



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No

07-32741

54. TITULO "COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA PARA SU USO EN
VACUNACIÓN CONTRA ESTAFILOCOCOS"

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K 39/085

71. SOLICITANTE GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

DOMICILIO RIXENSART, BÉLGICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTA, D.C. 30 MAR 2007

En 22-04-2007

Cesúa

Complemento 5 folios 26-06-2007

(FORMA P 10)

✓

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-032741- -00000-0000
Fec: 2007-03-30 10:44:24 Dep: 2007 NUECREACIONES
Ita: 11 PATENTE DE
EVS: 2/2 FASE NACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 2/3

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 22-04-2007

1

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I

☒ Capítulo II

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA**

Dirección Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica

Nacionalidad o Domicilio Rixensart, Bélgica

Lugar de Constitución Bélgica

Teléfono 3264270 Fax 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C C ☐ NIT ☐

C E ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección Calle 72 No 5-83 Piso 5°, Bogotá, Colombia

Teléfono 3264270 Fax 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐

C E ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39 690.713 TP 53 215

4

**INVENTOR(ES)
(72)**

Nombre: **CASTADO, Cindy, LECRENIER, Nicolas, Pierre, Fernand, NEYT, Cecile, Anne y POOLMAN, Jan**

Dirección GlaxoSmithKline Biologicals s a , Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart

Nacionalidad o Domicilio Bélgica

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No PCT/EP2005/010184

Fecha 20/09/05

Publicación Internacional No WO 2006/032472 A3

Fecha 30/03/06

6

Título (54) **COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA PARA SU USO EN VACUNACIÓN CONTRA ESTAFILOCOCOS**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 39/085

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

GB
GB
GB
GB
GB

22/09/04
22/09/04
22/09/04
22/09/04
15/02/05

0421082 9
0421078 7
0421081 1
0421079 5
0503143 0

9

Comprobante de Pago No. 07-21.323

Fecha: Marzo 13 de 2007

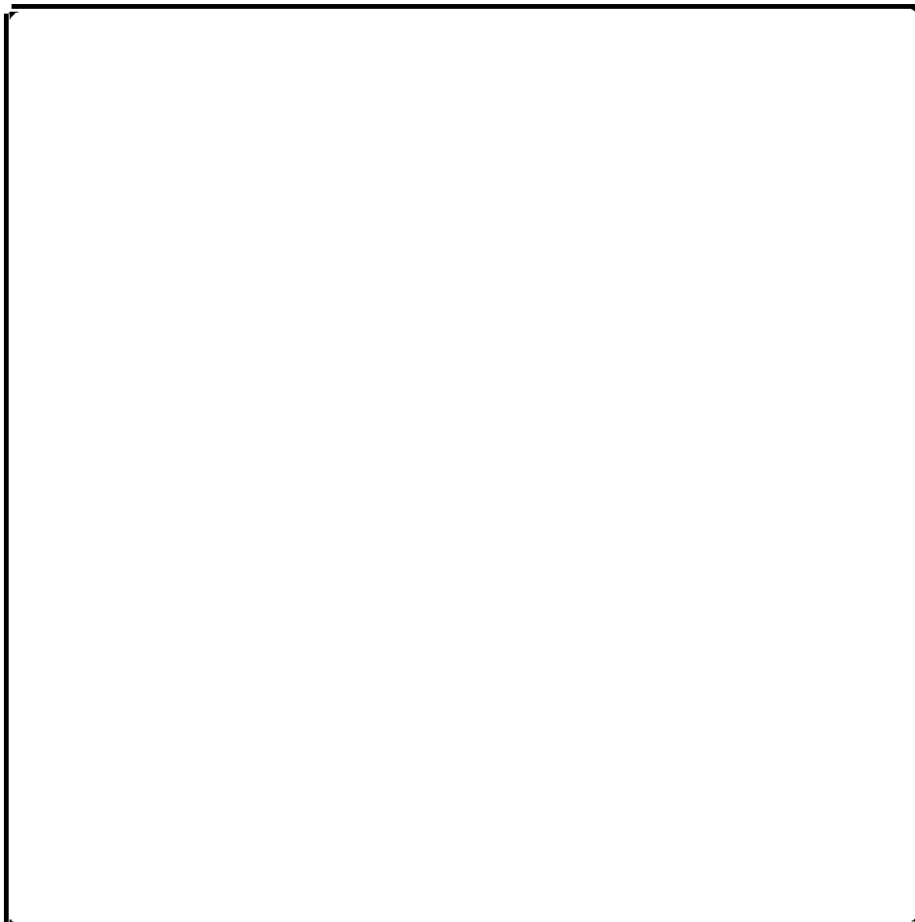
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Documento de Representación Legal
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☒ Copia del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad
- ☒ Traducción del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ Arte Final 12X12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción, Capítulo Revindicatorio como fue originalmente presentado en Fase Internacional con su traducción, Opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional con su traducción, Anexo Explicativo de Modificaciones a las Reivindicaciones y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA

FIRMA

C C 39 690 713 Usaquéñ T P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-032/41- -00000-0000
FOLIO 2007-03-30 10:44:24 LSP 2020 NUECREACIONES
178 11 PATENTE IYII
EVS 3/8 FASE NACIONAL II
AG 411 PRESENTACION FOLIO 200

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 21,323
FECHA : MARZO 13 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ELLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55738182	13/03/2007	5,070,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS



RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se esta presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

4

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-09-466
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español

Certificado Notarial (Sociedad) documento también escrito en inglés y en español

Notarización, documento escrito en español.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

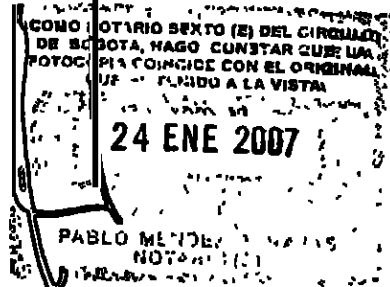
- 1 País Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento público
- 2 ha sido firmado James Kerr Milligan
- 3 actuando como Notario Público
- 4 lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

CERTIFICADO

5. en Londres
- 6 el 01 de septiembre de 2004
- 7 por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
- 8 Número **G 749037**
- 9 Sello/Estampilla.
10. Firma. (ilegible)

TRADUCCION OFICIAL
RESOLUCION 2177

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

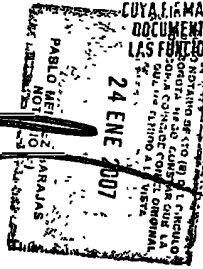


MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

260567

Anita Escobar

CUYA FIRMADA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10:47

mes

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

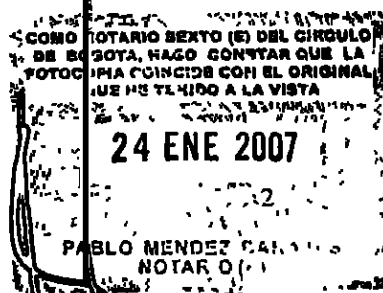
W Glass
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D C , por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, **JAMES KERR MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

C E R T I F I C O:

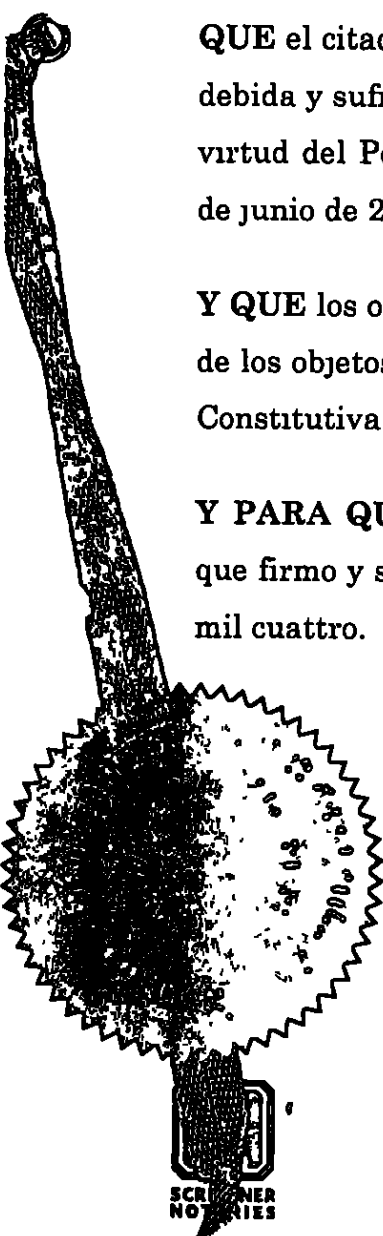
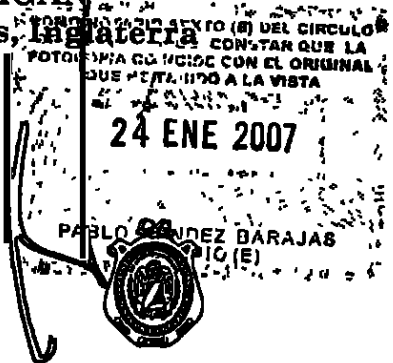
QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada "**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**" (anteriormente denominada "**Smithkline Beecham Biologicals s.a.**"), Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bélgica, con domicilio social en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica;

QUE el citado Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 12 de junio de 2002, cuyo original he tenido a la vista.

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE y obre los efectos conducentes expido la presente que firmo y sello en Londres, el día de hoy primero de septiembre del año dos mil cuatro.

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961/Convention de La Haye du 5 octot

- 1 Country United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays. Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

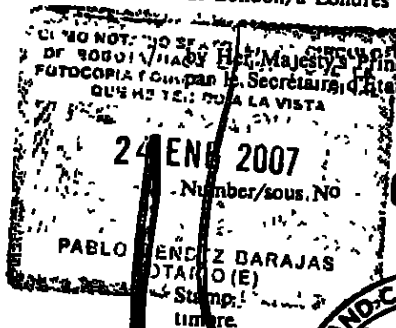
This public document/Le présent acte public

- 2 has been signed by *James Keef Milligan*
a été signé par
3 acting in the capacity of *Notary Public*
agissant en qualité de
4 bears the seal/stamp of *Notary Public*
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

5 at London/a Londres

6 the/le 01 SEP 2004



G 749037



10 Signature: *WGLASS*

WGLASS

For the Secretary of State/ Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is
not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the
mission representing that country.

Los abajo firmados, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica

con domicilio en **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Bélgica**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No 5-83, piso 6o, nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o del artículo 543 del decreto 410 de 1971

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos, formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley, recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo, llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses, y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a arbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno

tanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro

Dado y firmado

The undersigned, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a corporation organized and existing under the laws of Belgium.

domiciled at **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Belgium**

hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests, and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property

Given and signed this

Marcus Jonathan William DALTON
Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

31 AUG 2007

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

24 ENE 2007

PABLO MENDEZ L
NOTARIO

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de **Bélgica**, domiciliada en la ciudad de **Rixensart, Bélgica**, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social, conforme a las leyes de

que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder, que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad

suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe

Notary Public (Notario Público)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

On this day of , 200 , personally came

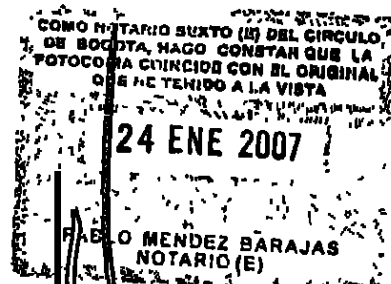
to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the

of **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the **Belgium**, domiciled at the City of **Rixensart, Belgium**, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of

, that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof, and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at , under date of

and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests



Se retiran folios 10 y 11
Correspondientes a folios archivos.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud		(51) Int Cl: A61K 39/085	
22) Fecha de solicitud 30-03-07		(71) Solicitante(s) GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.	
(30) Pnondad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	0421082.9	22-09-04	GB
	0421078.7	22-09-04	GB
	0421081.1	22-09-04	GB
	0421079.5	22-09-04	GB
	0503143.0	15-02-05	GB
(85) Fecha limite inicio fase nacional 22-04-07		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha 30-03-06	
Fecha de presentación de la solicitud 20-09-05		N° publicación WO2006/032472 A3	
No de solicitud PCT/EP2005/010184			
(54) Titulo COMPOSICIÓN INMUNOGENICA PARA SU USO EN VACUNACIÓN CONTRA ESTAFILOCOCOS			

Resumen - Reivindicación(es)

Reivindicación número 1.-

Una composición inmunogénica que contiene al menos dos diferentes proteínas o fragmentos inmunogénicos de ellas, seleccionados de al menos dos grupos de proteínas o fragmentos inmunogénicos seleccionados de los siguientes grupos

Grupo a) al menos una proteína de enlace de componente extracelular o fragmento inmunogénico de ella, seleccionada del grupo que consiste en SdrG, receptor de laminina, EbhA, EbhB, proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de enlace de enlace de fibronectina, coagulasa y MAP,

Grupo b) al menos una proteína transportadora estafilocócica o fragmento inmunogénico de ella, seleccionada del grupo que consiste en transportador ABC inmunodominante, IsdA, IsdB, transportador de Mg2+, SitC y transportador ABC Ni,

Grupo c) al menos un regulador de virulencia estafilocócico, toxina o fragmento inmunogénico de ella, seleccionado del grupo que consiste en toxina alfa (Hla), mutante H35R de toxina alfa, proteína activadora de ARN III (RAP)

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente CLJ/VB61055	PARA FUTURAS ACCIONES ver Forma PCT/ISA/220 así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación	
Solicitud internacional No PCT/EP2005/010184	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 20/09/2005	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 22/09/2004

Solicitante
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S A

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante Según el Artículo 18 Una copia será transmitida a la Oficina Internacional

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 6 hojas:
☒ También esta acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte

1 Bases del reporte

a Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevo a cabo según

☒ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó,

☐ la traducción de la solicitud internacional en _____, el cual es el lenguaje de la traducción proporcionada para el propósito de la búsqueda internacional (Reglas 12.3 (a) y 23.1(b))

b ☒ Respecto a una secuencia de ácido nucleótido y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver casilla I

2 ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ve. Recuadro II)

3 ☐ Falta unidad de invención (ver Recuadro III)

4 Respecto al título,

☐ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante

☒ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lea así

COMPOSICIÓN INMUNOGENICA PARA SU USO EN VACUNACION CONTRA ESIAFILOCOCOS

5 Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro IV El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad

6 Respecto a los dibujos,

a la figura de los dibujos que se publicara con el resumen es la Figura No _____

☐ como lo sugirió el solicitante

☐ como lo sugirió la Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura

☐ como lo sugirió la autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención-

b ☒ Ninguna de las figuras se publicara en el resumen

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional No

PCT/EP2005/010184

Casilla No. I Nucleótido y/o secuencia(s) aminoácida(s) (continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1 Respecto a cualquier **nucleótido y/o secuencia aminoácida** revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, la búsqueda internacional se ha establecido según

a. tipo de material

- ☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material

- ☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro

- ☐ contenido en la solicitud internacional según se registró
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..

2. ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas

3 Comentarios adicionales.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL		Solicitud Internacional No PCT/EP2005/010184
A CLASIFICACION DE MATERIA A61K 39/085 A61K39/116 A61P31/04 C07K16/12		
Segun la Clasificacion de Patentes Internacional (CPI) o segun la clasificacion nacional y la CPI		
B CAMPOS BUSCADOS		
Documentación minima buscada (sistema de clasificacion seguido de simbolos de clasificación) A61K		
Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados		
Base de datos electronica consultada durante la busqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)		
EPO-Interno, BIOSIS, EMBASE, Dato WPI, PAJ, Secuencia de busqueda		
C DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría °	Citacion de documento, con indicacion, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicacion Nu
X	US 6 703 025 B1 (PATTI JOSEPH M ET AL) 9 de marzo de 2004 (2004-03-09) columna 6, línea 64-columna 39, línea 41 -----	1-25
X	WO 00/03745 A (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC) 27 de Enero de 2000 (2000-01-27) página 32, línea 5-página 36, línea 9 reivindicación 92 -----	22-25
X	WO 93/09811 A (UNIVAX BIOLOGICS, INC, FATTOM, ALI, IBRAHIM, WRIGHT, D , CRAIG) 27 de mayo de 1993 (1993-05-27) página 2, línea 18-página 3, línea 12 reivindicaciones 1,2,8,10-14 ----- ---/---	22-25
☒ En el recuadro C se enumeran mas documentos ☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes		
° Categorías especiales de documentos citados		
'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia	'T' documento posterior publicado despues de la fecha de presentacion internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoria que sustenta la invencion	
'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional	'X' documento de relevancia particular, la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo	
'L' documento que puede anajar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)	'Y' documento de relevancia particular, la invencion reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o mas documentos, siendo dicha combinacion obvia para una persona experta en la tecnica	
'O' documento que se refiere a una revelacion oral, uso, exhibicion u otros medios		
'P' documento publicado antes de la fecha de presentacion internacional pero despues de la fecha de prioridad reivindicada	'&' documento miembro de la misma familia de patentes	
Fecha de la terminacion real de la busqueda internacional 31 de marzo de 2006	Fecha de envio por correo del reporte de búsqueda internacional 24/04/2006	
Nombre y direccion de correo de ISA/ European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado Ulbrecht, M	

13

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No
PCT/EP2005/010184

C (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No
X	US 2004/072748 A1 (BALABAN NAOMI) 15 de abril de 2004 (2004-04-15) parágrafo [0216]-parágrafo [0226] -----	22-25
X	US 2002/169288 A1 (HOOK MAGNUS ET AL) 14 de noviembre de 2002 (2002-11-14) reivindicaciones 1-15 -----	22-25
X	MENZIES BARBARA E ET AL "La inmunización pasiva con antisuero a una alfa-toxina mutante no tóxica de staphylococcus aureus, es protectora en un modelo murino" INFECTION AND IMMUNITY, vol 64, no 5, 1996, páginas 1839-1841, XP002374979 ISSN 0019-9567 citado en la solicitud documento completo -----	22-25
X	US 2003/113350 A1 (FATTOM ALI I ET AL) 19 de junio de 2003 (2003-06-19) ejemplos 1,2 -----	22-25
A	WO 02/094868 A (CHIRON SPA, MASIGNANI, VEGA, MORA, MARIROSA, SCARSELLI, MARIA, CHIRON) 28 de noviembre de 2002 (2002-11-28) página 23, línea 1-página 24, línea 16 reivindicaciones 1,11,13 SEQ ID Nos 682, 1096, 1168, 1170 -----	1-25
A	WO 02/45742 A (U S. ARMY MEDICAL RESEARCH AND MATERIAL COMMAND, DRABICK, JOSEPH, J, U) 13 de junio de 2002 (2002-06-13) ejemplo 7 reivindicaciones 1,4,9-12	1,12,14

15

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL		Solicitud internacional No PCT/EP2005/010184
Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 2 de la primera hoja)		
Este reporte de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones: 1 ☒ Reivindicaciones Nos porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber Aunque las reivindicaciones 19 y 24 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido basada y llevada a cabo en los efectos allegados de los efectos del compuesto/composicion 2 ☐ Reivindicaciones Nos porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente 3 ☐ Reivindicaciones No porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6 4(a)		
Casilla No. III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 3 de la primera hoja)		
Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así 1 ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables 2 ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales 3 ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos 4 ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos. Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante ☐ El pago de los derechos de busqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta		

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL				Solicitud Internacional No	
información sobre miembros familias de patentes				PCT/EP2005/010184	
Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación		Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
US 6703025	B1	09-03-2004	NINGUNA		
WO 0003745	A	27-01-2000	AU	771563 B2	25-03-2004
			AU	5000199 A	07-02-2000
			CA	2333931 A1	27-01-2000
			EP	1096952 A2	09-05-2001
			JP	2002520374 T	09-07-2002
WO 9309811	A	27-05-1993	AT	237351 T	15-05-2003
			AU	681573 B2	04-09-1997
			AU	3074792 A	15-06-1993
			CA	2123811 A1	27-05-1993
			DE	69233012 D1	22-05-2003
			DE	69233012 T2	06-11-2003
			DK	648127 T3	19-05-2003
			EP	0648127 A1	19-04-1995
			ES	2198405 T3	01-02-2004
			FI	942359 A	20-05-1994
			JP	7508498 T	21-09-1995
			JP	2004155789 A	03-06-2004
US 2004072748	A1	15-04-2004	NINGUNA		
US 2002169288	A1	14-11-2002	NINGUNA		
US 2003113350	A1	19-06-2003	CA	2460749 A1	31-07-2003
			CN	1638794 A	13-07-2005
			EP	1427442 A2	16-06-2004
			JP	2005515237 T	26-05-2005
			MX	PA04002624 A	17-02-2005
			WO	03061558 A2	31-07-2003
			ZA	200402185 A	25-04-2005
WO 02094868	A	28-11-2002	CA	2440368 A1	28-11-2002
			EP	1373310 A2	02-01-2004
			JP	2005502326 T	27-01-2005
WO 0245742	A	13-06-2002	AU	8896101 A	18-06-2002

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference CLJ/VB61055	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below	
International application No PCT/EP2005/010184	International filing date (day/month/year) 20/09/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 22/09/2004
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1 Basis of the report

a With regard to the language, the international search was carried out on the basis of

☒ the international application in the language in which it was filed

☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I

2 ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3 ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4 With regard to the title,

☐ the text is approved as submitted by the applicant

☒ the text has been established by this Authority to read as follows

IMMUNOGENIC COMPOSITION FOR USE IN VACCINATION AGAINST STAPHYLOCOCCI

5 With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6 With regard to the drawings,

a the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/010184

Box No I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

- 1 With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of
- a type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b format of material
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- c time of filing/furnishing
- ☐ contained in the international application as filed
- ☐ filed together with the international application in electronic form
- ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
- 2 ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished
- 3 Additional comments

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2005/010184

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/085 A61K39/116 A61P31/04 C07K16/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, Sequence Search

C DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	US 6 703 025 B1 (PATTI JOSEPH M ET AL) 9 March 2004 (2004-03-09) column 6, line 64 - column 39, line 41 -----	1-25
X	WO 00/03745 A (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC) 27 January 2000 (2000-01-27) page 32, line 5 - page 36, line 9 claim 92 -----	22-25
X	WO 93/09811 A (UNIVAX BIOLOGICS, INC; FATTOM, ALI, IBRAHIM; WRIGHT, G., CRAIG) 27 May 1993 (1993-05-27) page 2, line 18 - page 3, line 12 claims 1,2,8,10-14 ----- -/-	22-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C

☒ See patent family annex

* Special categories of cited documents

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 March 2006

Date of mailing of the international search report

24/04/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ulbrecht, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/010184

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	US 2004/072748 A1 (BALABAN NAOMI) 15 April 2004 (2004-04-15) paragraph [0216] - paragraph [0226] -----	22-25
X	US 2002/169288 A1 (HOOK MAGNUS ET AL) 14 November 2002 (2002-11-14) claims 1-15 -----	22-25
X	MENZIES BARBARA E ET AL: "Passive immunization with antiserum to a nontoxic alpha-toxin mutant from Staphylococcus aureus is protective in a murine model" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 64, no. 5, 1996, pages 1839-1841, XP002374979 ISSN: 0019-9567 cited in the application the whole document -----	22-25
X	US 2003/113350 A1 (FATTOM ALI J ET AL) 19 June 2003 (2003-06-19) examples 1,2 -----	22-25
A	WO 02/094868 A (CHIRON SPA; MASIGNANI, VEGA; MORA, MARIROSA; SCARSELLI, MARIA; CHIRON) 28 November 2002 (2002-11-28) page 23, line 1 - page 24, line 16 claims 1,11,13 SEQ ID Nos. 682, 1096, 1168, 1170 -----	1-25
A	WO 02/45742 A (U.S. ARMY MEDICAL RESEARCH AND MATERIAL COMMAND; DRABICK, JOSEPH, J; U) 13 June 2002 (2002-06-13) example 7 claims 1,4,9-12 -----	1,12,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/010184

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons

1

☒ Claims Nos
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely

Although claims 19 and 24 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2

☐ Claims Nos
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically

3

☐ Claims Nos
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6 4(a)

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows

1

☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims

2

☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee

3

☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos

4

☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/010184

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6703025	B1	09-03-2004	NONE
WO 0003745	A	27-01-2000	AU 771563 B2 25-03-2004 AU 5000199 A 07-02-2000 CA 2333931 A1 27-01-2000 EP 1096952 A2 09-05-2001 JP 2002520374 T 09-07-2002
WO 9309811	A	27-05-1993	AT 237351 T 15-05-2003 AU 681573 B2 04-09-1997 AU 3074792 A 15-06-1993 CA 2123811 A1 27-05-1993 DE 69233012 D1 22-05-2003 DE 69233012 T2 06-11-2003 DK 648127 T3 19-05-2003 EP 0648127 A1 19-04-1995 ES 2198405 T3 01-02-2004 FI 942359 A 20-05-1994 JP 7508498 T 21-09-1995 JP 2004155789 A 03-06-2004
US 2004072748	A1	15-04-2004	NONE
US 2002169288	A1	14-11-2002	NONE
US 2003113350	A1	19-06-2003	CA 2460749 A1 31-07-2003 CN 1638794 A 13-07-2005 EP 1427442 A2 16-06-2004 JP 2005515237 T 26-05-2005 MX PA04002624 A 17-02-2005 WO 03061558 A2 31-07-2003 ZA 200402185 A 25-04-2005
WO 02094868	A	28-11-2002	CA 2440368 A1 28-11-2002 EP 1373310 A2 02-01-2004 JP 2005502326 T 27-01-2005
WO 0245742	A	13-06-2002	AU 8896101 A 18-06-2002

SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional

30 de Marzo de 2006 (30.03.2006) PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2006/032472 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷:

A61K 39/085 (2006 01) A61P31/04 (2006 01)
A61K 39/116 (2006 01) C07K16/12 (2006 01)

(74) Agentes: LUBIENSKI, Michael, John; GlaxoSmithKline,
Corporate Intellectual Property 980 Great West Road, Brentford,
Middlesex TW8 9GS (GB)

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2005/010184

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera para toda
clase de protección nacional requerida) AE AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU CZ
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(22) Fecha de Registro Internacional 20 de Septiembre de 2005
(20 09 2005)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:

0421082 9	22 de septiembre de 2004 (22 09 04)	GB
0421078 7	22 de septiembre de 2004 (22 09 04)	GB
0421081 1	22 de septiembre de 2004 (22 09 04)	GB
0421079 5	22 de septiembre de 2004 (22 09 04)	GB
0503143 0	15 de febrero de 2005 (15 02 05)	GB

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera para toda
clase de protección regional requerida) ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Declaración bajo la Regla 4.17.

- en cuanto a la facultad del solicitante para aplicar y obtener una patente (Regla 4 17 (ii))
- en cuanto a la facultad del solicitante de reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4 17 (iii))
- relativo a la calidad de inventor (Regla 4 17 (iv))

(71) Solicitante (para todos los estados designados excepto Estados Unidos) GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA [BE/BE], Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE)

(72) Inventores: y

(75) Inventores/ solicitantes (para Estados Unidos solamente):
CASTADO, Cindy [BE/BE], GlaxoSmithKline Biologicals
s a, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE)
LECRENIER, Nicolas, Pierre, Fernand [BE/BE],
GlaxoSmithKline Biologicals s a, Rue de l'Institut 89, B-1330
Rixensart (BE) NEYT, Cecile, Anne [BE/BE],
GlaxoSmithKline Biologicals s a, Rue de l'Institut 89, B-1330
Rixensart (BE) POOLMAN, Jan [NL/BE], GlaxoSmithKline
Biologicals s a, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE)

Publicado:

- con reporte de Búsqueda Internacional

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional
20 de julio de 2006

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas
Gulas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada
emisión regular de la Gaceta PCT

(54) Título: COMPOSICIÓN INMUNÓGENICA PARA SU USO EN VACUNACIÓN CONTRA ESTAFILOCOCOS

(57) Resumen La presente solicitud se refiere a composiciones inmunogénicas que contienen una mezcla de antígenos estafilocócicos que combina antígenos que tienen diferentes funciones, por ejemplo, combinaciones que contienen una proteína de enlace de componente extracelular estafilocócico y una proteína transportadora estafilocócica o una proteína de enlace de componente extracelular estafilocócico y un regulador estafilocócico de virulencia o toxina o una proteína transportadora estafilocócica y un regulador estafilocócico de virulencia o toxina También se describen vacunas, métodos de tratamiento, usos y procesos para elaborar una vacuna estafilocócica.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



INTERNATIONAL BUREAU OF PATENT COOPERATION
3, rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE)

(43) International Publication Date
30 March 2006 (30.03.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/032472 A3

(51) International Patent Classification:

A61K 39/085 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/116 (2006.01) C07K 16/12 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2005/010184

(22) International Filing Date:

20 September 2005 (20.09.2005)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

0421082.9	22 September 2004 (22.09.2004)	GB
0421078.7	22 September 2004 (22.09.2004)	GB
0421081.1	22 September 2004 (22.09.2004)	GB
0421079.5	22 September 2004 (22.09.2004)	GB
0503143.0	15 February 2005 (15.02.2005)	GB

(71) Applicant (for all designated States except US): **GLAXO-SMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** [BE/BE], Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE)

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **CASTADO, Cindy** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE) **LECRENIER, Nicolas, Pierre, Fernand** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE) **NEYT, Cedric, Anne** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE) **POOLMAN, Jan** [NL/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(74) Agent: **LUBIENSKI, Michael, John**; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property, 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available):

AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available):

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report

(88) Date of publication of the International search report:

20 July 2006

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

(54) Title: **IMMUNOGENIC COMPOSITION FOR USE IN VACCINATION AGAINST STAPHYLOCOCCI**

(57) Abstract: The present application relates to immunogenic compositions comprising a mixture of staphylococcal antigens which combines antigen having different functions, for instance, combinations including a staphylococcal extracellular component binding protein and a staphylococcal transporter protein or a staphylococcal extracellular component binding protein and a staphylococcal regulator of virulence or toxin or a staphylococcal transporter protein and a staphylococcal regulator of virulence or toxin. Vaccines, methods of treatment, uses of and processes to make a staphylococcal vaccine are also described

WO 2006/032472 A3

**CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE
ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE
INTERNACIONAL JUNTO CON SU
TRADUCCION**

REIVINDICACIONES

1 Una composición inmunogénica que contiene al menos
dos diferentes proteínas o fragmentos inmunogénicos de ellas,
5 seleccionados de al menos dos grupos de proteínas o fragmentos
inmunogénicos seleccionados de los siguientes grupos:

Grupo a) al menos una proteína de enlace de componente
extracelular o fragmento inmunogénico de ella, seleccionada del
grupo que consiste en SdrG, receptor de laminina, EbhA, EbhB,
10 proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina,
ClfA, SdrC, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA,
Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de
enlace de enlace de fibronectina, coagulasa y MAP;

Grupo b) al menos una proteína transportadora estafilocócica o
15 fragmento inmunogénico de ella, seleccionada del grupo que
consiste en transportador ABC inmunodominante, IsdA, IsdB,
transportador de Mg²⁺, SitC y transportador ABC Ni;

Grupo c) al menos un regulador de virulencia estafilocócico,
toxina o fragmento inmunogénico de ella, seleccionado del grupo que
20 consiste en toxina alfa (Hla), mutante H35R de toxina alfa, proteína
activadora de ARN III (RAP)

2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1,
caracterizada además porque al menos una proteína o fragmento
inmunogénico se selecciona del grupo a).

25 3 La composición inmunogénica de la reivindicación 1 o 2

caracterizada además porque al menos una proteína o fragmento inmunogénico se selecciona del grupo b)

4 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-3, caracterizada además porque al menos una proteína o fragmento
5 inmunogénico se selecciona del grupo c)

5 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-4, caracterizada además porque al menos una proteína o fragmento inmunogénico se selecciona del grupo a), grupo b) y grupo c)

6 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-5,
10 que contiene al menos una proteína o fragmento inmunogénico de *S. aureus*

7 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-6, que contiene al menos una proteína o fragmento inmunogénico de *S. epidermidis*.

15 8 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-7, que contiene además un polisacárido u oligosacárido PIA.

