SEQ ID No: 119)
		1394,68	YGAGSSVNGVIDTR (SEQ ID No: 120)
		1436,66	LSLSDGSPDPYMR (SEQ ID No: 121)
		1479,70	ATQDAYVGWNDIK (SEQ ID No: 122)
		1540,80	INISVHVDNLFDR (SEQ ID No: 123)
		1545,80	TFPSGSLIVNMPQR (SEQ ID No: 124)

ES 2 588 010 T3

		1564,76	KLSLSDGSPDPYMR (SEQ ID No: 125)
		1667,72	SEFTNDSELYHG NR (SEQ ID No: 126)
		1730,85	FAPGWSWDINGNVIR (SEQ ID No: 127)
		1789,81	LAPDDQPWEMGFAASR (SEQ ID No: 128)
		1904,85	TYGYMNGSSAVAQVNMGR (SEQ ID No: 129)
		1981,02	SAQGGIINIVTQQPDSTPR (SEQ ID No: 130)
		1982,93	QGTATLDSSLGWQATER (SEQ ID No: 131)
		1995,94	DMQLYSGPVGMQTLNAGK (SEQ ID No: 132)
		2009,89	SSTQYHGSM LGNPF GDQ GK (SEQ ID No: 133)
		2027,02	LAVNLVGP HYFDG DNQLR (SEQ ID No: 134)
		2058,99	LRLAPDDQPWEMGFAASR (SEQ ID No: 135)
		2132,93	QVDDGDMINPATGSDDLGGTR (SEQ ID No: 136)
		2162,17	FNLSGPIQDGLLYGSVTLLR (SEQ ID No: 137)
		2274,20	VLPGLNIENSGNMLFSTISLR (SEQ ID No: 138)
		2363,13	SEFTNDSELYHG NRVPFVPR (SEQ ID No: 139)
		2377,30	SKFNLSGPIQDGLLYGSVTLLR (SEQ ID No: 140)
		2383,07	SNDDQVLGQLSAGYMLTDDWR (SEQ ID No: 141)
		2563,22	SASANNVSSTWSAPELSDAGVTASDK (SEQ ID No: 142)
		2657,23	YTTDDWVFNLSAWQQQHYSR (SEQ ID No: 143)
		2833,50	IAQGYKPSGYNIVPTAGLDAKPFVAEK (SEQ ID No: 144)
		2929,46	SASANNVSSTWSAPELSDAGVTASDKLPR (SEQ ID No: 145)
Lw550	66	867,49	VSGLLSHR (SEQ ID No: 146)
		881,42	TSEYLN R (SEQ ID No: 147)
		883,43	EWHGTVR (SEQ ID No: 148)
		1020,59	YTLILVDGK (SEQ ID No: 149)
		1086,57	RVDIEVNDK (SEQ ID No: 150)
		1167,61	VGKEWHGTVR (SEQ ID No: 151)
		1176,69	YTLILVDGKR (SEQ ID No: 152)
		1207,63	LMGGVYNVLDK (SEQ ID No: 153)
		1345,72	IQDSAASISVVTR (SEQ ID No: 154)
		1748,72	MDQDENYGTHWTPR (SEQ ID No: 155)
		1753,77	NEFD FDI GHYVQDR (SEQ ID No: 156)
		1850,95	DVPGVVVTGGGSHSDISIR (SEQ ID No: 157)
		2520,27	GTRPNSDGS GIEQ GWLPPLAAIER (SEQ ID No: 158)
		2606,16	NNYAITHHGYDFGNSTSYVQR (SEQ ID No: 159)
		2942,50	AYTDITDALKDVPGVVVTGGGSHSDISIR (SEQ ID No: 160)
		3085,41	NGAATFTLTPDDKNEFD FDI GHYVQDR (SEQ ID No: 161)
Lw552	45	1139,57	VNFTAGVGGYR (SEQ ID No: 162)
		1208,61	SSQALAI GSGYR (SEQ ID No: 163)
		1311,65	NSVSIGHESLNR (SEQ ID No: 164)
		1439,69	ASTSDTGVA VG FNSK (SEQ ID No: 165)
		1500,74	TTLETAEHTNKK (SEQ ID No: 166)

		1525,73	SAETLASANVYADSK (SEQ ID No: 167)
		1580,77	SAEVLGIANNYTDSK (SEQ ID No: 168)
		1595,78	ALGDSAVTYGAGSTAQK (SEQ ID No: 169)
Lw555	37	704,42	LGFAGLK (SEQ ID No: 170)
		880,43	ADAYSGGLK (SEQ ID No: 171)
		970,38	DGDQSYMR (SEQ ID No: 172)
		1121,57	DGNKLDLYGK (SEQ ID No: 173)
		1279,54	AEDQDQGNFTR (SEQ ID No: 174)
		1294,58	VDGLHYFSDDK (SEQ ID No: 175)
		1334,67	INLLDENEFTK (SEQ ID No: 176)
		1509,71	VDGLHYFSDDKSK (SEQ ID No: 177)
		1907,96	NAGINTDDIVAVGLVYQF (SEQ ID No: 178)
		2245,12	NTNFFGLVDGLNFALQYQGK (SEQ ID No: 179)
		2324,11	YDANNVYLAATYAQTYNLTR (SEQ ID No: 180)
		2642,22	GETQISDQLTGYGQWEYQANLNK (SEQ ID No: 181)
		2984,54	AQNIELVAQYQFDFGLRPSVAYLQSK (SEQ ID No: 182)
		3087,49	FGLKGETQISDQLTGYGQWEYQANLNK (SEQ ID No: 183)
Lw557	31	863,51	TVYLQIK (SEQ ID No: 184)
		1403,71	NTSDKNMLGLAPK + Oxidación (M) (SEQ ID No: 185)
		1615,81	FEEAQPVEDQLAK (SEQ ID No: 186)
		1779,83	TQMSETIWLEPSSQK + Oxidación (M) (SEQ ID No: 187)
		1875,92	VQTSTQTGNKHQYQTR (SEQ ID No: 188)
		2070,10	VNLKFEEAQPVEDQLAK (SEQ ID No: 189)
		2378,15	GYTVTSSPEDAHYWIQANVLK (SEQ ID No: 190)
1. Peso molecular determinado por SDS-PAGE.			
2. La masa de un fragmento de polipéptido se puede convertir en valor m/z añadiendo 1 a la masa. Cada masa incluye un intervalo de más o menos 1 Da o más o menos 300 ppm.			

Tabla 2. Características de los polipéptidos obtenidos de *Y. pestis*.

Denominación de polipéptidos	Peso molecular aproximado en kilodaltons (kDa) ¹	Masa de los fragmentos de polipéptido que resultan de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos prevista del fragmento de polipéptido
Lw529	104	643,43	ALISLK (SEQ ID No: 191)
		684,36	SIYFR (SEQ ID No: 192)
		770,49	ILIGEVK (SEQ ID No: 193)
		840,46	NPVARER (SEQ ID No: 194)
		898,55	AVQDIILK (SEQ ID No: 195)
		961,55	YPLISELK (SEQ ID No: 196)
		1136,61	NGIIFSPHPR (SEQ ID No: 197)
		1276,63	EAGVQEADFLAK (SEQ ID No: 198)
		1292,62	NFEEAVEKAEK (SEQ ID No: 199)
		1385,65	VVDESEPFHEK (SEQ ID No: 200)
		1409,76	NGGLNAAIVGQPATK (SEQ ID No: 201)
		1421,84	AAALAAADARIPLAK (SEQ ID No: 202)

ES 2 588 010 T3

		1497,82	AVTNVAELNELVAR (SEQ ID No: 203)
		1566,75	QTAFSQYDRPQAR (SEQ ID No: 204)
		1678,89	LLKEFLPASYNAGAK (SEQ ID No: 205)
		1683,82	YAEIADHLGLSAPGDR (SEQ ID No: 206)
		1725,93	GSLPIALEEVATDGAKR (SEQ ID No: 207)
		1872,90	EYANFSQEQVDKIFR (SEQ ID No: 208)
		1990,91	NHFASEYIYNAYKDEK (SEQ ID No: 209)
		2020,06	ILINTPASQGGIGDLYNFK (SEQ ID No: 210)
		2182,01	EYVEEFDREEEVAAATAPK (SEQ ID No: 211)
		2584,21	YNANDNPTKQTAFSQYDRPQAR (SEQ ID No: 212)
		2842,48	AAYSSGKPAIGVGAGNTPVVVDETADIKR (SEQ ID No: 213)
Lw530	99	1190,64	ILFYTGVDNKH (SEQ ID No: 214)
		1513,80	YRNIGISAHIDAGK (SEQ ID No: 215)
		1590,77	HSDDKEPFSALAFK (SEQ ID No: 216)
		1596,83	IATDPFVGNLTFFR (SEQ ID No: 217)
		1636,82	YLGGEELTEEEIKK (SEQ ID No: 218)
		1670,86	MEFPEPVISVAVEPK (SEQ ID No: 219)
		1713,93	EFIPAVDKGIQEQK (SEQ ID No: 220)
		1718,96	LGANPVPLQLAIGAEK (SEQ ID No: 221)
		1750,91	VYSGIVNSGDTVLSNVK (SEQ ID No: 222)
		1819,92	EFNVEANVGKPVAYR (SEQ ID No: 223)
		1863,01	EEIKEVHAGDIAAIGLK (SEQ ID No: 224)
		1966,91	LHYGSYHVDSSSELAFK (SEQ ID No: 225)
		2122,10	VYSGIVNSGDTVLSNVKSQR (SEQ ID No: 226)
Lw531	94	961,44	NRDEWSR (SEQ ID No: 227)
		1167,49	YEGMFSQK + Oxidación (M) (SEQ ID No: 228)
		1257,64	VSVIDENNGRR (SEQ ID No: 229)
		1371,63	VLYPDDSTYSGR (SEQ ID No: 230)
		1383,64	EENDPGLGNGGLGR (SEQ ID No: 231)
		1408,71	IIDAPDNWVPR (SEQ ID No: 232)
		1520,82	NLDYPSFLLALQK (SEQ ID No: 233)
		1668,86	EYADEIWHIKPIR (SEQ ID No: 234)
		1685,79	SYVDTQEVDALYR (SEQ ID No: 235)
		1713,78	GYGIRYEGMFSQK + Oxidación (M) (SEQ ID No: 236)
		1716,81	TLLNIANMGYFSSDR + Oxidación (M) (SEQ ID No: 237)
		1796,92	TSPFSYTSPVVSVDALK (SEQ ID No: 238)
		1832,92	LVEEQYPDDKELLSR (SEQ ID No: 239)
		1844,91	KTLLNIANMGYFSSDR + Oxidación (M) (SEQ ID No: 240)
		2218,12	IAIHLNDTHPVLSIPEMMR + 2 Oxidación (M) (SEQ ID No: 241)
		2426,09	FNQGDYFAAVEDKNHSENVSR (SEQ ID No: 242)
Lw532	88	888,51	YIQAAPVK (SEQ ID No: 243)
		926,46	FNINYTR (SEQ ID No: 244)
		945,53	SGFLIPNAK (SEQ ID No: 245)
		960,54	IGFNIELR (SEQ ID No: 246)
		1171,60	AQYLYVPYR (SEQ ID No: 247)
		1176,57	GLQWQNEFR (SEQ ID No: 248)
		1289,64	ITGWNAQGQTSK (SEQ ID No: 249)

ES 2 588 010 T3

		1332,67	RGLQWQNEFR (SEQ ID No: 250)
		1357,66	EEQVVEVWNAR (SEQ ID No: 251)
		1403,74	IASANQVSTGLTSR (SEQ ID No: 252)
		1418,68	FTSVNPTNPEASR (SEQ ID No: 253)
		1507,73	IYTGPDGTDKNATR (SEQ ID No: 254)
		1578,78	FNVSQVGIYYFSR (SEQ ID No: 255)
		1672,80	QFQVFTAAGNSNAYR (SEQ ID No: 256)
		1735,83	TVTATGDVNYDDPQIK (SEQ ID No: 257)
		2400,17	LLATHYQQDIPASFADNASNPK (SEQ ID No: 258)
		2665,28	VYNPDYQQGISQVGTASWPIADR (SEQ ID No: 259)
Lw533	77	686,37	DIGNIR (SEQ ID No: 260)
		784,49	RIEIVR (SEQ ID No: 261)
		858,41	VSYFDTK (SEQ ID No: 262)
		952,50	AKDYISTR (SEQ ID No: 263)
		1140,65	DLPVSILAGTR (SEQ ID No: 264)
		1155,66	QGVLTLDVGVR (SEQ ID No: 265)
		1170,64	QVPGLTVTGSGR (SEQ ID No: 266)
		1197,57	YYNNSAIEPK (SEQ ID No: 267)
		1402,71	EQTTEGVKLENR (SEQ ID No: 268)
		1408,68	TDDLGDILSFGTR (SEQ ID No: 269)
		1482,73	TALFNWDLAYNR (SEQ ID No: 270)
		1522,71	EYYTPQGIPQDGR (SEQ ID No: 271)
		1550,77	FSSGWLQDEITLR (SEQ ID No: 272)
		1617,74	HSTDTMVTATGNER (SEQ ID No: 273)
		1674,78	QEQTTPGGATESFPQAK (SEQ ID No: 274)
		1745,84	KHSTDTMVTATGNER (SEQ ID No: 275)
		1787,92	GTWQIDSIQSLSANLR (SEQ ID No: 276)
		1819,96	IRFSSGWLQDEITLR (SEQ ID No: 277)
		1851,87	VDMQAMTTTSVNIDQAK (SEQ ID No: 278)
		1940,75	YDNYSGSSDGYADVDADK (SEQ ID No: 279)
		2013,02	QGTDTGHLNSTFLDPALVK (SEQ ID No: 280)
		2017,97	QSNQFNAPNDETISNVLAK (SEQ ID No: 281)
		2056,96	VYSSAATGDHSFGLGASAFGR (SEQ ID No: 282)
		2168,01	VSSSTPQAGYGVNDFYVSYK (SEQ ID No: 283)
		2169,10	LFIESPASHLLTYGTETYK (SEQ ID No: 284)
		2426,25	TRLFIESPASHLLTYGTETYK (SEQ ID No: 285)
		2457,00	YDNYSGSSDGYADVDADKWSSR (SEQ ID No: 286)
		2828,33	VSSSTPQAGYGVNDFYVSYKGQAEAFK (SEQ ID No: 287)
Lw534	73	628,39	IEVIR (SEQ ID No: 288)
		748,43	GTIFRR (SEQ ID No: 289)
		909,42	GGYEDTLR (SEQ ID No: 290)
		930,51	TGGLDISIR (SEQ ID No: 291)
		1291,71	LLDSLALTYGAR (SEQ ID No: 292)
		1370,81	LLKNTNIILDSK (SEQ ID No: 293)
		1440,70	FTQNYANLSAANK (SEQ ID No: 294)
		1478,71	YDNSANQLGTIGAR (SEQ ID No: 295)
		1586,83	EAAASISVISQNELR (SEQ ID No: 296)
		1604,86	GMPSAYTLILVDGIR (SEQ ID No: 297)
		1640,87	LITNASVPQGSGLAGEK (SEQ ID No: 298)

ES 2 588 010 T3

		1654,77	YEYQTTFGGHISPR (SEQ ID No: 299)
		1705,82	DASRVESNTGVLSR (SEQ ID No: 300)
		1707,83	AYLVWDAQDNWTVK (SEQ ID No: 301)
		1757,91	LNWNINEQLSTWLK (SEQ ID No: 302)
		1796,97	LITNASVPQGSGLAGEKR (SEQ ID No: 303)
		1856,01	IREAAASISVISQNELR (SEQ ID No: 451)
		1912,94	INSVSIDNTTSTYTNVGK (SEQ ID No: 304)
		2004,03	DVTLNGAVNNLLDKDFTR (SEQ ID No: 305)
		2072,02	FSFYSSGPAVEDQLGLSLR (SEQ ID No: 306)
		2155,08	NKINSVSIDNTTSTYTNVGK (SEQ ID No: 307)
		2301,07	LDFGTWNSSLSYNQTENIGR (SEQ ID No: 308)
		2395,11	NYNDLAQALSDVEGVDVNSSTGK (SEQ ID No: 309)
		2484,12	AWASSATLEHTFQENTAFGDSSK (SEQ ID No: 310)
		2557,36	WYNNLGSEFKPFSVLNLGVAYK (SEQ ID No: 311)
		2557,36	WYNNLGSEFKPFSVLNLGVAYK (SEQ ID No: 312)
		2675,42	TPTLAQLHNGISGVTGQGTITTIGNPK (SEQ ID No: 313)
		2983,33	DGIVLANNGDEFAQDAWSLFSEDEWR (SEQ ID No: 314)
		3161,51	THIFAVGNNGTTTAGDYFTSSQSTAGYVVPGR (SEQ ID No: 315)
		3184,52	ITLGNDNRDLFGTWNSSLSYNQTENIGR (SEQ ID No: 316)
		3424,79	GGVSTGYKTPTLAQLHNGISGVTGQGTITTIGNPK (SEQ ID No: 317)
		3471,62	LEPESSVNTEVGYYENETGFGANVTLFHNR (SEQ ID No: 318)
Lw535	64	713,42	VPFVPR (SEQ ID No: 319)
		759,42	TVGINTR (SEQ ID No: 320)
		773,40	AATLG DAR (SEQ ID No: 321)
		806,41	YGALMPR (SEQ ID No: 322)
		919,48	GPQGTLYGK (SEQ ID No: 323)
		1023,50	GYIEGGVSSR (SEQ ID No: 324)
		1051,53	SINYLGR (SEQ ID No: 325)
		1102,55	ADATGVELEAK (SEQ ID No: 326)
		1164,56	DMQLYSGPVR (SEQ ID No: 327)
		1186,57	WNQDVQELR (SEQ ID No: 328)
		1199,60	TVDMVFGLYR (SEQ ID No: 329)
		1281,67	TVGINTRIDFF (SEQ ID No: 330)
		1394,68	YGAGSSVNGVIDTR (SEQ ID No: 331)
		1444,73	ADATGVELEAKWR (SEQ ID No: 332)
		1479,70	ATQDAYVGWNDIK (SEQ ID No: 333)
		1545,80	TFPSGSLIVNMPQR (SEQ ID No: 334)
		1667,72	SEFTNDSELYHG NR (SEQ ID No: 335)
		1692,82	ATQDAYVGWNDIKGR (SEQ ID No: 336)
		1730,85	FAPGWSWDINGNVIR (SEQ ID No: 337)
		1789,81	LAPDDQPWEMGFAASR (SEQ ID No: 338)
		1904,85	TYGYMNGSSAVAQVNMGR (SEQ ID No: 339)
		1968,90	ECTRATQDAYVGWNDIK (SEQ ID No: 340)
		1981,02	SAQGGIINIVTQQPDSTPR (SEQ ID No: 341)
		2009,89	SSTQYHGSM LGNPF GDQ GK (SEQ ID No: 342)
		2027,02	LAVNLVGP HYFDGDNQLR (SEQ ID No: 343)

ES 2 588 010 T3

		2058,99	YETADVTLQAATFYTHTK (SEQ ID No: 344)
		2162,17	FNLSGPIQDGLLYGSVTLLR (SEQ ID No: 345)
		2363,13	SEFTNDSELYHGNNRVFPVPR (SEQ ID No: 346)
		2377,30	SKFNLSGPIQDGLLYGSVTLLR (SEQ ID No: 347)
		2819,49	VAQGYKPSGYNIVPTAGLDAKPFVAK (SEQ ID No: 348)
		2929,46	SASANNVSSTVVSAPELSDAGVTASDKLPR (SEQ ID No: 349)
Lw536	60	1010,51	VEDALHATR (SEQ ID No: 350)
		1186,65	VAAVKAPGFGDR (SEQ ID No: 351)
		1230,66	TTLEDLGQAKR (SEQ ID No: 352)
		1237,65	ARVEDALHATR (SEQ ID No: 353)
		1290,65	VGAATEVEMKEK (SEQ ID No: 354)
		1566,87	AAVEEGVVAGGGVALIR (SEQ ID No: 355)
		1604,88	NVVLDSKSGSPTITK (SEQ ID No: 356)
		1620,85	SFGSPTITKDGVSVAR (SEQ ID No: 357)
		1668,75	QQIEDATSDYDKEK (SEQ ID No: 358)
		2020,03	AAHAIALKGDNEDQNVGIK (SEQ ID No: 359)
		2396,29	VVINKDTTIIDGVGDEAAIQGR (SEQ ID No: 360)
Lw537	46	872,51	NLSLLSAR (SEQ ID No: 361)
		1000,53	QVTTPPRAQ (SEQ ID No: 362)
		1179,55	AAADRDAAYEK (SEQ ID No: 363)
		1257,63	NNLDNALESLR (SEQ ID No: 364)
		1299,71	LSQDLAREQIK (SEQ ID No: 365)
		1306,65	DAAYEKINEVR (SEQ ID No: 366)
		1324,65	AIDSLSYTEAQK (SEQ ID No: 367)
		1367,75	TQRPDAVNLLK (SEQ ID No: 368)
		1394,76	YNYLINQLNIK (SEQ ID No: 369)
		1435,73	ASYDTVLAEEVAAR (SEQ ID No: 370)
		1608,93	LKTQRPDAVNLLK (SEQ ID No: 371)
		1615,87	FNVGLVAITDVQNAR (SEQ ID No: 372)
		1779,96	TILDVLTATTNLYQSK (SEQ ID No: 373)
		1951,01	QITGVVYPELASLNVER (SEQ ID No: 374)
		1957,97	AIDSLSYTEAQKQSVYR (SEQ ID No: 375)
		2018,98	QAQYNFVGASELLESAHR (SEQ ID No: 376)
		2098,10	SPLLPQLGLSAGYTHANGFR (SEQ ID No: 377)
		2177,16	QQLADARYNYLINQLNIK (SEQ ID No: 378)
		2709,43	INEVRSPLLPQLGLSAGYTHANGFR (SEQ ID No: 379)
Lw538	44	775,40	HTPPFFK (SEQ ID No: 380)
		836,49	EHILLGR (SEQ ID No: 381)
		904,49	FAIREGGR (SEQ ID No: 382)
		1026,58	AGENVGVLLR (SEQ ID No: 383)
		1072,60	GTVVTGRVER (SEQ ID No: 384)
		1199,66	EGGRTVGAGVVAK (SEQ ID No: 385)
		1231,57	ALEGAEWEAK (SEQ ID No: 386)
		1232,61	GYRPQFYFR (SEQ ID No: 387)
		1289,62	DEGGRHTPPFFK (SEQ ID No: 388)
		1375,63	AFDQIDNAPEEK (SEQ ID No: 389)
		1602,76	AFDQIDNAPEEKAR (SEQ ID No: 390)
		1613,89	VGEEVEIVGIKDTVK (SEQ ID No: 391)

ES 2 588 010 T3

		1709,94	LLDEGRAGENVGVLRL (SEQ ID No: 392)
		1772,87	GITINTSHVEYDTPAR (SEQ ID No: 393)
		1794,95	TKPHVNVGTIGHVDHGK (SEQ ID No: 394)
		1904,95	ELLSAYDFPGDDLPPVR (SEQ ID No: 395)
		1977,01	IIELAGYLDSEIPEPER (SEQ ID No: 396)
		2000,01	ARGITINTSHVEYDTPAR (SEQ ID No: 397)
Lw683	37	690,4064	VGFAGLK (SEQ ID No: 398)
		893,4606	ANAYTGGLK (SEQ ID No: 399)
		910,4330	GNGMLTYR (SEQ ID No: 400)
		1049,5617	RANAYTGGLK (SEQ ID No: 401)
		1114,4931	SSDAAGFADK (SEQ ID No: 402)
		1119,4906	NMSTYVDYK (SEQ ID No: 403)
		1121,4697	NGSSSETNNGR (SEQ ID No: 404)
		1197,5084	NLDGDQSYMR (SEQ ID No: 405)
		1262,5567	FADYGSLDYGR (SEQ ID No: 406)
		1307,6146	IDGLHYFSDNK (SEQ ID No: 407)
		1319,7085	INLLDKNDFTK (SEQ ID No: 408)
		1422,6739	TTAQNDLQYGQ GK (SEQ ID No: 409)
		1436,6976	YVDIGATYFFNK (SEQ ID No: 410)
		1490,6022	AENEDGNHDSFTR (SEQ ID No: 411)
		1533,8038	GKDIGIYGDQDLLK (SEQ ID No: 412)
		1578,7750	TTAQNDLQYGQ GK (SEQ ID No: 413)
		2245,1167	NTNFFGLVDGLNFALQYQ GK (SEQ ID No: 414)
		2367,1131	YDANNVYLAANYTQTYNLTR (SEQ ID No: 415)
		2487,1124	IDGLHYFSDNKNLDGDQSYMR (SEQ ID No: 416)
		2684,2718	GETQITDQLTGYGQWEYQVNLNK (SEQ ID No: 417)
		2979,5242	AHNIEWAQYQDFGLRPSVAYLQSK (SEQ ID No: 418)
		3292,4764	GVDQNGDGYGMSLSYDLGWGVSASAAMASSLR (SEQ ID No: 419)
Lw541	31	1019,58	ALASNILYR (SEQ ID No: 420)
		1074,51	SDPGAAPFWK (SEQ ID No: 421)
		1202,61	KSDPGAAPFWK (SEQ ID No: 422)
		1247,61	IFNLVDENER (SEQ ID No: 423)
		1321,58	MYNIDYNSFR (SEQ ID No: 424)
		1403,64	AWHAGVSYWDGR (SEQ ID No: 425)
		1786,80	ALYDAGIGAWYDDETK (SEQ ID No: 426)
		1990,03	FPDITPVNWGHSDIAPGR (SEQ ID No: 427)
		2090,99	YGYDTSGAVSEVGYNQLIR (SEQ ID No: 428)
		2118,12	FPDITPVNVVGHSDIAPGRK (SEQ ID No: 429)
Lw542	31	1142,58	SDPGPLFPWK (SEQ ID No: 430)
		1298,68	SDPGPLFPWKR (SEQ ID No: 431)
		1307,76	AIALQLVPEAQR (SEQ ID No: 432)
		1340,64	AWHAGVSSWQGR (SEQ ID No: 433)
		1370,68	IPQNGQLDTETR (SEQ ID No: 434)
		1578,77	GTYQIDTHYPSVAK (SEQ ID No: 435)
		1779,95	GAASVAVIQQALAAAYGYK (SEQ ID No: 436)
		1789,94	FLVLHYTAVGDAESLR (SEQ ID No: 437)
		1953,00	YNISPSDVVAHSDIAPLR (SEQ ID No: 438)
		2190,12	NNLNDTSIGIEIVNLGFTEK (SEQ ID No: 439)

		2630,38	AIALQLVPEAQRAWHAGVSSWQGR (SEQ ID No: 440)
Lw544	20	806,42	LIDGDFK (SEQ ID No: 441)
		1113,50	GFEESVDGFK (SEQ ID No: 442)
		1209,60	VGWMLGAGYR (SEQ ID No: 443)
		1243,58	FSSIFGQSESR (SEQ ID No: 444)
		1258,63	YYSVTAGPVFR (SEQ ID No: 445)
		1269,60	RGFEESVDGFK (SEQ ID No: 446)
		1356,66	VGWMLGAGYRF (SEQ ID No: 447)
		1789,94	INEYVSLYGLLGAGHGK (SEQ ID No: 448)
		2002,92	YEFNNDWGVIGSFAQTR (SEQ ID No: 449)
		2988,43	TSLAYGAGLQFNPHNPFVIDASYEYSK (SEQ ID No: 450)

1. Peso molecular determinado por SDS-PAGE.

2. La masa de un fragmento de polipéptido se puede convertir a valor m/z añadiendo 1 a la masa. Cada masa incluye un intervalo de más o menos 1 Da o más o menos 300 ppm.

- En otro aspecto más, la presente divulgación incluye además polipéptidos que tienen una similitud con una secuencia de aminoácidos. La similitud se refiere a una similitud estructural y generalmente se determina alineando los restos de las dos secuencias de aminoácidos (es decir, una secuencia de aminoácidos candidata y una secuencia de aminoácidos de referencia) para optimizar el número de aminoácidos idénticos a lo largo de las longitudes de sus secuencias; se permiten huecos en cualquiera o en ambas secuencias al hacer el alineamiento con el fin de optimizar el número de aminoácidos idénticos, aunque los aminoácidos de cada secuencia sin embargo se mantienen en el orden adecuado. Las secuencias de aminoácidos de referencia se desvelan en la Tabla 3 y Tabla 4. Se pueden comparar dos secuencias de aminoácidos utilizando algoritmos disponibles en el mercado.
- Preferentemente, se comparan dos secuencias de aminoácidos utilizando el programa Blastp del algoritmo de búsqueda BLAST 2, como describe Tatusova, et al., (FEMS Microbiol Lett 1999, 174:247-250), y que está disponible en internet, por ejemplo en el sitio de internet que mantiene el Centro Nacional de Información Biotecnológica, Institutos Nacionales de Salud. Preferentemente, se utilizan los valores por defecto de todos los parámetros de búsqueda del BLAST 2, que incluyen matriz = BLOSUM62; penalización de hueco abierto = 11, penalización de hueco de extensión = 1, x_disminución hueco = 50, esperado = 10, tamaño de palabra = 3, y opcionalmente filtro conectado. En la comparación de dos secuencias de aminoácidos utilizando el algoritmo de búsqueda BLAST, se hace referencia a la similitud estructural como "identidades". Preferentemente una secuencia de aminoácidos candidata tiene al menos un 90 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 % de identidad, al menos un 97 % de identidad, al menos un 98 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad con respecto a una secuencia de aminoácido de referencia. Preferentemente, el peso molecular de la secuencia de aminoácidos candidata y la secuencia de aminoácidos de referencia son sustancialmente del mismo valor. Preferentemente, el peso molecular de la secuencia de aminoácidos candidata y la secuencia de aminoácidos de referencia se determina por electroforesis en gel de SDS poliacrilamida. Un polipéptido candidato puede obtenerse cultivando un microbio en condiciones metálicas bajas y aislando posteriormente un polipéptido por los procedimientos desvelados en el presente documento.

Tabla 3.

Peso molecular del polipéptido de referencia (kDa) ¹	Identificador de secuencia NCBI del polipéptido por el algoritmo de computadora que tiene la mejor coincidencia con la huella de masa del polipéptido de referencia	SEQ ID NO:
268	23630568, adhesina YadA	1
83	282049, precursor receptor hemina	2
83	49114, receptor ferricromo FcuA	3
79	565634, receptor ferrioxamina	4
70	517386, precursor FyuA	5
66	77958488, receptor de membrana externa para ferrienteroquelina y colicinas	6
45	23630568, adhesina YadA	7
37	77956419, Proteína de membrana externa (porina)	8
31	48605, proteína YlpA	9

1. El peso molecular se determina por SDS-PAGE.

Tabla 4.

Peso molecular del polipéptido de referencia (kDa) ¹	Identificador de secuencia NCBI del polipéptido por el algoritmo de computadora que tiene la mejor coincidencia con la huella de masa del polipéptido de referencia	SEQ ID NO:
104	22125915, acetaldehído deshidrogenasa unida a CoA	10
99	51597993, factor G de elongación	11
94	15981846, glucógeno fosforilasa	12
88	45443416, precursor proteico de tolerancia a disolventes orgánicos	13
77	22124457, receptor de membrana externa dependiente de TonB	14
73	51595142, supuesto receptor de sideróforo férrico exógeno; adhesina Iha	15
64	22126288, receptor de la membrana externa de pesticina/Yersiniabactina	16
60	51594757, chaperonina GroEL	17
46	22127390, precursor proteico del canal de membrana externa	18
44	51597992, factor de elongación Tu	19
37	77633559, Proteína de membrana externa (porina)	20
31	22125738, supuesto regulador	21
31	22125770, supuesto regulador	22
20	22125223, proteína X de membrana externa	23
1. El peso molecular se determina por SDS-PAGE.		

Normalmente, una secuencia de aminoácidos candidata que tenga una similitud estructural con respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia tiene actividad inmunogénica, actividad inmunogénica protectora, actividad serorreactiva, actividad inmunorreguladora, o una combinación de las mismas.

Los polipéptidos que expresa un microbio de referencia y a los que se hace referencia anteriormente por el peso molecular se pueden obtener cultivando el microbio de referencia en condiciones metálicas bajas y aislando posteriormente un polipéptido por el proceso desvelado en el presente documento. Un polipéptido candidato es aislable de un microbio, preferentemente de un microbio gram negativo, más preferentemente, un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, preferentemente un miembro del género *Yersinia*, tal como *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, o *Y. pestis*. Un polipéptido candidato puede producirse también utilizando técnicas recombinantes, enzimáticas, o químicas.

También se proporcionan en la presente divulgación preparaciones de células completas de un microbio, en las que el microbio expresa uno o más de los polipéptidos de la presente divulgación. Las células presentes en una preparación de células completas están preferentemente inactivadas de manera que las células no se pueden replicar, pero se mantiene la actividad inmunogénica de los polipéptidos de la presente divulgación que expresa el microbio. Normalmente, las células se destruyen por exposición a agentes tales como glutaraldehído, formalina, o formaldehído.

Una composición de la presente divulgación puede incluir al menos un polipéptido descrito en el presente documento, o un número de polipéptidos que es un entero mayor de 1 (por ejemplo, al menos 2, al menos 3, al menos 4). En algunos aspectos, una composición puede incluir al menos 2 polipéptidos regulados por metales y al menos dos polipéptidos cuya expresión no está influenciada significativamente por la presencia de un metal. Por ejemplo, cuando los polipéptidos son aislables de *Y. enterocolitica*, una composición puede incluir 2, 3, 4, 5 o más polipéptidos aislados regulados por metales que tienen pesos moleculares de 268 kDa, 83 kDa, 79 kDa, 70 kDa, 66 kDa, 45 kDa, o cualquier subgrupo o combinación de los mismos, y dos polipéptidos aislados que tengan un peso molecular de 92 kDa, 54 kDa, 40 kDa, 37 kDa, 31 kDa, 28 kDa, o cualquier subgrupo o combinación de los mismos. En otro ejemplo, cuando los polipéptidos son aislables de *Y. pestis*, una composición puede incluir 2, 3, 4, 5, o más polipéptidos aislados regulados por metales que tengan pesos moleculares de 254 kDa, 94 kDa, 88 kDa, 77 kDa, 73 kDa, 64 kDa, 31 kDa, 28 kDa, 20 kDa, o cualquier subgrupo o combinación de los mismos, y dos polipéptidos que tengan pesos moleculares de 104 kDa, 99 kDa, 60 kDa, 44 kDa, 46 kDa, 37 kDa, 36 kDa, o cualquier subgrupo o combinación de los mismos. Una composición puede incluir polipéptidos aislables de 1 microbio, o pueden ser aislables de una combinación de 2 o más microbios. Por ejemplo una composición puede incluir polipéptidos aislables de 2 o más *Yersinia* spp., de 2 o más cepas de *Y. enterocolitica*, o de una *Yersinia* spp. y un microbio diferente que no sea miembro del género *Yersinia*. La presente invención también proporciona composiciones que comprenden una preparación de células completas de una cepa 27729 de la ATCC de *Yersinia enterocolitica* o una cepa KIM6+ de *Y. pestis*, como se define en las reivindicaciones.

Opcionalmente, un polipéptido de la presente invención puede unirse o conjugarse covalentemente a un polipéptido portador para mejorar las propiedades inmunológicas del polipéptido. Los polipéptidos portadores útiles se conocen en la técnica. Por ejemplo, un polipéptido de la presente divulgación se podría acoplar a inmunógenos conocidos de la membrana externa de *Yersinia* tales como el antígeno F1 o el antígeno V. Al igual, se podrían conjugar componentes de polisacáridos a las proteínas de la presente divulgación para aumentar el efecto protector de las composiciones. El acoplamiento químico de polipéptidos de la presente divulgación se pueden llevar a cabo utilizando métodos conocidos y de rutina. Por ejemplo, pueden utilizarse varios reactivos reticuladores homobifuncionales y heterobifuncionales tales como bis (sulfosuccinimidil) suberato, bis (diazobencidina), dimetil adipimidato, dimetil pimelimidato, dimetil superimidato, disuccinimidil suberato, glutaraldehído, m-maleimidobenzoyl-N hidroxisuccinimida, sulfo-m-maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimida, sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, sulfosuccinimidil 4-(p-maleimido-fenil) butirato y (1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodimida (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, en general y capítulo 5, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, NY (1988)).