9 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-8, que contiene además un polisacárido u oligosacárido capsular de tipo V y/o de tipo VIII de *S. aureus*

20 10 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-9, que contiene además un polisacárido u oligosacárido capsular de tipo I, de tipo II y/o de tipo III de *S. epidermidis*

11 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-10, que contiene además ácido lipoteicoico de una bacteria Gram
25 positiva

12 La composición inmunogénica de la reivindicación 11, caracterizada además porque el ácido lipoteicoico se extrae de una bacteria estafilocócica

13 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 8-
5 12, caracterizada además porque un polisacárido capsular estafilocócico está conjugado con un portador de proteína.

14. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 11-13, caracterizada además porque el ácido lipoteicoico está conjugado con un portador de proteína

10 15 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 13-14, caracterizada además porque el portador de proteína se selecciona del grupo que consiste en toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197, proteína D de *Haemophilus influenzae*, neumolisina y toxoide alfa

15 16 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-15, en donde se genera una respuesta inmunitaria efectiva tanto contra *S. aureus* como contra *S. epidermidis*.

17 Una vacuna que contiene la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-16 y un excipiente aceptable para uso
20 farmacéutico

18 Un método para elaborar una vacuna, que comprende los pasos de mezclar antígenos para elaborar la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-16 y añadir un excipiente aceptable para uso farmacéutico

25 19 Un método para prevenir o tratar una infección

estafilocócica, que comprende el paso de administrar la vacuna de la reivindicación 17 a un paciente que lo necesita

20 20 Un uso de la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-16 en la fabricación de una vacuna para el
5 tratamiento o prevención de una infección estafilocócica.

21. Un método para preparar una inmunoglobulina para uso en prevención o tratamiento de infección estafilocócica, que comprende los pasos de inmunizar un receptor con la vacuna de la reivindicación 17 y aislar la inmunoglobulina del receptor

10 22 Una inmunoglobulina preparada mediante el método de la reivindicación 21.

23 Una composición farmacéutica que contiene la inmunoglobulina de la reivindicación 22 y un excipiente aceptable para uso farmacéutico

15 24 Un método para el tratamiento o prevención de infección estafilocócica, que comprende un paso de administrar a un paciente una cantidad efectiva de la preparación farmacéutica de la reivindicación 23

25. Un uso de la preparación farmacéutica de la reivindicación
20 23 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de infección estafilocócica

CLAIMS

1. An immunogenic composition comprising at least two different proteins or immunogenic fragments thereof selected from at least two groups of proteins or immunogenic fragments selected from the following groups:

Group a) at least one staphylococcal extracellular component binding protein or immunogenic fragment thereof selected from the group consisting of SdrG, laminin receptor, SitC/MntC/saliva binding protein, EbhA, EbhB, Elastin binding protein (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolysin, ClfA, SdrC, SdrH, Lipase GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, Vitronectin binding protein, fibrinogen binding protein, coagulase, Fig and MAP;

Group b) at least one staphylococcal transporter protein or immunogenic fragment thereof selected from the group consisting of Immunodominant ABC transporter, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transporter, SitC and Ni ABC transporter;

Group c) at least one staphylococcal regulator of virulence, toxin or immunogenic fragment thereof selected from the group consisting of alpha toxin (Hla), alpha toxin H35R mutant, RNA III activating protein (RAP).

2. The immunogenic composition of claim 1 wherein at least one protein or immunogenic fragment is selected from group a).

3. The immunogenic composition of claim 1 or 2 wherein at least one protein or immunogenic fragment is selected from group b).

4. The immunogenic composition of claims 1-3 wherein at least one protein or immunogenic fragment is selected from group c).

5. The immunogenic composition of claims 1-4 wherein at least one protein or immunogenic fragment is selected from group a), group b) and group c).

6. The immunogenic composition of claims 1-5 comprising at least one protein or immunogenic fragment from *S. aureus*.

7. The immunogenic composition of claims 1-6 comprising at least one protein or immunogenic fragment from *S. epidermidis*.

8. The immunogenic composition of claims 1-7 further comprising a PIA polysaccharide or oligosaccharide.

30

9. The immunogenic composition of claims 1-8 further comprising type V and/or type VIII capsular polysaccharide or oligosaccharide from *S. aureus*.
- 5 10. The immunogenic composition of claims 1-9 further comprising Type I, and/or Type II and/or Type III capsular polysaccharide or oligosaccharide from *S. epidermidis*.
11. The immunogenic composition of claims 1-10 further comprising lipoteichoic acid from a Gram positive bacterium.
- 10 12. The immunogenic composition of claim 11 wherein the lipoteichoic acid is extracted from a staphylococcal bacterium.
13. The immunogenic composition of claims 8-12 wherein a staphylococcal capsular polysaccharide is conjugated to a protein carrier.
- 15 14. The immunogenic composition of claims 11-13 wherein the lipoteichoic acid is conjugated to a protein carrier.
- 20 15. The immunogenic composition of claims 13-14 wherein the protein carrier is selected from the group consisting of tetanus toxoid, diphtheria toxoid, CRM197, *Haemophilus influenzae* protein D, pneumolysin and alpha toxoid.
- 25 16. The immunogenic composition of claims 1-15 wherein an effective immune response is generated against both *S. aureus* and *S. epidermidis*.
17. A vaccine comprising the immunogenic composition of claims 1-16 and a pharmaceutically acceptable excipient.
- 30 18. A method of making a vaccine comprising the steps of mixing antigens to make the immunogenic composition of claims 1-16 and adding a pharmaceutically acceptable excipient.
- 35 19. A method of preventing or treating staphylococcal infection comprising the step of administering the vaccine of claim 17 to a patient in need thereof.
20. A use of the immunogenic composition of claims 1-16 in the manufacture of a vaccine for treatment or prevention of staphylococcal infection.
- 40 21. A method of preparing an immune globulin for use in prevention or treatment of staphylococcal infection comprising the steps of immunising a recipient with the vaccine of claim 17 and isolating immune globulin from the recipient.

72

22. An immune globulin prepared by the method of claim 21.

5 23. A pharmaceutical composition comprising the immune globulin of claim 22 and a pharmaceutically acceptable excipient.

10 24. A method for treatment or prevention of staphylococcal infection comprising a step of administering to a patient an effective amount of the pharmaceutical preparation of claim 23.

15 25. A use of the pharmaceutical preparation of claim 23 in the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of staphylococcal infection.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente CLJ/VB61055	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Forma PCT/IPEA/416	
Solicitud Internacional No PCT/EP2005/010184	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 20.09.2005	Fecha de prioridad (día/mes/año) 22 09.2004
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC INV A61K39/085 A61K39/116 A61P31/04 C07K16/12		
Solicitante GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. et al		
1 Este reporte es el reporte de examen preliminar internacional, establecido por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y transmitido al solicitante de conformidad con el Artículo 36 2 Este REPORTE consta de un total de 8 hojas, incluyendo esta carátula. 3 Este reporte también es acompañado por ANEXOS, que comprenden a ☒ (enviado al solicitante y a la Oficina Internacional) un total de 3 hojas, como sigue ☒ hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base de este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver Regla 70 16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas). ☐ hojas que reemplazan hojas anteriores, pero las cuales esta Autoridad considera que contienen una modificación que va más allá de la revelación en la solicitud internacional como se presentó, como se indicó en el ítem 4 de la Casilla No I y la Casilla Suplementaria b ☐ (enviado únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y número de medio(s) electrónico(s)) , que contienen un listado de secuencias y/o tablas con ello, únicamente en una forma legible en computador, como se indicó en la Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas)		

33

Casilla No. I Bases del reporte

1 Respecto al idioma, este reporte se basó en

- ☒ La solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó.
- ☐ Una traducción de la solicitud internacional al , que es el lenguaje de una traducción entregada para propósitos de.
- ☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3. y 23.1 (b)).
- ☐ publicación de la solicitud internacional (según la Regla 12 4(a))
- ☐ examen preliminar internacional (según las Reglas 55 2 (a) y/o 55 3(a))

2 Respecto a los elementos de la solicitud internacional este Reporte se basó en (hojas reemplazadas que has sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación según Artículo 14, son referidas en este reporte como "originalmente presentadas" y no son anexadas a este reporte):

Descripción, páginas

1-70 como se presentó originalmente

Listado de secuencia parte de la descripción, páginas

1-137 como se presentó originalmente

Reivindicaciones, números

1-25 recibida el 25 07.2006 con carta del 18 07.2006

Dibujos, hojas

1/58-58/58 como se presentó originalmente

☒ la secuencia numerada y/o alguna tabla(s)-ver Casilla Suplementaria a la Secuencia Numerada

3. ☐ Las modificaciones resultaron en la cancelación de

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/figuras
- ☐ listado de secuencia (especificar)
- ☐ cualquier tabla(s) relacionadas con la serie de listados (especificar)

4 ☐ Este reporte ha sido establecido como si (alguno de) los anexos corregidos a este reporte y numerado antes no ha sido hecho, desde que ellos han sido considerados a través de la presentación original, como esta indicado en la casilla suplementaria (regla 70.2©).

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/figuras
- ☐ secuencia que enumera (especificar)
- ☐ algunas tabla(s) relatando secuencia numerada (especificar)

*si el Item 4 aplica, algunas o todas aquellas hojas pueden ser marcadas "reemplazadas"

h

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD	Solicitud internacional No. PCT/EP2005/010184
--	--

Casilla No. III. No establecimiento de opinión respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

1 Las cuestiones de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucrar nivel inventivo (ser no obvia) o ser industrialmente aplicable no han sido examinadas respecto a:

☐ toda la solicitud internacional

☒ las reivindicaciones Nos 19,24 (con respecto a IA)

porque

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos 19,24 (con respecto a IA) se relaciona con la siguiente materia objeto las cuales no requieren examen preliminar internacional (*especificar*)

ver hoja separada

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*)

☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa (*especificar*).

☐ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos

☐ no fue posible formarse una opinión significativa sin la lista de secuencias, el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no.

☐ presentó una lista de secuencias en papel cumpliendo con el estándar presentado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicha lista no estaba disponible a la Autoridad de Examen Preliminar Internacional en un formato y manera aceptable a ella

☐ presentó una lista de secuencias en formato electrónico cumpliendo con el estándar presentado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicha lista no estaba disponible a la Autoridad de Examen Preliminar Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ pagó los derechos de presentación tardía requeridos para la presentación de una lista de secuencias en respuesta a una invitación bajo las Reglas 13ter.1(a) o (b) y 13ter 2.

☐ no fue posible formarse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con la lista de secuencias, el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no presentó dichas tablas en formato electrónico cumpliendo con los requerimientos técnicos presentados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas, y dichas tablas no estaban disponibles a la Autoridad de Examen Preliminar Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ las tablas relacionadas con la lista de secuencias nucleótidas y/o amino ácidas, si están en formato electrónico únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos presentados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas

☐ Ver la Casilla Suplementaria para más detalles

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD		Solicitud internacional No PCT/EP2005/010184
Casilla No. V Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación		
1. Afirmación		
Novedad (N)	Reivindicaciones Reivindicaciones	1-25
Nivel inventivo (IS)	Reivindicaciones Reivindicaciones	1-25
Aplicabilidad industrial (IA)	Reivindicaciones Reivindicaciones	1-18,20-23,25
2 Citaciones y Explicaciones (Regla 70.7)		
ver hoja separada		

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE
PATENTABILIDAD

Solicitud internacional No
PCT/EP2005/010184

Casilla Suplementaria con respecto al listado de secuencias

Continuación de la casilla I, Item 2:

- 1 Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según

a tipo de material

- ☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b formato de material

- ☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☐ contenido en la solicitud internacional según se registró
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador
☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda y/o examinación
☐ recibida por esta Autoridad como una enmienda* en

- 2 ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla(s) relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas

3 Comentarios adicionales.

*si el Item 4 en la casilla No 1 aplica, el listado y/o tabla(s) relacionados con ello, el cual forma parte de las bases del reporte, pueden ser marcadas "reemplazadas"

Re Item III.

Las reivindicaciones 19 y 24 se relacionan con la materia objeto considerada por esta Autoridad como cubierta por las provisiones de R. 67.1 (iv) PCT. En consecuencia, no se formulará opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Art 34(4)(a)(i) PCT)

Re Item V.

1 Documentos Citados

- D1: US-B1-6 703 025 (PATTI JOSEPH M ET AL) Marzo 9 de 2004 (2004-03-09)
- D2: WO 00/03745 A (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC) Enero 27 de 2000 (2000-01-27)
- D3: WO 93/09811 A (UNIVAX BIOLOGICS, INC; FATTOM, ALI, IBRAHIM; WRIGHT, D., CRAIG) Mayo 27 de 1993 (1993-05-23)
- D4: US 2004/072748 A1 (BALABAN NAOM) Abril 15 de 2004 (2004-04-15)
- D5: US 2002/169288 A1 (HOOK MAGNUS ET AL) Noviembre 14 de 2002 (2002-11-14)
- D6: MENZIES BARBARA E ET AL: "Passive immunization with antiserum to a nontoxic alpha-toxin mutant from Staphylococcus aureus is protective in a murine model" (La inmunización pasiva con anticuerpo a mutante de alfa-toxina no tóxico de Staphylococcus aureus es protector en un modelo murino) INFECTION AND IMMUNITY, vol. 64, no. 5, 1996, páginas 1839-1841
- D7: US 2003/113350 A1 (FATTOM ALI I ET AL) Junio 19 de 2003 (2003-06-19)

2 Novedad (Art. 33(2) PCT):

La materia objeto de las reivindicaciones 1-25 es novedoso porque la combinación de características sugerida por cualquiera de dichas reivindicaciones no está revelada en la técnica.

3. Nivel Inventivo (Art. 33(3) PCT).

- 3.1 La reivindicación 1 supuestamente resuelve el problema de proveer una composición inmunogénica de antígenos estafilocócicos, que es capaz de inducir una respuesta inmune particularmente efectiva (cf. p.5, l. 9-10). Como se muestra en el Ejemplo 8, esto parece ser logrado solamente por algunas combinaciones de antígenos específicas (grupos 4, 9 y 13), mientras que otras

combinaciones de antígenos no parecen ser particularmente efectivas. Así, el problema anterior no es resuelto por el alcance total de la reivindicación 1 y tiene que ser formulado en términos más amplios, a saber, como la provisión de una composición inmunogénica de antígenos estafilocócicos. D1 representa la técnica previa más cercana que revela combinaciones inmunogénicas de MSCRAMMs (c.10, l.34 – c.22, l.28) y sugiere la adición de antígenos adicionales sugeridos por la reivindicación presente 1 (c.22, l.30 – c.25, l.10). Las combinaciones sugeridas por la reivindicación presente 1 parecen ser selecciones arbitrarias de las posibles combinaciones derivadas a partir de la enseñanza de D1. Por consiguiente, la reivindicación 1 no establece un nivel inventivo.

- 3.2 Las composiciones inmunogénicas de D1 se usan para vacunación activa (supra; c.6, l.65 – c.9, l.7, c.28, l.16 – c.29, l.47) que implica que se usan en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable que tiene que ser mezclado con dicha composición. Por consiguiente, las reivindicaciones 17-21 que se refieren a cualquiera de dichas características, por las consideraciones bajo V.3.1, no establecen un nivel inventivo.
- 3.3 Las características adicionales sugeridas por cualquiera de las reivindicaciones 27-, 9, 11 y 16 son conocidas a partir de D1 (supra) y por lo tanto, no establecen un nivel inventivo.
- 3.4 Las Reivindicaciones 8, 10, 12-15 se refieren a características técnicas adicionales basadas en la rutina del experto. Se seleccionan arbitrariamente y como no producen ningún efecto técnico imprevisible, no establecen un nivel inventivo.
- 3.5 D5 enseña una composición terapéutica para el tratamiento o prevención de una infección estafilocócica, que comprende un anticuerpo que reconoce la GehD lipasa de *S. epidermidis* (reivindicaciones 4 y 5), en donde el término anticuerpo incluye anticuerpos monoclonales (párraf. [0041]). La materia objeto de la reivindicación 22 se distingue de D5 en que la composición farmacéutica comprende al menos un anticuerpo monoclonal adicional dirigido a un antígeno seleccionado de los grupos b) y c) de acuerdo con la reivindicación 1. Por las razones dadas bajo V.3.1., estos anticuerpos adicionales son arbitrariamente adicionados porque no producen ningún efecto técnico imprevisible. Tales anticuerpos son por ejemplo, conocidos de D1, que enseña el uso de MSCRAMM en inmunización pasiva y activa para prevenir o tratar infecciones estafilocócicas. La materia objeto de la reivindicación 22, por ende no involucra un nivel inventivo.

3.6 Las reivindicaciones 24 y 25 se refieren a la aplicación de los anticuerpos monoclonales sugeridos en D5 (supra). Por ende, las consideraciones de V.3.5 igualmente aplican para estas reivindicaciones.

3.7 La característica adicional sugerida por la reivindicación 23 está revelada en D5 y no establece inventiva

4. *Aplicabilidad Industrial (Art. 33(4) EPC)*

4.1 Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 19 y 24 sobre la pregunta si son aplicables industrialmente, no existe un criterio unificado en los Estados Contratantes de PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia objeto de las reivindicaciones para el uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero pueden permitir, sin embargo, reivindicaciones a un compuesto conocido para primer uso en tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

4.2 Se reconoce la aplicabilidad industrial de la materia objeto de las reivindicaciones 1-18, 20-23 y 25

✓

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que contiene al menos dos diferentes proteínas o fragmentos inmunogénicos de ellas, seleccionados de al menos dos grupos de proteínas o fragmentos inmunogénicos seleccionados de los siguientes grupos.

Grupo a) al menos una proteína de enlace de componente extracelular o fragmento inmunogénico de ella, seleccionada del grupo que consiste en SdrG, receptor de laminina, EbhA, EbhB, proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de enlace de fibronectina, coagulasa y MAP;

Grupo b) al menos una proteína transportadora estafilocócica o fragmento inmunogénico de ella, seleccionada del grupo que consiste en transportador ABC inmunodominante, IsdA, IsdB, transportador de Mg²⁺, SitC y transportador ABC Ni;

Grupo c) al menos un regulador de virulencia estafilocócico, toxina o fragmento inmunogénico de ella, seleccionado del grupo que consiste en toxina alfa (Hla), mutante H35R de toxina alfa, proteína activadora de ARN III (RAP)

2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, caracterizada además porque al menos una proteína o fragmento inmunogénico se selecciona del grupo a).

3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 o 2 caracterizada además porque al menos una proteína o fragmento inmunogénico se selecciona del grupo b).

4. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-3, caracterizada además porque al menos una proteína o fragmento inmunogénico se selecciona del grupo c)

5. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-4, caracterizada además porque al menos una proteína o fragmento inmunogénico se selecciona del grupo a), grupo b) y grupo c)

6. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-5, que contiene al menos una proteína o fragmento inmunogénico de *S. aureus*.

7. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-6, que contiene al menos una proteína o fragmento inmunogénico de *S. epidermidis*.

8. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-7, que contiene además un polisacárido u oligosacárido PIA.
9. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-8, que contiene además un polisacárido u oligosacárido capsular de tipo V y/o de tipo VIII de *S. aureus*.
10. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-9, que contiene además un polisacárido u oligosacárido capsular de tipo I, de tipo II y/o de tipo III de *S. epidermidis*.
11. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-10, que contiene además ácido lipoteicoico de una bacteria Gram positiva.
12. La composición inmunogénica de la reivindicación 11, caracterizada además porque el ácido lipoteicoico se extrae de una bacteria estafilocócica.
13. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 8-12, caracterizada además porque un polisacárido capsular estafilocócico está conjugado con un portador de proteína.
14. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 11-13, caracterizada además porque el ácido lipoteicoico está conjugado con un portador de proteína.
15. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 13-14, caracterizada además porque el portador de proteína se selecciona del grupo que consiste en toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197, proteína D de *Haemophilus influenzae*, neumolisina y toxoide alfa
16. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-15, la cual es capaz de generar una respuesta inmunitaria efectiva tanto contra *S. aureus* como contra *S. epidermidis*.
17. Una vacuna que contiene la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-16 y un excipiente aceptable para uso farmacéutico.
18. Un método para elaborar una vacuna, que comprende los pasos de mezclar antígenos para elaborar la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-16 y añadir un excipiente aceptable para uso farmacéutico.
19. Un método para prevenir o tratar una infección estafilocócica, que comprende el paso de administrar la vacuna de la reivindicación 17 a un paciente que lo necesita
20. Un uso de la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-16 en la fabricación de una vacuna para el tratamiento o prevención de una infección estafilocócica.

21 Un método para preparar una inmunoglobulina para uso en prevención o tratamiento de infección estafilocócica, que comprende los pasos de inmunizar un receptor con la vacuna de la reivindicación 17 y aislar la inmunoglobulina del receptor.

22 Una composición farmacéutica que contiene dos o más anticuerpos monoclonales o fragmentos de ellos, los cuales son reactivos contra al menos dos constituyentes de la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde los al menos dos constituyentes se seleccionan de al menos dos grupos a), b) y c).

23 Una composición farmacéutica que contiene la inmunoglobulina de la reivindicación 22 y un excipiente aceptable para uso farmacéutico

24. Un método para el tratamiento o prevención de infección estafilocócica, que comprende un paso de administrar a un paciente una cantidad efectiva de la composición [preparación] farmacéutica de la reivindicación 22 o 23.

25 Uso de la composición [preparación] farmacéutica de la reivindicación 22 o 23 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de infección estafilocócica.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference CLJ/VB61055		FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEAA16	
International application No. PCT/EP2005/010184	International filing date (day/month/year) 20.09.2005	Priority date (day/month/year) 22.09.2004	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV A61K39/085 A61K39/116 A61P31/04 C07K16/12			
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S A. et al			
1 This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36 2 This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of 3 sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in Item 4 of Box No. I and the Supplemental Box b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic camera(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).			
4 This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 19.07.2006		Date of completion of this report 20.09.2006	
Name and mailing address of the International preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx. 523656 epmu d Fax +49 89 2399 - 4485		Authorized officer Ulbrecht, Matthias Telephone No. +49 89 2399-7710 	

Handwritten mark

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No
PCT/EP2005/010184

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
- 2 With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-70 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-137 as originally filed

Claims, Numbers

1-25 received on 25.07.2006 with letter of 18.07.2006

Drawings, Sheets

1/58-58/58 as originally filed

- ☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify):*
 - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify):*
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c))
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify):*
 - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify):*

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2005/010184

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

- 1 The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application,
☒ claims Nos. 19,24 (with respect to IA)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 19,24 (with respect to IA) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*).

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*);
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*);
- ☐ no international search report has been established for the said claims Nos.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/EP2005/010184

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-25
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-25
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-18,20-23,25
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**International application No
PCT/EP2005/010184

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report was established on the basis of:

a. type of material:

- ☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material:

- ☒ on paper
☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing:

- ☐ contained in the international application as filed
☐ filed together with the international application in electronic form
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
☐ received by this Authority as an amendment* on

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3 Additional comments:

- * If item 4 in Box No. 1 applies, the listing and/or table(s) related thereto, which form part of the basis of the report, may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No

PCT/EP2005/010184

Re item III.

Claims 19 and 24 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of R. 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Art. 34(4)(a)(i) PCT).

Re item V.

1. Cited documents:

- D1: US-B1-6 703 025 (PATTI JOSEPH M ET AL) 9 March 2004 (2004-03-09)
- D2: WO 00/03745 A (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC) 27 January 2000 (2000-01-27)
- D3: WO 93/09811 A (UNIVAX BIOLOGICS, INC; FATTOM, ALI, IBRAHIM; WRIGHT, D., CRAIG) 27 May 1993 (1993-05-27)
- D4: US 2004/072748 A1 (BALABAN NAOMI) 15 April 2004 (2004-04-15)
- D5: US 2002/169288 A1 (HOOK MAGNUS ET AL) 14 November 2002 (2002-11-14)
- D6: MENZIES BARBARA E ET AL: "Passive immunization with antiserum to a nontoxic alpha-toxin mutant from Staphylococcus aureus is protective in a murine model" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 64, no. 5, 1996, pages 1839-1841
- D7: US 2003/113350 A1 (FATTOM ALI I ET AL) 19 June 2003 (2003-06-19)

2. Novelty (Art. 33(2) PCT):

The subject-matter of claims 1-25 is novel as the combination of features suggested by any of said claims is not disclosed in the art.

3. Inventive step (Art. 33(3) PCT):

- 3.1 Claim 1 allegedly solves the problem of providing an immunogenic composition of staphylococcal antigens which is able to induce a particularly effective immune response (cf. p. 5, l. 9-10). As shown in Example 8 this appears to be achieved only by some specific combinations of antigens (groups 4, 9 and 13), whilst other

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2005/010184

combinations of antigens do not appear to be particularly effective. Hence, the foregoing problem is not solved over the whole scope of claim 1 and has to be formulated in broader terms, namely as the provision of a immunogenic composition of staphylococcal antigens. D1 representing the closest prior which discloses immunogenic combinations of MSCRAMMs (c. 10, l. 34 - c. 22, l. 28) and suggests the addition of further antigens suggested by present claim 1 (c. 22, l. 30 - c. 25, l. 10). The combinations suggested by present claim 1 appear to be arbitrary selections out of the possible combinations derivable from the teaching of D1. Hence, claim 1 does not establish an inventive step.

- 3.2 The immunogenic compositions of D1 are used for active vaccination (supra; c. 6, l. 65 - c. 9, l. 7; c. 28, l. 16 - c. 29, l. 47) which implies that they are used in combination with a pharmaceutically acceptable excipient which has to be mixed with the said composition. Hence, claims 17-21 which refer to any of the said features, for the considerations under V.3.1 do not establish an inventive step
- 3.3 The additional features suggest by any of claims 2-7, 9, 11 and 16 are known from D1 (supra) and thus do not establish an inventive step.
- 3.4 Claims 8, 10, 12-15 refer to further technical features based on the skilled person's routine. They are arbitrarily selected and as they do not produce any unforeseeable technical effect do not establish an inventive step.
- 3.5 D5 teaches a therapeutic composition for treating or preventing a staphylococcal infection comprising an antibody recognising GehD lipase of *S. epidermidis* (claims 4 and 5), wherein the term antibody includes monoclonal antibodies (para. [0041]). The subject-matter of claim 22 is distinguished from D5 in that the pharmaceutical composition comprises at least a further monoclonal antibody directed at an antigen selected from the groups b) and c) according to claim 1. For the reasons given under V. 3.1, these further antibodies are arbitrarily added as they do not produce any unforeseeable technical effect. Such antibodies are for instance known from D1 which teaches the use of MSCRAMM in passive and active immunisation to prevent or treat staphylococcal infections. The subject-matter of claim 22, thus does not involve an inventive step.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No

PCT/EP2005/010184

3.6 Claims 24 and 25 refer to the application of the monoclonal antibodies suggested in D5 (supra). Hence, the considerations of V.3.5 equally apply to these claims.

3.7 The additional feature suggested by claim 23 is disclosed in D5 and does not establish inventiveness.

4. *Industrial applicability (Art. 33(4) PCT):*

4.1 For the assessment of the present claims 19 and 24 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

4.2 Industrial applicability of the subject-matter of claims 1-18, 20-23 and 25 is acknowledged.

CLAIMS

1. An immunogenic composition comprising at least two different proteins or immunogenic fragments thereof selected from at least two groups of proteins or immunogenic fragments selected from the following groups:

Group a) at least one staphylococcal extracellular component binding protein or immunogenic fragment thereof selected from the group consisting of SdrG, laminin receptor, EbhA, EbhB, Elastin binding protein (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolysin, ClfA, SdrC, SdrH, Lipase GahD, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, Vitronectin binding protein, coagulase, and MAP,

Group b) at least one staphylococcal transporter protein or immunogenic fragment thereof selected from the group consisting of Immunodominant ABC transporter, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transporter, SitC and Ni ABC transporter;

Group c) at least one staphylococcal regulator of virulence, toxin or immunogenic fragment thereof selected from the group consisting of alpha toxin (Hla), alpha toxin H35R mutant, RNA III activating protein (RAP)

2. The immunogenic composition of claim 1 wherein at least one protein or immunogenic fragment is selected from group a).
3. The immunogenic composition of claim 1 or 2 wherein at least one protein or immunogenic fragment is selected from group b).
4. The immunogenic composition of claims 1-3 wherein at least one protein or immunogenic fragment is selected from group c).
5. The immunogenic composition of claims 1-4 wherein at least one protein or immunogenic fragment is selected from group a), group b) and group c)
6. The immunogenic composition of claims 1-5 comprising at least one protein or immunogenic fragment from *S. aureus*.
7. The immunogenic composition of claims 1-6 comprising at least one protein or immunogenic fragment from *S. epidermidis*.

8. The immunogenic composition of claims 1-7 further comprising a PIA polysaccharide or oligosaccharide
9. The immunogenic composition of claims 1-3 further comprising type V and/or type VIII capsular polysaccharide or oligosaccharide from *S. aureus*.
10. The immunogenic composition of claims 1-9 further comprising Type I, and/or Type II and/or Type III capsular polysaccharide or oligosaccharide from *S. epidermidis*
11. The immunogenic composition of claims 1-10 further comprising lipoteichoic acid from a Gram positive bacterium.
12. The immunogenic composition of claim 11 wherein the lipoteichoic acid is extracted from a staphylococcal bacterium
13. The immunogenic composition of claims 8-12 wherein a staphylococcal capsular polysaccharide is conjugated to a protein carrier.
14. The immunogenic composition of claims 11-13 wherein the lipoteichoic acid is conjugated to a protein carrier.
15. The immunogenic composition of claims 13-14 wherein the protein carrier is selected from the group consisting of tetanus toxoid, diphtheria toxoid, CRM197, *Haemophilus influenzae* protein D, pneumolysin and alpha toxoid
16. The immunogenic composition of claims 1-15 which is capable of generating an effective immune response against both *S. aureus* and *S. epidermidis*.
17. A vaccine comprising the immunogenic composition of claims 1-16 and a pharmaceutically acceptable excipient.
18. A method of making a vaccine comprising the steps of mixing antigens to make the immunogenic composition of claims 1-16 and adding a pharmaceutically acceptable excipient.
19. A method of preventing or treating staphylococcal infection comprising the step of administering the vaccine of claim 17 to a patient in need thereof.
20. A use of the immunogenic composition of claims 1-16 in the manufacture of a vaccine for treatment or prevention of staphylococcal infection

21. A method of preparing an immune globulin for use in prevention or treatment of staphylococcal infection comprising the steps of immunising a recipient with the vaccine of claim 17 and isolating immune globulin from the recipient.
22. A pharmaceutical composition comprising two or more monoclonal antibodies or fragments thereof which are reactive against at least two constituents of the immunogenic composition of any one of claims 1-16 wherein the at least two constituents are selected from at least 2 of groups a), b) and c).
23. A pharmaceutical composition comprising the immune globulin of claim 22 and a pharmaceutically acceptable excipient.
24. A method for treatment or prevention of staphylococcal infection comprising a step of administering to a patient an effective amount of the pharmaceutical composition [preparation] of claim 22 or 23.
25. A use of the pharmaceutical composition [preparation] of claim 22 or 23 in the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of staphylococcal infection.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para: ver forma PCT/ISA/220	PCT OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43bis 1)																											
Fecha de envío por correo (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda página)																												
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220	PARA FUTURAS ACCIONES Ver el párrafo 2 a continuación																											
Solicitud Internacional No PCT/EP2005/010184	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 20 09 2005	Fecha de prioridad (día/mes/año) 22 09 2004																										
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC INV A61K39/085 A61K39/116 A61P31/04 C07K16/12																												
Solicitante GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S A																												
1 Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems <table><tr><td>☒</td><td>Casilla No I</td><td>Bases del Reporte</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No II</td><td>Prioridad</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No III</td><td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No IV</td><td>Falta de unidad de invención</td></tr><tr><td>☒</td><td>Casilla No V</td><td>Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis 1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial, citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No VI</td><td>Ciertos documentos citados</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No VII</td><td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td></tr><tr><td>☐</td><td>Casilla No VIII</td><td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td></tr></table> 2 ACCIONES FUTURAS Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA") Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66 1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad Examinadora Preliminar Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde. Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220 3 Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220 <table><tr><td>Nombre y dirección de correo de ISA European Patent Office D-80298 Munich Tel +49 89 2399-0 Tx 523656 epmu d Fax +49 89 2399-4465</td><td>Funcionario Autorizado Ulbrecht, M Teléfono No +49 89 2399-7710</td></tr></table>			☒	Casilla No I	Bases del Reporte	☐	Casilla No II	Prioridad	☒	Casilla No III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial	☐	Casilla No IV	Falta de unidad de invención	☒	Casilla No V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis 1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial, citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación	☐	Casilla No VI	Ciertos documentos citados	☐	Casilla No VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☐	Casilla No VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional	Nombre y dirección de correo de ISA European Patent Office D-80298 Munich Tel +49 89 2399-0 Tx 523656 epmu d Fax +49 89 2399-4465	Funcionario Autorizado Ulbrecht, M Teléfono No +49 89 2399-7710
☒	Casilla No I	Bases del Reporte																										
☐	Casilla No II	Prioridad																										
☒	Casilla No III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial																										
☐	Casilla No IV	Falta de unidad de invención																										
☒	Casilla No V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis 1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial, citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación																										
☐	Casilla No VI	Ciertos documentos citados																										
☐	Casilla No VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																										
☐	Casilla No VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																										
Nombre y dirección de correo de ISA European Patent Office D-80298 Munich Tel +49 89 2399-0 Tx 523656 epmu d Fax +49 89 2399-4465	Funcionario Autorizado Ulbrecht, M Teléfono No +49 89 2399-7710																											

54

**OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No
PCT/EP2005/010184

Casilla No. I. Bases de la opinión

- 1 Respecto al idioma, esta opinión se ha establecido según la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo bajo este ítem
 - ☐ Esta opinión se ha establecido según una traducción del idioma original al siguiente idioma, que es el idioma de una traducción proporcionada para la búsqueda internacional (bajo las Reglas 12 3 y 23 1(b))
- 2 Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según
 - a tipo de material
 - ☒ un listado de secuencia
 - ☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia
 - b formato de material
 - ☒ en formato escrito
 - ☒ en formato legible por computador
 - c tiempo de presentación/suministro
 - ☐ contenido en la solicitud internacional según se registró
 - ☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador
 - ☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda
- 3 ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas
- 4 Comentarios adicionales

56

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un paso inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a

- ☐ toda la solicitud internacional,
- ☒ reivindicaciones Nos. 19,24 (respecto a IA)

porque

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos 19,24 (con respecto a IA) se relacionan con la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*)
ver hoja separada

- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) de dichas reivindicaciones Nos son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*)
- ☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa
- ☐ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos (con respecto a la aplicabilidad industrial)
- ☐ El nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida no cumple con el estándar proporcionado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que

- | | |
|-----------------------------------|--|
| la forma escrita | ☐ no se ha proporcionado |
| | ☐ no cumple con el estándar |
| el formato legible por computador | ☐ no se ha proporcionado |
| | ☐ no cumple con el estándar |

- ☐ las tablas relacionadas con el nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida, si están en formato legible por computador únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos proporcionados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas
- ☐ Ver la hoja separada para más detalles

57

57

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE
BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No
PCT/EP2005/010184

Casilla No. V Afirmación razonada bajo la Regla 43 bis. 1 (a)(i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1 Afirmación

Novedad (N)	Si	Reivindicaciones	1-21
	No	Reivindicaciones	22-25
Nivel inventivo (IS)	Si	Reivindicaciones	
	No	Reivindicaciones	1-25
Aplicabilidad industrial (IA)	Si	Reivindicaciones	1-18,20-23,25
	No	Reivindicaciones	

2 Citaciones y explicaciones
ver hoja separada

58

Re Item III.