Preferentemente, dichas composiciones de la presente invención incluyen concentraciones bajas de lipopolisacáridos (LPS). El LPS es un componente de la membrana externa de la mayoría de los microbios gram negativos (véase, por ejemplo, Nikaido y Vaara, *Outer Membrane*, En: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology, Neidhardt et al., (eds.) American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 7-22 (1987), y normalmente incluye polisacáridos (de cadena específica O, núcleo externo e interno) y la región lipídica A. El componente lipídico A de los LPS es el componente más activo de la estructura de los LPS y juntos inducen un amplio intervalo de efectos patofisiológicos en mamíferos. Los efectos más dramáticos son fiebre, coagulación intravascular diseminada, activación del complemento, choque hipotensivo, y muerte. La actividad inmunoestimulante no específica de los LPS puede aumentar la formación de un granuloma en el sitio de la administración de composiciones que contengan LPS.

La concentración de LPS se puede determinar utilizando métodos de rutina que se conocen en la técnica. Dichos métodos normalmente incluyen la medición de un colorante unido al LPS (véase, por ejemplo, *Endotoxins and Their Detection With the Limulus Amebocyte Lysate Test*, Alan R. Liss, Inc., 150 Quinta Avenida, New York, NY (1982)). Hay cuatro métodos básicos disponibles en el mercado que se utilizan normalmente en un ensayo LAL; el ensayo gel-clot; el ensayo turbidimétrico (espectrofotométrico); el ensayo colorimétrico; y el ensayo cromogénico. Un ejemplo de ensayo gel-clot está disponible por la marca registrada E-TOXATO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; véase el Boletín Técnico N° 210 de Sigma), y PYROTELL (Associates of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA). Normalmente, las condiciones de ensayo incluyen poner en contacto la composición con una preparación que contiene un lisado de amebocitos circulantes del cangrejo de herradura, *Limulus polyphemus*. Cuando se expone a LPS, el lisado aumenta en opacidad así como en viscosidad y puede gelificarse. Se añaden aproximadamente 0,1 mililitros de la composición al lisado. Normalmente, el pH de la composición está entre 6 y 8, preferentemente, entre 6,8 y 7,5. La mezcla de la composición y el lisado se incuba durante aproximadamente 1 hora en reposo a aproximadamente 37 °C. Tras la incubación, la mezcla se observa para determinar si hubo gelificación de la mezcla. La gelificación indica la presencia de la endotoxina. Para determinar la cantidad de endotoxina presente en la composición se hacen diluciones de una solución referenciada de endotoxina y se ensaya al mismo tiempo que la composición que se ensaya. Las soluciones referenciadas de endotoxina están disponibles en el comercio en, por ejemplo, Sigma Chemical (Catálogo N° 210-SE), U.S. Pharmacopeia (Rockville, MD, Catálogo N° 235503), y Associates of Cape Cod, Inc., (Catálogo N° E0005). En general, cuando se prepara una composición de la presente invención aislando polipéptidos de un microbio por un método que se describe en el presente documento (por ejemplo, un método que incluye la destrucción y solubilización de las células, y la recolección de polipéptidos insolubles), la cantidad de LPS en una composición de la presente invención es menor que la cantidad de LPS presente en una mezcla de la misma cantidad de microbio que se ha destruido en las mismas condiciones pero no se ha solubilizado. Normalmente, el nivel de LPS en una composición de la presente invención disminuye, en orden creciente de preferencia, al menos en un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, o al menos un 90 % con respecto al nivel de LPS en una composición preparada por destrucción, pero sin solubilización del mismo microbio.

Las composiciones de la presente invención incluyen además opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, vehículo, excipiente, sal, etc., que es compatible con los otros ingredientes de la composición, y no son perjudiciales para el receptor del mismo. Normalmente, la composición incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable cuando se utiliza la composición como se describe en el presente documento. Las composiciones de la presente invención pueden formularse en preparaciones farmacéuticas con varias formas adaptadas a la vía de administración escogida, que incluye las vías adecuadas para la estimulación de una respuesta inmunitaria contra un antígeno. Por lo tanto, una composición de la presente invención se puede administrar por vías conocidas que incluyen, por ejemplo, la oral; parenteral que incluye la intradérmica, transcutánea, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, etc., y tópica, tal como, intranasal, intrapulmonar, intramamaria, intravaginal, intrauterina, intradérmica, transcutánea y rectal, etc. se prevé que la composición puede administrarse en una superficie mucosa, tal como la administración en la mucosa nasal o respiratoria (por ejemplo, por pulverización o aerosol), para estimular la inmunidad en la mucosa, tal como la producción de anticuerpos IgA secretorios, a lo largo del cuerpo del animal.

Una composición de la presente invención también se puede administrar por medio de un implante de liberación retardada o sostenida. Los implantes adecuados para su uso de acuerdo con la invención se conocen e incluyen, por ejemplo, los que se desvelan en Emery y Straub (documento WO 01/37810 (2001)), y Emery et al., (documento WO 96/01620 (1996)). Los implantes se pueden producir de un tamaño lo suficientemente pequeño para administrarse por aerosol o pulverización. Los implantes incluyen también nanoesferas y microesferas.

Una composición de la presente invención se puede administrar en una cantidad suficiente para tratar ciertas afecciones como se describe en el presente documento. La cantidad de polipéptidos o células completas presentes en una composición de la presente invención puede variar. Por ejemplo, la dosificación de polipéptidos puede estar entre 0,01 microgramos (μg) y 300 mg, normalmente entre 0,1 mg y 10 mg. Cuando la composición es una preparación de células completas las células pueden estar presentes a una concentración, por ejemplo, de 10^2 bacterias/ml, 10^3 bacterias/ml, 10^4 bacterias/ml, 10^5 bacterias/ml, 10^6 bacterias/ml, 10^7 bacterias/ml, 10^8 bacterias/ml, o 10^9 bacterias/ml. Para una composición inyectable (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, etc.) los polipéptidos pueden estar presentes en la composición en una cantidad tal que el volumen total de la composición que se administra sea de 0,5 ml a 5,0 ml, normalmente de 1,0-2,0 ml. Cuando la composición es una preparación de células completas, las células están presentes preferentemente en la composición en una cantidad tal que el volumen total de la composición que se administra es de 0,5 ml a 5,0 ml, normalmente de 1,0-2,0 ml. La cantidad administrada variará dependiendo de varios factores que incluyen pero no se limitan a, los polipéptidos específicos escogidos, el peso, estado físico y la edad del animal y la vía de administración. Por lo tanto, el peso absoluto del polipéptido que se incluye en una forma unitaria de dosificación determinada puede variar ampliamente, y depende de factores tales como la especie, edad, peso y estado físico del animal, así como el método de administración. Dichos factores se pueden determinar por un experto en la técnica. Otros ejemplos de dosificaciones adecuadas para la invención se desvelan en Emery et al., (Patente de EE. UU. 6.027.736).

Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos para preparar una composición que incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen la etapa de poner en asociación el compuesto activo (por ejemplo, un polipéptido de la divulgación o la célula completa de la composición de la presente invención) con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente el compuesto activo con un vehículo líquido, un vehículo sólido dividido finamente, o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto en las formulaciones deseadas.

Una composición que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir también un adyuvante. Un "adyuvante" se refiere a un agente que puede actuar de una manera no específica para aumentar una respuesta inmunitaria contra un antígeno particular, por lo tanto reduciendo potencialmente la cantidad de antígeno necesario en cualquier composición inmunizante determinada, y/o la frecuencia de inyecciones necesarias con el fin de generar una respuesta inmunitaria adecuada contra el antígeno de interés. Los adyuvantes pueden incluir, por ejemplo, IL-1, IL-2, emulsionantes, muramil dipéptidos, bromuro de dimetildiocradecilamonio (DDA), avridina, hidróxido de aluminio, aceites, saponinas, alfa-tocoferol, polisacáridos, parafinas emulsionadas (incluyendo, por ejemplo, las que están disponibles con la marca registrada EMULSIGEN de MVP Laboratories, Ralston, Nebraska), ISA-70, RIBI y otras sustancias conocidas en la técnica. Se espera que los polipéptidos de la presente divulgación tendrán actividad inmunorreguladora, y que dichos polipéptidos se pueden utilizar como adyuvantes que actúan directamente como activadores de células B y/o T o actúan sobre tipos celulares específicos que aumentan la síntesis de varias citocinas o activan las rutas de señalización intracelular. Se espera que dichos polipéptidos aumenten la respuesta inmunitaria para aumentar el índice de protección de la composición existente.

En otra realización, una composición de la invención que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye un modificador de la respuesta biológica, tal como, por ejemplo, IL-2, IL-4 y/o IL-6, TNF, IFN-alfa, IFN-gamma, y otras citocinas que tienen efecto sobre células inmunitarias. Una composición inmunizante también puede incluir otros componentes conocidos en la técnica tales como un antibiótico, un conservante, un antioxidante, o un agente quelante.

La presente divulgación también proporciona métodos para obtener los polipéptidos que se describen en el presente documento. Los polipéptidos de la presente divulgación y las células completas de la composición de la presente invención son aislables de *Yersinia* spp. Los ejemplos preferidos incluyen *Y. enterocolitica*, *Y. pestis*, y *Y. pseudotuberculosis*. Los microbios útiles para obtener los polipéptidos de la presente divulgación y para hacer las preparaciones de células completas de la presente invención están disponibles fácilmente. En el contexto de la presente invención, las células completas se aíslan de una cepa 27729 de la ATCC de *Yersinia enterocolitica* o de la cepa KIM6+ de *Yersinia pestis*. Además, dichos microbios se aíslan fácilmente por técnicas de rutina y se conocen en la técnica. Los microbios se pueden derivar de un animal infectado como un aislado de campo, y se utilizan para obtener polipéptidos de la presente divulgación y/o preparaciones de células completas de la presente invención, o se almacenan para su uso futuro, por ejemplo, en un almacén a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$, en medios bacteriológicos que contienen un 20 % de glicerol, y otros medios similares.

Cuando un polipéptido de la presente divulgación se va a obtener de un microbio, el microbio se puede incubar en condiciones metálicas bajas. Como se utiliza en el presente documento "condiciones metálicas bajas" se refieren a

un entorno, normalmente un medio bacteriológico, que contiene cantidades de un metal libre que hace que el microbio exprese o aumente la expresión de polipéptidos regulados por metales. Como se utiliza en el presente documento, la frase "condiciones metálicas altas" se refiere a un entorno que contiene cantidades de un metal libre que hace que un microbio no exprese a un nivel detectable uno o más polipéptidos regulados por metales descritos en el presente documento, o disminuya la expresión de dicho polipéptido. Los metales son los presentes en la tabla periódica en los Grupos 1 a 17 (notación de la IUPAC; a los que se hace referencia también como Grupos I-A, II-A, III-B, IV-B, V-B, VI-B, VII-B, VIII, I-B, II-B, III-A, IV-A, V-A, VI-A, y VII-A, respectivamente, según la notación CAS). Preferentemente, los metales son los de los Grupos 2 a 12, más preferentemente, Grupos 3-12. Incluso más preferentemente, el metal es hierro, zinc, cobre, magnesio, níquel, cobalto, manganeso, molibdeno, o selenio, más preferentemente, el hierro.

Las condiciones metálicas bajas en general son el resultado de la adición de un compuesto quelante de metales a un medio bacteriológico, o el uso de medios bacteriológicos formulados para que contengan bajas cantidades de un metal. Las condiciones metálicas altas en general están presentes cuando no está presente un quelante en el medio, se añade un metal al medio, o la combinación de los mismos. Ejemplos de quelantes metálicos incluyen compuestos naturales o sintéticos. Ejemplos de compuestos naturales incluyen compuestos fenólicos vegetales, tales como los flavonoides. Ejemplos de flavonoides incluyen los quelantes del cobre catequina y naringenina, y los quelantes del hierro miricetina y quercetina. Ejemplos de quelantes sintéticos del cobre incluyen, por ejemplo, tetratiomolibdato, y ejemplos de quelantes sintéticos del zinc incluyen, por ejemplo, N,N,N',N'-Tetrakis (2-piridilmetil)-etileno diamina. Ejemplos de quelantes sintéticos del hierro incluyen 2,2'-dipiridilo (al que se hace referencia en la técnica también como 2,2'-bipiridilo), 8-hidroxiquinolina, ácido etilendiamina-di-O-hidroxifenilacético (EDDHA), metanosulfonato de desferrioxamina (desfenol), transferrina, lactoferrina, ovotransferrina, sideróforos biológicos, tales como, los catecolatos e hidroxamatos, y citrato. Preferentemente se utiliza el 2,2'-dipiridilo para la quelación del hierro. Normalmente, el 2,2'-dipiridilo se añade a los medios a una concentración de al menos 0,0025 microgramos/mililitro ($\mu\text{g/ml}$), al menos 0,025 $\mu\text{g/ml}$, o al menos 0,25 $\mu\text{g/ml}$, y generalmente no más de 10 $\mu\text{g/ml}$, no más de 20 $\mu\text{g/ml}$, o no más de 30 $\mu\text{g/ml}$.

Se espera que una *Yersinia* spp. con una mutación en un gen *fur* dará como resultado la expresión constitutiva de muchos, si no todos, los polipéptidos regulados por hierro de la presente divulgación. La producción de una mutación *fur* en una *Yersinia* spp. puede producirse utilizando métodos de rutina que incluyen, por ejemplo, mutagénesis por transposón, química o dirigida al sitio útiles para generar mutaciones de desactivación génica en bacterias gram negativas.

El medio que se utiliza para incubar el microbio y el volumen de los medios que se utilizan para incubar el microbio pueden variar. Cuando se evalúa un microbio en cuanto a su habilidad para producir uno o más de los polipéptidos descritos en el presente documento, el microbio puede cultivarse en un volumen adecuado, por ejemplo de 10 mililitros a 1 litro de medio. Cuando un microbio se va a cultivar para obtener polipéptidos para su uso, por ejemplo, en la administración a animales, el microbio se puede cultivar en un fermentador para permitir el aislamiento de mayores cantidades de polipéptidos. Los métodos para cultivar microbios en un fermentador son de rutina y se conocen en la técnica. Las condiciones que se utilizan para cultivar un microbio incluyen preferentemente un quelante de metales, más preferentemente un quelante del hierro, por ejemplo, el 2,2'-dipiridilo, un pH de entre 6,5 y 7,5, preferentemente entre 6, 9 y 7,1 y una temperatura de 37 °C.

En algunos aspectos de la divulgación, se puede recolectar un microbio tras el cultivo. La recolección incluye la concentración del microbio en un volumen más pequeño y la suspensión en un medio diferente del medio de cultivo. Los métodos para concentrar un microbio son de rutina y se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, filtración o centrifugación. Normalmente, el microbio concentrado se suspende en cantidades decrecientes de tampón. Preferentemente, el tampón final incluye un quelante de cationes, preferentemente, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Un ejemplo de un tampón que se puede utilizar contiene base-Tris (7,3 gramos/litro) y EDTA (0,9 gramos/litro), a un pH de 8,5. Opcionalmente, el tampón final también minimiza la degradación proteolítica. Esto se puede conseguir manteniendo el tampón final a un pH mayor de 8,0, preferentemente, al menos 8,5, y/o incluyendo uno o más inhibidores de proteinasas (por ejemplo, fluoruro de fenilmetanosulfonilo). Opcionalmente, y preferentemente, el microbio concentrado se congela a -20 °C o por debajo hasta su destrucción.

Cuando el microbio se va a utilizar como una preparación de células completas, las células recolectadas se pueden procesar utilizando métodos de rutina conocidos para inactivar las células. De manera alternativa, cuando se va a utilizar un microbio para preparar polipéptidos de la presente divulgación, el microbio se puede destruir utilizando métodos químicos, físicos o mecánicos de rutina y conocidos en la técnica, que incluyen por ejemplo, la prensa francesa, sonicación, u homogeneización. Preferentemente, se utiliza la homogeneización. Un ejemplo de dispositivo adecuado útil para la homogeneización es un Homogeneizador Avestin modelo C500, (Avestin Inc, Ottawa Canadá). Como se utiliza en el presente documento "destrucción" se refiere a la rotura de la célula. La destrucción de un microbio se puede medir por métodos que son de rutina y se conocen en la técnica, que incluyen, por ejemplo, cambios en la densidad óptica. Normalmente, un microbio se somete a destrucción hasta que el porcentaje de transmitancia aumenta un 20 % cuando se mide en una dilución 1:100. La temperatura durante la destrucción se mantiene normalmente baja, preferentemente a 4 °C, para minimizar más la degradación proteolítica.

El microbio destruido se solubiliza en un detergente, por ejemplo, un detergente aniónico, zwitteriónico, no iónico, o catiónico. Preferentemente, el detergente es la sarcosina, más preferentemente, lauroil sarcosinato sódico. Como se utiliza en el presente documento, el término "solubilizar" se refiere a disolver materiales celulares (por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos) en una fase acuosa del tampón en el que se destruye el microbio, y la formación de agregados de materiales celulares insolubles. Las condiciones para la solubilización preferentemente dan como resultado la agregación de polipéptidos de la presente divulgación en agregados insolubles que son lo suficientemente grandes para permitir un aislamiento fácil, por ejemplo, por centrifugación.

Se observan normalmente disminuciones de los LPS cuando se solubiliza el microbio destruido en niveles más altos de sarcosina, se solubiliza durante periodos más largos, o la combinación de los mismos. Preferentemente, la sarcosina se añade de manera que la proporción final de sarcosina respecto a gramo de peso del microbio destruido sea entre 1,0 gramos de sarcosina por 4,5 gramos de masa de aglomerado y 6,0 gramos de sarcosina por 4,5 gramos de masa de aglomerado, preferentemente, 4,5 gramos de sarcosina por 4,5 gramos de masa de aglomerado. La solubilización del microbio se puede medir por métodos que son de rutina y conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, cambios en la densidad óptica. Normalmente, se permite que se produzca la solubilización durante al menos 24 horas, preferentemente, al menos 48 horas, más preferentemente, al menos 72 horas, más preferentemente, al menos 96 horas. La temperatura durante la destrucción normalmente se mantiene baja, preferentemente a 4 °C.