Las reivindicaciones 19 y 24 se relacionan con la materia objeto considerada por esta Autoridad como cubierta por las provisiones de R 67 1 (iv) PCT. En consecuencia, no se formulara opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Art. 34(4)(a)(i) PCT).

Re Item V.

1 Documentos Citados

- D1 US-B1-6 703 025 (PATTI JOSEPH M ET AL) Marzo 9 de 2004 (2004-03-09)
- D2 WO 00/03745 A (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC) Enero 27 de 2000 (2000-01-27)
- D3 WO 93/09811 A (UNIVAX BIOLOGICS, INC; FATTOM, ALI, IBRAHIM, WRIGHT, D , CRAIG) Mayo 27 de 1993 (1993-05-23)
- D4 US 2004/072748 A1 (BALABAN NAOM) Abril 15 de 2004 (2004-04-15)
- D5 US 2002/169288 A1 (HOOK MAGNUS ET AL) Noviembre 14 de 2002 (2002-11-14)
- D6 MENZIES BARBARA E ET AL: "Passive immunization with antiserum to a nontoxic alpha-toxin mutant from *Staphylococcus aureus* is protective in a murine model" (La inmunización pasiva con anticuerpo a mutante de alfa-toxina no tóxico de *Staphylococcus aureus* es protector en un modelo murino) INFECTION AND IMMUNITY, vol 64, no 5, 1996, páginas 1839-1841
- D7 US 2003/113350 A1 (FATTOM ALI I ET AL) Junio 19 de 2003 (2003-06-19)

2 Novedad (Art 33(2) PCT)

- 2 1 D1 enseña IgG purificado a partir de monos ihesus inmunizados con una composición de MSCRAMM que se usan para inmunizar pasivamente ratones para prevenir la sepsis estafilocócica (Ejemplo 2) Como la especificidad de la preparación de globulina inmune de acuerdo con la reivindicación 22 no está definida, y puede ser dirigida a cualquiera de los antígenos administrados en el método de la reivindicación 21, o incluso a ninguno de ellos dependiendo de la reacción inmune del receptor (cf V 5 4), se considera que la preparación de globulina inmune de D1 cae bajo el alcance de la reivindicación 22, destruyendo así su novedad

Por estas consideraciones, la reivindicación 22 también carece de novedad sobre D2 (p 32, l 5 – p 36, l 9, reivindicación 92), D3 (p 2, l 18 – p 3, l 12, reivindicaciones 1, 2, 8, 10-14), D4 (párraf [0216] – [0226]), D5 (reivindicaciones 1-15), D6 (documento completo), y D7 (Ejemplos 1 y 2)

- 2 2 Las características de las reivindicaciones 23-25 también están reveladas en D1 (supra, c 39, l 32 ff), D2 (supra), D3 (supra), D5 (supra), y D6 (supra) Estas reivindicaciones, por ende, carecen de novedad
- 2 3 La materia objeto de las reivindicaciones 1-21 es novedosa porque la combinación de características sugerida por cualquiera de dichas reivindicaciones no está revelada en la técnica
- 3 *Nivel Inventivo (Art 33(3) PCT):*
- 3 1 La reivindicación 1 supuestamente resuelve el problema de proveer una composición inmunogénica de antígenos estafilocócicos, que es capaz de inducir una respuesta inmune particularmente efectiva (cf p 5, l 9-10) Como se muestra en el Ejemplo 8, esto parece ser logrado solamente por algunas combinaciones de antígenos específicas (grupos 4, 9 y 13), mientras que otras combinaciones de antígenos no parecen ser particularmente efectivas Así, el problema anterior no es resuelto por el alcance total de la reivindicación 1 y tiene que ser formulado en términos más amplios, a saber, como la provisión de una composición inmunogénica de antígenos estafilocócicos D1 representa la técnica previa más cercana que revela combinaciones inmunogénicas de MSCRAMMs (c 10, l 34 – c 22, l 28) y sugiere la adición de antígenos adicionales sugeridos por la reivindicación presente 1 (c 22, l 30 – c 25, l 10). Las combinaciones sugeridas por la reivindicación presente 1 parecen ser selecciones arbitrarias de las posibles combinaciones derivadas a partir de la enseñanza de D1 Por consiguiente, la reivindicación 1 no establece un nivel inventivo
- 3.2 Las composiciones inmunogénicas de D1 se usan para vacunación activa (supra, c.6, l 65 – c 9, l 7, c 28, l 16 – c 29, l 47) que implica que se usan en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable que tiene que ser mezclado con dicha composición Por consiguiente, las reivindicaciones 17-21 que se refieren a cualquiera de dichas características, por las consideraciones bajo V 3 1, no establecen un nivel inventivo
- 3 3 Las características adicionales sugeridas por cualquiera de las reivindicaciones 27-, 9, 11 y 16 son conocidas a partir de D1 (supra) y por lo tanto, no establecen un nivel inventivo
- 3 4 Las Reivindicaciones 8, 10, 12-15 se refieren a características técnicas adicionales basadas en la rutina del experto. Se seleccionan arbitrariamente y como no producen ningún efecto técnico imprevisible, no establecen un nivel inventivo
- 4 *Aplicabilidad Industrial (Art 33(4) EPC)*

- 4.1 Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 19 y 24 sobre la pregunta si son aplicables industrialmente, no existe un criterio unificado en los Estados Contratantes de PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia objeto de las reivindicaciones para el uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero pueden permitir, sin embargo, reivindicaciones a un compuesto conocido para primer uso en tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico
- 4.2 Se reconoce la aplicabilidad industrial de la materia objeto de las reivindicaciones 1-18, 20-23 y 25
- 5 *Claridad (Art 6 PCT)*
- 5.1 La reivindicación 1 se refiere a la proteína SasA. No hay indicación en la solicitud en cuanto a la naturaleza de esta proteína (cf. p 10, l 9). En vista del uso inconsistente en la técnica previa de acrónimos que designan las proteínas bacterianas, no se puede determinar cual proteína está cubierta por dicho acrónimo (Art 6 PCT). Más aún, debido a esta falta de claridad, dicha proteína también debe ser considerada como insuficientemente revelada, haciéndola entonces imposible de establecer por el experto en la práctica puesto que se relaciona a dicha proteína (Art 5 PCT)
- 5.2 La reivindicación 1 sugiere proteínas definidas por términos y acrónimos con al menos coincidencia, si no alcance idéntico, creando así falta de claridad. Las proteínas SdrG y Fig parecen ser idénticas. Más aún, la coagulasa, Club y ClfA caen todas bajo el término de proteínas de enlace de fibrinógeno. Finalmente, SltC se menciona en el grupo a) y también en el grupo b).
- 5.3 La reivindicación 16, aunque se refiere a la composición, define la característica técnica de un método ("en donde se genera una respuesta inmune efectiva") confundiendo así la categoría de dicha reivindicación. Si la reivindicación de hecho se refiere a una composición inmunogénica que genera dicha respuesta inmune, esto equivale a una definición en términos de un resultado a ser alcanzado. Tal definición no definiría claramente el alcance de tal reivindicación porque no se puede determinar cuales combinaciones de antígenos están cubiertas.
- 5.4 La reivindicación 22 está dirigida a un producto definido mediante el proceso de su fabricación. El proceso, p.e., la inmunización, sin embargo, no produce un producto definido.

Dependiendo de la reactividad inmune del receptor inmunizado con la vacuna, se puede producir un suero inmune dirigido a cualquier combinación de los antígenos usados. También se abarcan sueros inmunes dirigidos en componentes adicionales de la vacuna, o incluso dirigidos de alguna manera a cualquier componente de la vacuna, a saber, en el caso de no respuesta a la inmunización. En consecuencia, no se puede determinar el alcance de la reivindicación 22.

5 5 Estas consideraciones también aplican para las reivindicaciones 23-25 que se refieren a la globulina inmune de acuerdo con la reivindicación 22.

6 La reivindicación 21 abarca un método para preparar una globulina inmune en humanos expuestos a antígenos estafilocócicos. Se debe tener en cuenta que, a la entrada en la fase regional, la patentabilidad de tal reivindicación puede subyacer restricciones con base en fundamentos morales (c f p.e , Art 53(a) EPC)

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No
PCT/EP2005/010184

International filing date (day/month/year)
20 09 2005

Priority date (day/month/year)
22 09 2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV A61K39/085 A61K39/116 A61P31/04 C07K16/12

Applicant
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S A.

1. This opinion contains indications relating to the following items.

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 56 1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later

For further options, see Form PCT/ISA/220

3 For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel +49 89 2399 - 0 Tx 523656 epmu d
Fax +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Ullbrecht, M
Telephone No +49 89 2399-7710



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**International application No
PCT/EP2005/010184

Box No. I Basis of the opinion

- 1 With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item
- ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
- 2 With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of
- a type of material.
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b format of material.
- ☒ in written format
- ☒ in computer readable form
- c time of filing/furnishing
- ☐ contained in the international application as filed.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished
- 4 Additional comments.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No
PCT/EP2005/010184

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
☒ claims Nos 19,24 (with respect to IA)

because

- ☒ the said international application, or the said claims Nos 19,24 (with respect to IA) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*).

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*Indicate particular elements below*) or said claims Nos are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*)
- ☐ the claims, or said claims Nos are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
- the written form ☐ has not been furnished
☐ does not comply with the standard
- the computer readable form ☐ has not been furnished
☐ does not comply with the standard
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions
- ☐ See separate sheet for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2005/010184

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(I) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Statement

Novelty (N)	Yes	Claims	1-21
	No.	Claims	22-25
Inventive step (IS)	Yes.	Claims	
	No.	Claims	1-25
Industrial applicability (IA)	Yes	Claims	1-18,20-23,25
	No	Claims	

2 Citations and explanations
see separate sheet

Re Item III.

Claims 19 and 24 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of R. 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Art. 34(4)(a)(i) PCT).

Re Item V.

1. *Cited documents:*

- D1: US-B1-6 703 025 (PATTI JOSEPH M ET AL) 9 March 2004 (2004-03-09)
- D2: WO 00/03745 A (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC) 27 January 2000 (2000-01-27)
- D3: WO 93/09811 A (UNIVAX BIOLOGICS, INC; FATTOM, ALI, IBRAHIM; WRIGHT, D , CRAIG) 27 May 1993 (1993-05-27)
- D4: US 2004/072748 A1 (BALABAN NAOMI) 15 April 2004 (2004-04-15)
- D5: US 2002/169288 A1 (HOOK MAGNUS ET AL) 14 November 2002 (2002-11-14)
- D6: MENZIES BARBARA E ET AL: "Passive immunization with antiserum to a nontoxic alpha-toxin mutant from Staphylococcus aureus is protective in a murine model" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 64, no. 5, 1996, pages 1839-1841
- D7: US 2003/113350 A1 (FATTOM ALI I ET AL) 19 June 2003 (2003-06-19)

2. *Novelty (Art. 33(2) PCT):*

- 2.1 D1 teaches IgG purified from rhesus monkeys immunised with a composition of MSCRAMM which are used to passively immunise mice to prevent staphylococcal sepsis (Example 2). As the specificity of the immune globulin preparation according to claim 22 is not defined and may be directed to any of the antigens administered in the method of claim 21 or even none of them depending on the immune reaction of the recipient (cf. V.5.4), the immune globulin preparation of D1 is considered to fall under the scope of claim 22, thereby destroying its novelty.

For these considerations claim 22 also lacks novelty over D2 (p. 32, l. 5 - p. 36, l. 9; claim 92), D3 (p. 2, l. 18 - p. 3, l. 12; claims 1, 2, 8, 10-14), D4 (para [0216] - [0226]), D5 (claims 1-15), D6 (whole document), and D7 (Examples 1 and 2).

2.2 The features of claims 23-25 are also disclosed in D1 (supra; c. 39, l. 32 ff.), D2 (supra), D3 (supra), D5 (supra), and D6 (supra). These claims hence, lack novelty.

2.3 The subject-matter of claims 1-21 is novel as the combination of features suggested by any of said claims is not disclosed in the art.

3 *Inventive step (Art. 33(3) PCT):*

3.1 Claim 1 allegedly solves the problem of providing an immunogenic composition of staphylococcal antigens which is able to induce a particularly effective immune response (cf. p. 5, l. 9-10). As shown in Example 8 this appears to be achieved only by some specific combinations of antigens (groups 4, 9 and 13), whilst other combinations of antigens do not appear to be particularly effective. Hence, the foregoing problem is not solved over the whole scope of claim 1 and has to be formulated in broader terms, namely as the provision of a immunogenic composition of staphylococcal antigens. D1 representing the closest prior which discloses immunogenic combinations of MSCRAMMs (c. 10, l. 34 - c. 22, l. 28) and suggests the addition of further antigens suggested by present claim 1 (c. 22, l. 30 - c. 25, l. 10). The combinations suggested by present claim 1 appear to be arbitrary selections out of the possible combinations derivable from the teaching of D1. Hence, claim 1 does not establish an inventive step

3.2 The immunogenic compositions of D1 are used for active vaccination (supra; c. 6, l. 65 - c. 9, l. 7; c. 28, l. 16 - c. 29, l. 47) which implies that they are used in combination with a pharmaceutically acceptable excipient which has to be mixed with the said composition. Hence, claims 17-21 which refer to any of the said features, for the considerations under V.3.1 do not establish an inventive step

3.3 The additional features suggest by any of claims 2-7, 9, 11 and 16 are known from D1 (supra) and thus do not establish an inventive step.

3.4 Claims 8, 10, 12-15 refer to further technical features based on the skilled person's routine. They are arbitrarily selected and as they do not produce any unforeseeable technical effect do not establish an inventive step.

4. *Industrial applicability (Art. 33(4) PCT):*

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No

PCT/EP2005/010184

- 4.1 For the assessment of the present claims 19 and 24 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment
- 4.2 Industrial applicability of the subject-matter of claims 1-18, 20-23 and 25 is acknowledged.
5. *Clarity (Art. 6 PCT):*
- 5.1 Claim 1 refers to the SasA protein. There is no indication in the application as to the nature of this protein (cf p. 10, l. 9). In view of the inconsistent use in the prior art of acronyms designating bacterial proteins, it is not determinable which protein is covered by said acronym (Art. 6 PCT). Moreover, due to this lack of clarity, the said protein also has to be considered as being insufficiently disclosed, thereby rendering it impossible for the skilled person to set the invention into practice inasmuch as it concerns the said protein (Art. 5 PCT).
- 5.2 Claim 1 suggests proteins defined by terms and acronyms with at least overlapping if not identical scope, thereby creating unclarity. The proteins SdrG and Fig appear to be identical. Moreover, coagulase, ClfB and ClfA all fall under the term of fibrinogen binding proteins. Finally, SitC is mentioned in group a) as well as in group b).
- 5.3 Claim 16 although referring to the composition, defines technical feature of a method ("wherein an effective immune response is generated") thereby obscuring the category of said claim. Should the claim in fact refer to an immunogenic composition generating the said immune response, this would amount to a definition in terms of a result to be achieved. Such a definition would not clearly define the scope of such a claim as it is not determinable which combinations of antigens are covered.
- 5.4 Claim 22 is drawn to a product defined by the process of its manufacture. The process i.e. the immunisation, however does not produce a defined product.

Depending on the immune reactivity of the recipient immunised with the vaccine, an immune serum directed at any combination of the antigens used may result. Also embraced are immune sera directed at further components of the vaccine or even directed at any component of the vaccine at all, namely in the case of non-responsiveness to the immunisation. Consequently, the scope of claim 22 is not determinable

- 5.5 These considerations also apply to claims 23-25 referring to the immune globulin according to claim 22.
6. Claim 21 encompasses a method of preparing an immune globulin in humans exposing them to staphylococcal antigens. It should be borne in mind that, upon entry into the regional phase, the patentability of such a claim may underlie restrictions based on moral grounds (cf. e.g. Art 53(a) EPC).

ANEXO EXPLICATIVO DE MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES

En ejercicio del derecho conferido por el Artículo 28 numeral 1 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes PCT, atentamente me permito informar a ese Despacho que el capítulo reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional ha sido modificado.

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente invención y en este sentido, no configuran una ampliación del invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA PARA SU USO EN VACUNACIÓN
CONTRA ESTAFILOCOCOS

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

La presente solicitud se refiere a composiciones inmunogénicas que contienen una mezcla de antígenos estafilocócicos que combina antígenos que tienen diferentes funciones, por ejemplo, combinaciones que contienen una proteína de enlace de componente extracelular estafilocócico y una proteína transportadora estafilocócica o una proteína de enlace de componente extracelular estafilocócico y un regulador estafilocócico de virulencia o toxina o una proteína transportadora estafilocócica y un regulador estafilocócico de virulencia o toxina. También se describen vacunas, métodos de tratamiento, usos y procesos para elaborar una vacuna estafilocócica.

20

25

COMPOSICIÓN INMUNOGÉNICA PARA SU USO EN VACUNACIÓN
CONTRA ESTAFILOCOCOS

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al campo de composiciones y vacunas inmunogénicas estafilocócicas, a su fabricación y al uso de estas composiciones en medicina. Más particularmente, se refiere a composiciones para vacuna que contienen una combinación de antígenos para el tratamiento o prevención de infección estafilocócica. También se proporcionan métodos para usar estas vacunas en medicina y los métodos para su preparación.

Antecedentes de la invención

La cantidad de infecciones adquiridas en la comunidad y de infecciones adquiridas en el hospital ha aumentado en años recientes con el aumento en el uso de dispositivos intravasculares. Las infecciones adquiridas en hospitales (nosocomiales) son una causa principal de morbilidad y de mortalidad, más particularmente en Estados Unidos, en donde afectan a más de 2 millones de pacientes anualmente. Después de diversos estudios, se ha determinado que aproximadamente el 6 por ciento de los pacientes estadounidenses adquirirán una infección durante su estancia en el hospital. La carga económica en Estados Unidos se estimó en más de 4.5 billones de dólares en 1992 (Emori y Gaynes, 1993, Clin Microbiol Rev 6, 428). Las infecciones más frecuentes son infecciones del tracto urinario (UTI-33% de las infecciones), seguidas

✗

por neumonía (15.5%), infecciones en sitio quirúrgico (14.8%) e infecciones primarias del torrente sanguíneo (13%) Emori y Gaynes, 1993, Clin Microbiol Rev 6, 428)

Staphylococcus aureus, los estafilococos negativos a la
5 Coagulasa (mayormente *Staphylococcus epidermidis*), *enterococcus spp*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, son los patógenos nosocomiales principales. Si bien estos patógenos casi ocasionan la misma cantidad de infecciones, la gravedad de los trastornos que pueden producir combinada con la frecuencia de aislados resistentes
10 a antibióticos, mueve la balanza en esta clasificación hacia *S. aureus* y *S. epidermidis* como los patógenos nosocomiales más significativos.

El *Staphylococcus aureus* es la causa más común de infecciones nosocomiales con una morbilidad y una mortalidad
15 significativas (Romero-Vivas *et al* 1995, Infect. Dis 21, 1417). Es la causa de algunos casos de osteomielitis, endocarditis, artritis séptica, neumonía, abscesos y síndrome de shock tóxico.

El *S. epidermidis* es un comensal normal en la piel que también es un patógeno oportuno responsable de infecciones de dispositivos
20 médicos implantados y de infecciones en lugares donde se realiza cirugía. Los dispositivos médicos infectados por *S. epidermidis* incluyen estimuladores cardíacos, derivaciones para fluido cerebroespinal, catéteres para diálisis peritoneal ambulatoria continua, dispositivos ortopédicos y válvulas cardíacas protésicas.

25 Las infecciones con *S. aureus* y *S. epidermidis* se tratan con

antibióticos, siendo la penicilina el fármaco de elección, mientras que la vancomicina se usa para los aislados resistentes a la meticilina. El porcentaje de cepas estafilocócicas que muestran resistencia de amplio espectro a los antibióticos se ha generalizado y está en aumento desde los años 80. (Panlilo *et al* 1992, Infect Control. Hosp. Epidemiol. 13, 582), lo que supone una amenaza para la terapia antimicrobiana efectiva. Además, la reciente aparición de la cepa de *S. aureus* resistente a la vancomicina ha dado lugar al temor de que las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina aparezcan y se extiendan, para las cuales no hay disponible una terapia efectiva.

Un enfoque alternativo del uso de anticuerpos contra antígenos estafilocócicos en inmunoterapia pasiva ha sido investigado. La terapia que involucra la administración de antisueros policlonales está en desarrollo (WO 00/15238, WO 00/12132), así como también el tratamiento con un anticuerpo monoclonal contra el ácido lipoteicoico (WO 98/57994).

Un enfoque alternativo podría ser el uso de la vacunación activa para generar una respuesta inmunológica contra los estafilococos. Varios candidatos para su inclusión como componentes de vacunas han sido identificados. Estos incluyen proteína de enlace de fibronectina (US5840846), análogo de MHC II (US5648240), proteína de enlace de fibrinógeno (US6008341), GehD (US 2002/0169288), proteína de enlace de colágeno (US6288214), SdrF, SdrG y SdrH (WO 00/12689), exotoxinas mutantes SEA y SEB (WO 00/02523) y proteína de enlace de fibronectina de 52 kDa (WO 01/60852).

El genoma del *S aureus* ha sido secuenciado y muchas de las secuencias codificadoras han sido identificadas (EP786519, WO02/094868) Lo mismo es cierto para *S epidermidis* (WO 01/34809). Como un refinamiento de este enfoque, otros han identificado proteínas
5 que son reconocidas por los sueros hiperinmunitarios de pacientes que han sufrido de infección por estafilococos (WO 01/98499, WO 02/059148)

La primera generación de vacunas dirigidas contra *S aureus* o contra las exoproteínas que éste produce, han tenido éxito limitado
10 (Lee 1996 Trends Microbiol 4; 162) Todavía permanece una necesidad de desarrollar vacunas efectivas contra infecciones estafilocócicas

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que contiene al menos dos proteínas
15 diferentes o fragmentos inmunogénicos de ellas, seleccionadas de al menos dos grupos de proteínas o fragmentos inmunogénicos seleccionados de los siguientes grupos

Grupo a) al menos una proteína de enlace de componente extracelular o fragmento inmunogénico de ella, seleccionada del
20 grupo que consiste en receptor de laminina, proteína de enlace de SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de enlace de vitronectina, proteína de enlace de
25 fibrinógeno, coagulasa, Fig y MAP,

Grupo b) - al menos una proteína transportadora estafilocócica o fragmento de ella, que se selecciona del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg^{2+} , SitC y transportador ABC Ni;

- 5 Grupo c) - al menos un regulador de virulencia estafilocócico, toxina o fragmento de ella que se selecciona del grupo que consiste en toxina alfa (Hla), mutante H35R de toxina alfa, proteína activadora de ARN III (RAP)

Descripción de las figuras

- 10 Figura 1 – Secuencias de polipéptidos de proteínas preferidas La Tabla 1 proporciona información acerca de cuál proteína está representada por cada SEQ ID.

- Figura 2 – Secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas preferidas La Tabla 1 proporciona información sobre qué proteína está
15 codificada por cada SEQ ID.

- Figura 3 – Purificación de toxina alfa bajo condiciones naturales El panel A muestra un SDS-PAGE de muestras preparadas durante la purificación de la toxina alfa. Línea 1 - marcadores de peso molecular, línea 2 – fracción soluble que contiene toxina alfa sobre-expresada,
20 línea 3 – flujo a través de la columna de Ni-NTA, línea 4 - fracciones eluidas con 10% de regulador de pH B, línea 5 - fracciones eluidas con 20% de regulador de pH B, línea 6 - fracciones eluidas con 30% de regulador de pH B, línea 7 - fracciones eluidas con 50% de regulador de pH B, línea 8 - fracciones eluidas con 75% de regulador de pH B, línea 9
25 y 10 fracciones eluidas con 100% de regulador de pH B, línea 11

bacterias en T=0 antes de la inducción, línea 12 - bacterias en T=4 horas después de la inducción, línea 13 – lisado de células, línea 14 – fracción soluble, línea 15 – fracción insoluble

El panel B muestra un SDS-PAGE teñido con Coomassie de 10, 5, 2 y 1 µL de la toxina alfa purificada

Figura 4 – Purificación de condiciones desnaturalizantes de SdrC
El panel A muestra un SDS-PAGE teñido con Coomassie de muestras preparadas durante la purificación de la toxina alfa. Línea M - marcadores de peso molecular, línea Inicio – supernadante formado a partir de la fracción insoluble que contiene SdrC sobre-expresado, línea FT1 - flujo a través de la columna Ni-NTA, línea C - fracciones eluidas con regulador de pH para lavado C, línea D - fracciones eluidas con regulador de pH D, línea E - fracciones eluidas con regulador de pH E

El panel B muestra un SDS-PAGE teñido con Coomassie de 1, 2, 5 y 10 µL del SdrC purificado.

Figura 5 – Resultados de ELISA para antisuero con proteínas estafilocócicas en placas recubiertas con proteínas purificadas

Ratones agrupado pre – resultado usando sueros agrupados extraídos de ratones antes de la inoculación. Ratones agrupado post III – resultado usando sueros de ratón agrupados extraídos después de la inmunización. Conejo agrupado pre – resultado usando sueros agrupados extraídos de conejos antes de la inoculación. Conejo agrupado post III – resultado usando sueros de conejo agrupados extraídos después de la inmunización. B1c- control negativo.

Figura 6 – Resultados de ELISA para antisuero de ratón cultivado

contra proteínas estafilocócicas en placas recubiertas con estafilococos muertos.

El panel A usa placas recubiertas con células completas muertas con serotipo 5 de *S. aureus*. El panel B usa placas recubiertas con células completas muertas con serotipo 8 de *S. aureus*. El panel C usa placas recubiertas con células completas muertas de *S. epidermidis*

La línea marcada con símbolos cuadrados muestra el resultado de ELISA usando antisuero de ratones inmunizados tres veces con la proteína estafilocócica indicada. La línea marcada con símbolos romboidales muestra el resultado de ELISA para los sueros de ratones inmunizados previamente

Figura 7 - Resultados de ELISA para antisuero de conejo cultivado contra proteínas estafilocócicas en placas recubiertas con estafilococos muertos

El panel A usa placas recubiertas con células completas muertas con serotipo 5 de *S. aureus*. El panel B usa placas recubiertas con células completas muertas con serotipo 8 de *S. aureus*. El panel C usa placas recubiertas con células completas muertas de *S. epidermidis*

La línea marcada con símbolos cuadrados muestra el resultado de ELISA usando antisueros de ratones inmunizados tres veces con la proteína estafilocócica indicada (excepto para HarA, en donde sólo se administró una inmunización). La línea marcada con símbolos de diamante muestra los resultados de ELISA para los sueros de conejos inmunizados previamente

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe combinaciones particulares de antígenos estafilocócicos que cuando se combinan, conducen a la producción de una composición inmunogénica para tratar o para prevenir infección estafilocócica. Las composiciones inmunogénicas de la invención incorporan de manera apropiada antígenos que están involucrados en diferentes funciones estafilocócicas. Estas composiciones inmunogénicas dirigen la respuesta inmunitaria hacia diferentes aspectos de la función estafilocócica y por lo tanto son capaces de inducir una respuesta inmunitaria efectiva.

Las infecciones estafilocócicas progresan a través de diferentes etapas. Por ejemplo, el ciclo de vida estafilocócico implica la colonización del comensal, la iniciación de la infección accediendo a tejidos adyacentes o el torrente sanguíneo, multiplicación anaeróbica en la sangre, interrelación entre los determinantes de virulencia de *S. aureus* y los mecanismos de defensa, e inducción de complicaciones, incluyendo endocarditis, formación de abscesos metastásicos y síndrome de sepsis. Diferentes moléculas en la superficie de la bacteria estarán involucradas en diferentes pasos del ciclo de infección. Dirigiendo la respuesta inmunitaria contra una cantidad efectiva de una combinación de antígenos en particular involucrados en diferentes procesos de infección estafilocócica, se puede lograr una composición o vacuna inmunogénica con eficacia aumentada.

En particular, las combinaciones de ciertos antígenos de diferentes clases, algunos de los cuales están involucrados en la adhesión a células anfitrionas, algunos de los cuales están

/

involucrados en la adquisición de hierro o en otras funciones de transporte, algunos de los cuales son toxinas o reguladores de virulencia y antígenos inmunodominantes, pueden desencadenar una respuesta inmunitaria que proteja contra múltiples etapas de la
5 infección

La efectividad de la respuesta inmunitaria se puede medir ya sea en análisis en modelos animales, tal como se describe en los ejemplos, y/o usando un análisis opsonofagocítico tal como se describe en los ejemplos

10 Una ventaja adicional de la invención es que la combinación de antígenos de la invención de diferentes familias de proteínas en una composición inmunogénica hará posible la protección contra una gama de cepas más amplia

La invención se refiere a composiciones inmunogénicas que
15 contienen una pluralidad de proteínas seleccionadas de al menos dos diferentes categorías de proteína, que tienen diferentes funciones dentro de los estafilococos. Los ejemplos de estas categorías de proteínas son proteínas de enlaces extracelulares, proteínas transportadoras tales como proteínas de adquisición de Fe,
20 toxinas o reguladores de virulencia, y otras proteínas inmunodominantes. Las combinaciones para vacuna de la invención son efectivas contra cepas estafilocócicas homólogas (cepas a partir de las cuales se originan los antígenos) y preferiblemente también contra cepas estafilocócicas heterólogas.