Los agregados insolubles que incluyen uno o más de los polipéptidos de la presente divulgación se pueden aislar por métodos que son de rutina y conocidos en la técnica. Preferentemente, los agregados insolubles se aíslan por centrifugación. Normalmente, la centrifugación de polipéptidos que son insolubles en detergentes necesita fuerzas de al menos 50.000 x g, normalmente 100.000 x g. El uso de dichas fuerzas centrífugas necesita el uso de ultracentrífugas, y el aumento a escala para procesar grandes volúmenes de muestra a menudo es difícil y antieconómico con estos tipos de centrífugas. Los métodos descritos en el presente documento proporcionan la producción de agregados insolubles lo suficientemente grandes como para permitir el uso de fuerzas centrífugas significativamente más bajas (por ejemplo, 46.000 x g). Los métodos para procesar grandes volúmenes a estas fuerzas centrífugas más bajas están disponibles y se conocen en la técnica. Por lo tanto, los agregados insolubles se pueden aislar a un coste significativamente menor. Ejemplos de dispositivos adecuados para la centrifugación de grandes volúmenes incluyen T-1 Sharples, (Alfa Laval Separations, Warminster, PA) y centrífugas de alta velocidad Hitachi Himac CC40 (Hitachi-Koki Co, Tokyo, Japón).

Opcional y preferentemente, la sarcosina se retira de los polipéptidos aislados. Los métodos para retirar la sarcosina de los polipéptidos aislados se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, diafiltración, precipitación, cromatografía hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico, o cromatografía por afinidad, y la ultra filtración y lavado de los polipéptidos en alcohol por diafiltración. Tras el aislamiento, los polipéptidos se suspenden en el tampón y se almacenan a baja temperatura, por ejemplo, -20 °C.

Los polipéptidos de la presente divulgación pueden obtenerse también de miembros del género *Yersinia* utilizando métodos que se conocen en la técnica. El aislamiento de los polipéptidos se puede conseguir como se describe por ejemplo, en Emery et al., (Patente de EE. UU. 5.830.479) y Emery et al., (Solicitud de Patente de EE. UU. US 20030036639 A1).

En los aspectos de la presente invención cuando se va a hacer una preparación de células completas, se pueden utilizar métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, tras el cultivo de un microbio se puede destruir con la adición de un agente tal como el glutaraldehído, formalina, o formaldehído, a una concentración suficiente para inactivar las células del cultivo. Por ejemplo, se puede añadir formalina a una concentración del 3 % (vol:vol). Después de un periodo suficiente para inactivar las células, se pueden recolectar las células, por ejemplo, por diafiltración y/o centrifugación, y se lavan.

Un aspecto de la presente divulgación se refiere adicionalmente a métodos para utilizar las composiciones de la presente invención. Los métodos incluyen la administración a un animal de una cantidad eficaz de una composición de la presente invención. El animal puede ser, por ejemplo, aves (incluyendo, por ejemplo, pollos o pavos), bovinos (incluyendo, por ejemplo ganado bovino), caprinos (incluyendo, por ejemplo, cabras), ovinos (incluyendo, por ejemplo, ovejas), porcinos (incluyendo por ejemplo, cerdos), bisontes (incluyendo, por ejemplo, búfalos), un animal de compañía (incluyendo, por ejemplo, gatos, perros y caballos), miembros de la familia Cervidae (incluyendo, por ejemplo, ciervos, alces, alces americanos, caribús, y renos), peces (incluyendo, por ejemplo, salmones o truchas), crustáceos (incluyendo, por ejemplo, langosta, cangrejo, o gamba), miembros de la familia Muridae (incluyendo, por ejemplo, ratas o ratones), o seres humanos.

En algunos aspectos, los métodos pueden incluir además administraciones adicionales (por ejemplo, una o más administraciones de refuerzo) de la composición al animal para aumentar o estimular una respuesta inmunitaria secundaria. Se puede administrar un refuerzo en un tiempo tras la primera administración, por ejemplo, de 1 a 8 semanas, preferentemente de 2 a 4 semanas, tras la primera administración de la composición. Se pueden administrar refuerzos posteriores una, dos, tres, cuatro o más veces anualmente. Sin pretender quedar limitados por

teoría alguna, en algunos aspectos de la presente divulgación se espera que los refuerzos anuales no serán necesarios, ya que el animal será desafiado en el campo por exposición a microbios que expresen polipéptidos presentes en las composiciones que tienen epítomos que son idénticos a o relacionados estructuralmente con los epítomos presentes sobre los polipéptidos de la composición que se administró al animal.

5 En un aspecto, la divulgación se refiere a métodos para producir anticuerpos, tal como para inducir la producción de un anticuerpo en un animal, o por técnicas recombinantes. El anticuerpo que se produce incluye anticuerpos que se unen específicamente al menos a un polipéptido presente en la composición. En este aspecto de la divulgación, una “cantidad eficaz” es una cantidad eficaz que da como resultado la producción de anticuerpos en el animal. Los
10 métodos para determinar si un animal ha producido anticuerpos que se unan específicamente a los polipéptidos presentes en una composición de la presente divulgación se pueden determinar como se ha descrito en el presente documento. La presente divulgación incluye además anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de la presente divulgación, y composiciones que incluyen dichos anticuerpos.

15 El método se puede utilizar para producir anticuerpos que se unan específicamente a los polipéptidos expresados por un microbio distinto del microbio del cual se aíslan los polipéptidos de la composición. Como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo que se puede “unir específicamente” a un polipéptido es un anticuerpo que interactúa con el epítomo del antígeno que induce la síntesis del anticuerpo, o interactúa con un epítomo relacionado estructuralmente. Al menos algunos de los polipéptidos presentes en las composiciones de la presente invención
20 incluyen normalmente epítomos que se conservan en los polipéptidos de diferentes especies de microbios. En consecuencia, un anticuerpo producido que se utiliza en una composición derivada de un microbio se espera que se una a polipéptidos expresados por otros microbios y proporcione una protección de amplio espectro contra organismos gram negativos. Ejemplos de microbios gram negativos a los que el anticuerpo puede unirse específicamente son enteropatógenos, por ejemplo, miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, preferentemente,
25 miembros del género *Yersinia*.

La presente divulgación también se refiere al uso de dicho anticuerpo para dirigirse a un microbio que expresa un polipéptido de la presente divulgación o a un polipéptido que tiene un epítomo estructuralmente relacionado con un epítomo presente en un polipéptido de la presente divulgación. Un compuesto puede unirse covalentemente a un
30 anticuerpo, en el que el compuesto puede ser, por ejemplo, una toxina. Al igual, dichos compuestos se pueden unir covalentemente a un sideróforo bacteriano, tal como una yersiniabactina, para dirigirse al microbio. El acoplamiento químico o la conjugación de un anticuerpo de la presente divulgación o una parte del mismo (tal como un fragmento Fab) se pueden llevar a cabo utilizando métodos conocidos y de rutina.

35 En un aspecto, la divulgación también se refiere al tratamiento de una infección en un animal producida por un microbio gram negativo, preferentemente, un miembro del género *Yersinia*. Como se utiliza en el presente documento, el término “infección” se refiere a la presencia de un microbio gram negativo, preferentemente, un miembro del género *Yersinia*, en el cuerpo de un animal, que puede ser o no clínicamente aparente. A menudo se hace referencia como portador asintomático a un animal con una infección por un miembro del género *Yersinia* que
40 no es clínicamente aparente. El método incluye la administración de una cantidad eficaz de la composición de la presente divulgación a un animal que tiene una infección producida por un miembro del género *Yersinia*, y determinar si ha disminuido la *Yersinia* spp. que produce la infección. Los métodos para determinar si una infección está producida por un miembro del género *Yersinia* son de rutina y se conocen en la técnica.

45 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos para tratar uno o más síntomas de ciertas afecciones en animales tales como ovejas, ganado bovino, cerdos, perros, aves, roedores y ciervos que pueden producirse por la infección por un miembro del género *Yersinia*. Ejemplos de afecciones producidas por infecciones por *Yersinia* spp. incluyen, por ejemplo, diarrea o enteritis en animales bovinos, ovinos y porcinos y en seres humanos, enfermedades tipo peste en gatos domésticos y seres humanos, abortos en ganado bovino y ovejas, epididimitis-
50 orquitis en carneros, y múltiple formación de abscesos en ovejas. Otro aspecto más de la presente divulgación se refiere al tratamiento de enfermedades de peces de agua fría tales como la enfermedad entérica de boca roja en peces juveniles, particularmente en acuicultura intensiva de truchas y salmones. El tratamiento de síntomas asociados a estas afecciones puede ser profiláctico o, de manera alternativa, se puede iniciar tras el desarrollo de una afección que se describe en el presente documento. Como se utiliza en el presente documento, el término
55 “síntoma” se refiere a una prueba evidente en un sujeto de una afección producida por la infección por un miembro del género *Yersinia* spp. Los síntomas asociados a las afecciones a las que se hace referencia en el presente documento y la evaluación de dichos síntomas son de rutina y se conocen en la técnica. Se hace referencia en el presente documento al tratamiento que es profiláctico, por ejemplo, que se inicia antes de que un sujeto manifieste síntomas de una afección producida por un microbio como el tratamiento de un sujeto que está “en riesgo” de
60 desarrollar la afección. Normalmente, un animal “en riesgo” de desarrollar una afección es un animal presente en un área en la que la afección se ha diagnosticado y/o es probable que esté expuesto a una *Yersinia* spp. que produce la afección. En consecuencia, la administración de una composición se puede llevar a cabo antes, durante, o después de que se produzcan las afecciones descritas en el presente documento. El tratamiento que se inicia tras el desarrollo de una afección puede dar como resultado una disminución de la gravedad de los síntomas de una de las
65 afecciones, o eliminar completamente los síntomas. En este aspecto de la divulgación, una “cantidad eficaz” es una cantidad eficaz para prevenir la manifestación de síntomas de una enfermedad, disminuir la gravedad de los

síntomas de una enfermedad, y/o eliminar completamente los síntomas.

La presente divulgación también se refiere a la disminución de la colonización por bacterias gram negativas, por ejemplo, bloqueando los sitios de fijación de las bacterias gram negativas, a los tejidos del sistema esquelético (por ejemplo, huesos, cartílagos, tendones y ligamentos), sistema muscular (por ejemplo, músculos esqueléticos y lisos), sistema circulatorio (por ejemplo, corazón, vasos sanguíneos, capilares y sangre), sistema nervioso (por ejemplo, cerebro, médula espinal, y nervios periféricos), sistema respiratorio (por ejemplo, nariz, tráquea, pulmones, bronquios, bronquiolos, alveolos), sistema digestivo (por ejemplo, boca, glándulas salivares, esófago, hígado, estómago, intestino delgado y grueso), sistema excretor (por ejemplo, riñones, uréteres, vejiga y uretra), sistema endocrino (por ejemplo, hipotálamo, pituitaria, tiroides, páncreas y glándulas adrenales), sistema reproductor (por ejemplo, ovarios, oviducto, útero, vagina, glándulas mamarias, testículos, y vesículas seminales), sistema linfático/inmunitario (por ejemplo, linfa, ganglios y vasos linfáticos, células mononucleares o leucocitos, tales como macrófagos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, células linfocíticas T y B), y linajes celulares específicos (por ejemplo, células precursoras, células epiteliales, células madre), y similares. Preferentemente, las bacterias gram negativas son miembros del género *Yersinia*. El método incluye la administración de una cantidad eficaz de una composición de la presente invención a un animal colonizado por, o en riesgo de ser colonizado por un miembro del género *Yersinia*. En este aspecto de la divulgación, una "cantidad eficaz" es una cantidad eficaz para disminuir la colonización del animal por el microbio. Los métodos para evaluar la colonización de un animal por un microbio son de rutina y conocidos en la técnica. Por ejemplo, la colonización del tracto intestinal del animal por un microbio se puede determinar midiendo la presencia del microbio en las heces del animal. Se espera que disminuyendo la colonización de un animal por un microbio se reducirá la transmisión del microbio a los seres humanos.

Se puede utilizar una composición de la invención para proporcionar una inmunización activa o pasiva contra la infección bacteriana. En general, la composición se puede administrar a un animal para proporcionar una inmunización activa. Sin embargo, la composición también se puede utilizar para inducir la producción de productos inmunitarios, tales como anticuerpos, que se pueden recolectar de animales productores y administrarse a otro animal para proporcionar una inmunidad pasiva. Los componentes inmunitarios, tales como los anticuerpos, se pueden recolectar para preparar composiciones de anticuerpo a partir de suero, plasma, sangre, calostro, etc., para las terapias de inmunización pasiva. Las composiciones de anticuerpo comprenden anticuerpos monoclonales y/o anti-idiotipos también se pueden preparar utilizando métodos conocidos. Dichas composiciones de anticuerpo incluyen anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Los anticuerpos quiméricos incluyen regiones constantes derivadas del ser humano tanto de las cadenas pesadas y ligeras y regiones variables que son específicas del antígeno derivadas del murino (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81(21):6851-5; LoBuglio et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86(11):4220-4; Boulianne et al., Nature, 1984, 312(5995):643-6). Los anticuerpos humanizados sustituyen la región constante y la región marco conservada (FR) (de la región variable) con los equivalentes humanos (Jones et al., Nature, 1986, 321(6069):522-5; Riechmann et al., Nature, 1988, 332(6162):323-7; Verhoeyen et al., Science, 1988, 239(4847):1534-6; Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86(24):10029-33; Daugherty et al., Nucleic Acids Res., 1991, 19(9): 2471-6). De manera alternativa, se pueden utilizar ciertas cepas de ratón que se han modificado genéticamente para producir anticuerpos que sean casi completamente de origen humano; después de la inmunización, las células B de estos ratones se recolectan y se immortalizan para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Bruggeman y Taussig, Curr. Opin. Biotechnol., 1997, 8(4):455-8; Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol., 1995;13 (1):65-93; Lonberg et al., Nature, 1994, 368:856-9; Taylor et al., Nucleic Acids Res., 1992, 20:6287-95). Las composiciones de anticuerpo pasivas y los fragmentos de los mismos, por ejemplo, scFv, Fab, F(ab')₂ o Fv u otras formas modificadas de los mismos, se pueden administrar a un receptor en forma de suero, plasma, sangre calostro, y similares. Sin embargo, los anticuerpos también se pueden aislar del suero, plasma, sangre, calostro y similares, utilizando métodos conocidos para su uso posterior en una forma concentrada o reconstituida tal como, por ejemplo, soluciones de lavado, apósitos impregnados y/o agentes tópicos, y similares. Las preparaciones para inmunización pasiva pueden ser particularmente ventajosas para el tratamiento de enfermedad aguda sistémica, o la inmunización pasiva de animales jóvenes que no recibieron niveles adecuados de inmunidad pasiva a través del calostro materno. Los anticuerpos útiles para la inmunización pasiva también pueden ser útiles para conjugarlos con varios fármacos o antibióticos que se podrían dirigir directamente a las bacterias que expresan un polipéptido de la presente divulgación durante una infección sistémica o localizada o un polipéptido que tiene un epítipo estructuralmente relacionado con un epítipo presente en un polipéptido de la presente divulgación.

Hay disponibles modelos animales, en particular, modelos de ratón, para evaluar experimentalmente las composiciones de la presente invención (véase, por ejemplo, Alpar, H. O., et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 51, 173-201, (2001), Brem, D., et al., Microbiology, 147, 1115-1127, (2001), Carter, P. B. y F. M. Collins, Infect. Immun., 9, 851-857, (1974), Collyn, F., et al., Infect. Immun., 72, 4784-9470, (2004), Di Genaro, M. S., et al., Microbiol. Immunol., 42, 781-788, (1998), Grosfeld, H., et al., Infect Immun, 71, 374-383, (2003), Jones, S. M., et al., Vaccine, 19, 358-366, (2001), Karlyshev, A. V., et al., Infect Immun, 69, 7810-7819, (2001), Leary, S. E., et al., Microb Pathog, 23, 167-179, (1997), Noll, A., et al., Eur J Immunol, 29, 986-996, (1999), Pelludat, C., et al., Infect Immun, 70, 1832-1841, (2002), Sabhnani, L., et al., FEMS Immunol Med Microbiol, 38, 215-29, (2003), y Williamson, E. D., et al., Vaccine, 19, 566-571, (2000)). Estos modelos de ratón son modelos aceptados comúnmente para el estudio de enfermedades humanas producidas por miembros del género *Yersinia*, y adicionalmente han servido como modelos aceptados en el desarrollo y ensayo inicial de vacunas con el fin de prevenir las enfermedades humanas por *Yersinia* spp.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona métodos para detectar anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos de la presente divulgación. Estos métodos son útiles, por ejemplo, para detectar si un animal tiene anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos de la presente divulgación, y diagnosticar si un animal puede tener una afección producida por un microbio que expresa los polipéptidos descritos en el presente documento, o que expresa polipéptidos que comparten epítomos con los polipéptidos descritos en el presente documento. Tales sistemas de diagnóstico pueden estar en forma de kit. Los métodos incluyen poner en contacto un anticuerpo con una preparación que incluye polipéptidos de la presente divulgación para dar como resultado una mezcla. El anticuerpo puede estar presente en una muestra biológica, por ejemplo, sangre, leche o calostro. El método incluye además incubar la mezcla en condiciones que permitan al anticuerpo unirse específicamente al polipéptido para formar un complejo polipéptido:anticuerpo. Como se utiliza en el presente documento, la expresión “complejo polipéptido:anticuerpo” se refiere al complejo que resulta cuando un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido. La preparación que incluye los polipéptidos de la presente divulgación también puede incluir reactivos, por ejemplo, un tampón, que proporciona las condiciones apropiadas para la formación del complejo polipéptido:anticuerpo. Luego se detecta el complejo polipéptido:anticuerpo. La detección de anticuerpos se conoce en la técnica y puede incluir, por ejemplo, inmunofluorescencia y peroxidasa. Los métodos para detectar la presencia de anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos de la presente divulgación se pueden utilizar en varios formatos que se han utilizado para detectar anticuerpos, que incluyen el radioinmunoensayo y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

La presente divulgación también proporciona un kit para detectar anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos de la presente divulgación. El anticuerpo que se detecta se puede obtener a partir de un animal sospechoso de tener una infección producida por un microbio gram negativo, más preferentemente, un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, preferentemente, un miembro del género *Yersinia*, tal como *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, o *Y. pestis*. El kit incluye al menos uno de los polipéptidos de la presente divulgación, o un número de polipéptidos que es un entero mayor de 1 (por ejemplo, al menos 2, al menos 3, etc.), en un material de envasado adecuado, en una cantidad suficiente para al menos un ensayo. Opcionalmente, también se incluyen otros reactivos tales como tampones y soluciones necesarias para la práctica de la divulgación. Por ejemplo, un kit puede incluir también un reactivo que permita la detección de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de la presente divulgación, tal como un anticuerpo secundario marcado, diseñado para unirse específicamente a un anticuerpo obtenido de un animal. También se incluyen normalmente, instrucciones para el uso de los polipéptidos envasados. Como se utiliza en el presente documento, la frase “material de envasado” se refiere a una o más estructuras físicas que se utilizan para albergar los contenidos del kit. El material de envasado se construye por métodos bien conocidos, generalmente para proporcionar un entorno estéril, libre de contaminantes. El material de envasado puede tener una etiqueta que indique que los polipéptidos se pueden utilizar para detectar anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos de la presente divulgación. Además, el material de envasado contiene instrucciones que indican cómo se emplean los materiales del kit para detectar el anticuerpo. Como se utiliza en el presente documento, el término “envase” se refiere a un recipiente tal como de cristal, plástico, papel, una lámina, y similares, capaz de mantener los polipéptidos y otros reactivos dentro de límites fijos, por ejemplo, un anticuerpo secundario. Por lo tanto, por ejemplo, un envase puede ser un pocillo de una placa de microtitulación en el que se han añadido cantidades de polipéptidos en microgramos. Un envase también puede contener un anticuerpo secundario. Las “instrucciones de uso” incluyen normalmente una expresión tangible que describe la concentración de reactivo o al menos un parámetro del método de ensayo, tal como las cantidades relativas de reactivo y muestra que se tienen que mezclar, los periodos de tiempo de mantenimiento de las mezclas reactivo/muestra, la temperatura, las condiciones de tampón, y similares.

La presente invención se ilustra con los siguientes ejemplos. En el caso de que cualquiera de los ejemplos contuviera una materia objeto que estuviera fuera del alcance de la presente invención, se incluiría simplemente con fines de referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción y aislamiento de proteínas reguladas por metales

Las composiciones que se utilizan en los ejemplos siguientes se prepararon utilizando proteínas derivadas de la cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica* y la cepa KIM6+ de *Y. pestis* (obtenidas de R.D. Perry, Universidad de Kentucky). Cada una de las dos cepas se inocularon a partir de reservas congeladas en 25 ml de caldo de soja triptico (TSB) que contenía 160 µM de 2,2'-dipiridilo o 300 µM de FeCl₃ y se incubaron a 37 °C con agitado a 400 rpm. Después de 12 horas de incubación, se transfirieron 5 ml de cada cultivo a 500 ml de medio pre-incubado (37 °C) que contenía 160 µM de 2,2'-dipiridilo o 300 µM de FeCl₃ y se incubaron a 37 °C con agitado a 100 rpm. Después de 8 horas de incubación, se centrifugaron los cultivos a 10.000 x g durante 20 minutos. Los aglomerados bacterianos se resuspendieron en 100 ml de solución salina fisiológica estéril y se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos para retirar cualquiera de las proteínas contaminantes del medio. Los aglomerados bacterianos se resuspendieron entonces en 40 ml de solución salina tamponada-Tris pH 7,2 (TBS) y se destruyeron por sonicación durante 1,5 minutos a 4 °C utilizando un Branson 450 equipado con un cuerno de destrucción de media pulgada

(Branson, Danbury CT). Las suspensiones de bacterias destruidas se clarificaron por centrifugación a 32.000 x g durante 12 minutos. Los sobrenadantes se recolectaron y solubilizaron por adición de lauroil sarcosinato sódico (un 4 % vol/vol) a 4 °C durante 24 horas. Las fracciones enriquecidas con proteínas insolubles a detergentes se recolectaron por centrifugación a 32.000 x g durante 2,5 horas a 4 °C. Los aglomerados proteicos se resuspendieron en 200 µl de tampón Tris (pH 7,2) y se almacenaron a -90 °C. Una muestra de cada extracto se redisolvió en un gel SDS-PAGE al 10 % para los métodos convencionales y se visualizó por tinción con Azul Coomassie (Fig. 3).

Ejemplo 2

Preparación de composiciones inmunizantes derivadas de *Y. enterocolitica*

Las proteínas producidas por *Y. enterocolitica* como se ha descrito en el Ejemplo 1, se utilizaron para preparar una composición para la administración a los animales. La composición contenía polipéptidos que tenían pesos moleculares de 268 kDa, 92 kDa, 83 kDa, 79 kDa, 70 kDa, 66 kDa, 54 kDa, 45 kDa, 40 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 31 kDa, o 28 kDa. Los polipéptidos que tenían pesos moleculares de 83 kDa, 70 kDa, y 66 kDa se expresaron solamente en condiciones limitadas de hierro y la expresión de polipéptidos que tenían pesos moleculares de 268 kDa, 79 kDa, y 45 kDa estaba aumentada en condiciones limitadas de hierro.

Se preparó una vacuna de reserva a partir de la composición emulsionando la suspensión de proteína acuosa (500 µg de proteína total/ml) en un adyuvante comercial, EMULSIGEN, (MVP Laboratories, Ralston, Nebraska) utilizando un recipiente de homogeneización IKA Ultra Turrax T-50 (IKA, Cincinnati, OH). La vacuna se administró a ratones para dar una dosis final de 50 µg de proteína total en un volumen inyectable de 0,1 ml con una concentración de adyuvante del 22,5 % vol/vol. Se preparó un placebo reemplazando el antígeno con solución salina fisiológica en la formulación anterior y emulsionando la suspensión en EMULSIGEN para dar una concentración de adyuvante del 22,5 %.

Ejemplo 3

Preparación del organismo de desafío

Cuando se utilizaba como desafío, la cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica* se preparó de la siguiente manera. En resumen, el aislado de una reserva congelada se sembró en estrías en una placa de agar sangre y se incubó a 37 °C durante 18 horas. Se subcultivó una única colonia en 50 ml de caldo de soja triptico (Difco) que contenía 25 µg/ml de 2,2' dipiridilo. El cultivo se incubó a 37 °C durante 6 horas mientras se rotaba a 200 rpm, momento en el que se centrifugó el cultivo a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C para aglomerar las bacterias. El aglomerado bacteriano se lavó dos veces por centrifugación en solución salina fisiológica a 4 °C. El aglomerado final se resuspendió en 25 ml de solución salina fisiológica y se utilizó para el desafío. Justo antes del desafío, se diluyó 1 ml de la suspensión bacteriana anterior diez veces en serie para enumerar el número de UFC/dosis por ratón.

Ejemplo 4

Vacunación de los ratones y estudio del desafío para evaluar la protección contra el desafío intravenoso

La eficacia de la composición de *Y. enterocolitica* se evaluó utilizando un desafío vivo virulento en ratones. Se dividieron veinte ratones CF-1 (Harlan Breeding Laboratories, Indianapolis, IN) en dos grupos de 10 ratones por grupo. Los ratones del grupo de control se vacunaron con el placebo, mientras que los ratones del segundo grupo se inmunizaron con 50 µg de la composición que se obtuvo como se ha descrito en el Ejemplo 1. La inmunización de 0,1 cc se administró por vía intraperitoneal dos veces a intervalos de 14 días. Catorce días después de la segunda vacunación, se administró una dosis de desafío de la cepa 27729 ($9,4 \times 10^4$ UFC/ratón) a todos los ratones en la vena lateral del rabo. Se registró la mortalidad durante 7 días tras el desafío.

De los 10 ratones vacunados con el placebo, 10 (el 100 %) murieron en las 168 horas tras el desafío, mientras que ninguno de los ratones vacunados murió en el mismo periodo de tiempo. Además, todos los ratones vacunados sobrevivieron durante el resto del estudio que terminó a los 20 días post-desafío. Un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y un ensayo de rango logarítmico (véase la Figura 1) indicaban que la inmunización proporcionaba una protección estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) contra el desafío. Estos resultados sugieren que las proteínas de *Y. enterocolitica* cultivada en condiciones de restricción de hierro constituyen antígenos eficaces en el modelo de ratón de infección intravenosa.

Ejemplo 5

Análisis de transferencia de Western de proteínas de *Y. enterocolitica* con suero policlonal de ratón hiperinmunizado y convaleciente

Se utilizó el análisis de transferencia de Western para evaluar las proteínas inmunorreactivas derivadas de *Y. enterocolitica* contra suero policlonal de ratón hiperinmunizado y sueros convalecientes. El suero policlonal de ratón hiperinmunizado se obtuvo tras la vacunación con la composición descrita en el Ejemplo 2, y los sueros convalecientes se obtuvieron de ratones vacunados/desafiados que sobrevivieron al ensayo descrito en el Ejemplo 4. La composición contenía polipéptidos que tenían pesos moleculares de 268 kDa, 92 kDa, 79 kDa, 70 kDa, 66 kDa, 54 kDa, 52 kDa, 41 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 31 kDa, 28 kDa y dos proteínas que tenían pesos moleculares de 83 kDa. Los polipéptidos que tenían pesos moleculares de 83 kDa, 70 kDa, y 66 kDa se expresaban solamente en condiciones limitadas de hierro.

Para obtener el suero hiperinmunizado, se inmunizaron los ratones dos veces con intervalos de 14 días como se ha descrito en el Ejemplo 4. El suero policlonal hiperinmunizado se recolectó de los ratones 14 días después de la segunda inmunización. El suero convaleciente derivado de los ratones vacunados/desafiados se obtuvo 14 días tras el desafío. Las proteínas derivadas de la cepa 27729 de *Y. enterocolitica* se fraccionaron primero por tamaño en SDS-PAGE (un 4 % de gel de relleno/un 10 % de redisolución) utilizando 30 ug de proteína total como se ha descrito en el Ejemplo 1. La banda de migración se visualizó utilizando referencias de caleidoscopio de amplio intervalo (BioRad) para ayudar la electrotransferencia mientras que se utilizaron referencias de amplio intervalo biotiniladas como referencias de peso molecular en la transferencia. Para el análisis de transferencia de western, se electrotransfirieron las proteínas desde el gel SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa trans-blot (BioRad) durante una noche, a 4 °C a 50 Voltios, en tampón Towbin (25 mM de Tris, 192 mM de glicina, y un 20 % de metanol) utilizando un celda de transferencia Trans-Blot BioRad. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó por métodos convencionales utilizando un 3,0 % de gelatina de pescado (BioRad). El suero policlonal hiperinmunizado y los sueros convalecientes se diluyeron 1/25000 en solución salina tamponada-Tris que contenía un 1,0 % de gelatina de pescado, un 0,05 % de Tween 20 y un 20 % de azida sódica (tampón de anticuerpo). La membrana de nitrocelulosa se incubó con la solución de anticuerpo primario durante una noche. La membrana se lavó entonces dos veces en solución salina tamponada-Tris que contenía un 0,05 % de Tween-20 (TTBS) y se transfirió al tampón de anticuerpo que contenía una dilución 1/10.000 de anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (BioRad) y una dilución 1/3.000 de avidina conjugada con fosfatasa alcalina (BioRad). La membrana se incubó a 37 °C durante 2 horas en un agitador, y posteriormente se lavó en TTBS cuatro veces para retirar los conjugados no unidos. La transferencia se redisolvió, durante 30 minutos a 37 °C en un agitador, en una solución de sustrato que contenía el reactivo de color A y B de fosfatasa alcalina en 1x de tampón de desarrollo de color AP (BioRad).

Se utilizó el análisis de transferencia de Western como una herramienta para identificar potencialmente proteínas derivadas de la composición como se ha descrito en el Ejemplo 1 como inmunorreactivas con anticuerpos derivados de los sueros hiperinmunizados y/o convalecientes. El análisis de transferencia de western revelaba varias proteínas inmunorreactivas. Los sueros hiperinmunizados contenían anticuerpos que reaccionaban con proteínas de 268 kDa, 92 kDa, 83 kDa, 79 kDa, 70 kDa, 66 kDa, 54 kDa, 52 kDa, 41 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 31 kDa y 28 kDa. De manera similar, los sueros convalecientes mostraban patrones de banda idénticos en 268 kDa, 92 kDa, 83 kDa, 79 kDa, 70 kDa, 66 kDa, 54 kDa, 52 kDa, 41 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 31 kDa y 28 kDa. Además, se vieron tres proteínas inmunorreactivas en las regiones de 52 kDa, 40 kDa y 20 kDa que no se habían visto inicialmente en el gel SDS-PAGE, ni se habían visto en los análisis de transferencia de western utilizando los sueros hiperinmunizados. Es interesante especular que estas tres proteínas estaban a una concentración demasiado baja para visualizarse en el gel SDS-PAGE, pero puede ser que sean altamente inmunogénicas y den como resultado un intensidad de banda mayor después de la impregnación del sistema inmunitario lo que da como resultado una intensidad de banda aumentada de estas proteínas tras el desafío.

El análisis de transferencia de Western de la composición vacunal revelaba diferencias en la intensidad de las bandas de proteínas inmunorreactivas entre los sueros hiperinmunizado y convaleciente. Estas diferencias podrían ser el resultado de las diferentes propiedades inmunogénicas de las proteínas individuales y de cómo el sistema inmunitario reconoce cada proteína individual en la composición. Además, la cantidad y proporción de las proteínas de la composición también puede tener influencia en el estado inmunológico de cada proteína que puede influenciar en la respuesta inmunológica del animal a las proteínas individuales de la composición. No obstante, cada proteína de la composición reacciona inmunológicamente como se examina por el análisis de transferencia de Western, por lo tanto, la respuesta inmunológica del ratón al vacunarse, reconoce y responde montando una respuesta de anticuerpos para cada proteína individual de la composición. En conjunto, los resultados descritos en el Ejemplo 4 ilustran que la composición proteica era extremadamente eficaz proporcionando una protección del 100 % en los ratones desafiados en comparación con los ratones no vacunados que tenían una mortalidad del 100 %.

Ejemplo 6

Análisis de transferencia de Western de las proteínas de *Y. pestis* con el suero hiperinmunizado preparado contra las proteínas de *Y. enterocolitica*

El análisis de Western se utilizó para evaluar las proteínas inmunorreactivas derivadas de *Y. pestis* contra sueros hiperinmunizados preparados contra la composición derivada de *Y. enterocolitica* como se describe en el Ejemplo 5. La composición contenía polipéptidos que tenían pesos moleculares de 254 kDa, 104 kDa, 99 kDa, 94 kDa, 88 kDa, 77 kDa, 73 kDa, 64 kDa, 60 kDa, 46 kDa, 44 kDa, 37 kDa 36 kDa, 31 kDa 28 kDa y 20 kDa. Los polipéptidos que

tenían pesos moleculares de 94 kDa, 88 kDa, 77 kDa, 73 kDa, y 64 kDa se expresaban solamente en condiciones limitadas de hierro. Las proteínas derivadas de la cepa KIM6+ de *Y. pestis* se fraccionó primero en SDS-PAGE (un 4 % de gel de relleno/un 10 % de redisolución) como se había descrito anteriormente en el Ejemplo 5 utilizando 30 ug de proteína total. Se llevó a cabo el análisis de transferencia de western en idénticas condiciones que las descritas en el Ejemplo 5 excepto por la siguiente modificación: los sueros convalecientes no se ensayaban contra las proteínas de membrana de *Y. pestis*. Los resultados demostraban que las proteínas de las regiones de aproximadamente 254 kDa, 94 kDa, 88 kDa, 46 kDa, 44 kDa, 37 kDa, 36 kDa y 20 kDa eran inmunorreactivas con los anticuerpos derivados del suero hiperinmunizado que se preparó contra las proteínas de membrana de *Y. enterocolitica*.

Ejemplo 7

Estudio de vacunación y desafío de ratón para evaluar la protección contra el desafío neumónico e intravenoso con *Y. pestis*

Se distribuyeron por igual ochenta y ocho hembras de Swiss-Webster (Harlan Laboratories) que pesaban entre 16-22 gramos, en 4 grupos (22 ratones/grupo), denominados 1 a 4. Los animales se albergaron en un sistema de jaulas para animales con suministro de aire positivo micro-vent, filtrado con HEPA (instalación BSL3). El alimento y el agua se suministraron *ad libitum*.

Se prepararon las proteínas de la cepa KIM6+ de *Y. pestis* como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1, y se formularon como una vacuna utilizando hidróxido de aluminio como adyuvante (Rehydagel-HPA, Rheis NJ) a una concentración final del 20 % vol/vol y 500 µg de proteína total/ml. El placebo se preparó reemplazando el antígeno con PBS mientras que se mantuvo la misma concentración de adyuvante. Los ratones de los grupos 1 y 3 se vacunaron por vía intraperitoneal dos veces a intervalos de 14 días con 0,1 ml de vacuna que contenía 50 µg de proteína total, mientras que los ratones de los grupos 2 y 4 se inmunizaron con el placebo con un programa idéntico.

Se utilizó la cepa CO92 para el desafío, y se preparó en las instalaciones de contención BSL3. Catorce días tras la segunda vacunación, se desafiaron los ratones de los grupos 1 y 2 por vía intravenosa en la vena lateral del rabo con 0,1 ml de cepa CO92 (10^3 UFC o aproximadamente 100 DL₅₀ por ratón). Los ratones de los grupos 3 y 4 se sometieron a una dosis de desafío en aerosol de *Y. pestis* CO92 diluida en solución salina fisiológica para alcanzar una concentración aproximada de 100 DL₅₀ UFC por ratón durante 30 minutos en una cámara hermética. La DL₅₀ en aerosol para la cepa CO92 en los ratones Swiss Webster se determinó por pequeños estudios piloto antes de los experimentos de desafío propuestos. La mortalidad se registró durante 21 días tras el desafío.