25 Una composición inmunogénica de la invención contiene una

cantidad de proteínas mayor o igual que 2, 3, 4, 5 o 6 seleccionadas de 2 o 3 de los siguientes grupos.

- grupo a) - al menos una proteína de enlace de componente extracelular estafilocócica o fragmento de ella, que se selecciona del grupo que consiste en receptor de laminina, proteína de enlace de SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de enlace de vitronectina, proteína de enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig y MAP;
- grupo b) - al menos una proteína transportadora estafilocócica o fragmento de ella, que se selecciona del grupo que consiste en transportadora inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportadora Mg²⁺, SitC y transportadora ABC Ni;
- grupo c) - al menos un regulador de virulencia estafilocócico, toxina o fragmento de ella que se selecciona del grupo que consiste en toxina alfa (Hla), mutante H35R de toxina alfa, proteína activadora de ARN III (RAP)

Por ejemplo, una primera proteína se selecciona del grupo a), b) o c) y una segunda proteína se selecciona de un grupo seleccionado de los grupos a), b) y c) que no incluyen la segunda proteína

En una modalidad preferida, la composición inmunogénica de la invención contiene al menos una proteína que se selecciona del grupo a) y una proteína adicional que se selecciona del grupo b) y/o del grupo c).

En una modalidad adicional, la composición inmunogénica de la invención contiene al menos un antígeno que se selecciona del grupo b) y una proteína adicional que se selecciona del grupo c) y/o del grupo a)

En una modalidad adicional, la composición inmunogénica de la invención contiene al menos un antígeno que se selecciona del grupo c) y una proteína adicional que se selecciona del grupo a) y/o del grupo b)

La composición inmunogénica de la invención contiene de manera apropiada, proteínas de *S aureus*, y/o de *S epidermidis*

Proteínas

Las composiciones inmunogénicas de la invención incluyen una proteína aislada que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad, preferiblemente al menos 90% de identidad, más preferiblemente al menos 95% de identidad, mucho más preferiblemente al menos 97-99% o identidad exacta con la de cualquier secuencia de la figura 1

Cuando se menciona específicamente una proteína aquí, preferiblemente es una referencia a una proteína de longitud completa, natural o recombinante, u opcionalmente una proteína madura en la cual se ha eliminado cualquier secuencia de señal. La proteína puede ser aislada directamente de la cepa estafilocócica o producida mediante técnicas de ADN recombinante. Se puede incorporar fragmentos inmunogénicos de la proteína en la composición inmunogénica de la invención. Estos son fragmentos que contiene al menos 10 aminoácidos, preferiblemente 20 aminoácidos, más preferiblemente 30 aminoácidos, más preferiblemente 40 aminoácidos o 50 aminoácidos, mucho más

preferiblemente 100 aminoácidos, tomados de manera contigua de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Además, estos fragmentos inmunogénicos típicamente son reactivos inmunológicamente con los anticuerpos generados contra la proteínas estafilocócicas o con los anticuerpos generados mediante infección de un anfitrión mamífero con estafilococos. Los fragmentos inmunogénicos también incluyen fragmentos que cuando se administran en una dosis efectiva, (ya sea solos o como un hapteno unido a un portador), desencadenan una respuesta inmunitaria protectora contra la infección estafilocócica, más preferiblemente es protectora contra infección por *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. Un fragmento inmunogénico como este puede incluir, por ejemplo, la proteína que carece de una secuencia guía en el terminal N, y/o un dominio transmembrana y/o un dominio ancla en el terminal C. En un aspecto preferido, el fragmento inmunogénico de acuerdo con la invención contiene sustancialmente todo el dominio extracelular de una proteína que tiene al menos 85% de identidad, preferiblemente al menos 90% de identidad, más preferiblemente al menos 95% de identidad, mucho más preferiblemente al menos 97-99% de identidad, con la de la secuencia seleccionada de la Figura 1 en la longitud completa de la secuencia del fragmento.

También están incluidas entre las composiciones inmunogénicas de la invención, proteínas de fusión de proteínas estafilocócicas, o fragmentos de proteínas estafilocócicas. Estas proteínas de fusión se pueden elaborar de manera recombinante, y pueden contener una porción de al menos 2, 3, 4, 5 o 6 proteínas

estafilocócicas. De manera alternativa, una proteína de fusión puede
contener múltiples porciones de al menos 2, 3, 4 o 5 proteínas
estafilocócicas. Estas pueden combinar diferentes proteínas
estafilocócicas o fragmentos de ellas en la misma proteína De manera
5 alternativa, la invención también incluye proteínas de fusión individuales
de proteínas estafilocócicas o fragmentos inmunogénicos de ellas,
como una proteína de fusión con secuencias heterólogas, tal como una
proveedora de epítopos de células T o etiquetas de purificación, por
ejemplo β-galactosidasa, glutatión-S-transferasa, proteína verde
10 fluorescente (GFP), etiquetas de epítipo tales como FLAG, etiqueta
myc, poli histidina, o proteínas superficiales virales tales como
hemaglutinina del virus de la influenza, o proteínas bacterianas tales
como toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197.

Tabla 1

15 La siguiente tabla presenta los números de SEQ ID de las
secuencias de proteína y de las secuencias de ADN que se
encuentran en la Figura 1 y en la Figura 2 respectivamente SA
indica una secuencia de *S aureus* y SE indica una secuencia de *S*
epidermidis

20	Nombre	Secuencia de proteínas	Secuencia de ADN
	Transportador ABC inmunodominante		
	SA	SEQ ID 1	SEQ ID 34
25	SE	SEQ ID 2	SEQ ID 35

5	Receptor de laminina		
	SA	SEQ ID 3	SEQ ID 36
	SE	SEQ ID 4	SEQ ID 37
10	Antígeno secretor A SsaA		
	SA1	SEQ ID 5	SEQ ID 38
	SA2	SEQ ID 6	SEQ ID 39
	SE	SEQ ID 7	SEQ ID 40
15	SitC		
	SA	SEQ ID 8	SEQ ID 41
	SE	SEQ ID 9	SEQ ID 42
20	IsA / PisA (IssA)		
	SA	SEQ ID 10	SEQ ID 43
	SE	SEQ ID 11	SEQ ID 44
25	EbhA / B		
	SA EbhA	SEQ ID 12	SEQ ID 45
	SA EbhB	SEQ ID 13	SEQ ID 46
	SE EbhA	SEQ ID 14	SEQ ID 47
	SE EbhB	SEQ ID 15	SEQ ID 48

5	Acumulación-asoc. pro Aap		
	SA	SEQ ID 16	SEQ ID 49
	SE	SEQ ID 17	SEQ ID 50
10	Proteína activadora de ARNIII		
	SA	SEQ ID 18	SEQ ID 51
	SE	SEQ ID 19	SEQ ID 52
15	FIG / SdrG		
	SA	SEQ ID 20	SEQ ID 53
	SE	SEQ ID 21	SEQ ID 54
20	Proteína fijadora de elastina EbpS		
	SA	SEQ ID 22	SEQ ID 55
	SE	SEQ ID 23	SEQ ID 56
25	Proteína extracelular EFB SA	SEQ ID 24	SEQ ID 57
	Toxina alfa SA	SEQ ID 25	SEQ ID 58
	SBI SA	SEQ ID 26	SEQ ID 59
	IsdA SA	SEQ ID 27	SEQ ID 60
	IsdB SA	SEQ ID 28	SEQ ID 61

5	SdrC SA	SEQ ID 29	SEQ ID 62
	CfIA SA	SEQ ID 30	SEQ ID 63
	FnbA SA	SEQ ID 31	SEQ ID 64
	CfIA SA	SEQ ID 32	SEQ ID 65
	Coagulasa SA	SEQ ID 33	SEQ ID 66
10	FnbB SA	SEQ ID 67	SEQ ID71
	MAP SA	SEQ ID 68	SEQ ID 72
	SdrC SA	SEQ ID 69	SEQ ID 73
	SdrG SA	SEQ ID 70	SEQ ID 74

15 **Proteínas de enlaces de componente extracelular**

Las proteínas de enlace de componente extracelular son proteínas que se unen a componentes extracelulares del anfitrión. El término incluye las adhesinas, pero no se limita a ellas

Los ejemplos de proteínas de enlaces de componente extracelular incluyen receptor de laminina (Naidu *et al* J. Med Microbiol. 1992, 36, 177), proteína de enlace de SitC/MntC/saliva (US5801234, Wiltshire y Foster Infect. Immun 2001, 69, 5198), EbhA (Williams *et al* Infect Immun 2002, 70, 6805), EbhB, Proteína de enlace de elastina (EbpS) (Park *et al* 1999, J Biol Chem 274; 2845), EFB (FIB) (Wastfelt y Flock 1995, J. Clin. Microbiol. 33; 2347), SBI (Zhang *et al* FEMS Immun Med

Microbiol. 2000, 28; 211), autolisina (Rupp *et al* 2001, J Infect Dis 183, 1038), ClfA (US6008341, McDevitt *et al* Mol. Microbiol 1994, 11 , 237), SdrC, SdrG (McCrea *et al* Microbiology 2000, 146, 1535), SdrH (McCrea *et al* Microbiology 2000, 146; 1535), Lipasa GehD 5 (US2002/0169288), SasA, FnbA (Flock *et al* Mol Microbiol. 1994, 12; 599, US6054572), FnbB (WO 97/14799, Booth *et al* 2001 Infec. Immun 69; 345), proteína de enlace de colágeno Cna (Visai *et al* 2000, J. Biol Chem. 275, 39837), ClfB (WO 99/27109), FbpA (Phonimdaeng *et al* 1988 J. Gen Microbiol.134, 75), Npasa (Flock 2001 J. Bacteriol. 183, 3999), 10 IsaA/PisA (Lonenz *et al* FEMS Immuno. Med Microbiol. 2000, 29; 145), SsaA (Lang *et al* FEMS Immunol. Med. Microbiol 2000, 29, 213), EPB (Hussain y Hermann Simposio en Staph Dinamarca 14-17 2000), SSP-1 (Veenstra *et al* 1996, J Bacteriol 178; 537), SSP-2 (Veenstra *et al* 1996, J Bacteriol. 178, 537), proteína de enlace de heparina HBP de 17 15 kDa (Fallgren *et al* 2001, J. Med. Microbiol. 50; 547), proteína de enlace de vitronectina (Li *et al* 2001, Curr. Microbiol 42, 361), proteína de enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig (WO 97/48727) y MAP (US5648240)

Proteína de enlace de SitC/MntC/saliva

20 Esta es una proteína transportadora ABC, la cual es un homólogo de adhesina PsaA en *S. pneumoniae*. Es una lipoproteína altamente inmunogénica de 32 kDa que está distribuida en la pared celular bacterial (Cockayne *et al* Infect Immun. 1998 66; 3767). Se expresa en *S. aureus* y *S. epidermidis* como una lipoproteína de 32 kDa y un 25 homólogo de 40 kDa está presente en *S. hominis*. En *S. epidermidis*, es

un componente de un operón regulado por hierro. Muestra considerable homología con ambas adhesinas, incluyendo FimA de *Streptococcus parasanguis*, y con lipoproteínas de una familia de transportadores ABC con funciones de transporte de ion metálico probadas o supuestas. Por lo tanto la SitC está incluida como una proteína de enlace extracelular y como un transportador de ion metálico

La proteína de enlace de saliva descrita en US 5,801,234 también es una forma de SitC y puede ser incluida en una composición inmunogénica de la invención

10 **ClfA y ClfB**

Ambas de estas proteínas tienen actividad de enlace de fibrinógeno y impulsan la formación de agrupamientos de *S. aureus* en la presencia de plasma. Ellas contienen un motivo LPXTG común a las proteínas asociadas a la pared.

15 La ClfA se describe en US6008341 y la ClfB es como se describe en WO 99/27109

Coagulasa (FbpA)

Esta es una proteína de enlace de fibrinógeno que impulsa la formación de agrupamientos de *S. aureus* en la presencia de plasma. Se describe en las referencias relacionadas con la coagulasa: Phonimdaeng et al (J Gen Microbio 1988, 134 75-83), Phonimdaeng et al. (Mol Microbiol 1990, 4 393- 404), Cheung et al. (Infect Immun 1995, 63:1914-1920) y Shopsin et al. (J Clin Microbiol. 2000, 38:3453-3456).

Los fragmentos preferidos para su inclusión en la composición inmunogénica de la invención incluyen la proteína madura en la cual el

péptido señal ha sido eliminado (aminoácidos 27 hasta el término C).

La coagulasa tiene tres dominios distintos. Los aminoácidos 59-297 que forman una región en doble espiral, los aminoácidos 326-505 que son una región rica en prolina y en glicina y el dominio del terminal C desde el aminoácido 506 hasta el 645, el cual tiene una conformación en lámina beta. Cada uno de estos dominios es un fragmento que puede ser incorporado en la composición inmunogénica de la invención

SdrG- Fbe - EfB/FIG

Fbe es una proteína de enlace de fibrinógeno que se encuentra en muchos aislados de *S. epidermidis* y que tiene un peso molecular deducido de 119 kDa (Nilsson *et al* 1998 *Infect, Immun* 66, 2666) Su secuencia está relacionada con la del factor de agrupamiento de *S. aureus* (ClfA) Los anticuerpos contra Fbe pueden bloquear el enlace de *S. epidermidis* a placas y a catéteres cubiertos con fibrinógeno (Pei y Flock 2001, *J Infect Dis* 184, 52) Esta proteína también se describe como SdrG en WO 00/12689 La SdrG se encuentra en estafilococos negativos a la coagulasa y es una proteína asociada a la pared celular, que contiene una secuencia LPXTG

La SdrG contiene un péptido señal (aminoácidos 1-51), una región que contiene sitios de enlace a fibrinógeno y sitios de enlace a colágeno (aminoácidos 51-825), dos dominios CnaB (aminoácidos 627-698 y 738-809), una región de repetición SD (aminoácidos 825-1000) y un dominio ancla (aminoácidos 1009-1056)

La Fbe tiene una secuencia de señal supuesta con un sitio de

escisión entre los aminoácidos 51 y 52 por lo tanto, un fragmento preferido de Fbe contiene la forma madura de Fbe que se extiende desde el aminoácido 52 hasta el término C (aminoácido 1,092)

El dominio de Fbe del aminoácido 52 hasta el aminoácido 825,
5 es responsable por el enlace a fibrinógeno Por lo tanto, un fragmento preferido de Fbe consiste en o contiene los aminoácidos 52- 825.

La región entre los aminoácidos 373 y 516 de Fbe muestra la mayor conservación entre Fbe y Clfa El fragmento preferido
10 contendrá por lo tanto los aminoácidos 373-516 de Fbe

Los aminoácidos 825 - 1041 de Fbe contienen una región altamente repetitiva compuesta de residuos de ácido aspártico y serina repetidos por parejas

Los fragmentos preferidos de SdrG incluyen polipéptidos en los
15 cuales el péptido señal y/o las repeticiones de SD y el dominio ancla han sido eliminados Estos incluyen polipéptidos que contienen o que consisten en aminoácidos 50-825, aminoácidos 50-633, aminoácidos 50-597 (SEQ ID NO 2 de WO 03/76470), aminoácidos 273-597 (SEQ ID NO 4 de WO 03/76470), aminoácidos 273-577 (SEQ ID NO 6 de WO
20 03/76470) aminoácidos 1-549, aminoácidos 219-549, aminoácidos 225-549, aminoácidos 219-528, aminoácidos 225-528 de SEQ ID NO 70.

Preferiblemente, un polipéptido SdrG que tiene una secuencia con al menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología con la secuencia de SEQ ID NO: 70, 20 o 21 está incorporado
25 en la composición inmunogénica de la invención

Las composiciones de la invención opcionalmente contienen un fragmento de los polipéptidos SdrG descritos anteriormente

Los fragmentos preferidos tienen el péptido señal y/o el dominio de repetición de SD y/o el dominio ancla eliminado. Por ejemplo, las
 5 secuencias que corresponden a los aminoácidos 1-713, 1-549, 225-549, 225-529, 24-717, 1-707, 1-690, 1-680, 1-670, 1-660, 1-650, 1-640, 1-630, 1-620, 1-610, 1-600, 34-707, 44-697, 36-689 de SEQ ID 76 o las secuencias que tienen 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID 70 o 20 o 21.

10 Los fragmentos preferidos con el péptido señal eliminado tienen un residuo metionina en el término N del fragmento para asegurar la traducción correcta.

Un fragmento más preferido tiene la siguiente secuencia

MEENSVQDVKDSNTDDELSDSNDQSSDEEKNDVINNWQSINTD
 15 DNNQIIKKEETNNYDGLIEKRSEDRTESTTNVDENEATFLQKTPQDNTHL
 TEEEVKESSSVESNSSIDTAQQPSHTTINREESVQTSDNVEDSHVSDF
 ANSKIKNESNTESGKEENTIEQPNKVKEDSTTSQPSGYTNIDEKISNQDE
 LLNLPINEYENKARPLSTTSAQPSIKRVTVNQLAAEQGSNWHLIK
 VTDQSITIEGYDDSEGVKAHDAENLIYDVTFEVDKVKSGDTMTVDIDK
 20 NTVPSDLTDSFTIPKIKDNSGEIATGTYDNKNKQITYTFTDYVDKYENIK
 AHLKLTSYIDKSKVPNNNTKLDVEYKTALSSVNKTITVEYQRPNENRTA
 NLQSMFTNIDTKNHTVEQTIYINPLRYSAKETNVNISGNGDEGST
 IIDSTIIKVYKVGDNQNLPSNRIYDYSEYEDVTNDDYAQLGNN
 NDVNINFGNIDSPYIIKVISKYDPNKDDYTTIQQTVTMQTTINEYTGEFRT
 25 ASYDNTIAFSTSSGQGQGDLPPEKTYKIGDYVWEDVDKDG IQNTNDNE

KPLSNVLVTLTYPDGTSKSVRTDEDGKYQFDGLKNGLTYPKITFETPEGY
 TPTLKHS GTNP ALDSEGN SVWVTINGQDDMTIDSGFYQTPKYSLGNY
 VWYDTNKDGIQGDDEKGISGVKVT LKDENGNIISTTTT DENGKYQ
 FDNLNSGNYIVHFDKPSGMTQTTTDSGDDDEQDADGEEVHVTITDHDD

5 FSIDNGYYDDE

EbhA y EbhB

EbhA y EbhB son proteínas que se expresan tanto en *S. aureus* como en *S. epidermidis* (Clarke y Foster Infect Immun 2002, 70, 6680, Williams *et al* Infect. Immun. 2002, 20; 6805) y las cuales se enlazan a la fibronectina. Dado que la fibronectina es un componente importante de la matriz extracelular, la EbhA y la EbhB tienen una función importante en la adherencia de los estafilococos a la matriz extracelular del anfitrión.

Las proteínas Ebh son grandes, tienen un peso molecular de 1.1 mega Dalton. Es ventajoso usar un fragmento de la proteína Ebh en lugar de la secuencia completa, debido a la facilidad de producción y formulación. La región central de la proteína contiene repeticiones imperfectas que contienen sitios de enlace de fibronectina. Los fragmentos que contienen uno o más de los dominios de repetición descritos más adelante son los fragmentos preferidos para su incorporación en la composición inmunogénica de la invención.

Las proteínas Ebh contienen unidades de repetición imperfectas de 127 aminoácidos de longitud, las cuales están caracterizadas porque contienen la secuencia de consenso.

25 L.G {10}A {13}Q {26}L M L {33}A

25

Preferiblemente

{19}L.G.{10}A.{13}Q {26}L M L {33}A. {12}

Más preferiblemente

.....I/V..A.. 1/V AK ALN/DG. NL..AK..A.{6}L..LN AQK L..QI/V .A..V

5 V {6}A LN/D AM..L...I/V.D/E...TK S.NY/F.N/DAD..K AY/F..AV..A .I/V.N/
D . . .

En donde " " significa cualquier aminoácido y "{10}" significa cualesquiera 10 aminoácidos y I/V indica elecciones alternativas de aminoácido

10 Mediante referencia a la secuencia descrita en Kuroda *et al* (2001) Lancet 357; 1225-1240, y en la Tabla 2, las secuencias de repetición dentro de las proteínas Ebh se deduce fácilmente.

Los fragmentos preferidos para ser incluidos en la composición inmunogénica de la invención incluyen proteínas que están constituidas
15 por uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de 10 de las 127 unidades de repetición del aminoácido. Estos fragmentos pueden consistir en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más repeticiones de la región de repetición 127 del aminoácido, o pueden consistir en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más repeticiones con residuos adicionales de
20 aminoácidos presentes en cualquiera de los extremos o en ambos extremos del fragmento. Otro fragmento preferido es el polipéptido H2 de 44 kDa, que abarca tres repeticiones (aminoácidos 3202-3595) como se describe en Clarke *et al. Infection and Immunity* 70, 6680- 6687, 2002. Estos fragmentos preferiblemente serán capaces de enlazarse a la
25 fibronectina y/o de producir anticuerpos que sean reactivos contra la

proteína Ebh completa

Los polipéptidos Ebh son capaces de enlazarse a la fibronectina. Los fragmentos preferidos de estas secuencias de polipéptidos mantienen la capacidad de enlazarse a la fibronectina. El enlace a la fibronectina se puede evaluar mediante ELISA según se describe en Clarke *et al* (*Infection and Immunity* 70, 6680-6687 2002).

Todavía otros fragmentos preferidos son los que contienen un epítipo de célula B o de auxiliar T, por ejemplo los fragmentos/péptidos que se describen en las Tablas 3 y 4

10 **Tabla 2: Secuencias de repetición en la secuencia de longitud completa de Ebh.**

La secuencia de longitud completa de Ebh se describe en Kuroda *et al* (2001). *Lancet* 357, 1225- 1240 La siguiente tabla muestra los residuos de aminoácidos en los cuales el aminoácido 127 principia y finaliza las repeticiones en la secuencia de longitud completa.

20

25

	Principio	Final
1	3204	3330
2	3331	3457
3	3457	3583
4	3583	3709
5	3709	3835
6	3835	3961
7	3961	4087

of

5

10

15

20

25

8	4200	4326
9	4326	4452
10	4452	4578
11	4578	4704
12	4704	4830
13	4830	4956
14	4956	5082
15	5082	5208
16	5208	5334
17	5334	5460
18	5460	5586
19	5585	5711
20	5711	5837
21	5837	5963
22	5963	6089
23	6089	6215
24	6215	6341



5

10

15

20

25

25	6341	6467
26	6467	6593
27	6593	6719
28	6719	6845
29	6845	6971
30	6971	7097
31	7079	7223
32	7223	7349
33	7349	7475
34	7475	7601
35	7601	7727
36	7727	7853
37	7852	7978
38	7978	8104
39	8104	8230
40	8230	8356
41	8356	8482

5

42	8482	8608
43	8604	8730
44	8858	8984

Tabla 3. Predicción de epítipo de células B para una repetición del aminoácido 127:

10 La secuencia de longitud completa se describe en Kuroda *et al* (2001) Lancet 357, 1225-1240. Una de estas repeticiones, codificada por los aminoácidos 3204-3331 de la secuencia de longitud completa, se escogió para llevar a cabo una predicción de epítipo.

 MDVNTVNQKAASVKSTKDALDGQQNLQRAKTEATNAITHASDLNQA
15 QKNALTQQVNSAQNVHAVNDIKQTTQSLNTAMTGLKRGVANHNQVVQSD
 NYVNADTNKK NDYNNAYNHANDIINGNAQHPVI

20

25

Principio	Final	Secuencia de epítipos	Inicio	Fin
5	10	TVNQKA	3208	3213
14	19	KSTKDA	3217	3222
21	33	DGQQNLQRAKTEA	3224	3236
42	51	DLNQAQKNAL	3245	3254
66	74	DIKQTTQSL	3269	3277
100	112	ADTNKKNDYNNAY	3303	3315
117	123	DIINGNA	3320	3326

Las columnas "principio" y "final" presenta la posición de los epítomos de células B predichos en la repetición del aminoácido 127

5 Las columnas "inicio" y "fin" presentan la posición de los epítomos de células B predichos en la secuencia de Ebh de longitud completa

Tabla 4: Predicción de epítopo de células T auxiliares en Ebh :

La secuencia de longitud completa se describe en la base de datos TrEMBL, referencia de secuencia Q8NWQ6. Una de estas
10 repeticiones, codificada por los aminoácidos 3204-3331 de la secuencia de longitud completa, se escogió para llevar a cabo una predicción de epítopo.

MDVNTVNQKAASVKSTKDALDGQQNLQRAKTEATNAITHASDLNQA
QBCNALTQQVNSAQNVHAVNDIKQTTQSLNTAMTGLKRGVANHNQVVQS
15 DNYVNADTNKK NDYNNAYNHANDIINGNAQHPVI

	Posición en la repetición	Secuencia de epítopo	Posición en la secuencia
	1	MDVNTVNQK	3204
20	3	VNTVNQKAA	3206
	6	VNQKAASVK	3209
	26	LQRAKTEAT	3229
25	37	ITHASDLNQ	3240
	43	LNQAQKNAL	3246
	51	LTQQVNSAQ	3254

21

5	55	VNASAQNVHA	3258
	61	VHAVNDIKQ	3264
	64	VNDIKQTTQ	3267
	67	IKQTTQSLN	3270
	74	LNTAMTGLK	3277
10	78	MTGLKRGVA	3281
	81	LKRGVANHN	3284
	85	VANHNQVVQ	3288
	91	VVQSDNYVN	3294
	92	VQSDNYVNA	3295
15	97	YVNADTNKK	3301
	98	VNADTNKKN	3302
	108	YNNAYNHAN	3311
	112	YNHANDIIN	3315
	118	IINGNAQHP	3321
20	119	INGNAQHPV	3322
25			

La columna "Posición de repetición" presenta la posición de los epítopos de células T predichos en la repetición

La columna "Posición en la secuencia" presenta la posición de los epítopos de células T predichos en la secuencia de Ebh de longitud
5 completa

Los fragmentos de los polipéptidos de la invención pueden ser empleados para producir el correspondiente polipéptido de longitud completa mediante síntesis de péptidos; por lo tanto, estos fragmentos se pueden emplear como productos intermedios para producir los
10 polipéptidos de longitud completa de la invención.

Se prefiere particularmente a las variantes en las cuales varios, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos están sustituidos, eliminados, o añadidos en cualquier combinación

Proteína de enlace de elastina (EbpS)

15 La EbpS es una proteína que contiene 486 aminoácidos con un peso molecular de 83 kDa. Está asociada con la membrana citoplásmica de *S. aureus* y tiene tres regiones hidrofóbicas que mantienen la proteína en la membrana (Downer *et al* 2002, J. Biol Chem 277; 243, Park *et al* 1996, J. Biol. Chem. 271 ; 15803)

20 Dos regiones entre los aminoácidos 1-205 y 343-486 están expuestas superficialmente en la cara exterior de la membrana citoplásmica. El dominio de enlace del ligando EbpS está localizado entre los residuos 14-34 en el término N (Park *et al* 1999, J. Biol. Chem. 274; 2845)

25 Un fragmento preferido para ser incorporado en la composición

inmunogénica de la invención es el fragmento expuesto superficialmente que contiene la región de enlace a elastina (aminoácidos 1-205) Algunos de los fragmentos preferidos no contienen el lazo entero expuesto, sino que deben contener la región de enlace a elastina (aminoácidos 14-34). Un fragmento alternativo que podría usarse consiste en los aminoácidos que forman el segundo lazo expuesto superficialmente (aminoácidos 343-486) También son posibles fragmentos que contengan hasta 1, 2, 5, 10, 20, 50 aminoácidos menos en uno o en ambos extremos

10 **Receptores de laminina**

El receptor de laminina de *S. aureus* juega un papel importante en la patogenicidad. Una característica clave de la infección es la invasión del torrente sanguíneo, lo que permite la formación de abscesos metastásicos diseminada ampliamente. La invasión del torrente sanguíneo requiere la habilidad para extravasarse a través de la membrana de base vascular. Esto se logra mediante el enlace a la laminina a través del receptor de laminina (Lopes *et al* Science 1985, 229, 275).

Los receptores de laminina están expuestos superficialmente y están presentes en muchas cepas de estafilococos, incluyendo *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Sbi

La Sbi es una proteína que tiene una región de enlace a IgG y un dominio de enlace a apolipoproteína H y se expresa en la mayoría de las cepas de *S. aureus* (Zhang *et al* 1998, Microbiology 144, 985).

El término N de la secuencia de Sbi tiene una secuencia de señal típica con un sitio de escisión después del aminoácido 29. Por lo tanto, un fragmento preferido de Sbi para ser incorporado en una composición inmunogénica de la invención comienza en el residuo de aminoácido 30, 31, 32 o 33 y continúa hasta el término C de la Sbi, por ejemplo de SEQ ID NO: 26

El dominio de enlace de Sbi ha sido identificado como una región hacia el término N de la proteína de los aminoácidos 41-92. Este dominio es homólogo con los dominios de enlace a IgG de la proteína A.

El dominio de enlace a IgG de Sbi mínimo contiene la siguiente secuencia:

QTTQNNYVTDQQKAFYQVLHLKGITEEQRNQYIKTLREHPERAQEVFSESLK

 ** *** * *** * * * * *

* indica aminoácidos que son similares entre dominios fijadores de IgGs

El fragmento preferido de Sbi para ser incluido en la composición inmunogénica de la invención contiene un dominio de enlace a IgG. Este fragmento contiene la secuencia de consenso para un dominio de enlace a IgG según se indica mediante * tal como se muestra en la secuencia anterior. Preferiblemente el fragmento contiene o consiste en la secuencia completa mostrada anteriormente. Más preferiblemente, el fragmento contiene o consiste en los aminoácidos 30-92, 33-92, 30-94, 33-94, 30-146, 33-146, 30-150, 33-150, 30-160, 33-160, 33-170, 33-180, 33-190, 33-200, 33-205 o 33-210 de Sbi, por ejemplo de SEQ ID NO 26.

El fragmento preferido puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

sustituciones de aminoácido de las secuencias indicadas.

Los fragmentos preferidos pueden contener repeticiones múltiples (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) del dominio de enlace a IgG.

EFB - FIB

5 La Fib es una proteína de enlace de fibrinógeno de 19 kDa que es secretada en el medio extracelular por *S. aureus*. Es producida por todos los aislados de *S. aureus* sometidos a prueba (Wastfelt y Flock 1995, *J. Clin. Microbiol.* 33, 2347)

10 El *S. aureus* forma agrupaciones en la presencia de fibrinógeno y se enlaza a las superficies recubiertas con fibrinógeno. Esta capacidad facilita la colonización estafilocócica de catéteres y células endoteliales.

15 La Fib contiene a secuencia de señal en el término N de la proteína con un sitio de escisión supuesto aproximadamente en el aminoácido 30. Por lo tanto, el fragmento preferido para ser introducido en la composición inmunogénica de la invención podría contener la secuencia de la proteína madura (aproximadamente desde el aminoácido 30 hasta el término C de la proteína).

IsaA/PisA

20 La IsaA es una proteína de 29 kDa, también conocida como PisA, que ha demostrado ser una proteína inmunodominante estafilocócica durante la sepsis en pacientes de hospital (Lorenz *et al* 2000, *FEMS Immunol. Med. Microb.* 29, 145).

25 Se piensa que los primeros 29 aminoácidos de la secuencia de IsaA son una secuencia de señal. Por lo tanto, un fragmento preferido de IsaA para ser incluido en una composición inmunogénica de la

invención podría contener residuos de los aminoácidos 30 en adelante, hasta el final de la secuencia codificada.

Proteína de enlace de fibronectina

La proteína de enlace de fibronectina A (FnbA) se describe en
5 US5320951 y en Schennings *et al* (1993, Microb Pathog 15: 227) La
proteína de enlace de fibronectina A contiene varios dominios que están
involucrados en el enlace a la fibronectina (WO 94/18327) Estos se
denominan D1, D2, D3 y D4. Los fragmentos preferidos de proteína de
enlace de fibronectina A o B comprenden o consisten en D1, D2, D3, D4,
10 D1-D2, D2-D3, D3-D4, D1-D3, D2-D4 o D1-D4 (tal como se describe en
WO 94/18327).

La proteína de enlace de fibronectina contiene una secuencia de
señal de 36 aminoácidos Por ejemplo

VKNNLRYGIRKHKLGAA SVFLGTMIWGMGQDKEAA

15 Opcionalmente, la proteína madura, omitiendo esta secuencia de
señal, está incluida en la composición inmunogénica de la invención.

Proteínas transportadoras

La pared celular de las bacterias Gram positivas actúa como una
barrera que previene la difusión libre de metabolitos en la bacteria Una
20 familia de proteínas orchestra el paso de nutrientes esenciales en la
bacteria y por lo tanto es esencial para la viabilidad de la bacteria. El
término proteína transportadora cubre proteínas involucradas en el paso
inicial de enlace a metabolitos, tales como hierro, así como también los
involucrados en transportar realmente el metabolito en la bacteria

25 El hierro molecular es un co-factor esencial para el crecimiento

bacteriano Se secretan sideróforas que fijan el hierro libre y luego se capturan mediante receptores superficiales bacterianos que suministran hierro para transportarlo a través de la membrana citoplásmica La adquisición de hierro es crítica para el establecimiento de infecciones humanas, de tal forma que la generación de una respuesta inmunitaria contra esta clase de proteínas conduce a una pérdida de viabilidad estafilocócica.

Los ejemplos de proteínas transportadoras incluyen el transportador inmunodominante ABC (Burnie *et al* 2000 *Infect. Immun.* 68; 3200), IsdA (Mazmanian *et al* 2002 PNAS 99; 2293), IsdB (Mazmanian *et al* 2002 PNAS 99, 2293), el transportador de Mg²⁺, SitC (Wiltshire y Foster 2001 *Infect. Immun* 69; 5198) y el transportador ABC Ni

Transportador inmunodominante ABC

El transportador inmunodominante ABC es una proteína bien conservada que puede ser capaz de generar una respuesta inmunitaria que tiene protección cruzada contra diferentes cepas estafilocócicas (Mei *et al* 1997, *Mol. Microbiol* 26, 399) Los anticuerpos contra esta proteína se han encontrado en pacientes con septicemia (Burnie *et al* 2000, *Infect Immun* 68, 3200).

Los fragmentos preferidos de transportador inmunodominante ABC incluirán los péptidos DRHFLN, GNYD, RRYPF, KTTLLK, GVTTSLS, VDWLR, RGFL, más preferiblemente KIKVYVGNYDFWYQS, TVIVVSHDRHFLYNNV y/o TETFLRGFLGRMLFS, dado que estas secuencias contienen epítomos que son reconocidos por el sistema inmunológico humano

IsdA-IsdB

Los genes *isd* (determinantes superficiales regulados por hierro) de *S. aureus* codifican las proteínas responsables de el enlace a hemoglobina y del paso de hierro del grupo hemo hacia el citoplasma, en donde actúa como un nutriente esencial. IsdA y IsdB están localizados en la pared celular de los estafilococos. La IsdA parece estar expuesta en la superficie de la bacteria, dado que es susceptible de digestión por la proteinasa K. La IsdB fue digerida parcialmente, lo que sugiere que está expuesta parcialmente sobre la superficie de la bacteria (Mazmanian *et al* 2003 Science 299; 906).

La IsdA y la IsdB son ambas proteínas de 29 kDa que se enlazan al grupo hemo. Su expresión está regulada por la disponibilidad y hierro por medio del represor Fur. Su expresión será alta durante la infección en un anfitrión, en donde la concentración de hierro será baja.

También son conocidas como FrpA y FrpB (Morrissey *et al* 2002, Infect. Immun. 70; 2399). FrpA y FrpB son proteínas con una alta carga. Han demostrado que proporcionan una contribución principal a la adhesión al plástico.

En una modalidad, la composición inmunogénica de la invención contiene un fragmento de IsdA y/o IsdB que es como se describe en WO 01/98499 o en WO 03/11899.

Toxinas y reguladores de virulencia

Los miembros de esta familia de proteínas incluyen toxinas tales como la toxina alfa, hemolisina, enterotoxina B y TSST-1, así como también proteínas que regulan la producción de toxinas tales como RAP.

Toxina alfa (Hla)

La toxina alfa es un importante determinante de virulencia producida por la mayoría de las cepas de *S. aureus*. Es una toxina formadora de poros con actividad hemolítica. Se ha demostrado que los anticuerpos contra la toxina alfa neutralizan los efectos perjudiciales y letales de la toxina alfa en modelos animales (Adlam *et al* 1977 *Infect Immun.* 17, 250). Las plaquetas humanas, las células endoteliales y las células mononucleares son susceptibles a los efectos de la toxina alfa.

La alta toxicidad de la toxina alfa requiere que sea desintoxicada antes de usarse como inmunogénico. Esto se puede lograr mediante tratamiento químico, por ejemplo mediante tratamiento con formaldehído, glutaraldehído o de otros reactivos reticulantes o conjugándolo químicamente con polisacáridos bacterianos como se describe más adelante.

Otra manera de eliminar la toxicidad es introducir mutaciones puntuales que eliminan toxicidad mientras que mantienen la antigenicidad de la toxina. La introducción de una mutación puntual en el aminoácido 35 de la toxina alfa en donde se reemplaza un residuo de histidina con un residuo de leucina, da como resultado la eliminación de toxicidad, mientras que mantiene la inmunogenicidad (Menzies y Kemodle 1996; *Infect. Immun.* 64; 1839). La histidina 35 parece ser crítica para la oligomerización apropiada requerida para la formación de poros, y la mutación de este residuo conduce a la pérdida de toxicidad.

Cuando se incorpora en composiciones inmunogénicas de la invención, la toxina alfa preferiblemente es desintoxicada mediante

mutación de His 35, más preferiblemente reemplazando His 35 con Leu o Arg. En una modalidad alternativa, la toxina alfa es desintoxicada mediante la conjugación con otros componentes de la composición inmunogénica, preferiblemente con polisacárido tipo V de *S. aureus* y/o con polisacárido tipo VIII de *S. aureus* y/o con PNAG.

Proteína activadora de ARN II (RAP)

La RAP no es en sí misma una toxina, sino que es un regulador de factores de expresión de virulencia. La RAP es producida y secretada por estafilococos. Activa el sistema regulador de *agr* de otros estafilococos y activa la expresión y la liberación subsiguiente de factores de virulencia tales como hemolisina, enterotoxina B y TSST-1.

Una respuesta inmunitaria generada contra RAP podría no matar la bacteria, pero podría interferir con su patogenicidad. Esto tiene la ventaja de proporcionar presión menos selectiva para que surjan nuevas cepas resistentes.

Podría haber una segunda ventaja en producir una respuesta inmunitaria que pudiera ser instrumental para reducir la morbilidad de la infección.

Es particularmente ventajoso combinar la RAP con otros antígenos en una vacuna, particularmente en donde el antígeno adicional podría proporcionar una respuesta inmunitaria que sea capaz de matar la bacteria.

Otras proteínas

Proteína asociada a la acumulación (Aap)

La Aap es una proteína de 140 kDa que es esencial para la

acumulación de cepas de *S. epidermidis* sobre las superficies (Hussain *et al* Infect Immun 1997, 65; 519). Las cepas que expresan esta proteína producen significativamente mayores cantidades de biopelícula y la Aap parece estar involucrada en la formación de biopelícula Los anticuerpos contra la Aap son capaces de inhibir la formación de biopelícula y de inhibir la acumulación de *S. epidermidis*.

Un fragmento preferido de Aap es un dominio conservado que contiene o que consiste en los aminoácidos 550-1069

Antígeno secretor estafilocócico SsaA

10 La SsaA es una proteína fuertemente inmunogénica de 30 kDa que se encuentra tanto en *S. aureus* como en *S. epidermidis* (Lang *et al* 2000 *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29; 213). Su expresión durante la endocarditis sugiere un papel en la virulencia específico para la patogénesis de la enfermedad infecciosa

15 La SsaA contiene una secuencia conductora en el terminal N y un sitio de escisión de peptidasa señal. El péptido conductor es seguido por una región hidrofílica de aproximadamente 100 aminoácidos desde el residuo 30 hasta el residuo 130.

Un fragmento preferido de SsaA para ser incorporado en la composición inmunogénica de la invención se elabora de la proteína madura (aminoácidos 27 hasta el término C o aminoácidos 30 hasta el término C).

Otros fragmentos preferidos contienen el área hidrofílica de SsaA desde el aminoácido 30 hasta el aminoácido 130.

25 Combinaciones preferidas

Una combinación preferida de proteínas en la composición inmunogénica de la invención contiene receptor de laminina y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene SitC y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene EbhA y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene EbhB y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA

Una combinación de proteínas preferida adicional en la

composición inmunogénica de la invención contiene EbpS y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene EFB(FIB) y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene SBI y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene autolisina y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene ClfA y 1, 2, 3, 4 o 5

##

antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA

5 Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene SdrC y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina
10 alfa, RAP, Aap y SsaA

 Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene SdrG y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺,
15 SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa y RAP.

 Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene SdrH y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en
20 transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA

 Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene Lipasa GehD y 1, 2,
25 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que

consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la
5 composición inmunogénica de la invención contiene SasA y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

10 Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene FnbA y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina
15 alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene FnbB y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺,
20 SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene Cna y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en
25 transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺,

SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene ClfB y 1, 2, 3, 4 o 5
5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la
10 composición inmunogénica de la invención contiene FbpA y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

15 Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene Npasa y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina
20 alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene IsaA/PisA y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺,
25 SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina

alfa, RAP, Aap y SsaA

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene SsaA y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en
5 transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene EPB y 1, 2, 3, 4 o 5
10 antígenos adicionales seleccionados del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene SSP-1 y 1, 2, 3, 4 o
15 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

20 Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene SSP-2 y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina
25 alfa, RAP, Aap y SsaA

778

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene HPB y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene proteína de enlace de vitronectina y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, Site, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene proteína de enlace de fibrinógeno y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, Site, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene coagulasa y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la

composición inmunogénica de la invención contiene Fig y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene MAP y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene transportador ABC inmunodominante y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en receptor de laminina, proteína de enlace de SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, Proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de enlace de vitronectina, proteína de enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig, MAP, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene IsdA y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en receptor de laminina, proteína de enlace de SitC/MntC/saliva, EbhA,

EbhB, proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de enlace de vitronectina, proteína de enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig, MAP, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene IsdB y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en receptor de laminina, proteína de enlace de SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, Proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de enlace de vitronectina, proteína de enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig, MAP, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y SsaA

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene SitC y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en receptor de laminina, proteína de enlace de SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, Proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de enlace de vitronectina, proteína de enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig, MAP, toxina alfa, mutante H35L o H35R de toxina alfa, RAP, Aap y

SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene toxina alfa y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en receptor de laminina, proteína de enlace de SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP- 2, HBP, proteína de enlace de vitronectina, proteína de enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig, MAP, transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg2+, SitC, transportador ABC Ni, Aap y SsaA

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene variante H35L o H35R de toxina alfa y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en receptor de laminina, proteína de enlace de SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de enlace de vitronectina, proteína de enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig, MAP, transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg2+, SitC, transportador ABC Ni, Aap y SsaA.

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene RAP y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en

receptor de laminina, proteína de enlace de SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, Proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de
 5 enlace de vitronectina, proteína de enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig, MAP, transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, Aap y SsaA

Una combinación de proteínas preferida adicional en la composición inmunogénica de la invención contiene Aap y 1, 2, 3, 4
 10 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en receptor de laminina, proteína de enlace de SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP,
 15 proteína de enlace de vitronectina, proteína de enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig, MAP, transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador ABC Ni, RAP, toxina alfa y mutante H35L o H35R de toxina alfa

Una combinación de proteínas preferida adicional en la
 20 composición inmunogénica de la invención contiene SsaA y 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos adicionales, que se seleccionan del grupo que consiste en receptor de laminina, proteína de enlace de SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB,
 25 Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP,

proteína de enlace de vitronectina, proteína de enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig, MAP, transportador inmunodominante ABC, IsdA, IsdB, transportador Mg^{2+} , SitC, transportador ABC Ni, RAP, toxina alfa y mutante H35L o H35R de toxina alfa

- 5 Los inventores han demostrado que ciertos antígenos producen una respuesta inmunitaria particularmente efectiva dentro del contexto de una mezcla de antígenos. De acuerdo con esto, una modalidad de la invención es una composición inmunogénica que contiene IsaA y una proteína transportadora estafilocócica, o IsaA y
- 10 un regulador de virulencia o toxina estafilocócica, o que contiene Sbi y una proteína transportadora estafilocócica, o Sbi y un regulador de virulencia o toxina estafilocócica, o que contiene SdrC y una proteína transportadora estafilocócica o SdrC y un regulador de virulencia o toxina estafilocócica, o IsaA y Sbi, o IsaA y SdrC, o IsaA y
- 15 autolisina, o IsaA y Ebh, o Sbi y SdrC, o Sbi y autolisina, o Sbi y Ebh, o SdrC y autolisina, o SdrC y Ebh, o autolisina-glucosaminidasa y Ebh. Para cada una de estas combinaciones, las proteínas pueden ser de longitud completa o fragmentos, con secuencias al menos 85%, 90%, 95%, 98% o 100% idénticas a las
- 20 de las secuencias de la figura 1

En las combinaciones anteriores y siguientes, las proteínas especificadas pueden estar presentes opcionalmente en la composición inmunogénica de la invención como un fragmento o proteína de fusión como se describió aquí anteriormente.

- 25 Las composiciones inmunogénicas preferidas de la invención no

incluyen las secuencias de proteína descritas en WO02/094868

Combinaciones de tres proteínas

Una composición inmunogénica preferida de la invención contiene además tres componentes de proteínas en una combinación de toxina
 5 alfa, una proteína de enlace de componente extracelular (preferiblemente una adhesina) y una proteína transportadora (preferiblemente una proteína de enlace de hierro).

En una combinación como esta, la toxina alfa puede ser desintoxicada químicamente, o desintoxicada genéticamente mediante la
 10 introducción de mutación o mutaciones puntuales, preferiblemente la mutación en el punto His35Leu. La toxina alfa está presente como base libre, o de manera alternativa, está conjugada con un polisacárido o con un componente LTA de la composición inmunogénica.

Las combinaciones preferidas incluyen.

15 Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdA y una proteína de enlace de componente extracelular que se selecciona del grupo que consiste en receptor de laminina, proteína de enlace de SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA,
 20 FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de enlace de vitronectina, proteína de enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig y MAP.

Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdB y una proteína de enlace de componente extracelular que se selecciona
 25 del grupo que consiste en receptor de laminina, proteína de enlace de

SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de enlace de vitronectina, proteína de enlace de
5 fibrinógeno, coagulasa, Fig y MAP

Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdA y una adhesina que se selecciona del grupo que consiste en receptor de laminina, EbhA, EbhB, proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, autolisina, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA,
10 Npasa, SSP-1, SSP-2, proteína de enlace de vitronectina, proteína de enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig y MAP

Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdB y una adhesina que se selecciona del grupo que consiste en receptor de laminina, EbhA, EbhB, proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB),
15 autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, SSP-1, SSP-2, proteína de enlace de vitronectina, proteína de enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig y MAP.

Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdA y receptor de laminina.

20 Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdA y EbhA.

Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdA y EbhB.

Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdA y
25 EbpS.

Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdA y EFB (FIB)

Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdA y SdrG

5 Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdA y ClfA

Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdA y ClfB.

10 FnbA Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdA y

coagulasa.

Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdA y Fig

15 Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdA y SdrH.

Una composición inmunogénica que contiene toxina alfa, IsdA y SdrC

20 MAP. Una composición inmunogénica que contiene IsaA y Sbi

Una composición inmunogénica que contiene IsaA y Sbi

Una composición inmunogénica que contiene IsaA y IsdB.

Una composición inmunogénica que contiene IsaA y IsdA.

25 Una composición inmunogénica que contiene IsaA y SdrC Una
composición inmunogénica que contiene IsaA y Ebh o fragmento de ella

como se describió aquí anteriormente

Una composición inmunogénica que contiene Sbi y SdrC

Una composición inmunogénica que contiene Sbi y Ebh o fragmento de ella como se describió aquí anteriormente.

- 5 Una composición inmunogénica de la invención que contiene IsaA, Sbi o SdrC

Selección de antígenos expresados en diferentes linajes clonales

10 El análisis de la aparición de factores de virulencia en relación con la estructura de la población de *Staphylococcus aureus* mostró la presencia variable de genes de virulencia en las poblaciones naturales de *S. aureus*.

Entre los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*, al menos cinco linajes clonales mostraron ser muy frecuentes (Booth *et al.*, 2001
15 Infect Immun. 69(1) 345-52) La alfa-hemolisina (*hla*), proteína A de enlace de fibronectina (*fnbA*) y factor de agrupamiento A (*clfA*) mostraron estar presentes en la mayoría de los aislados, sin considerar la identidad del linaje, lo que sugiere un papel importante de estas proteínas en la supervivencia del *S. aureus* (Booth *et al.*, 2001 Infect
20 Immun. 69(1).345-52). Más aún, de acuerdo con Peacock *et al* 2002 las distribuciones de *fnbA*, *clfA*, coagulasa, *spa*, *map*, *pvl* (leucocidina Pantón-Valentine), *hlg* (toxina gamma), toxina alfa e *ica* perecieron no estar relacionadas con la estructura clonal subyacente, lo que sugiere una transferencia horizontal considerable de estos genes

- 25 Por el contrario, otros genes de virulencia tales como la proteína

de enlace de fibronectina B (*fnbB*), beta-hemolisina (*hly*), proteína de enlace de colágeno (*cna*), TSST-1 (*tst*) y gen de resistencia a la meticilina (*mecA*) están fuertemente asociados con linajes específicos (Booth *et al.*, 2001 Infect Immun 69(1):345-52) De manera similar, Peacock *et al.* 2002 (Infect Immun 70(9):4987-96) demostraron que las distribuciones de las enterotoxinas, *tst*, las exfolatinas (*eTa* y *etb*), beta- y delta-toxinas, los genes *sdr* (*sdrd*, *sdrE* y *bbp*), *cna*, *ebpS* y *efb* dentro de la población, son todos altamente significativos con relación a los complejos clonales derivados de MLST.

10 Los datos de MLST no proporcionan evidencia de que las cepas responsables de la enfermedad nosocomial representen una sub población distinta de las cepas que ocasionan enfermedad adquirida en la comunidad o de las cepas recuperadas de portadores asintomáticos (Feil *et al.*, 2003 J Bacteriol. 185(11):3307-16).

15 Las composiciones inmunogénicas preferidas de la invención son efectivas contra estafilococos de diferentes linajes clonales

En una modalidad, esto se logra incluyendo 1, 2, 3, 4, preferiblemente al menos 1 proteína que se expresa en la mayoría de los aislados de estafilococos. Los ejemplos de estas proteínas incluyen alfa-hemolisina (*hly*), proteína A de enlace de fibronectina (*fnbA*) y factor de agrupamiento A (*clfA*), coagulasa, *spa*, *map*, *pvl* (leucocidina Panton-Valentine), *hlg* (toxina gamma), *ica*, transportador inmunodominante ABC, RAP, autolisina (Rupp *et al* 2001, J. Infect. Dis. 183; 1038), receptores de laminina, SitC, IsaA/PisA, SPOIIE (), SsaA, EbpS, SasF (Roche *et al* 2003, Microbiology 149, 643), EFB(FIB), SBI,

20

25

ClfB, IsdA, IsdB, FnbB, Npasa, EBP, Sialoproteína II de enlace ósea, IsaB/PisB (Lorenz *et al* FEMS Immuno Med Microb. 2000, 29; 145), SasH (Roche *et al* 2003, Microbiology 149, 643), MRPI, SasD (Roche *et al* 2003, Microbiology 149, 643), SasH (Roche *et al* 2003, Microbiology 149, 643), precursor de aureolisina (AUR)/Sepp1 y autolisina novedosa.

En una modalidad alternativa, 2 o más proteínas que se expresan en diferentes conjuntos de cepas clonales están incluidas en la composición inmunogénica de la invención Preferiblemente la combinación de antígenos permitirá que sea generada una respuesta inmunitaria que sea efectiva contra múltiples cepas clonales, mucho más preferiblemente contra todas las cepas clonales. Las combinaciones preferidas incluyen FnbB y betahemolisina, FnbB y Cna, FnbB y TSST-1, FnbB y mecA, FnbB y SdrD, FnbB y SdrF, FnbB y EbpS, FnbB y Efb, beta-hemolisina y Cna, beta-hemolisina y TSST-1, beta-hemolisina y mecA, beta-hemolisina y SdrD, beta-hemolisina y SdrF, beta-hemolisina y EbpS, beta-hemolisina y Efb, Cna y TSST-1, Cna y mecA, Cna y SdrD, Cna y SdrF, Cna y EbpS, Cna y Efb, TSST-1 y mecA, TSST-1 y SdrD, TSST-1 y SdrF, TSST-1 y EbpS, TssT-1 y Efb, MecA y SdrD, MecA y SdrF, MecA y EbpS, MecA y Efb, SdrD y SdrF, SdrD y EbpS, SdeD y Efb, SdrF y EbpS, SdrF y Efb, y EbpS y Efb.

Las combinaciones preferidas descritas aquí anteriormente pueden ser combinadas con componentes adicionales que se describen más adelante.

Selección de antígenos expresados durante diferentes fases de crecimiento

Los estafilococos pasan por una fase de crecimiento exponencial durante la cual será expresado un conjunto particular de proteínas. Estas incluyen muchas de las proteínas de enlaces de componente extracelular y proteínas transportadoras. Después de un periodo de crecimiento exponencial, los estafilococos regresan hacia una fase post exponencial durante la cual el crecimiento es más lento y la expresión de proteínas es modulada. Muchas de las proteínas expresadas durante la fase de crecimiento exponencial son reguladas hacia abajo, mientras que otras proteínas, tales como enzimas y la mayoría de las toxinas, incluyendo la toxina alfa, son expresadas en niveles más altos.

Las composiciones inmunogénicas de la invención contienen una proteína expresada en niveles más altos durante la fase de crecimiento exponencial y una proteína expresada en niveles más altos durante la fase post-exponencial.

En una modalidad preferida, la composición inmunogénica de la invención contiene toxina alfa y una proteína de enlace de componente extracelular (preferiblemente FnbA, FnbB, ClfA y ClfB) o una proteína transformadora.

Más preferiblemente, contiene toxina alfa o Cna o lipasa GehD y una proteína seleccionada del grupo que consiste en receptor de laminina, proteína de enlace de SltC/MntC/saliva, proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA₁, SdrC, SdrG, SdrH, SasA, FnbA, FnbB, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de enlace de vitronectina, proteína de

enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig y MAP, transportador ABC inmunodominante, IsdA, IsdB, transportador Mg²⁺, SitC, transportador Ni ABC, Aap y SsaA

En las combinaciones descritas anteriormente, la toxina alfa
5 puede ser desintoxicada genéticamente o químicamente, tal como se describe más adelante

Polisacáridos

Las composiciones inmunogénicas de la invención preferiblemente contienen además polisacáridos capsulares, incluyendo uno o más de
10 PIA (también conocido como PNAG) y polisacáridos capsulares de tipo V y/o de tipo VIII de *S. aureus* y/o polisacáridos capsulares de tipo I y/o de tipo II de *S. epidermidis*.

PIA (PNAG)

Está claro ahora que las diversas formas de polisacáridos
15 estafilocócicos superficiales identificados como PS/A, PIA y SAA son la misma entidad química - PNAG (Maira-Litran *et al* Vacuna 22; 872-879 (2004)). Por lo tanto, el término PIA o PNAG comprende todos estos polisacáridos u oligosacáridos que provienen de ellos.

El PIA es una adhesina intracelular polisacárida, y está compuesto
20 de un polímero de glucosamina β -(1→6)-ligada sustituida con constituyentes N-acetilo y O-succinilo. Este polisacárido está presente tanto en *S. aureus* como en *S. epidermidis* y puede ser aislado de cualquier fuente (Joyce *et al* 2003, Carbohydrate Research 338, 903, Maira-Litran *et al* 2002, Infect Immun 70, 4433) Por ejemplo, el PNAG
25 puede ser aislado de la cepa MN8m de *S. aureus* (WO 04/43407).

El PIA aislado de *S. epidermidis* es un constituyente integral de la biopelícula. Es responsable de mediar la adhesión célula-célula y probablemente también funciona para proteger la colonia en crecimiento de la respuesta inmunitaria del anfitrión.

5 Recientemente se demostró que el polisacárido conocido previamente como poli-N-succinil- β -(1 $\rightarrow$ 6)-glucosamina (PNSG) no tiene la estructura esperada, dado que la identificación de la N-succinilación era incorrecta (Maira-Litran *et al* 2002, Infect. Immun. 70, 4433). Por lo tanto el polisacárido conocido formalmente como PNSG y que ahora se
10 encuentra que es PNAG también está comprendido en el término PIA.

El PIA (o PNAG) puede tener tamaños diferentes que varían desde 400 kDa hasta entre 75 y 400 kDa hasta entre 10 y 75 kDa para oligosacáridos compuestos de hasta 30 unidades de repetición (de glucosamina β -(1 $\rightarrow$ 6)-ligada sustituida con constituyentes N-acetilo y O-succinilo). Cualquier tamaño de polisacárido PIA u oligosacárido puede
15 usarse en una composición inmunogénica de la invención, sin embargo se prefiere un tamaño de más de 40 kDa. El tamaño se puede lograr mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo mediante micro fluidización, irradiación ultrasónica o mediante escisión química
20 (WO 03/53462, EP497524, EP497525).

Los rangos de tamaño preferidos de PIA (PNAG) son 40-400 kDa, 50-350 kDa, 40-300 kDa, 60-300 kDa, 50-250 kDa y 60-200 kDa.

El PIA (PNAG) puede tener grados de acetilación diferentes debido a la sustitución en los grupos amino por acetato. El PIA
25 producido *en vitro* está casi sustituido en los grupos amino (95-100%)

De manera alternativa, se puede usar un PIA (PNAG) desacetilado que tenga menos de 60%, preferiblemente menos de 50%, 40%, 30%, 20%, 10% de acetilación. El uso de un PIA (PNAG) desacetilado se prefiere, dado que los epítomos no acetilados del PNAG son eficientes para
5 mediar la eliminación opsónica de las bacterias Gram positivas, preferiblemente *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. Mucho más preferiblemente, el PIA (PNAG) tiene un tamaño de entre 40 kDa y 300 kDa y está desacetilado de manera que menos de 60%, 50%, 40%, 30% o 20% de los grupos amino están acetilados.

10 El término PNAG desacetilado (dPNAG) se refiere a un polisacárido u oligosacárido PNAG en el cual menos de 60%, 50%, 40%, 30%, 20% o 10% de los grupos amino están acetilados

En una modalidad, el PNAG es desacetilado para formar dPNAG tratando químicamente el polisacárido natural. Por ejemplo, el PNAG
15 natural se trata con una solución básica, de tal forma que el pH aumente a más de 10. Por ejemplo el PNAG se trata con 0.1-5 M, 0.2-4 M, 0.3-3 M, 0.5-2 M, 0.75-1.5 M o 1 M de NaOH, KOH o NH₄OH. El tratamiento es durante al menos 10 o 30 minutos, o 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 o 20 horas a una temperatura de 20-100, 25-80, 30-60 o 30-50 o 35-45 °C. El dPNAG
20 se puede preparar como se describe en WO 04/43405

El o los polisacáridos incluidos en la composición inmunogénica de la invención preferiblemente están conjugados con una proteína portadora como se describe más adelante o de manera alternativa, no están conjugados.

25 **Polisacáridos tipo 5 y tipo 8 de *S. aureus***

La mayoría de las cepas de *S. aureus* que ocasionan infección en el hombre contienen polisacáridos de tipo 5 o de tipo 8. Aproximadamente 60% de las cepas humanas son de Tipo 8 y aproximadamente 30% son de Tipo 5. Las estructuras de los antígenos polisacáridos capsulares de tipo 5 y tipo 8 se describen en Moreau *et al*/ Carbohydrate Res. 201 ; 285 (1990) y Fournier *et al*/ Infect Immun 45; 87 (1984). Ambas tienen FucNAc en su unidad de repetición, así como también ManNAcA, lo que puede usarse para introducir un grupo sulfhidrilo. Se informó que las estructuras son como sigue:

10 Tipo 5
 →4)-β-D-ManNAcA(3OAc)-(1→4)-α-L-FucNAc(1→3)-β-D-FucNAc-
 (1 →

 Tipo 8
 →3)-β-D-ManNAcA(4OAc)-(1→3)-α-L-FucNAc(1→3)-β-D-FucNAc-
 15 (1 →

Recientemente (Jones Carbohydrate Research 340, 1097-1106 (2005)) la espectroscopia con NMR produjo una revisión de las estructuras así:

 Tipo 5
 20 →4)-β-D-ManNAcA-(1→4)-α-L-FucNAc(3OAc)-(1→3)-β-D-FucNAc-
 (1 →
 Tipo 8
 →3)-β-D-ManNAcA(4OAc)-(1→3)-α-L-FucNAc(1→3)-α-D-FucNAc(1
 →

25 Los polisacáridos pueden ser extraídos de la cepa apropiada de *S.*

aureus usando métodos que son familiares para el conocedor de la materia, por ejemplo como se describe en US6294177. Por ejemplo, ATCC 12902 es una cepa de *S. aureus* Tipo 5 y ATCC 12605 es una cepa de *S. aureus* Tipo 8

5 Los polisacáridos son de tamaño natural, o de manera alternativa, pueden ser dimensionados, por ejemplo mediante micro fluidización, irradiación ultrasónica o mediante tratamiento químico. La invención también cubre oligosacáridos provenientes de los polisacáridos tipo 5 y tipo 8 de *S. aureus*.

10 Los polisacáridos tipo 5 y tipo 8 incluidos en la composición inmunogénica de la invención preferiblemente están conjugados con una proteína portadora como se describe más adelante o de manera alternativa, no están conjugados

Las composiciones inmunogénicas de la invención de manera
15 alternativa, contiene polisacárido de tipo 5 o de tipo 8.

Antígeno 336 de *S. aureus*

En una modalidad, la composición inmunogénica de la invención contiene el antígeno 336 de *S. aureus* que se describe en US 6294177.

El antígeno 336 contiene hexosamina β -ligada, no contiene grupos
20 O-acetilo y específicamente se enlazan a anticuerpos para *S. aureus* Tipo 336 depositados bajo ATCC 55804

En una modalidad, el antígeno 336 es un polisacárido que es de tamaño natural o de manera alternativa, puede ser dimensionado, por ejemplo mediante micro fluidización, irradiación ultrasónica o mediante
25 tratamiento químico. La invención también cubre oligosacáridos

provenientes del antígeno 336

El antígeno 336, cuando se incluye en la composición inmunogénica de la invención, preferiblemente está conjugado con una proteína portadora como se describe más adelante, o de manera alternativa, no están conjugados

Polisacáridos de tipo I, II y III de *S. epidermidis*.

Las cepas ATCC-31432, SE-360 y SE-10 de *S. epidermidis*, son características de tres tipos capsulares diferentes, I, II y III respectivamente (Ichiman y Yoshida 1981, J Appl. Bacteriol 51; 229)

10 Los polisacáridos capsulares extraídos de cada serotipo de *S. epidermidis* constituyen polisacáridos de Tipo I, II y III. Los polisacáridos se pueden extraer mediante varios métodos, incluyendo el método que se describe en US4197290 o como se describe en Ichiman et al 1991, J. Appl. Bacteriol. 71 : 176

15 En una modalidad de la invención, la composición inmunogénica contiene polisacáridos u oligosacáridos de tipo I y/o II y/o III de *S. epidermidis*.

Los polisacáridos son de tamaño natural o de manera alternativa, pueden ser dimensionados, por ejemplo mediante micro fluidización, irradiación ultrasónica o escisión química La invención también cubre

20 oligosacáridos extraídos de cepas de *S. epidermidis*.

Estos polisacáridos no están conjugados, o preferiblemente están conjugados como se describe más adelante.