Ejemplo 8

Estudio de vacunación y desafío en peces para evaluar la protección contra el desafío por *Y. ruckeri*

Se mantuvieron dos grupos de 20 truchas arcoíris, denominados grupos 1 y 2 que pesaban aproximadamente 2 gramos en dos depósitos separados de 60 litros a una temperatura de 18 °C. Los peces se alimentaban dos veces al día con un alimento comercial para truchas (Ziegler Brothers, Gardners, PA). Los peces del grupo 1 se vacunaron con una composición derivada de *Y. ruckeri* utilizando el mismo método que se ha descrito en el Ejemplo 1. Las proteínas extraídas derivadas de *Y. ruckeri* se utilizaron para preparar una composición vacunal para la administración a los peces. Se preparó una vacuna de reserva de la composición emulsionando la suspensión proteica acuosa en una emulsión de agua en aceite que contenía aceite mineral Drakeol 6 y Arlacel A como emulsionante. La vacuna se administró por vía intraperitoneal para dar una dosis final de 25 ug de proteína total en un volumen inyectable de 0,1 cc utilizando 0,1 cc. Se preparó un placebo reemplazando el antígeno con solución salina fisiológica en la formulación anterior y se administró a los peces del grupo 2 (controles). Se administró a los peces una segunda vacunación 28 días después de la primera vacunación. Catorce días después de la segunda vacunación todos los peces se desafiaron por vía intraperitoneal.

Se utilizó un aislado virulento de *Y. ruckeri* para el desafío. El aislado del desafío se cultivó en caldo tripticasa de soja (TSB) que contenía 160 µM de 2,2'-dipiridilo y se cultivó durante 12 horas de incubación a 37 °C. El cultivo se lavó una vez en solución salina fisiológica por centrifugación a 10.000 x g y se resuspendió en solución salina. El cultivo se ajustó a $5,0 \times 10^7$ UFC por ml. Cada trucha se inoculó por vía intraperitoneal con 0,1 cc de la bacteria correspondiente a una dosis de desafío final de $5,0 \times 10^6$ UFC. Se registró la mortalidad diariamente durante 14 días después del desafío. Todos los peces muertos se retiraban del depósito y se extraían los hígados y se colocaban en placas para enumerar la presencia del organismo de desafío. La eficacia se midió como el grado de supervivencia al comparar los vacunados y los controles no vacunados.

Ejemplo 9

Caracterización de proteínas reguladas por metales de la cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica* y la cepa KIM6+ de *Y. pestis*

Las proteínas que se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 a partir de la cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica* y la cepa KIM6+ de *Y. pestis* se caracterizaron utilizando la espectrometría de desorción/ionización por láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS). Las muestras de cada composición se redisolvieron utilizando un gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida al 10 %. Después de que se redisolvieran las proteínas de una composición, el gel se tiñó con azul Coomassie brillante para visualizar las proteínas.

Materiales y Métodos

Escisión y lavado. El gel se lavó durante 10 minutos con agua dos veces. Cada banda de proteína de interés se escindió cortando lo más cerca posible de la proteína para reducir la cantidad de gel presente en la muestra. Cada porción de gel se cortó en cubos de 1x1 mm y se colocó en un tubo de 1,5 ml. Las piezas de gel se lavaron con agua durante 15 minutos. Todos los volúmenes de disolvente que se utilizaron en las etapas de lavado eran aproximadamente iguales a dos veces el volumen de la porción de gel. La porción de gel se lavó a continuación con agua/acetonitrilo (1:1) durante 15 minutos. La mezcla de agua/acetonitrilo se retiró, y se añadió acetonitrilo para cubrirla hasta que las piezas de gel se volvieron blancas pegajosas, en cuyo momento se retiró el acetonitrilo. Las piezas de gel se rehidrataron en 100 mM de NH_4HCO_3 , y después de 5 minutos, se añadió un volumen de acetonitrilo igual a dos veces el volumen de las piezas de gel. Esto se incubó durante 15 minutos, se retiró el líquido, y se secaron las piezas de gel en un SpeedVac.

Reducción y alquilación. Las piezas de gel secas se rehidrataron en 10 mM de DTT y 10 mM de NH_4HCO_3 , y se incubaron durante 45 min a 56 °C. Después de dejar que los tubos se enfriaran a temperatura ambiente, se retiró el líquido y se añadió inmediatamente el mismo volumen de una mezcla de 55 mM de yodoacetamida y 100 mM de NH_4HCO_3 . Esto se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. El líquido se retiró, se añadió acetonitrilo para cubrirla hasta que las piezas de gel se volvían blancas pegajosas, en cuyo momento se retiró el acetonitrilo. Las piezas de gel se rehidrataron en 100 mM de NH_4HCO_3 , y después de 5 minutos, se añadió un volumen de acetonitrilo igual a dos veces el volumen de las piezas de gel. Esto se incubó durante 15 minutos, se retiró el líquido, y las piezas de gel se secaron en un Speed Vac. Si aún permanecía azul Coomassie residual, se repetía el lavado con 100 mM de NH_4HCO_3 /acetonitrilo.

Digestión en gel. Las piezas de gel se secaron completamente en un Speed Vac. Las piezas se rehidrataron en tampón de digestión (50 mM de NH_4HCO_3 , 5 mM de CaCl_2 , 12,5 nanogramos por microlitro (ng/ μl) de tripsina) a 4 °C. Se añadió suficiente tampón para cubrir las piezas de gel, y se añadía más si era necesario. Las piezas de gel se incubaron en hielo durante 45 minutos, y se retiró el sobrenadante y se sustituyó con 5-2 μl del mismo tampón sin tripsina. Esto se incubó a 37 °C durante una noche en una incubadora con aire.

Extracción de péptidos. Se añadió un volumen suficiente de 25 mM de NH_4HCO_3 para cubrir las piezas de gel, y se incubó durante 15 minutos (normalmente en un baño sonicador). Se añadió el mismo volumen de acetonitrilo y se incubó durante 15 minutos (en un baño sonicador si es posible), y se recuperó el sobrenadante. La extracción se repitió dos veces, utilizando un 5 % de ácido fórmico en vez de NH_4HCO_3 . Se añadió un volumen suficiente de ácido fórmico al 5 % para cubrir las piezas y se incubó durante 15 minutos (normalmente en un baño sonicador). Se añadió el mismo volumen de acetonitrilo y se incubó durante 15 minutos (normalmente en un baño sonicador), y se recuperó el sobrenadante. Los extractos se agruparon, y se añadieron 10 mM de DTT a una concentración final de 1 mM de DTT. La muestra se secó en un Speed Vac hasta un volumen final de aproximadamente 5 μl .

Desalación de péptidos. Las muestras se desalaron utilizando puntas de pipeta ZIPTIP (C18, Millipore, Billerica, MA) como sugería el fabricante. En resumen, una muestra se reconstituía en solución de reconstitución (5:95 de acetonitrilo: H_2O , 0,1 %-0,5 % de ácido trifluoroacético, se centrifugó y se comprobó el pH para verificar que era menor de 3. Se hidrató un ZIPTIP aspirando 10 μl de solución 1 (50:50 de acetonitrilo: H_2O , 0,1 % de ácido trifluoroacético en H_2O desionizada) y se desecharon las alícuotas aspiradas. A continuación, se aspiraron 10 μl de solución 2 (0,1 ácido trifluoroacético en H_2O desionizada) y se desecharon las alícuotas aspiradas. La muestra se cargó en la punta aspirando lentamente 10 μl de muestra en la punta, expeliéndola en el tubo de muestras y repitiendo esto 5 a 6 veces. Se aspiraron diez microlitros de solución 2 en la punta, se desechó expeliéndola y se repitió este proceso 5-7 veces para lavar. Los péptidos se eluyeron aspirando 2,5 μl de solución 3 enfriada en hielo (60:40 de acetonitrilo: H_2O , 0,1 % de ácido trifluoroacético), expeliendo, y luego re-aspirando la misma alícuota dentro y fuera de la punta 3 veces. Después de que la solución se había expelido de la punta, el tubo se tapó y se almacenó en hielo.

Mapeo peptídico por espectrometría de masas. Los péptidos se suspendieron en 10 μl a 30 μl de un 5 % de ácido fórmico, y se analizaron por MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA). El espectro de masas de los fragmentos peptídicos se determinó como sugería el fabricante. En resumen, una muestra que contenía los péptidos que resultaban de una digestión triptica se mezclaron con la matriz de ácido ciano-4-hidroxycinámico, se transfirieron a un blanco, y se dejó secar. La muestra seca se colocó en el espectrómetro de masas, se irradió, y se detectó el tiempo de vuelo de cada ion y se utilizó para determinar una huella de masa del péptido para cada proteína presente en la composición. Se utilizaron polipéptidos conocidos (angiotensina humana II, masa monoisotópica MH^+ 1046,5 (Sigma Chemical Co.), y fragmento 18-39 de hormona adrenocorticotropina, MH^+ 2465,2 (Sigma Chemical, Co.)) para calibrar la máquina.

Análisis de los datos. Las masas observadas experimentalmente para los péptidos de cada espectro de masas se compararon con las masas esperadas que resultaban de proteínas conocidas utilizando el método de búsqueda de huella de masa peptídica del motor de búsqueda Mascot (Matrix Science Ltd., London, UK, y www.matrixscience.com, véase Perkins et al., Electrophoresis 20, 3551-3567 (1999)). Los parámetros de búsqueda incluían: base de datos, NCBI nr; taxonomía, bacterias (eubacterias); tipo de búsqueda, huella de masa peptídica; enzima, tripsina; modificaciones fijadas, ninguna; modificaciones variables, ninguna o metionina oxidada; valores de masa, monoisotópica; masa de proteína, sin restricción; tolerancia de masa peptídica, 61 Da o 61 330 ppm; estado de carga peptídica, Mr; máximo de escisiones perdidas, 1; número de consultas, 25.

10 Resultados

El resultado de esta búsqueda era una huella de masa para las proteínas presentes en la composición (Tablas 5 y 6).

15 Tabla 5. Datos experimentales del análisis MALDI-TOF MS de proteínas aisladas de la cepa 27729 de la ATCC de *Y. enterocolitica*

Denominación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodaltons (kDa) ¹	Valor m/z de los fragmentos polipeptídicos que resultan de la digestión con tripsina ²
Lw545	268	929,46
		1140,47
		1312,57
		1440,69
		1526,68
		1555,66
		1581,70
		1596,67
		1683,69
		2110,21
Lw391A (± 1 Da)	83	687,5
		976,4
		1001,6
		1016,5
		1141,6
		1170,7
		1171,7
		1198,5
		1344,5
		1357,7
		1395,6
		1453,7
		1477,7
		1521,7
		1693,8
		1716,8
		1829,8
		1962,0
		2014,1
		2020,0
		2042,0
		2164,1
		2226,1
		2417,3
		3175,5

ES 2 588 010 T3

Lw391B (± 1 Da)	83	1001,6
		1104,6
		1140,6
		1155,5
		1171,7
		1209,5
		1214,7
		1338,6
		1453,7
		1568,8
		1634,9
		1651,8
		1660,9
		1709,8
		1750,0
		1851,0
		1988,1
		2105,1
		2112,1
		2164,1
		2387,2
		2453,1
		2538,4
		3423,7
Lw392 (± 1 Da)	79	837,5
		1018,6
		1071,5
		1086,5
		1132,7
		1189,5
		1215,6
		1236,6
		1256,6
		1264,6
		1361,6
		1497,7
		1502,8
		1615,7
		1653,8
		1718,9
		1770,9
		1820,9
		1828,1
		2006,0
		2067,1
		2120,9
		2300,3
		2308,2

ES 2 588 010 T3

		2783,3
		2912,4
		3024,5
		3287,6
Lw393 (± 1 Da)	70	714,6
		760,5
		807,5
		820,5
		920,5
		1024,6
		1052,6
		1187,6
		1200,6
		1395,7
		1437,7
		1480,7
		1541,9
		1546,9
		1565,8
		1668,8
		1732,0
		1790,9
		1906,0
		1982,2
		1984,1
		1997,1
		2011,1
		2028,2
		2060,2
		2134,1
		2163,3
		2275,4
		2364,3
		2378,5
		2384,3
		2564,4
		2658,4
		2834,7
		2930,7
Lw550	66	868,6500
		882,5700
		884,5900
		1021,7000
		1087,7100
		1168,7300
		1177,8200
		1208,6800
		1346,8700

		1750,0100
		1755,0500
		1852,2800
		2521,8100
		2607,6700
		2944,1000
		3087,0800
Lw552	45	1140,5500
		1209,5400
		1312,5800
		1440,6400
		1501,6900
		1526,6200
		1581,6800
		1596,6800
Lw555	37	705,3700
		881,2400
		971,1700
		1122,3100
		1280,1900
		1295,2200
		1335,2900
		1510,3000
		1908,5300
		2245,7300
		2324,7100
		2642,7500
		2985,0200
		3087,9700
Lw557	31	864,49
		1404,50
		1616,68
		1780,68
		1876,82
		2071,04
		2379,08
1. Peso molecular, en kilodaltons, del polipéptido obtenido de la cepa 27729 de la ATCC de <i>Y. enterocolitica</i> .		
2. m/z, relación de masa (m) respecto a la carga (z).		

Tabla 6. Datos experimentales del análisis MALDI-TOF MS de proteínas aisladas de la cepa KIM6+ de *Y. pestis*.

Denominación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodaltons (kDa) ¹	Valor m/z de los fragmentos polipeptídicos que resultan de la digestión con tripsina ²
Lw529	104	644,50
		685,40
		771,40
		841,40
		899,50
		962,40
		1137,40

ES 2 588 010 T3

		1277,40
		1293,40
		1386,40
		1410,50
		1422,60
		1498,60
		1567,50
		1679,70
		1684,60
		1726,70
		1873,70
		1991,70
		2020,80
		2182,80
		2584,90
		2843,20
Lw530	99	1191,40
		1514,50
		1591,50
		1597,50
		1637,50
		1671,50
		1714,60
		1719,60
		1751,60
		1820,60
		1863,70
		1967,60
		2122,60
Lw531	94	962,20
		1168,20
		1258,30
		1372,30
		1384,30
		1409,30
		1521,40
		1669,50
		1686,40
		1714,40
		1717,40
		1797,50
		1833,50
		1845,50
		2218,60
		2426,60
Lw532	88	889,30
		927,30
		946,40

ES 2 588 010 T3

		961,40
		1172,40
		1177,40
		1290,40
		1333,50
		1358,40
		1404,50
		1419,50
		1508,50
		1579,60
		1673,60
		1736,60
		2401,00
		2666,00
Lw533	77	687,40
		785,40
		859,30
		953,40
		1141,50
		1156,50
		1171,50
		1198,40
		1403,50
		1409,50
		1483,50
		1523,50
		1551,60
		1618,60
		1675,50
		1746,60
		1788,70
		1820,70
		1852,80
		1941,60
		2013,90
		2018,80
		2057,80
		2168,80
		2170,00
		2427,00
		2457,80
		2829,10
Lw534	73	629,40
		749,40
		910,30
		931,40
		1292,50
		1371,50

ES 2 588 010 T3

		1441,40
		1479,50
		1587,60
		1605,60
		1641,60
		1655,50
		1706,60
		1708,60
		1758,70
		1797,80
		1856,80
		1913,70
		2004,80
		2072,80
		2155,90
		2301,90
		2395,90
		2484,90
		2558,20
		2676,20
		2984,10
		3162,30
		3185,30
		3425,50
		3472,40
Lw535	64	714,40
		760,40
		774,40
		807,40
		920,40
		1024,40
		1052,40
		1103,40
		1165,40
		1187,40
		1200,40
		1282,50
		1395,40
		1445,50
		1480,50
		1546,60
		1668,50
		1693,60
		1731,60
		1790,60
		1905,70
		1969,70
		1981,80

ES 2 588 010 T3

		2010,80
		2027,80
		2059,80
		2163,00
		2363,90
		2378,10
		2820,20
		2930,20
Lw536	60	1011,46
		1187,55
		1231,54
		1238,57
		1291,57
		1567,76
		1605,78
		1621,74
		1669,68
		2021,02
		2397,21
Lw537	46	873,53
		1001,53
		1180,50
		1258,60
		1300,67
		1307,58
		1325,59
		1368,72
		1395,70
		1436,67
		1609,91
		1616,82
		1780,94
		1952,05
		1959,02
		2020,04
		2099,15
		2178,22
		2710,51
Lw538	44	776,51
		837,65
		905,62
		1027,71
		1073,74
		1200,79
		1232,67
		1233,72
		1290,81
		1376,71

ES 2 588 010 T3

		1603,90
		1615,01
		1711,08
		1774,04
		1796,13
		1906,14
		1978,16
		2001,23
Lw683	37	691,26
		894,21
		911,21
		1050,26
		1115,19
		1120,19
		1122,24
		1198,17
		1263,19
		1308,24
		1320,34
		1423,28
		1437,31
		1491,23
		1534,41
		1579,39
		2245,71
		2367,68
		2487,63
		2684,79
		2980,02
		3292,91
Lw541	31	1020,84
		1075,77
		1203,86
		1248,88
		1322,87
		1404,95
		1788,29
		1991,60
		2092,61
		2119,74
Lw542	31	1143,91
		1299,97
		1309,09
		1341,97
		1372,04
		1580,12
		1781,45
		1791,43

ES 2 588 010 T3

		1954,57
		2191,78
		2632,11
Lw544	20	807,40
		1114,43
		1210,48
		1244,46
		1259,51
		1270,49
		1357,49
		1790,90
		2003,91
		2989,45
1. Peso molecular, en kilodaltons, del polipéptido obtenido de la cepa KIM6+ de <i>Y. pestis</i> . 2. m/z, relación de masa (m) respecto a la carga (z).		

REIVINDICACIONES

1. Una composición que se puede obtener por un proceso que comprende:

- 5 proporcionar un cultivo que comprende un cepa 27729 de la ATCC de *Yersinia enterocolitica*, en el que la *Yersinia enterocolitica* se ha cultivado a 37 °C en un medio de caldo de soja triptico (TSB) que comprende 160 µM de 2,2'-dipiridilo;
destruir la *Yersinia enterocolitica* para dar como resultado una mezcla que comprende las membranas celulares destruidas;
- 10 solubilizar la mezcla añadiendo a la mezcla un detergente biológico para dar como resultado una preparación que comprende proteínas solubilizadas y no solubilizadas; y
aislar los polipéptidos no solubilizados.

2. Una composición que comprende una preparación de células completas aisladas de una cepa 27729 de la ATCC de *Yersinia enterocolitica*, en la que las células se han cultivado a 37 °C en medio TSB que comprende 160 µM de 2,2'-dipiridilo.