Conjugación de polisacáridos

25 Entre los problemas asociados con el uso de polisacáridos en

vacunación, el hecho es que los polisacáridos *per se* son inmunogénicos deficientes. Las estrategias que se han diseñado para superar esta falta de inmunogenicidad, incluyen en enlace del polisacárido a proteínas portadoras grandes, que proporcionan ayuda de células T presenciales. Se prefiere que los polisacáridos utilizados en la invención estén ligados con una proteína portadora que proporcione ayuda de células T presenciales. Los ejemplos de estos portadores que pueden ser conjugados con inmunogénicos polisacáridos u oligosacáridos incluyen los toxoides de Difteria y Tétano (DT, DT 5 Crm197 y TT), Hemocianina de lapa californiana (KLH), y el derivado de proteína purificado de Tuberculina (PPD), proteína D de *Haemophilus influenzae*, neumolisina o fragmentos de cualquiera de los anteriores. Los fragmentos apropiados para su uso incluyen fragmentos que contienen epítopos de células T auxiliares. En particular, el fragmento 10 de proteína D preferiblemente contendrá el terminal N 1/3 de la proteína. La proteína D es una proteína de enlace con IgD de *Haemophilus influenzae* (EP 0 594 610 B1) y es un inmunogénico potencial.

Además, las proteínas estafilocócicas se pueden usar como proteína portadora en los conjugados polisacáridos de la invención. Las proteínas estafilocócicas descritas más adelante pueden usarse 20 como proteína portadora, por ejemplo, receptor de laminina, proteína de enlace de SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npasa, IsaA/PisA, SsaA, 25 EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de enlace de fibronectina,

proteína de enlace de fibrinógeno, coagulasa, Fig, MAP, transportador ABC inmunodominante, IsdA, IsdB, transportador Mg2+, SitC, toxina alfa transportadora ABC Ni (Hla), mutante H35R de toxina alfa, proteína activadora de ARN III (RAP), o fragmentos de
5 ellas

Una nueva proteína que podría ser particularmente ventajosa pasa su uso en el contexto de una vacuna estafilocócica es el toxoide alfa estafilocócico La forma natural puede ser conjugada con un polisacárido, dado que el proceso de conjugación reduce la
10 toxicidad Preferiblemente se usa una toxina alfa desintoxicada genéticamente, tal como las variantes His35Leu o His 35 Arg como portadores, dado que la toxicidad residual es menor De manera alternativa, la toxina alfa es desintoxicada químicamente mediante tratamiento con un reactivo reticulante, formaldehído o
15 glutaraldehído Una toxina alfa desintoxicada genéticamente es desintoxicada químicamente de manera opcional, preferiblemente mediante tratamiento con un reactivo reticulante, formaldehído o glutaraldehído para reducir aún más la toxicidad

Los polisacáridos pueden ser ligados a la proteína o proteínas
20 portadoras mediante cualquier método conocido (por ejemplo, mediante Likhite, patente estadounidense número 4,372,945 de Armor *et al.*, patente estadounidense número 4,474,757, y Jennings *et al.*, patente estadounidense número 4,356,170). Preferiblemente se lleva a cabo la química de conjugación CDAP (véase WO95/08348)

25 En la CDAP, el reactivo cianilante tetrafluoroborato de 1-ciano-

dimetilaminopiridinio (CDAP) preferiblemente se usa para la síntesis de conjugados de polisacárido-proteína. La reacción de cianilación puede realizarse bajo condiciones relativamente suaves, lo que permite la hidrólisis de los polisacáridos sensibles a la alcalinidad. Esta síntesis
5 permite acoplamiento directo con una proteína portadora.

El polisacárido es solubilizado en agua o en una solución salina. El CDAP se disuelve en acetonitrilo y se añade inmediatamente a la solución de polisacárido. El CDAP reacciona con los grupos hidroxilo del polisacárido para formar un éster de cianato. Después del paso de
10 activación, se añade la proteína portadora. Los grupos amino de la lisina reaccionan con el polisacárido activado para formar un enlace covalente isourea. Después de la reacción de acoplamiento, se le añade un gran excedente de glicina para extinguir los grupos funcionales residuales activados. Luego se hace pasar el producto a
15 través de una columna de permeación de gel para eliminar la proteína portadora y los reactivos residuales que no reaccionaron.

La conjugación preferiblemente involucra producir un enlace directo entre la proteína portadora y el polisacárido. Opcionalmente, se puede introducir un separador (tal como dihidruro adípico (ADH))
20 entre la proteína portadora y el polisacárido.

Protección contra *S. aureus* y *S. epidermidis*

En una modalidad preferida de la invención, la composición inmunogénica proporciona una respuesta inmunitaria efectiva contra más de una cepa de estafilococos, preferiblemente contra cepas tanto
25 de *S. aureus* como de *S. epidermidis*. Más preferiblemente, se genera

una respuesta inmunitaria protectora contra los serotipos de tipo 5 y 8 de *S. aureus*. Más preferiblemente, se genera una respuesta inmunitaria contra múltiples cepas de *S. epidermidis*, por ejemplo de cepas de al menos dos serotipos I, II y III de *S. epidermidis*

5 Un uso de la composición inmunogénica de la invención es prevenir infecciones nosocomiales, por ejemplo en pacientes de cirugía electiva, mediante inoculación antes del tratamiento en el hospital. En esta etapa, es difícil predecir con exactitud a cuáles cepas estafilocócicas estará expuesto el paciente. Por lo tanto, es ventajoso
10 inocularlo con una vacuna que sea capaz de generar una respuesta inmunitaria efectiva contra diversas cepas de estafilococos.

 Una respuesta inmunitaria efectiva se define como una respuesta inmunitaria que da protección significativa en un modelo de exposición con ratón o en un análisis de opsonofagocitosis como se describe en los
15 ejemplos. La protección significativa en un modelo de exposición con ratón, por ejemplo la del ejemplo 5, se define como un aumento en la LD50 en comparación con ratones inoculados con portador de al menos 10%, 20%, 50%, 100% o 200%. La protección significativa en un modelo de exposición con rata del algodón, por ejemplo la del ejemplo 8, se
20 define como una disminución en la media Log de CFU/nariz observada de al menos 10%, 20%, 50%, 70% o 90%. Se sabe que la presencia de anticuerpos opsonizantes está correlacionada con la protección, por lo tanto está indicada una protección significativa por una disminución de al menos 10%, 20%, 50%, 70% o 90% en un análisis de
25 opsonofagocitosis, por ejemplo el del ejemplo 7

Varias de las proteínas que incluyen el transportador inmunodominante ABC, proteína activadora de ARN II, receptores de laminina, SitC, IsaA/PisA, SsaA, EbhA/EbhB, EbpS y Aap están bien conservados entre *S. aureus* y *S. epidermidis*, y el ejemplo 8 muestra
5 que IsaA, ClfA, IsdB, SdrG, HarA, FnbpA y Sbi pueden generar una respuesta inmunitaria de reacción cruzada (por ejemplo reacción cruzada entre al menos una cepa de *S. aureus* y al menos una cepa de *S. epidermidis*). La PIA también es bien conservada entre *S. aureus* y *S. epidermidis*, y es capaz de inducir una respuesta inmunológica
10 protectora cruzada

Por lo tanto, en una modalidad preferida, la composición inmunogénica de la invención contendrá dos, tres o cuatro de las proteínas anteriores, preferiblemente contendrá además PIA (PNAG)

Vacunas de polinucleótidos

15 En un aspecto adicional la presente invención se refiere al uso de los polinucleótidos de la Figura 2 para el tratamiento, prevención o diagnóstico de infección por estafilococos. Estos polinucleótidos incluyen polinucleótidos aislados que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos 70 % de
20 identidad, preferiblemente al menos 80 % de identidad, más preferiblemente al menos 90 % de identidad, todavía más preferiblemente al menos 95 % de identidad, con la secuencia de aminoácidos de la Figura 1, en la longitud completa de la secuencia. Con respecto a esto, los polipeptidos que tienen al menos 97 % de
25 identidad son altamente preferidos, mientras que los que tienen al

menos 98-99 % de identidad se prefieren más, y los que tienen al menos 99 % de identidad son los más altamente preferidos

Otros polinucleótidos que encuentran utilidad en la presente invención, incluyen polinucleótidos aislados que contienen una
5 secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70 % de identidad, preferiblemente al menos 80 % de identidad, más preferiblemente al menos 90 % de identidad, todavía más preferiblemente al menos 95 % de identidad, con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la invención en la región codificadora completa. Con
10 respecto a esto, los polinucleótidos que tienen al menos 97 % de identidad se prefieren altamente, mientras que los que tienen al menos 98-99 % de identidad se prefieren aún más, y los que tienen al menos 99 % de identidad son los más altamente preferidos

Otros polinucleótidos incluyen polinucleótidos aislados que
15 contienen una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70 % de identidad, preferiblemente al menos 80 % de identidad, más preferiblemente al menos 90 % de identidad, todavía más preferiblemente al menos 95 % de identidad, con las secuencias de la figura 1. Con respecto a esto, los polinucleótidos que tienen al
20 menos 97 % de identidad son altamente preferidos, mientras que los que tienen al menos 98-99 % de identidad se prefieren más, y los que tienen al menos 99 % de identidad son los más altamente preferidos. Dicho polinucleótido puede ser insertado en un plásmido apropiado o en un vector de microorganismo recombinante, y se usan
25 para inmunización (véase por ejemplo Wolff et al., Science

247 1465-1468 (1990), Corr et al, J Exp Med 184 1555-1560
(1996), Doe et al, Proc. Natl. Acad Sci 93 8578-8583 (1996))

La presente invención también proporciona un ácido nucleico
que codifica las proteínas antes mencionadas de la presente
5 invención, y su uso en medicina. En una modalidad preferida, los
polinucleótidos aislados de acuerdo con la invención pueden ser
monocatenarios (codificadores o inversos), o bicatenarias, y pueden
ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o moléculas de
ARN. Otras secuencias codificadoras o no codificadoras pueden
10 estar presentes, pero no es necesario que lo estén, dentro de un
polinucleótido de la presente invención. En otras modalidades
relacionadas, la presente invención proporciona variantes de
polinucleótidos que tienen identidad sustancial con las secuencias
descritas aquí en la figura 2, estas contienen al menos 70% de
15 identidad de secuencia, preferiblemente al menos 75%, 80%, 85%,
90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% o mayor identidad de secuencia
comparada con una secuencia de polinucleótidos de esta invención
usando los métodos descritos aquí (por ejemplo análisis BLAST
usando parámetros estándar). En una modalidad relacionada, el
20 polinucleótido aislado de la invención contendrá una secuencia de
nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos 90%,
preferiblemente 95% y más, identidad con la secuencia de
aminoácidos de la figura 1, en toda la longitud de una secuencia de
figura 1, o una secuencia de nucleótidos complementaria a dicho
25 polinucleótido aislado.

142

La invención también contempla el uso de polinucleótidos que son complementarios a todos los polinucleótidos descritos anteriormente

La invención también provee el uso de un fragmento de un
5 polinucleótido de la invención que cuando se administra a un sujeto tiene las mismas propiedades inmunogénicas que un polinucleótido de la figura 1

La invención también proporciona el uso de un polinucleótido que codifica un fragmento inmunológico de una proteína de la figura
10 1 tal como se definió anteriormente. También se contempla el uso de estos fragmentos que tienen un nivel de actividad inmunogénica de al menos aproximadamente 50%, preferiblemente al menos aproximadamente 70% y más preferiblemente aproximadamente 90% del nivel de actividad de inmunogenicidad de una secuencia de
15 polipéptidos codificada por una secuencia de nucleótidos que se presenta en la figura 2

Los fragmentos de polipéptidos para su uso de acuerdo con la invención preferiblemente contienen al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 50, o 100 aminoácidos contiguos o más, incluyendo
20 todas las longitudes intermedias, de una composición de polipéptidos que se presenta aquí, tales como los que se exponen anteriormente

Los polinucleótidos para su uso en la invención pueden obtenerse usando técnicas de clonación y detección estándar, de una biblioteca de ADNc derivado de ARNm en células de tejido
25 humano preneoplásico o tumoral (pulmón, por ejemplo), (por ejemplo

143

Sambrook *et al* , *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2ª Ed , Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N Y (1989)) Los polinucleótidos de la invención también se pueden obtener de fuentes naturales, tales como bibliotecas de ADN genómico, o pueden ser sintetizados usando técnicas bien conocidas y disponibles comercialmente

Hay varios métodos disponibles y que son familiares para los conocedores de la materia, para obtener ADNc de longitud completa, o para extender ADNc cortos , por ejemplo los que se basan en el método de amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE) (véase, por ejemplo, Frohman *et al* , PNAS USA 85, 8998-9002, 1988) Recientes modificaciones de la técnica, ejemplificadas por la tecnología Marathon™ (Clontech Laboratories Inc) por ejemplo, han simplificado significativamente la búsqueda de ADNc más largos En la tecnología Marathon™ los ADNc han sido preparados a partir de ARNm extraído de un tejido escogido y una secuencia "adaptadora" ligada en cada extremo La amplificación de ácido nucleico (PCR) se lleva a cabo luego para amplificar el extremo 5 "ausente" del ADNc usando una combinación de sensibilizadores oligonucleótidos específicos para adaptador y específicos para gen. La reacción PCR se repite luego usando sensibilizadores "anidados", esto es, sensibilizadores diseñados para aparearse dentro del producto amplificado (típicamente un sensibilizador específico para adaptador que aparea otro 3' en la secuencia del adaptador y un sensibilizador específico para el gen que aparea otro 5' en la secuencia genética

conocida) Los productos de esta reacción pueden ser analizados luego mediante secuenciación de ADN y un ADNc de longitud completa construido ya sea uniendo el producto directamente al ADNc existente para darle una secuencia completa, o llevando a
5 cabo una PCR de longitud completa por separado usando la nueva información de secuencia para el diseño del sensibilizador 5'.

Los vectores que contienen este ADN, los anfitriones transformados de esta manera y las proteínas truncada o híbridas por sí solas, expresados o descritos aquí más adelante, forman todos
10 parte de la invención

El sistema de expresión también puede ser un microorganismo vivo recombinante, tal como un virus o bacteria El gen de interés puede ser insertado en el genoma de un virus o bacteria recombinante vivo La inoculación y la infección in vivo con este
15 vector vivo conducirá a la expresión *in vivo* del antígeno y a la inducción de respuestas inmunitarias

Por lo tanto, en ciertas modalidades, los polinucleótidos que codifican polipéptidos inmunogénicos para su uso de acuerdo con la presente invención, se introducen en células apropiadas de anfitrión
20 mamífero para su expresión usando cualquiera de una cantidad de sistemas basados en virus conocidos En una modalidad ilustrativa, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente y efectiva para los sistemas de suministro genéticos Una secuencia de nucleótido seleccionada que codifica un polipéptido para su uso en la
25 presente invención puede ser insertada en un vector y empaquetada

145

en partículas retro virales usando técnicas conocidas en la materia
 El virus recombinante puede ser aislado entonces y suministrado a
 un sujeto Una cantidad de sistemas retro virales ilustrativos han
 sido descritos (por ejemplo, en la patente estadounidense número
 5 5,219,740, Miller y Rosman (1989) *BioTechniques* 7 980-990, Miller,
 A D (1990) *Human Gene Therapy* 1 :5-14, Scarpa *et al* (1991)
Virology 180.849-852; Burns *et al* (1993) *Proc Natl Acad Sci USA*
 90 8033-8037, y en Boris-Lawrie y Temin (1993) *Cur Opin Genet*
Develop. 3 102-109)

10 Además, se ha descrito también una cantidad de sistemas
 ilustrativos basados en adenovirus A diferencia de los retrovirus,
 que se integran en el genoma anfitrión, los adenovirus persisten
 extra cromosómicamente, reduciendo así al mínimo los riesgos
 asociados con la mutagénesis insercional (Haj-Ahmad y Graham
 15 (1986) *J Virol* 57.267-274, Belt *et al* (1993) *J Virol.* 67 5911- 5921,
 Mittereder *et al* (1994) *Human Gene Therapy* 5.717-729, Seth *et al*
 (1994) *J Virol* 68.933-940, Barr *et al.* (1994) *Gene Therapy* 1 51-
 58, Berkner, K. L. (1988) *BioTechniques* 6.616-629; y Rich *et al*
 (1993) *Human Gene Therapy* 4 461-476)

20 También se han desarrollado diversos sistemas con vectores
 virales adeno-asociados (AAV) para el suministro de polinucleótidos.
 Los vectores AAV pueden ser contruidos fácilmente usando técnicas
 bien conocidas en la materia Véase, por ejemplo, las patentes
 estadounidenses números 5,173,414 y 5,139,941, las publicaciones
 25 internacionales números WO 92/01070 y WO 93/03769, Lebkowski *et*

et al (1988) *Molec. Cell Biol* 8:3988-3996, Vincent *et al* (1990) *Vaccines* 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B J (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3 533-539, Muzyczka, N (1992) *Current Topics in Microbiol, and Immunol* 158 97-129, Kotin, R M (1994) *Human Gene Therapy* 5 793-801, Shelling y Smith (1994) *Gene Therapy* 1 165-169, and Zhou *et al* (1994) *J Exp Med* 179:1867-1875

Otros vectores virales adicionales útiles para suministrar las moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos para su uso en la presente invención mediante transferencia genética incluyen los derivados de la familia de virus de viruela, tales como el virus de vaccinia y el virus de la viruela aviar. A manera de ejemplo, los virus de vaccinia recombinantes que expresan las moléculas de interés pueden ser contruidos como sigue El ADN que codifica un polipéptido se inserta primero en un vector apropiado, de tal forma que esa adyacente a un promotor de vaccinia y que flanquee las secuencias de ADN de vaccinia, tales como la secuencia que codifica la timidina quinasa (TK) Este vector se usa luego para transfectar células que son infectadas simultáneamente con vaccinia La recombinação homóloga sirve para insertar el promotor de vaccinia mas el gen que codifica el polipéptido de interés en el genoma viral. La TK. sup (-) recombinante puede ser seleccionada cultivando las células en la presencia de 5-bromodesoxiuridina y escogiendo placas virales resistentes a ellas

Un sistema de infección/transfección basado en vaccinia puede

usarse convenientemente para proporcionar expresión o coexpresión transitoria inducible, de uno o más polipéptidos descritos aquí en las células anfitrionas de un organismo. En este sistema en particular, las células se infectan primero in vitro con un virus de vaccinia recombinante que codifica el bacteriófago T7 ARN polimerasa. Esta polimerasa muestra una especificidad exquisita en la que solamente transcribe plantillas portadoras de promotores T7. Después de la infección, las células son transfectadas con el polinucleótido o polinucleótidos de interés, dirigidas por un promotor T7. La polimerasa expresada en el citoplasma del virus recombinante de vaccinia transcribe el ADN transfectado en ARN, el cual es traducido luego en el polipéptido mediante la maquinaria traduccional del anfitrión. El método proporciona la producción citoplásmica transitoria, de alto nivel, de grandes cantidades de ARN y sus productos de traducción. Véase, por ejemplo, Elroy-Stein y Moss, Proc Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:6743-6747, Fuerst *et al* Proc Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:8122-8126.

Alternativamente, los virus de viruela aviar, tales como los virus de difteroviruela aviar y virus de la viruela del canario, se pueden usar también para suministrar las secuencias codificadoras de interés. Se sabe que los virus de viruela aviar recombinante, que expresan inmunogénicos de patógenos mamíferos, confieren inmunidad protectora cuando se administran a especies no aviares. El uso del vector de viruela aviar es particularmente deseable en especies humana y de otros mamíferos, dado que los miembros del

género de la viruela aviar solamente pueden replicarse productivamente en especies aviares susceptibles, y por lo tanto no son inefectivos en las células de mamífero. Los métodos para producir virus de viruela aviar recombinante son conocidos en la técnica, y emplean recombinación genética, tal como se describió anteriormente con respecto a la producción de virus de vaccinia. Véase, por ejemplo, WO 91/12882, WO 89/03429; y WO 92/03545.

Cualquiera de una cantidad de vectores de virus alfa puede usarse para el suministro de composiciones de polinucleótidos para su uso en la presente invención, tales como los vectores que se describen en las patentes estadounidenses números 5,843,723, 6,015,686, 6,008,035 y 6,015,694. Ciertos vectores basados en la encefalitis equina venezolana (VEE) también se pueden usar, ejemplos ilustrativos de los cuales se pueden encontrar en las patentes estadounidenses números 5,505,947 y 5,643,576.

Más aún, los vectores conjugados moleculares, tales como los vectores quiméricos de adenovirus descritos en Michael *et al* J Biol Chem (1993) 268 6866-6869 y en Wagner *et al* Proc. Natl Acad Sci USA (1992) 89:6099-6103, también se pueden usar para el suministro genético bajo la invención.

Se puede encontrar información ilustrativa adicional en estos y en otros sistemas de suministro basados en virus, por ejemplo, en Fisher-Hoch *et al* , Proc Natl Acad Sci USA 86 317-321, 1989, Flexner *et al* , Ann N.Y Acad Sci 569:86-103, 1989; Flexner *et al* , Vaccine 8 17-21, 1990, patentes estadounidenses números

4,603,112, 4,769,330, y 5,017,487, WO 89/01973, patente
estadounidense número 4,777,127, GB 2,200,651, EP 0,345,242, WO
91/02805, Berkner, Biotechniques 6 616-627, 1988, Rosenfeld *et al* ,
Science 252 431-434, 1991, Kolls *et al* , Proc Natl Acad Sci USA
5 91-215-219, 1994, Kass-Eisler *et al* , Proc Natl Acad Sci USA
90 11498-11502, 1993, Guzman *et al* , Circulation 88 2838-2848,
1993, y Guzman *et al* , Cir Res 73 1202-1207, 1993

Los microorganismos vivos recombinantes descritos
anteriormente, pueden ser virulentos, o pueden estar atenuados de
10 varias maneras con el fin de obtener vacunas vivas. Estas vacunas
vivas también forman parte de la invención.

En ciertas modalidades, un polinucleótido puede estar
integrado en el genoma de una célula objetivo. Esta integración
puede ser en la ubicación y orientación específica por medio de
15 recombinación homóloga (reemplazo genético) o puede estar
integradas en una ubicación aleatoria, no específica (aumento
genético). En todavía otras modalidades, el polinucleótido puede ser
mantenido establemente en la célula como un segmento episómico
de ADN. Estos segmentos de polinucleótidos o "episomas" codifican
20 secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y replicación
independiente o en sincronización con el ciclo de la célula anfitriona.
La manera en la cual se suministra la construcción de expresión a
una célula y en donde en la célula el polinucleótido permanece, es
dependiente del tipo de construcción de expresión empleado.

25 En otra modalidad de la invención, un polinucleótido se

administra/suministra como ADN "desnudo", por ejemplo como se describe en Ulmer *et al* , Science 259 1745-1749, 1993 y revisado por Cohen, Science 259 1691-1692, 1993 La absorción del ADN desnudo puede ser aumentada recubriendo el ADN sobre perlas biodegradables, que son transportadas eficientemente en las células

En todavía otra modalidad, una composición de la presente invención puede ser suministrada por medio de un enfoque de bombardeo de partículas, muchos de los cuales han sido descritos en un ejemplo ilustrativo, la aceleración de partículas accionada por gas puede lograrse con dispositivos tales como los fabricados por Powderjet Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK) y Powderjet Vaccines Inc (Madison, WI), algunos ejemplos de los cuales están descritos en las patentes estadounidenses números 5,846,796, 6,010,478, 5,865,796, 5,584,807; y en la patente EP número 0500 799. Este enfoque ofrece un enfoque de suministro libre de aguja, en donde una formulación en polvo seco de partículas microscópicas, tales como partículas de polinucleótidos o de polipéptidos, es acelerada a alta velocidad dentro de un chorro de gas helio generado por un dispositivo de mano, propulsando las partículas en un tejido objetivo de interés

En una modalidad relacionada, otros dispositivos y métodos que pueden ser útiles para inyección sin aguja accionada por gas, de las composiciones de la presente invención, incluyen los proporcionados por Bioject, Inc. (Portland, OR), algunos ejemplos de los cuales están descritos en las patentes estadounidenses números

4,790,824, 5,064,413; 5,312,335; 5,383,851 , 5,399,163, 5,520,639 y
5,993,412

Vacunas

En una modalidad preferida, la composición inmunogénica de la
5 invención está mezclada con un excipiente aceptable para uso
farmacéutico, más preferiblemente con un adyuvante, para formar una
vacuna

Las vacunas de la presente invención preferiblemente están
auxiliadas Los adyuvantes apropiados incluyen una sal de aluminio tal
10 como gel de hidróxido de aluminio (alum) o fosfato de aluminio, pero
también pueden ser una sal de calcio, magnesio, hierro o zinc, o pueden
ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o de azúcares
acilados, polisacáridos catiónica o aniónicamente producidos, o
polifosfazenos.

15 Se prefiere que el adyuvante sea seleccionado para que sea un
inductor preferencial de un tipo de respuesta TH1 o TH2. Los altos
niveles de citocinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de
respuestas inmunitarias mediadas por células para un antígeno dado,
mientras que los altos niveles de citocinas de tipo Th2 tienden a
20 favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales al
antígeno.

Es importante recordar que la distinción de la respuesta
inmunitaria de tipo Th1 y de tipo Th2 no es absoluta. En realidad, un
individuo admitirá una respuesta inmunitaria que se describe como
25 predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, con

frecuencia es conveniente considerar las familias de citocinas en términos de lo que se describe en clones de células T CD4 +ve por Mosmann y Coffman (Mosmann, T.R. y Coffman, R L (1989) *TH1 y TH2 Cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology*, 7, p 145-173)

Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 están asociadas con la producción de citocinas INF- γ e IL-2 por los linfocitos T. Otras citocinas con frecuencia asociadas directamente con la inducción de las respuestas inmunitarias de tipo Th1 no son producidas por las células T, tal como la IL-12. En contraste, las respuestas de tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Los sistemas adyuvantes que promueven una respuesta predominantemente Th1 incluyen: lípido A monofosforilado o un derivado de él, particularmente lípido A monofosforilado 3-des-O-acilado (3D-MPL) (para su preparación, véase GB 2220211 A), y una combinación de lípido A monofosforilado, preferiblemente lípido A monofosforilado 3-des-O-acilado, junto con cualquier sal de aluminio (por ejemplo, fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) o una emulsión de aceite en agua. En estas combinaciones, el antígeno y el 3D-MPL están contenidos en las mismas estructuras en partículas, lo que permite un suministro más eficiente de señales antigénicas e inmunoestimuladoras. Los estudios han demostrado que el 3D-MPL es capaz de mejorar más la inmunogenicidad de un antígeno adsorbido por el alum [Thoelen et al. *Vaccine* (1998) 16:708-14; EP 689454-B1]

Un sistema mejorado implica la combinación de un lípido A

monofosforilado y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y el 3D-MPL según se describe en WO 94/00153, o una composición menos reactogena en donde la QS21 es extinguida con colesterol según se describe en WO 96/33739. Una formulación adyuvante particularmente potente que involucra QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua está descrita en WO 95/17210, y es una formulación preferida. Preferiblemente la vacuna contiene adicionalmente una saponina, más preferiblemente QS21. La formulación también puede contener una emulsión de aceite en agua y tocoferol (WO 95/17210). La presente invención también proporciona un método para producir una formulación para vacuna que comprende mezclar una proteína de la presente invención junto con un excipiente aceptable para uso farmacéutico, tal como 3D-MPL. Las CpG no metiladas que contienen oligonucleótidos (WO 96/02555) también son inductores preferenciales de una respuesta TH 1 y son apropiadas para su uso en la presente invención.

Las composiciones preferidas de la invención son las que forman una estructura de liposoma. Las composiciones en donde la fracción esterol/saponina activa inmunológicamente forma una estructura ISCOM también forman un aspecto de la invención.

La proporción de QS21:esterol típicamente estará en el orden de 1:100 hasta 1:1 peso por peso. Preferiblemente está presente un exceso de esterol, la proporción de QS21:esterol es de al menos 1:2 p/p. Típicamente para la administración a seres humanos, QS21 y el esterol estarán presentes en una vacuna en el rango desde aproximadamente 1

µg hasta aproximadamente 100 µg, preferiblemente desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 50 µg por dosis

Los liposomas preferiblemente contienen un lípido neutro, por ejemplo fosfatidilcolina, que preferiblemente es no cristalina a temperatura ambiente, por ejemplo fosfatidilcolina de yema de huevo, dioleoil fosfatidilcolina o dilauril fosfatidilcolina. Los liposomas también pueden contener un lípido cargado que aumente la estabilidad de la estructura liposoma-QS21 para los liposomas compuestos de lípidos saturados. En estos casos, la cantidad de lípido cargado preferiblemente es de 1-20% p/p, mucho más preferiblemente 5-10%. La proporción de esteroles con respecto a fosfolípido es de 1-50% (mol/mol), mucho más preferiblemente 20-25%.

Preferiblemente las composiciones de la invención contienen MPL (lípidos A monofosforilados 3-desacilados), también conocido como 3D-MPL. El 3D-MPL se conoce a partir de GB 2 220 211 (Ribi) como una mezcla de 3 tipos de lípidos A monofosforilados des-O-acilados con 4, 5 o 6 cadenas aciladas, y es fabricado por Ribi Immunochem, Montana. Una forma preferida se describe en la solicitud de patente internacional 92/116556.

Las composiciones apropiadas de la invención son aquellas en donde los liposomas son preparados inicialmente sin MPL, y luego se les añade el MPL, preferiblemente como partículas de 100 nm. El MPL por lo tanto no está contenido en la membrana de la vesícula (conocidas como MPL fuera). Las composiciones en donde el MPL está contenido dentro de la membrana de la vesícula (conocidas como MPL dentro)

también forman un aspecto de la invención. El antígeno puede estar contenido dentro de la membrana de la vesícula o contenido fuera de la membrana de la vesícula. Preferiblemente los antígenos solubles están fuera y los antígenos hidrofóbicos o lipídicos están contenidos ya sea dentro o fuera de la membrana.

Las preparaciones para vacuna de la presente invención pueden usarse para proteger o para tratar un mamífero susceptible de infección, por medio de la administración de dicha vacuna por ruta sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección por las vías intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea; o por medio de administración mucosa a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. La administración intranasal de vacunas para el tratamiento de neumonía o de otitis media se prefiere (dado que el acarreo nasofaríngeo de neumococos puede ser prevenido más efectivamente, atenuando así la infección en su etapa más temprana). Si bien la vacuna de la invención puede ser administrada como una sola dosis, los componentes de ella pueden ser co-administrados también juntos en el mismo momento o en diferentes momentos (por ejemplo se puede administrar polisacáridos neumocócicos por separado, al mismo tiempo, o 1-2 semanas después de la administración de cualquier componente de proteína bacteriana de la vacuna para la coordinación óptima de las respuestas inmunitarias una con respecto a la otra). Para su co-administración, el adyuvante opcional Th1 puede estar presente en cualquiera o en todas las diferentes administraciones, sin embargo se prefiere si éste está presente en combinación con el componente de

proteína bacterial de la vacuna. Además para una sola ruta de administración, se puede usar dos diferentes rutas de administración. Por ejemplo, se puede administrar polisacáridos IM (o ID) y proteínas bacterianas se pueden administrar IN (o ID). Además, las vacunas de la invención se pueden administrar IM para dosis de sensibilización e IN para dosis de refuerzo.

La cantidad de antígeno conjugado en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios en vacunas típicas. Esta cantidad variará dependiendo de cuál inmunogénico específico se emplee y de cómo esté presentado. Generalmente, se espera que cada dosis contendrá 0.1-100 µg de polisacárido, preferiblemente 0.1-50 µg para conjugados de polisacárido, preferiblemente 0.1-10 µg, más preferiblemente 1-10 µg, de los cuales 1 hasta 5 µg es un rango más preferible.

El contenido de antígenos de proteína en la vacuna típicamente estará en el rango de 1-100 µg, preferiblemente 5-50 µg, mucho más típicamente en el rango de 5 – 25 µg. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas adecuadamente.

La preparación de vacuna está descrita en general en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). La encapsulación dentro de liposomas está descrita por Fullerton, patente estadounidense número 4,235,877.

Las vacunas de la presente invención pueden ser almacenadas en solución o liofilizadas. Preferiblemente la solución es liofilizada en la presencia de un azúcar tal como sacarosa, trehalosa o lactosa. Es todavía preferible además que estén liofilizadas y sean reconstituidas extemporáneamente antes de su uso. La liofilización puede dar como resultado una composición más estable (vacuna) y puede conducir posiblemente a títulos de anticuerpo más altos en la presencia de 3D-MPL y en la ausencia de un adyuvante basado en aluminio.