3. Una composición que se puede obtener por un proceso que comprende:

- 20 proporcionar un cultivo que comprende la cepa 27729 de la ATCC de *Yersinia enterocolitica*, en el que la *Yersinia enterocolitica* se ha cultivado a 37 °C en medio TSB que comprende 160 µM de 2,2'-dipiridilo;
inactivar la *Yersinia enterocolitica* para dar como resultado una composición que comprende células inactivadas de *Yersinia enterocolitica*, en donde la inactivación se produce en condiciones que no destruyen las células; y
recolectar las células inactivadas.

4. Una composición que se puede obtener por un proceso que comprende:

- proporcionar un cultivo que comprende una cepa KIM6+ de *Yersinia pestis*, en el que la *Yersinia pestis* se ha cultivado a 37 °C en medio TSB que comprende 160 µM de 2,2'-dipiridilo;
- 30 destruir la *Yersinia pestis* para dar como resultado una mezcla que comprende membranas celulares destruidas;
solubilizar la mezcla añadiendo a la mezcla un detergente biológico para dar como resultado una preparación que comprende proteínas solubilizadas y no solubilizadas; y
aislar los polipéptidos no solubilizados.

5. Una composición que comprende una preparación de células completas aisladas de una cepa KIM6+ de *Yersinia pestis*, en la que las células se han cultivado a 37 °C en medio TSB que comprende 160 µM de 2,2'-dipiridilo.

6. Una composición que se puede obtener por un proceso que comprende:

- 40 proporcionar un cultivo que comprende una cepa KIM6+ de *Yersinia pestis*, en la que la *Yersinia pestis* se ha cultivado a 37 °C en medio TSB que comprende 160 µM de 2,2'-dipiridilo;
inactivar la *Yersinia pestis* para dar como resultado una composición que comprende células de *Yersinia pestis* inactivadas, en donde la inactivación se produce en condiciones que no destruyen las células; y
recolectar las células inactivadas.

7. Una composición de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6 para su uso como un medicamento.

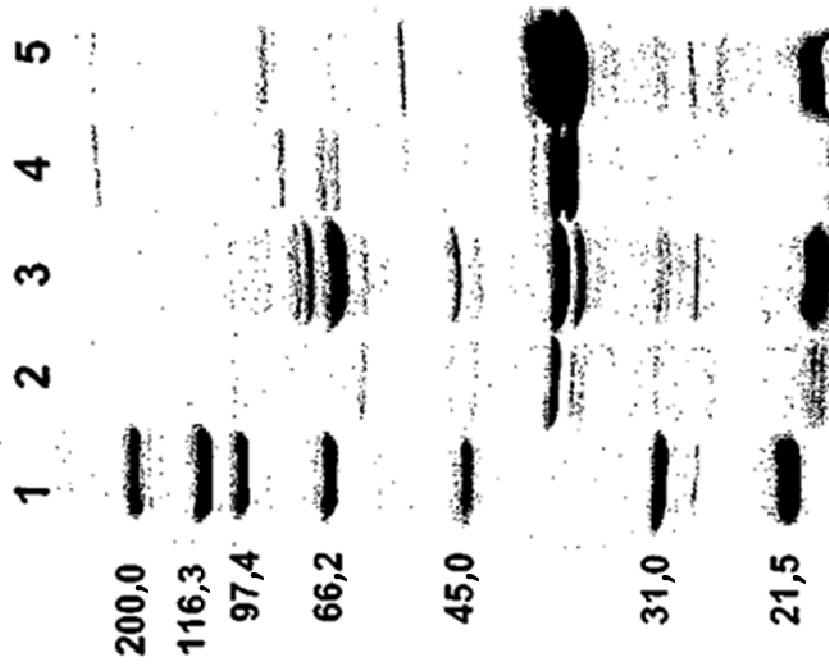


Figura 1

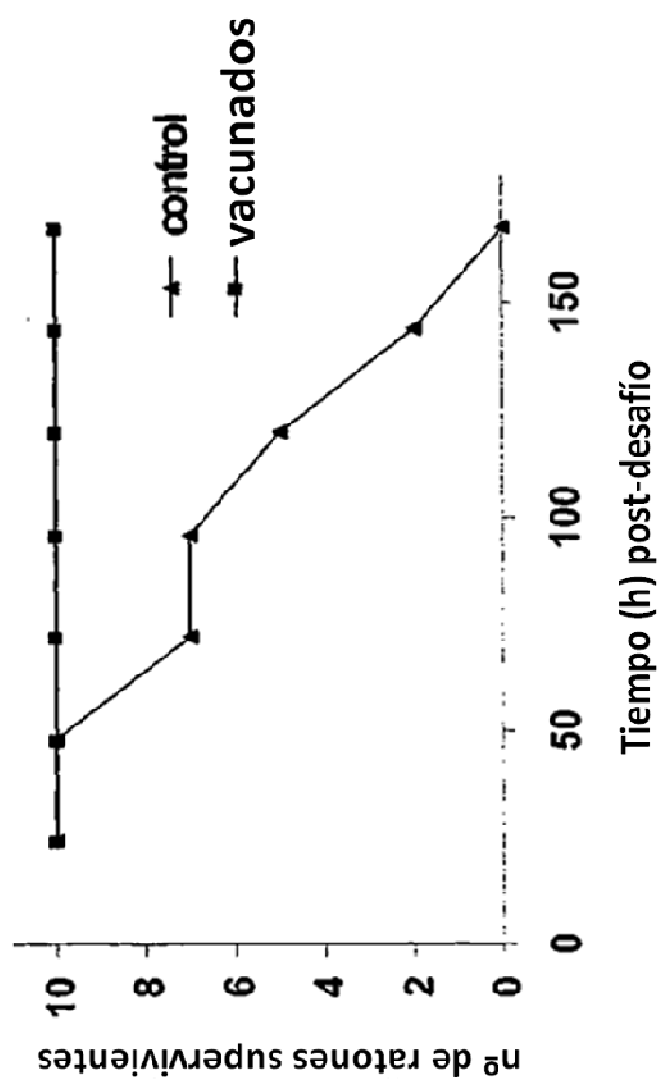
**Figura 2**

Figura 3

SEQ ID NO:1

MTKDFKISVSAALISALFSSPYAFANDEVHFTAVQISPNSDPDSHVMIFQPEVRAPGGTNALAKGTHS
I
AVGASAEAAERA AVAVGAGSIATGVNSVAIGPLSKALGDSAVTYGAGSTAQKDGVAIGARASTSDTGVA
V
GFNSKVDAKNSVSIGHSSHVAVDHDYSIAIGDRSKTDRKNSVSIGHESLNRQLTHLAAGTKD TDAVNVA
Q
LKKEIEKTOENANKKSAEVLGIANNYTDSKSAETLENARKEAFDLSNDALDMAKKHSNSVARTTLETAE
E
HTNKKSAETLASANVYADSKSSH TLKTANSYTDVTVSNSTKKA IRESNQYTDHKFHQLDNRLDKLDTRV
D
KGLASSAALNSLFQPYGVGKVNFTAGVGGYRSSQALAIGSGYRVNESVALKAGVAYAGSSDVMYNASFN
I
EW

SEQ ID NO:2

MPRSTSDRFRWSPLSLAIAC TSLAVQAADTSSTQTNSKKRIADTMVVTATGNERSSFEAPMMVTVVEA
D
TPTSETATSATDMLRNIPGLTVTGSGRVNGQDVTLRGYKGQGVLT LVDGIRQGTDTGHLNSTFLDPALV
K
RVEIVRGPSALLYGSGALGGVISYETVDAADLLPGQNSGYRVYSAAATGDHSFGLGASAFGR TDDVDG
I
LSFGTRDIGNIRQSDGFNAPNDETISNVLAKGTWRIDQIQSLSANLRYNN SALEPKNPQTSAA SSTNL
M
TDRSTIQRDAQLKYNIKPLDQEWLNATAQVYYSEVEINAR PQGTPEEGRKQTTKGGKLENRTRLFTDSF
A
SHLLTYGTEAYKQEQT PSGATESFPQADIRFGSGWLQDEITLRDL PVSILAGTRYDNYRGSSEGYADVD
A
DKWSSRGAVSVTPTDWLMLFGSYAQAFRAP TMGEMYNDSKHFSMNINVT PDQLLGTNP NLKPETNETQE
Y
GFGLRFNDLMAAEDDLQFKASYFD TNAKDYISTGVTMDFGFGPGGLYCKNCSTYSTNI DRAKIWGWDAT
M
TYQTQWFNLGLAYNRTRGKNQNTNEWLDTINPDTVTSTLDVPVANS GFVAVGWIGTFADRSSRVSSSGTP
Q
AGYGVNDFYVSYKGQE QFKGMTT VVLGNAFDKGYGPGQVPQDGRNAKEFFVSYQW

SEQ ID NO:3

MNQTISSRAPQKRLAPRLLCVMIGAALGTLSASSWAAAATDSTAENAKKTSATAATAKAEDSKTNDTIT
V
VGAQETFRAGGNDLIPTYL DGGQVANGGRIGFLGQQDARNVPFNVIGYTSKMIEDQQANSIADVVKNDAS
V
QNVRGYGNPSQNYRIRGYNL DGGDISFGGLFGVLPRQIVSTSMVERVEVFKGANAFINGISPSGSGVGG
M
INLEPKRAGDTPLTRVTVDYGSASQVGGALDVGRRYGDDQFGVRVNVLHREGESA IHDQKERTTAVST
G
LDYRGDRARTSLDVG YQKQTIHMR TDVAIGGATVIPEPPSSTLNYGQSWVYTDMETTFGMLRSEYDVS
Q
NWTVYGSVGASRNEETGOYGAPMLTNNNGDATISRLYVPYVADSVAGLGGIRGHFDTGPITHKVN LGYA
A
NYRTTKSAWNMSGQEDTNIYNPGVIGFPQTMGSDSQDPQLTSQVRASGLSLSDTL SMMDOKVSLMLGV
R
RQEV TIRNFD SGVPNSAGSLDAMKVTP IYXIMVKPWEKVSLYANHIEALGPGKSAPYQYNGKPVVNAGQ
I
PGI IHSKQNEIGVKFDNQRYGGTLALFEITRPTGMVDPATNVYGFYGEQRNRGIELNVFGEPVFGTRLL
A
SATWLDPKLTKAADSANNGNDAVGVANYQLVFGGEYDIPVVEGLTATGTVVRSGSQYANEANTLKLKPW
T
RLDLGVRYTMPHKDTSLTWRANIENV TNERYWESVEDSGTYIYQGDPRALKLSVSMDF

Figura 3 cont.

SEQ ID NO:4

MFSAFIIKRSAILCSLAMFIPLASIADDTIEVTAKAGHEADLPTSGYTATTTKGATKTDQPLILTAQSV
 S
 VVTRQQMDDQNVATVNQALNYTPGVFTGFSGGATRYDTVALRGFHGGDVNNTFLDGLRLLSDGGSYNVL
 Q
 VDPWFLERIDVIKGPSSALYGQSIIPGGVMMTSKRPOFTSEGHFRLTAGNNNTQVAAFDYTDAlSEHWA
 F
 RLTGITRNSDTMYDHQREERYAIAPSLWQPDENTSLLLRLANLQKDPSSGGYHSAVPADGSIYGQKLSRG
 F
 FDGESNHNVFKRWQQIYSYEFSHKFDDVWSFRQNASYTHSNTQLEQVYQGGWNSDRITLMNRYYSGEDSS
 L
 NAFAVDNQLEADLRATAAVKHKVLGVDQKFRNNLRSDSAYATPLNPYTGVSOGGSTLYSDYLLTTPGIN
 T
 SYLSRRYEQSGVYLQDEMTLDNWHNLNSGRYDRMKTENINNTANSTDERTDNHASGRASILLYSFDSGIS
 P
 YVSYSQAITPSLFPDAQKLLKPMTSEQYEVGIIYQPPGSTSLYSAALYDLTQNDVANRAVPATYYVPA
 G
 KVNSQGLELEARSQISDRLSVIAGYTYNRVKFKDAIDGNDGNTFVLAPSNMASLWAQYEAGYGINVGAG
 I
 RYIGKQWADDANTLRVPSYTLGDASVRADLGTWAASLKGAQVQLNVNNIADKKYVAACYSTSICYWGAE
 R
 SVQATVGYDF

SEQ ID NO:5

MKMTRLYPLALGGLLLPAIANAQTSQODESTLEVTASKQSSRSASANNVSSTVVSAPELSDAGVTASDK
 L
 PRVLPGLNIENSGNMLFSTISLRGVSSAQDFYNPAVTLYVDGVPQLSTNTIQALTDVQSVELLRGPQGT
 L
 YGKSAQGGIINIVTQQPDSTPRGYIEGGVSSRDSYRSKFNLSGPIQDGLLYGSVTLLRQVDDGDMINPA
 T
 GSDDLGGTRASIGNVKLRAPDDQPWEMGFAASRECTRATQDAYVGWNDIKGRKLSLSDGSPDPYMRRC
 T
 DSQTLSGKYTTDDWVFNLISAWQQQHYSRTFPGSLIVNMPQRWNQDVQELRAATLGDAITVDMVFGLY
 R
 QNTREKLNSAYDMPTMPYLSSTGYTTAETLAAYSDLTWHLTDRFDIGGGVRPSHDKSSTQYHGSM LGNP
 F
 GDQGKSNDDQVLGQLSAGYMLTDDWRVYTRIAQGYKPSGYNIVPTAGLDAKPFVAEKSINYLGTTRYET
 A
 DVTLQAATFYTHTKDMQLYSGFVGMQTLNAGKADATGVELEAKWRFAPGWSWDINGNVIRSEFTNDSE
 L
 YHG NRVPFVPRYGAGSSVNGVIDTRYGALMPRLAVNLVGP HYFDGDNQLRQGT YATLDSSLGWQATERI
 N
 ISVHVDNLFDRRYRTYGYMNGSSAVAQVNMGRTVGINTRIDFF

Figura 3 cont.

SEQ ID NO:6

MVTASGFQQRIQDSAASISVVTREQIENKAYTDITDALKDVPGVVVTGGGSHSDISIRGMAAKYTLILV
D
GKRVDTRGTRPNSDGSIEQGWLPPLAAIERIEVVRGPMSSLYGSDAMGGVINVITRKVGKEWHGTVRA
D
ATLQEDSKSGDIFQTNAYASGPLIDGLLGLKVSGLLSHRSEDKIVDGYNEQRLRNGAATFTLTDPDKNE
F
DFDIGHYVQDRNSTAGRSVALNGKSSDVQYDRNNYAITHHGYDFGNSTSYVQRDETRNPSREMKSVDN
I
FNTQTSFLLDNHTLILGGQYRYEELNDTGMQLASAKDLTKLTRWSWALFAEDEWQMTNDFALTGGVRMD
Q
DENYGTHWTPRLYGVWHLAEQWTLKGGVSGGYRSPDLRQATENWGQITGGRGDPAAIIGNANLKPERSI
S
QEIGILWDDQEGMNAGVTLFNTDFKDKITEVRRCTDTTGKASGQCMINGASYKFISDRTNVDKAITRGV
E
ATFGWDINQEWSLTSNYTFTQSEQKSGQFAGQPLNQMPKHMLNGTLNWQASEALATWVRANYRGKTSEY
L
NRTSIGGSTPSYTFVDLGANYQLTKEFRLMGGVYNVLDKRVDIEVNDKVLDGRRYVMGASYDF

SEQ ID NO:7

MTKDFKISVSAALISALFSSPYAFANNDVHFTAVQISPNSDPDSHVMIFQPEVRAPGGTNALAKGTHS
I
AVGASAEAAERAAVAVGAGSIATGVNSVAIGPLSKALGDSAVTYGAGSTAQKDGVAIGARASTSDTGVA
V
GFNSKVOAKNSVSIGHSSHVAVDHDYSIAIGDRSKTDRKNSVSIGHESLNRQLTHLAAGTKDQDAVNVA
Q
LKKEIEKTQENANKKSAEVLGIANNYTDSKSAETLENARKEAFDLSNDALDMAKKHSNSVARTTLETAE
E
HTNKKSAETLASANVYADSKSSHTLKTANSYTDVTVSNSTKKAIRESNQYTOHKFHQLDNRLDKLDTRV
D
KGLASSAALNSLFQPYGVGKVNFTAGVGGYRSSQALAIGSGYRVNESVALKAGVAYAGSSDVMYNASFN
I
EW

SEQ ID NO:8

MKLRVLSLLVPALLVAGSAGAAEYHKDGNKLDLYGKVDGLHYFSDDKSKDGDQSYMRFGLKGETQISD
Q
LTGYGQWEYQANLNKAEDQDQGNFTRLGFAGLKFADYGSLDYGRNYGVLYDVTSWTDVLPEFGGDTYGA
D
NFMSQRANGLATYRNTNFFGLVDGLNFALQYQGKNGSPTESNNGRDVKQGNGDGYGMSLSYDLGWGVS
A
AAMSSSKRTTEQNQLLFGNGDRADAYSGLKYDANNVYLAATYAQTYNLTRFGNFQNNNSGFANKAQNI
E
LVAQYQFDFGLRPSVAYLQSKGKDLNGYGDQDLVQYVDVGATYFFNKNMSTYVDYKINLLDENEFTKN
A
GINTDDIVAVGLVYQF

SEQ ID NO:9

MKKNMKLIAITAVLSSVLVLSGCGAMSTAICKRNLEVKTQMSSETIWLEPSSQKTVYLQIKNTSDKNMLG
L
APKITKAVQDKGYTVTSSPEDAHYWIQANVLKADKMDLREAEGFLSQGYQGAALGAALGAGITGYNSNS
A
GASLGVGLAAGLVGMVADAMVEDINYTMVTDVQISEKTDTPLOTDNVAALKQGTSGYKVQTSQTGNKH
Q
YQTRVVSSANKVNLKFEEAQPVEDQLAKSIANIL

Figura 3 cont.