Anticuerpos e inmunización pasiva

Otro aspecto de la invención es un método para preparar una inmunoglobulina para su uso en la prevención o tratamiento de infección estafilocócica, que comprende los pasos de inmunizar a un receptor con la vacuna de la invención y aislar la inmunoglobulina del receptor. Una inmunoglobulina preparada mediante este método es un aspecto adicional de la invención. Una composición farmacéutica que contiene la inmunoglobulina de la invención y un portador aceptable para uso farmacéutico, es un aspecto adicional de la invención que puede usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedad estafilocócica. Un método para el tratamiento o prevención de infección estafilocócica que comprende un paso de administrar a un paciente una cantidad efectiva de la preparación farmacéutica de la invención, es un aspecto adicional de la invención.

Los inóculos para la producción de anticuerpo policlonal se preparan típicamente dispersando la composición de antígenos en un diluyente tolerable fisiológicamente, tal como salina u otros adyuvantes.

apropiados para uso humano, para formar una composición acuosa. Una cantidad de inóculo inmunoestimulante se administra a un mamífero, y el mamífero inoculado se mantiene luego durante un tiempo suficiente para que la composición antigénica induzca anticuerpos protectores.

5 Los anticuerpos se pueden aislar en la extensión deseada mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía por afinidad (Harlow and Lane Antibodies; a laboratory manual 1988)

Los anticuerpos pueden incluir preparaciones de suero de una variedad de animales usados comúnmente, por ejemplo cabras, 10 primates, burros, cerdos, caballos, cerdos de guinea, ratas o humanos. Se le extrae sangre a los animales y se recuperan los sueros.

Una inmunoglobulina producida de acuerdo con la presente invención pueden incluir anticuerpos completos, fragmentos o sub fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser 15 inmunoglobulinas completas de cualquier clase, por ejemplo IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con especificidad dual para dos o más antígenos de la invención. También pueden ser fragmentos, por ejemplo F(ab')₂, Fab', Fab, Fv y similares, incluyendo fragmentos híbridos. Una inmunoglobulina también incluye 20 proteínas naturales, sintéticas o diseñadas genéticamente, que actúan como un anticuerpo fijándose a antígenos específicos para formar un complejo.

Una vacuna de la presente invención se puede administrar a un receptor que luego actúa como una fuente de inmunoglobulina, 25 producida en respuesta a la exposición de la vacuna específica. Un

sujeto tratado así, podría donar plasma para el cual la globulina hiperinmunitaria podría ser obtenida por medio de metodología convencional de fraccionamiento de plasma. La hiperinmunoglobulina podría ser administrada a otro sujeto con el fin de impartirle resistencia
5 contra infección estafilocócica o tratarla. Las hiperinmunoglobulinas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento o prevención de enfermedad estafilocócica en niños, individuos comprometidos inmunológicamente o cuando se requiere tratamiento y no hay tiempo para que el individuo produzca anticuerpos en respuesta a la
10 vacunación.

Un aspecto adicional de la invención es una composición farmacéutica que contiene dos o más anticuerpos monoclonales (o fragmentos de ellos, preferiblemente humanos o humanizados) reactivos contra al menos dos constituyentes de la composición inmonogénica de
15 la invención, la cual podría ser usada para tratar o para prevenir infección con bacterias Gram positivas, preferiblemente estafilococos, más preferiblemente *S. aureus* o *S. epidermidis*.

Estas composiciones farmacéuticas contienen anticuerpos monoclonales que pueden ser inmunoglobulinas completas de cualquier
20 clase, por ejemplo IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con especificidad para dos o más antígenos de la invención. También pueden ser fragmentos, por ejemplo F(ab')₂, Fab', Fab, Fv y similares, incluyendo fragmentos híbridos

Los métodos para elaborar anticuerpos monoclonales son bien
25 conocidos en la técnica y pueden incluir la fusión de esplenocitos con

X

células de mieloma (Kohler y Milstein 1975 Nature 256; 495, Antibodies - a laboratory manual Harlow y Lane 1988) De manera alternativa, se puede obtener fragmentos monoclonales de Fv examinando una biblioteca que tenga fagos apropiados (Vaughan TJ *et al* 1998 Nature Biotechnology 16; 535). Los anticuerpos monoclonales pueden ser humanizados o parcialmente humanizados mediante métodos conocidos.

Métodos

La invención también comprende métodos para elaborar las composiciones inmunogénicas y vacunas de la invención

10 Un proceso preferido de la invención, es un método para elaborar una vacuna que comprende los pasos de mezclar antígenos para elaborar la composición inmunogénica de la invención y añadir un excipiente aceptable para uso farmacéutico

Métodos de tratamiento

15 La invención también comprende métodos de tratamiento de infección estafilocócica, particularmente infecciones nosocomiales adquiridas en el hospital

Esta composición inmunogénica o vacuna de la invención es particularmente ventajosa de usar en casos de cirugía electiva. Estos
20 pacientes conocerán la fecha de la cirugía con anterioridad, y podrían ser inoculados previamente Dado que no se sabe si el paciente estará expuesto a infección por *S. aureus* o por *S. epidermidis*, se prefiere inocularlo con una vacuna de la invención que lo proteja contra ambos, como se describió aquí anteriormente. Preferiblemente los adultos de
25 más de 16 que están esperando cirugía electiva, se tratan con las

composiciones inmunogénicas y vacunas de la invención

También es ventajoso inocular a los trabajadores de la salud con la vacuna de la invención

Las preparaciones para vacuna de la presente invención pueden
5 usarse para proteger o para tratar a un mamífero susceptible de infección, por medio de la administración de dicha vacuna por vía sistémica o mucosa. Estas administraciones pueden incluir inyección por medio de las rutas intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea, o por medio de administración a los tractos oral/alimentario,
10 respiratorio, genitourinario

La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna se selecciona como una dosis que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en las vacunas típicas. Esta cantidad variará dependiendo de qué inmunogénico específico se
15 emplee y de cómo se presenta. El contenido de proteína de la vacuna típicamente estará en el rango de 1 -100 µg, preferiblemente 5-50 µg, mucho más comúnmente en el rango de 10 - 25 µg. Generalmente, se espera que cada dosis contenga 0.1-100 µg de polisacárido cuando esté presente, preferiblemente 0.1-50 µg, preferiblemente 0.1-10 µg, de
20 los cuales 1 hasta 5 µg es el rango más preferible. Una cantidad óptima para una vacuna en particular, se puede determinar mediante estudios estándar que implican la observación de respuestas inmunitarias apropiadas en sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o más inmunizaciones de refuerzo separadas
25 adecuadamente.

162

Si bien las vacunas de la presente invención se pueden administrar por cualquier ruta, la administración de las vacunas descritas en la piel (ID) forma una modalidad de la presente invención. La piel humana contiene una cutícula exterior "callosa" denominada el stratum corneum, la cual cubre la epidermis. Debajo de esta epidermis está una capa denominada la dermis, la cual a su vez cubre el tejido cutáneo. Los investigadores han demostrado que la inyección de una vacuna en la piel, y en particular en la dermis, estimula una respuesta inmunitaria, la cual también puede estar asociada con una cantidad de ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas aquí forma una característica preferida de la presente invención.

La técnica convencional de inyección intradérmica "procedimiento Mantoux", comprende los pasos de limpiar la piel, y luego estirarla con una mano, y con el bisel de una aguja calibrada delgada (calibre 26-31) dirigido hacia arriba, se inserta la aguja en un ángulo de entre 10-15°. Una vez que el bisel de la aguja es insertado, se baja el cilindro de la aguja y se empuja más mientras se proporciona una ligera presión para elevarlo bajo la piel. Luego se inyecta el líquido muy lentamente, formando una ampolla o protuberancia sobre la superficie de la piel, y luego se retira lentamente la aguja.

Más recientemente, se han descrito dispositivos que están diseñados específicamente para administrar agentes líquidos en o a través de la piel, por ejemplo los dispositivos que se describen en WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección

presurizada descritos por ejemplo en WO 01/13977, US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520,639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 y WO 97/13537 Los métodos alternativos de administración intradérmica de las preparaciones para vacuna pueden incluir jeringas y agujas convencionales, o dispositivos diseñados para el suministro balístico de vacunas sólidas (WO 99/27951), o parches transdérmicos (WO 97/48440; WO 98/28037); o aplicados a la superficie de la piel (suministro transdérmico o transcutáneo WO 98/20734; WO 98/28037).

Cuando las vacunas de la presente invención se van a administrar en la piel, o más específicamente en la dermis, la vacuna tiene poco volumen de líquido, particularmente un volumen de entre aproximadamente 0.05 mL y 0.2 mL

El contenido de antígenos en las vacunas cutáneas o intradérmicas de la presente invención puede ser similar a las dosis convencionales que se encuentran en las vacunas intramusculares (véase más arriba) Sin embargo, es una característica de las vacunas cutáneas o intradérmicas que las formulaciones puedan ser de "dosis baja" De acuerdo con esto, los antígenos de proteína en las vacunas de "dosis baja" preferiblemente están presentes en tan poco como 0.1 hasta 10 µg, preferiblemente 0.1 hasta 5 µg por dosis, y los antígenos polisacáridos (preferiblemente conjugados) pueden estar presentes en el

rango de 0.01-1 μ g, y preferiblemente entre 0.01 y 0.5 μ g de polisacárido por dosis

Como se usa aquí, el término "suministro intradérmico" significa el suministro de la vacuna a la región de la dermis en la piel. Sin embargo, la vacuna no necesariamente será colocada exclusivamente en la dermis. La dermis es la capa en la piel ubicada entre aproximadamente 1.0 y aproximadamente 2.0 mm desde la superficie en la piel humana, pero hay una cierta cantidad de variación entre individuos y en diferentes partes del cuerpo. En general, se puede esperar alcanzar la dermis yendo 1.5 mm por debajo de la superficie de la piel. La dermis está ubicada entre el stratum corneum y la epidermis en la superficie y la capa subcutánea que está por debajo. Dependiendo del modo de suministro, la vacuna estará localizada finalmente sólo o principalmente dentro de la dermis, o puede ser distribuida finalmente dentro de la epidermis y la dermis.

Una modalidad preferida de la invención es un método de prevención o tratamiento de infección o enfermedad estafilocócica que comprende el paso de administrar la composición inmunogénica o vacuna de la invención a un paciente que lo necesita.

En una modalidad preferida, el paciente está esperando por cirugía electiva.

Una modalidad preferida adicional de la invención es el uso de la composición inmunogénica de la invención en la fabricación de una vacuna para el tratamiento o prevención de infección o enfermedad estafilocócica, preferiblemente infección estafilocócica posterior a una

cirugía

El término 'infección estafilocócica' comprende infección ocasionada por *S aureus* y/o *S. epidermidis* y otras cepas estafilocócicas capaces de ocasionar infección en un mamífero, preferiblemente en un anfitrión humano.

Los términos "que contiene", "contienen" y "contiene" que se usan aquí, tienen la intención de los inventores de ser sustituibles opcionalmente con los términos "que consiste en" "consisten" y "consiste", respectivamente, en cada caso.

Todas las referencias o solicitudes de patente citadas dentro de esta especificación de patente están incorporadas aquí mediante referencia.

Con el fin de que esta invención sea comprendida mejor, se presentan los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son para propósitos de ilustración solamente, y no deben ser interpretados como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de plásmido para expresar proteínas recombinantes

A: Clonación.

Los sitios de restricción apropiados diseñados en oligonucleótidos específicos para el gen estafilocócico permitió la clonación direccional del producto de PCR en el plásmido de expresión pET24d o pQE-30 de *E.coli* de tal forma que se pudiera expresar una proteína como una proteína de fusión que contuviera una etiqueta (His)6 de cromatografía

por afinidad en el término C o N

Los sensibilizadores usados fueron

	Toxina	alla	-	5'-
	CGCGGATCCGCAGATTCTGATATTAATATTTAAAC-3' y			
5	5'CCCAAGCTTTTAATTTGTCATTTCTTCTTTTC-3'			
	EbpS	-	5'-CGCGGATCCGCTGGGTCTAATAATTTTAAAGATG-3'	y
	5'CCCAAGCTTTTATGGAATAACGATTTGTTG-3'			
	CifA	-	5'-CGCGGATCCAGTGAAAATAGTGTTACGCAATC-3'	y
	5'CCCAAGCTTTTACTCTGGAATTGGTTCAATTC-3'			
10	FnbpA	-	5'-CGCGGATCCACACAAACAACTGCAACTAACG-3'	y
	5'CCCAAGCTTTTATGCTTTGTGATTCTTTTTCAAACS'			
	Sbi	-	5'-CGCGGATCCAACACGCAACAACTTC-3'	y
	5'GGAAGTGCAGTTATTTCCAGAATGATAATAAATTAC-3'			
	SdrC	-	5'-CGCGGATCCGCAGAACATACGAATGGAG-3'	y
15	5'CCCAAGCTTTTATGTTTCTTCTTCGTAGTAGC-3'			
	SdrG	-	5'-CGCGGATCCGAGGAGAATTCAGTACAAG-3'	y
	5'CCCAAGCTTTTATTCGTCATCATAGTATCCG-3'			
	Ebh	-	5'-AAAAGTACTCACCACCACCACCACC-3'	y
	5'AAAAGTACTCACTTGATTCATCGCTTCAG-3'			
20	Aaa	-	5'-GCGCGCCATGGCACAAGCTTCTACACAACATAC-3'	y
	5'GCGCGCTCGAGATGGATGAATGCATAGCTAGA-3'			
	IsaA	-	5'-	
	GCATCCATGGCACCATCACCATCACCACGAAGTAAACGTTGATCAAGC-			
	3' y 5'-AGCACTCGAGTTAGAATCCCCAAGCACCTAAACC-3'			
25	HarA	-	5'-GCACCCATGGCAGAAAATACAAATACTTC-3'	y

5'TTTTCTCGAGCATTTTAGATTGACTAAGTTG-3'

Autolisina	glucosaminidasa	-	5'-
CAAGTCCCATGGCTGAGACGACACAAGATCAAC-3'		y	5'-
CAGTCTCGAGTTTTACAGCTGTTTTTGGTTG-3'			

5	Autolisina	amidasa	-	5'-
	AGTCATATGGCTTATACTGTTACTAAACC-3'			y
	5'GCGCCTCGAGTTTATATTGTGGGATGTCG-3'			

IsdA - 5'-CAAGTCCCATGGCAACAGAAGCTACGAACGCAAC-3' y
5'ACCAGTCTCGAGTAATCTTTAGCTTTAGAGCTTG-3'

10 IsdB - 5'-TATTCTCGAGGCTTTGAGTGTGTCCATCATTG-3' y 5'
GAAGCCATGGCAGCAGCTGAAGAAACAGGTGG-3'

MRPII - 5'-GATTACACCATGGTTAAACCTCAAGCGAAA-3' y
5'AGGTGTCTCGAGTGCGATTGTAGCTTCATT-3'

Los productos de la PCR fueron introducidos primero en el vector
15 de clonación pGEM-T (Novagen) usando células bacteriales Top10, de
acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esta construcción
intermedia se elaboró para facilitar la clonación adicional en un vector
de expresión. Los transformantes que contenían el inserto de ADN
fueron seleccionados mediante análisis de enzima de restricción.
20 Después de la digestión, se analizó una alícuota de ~20µL de la
reacción mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8 % agarosa en
un regulador de pH Tris-acetato-EDTA (TAE)). Los fragmentos de ADN
se visualizaron mediante iluminación con rayos UV después de
electroforesis en gel y de tinción con bromuro de etidio. Un estándar
25 molecular de tamaño de ADN (cadena de 1 Kb, Life Technologies) se

sometió a electroforesis en paralelo con las muestras de prueba y se usó para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN. El plásmido purificado de transformantes seleccionados para cada clonación fue digerido luego secuencialmente hasta que estuvo completo con enzimas de restricción apropiadas según lo recomendado por el fabricante (Life Technologies). El fragmento de ADN se purificó luego usando columnas con espín, con base de gel de sílice antes de la ligación con el plásmido pET24d o pQE-30. La clonación de Ebh (fragmento H2), AaA, IsdA, IsdB, HarA, Atl-amidasa, Atl-glucosamina, MRP, IsaA se llevó a cabo usando el plásmido pET24d y la clonación de ClfA, SdrC, SdrE, FnbpA, SdrG/Fbe, toxina alfa y Sbi se llevó a cabo usando el plásmido pQE-30.

B: Producción de vector de expresión

Para preparar el plásmido de expresión pET24d o pQE-30 para la ligación, se digirió de manera similar hasta su terminación con las enzimas de restricción apropiadas. Se usó un exceso molar de aproximadamente 5 veces de los fragmentos digeridos para el vector preparado, para programar la reacción de ligación. Se realizó una reacción de ligación estándar de ~20 µL (~16 °C, ~16 horas), usando métodos bien conocidos en la técnica, se realizó usando ligasa ADN T4 (~2.0 unidades / reacción, Life Technologies). Una alícuota de la ligación (~5 µL) se usó para transformar células electro competentes M15(pREP4) o BT21 : DE3 de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Después de un periodo de excrecencia de ~2-3 horas a 37°C en ~1.0 mL de caldo de cultivo LB, las células transformadas se colocaron en placas de agar LB que contenían ampicilina (100 µg/mL).

X

y/o kanamicina (30 µg/mL) Se incluyeron antibióticos en la selección. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C durante ~16 horas. Se escogieron colonias individuales de ApR/KanR con palillos estériles y se usaron para "parchar" placas LB ApR/KanR recién inoculadas, así como

5 también un cultivo en ~10 mL de caldo LB Ap/ Kan. Tanto las placas con parche como el cultivo en caldo fueron incubados durante la noche a 37 °C en una incubadora estándar (placas) o en un baño de agua con agitación. Se empleó un análisis de PCR basado en células completas para verificar que los transformantes contenían el inserto de ADN. Aquí,

10 el cultivo en caldo LB Ap/Kan de ~10 mL de un día para otro, fue transferido a un tubo de polipropileno de 1.5 mL y se recolectaron las células mediante centrifugación en una microcentrífuga Beckmann (~3 min., temperatura ambiente, -12,000 X g). Los gránulos de células fueron suspendidos en ~200 µL de agua estéril, y se usó una alícuota de

15 ~10 µL para programar un volumen final de ~50 µL de reacción PCR que contuviera ambos sensibilizadores de amplificación directa e inversa. El paso de desnaturalización a 95°C se aumentó a 3 minutos para asegurar la alteración térmica de las células bacterianas y la liberación de ADN plásmido. Se usó un ciclizador térmico ABI Modelo 9700 y un perfil de

20 amplificación térmica de tres pasos de 32 ciclos, es decir, 95 °C, 45 seg, 55-58 °C, 45 seg, 72 °C, 1 min, para amplificar el fragmento BASB203 de las muestras transformantes lisadas. Después de la amplificación térmica, se analizó una alícuota de ~20 µL de la reacción mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8 % de agarosa en un

25 regulador de pH Tris-acetato-EDTA (TAE)). Los fragmentos de ADN se

visualizaron mediante iluminación con rayos UV después de electroforesis en gel y de tinción con bromuro de etidio. Un estándar molecular de tamaño de ADN (cadena de 1 Kb, Life Technologies) se sometió a electroforesis en paralelo con las muestras de prueba y se
5 usó para estimar el tamaño de los productos de la PCR. Los transformantes que produjeron el producto de PCR del tamaño esperado fueron identificados como cepas que contenían una construcción de expresión de proteína. Las cepas que contenían el plásmido de expresión fueron analizadas luego para determinar la expresión
10 inducible de proteína recombinante.

C: Análisis de expresión de transformantes positivos a la PCR

Una alícuota del cultivo sembrado durante la noche (~10 mL) fue inoculada en un matraz Erlenmeyer de 125 mL que contenía ~25 mL de
15 caldo de cultivo LB Ap/Kan, y se cultivó a 37 °C con agitación (~250 rpm) hasta que la turbidez del cultivo alcanzó una O D 600 de ~0.5, es decir, fase semi logarítmica (usualmente de aproximadamente 1.5 - 2.0 horas). En este tiempo, aproximadamente la mitad del cultivo (~12.5 mL) fue transferida a un segundo matraz de 125 mL y se indujo la expresión
20 de proteína recombinante mediante la adición de IPTG (solución madre 10 M preparada en agua estéril, Sigma) para una concentración final de 10 mM. La incubación tanto de los cultivos inducidos por IPTG como de los no inducidos, continuó durante ~4 horas más a 37 °C con agitación. Se sacaron muestras (~10 mL) de ambos cultivos inducido y no inducido
25 después del periodo de inducción, y se recolectaron las células

mediante centrifugación a temperatura ambiente durante ~3 minutos. Se suspendieron los gránulos de células individuales en ~50 μ L de agua estéril, luego se mezclaron con un volumen igual de regulador de pH para muestras para SDS-PAGE 2X Laemmli que contenía 2-mercaptoetanol, y se colocaron en un baño de agua hirviendo durante ~3 min para desnaturalizar la proteína. Se cargaron volúmenes iguales (~15 μ L) tanto de lisados celulares crudos inducidos por IPTG como de lisados celulares no inducidos, en gel de poliacrilamida con 12% de Tris/glicina (1 mm de espesor, Mini-gels, Novex) por duplicado. Las muestras de lisado inducidas y no inducidas fueron sometidas a electroforesis junto con marcadores de peso molecular teñidos previamente (véase Blue, Novex) bajo condiciones convencionales usando un regulador corriente estándar de SDS/Tris/glicina (BioRad). Después de la electroforesis, un gel se tiñó con azul Comassie brillante R250 (BioRad) y luego se eliminó el tinte para visualizar la nueva proteína o proteínas inducibles por IPTG. El segundo gel se electrotransfirió sobre una membrana de PVDF (tamaño de poro de 0.45 micras, Novex) durante ~2 h a 4 °C usando un aparato para transferencia BioRad Mini-Protean II y regulador de pH para transferencia metanol de Towbin (20 %). El bloqueo de la membrana y las incubaciones del anticuerpo se realizaron de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Se usó un anticuerpo monoclonal (His)₃ anti-RGS, seguido por un segundo anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado con HRP (QiaGen), para confirmar la expresión y la identidad de la proteína recombinante. La visualización del patrón reactivo del

anticuerpo anti-His se logró usando un sustrato insoluble ABT o usando hiperpelícula con el sistema de quimioluminiscencia Amersham ECL

Ejemplo 2: Producción de proteína recombinante

Cepa bacteriana

- 5 Se usó una cepa de expresión recombinante de *E. coli* M15(pREP4) que contenía un plásmido (pQE30) o BL21..DE3 que contenía plásmido pET24d codificador de proteína estafilocócica para producir masa celular para la purificación de proteína recombinante.

Medios

- 10 El medio de fermentación usado para la producción de proteína recombinante consistió en caldo de cultivo 2X YT (Difco) que contenía 100 µg/mL de Ap y/o 30 µg/mL de Km Se le añadió antiespumante al medio para la fermentadora en 0.25 mL/L (Antifoam 204, Sigma). Para inducir la expresión de la proteína recombinante, se le añadió IPTG
- 15 (Isopropil β-D-Tiogalactopiranosida) a la fermentadora (1 mM, final)

Producción de proteínas recombinantes

Bajo condiciones naturales

- Se añadió IPTG en una concentración final de 1 mM, y el cultivo se dejó crecer durante 4 horas adicionales. Luego se centrifugó el
- 20 cultivo a 6,000 rpm durante 10 minutos y se resuspendió el granulado en regulador de pH fosfatado (50 mM de K₂HPO₄, KH₂PO₄ pH 7) incluyendo un coctel inhibidor de proteasa. Esta muestra fue sometida a lisis por presión francesa usando una presión de 1500 bar (2 corridas). Después de centrifugación durante 30 minutos a 15,000 rpm, se reservó
- 25 el supernadante para purificación adicional, y se le añadió NaCl hasta

0.5 M. La muestra se cargó luego en una resina Ni-NTA (columna XK 16 Pharmacia, resina Ni-NTA Qiagen) acondicionada en 50 mM de K₂HPO₄, KH₂PO₄ con pH 7. Después de cargar la muestra, se lavó la columna con regulador de pH A (0.2M NaH₂PO₄ pH7, 0.3M NaCl, 10% de glicerol). Para eluir la proteína unida, se usó un paso gradiente en donde se le añadieron diferentes proporciones de regulador de pH B (0.2 M de NaH₂PO₄ con pH7, 0.3 M de NaCl, 10% de glicerol y 200 mM de imidazol) al regulador de pH A. La proporción de regulador de pH B fue aumentada gradualmente desde 10% hasta 100%. Después de la purificación, las fracciones eluidas que contenían la proteína fueron agrupadas, concentradas y dializadas contra 0.002 M de KH₂PO₄/K₂HPO₄ con pH7, 0.15 M de NaCl.

Este método se usó para purificar ClfA, SdrG, IsdA, IsaB, HarA, Ati-glucosamina y toxina alfa.

15 **Baio condiciones desnaturalizantes**

Se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y el cultivo se dejó crecer durante 4 horas adicionales. Luego se centrifugó el cultivo a 6,000 rpm durante 10 minutos y se resuspendió el granulado en regulador de pH fosfatado (50 mM de K₂HPO₄, KH₂PO₄ con pH 7) incluyendo un coctel inhibidor de proteasa. Esta muestra se sometió a lisis por presión francesa usando una presión de 1500 (2 corridas). Después de centrifugación durante 30 minutos a 15,000 rpm, se lavó el granulado con regulador de pH fosfatado incluyendo 1 M de urea. La muestra se centrifugó durante 30 min a 15000 rpm y se resuspendió el granulado en 8 M de urea, 0.1 M de NaH₂PO₄, 0.5 M de NaCl, 0.01 M

de Tris-HCl pH8 y se mantuvo durante la noche a temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada durante 20 minutos a 15000 rpm y se recolectó el supernadante para purificación adicional. La muestra se cargó luego en una resina de Ni-NTA (columna XK 16 Pharmacia, resina Ni-NTA Qiagen) acondicionada en 8 M de urea, 0.1 M de NaH_2PO_4 , 0.5 M de NaCl, 0.01 M de Tris-HCl con pH 8. Después del paso del flujo a través, la columna se lavó sucesivamente con regulador de pH A (8M de Urea, 0.1 M de NaH_2PO_4 , 0.5 M de NaCl, 0.01 M de Tris, pH 8.0), regulador de pH C (8M de Urea, 0.1 M de NaH_2PO_4 , 0.5 M de NaCl, 0.01 M de Tris, pH 6.3), regulador de pH D (8M de Urea, 0.1 M de NaH_2PO_4 , 0.5 M de NaCl, 0.01 M de Tris, pH 5.9) y regulador de pH E (8 M de Urea, 0.1 M de NaH_2PO_4 , 0.5 M de NaCl, 0.01 M de Tris, pH 4.5). La proteína recombinante se eluyó de la columna durante los lavados con regulador de pH D y E. La proteína recombinante desnaturalizante se pudo solubilizar en una solución desprovista de urea. Para este fin, la proteína desnaturalizante contenida en 8M de urea fue dializada sucesivamente contra 4 M de urea, 0.1 M de Na_2PO_4 , 0.01 M de Tris-HCl, pH 7.1, 2 M de urea, 0.1 M de NaH_2PO_4 , 0.01 M de Tris-HCl, pH 7.1, 0.5 M de arginina y 0.002 M de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ con pH 7.1, 0.15 M de NaCl, 0.5 M de arginina.

Este método se usó para purificar Ebh (fragmento H2), AaA, SdrC, FnbpA, Sbi, Atl-amidasa y IsaA.

Las proteínas purificadas fueron analizadas por SDS-PAGE. Los resultados para una proteína purificada bajo condiciones naturales (toxina alfa) y una proteína purificada bajo condiciones

desnaturalizantes (SdrC) se muestran en las Figuras 3 y 4

Ejemplo 3. Preparación de Polisacáridos

Se prepara PNAG como se describe en Joyce *et al* 2003, Carbohydrate Research 338, 903- 922

- 5 Los polisacáridos tipo 5 y tipo 8 son extraídos de *S. aureus* como se describe en Infection and Immunity (1990) 58(7), 2367

Química de activación y acoplamiento

- 10 Se disuelve el polisacárido natural en NaCl 2 M o en agua. La concentración óptima del polisacárido se evalúa para todos los serotipos, y está entre 2mg/mL y 5mg/mL.

- De una solución madre de 100 mg/mL en acetonitrilo, se le añade CDAP (proporción CDAP/PS:0.75 mg/mg de PS) a la solución de polisacárido. 1.5 minutos después, se le añade 0.2 M de trietilamina para obtener el pH de activación específico (pH 8.5-10.0). La activación
15 del polisacárido se realiza con este pH durante 2 minutos a 25 °C. Se añade la proteína portadora al polisacárido activado en una cantidad suficiente para dar una proporción molar de 1/1 y la reacción de acoplamiento se realiza en el pH específico durante 1 hora.

- 20 Luego se extingue la reacción con glicina durante 30 minutos a 25 °C y durante la noche a 4°C.

Los conjugados se purifican mediante filtración en gel usando una columna de filtración con gel Sephacryl 500HR equilibrada con 0.2 M de NaCl.

- 25 Se determinan los contenidos de carbohidratos y proteínas de las fracciones eluidas. Los conjugados se agrupan y se filtran de manera

estéril en una membrana esterilizante de 0.22 μm . Se determinan las proporciones de PS/Proteína en las preparaciones de conjugados.

Caracterización:

Cada conjugado se caracteriza según su contenido de proteína y
5 polisacárido.

Se mide el contenido de polisacárido mediante la prueba con Resorcinol, y el contenido de proteína se mide mediante la prueba Lowry. Se determina la proporción final de PS/PD ratio (p/p) mediante la proporción de las concentraciones.

10 Contenido residual de DMAP (ng/ μg PS):

La activación del polisacárido con CDAP introduce un grupo cianato en el polisacárido y se libera DMAP (4-dimetilamino-piridina). El contenido residual de DMAP se determina mediante un análisis específico desarrollado, y se valida en GSK.

15 Contenido de polisacárido libre (%):

Se determina el contenido de polisacárido libre en los conjugados mantenidos a 4 °C o almacenados durante 7 días a 37 °C en el supernadante obtenido después de la incubación con anticuerpos portadores α y sulfato de amonio saturado, seguido por una
20 centrifugación.

Se usa un ELISA α -PS/ α -PS para la cuantificación de polisacárido libre en el supernadante. La ausencia de conjugado se controla también mediante un ELISA portador α / α -PS.

Ejemplo 4. Formulación

25 Composiciones adyuvantes

La proteína, ya sea individualmente o junta, de los ejemplos anteriores, puede ser formulada con la combinación de polisacáridos estafilocócicos y como adyuvante, la formulación puede contener una mezcla de lípido A monofosforilado 3 des-O-acilado (3D-MPL) e
5 hidróxido de aluminio, o de lípido A monofosforilado 3 des-O-acilado (3D-MPL) y fosfato de aluminio, o de 3D-MPL y/o QS21 opcionalmente en una emulsión de aceite/agua, y opcionalmente formulado con colesterol, o sal de aluminio sola, preferiblemente fosfato de aluminio.

3D-MPL: es una forma químicamente desintoxicada del
10 lipopolisacárido (LPS) de la bacteria Gram-negativa *Salmonella minnesota*

Experimentos realizados en GSK Biologicals han demostrado que el 3D-MPL combinado con diversos vehículos mejora fuertemente tanto el tipo de inmunidad celular humoral como el TH1

15 QS21 es una saponina purificada de un extracto crudo de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina, la cual tiene una fuerte actividad adyuvante activa tanto la linfoproliferación específica para antígeno como la CTL para diversos antígenos

La vacuna que contiene un antígeno de la invención que contiene
20 3D-MPL y alum se puede preparar de manera análoga a la que se describe en WO93/19780 o en 92/16231

Experimentos realizados en GSK Biologicals han demostrado un claro efecto sinérgico de combinaciones de 3D-MPL y QS21 en la inducción de las respuestas inmunitarias celulares tanto humorales
25 como de tipo TH1 Las vacunas que contienen un antígeno de este tipo

se describen en US 5750110

Una emulsión de aceite/agua puede estar compuesta de dos aceites (un tocoferol y escualeno), y de PBS con Tween 80 como emulsificante. La emulsión contenía 5% de escualeno, 5% de tocoferol, 0.4% de Tween 80 y tuvo un tamaño promedio de partícula de 180 nm, y se conoce como SB62 (véase WO 95/17210).