SEQ ID NO:10

MAVTNVAELNELVARVKKAQREYANFSQEVDKIFRAAALAAADARIPLAKLAVTESGMGIVEDKVIKN
H
FASEYIYNAYKDEKTCGILCEDKTFGTITIAEPIGLICGIVPTTNPTSTAIFKALISLKTRNGIIFSPH
P
RAKDATNKAADIVLQAAIAAGAPADIIGWIDAPTVELSNQLMHHPDINLILATGGPGMVKAAYSSGKPA
I
GVGAGNTPVVVDETADIKRVVASILMSKTFDNGVICASEQSIIVVDSVYDAVRERFASHGGYLLQGKEL
K
AVQDIILKNGGLNAAIVGQPATKIAEMAGIKVPSNTKILIGEVKVVDSEPFHAHEKLSPTLAMYRAKNF
E
EAVEKAEKLVEMGGIGHTSCLYTDQDNQTARVKYFGDKMKTARILINTPASQGGIGDLYNFKLAPSLTL
G
CGSWGNSISENVGPKHLINKKTVAKRAENMLWHKLPKSIYFRGSLPIALEEVATDGAKRAFIIVTDRY
L
FNNGYADQVTSVLKSHGIETEVFFEVEAAPTLSIVRKGAEQMNSFKPDVIALGGGSPMDAAKIMWVMY
E
HPETHFEELALRFMDIRKRIYKFKPMGVKAKLVAITTTSGTGSEVTPFAVVTDATGQKYPLADYALTP
D
MAIVDANLVMNMFKSLCAFGGLDAVTHALEAYVSVLANEYSDGQALQALKLLKEFLPASYNAGAKNPVA
R
ERVHNAATIAGIAFANAFLGVCHSMAHKLGSSEFHIPHGLANAMLISNVIRYNANDNPTKQTAFSQRDRP
Q
ARRRYAEIADHLGLSAPGDRTAQKIQLLAWLDEIKAEKGIPASIREAGVQEADFLAKVDKLSEDAFDD
Q
CTGANPRYPLISELKQILMDTYYGREYVEEFDREEVAAATAPKAEKKTKK

SEQ ID NO:11

MARKTPIERYRNIGISAHIDAGKTTTTTERILFYTG VNHKIGEVHDGAATMDWMEQEQRGITITSAATT
C
FWSGMAKQFEPHHVNIIDTPGHVDFTIEVERSMRVLDGAVMVYCAVGGVQPQSETVWRQANKYKVPRIA
F
VNKMDRMGANFLRVVGLKSR LGANPVPLQLAIGAEKFTGIIDL VKMKAINWNEADQGVTFEYEEIPA
D
MAELAAEWHQNLVESAAEASDELMDKYLGGEELTETEEIKKALRQRLKSEIILVTCGSAFKNKGVQAML
D
AVIEYLPAPTDVESINGILDDGKDTPAVRHSDDOKEPFSALAFKIATDPFVGNLTFFRVYSGIVNSGDTV
L
NSVKSQRERLGRIVQM HANKREEIKEVHAGDIAAAIGLKDVTTGOTLCDPNNPIILERMEFPEPVISVA
V
EPKTKADQEKMGMALGR LAKEDPSFRVWTDEESGQTIIAGMGELHLDILVDRMRREFNVEANVGKPQVA
Y
RETIRETVKDVEGKHAKQSGGRGQYGHVVIDMSPLPPGGVGYEFVNEIVGGSIPKEFIPAVDKGIOEQL
K
SGPLAGYPVVVDKVR LHYGSYHDVDSSELAFKLAGSIAFKEGFKRAKPVLLPEIMKVEVETPEDYMGDV
M
GDLNRRRGIIEGMEDTATGKTVRVKVP LSEMFGYATDLRSQTQGRASYSMEFLEYAEAPSNAVAKAVIEA
R
GK

Figura 3 cont.

SEQ ID NO:12

MTSPPFSYTSPPVSVDAKHSIAYKLMFIIGKDPTIATQHOWNATLFAVRDRMVERWLRSNRAQLSQDV
 R
 QVYYLSMEFLLGRTLSNALLSMGIYDEIEQALDEMGLSLSELLKEENDPGLGNGGLGRLAACFLDSLAT
 L
 ALPGRGYGIRYEGMFSQKIVNGQQMESPDNWLEYGNWEEFPRHNTRYKVRFGGRIQQEGSKIRWLETE
 E
 ILACAYDQIIPGFDTDATNTLRLWSAQASNEINLGKFNQGDYFAAVEDKNHSENVSRVLYPDDSTYSGR
 E
 LRLRQEYFLVSATVQDILNRHWAMHHTFNNLADKIAIHLNDTHPVLSIPEMMRLIDEHKFTWMDAWDV
 V
 QQVFSYTNHTLMSEALETWPVDMIGKILPRHLQIIFDINDHFLKLVEEQYPDDKELLSRVSVIDENNGR
 R
 IRMAWLAVIASHKVNGVSALHSELMVQSLFADFARIFPNRFCNKTNQVTPRRWLGLANRPLAAVLDDSI
 G
 QTWRTDLSQLSELEKNLDYPSFLLALQKAKLENKKRLAVYIAEKLNIIVNPAALFDVQIKRIHEYKRQL
 L
 NVLHVITRYNRIIDAPDNNWVPRVVFAGKAASAYYNAKQIIHLINDVAKVINNDPRINNLLKVVFIPN
 Y
 SVSLAQLIIPAADLSEQISLAGTEASGTSNMKFALNGALTIGTLDGANVEIREHVGEENIFIFGNTTEQ
 V
 EALRKSGYNPRKYDDEPELHQVLTQIATGTFSPPEPHRYTNLFOSLVNLGDHYQLLADYRSYVDTQEQ
 V
 DALYRNRDEWSRKTLNLIANMGYFSSDRTIKEYADEIWHIKPIRL

SEQ ID NO:13

MKKRFPPTLLATLIWTALYSQHTLADLAEQCMLGVPTYDQPLVTGDPNQLPVRINADKTEANYPDNALFT
 G
 NVIVQQGNSTLTANQVELTQVQKPGEVIPLRTVTATGDVNYDDPQIKLKGPKGWSNLNTKDTMDKGKY
 Q
 MVGRQGRGDADLMKLRDQSRYTILKNGTFTSCLPGDNSWSVVGSEVIHOREEQVVEVWNARFKIGKVPV
 F
 YSPYMLPVGDKRRSGFLIPNAKFTSNNGFEFLLPYYWNIAPNFDATITPHYMERRGLQWQNEFRYLLA
 P
 GSGTMALDWLPNDRIYTGPDGTDKNATRWLYYWGHSVMDQVWRFNINYTRVSDPAYFTDLTSQYGSTT
 D
 GYATQIFTAGYANENWNATLSSKQFQVFTAAGNSNAYRAQPQLDMNYKNDVGPFDMHVYGQAAKFTSV
 N
 PTNPEASRFHIEPTVNLPLSNSWGSINTEAKLLATHYQQDIPASFADNASNPCLKDSVNRVLPQFKVDG
 K
 VVFDRSMDWATGFTQTLEPRAQYLYVPYRNQDDIYYDTTLMQSDYSGLFRDRTYSGLDRIASANQVST
 G
 LTSRIYDDARVERFNVSVGQIYYFSRSRTGNTEAIDNSNATGSLVWAGDTFWRINDQLGLKGGAQYDTR
 L
 GSLTLGNAIMEYRKDADRMQLNYRYASPKYIQAAVPKVYNPDYQQGISQVGTASWPIADRWAIVGAY
 Y
 YDTKAKQPASQLVGLQYNTCCWAVNLGYERKITGWNAQGQTSKYDNKIGFNIELRGLSGGHSGLTAQML
 N
 SGILPYQSAF

Figura 3 cont.

SEQ ID NO:14

MLRSTSDRFRWSSLSLAIAC TLPLATQAADTTTTQTSSKKHSTDTMVVTATGNERSSFEAPMMVTVIEG
 N
 APTSQTAATAADMLRQVPGLTVTGSGRTNGQDVVMRGYKQGVLTFLVDGVRQGTDTGHLNSTFLDPALV
 K
 RIEIVRGPAALLYGSGALGGVIAIYETVDAADMLQPGQNSGYRVYSSAATGDHSFGLGASAFGR TDDLDG
 I
 LSFGTRDIGNIRQSNGFNAPNDETISNVLAKGTWQIDS IQSLSANLRYNNNSAIEPKNPQTSAPSSTNV
 M
 TNRSTIQRDAQLRYNIKPLDQEWLNATAQVYYSEVEINARPPQGSAAEGREQTTEGVKLENRTRLFIESP
 A
 SHLLTYGTETYSKQEQTPGGATESFPQAKIRFSSGWLQDEITLRDLPVSILAGTRYDNYSGSSDGYADVD
 A
 DKWSSRGAISITPTDWLMLFGSYAQAFRAPTMGEMYND SKHFAIPIRPGLTLTNVWP NPNLKPETNET
 Q
 EYGFGLRFSDLLMAEDDLQFKVSYFDTKAKDYISTRVDMQAMTTTSVNIDQAKINGWDASMSYKTALFN
 W
 DLAYNRTRGKNQNTDEWLD TINPDTVTSIVDVPVANSFGSVGWIGTFANRSSRVSSSTPQAGYGVNDFY
 V
 SYKGQEAFFKGMTTMTLLGNVFEKEYYTPQGI PQDGRNVKFFVSYQW

SEQ ID NO:15

MSNKTIAFALVASSAPVIAADNDNIMVVTASGYEQKIREAAASISVISQNELRQRNYNDLAQALSDVE
 G
 VDVNSSTGKTGGLDISIRGMPSAYTLILVDGIRQNGTSDVTPNGFGAMNTSFMPPLSAIERIEVIRGPM
 S
 TLYGSDAIGGVNIIITKKITKAWASSATLEHTFQENTAFGDSSKFSFYSSGPAVEDQLGLSLRGTI FR
 D
 ASRVESSTGVELSRRGPNPVKADNYNLGGKLFWQLNTQSTLWLDGDIANQKYDNSANQLGTIGARGGY
 E
 DTLRYQRRKITLGNDNR LDFGTWNSSLSYNQ TENIGRLITNASVPQGSGLAGEKRLLKNTNIILDSKLV
 A
 PLGDNHMTLGGQYWN AIMKDGIVLANNGDEFAQDAWSL FSEDEWRLLDSLALTYGARYEYQTTFGGHI
 S
 PRAYLVWDAQDNWTVKGGVSTGYKTPTLAQLHNGISGVTGQGTITTIGNPKLEPESSVNTTEVG VYYENE
 T
 GFGANVTLFHNRFRNKINSVSIDNTTSTYTNVGKAITQGIEVASTIPLWSDOWMLGINYTFTDSEQKDG
 N
 NKGARLTNTPKNMVNARLNWNINEQLSTWLKAEYRSKTARFTQNYANLSAANKVVYNNLGSEFKPF SVL
 N
 LGVAYKVTKDVTLNGAVNNLLDXDFTRTHIFAVGN GTTTAGDYFTSSQSTAGYVVPGRNYWVSVNVNF

Figura 3 cont.

SEQ ID NO:16

MKMTRLYPLALGGLLLPAIANAQTSQQDESTLVVTASKQSSRSASANNVSSTVVSAPELSDAGVTASDK
 L
 PRVLPGLNIENSGNMLFSTISLRGVSSAQDFYNPAVTLYVDGVPQLSTNTIQALTDVQSVELLRGPQGT
 L
 YGKSAQGGIINIVTQQPDSTPRGYIEGGVSSRDSYRSKFNLSGPIQDGLLYGSVTLLRQVDDGDMINPA
 T
 GSDDLGGTRASIGNVKRLAPDDQPWEMGFAASRECTRATQDAYVGWNDIKGRKLSISDGSPDPYMRR
 T
 DSQTLGSKYTTDDWVFNLISAWQQQHYSRTFPSSGLIVNMPQRWNQDVQELRAATLGDARTVDMVFGLY
 R
 QNTREKLNSAYDMPTMPYLSSTGYTTAETLAAYSDLTWHLTDTRFDIGGGVRFSDHKSSTQYHGSMLGNP
 F
 GDQGSNDDQVLGQLSAGYMLTDDWRVYTRVAQGYKPSGYNIVPTAGLDAKPFVAEKSINYEGLTRYET
 A
 DVTLQAATFYTHTKDMQLYSGPVRMOTLSNAGKADATGVELEAKWRFAPGWSWDINGNVIRSEFTNDSE
 L
 YHGHRVPFVPRYGAGSSVNGVIDTRYGALMPRLAVNLVGPHYFDGDNQLRQGTATLDSSLGWQATERM
 N
 ISVYVDNLFDRRYRTYGYMNGSSAVAQVNMGRVTGINTRIDFF

SEQ ID NO:17

MAAKDVKFNGDARIKMLRGVNIADAVKVTLGPKGRNVLDKSFSGSPTITKDGVSVAREIELEDKFENM
 G
 AQMVKEVASKANDAAGDGTATVLAQSIITEGLKAVAAGMNPMDLKRGIKAVIAAVEELKKLSVPCS
 D
 SKAIAQVGTISANSSTVGLIAQAMEKVGKEGVITVEEGSLQDELDVVEGMQFDRGYLSPYFINKPE
 T
 GSIELESPFILLADKKISNIREMLPVLEAVAKAGKPLLIIEADVEGEALATLVVNTMRGIVKVAVKAP
 G
 FGDRRKAMLQDIATLTAGTVISEEIGLELEKTTLLEDLGQAKRVVINKOTTIIDGVGDEAAIQGRVAQI
 R
 QQIEDATSDYDKEKLQERVAKLAGGVAVIKVGAATEVEMKEKKARVEDALHATRAAVEEGVVAGGGVAL
 I
 RAAHAIAGLKGDNEDQNVGIKVALRAMESPLRQIVVNAGEEASVIANKVKAGEGSFGYNAYTEEYGDMI
 A
 MGILDPTKVTRSAHQYAASIAGLMITTECMVTDLPDDKGADMGAGGMGGMGGMGGM

SEQ ID NO:18

MQMKKLLPLLIGLSLAGFSTMSQAENLLQVYKQARDSNPDLRKAAADRDAAYEKINEVRSPLLQQLGLS
 A
 GYTHANGFRDASNSPDSNATSGSLKLTQTIFDMSKWRALTLOEKAAGIQDVTFTQTEQQLIINTATAYF
 N
 VLRAIDSLSYTEAQKQSVYRQLDQTTQRFNVGLVAITDVQNARASYDTVLAAEVAARNNLDALESRLQ
 I
 TGVYYPELASLNVERLKTQRPDAVNNLLKEAEKRNLSSLARSQDLAREQIKSAETGYMPTVDLTASS
 S
 ITNTRYSGGTPSSQQVNNDSGQNQIGVQFSLPLYSGGATNSAVKQAQYNFVGASELLESAHRNMVQTLR
 S
 SFNNISASISSINAYQQVVISNQSSLDAMEAGYQVGTRTILDVLTATTNLYQSKQQLADARYNYLINQL
 N
 IKSALGTLNMNDLMALNAVLDPVPTSAALAPENTTROTVTTPRAQ

Figura 3 cont.

SEQ ID NO:19

MSKEKFERTKPHVNVGTIGHVDHGKTTLTAAITTVLAKTYGGSARAFDQIDNAPEEKARGITINTSHVE
 Y
 DTPARHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQMDGAILVVAATDGMPQOTREHILLGRQVGVPIIIVFMNKCD
 M
 VDDEELLELVEMEVRELLSAYDFPGDDL PVVRGSALKALEGEAEWEAKI IELAGYLD SYIPEPERAIDK
 P
 FLLPIEDVFSISGRGT VVTGRVERGIVKVGEVEIVGIKDTV KSTCTGVEMFRKLLDEGRAGENVG VLL
 R
 GIKREDIERGQVLAKPGSIKPHTTFESEVYILSKDEGGRHTPFFKGYRPQFYFRTTDVTGTIELPEGVE
 M
 VM PGDNINMIVTLIHP IAMDDGLRFAIREGGRTVGAGV VAKVIA

SEQ ID NO:20

MKLRVLSFIIPALLVAGSASAAEIYNKDGNKLDLYGKIDGLHYFSDNKNLDGDQSYMRFG LKGETQITD
 Q
 LTGYGQWEYQVNLNKAENEDGNHDSFTRVG FAGLK FADYGS LDYGRNYGVLYDVT SWTDVLPEFGGDTY
 G
 ADNFLSQRGNGLTYRNTNFFGLVDGLNFALQYQGKNGSSSETNNGRGVADQNGDGYGMSLSYDLGWGV
 S
 ASAAMASSLRTTAQNDLQYGGQKRANAYTGGLKYDANNVYLAANYTQTYNLTRFGDFS NRSSDAAFGFA
 D
 KAHNIEVVAQYQDFGLRPSVAYLQSKGKDIGIYGDDLLKYVDIGATYFFNKNMSTYVDYKINLLDKN
 D
 FTKNARINTDDIVAVGMVYQF

SEQ ID NO:21

MYNIDYNSFRSVKGFNRRVRFLVMHYTAFNFKDSIDALTGPSVSAHYLVPDPTEQTYIDAGFKDMRIFN
 L
 VDENERAWHAGVSYWDGRNNLNDAIGIETVNLATDNDGVFTFFPYNVTQIAAIKALASNILYRFPDIT
 P
 VNVVGHSDIAPGRKSDPGAAPWKALYDAGIGAWYDDETKQRYLDQFLCSLPSKNDIISKLKRYGYDTS
 G
 AVSEVGYNQLIRAFQLHFRPCNYDGIPDAETVAILYALVDKYKP

SEQ ID NO:22

MRKLLSGGLLLLLLAGCSSSDHRNSNELIDRGTYQIDTHYPSVAKNERVRFLVLHYTAVGDAESLRLLTQ
 G
 EVSAHYLIPTHPKKAGGKAIALQLVPEAQRAWHAGVSSWQGRNNLNDSIGIEIVNLGFTEKMLGRTWY
 P
 YNESQIELIEQLTKDIVQRYNISPSDVVAHSDIAPLRKSDPGPLFPWKRLAEKGVGAWPDDATVAKYIG
 G
 RDKKGAASVAVIQQALAAYGYKIPQNGQLDTETQVIKAFQMHFRPQDFSGVPDVETEAIALALVEKYR
 T
 LST

SEQ ID NO:23

MVTVLGIVITIWMVFMNKTLVSSLIACLSIASVNVYAEGESSISIGYAQSRVKEDGYKLDKNPRGFNL
 K
 YRYEFNNDWGVIGSFAQTRRGFEESVDGFKLIDGDFKYYSVTAGPVFRINEYVSLYGLLGAGHGKAKFS
 S
 IFGQSESRSKTSLAYGAGLQFNPHPNFVIDASYEYSKLDDVKVGTWMLGAGYRF