Experimentos realizados en GSK Biologicals han probado que la adjunción de esta emulsión de aceite en agua a MPL/QS21 aumenta adicionalmente sus propiedades inmunoestimulantes.

10 **Preparación de emulsión SB62 (concentrada 2 veces)**

Se disuelve Tween 80 en salina fosfatada regulada (PBS) para dar una solución al 2% en la PBS. Para proporcionar 100 mL de emulsión concentrada 2 veces, se sometió a vórtice 5 g de DL alfa tocoferol y 5 mL de escualeno hasta mezclar por completo. Se le añadió 90 mL de solución de PBS/Tween y se mezcló completamente. La solución resultante se hizo pasar entonces a través de una jeringa y finalmente se microfluidizó usando una máquina para microfluidos M110S. Las gotitas resultantes de aceite tenían un tamaño de aproximadamente 180 nm.

20 **Ejemplo 5**

Experimentos con animales

Se obtuvieron ratones hembras CD-1 de 8 a 10 semanas de edad en Charles River Laboratories, Kingston, Mass. Para los estudios de letalidad, cinco grupos de 9 a 11 ratones CD-1 se expusieron por vía intraperitoneal (i.p.) con diluciones en serie de *S. aureus* cultivados en

placas CSA. Los tamaños inoculares abarcan desde $\sim 10^{10}$ hasta 10^8 CFU/ratón. La mortalidad se evalúa sobre una base diaria durante 3 días. La dosis letal del 50% (LD_{50}) se estima usando un modelo Probit de la relación dosis-respuesta. La hipótesis nula de la LD_{50} común fue
5 sometida a prueba mediante la prueba de índice de probabilidad. La bacteremia subletal se inicia exponiendo grupos de 8 a 20 ratones por vía intravenosa (i.v.) con $\sim 2 \times 10^6$ CFU/ratón o por vía i.p. con $\sim 2 \times 10^7$ CFU/ratón. Después de la inoculación, se extrae sangre de la cola de grupos de animales por separado, en momentos especificados, y se
10 estiman los niveles de bacteremia mediante conteos en placa cuantitativos realizados por duplicado en placas de agar con soya trípticas con 5% de sangre de oveja (Becton Dickinson Microbiology Systems). La significación estadística se determina con la modificación Welch de la prueba t de Student no apareada.

15 **Ejemplo 6**

Metodología general para determinar respuestas de anticuerpos en diversos mamíferos

Los sueros fueron analizados mediante ELISA con respecto a los anticuerpos IgG para los polisacáridos estafilocócicos. De manera
20 resumida, se recubren polisacáridos capsulares purificados de ATCC (Rockville, Md, 20852) a 25 $\mu\text{g/mL}$ en salina fosfatada regulada (PBS) en placas para microtitulación de alto enlace (Nunc Maxisorp) durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquean con 10% de suero fetal de ternera (FCS), 1 hora a 37 °C. Las muestras de suero se incuban previamente
25 con 20 $\mu\text{g/mL}$ del polisacárido de pared celular c (Statens Serum

Institute, Copenhagen) y 10% de FCS a temperatura ambiente durante 30 minutos para neutralizar los anticuerpos para este antígeno. Las muestras se diluyen luego dos veces en la microplaca en 10% de FCS en PBS, y se equilibran a temperatura ambiente durante 1 hora con
5 agitación. Después de lavarse, las microplacas se equilibran con anticuerpo monoclonal Fc anti IgG humana marcados con peroxidasa (HP6043-HRP, Stratech Scientific Ltd) diluidos 1:4000 en 10% de FCS en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. El análisis ELISA se realiza para medir la IgG de rata usando IgG de cabra anti-
10 rata AffiniPure conjugado con peroxidasa de Jackson ImmunoLaboratories Inc (H+L) (código 112-035-003) a 1:5000. Las curvas de titulación se refieren a suero estándar para cada serotipo usando comparación logarítmica logística mediante el software SoftMax Pro. Las concentraciones de polisacáridos usadas para recubrir la placa
15 ELISA son de 10-20 µg/mL. El color se revela usando 4 mg de OPD (Sigma) por 10 mL de regulador citrato 0.1 M con pH 4.5, con 14 µL de H₂O₂ durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detiene con 50 µL de HCl, y la densidad óptica se lee a 490 nm con relación a 650 nm. Las concentraciones de IgG se determinan
20 mediante referencia de titulación con respecto a la curva de calibración modelada usando una ecuación logarítmica logística de 4 parámetros calculada mediante el software SoftMax Pro.

La prueba ELISA para medir la IgG murina y de rata con respecto a los polisacáridos estafilocócicos es similar, con las siguientes
25 excepciones. Se empleó IgG anti-ratón de cabra AffiniPure conjugado

con peroxidasa (H+L) e IgG anti-rata de cabra AffiniPure (H+L) de Jackson ImmunoLaboratories Inc para detectar el enlace a IgG.

El HP6043-HRP reacciona igualmente con IgG purificada humana y de Rhesus, y por ello este reactivo se usa para antisuero de Rhesus

- 5 La prueba ELISA de la proteína se realiza de manera similar a la ELISA del polisacárido con las siguientes modificaciones La proteína es recubierta durante la noche a 20 µg/mL en PBS Las muestras de suero se diluyen en PBS que contiene 10% de suero fetal bovino y 0.1 % de alcohol polivinílico. El anticuerpo humano fijado se detecta usando
- 10 anticuerpo purificado por afinidad de cabra conjugado con peroxidasa Sigma para Fc de IgG humana (referencia A-2290)

Ejemplo 7

Análisis de opsonofagocitosis.

- La eliminación opsonofagocítica *in vitro* de *S. aureus* por
- 15 leucocitos humanos polimorfonucleares (PMN) se realiza como se describe en Xu *et al* 1992 Infect. Immun. 60; 1358. Los PMN humanos se preparan a partir de sangre heparinizada mediante sedimentación en 3% de dextran T- 250 La mezcla de reacción opsónica (1 mL) contiene ~ 10⁶ PMN en medio RPMI 1640 complementado con 10% de suero fetal
- 20 de ternera inactivado por calor, ~ 10⁸ CFU de *S. aureus*, y 0.1 mL del suero o preparación de IgG de prueba Se usa suero de conejo hiperinmunizado como control positivo, y se usó 0.1 mL de suero de conejo no inmune como una fuente completa para las muestras de IgG
- Las mezclas de la reacción se incuban a 37 °C, y se transfieren las
- 25 muestras bacteriales a 0, 60 y 120 min en agua y se diluyen

subsiguientemente, se diseminan en placas de agar de soya tripticas y se incuban a 37 °C para el conteo bacterial después de incubación de un día para otro

Eiemplo 8

5 Immunogenicidad de proteínas estafilocócicas en ratones y conejos

Se inmunizó a los animales con proteínas estafilocócicas purificadas con el fin de generar sueros hiperinmunes. Se inmunizó a los ratones tres veces (días 0, 14 y 28) con 10 µg de cada una de las
10 proteínas auxiliadas en Specol. Los conejos se inmunizaron tres veces (días 0, 21 y 42) con 20 µg de cada una de las proteínas, auxiliadas en Specol. Se recolectaron los sueros inmunes y se evaluaron en ELISA de células completas anti proteína y anti eliminación

ELISA Anti-Proteína:

15 Se recubrió la proteína purificada a 1 µg/mL en salina fosfatada regulada (PBS) en placas para microtitulación de alto enlace (Nunc Maxisorp) durante la noche a 4° C. Las placas fueron bloqueadas con PBS-BSA 1 %, durante 30 min a temperatura ambiente con agitación. Luego se diluyeron las muestras de la prueba 1/1000 y se incubaron a
20 temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Después del lavado, se detectó anticuerpo murina o de conejo fijado usando IgG anti-ratón de cabra AffiniPure conjugada con peroxidasa de Jackson ImmunoLaboratories Inc (ref: 115-035-003) o IgG anti-conejo de cabra AffiniPure (H+L) (ref: 11-035-003) diluida 1:5000 en PBS-Tween al
25 0.05%. Los anticuerpos de detección se incubaron durante 30 min. a

temperatura ambiente con agitación. Se reveló el color usando 4 mg OPD (Sigma) + 5 µL H₂O₂ por 10 mL pH 4.5 0.1 M regulador citrato de pH durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con 50 µL de HCl, y la densidad óptica se leyó a 490 nm con relación a 650 nm.

La O.D. para una dilución de 1/1000 de Post III se comparó con la O.D. obtenida con la misma dilución de sueros previamente inmunizados.

Los resultados generados con sueros de ratones y conejo se presentan en la Figura 5. Se observó una buena seroconversión contra cada antígeno. La evaluación de suero dirigido contra SBI fue impedida debido a la actividad de enlace a Ig de esta proteína.

ELISA anti-células completas muertas:

Se recubrieron células completas muertas (inactivadas por calor o por formaldehído) de *S. aureus* tipo 5 y 8 o de la cepa Hay de *S. epidermidis* a 20 µg/mL en salina fosfatada regulada (PBS), en placas para microtitulación de alto enlace (Nunc Maxisorp) durante la noche a 4° C con evaporación. Las placas fueron bloqueadas con PBS-BSA 1% 30 min a temperatura ambiente con agitación. Se neutralizó la proteína A mediante la adición de 10 µg/mL de anti-proteína A de pollo purificada por afinidad (ref. ICL: CPA-65A-2) diluida en PBS-Tween al 0.05% seguida por incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se diluyeron las muestras de prueba dos veces en la microplaca en PBS-0.05% de una dilución inicial a 1/10 y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Después del lavado, se detectó el

anticuerpo murino o de ratón fijado usando IgG anti-ratón de cabra AffiniPure conjugada con peroxidasa (H+L) de Jackson ImmunoLaboratories Inc. (ref. 115-035-003) o IgG anti-conejo de cabra AffiniPure (H+L) (ref 11-035-003) diluido 1 5000 en PBS-Tween al
 5 0 05% Estos anticuerpos de detección se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente con agitación Se reveló el color usando 4 mg OPD (Sigma) + 5 µL H₂O₂ por 10 mL pH 4 5 0.1 M de regulador citrato durante 15 minutos en la oscuridad, a temperatura ambiente Se detuvo la reacción con 50 µL de HCl, y la densidad óptica se leyó a 490 nm con
 10 relación a 650 nm

Se debe notar que los niveles de expresión de proteínas en estafilococos variarán dependiendo de las condiciones de cultivo. Por lo tanto, un resultado negativo puede reflejar la elección de condiciones de cultivo incorrectas en lugar de una carencia de inmunogenicidad.

15 Los resultados usando sueros de ratón se muestran en la Tabla 5 y algunos de los gráficos se muestran en la figura 6. Se observa un débil reconocimiento de la cepa 5 de *S. aureus* con el suero dirigido contra SdrC, FnbpA, Ebh, Sbi e IsaA. El reconocimiento de la cepa 8 de *S. aureus* solamente se observa con el suero dirigido contra Sbi. Se
 20 observa un débil reconocimiento de Hay de *S. epidermidis* con los sueros dirigidos contra Atl amidasa, MRP, IsdA, IsaA, Ebh, Aaa y Sbi.

Una selección de los resultados generados usando suero de conejo se muestra en la figura 7 y se resume en la Tabla 6 Se observó un reconocimiento muy bueno de las tres cepas con IsaA y con IsdB Se
 25 observó un débil reconocimiento de las tres cepas con HarA, a pesar de

que los animales solamente recibieron una inyección en lugar de las tres inyecciones usadas para las otras proteínas

Tabla 5

5	Nombre de la proteína	Reacción en SA5	Reacción en SA8	Reacción en SE Hay
10	IsaA	(+)	(+)	(+)
	ClfA	-	(+)	(+)
	Amidasa Atl	-	-	++
	SdrG	-	-	-
	Glucosamidasa	-	-	-
15	IsdA	-	-	++
	Toxina alfa	-	-	-
	SdrC	++	(+)	-
	Ebh	+	-	-
20	AaA	-	-	++
	MRP	-	-	++
	Sbi	++	++	+++
	FnbpA	+	+	(+)
25				

Tabla 6

	Nombre de la proteína	Reacción en SA5	Reacción en SA8	Reacción en SE Hay
5	IsaA	+++	+++	+++
10	CifA	+	++	++
	Amidasa Atl	-	++	+
	IsdB	+++	+++	+++
	SdrG	+	+	+
	Glucosamidasa	-	-	-
	HarA (1 infect.)	+	+	+
	IsdA	-	-	-
	Toxina alfa		-	+
	SdrC	-	-	-
	Ebh	-	+	-
20	AaA	-	-	-
	MRP	-	+++	++
	Sbi	-	++	-
	FnbpA	-	-	++
25				

Ejemplo 8**Eficacia de combinaciones de proteínas estafilocócicas en un modelo de colonización nasal**

5 Se inoculó a quince grupos de tres ratas del algodón con combinaciones de ocho antígenos estafilocócicos y cinco ratas del algodón que actuaron como controles fueron tratadas sin antígeno. Estos dieciséis grupos son los siguientes:

 Grupo 1 - Atl-glucosamina, Atl-amidasa, AAA, toxina alfa, SdrC,
10 SdrG, Ebh, Sbi

 Grupo 2 - Atl-glucosamina, Atl-amidasa, IsdA, IsdB, ClfA, SdrC, Ebh, FnbpA

 Grupo 3 - Atl-glucosamina, Atl-amidasa, HarA, IsdA, MRP, IsdB, AAA, toxina alfa

15 Grupo 4 - Atl-glucosamina, HarA, IsdA, AAA, ClfA, IsaA, Ebh, Sbi

 Grupo 5 - HarA, MRP, AAA, toxina alfa, ClfA, SdrC, Ebh, FnbpA

 Grupo 6 - IsdA, IsdB, AAA, toxina alfa, ClfA, SdrG, Sbi, FnbpA

 Grupo 7 - Atl-aminidasa, IsdA, MRP, AAA, IsaA, SdrG, Ebh, FnbpA

 Grupo 8 - Control

20 Grupo 9 - Atl-glucosamina, IsdA, MRP, toxina alfa, IsaA, SdrC, Sbi, FnbpA

 Grupo 10 - Atl-glucosamina, MRP, IsdB, AAA, ClfA, IsaA, SdrC, SdrG

 Grupo 11- Atl-amidasa, MRP, IsdB, toxina alfa, ClfA, IsaA, Ebh,
25 Sbi

Grupo 12 - Atl-glucosamina, HarA, IsdB, toxina alfa, IsaA, SdrG, Ebh, FnbpA

Grupo 13 - Atl-amidasa, HarA, IsdB, AAA, IsaA, SdrC, Sbi, FnbpA

Grupo 14 - Atl-glucosamina, Atl-amidasa, HarA, MRP, ClfA, SdrG, Sbi, FnbpA

Grupo 15 - Atl-amidasa, HarA, IsdA, toxina alfa, ClfA, IsaA, SdrC, SdrG

Grupo 16 - HarA, IsdA, MRP, IsdB, SdrC, SdrG, Ebh, Sbi

Cada mezcla de antígenos contenía 3µg de cada antígeno mezclado con un adyuvante elaborado de liposomas que contenía MPL y QS21. Las ratas del algodón fueron inoculadas tres veces los días 1, 14 y 28 del experimento. Dos semanas después de la inoculación, se evaluó la eficacia de las inmunizaciones usando un análisis de colonización nasal como se describe en Kokai-Kun *et al* (2003) Antimicrob Agents Chemother. 47, 1589-1597.

Se llevó a cabo un análisis clásico de regresión lineal múltiple de los datos, usando el software "Design Expert 6". La presencia de un antígeno se codificó como +1 y la ausencia de un antígeno se codificó como -1. Usando la ecuación del modelo fue posible determinar cuáles antígenos fueron los antígenos clave que produjeron una gran disminución en la cantidad de colonias por nariz.

Resultados

Los resultados del análisis de colonización nasal se muestran en la Tabla 7. El grupo de control tuvo una media logarítmica de CFU/nariz de 3.51335 y se pudo observar una disminución en la colonización nasal

estafilocóccicas. Los grupos 4, 9 y 13 mostraron la mayor disminución en la colonización nasal con una disminución por encima de 2 log en CFU/nariz. Los grupos 12 y 16 también dieron buenos resultados, mostrando una disminución de aproximadamente 2 log en CFU/nariz.

5

10

15

20

25

Tabla 7

Grupo	Media observada Log/CFU/nariz	Log/CFU/nariz predicho
1	1.77527	2.03560
2	2.90435	2.52684
3	1.96556	2.23033
4	1.27748	1.21872
5	1.67304	1.93128
6	2.79745	2.98193
7	2.21481	2.30705
8	3.51355	3.47317
9	1.22480	1.44080
10	2.03085	1.93204
11	2.02522	1.81581
12	1.53402	1.70996
13	1.36063	1.49100
14	2.31201	1.73909
15	2.22979	1.98223
16	1.58109	1.44004

La contribución de antígenos específicos dentro de la mezcla de antígenos se calculó usando análisis de regresión múltiple de los datos de colonización nasal. El modelo final contiene los siete mejores antígenos. Los resultados para estos antígenos se muestran en la

5 Tabla 8. Dentro del contexto de la mezcla de proteínas, la inclusión de HarA dio la mayor disminución en la colonización nasal, seguida por IsaA, Sbi, SdrC, autolisina-glucosamina, MRP y Ebn.

Tabla 8 Efectos en diferencia de log CFU/nariz e índice de CFU/nariz para los siete mejores antígenos en el modelo y valores de p correspondientes.

10

Antígeno	Prob > F	Efecto estimado	Tasa de reducción	Efecto acumulativo	Tasa acumulativa
HarA	0.033	-0.596	3.9	-0.596	3.9
IsaA	0.046	-0.558	3.6	-1.154	14.3
Sbi	0.077	-0.491	3.1	-1.645	44.2
SdrC	0.22	-0.337	2.2	-1.982	96.0
Atl- glucos	0.238	-0.324	2.1	-2.306	202.2
MRP	0.239	-0.323	2.1	-2.629	425.3
Ebn	0.297	-0.286	1.9	-2.914	821.0

REIVINDICACIONES

1 Una composición inmunogénica que contiene al menos
dos diferentes proteínas o fragmentos inmunogénicos de ellas,
5 seleccionados de al menos dos grupos de proteínas o fragmentos
inmunogénicos seleccionados de los siguientes grupos

Grupo a) al menos una proteína de enlace de componente
extracelular o fragmento inmunogénico de ella, seleccionada del
grupo que consiste en SdrG, receptor de laminina, EbhA, EbhB,
10 proteína de enlace de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina,
ClfA, SdrC, SdrH, Lipasa GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA,
Npasa, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de
enlace de enlace de fibronectina, coagulasa y MAP,

Grupo b) al menos una proteína transportadora estafilocócica o
15 fragmento inmunogénico de ella, seleccionada del grupo que
consiste en transportador ABC inmunodominante, IsdA, IsdB,
transportador de Mg²⁺, SitC y transportador ABC Ni,

Grupo c) al menos un regulador de virulencia estafilocócico,
toxina o fragmento inmunogénico de ella, seleccionado del grupo que
20 consiste en toxina alfa (Hla), mutante H35R de toxina alfa, proteína
activadora de ARN III (RAP)

2 La composición inmunogénica de la reivindicación 1,
caracterizada además porque al menos una proteína o fragmento
inmunogénico se selecciona del grupo a).

25 3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 o 2

194

caracterizada además porque al menos una proteína o fragmento inmunogénico se selecciona del grupo b)

4 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-3, caracterizada además porque al menos una proteína o fragmento
5 inmunogénico se selecciona del grupo c)

5 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-4, caracterizada además porque al menos una proteína o fragmento inmunogénico se selecciona del grupo a), grupo b) y grupo c)

6. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-5,
10 que contiene al menos una proteína o fragmento inmunogénico de *S. aureus*

7 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-6, que contiene al menos una proteína o fragmento inmunogénico de *S. epidermidis*

15 8 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-7, que contiene además un polisacárido u oligosacárido PIA

9 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-8, que contiene además un polisacárido u oligosacárido capsular de tipo V y/o de tipo VIII de *S. aureus*.

20 10. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-9, que contiene además un polisacárido u oligosacárido capsular de tipo I, de tipo II y/o de tipo III de *S. epidermidis*

11 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-10, que contiene además ácido lipoteicoico de una bacteria Gram
25 positiva

12 La composición inmunogénica de la reivindicación 11, caracterizada además porque el ácido lipoteicoico se extrae de una bacteria estafilocócica

13 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 8-12, caracterizada además porque un polisacárido capsular estafilocócico está conjugado con un portador de proteína

14 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 11-13, caracterizada además porque el ácido lipoteicoico está conjugado con un portador de proteína

15 La composición inmunogénica de las reivindicaciones 13-14, caracterizada además porque el portador de proteína se selecciona del grupo que consiste en toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM197, proteína D de *Haemophilus influenzae*, neumolisina y toxoide alfa

16. La composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-15, la cual es capaz de generar una respuesta inmunitaria efectiva tanto contra *S aureus* como contra *S epidermidis*

17. Una vacuna que contiene la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-16 y un excipiente aceptable para uso farmacéutico.

18. Un método para elaborar una vacuna, que comprende los pasos de mezclar antígenos para elaborar la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-16 y añadir un excipiente aceptable para uso farmacéutico

19 Un método para prevenir o tratar una infección

estafilocócica, que comprende el paso de administrar la vacuna de la reivindicación 17 a un paciente que lo necesita

20 Un uso de la composición inmunogénica de las reivindicaciones 1-16 en la fabricación de una vacuna para el
5 tratamiento o prevención de una infección estafilocócica

21 Un método para preparar una inmunoglobulina para uso en prevención o tratamiento de infección estafilocócica, que comprende los pasos de inmunizar un receptor con la vacuna de la reivindicación 17 y aislar la inmunoglobulina del receptor

10 22 Una composición farmacéutica que contiene dos o más anticuerpos monoclonales o fragmentos de ellos, los cuales son reactivos contra al menos dos constituyentes de la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde los al menos dos constituyentes se seleccionan de al menos dos
15 grupos a), b) y c).

23 Una composición farmacéutica que contiene la inmunoglobulina de la reivindicación 22 y un excipiente aceptable para uso farmacéutico

24 Un método para el tratamiento o prevención de infección
20 estafilocócica, que comprende un paso de administrar a un paciente una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 22 o 23

25 Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 22 o 23 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o
25 prevención de infección estafilocócica

Fig. 1.2

TSETISASQAASYNYIH

SEQ ID NO: 8 secuencia de polipéptido

MKKLVLPLLLALLLLVAACCTGGKQSSDKSNGKLKVVTTNSILYDMAKIVGGDMVDIHSIVPVQDQPHRYEVKPKDKIKLT
 DADVILYNGLNLETGNGWFEKALDQAGKSTKDKGVIAASXNVKPIYLNAGEEGNKQDPPHAWLSLBNQIKYVKTIIQQTPI
 DNDKGGKADYSKQGNKYIAQLEKLNKDSKDKFDDIPKZQAMNITSBQAFKYPSKQYGITPGYIWEINTEKQGTPEQNRQA
 IEPVKHKLKHLVETSVDKKAMESLSEETKKDIFGEVYTDGIGKEGTGSDSYTKMKSNIEIVHGSNK

SEQ ID NO: 9 secuencia de polipéptido

MKKILALAIAPLIILAACGNHSHHSHSHSEGLKVVTTN3ILYDMVKRVGGHXYDVHSIVPVQDQPHRYEVKPKDKIKALT
 DADVILYNGLNLETGNGWFEKALDQAGKSTKDKGVIAASXNVKPIYLNAGEEGNKQDPPHAWLSLBNQIKYVKTIIQKSL
 HHDKDKSTYEQGNAYISKLEELNKDSKDKFDDIPKZQAMNITSBQAFKYPAQQFDVKPGYIWEINTEKQGTPEQNRQA
 IKPVKDNHLKHLVETSVDKKAMESLSEETKKDIFGEVYTDGIGKEGTGSDSYTKMKSNIEIVHGSNK

SEQ ID NO: 10 secuencia de polipéptido

MKKTIHASSLAVALGVTGYAAGTGHQAHAEEVNVDAQHL/DLAMNHQDQLNAAPIKDGAYDIHFVKDQFYNYFTSNQTTN
 SNWYEAANGQTAFSINVAGADYTTSYEQSSOVQSVSYNAQSSNSNVEAVSAPTYHNYSTSTSSSVRLSNGNTAGATGSS
 AAQIMAQRTCVSASTMAAIIARESNQGVNAYNPSGASGLPQTMPCWGPNTTVDQQINAAVKAYKAQGLGANGF

SEQ ID NO: 11 secuencia de polipéptido

MKKTVIASTLAVSLGIAGYGLSGHAAHASETTVVDKAHL/DLAQHNPEELNAKPVOAGAYDIHFVDNGYQYNYFTSNQSEW
 SNWYAVACSDADYTESSSNQEVSAANTQSSNTNVQAVSAPTSSSRGYSSTSTTSYAPSNNYSSESSSVRLSNGNTAGSGV
 SYAAQAHAARTQVSASTWEHIIARLSNGQLNARNAAGAGLPQTMPCWGPNTTVDQQINAAVKAYKAQGLSANGH

SEQ ID NO: 12 secuencia de polipéptido

MNYRDKIQKPSIRKYTVGTFSTVIATLVPLGPTSSQAHAETNQPAEVVKQKQSSMNEQTEKRESQVQMSQNSQNSQSLS
 ATHENEQPNNSQAMLVNQKVAQSSTTNDEQPAQNVMTKDSATAATTQPKESIKQKQESQGANKNQNDRAAHVENH
 EAMVVTASDSSDNGNVQHDRNELQAFPDANYHYRFDRENADSGTFNYVKGIIDKINTLLGSRDPIMKDLQLAYKELE
 QAVALLIRTHPQRQTSRRSNRIQTRSVESRAAEPRSVSDYQWANSBYIVENANDGSOYPVQTYINASSKQAPYNLPTTPW
 NTLKASDSKETALMTAKQTGDGYQWVIKFNKGHAPHQNMIFWALPADQVFPVGRDTPVTVESDQTVQWNSHQAQAGANKP
 LQQMWEYGVNDPDRSHDFKIRNRSGQVIYSWPTVHVYSLDCLERASDYFSEAGATPATKAFGRQNFYINGQKPAESPGV
 PKVYTFIQGGDASYTISPKTQGPVVKLYYAAGGRALFYIQLPHYSQLYVESTQDHOQRILNGLRQVVMRTYIRIGTKRVE
 VSQENVQTKKVLSTNLNIDDPVDDPLSYVKTPSNKVLGPYPTNANTNAPRPGGVQELNETQLSOLFDDOKLQEAARTN
 PIRLMIGFDYDQYGNSETLVFVNLTVLPEIQENIKFFKIDDTQNIKPKPSKQAGHPVPVYVYAGNQGNAASVNLQGSVTS
 IQPLRINLTSNENFTDKDQITGIPRTLHIENSTNRNARERNIELVGNLLPGDYFGTIRPGRKSQLFEIRVKPHTPTI
 TTTASQLRGTAQLQKVPVNTISCIPLDPBALVYLVAPTNQTNGGSEADQIPSGYTIILATGTPDQVNTITIRPDQYVVFIP
 PVQKIRAVVYVYKVVASNNENAVTILPDDIPPTINNPFVGINAKYRGDEVNFTNQVSDRHSQIKNTITTLPSGWTSL
 TKSDUNKGSLAITORVSHNQAFNSDITPKVSATDNVNTNDSQSKVSIHVQKISEDANPIVLGNTKRVVVNPTAVSH
 DEKQSIITAPMKNQNIIRGYLASTDPVTVDMNGNVTLHYRDGSSTTLDATNVTIYEPVVKSEYQTANAATATVITANGQ
 SFNIGDIKQYFTLSNGQAIPIHGTPTNITSDRTIPTAQEVSBQNAQTQLYHIVASNAYHKDTSDFYISLKIIVDKQPEQDQ
 RVYRTSTYDLTTDEISKVKQAFINANRDVITLAEGDISVINTPNGANVSTITVINKORLTSPASNLANMPLRNVNFP
 QDYTVTWNAXIANRPTDGGLSWSDHKSIIYRYDATLGQITTDILTMLKATTTVPGLRNNITGNEKAQABAGGRPNY
 RTTGYSSQSNATTIDGQRFILNGQVIQILDIINPSNGYGGQPVNTNTRANHSMSTVNVNPEAANGAGAPTIDHVVKNS
 THNASDAVYKAGLYLTPYGPQYVEHLNQNTGNTDAINIFYVPSDLVNPITISVGNYNHGVFSGETPTNTITANDNFGV
 QSVTVFNSTQITGTVDNNHQHVSATAPNVTBATSKTINLLATDTSQNTATTSFVTVKPLRDKYVGTSSSTANPVRIAN
 ISMNAVSQADQTTIINSLTFTSNAPNRNYATASANEITSEKTVSHVSRGTGNANVTIVTHQDGTSTTVTVPKHVIPEI
 VAREHYTVQGGDFPAGNGSSAADYFKLSNGSAIPDATITWVSGQAPNKNDFRIGEDITVTAILIDGETTPTTKTATYKV
 VRTVPKHVFETARGVLYPGVSDMYDAQYVVKPVNNSWSTHAQHNNPQPVGTYPGNKDVVGISTRLIRVTVDRQTEDLTI
 LSKVKPDPFRIDANSVTYKAGLTNQEIKVMNVLNSSVKLPKADNTPLVNTNITHGSOFSVVTVSDALPNGGIKAKSEI
 SMNVVYTTTQDEHGVVTVTRNBSVDSNDSASYTVTPOLQATTBGAVFIKGGDGFDFGHEVFIQNPFGATVANHDSFD
 TWKNTVGNTHKTAVVTLPSGGGTRNVEVPVKYYPVANAKAPSRDVKQNLTHGTNAIDYITFDPTNIMGITAAWNRQQ
 PNNQAGVQKHLNVDVTPGISAAKRVPTVNVYQFEPPTTYTTTVGOTLASGTQASGYAHMQNASGLPTDGFYTKHNRD
 TTGTNDANWAAHMKPNTAQVYNAKYDVIYNGHTFATSLPAKFVVKDVQPAKPTVTETAAGAITIAPGAMQTVNTHAGNVT
 TYADKLYIKRNGNVVITFTRENTSPPWKEASADNVTCIVGTNMOITVAAGTFNPADTIQVYATQSGSETISDEQRSDDF
 TVVAPQPNQATTIKWQNGHIDITPNPSPCHLINPTQAMDLAYTEKVGNGAHSKTIWVROQNNQNTIANKPDYVTLDAQ
 TUKVTFNANTIKPHSSITITPKAGTGHFVSSNPSTLTAPAANTVNTTEIVKDYGSNVTAAEINNAVQVANKRTATIKGT
 AMPTNLAQGSTTTIPUTVTVYNDGSTEEVQESIPTKADKRELITAKHLLDDPVSTEGKKPGTITQYNNANENAGQQINTAK
 TEAQVINNERATPOQVSDALTKVRAAQTKIDQAKALLQNKEDNSQLVTSKNNLQSSVNVQVSTAGNTQOSIDIMYNAKRR
 EASTEITAAQRVIDNGDATAQOISDEKRVVDNALTAHQKHLTADTHALBQAVQQLNRGTITTOKKPASITAYNNSIR

Fig. 1.3

ALQSDLTSAKNSANAI IQXP I RTVQEVQSAL TNVNRVNERLTQA INQLVPLADNSALRTAKTKLDER INKSVTTDQMTQS
 SIQAYENAKRAGQTETTTNAQNV INNGDATDQQTAAEKT VEEKYNSL KQAIAGLTPDLAPLOTAKTQLQND IDQPTSTTG
 MTSASVAA PNDKLSAARTKI QSIDRVLASHPDVATTIRQNVTAANAAKTALDQARNOLTVDKAPLENAKQNDLQMS IDTOTS
 TTGNTQDSINAYNAKLTAAJENKVOQ INQVLGSPPTVDQI MTNTSAAHQAKSDLDHARQALT PDKAPLQNAKTQLBSQ INQ
 PTDTTGNTTASLNAYNQKLQAAKQKLT INQVLNGWPTVQNTNDKVAEANKQAKDQLNTARQGLTLDROPALTTLHQAENL
 NQAQCNPTTQOINAAQNHAALET I KENITALNTAMTKL KDSVADENITKSGQNYTDTATPANKQAYDHA VNAKGVIGFTT
 NPTMDVNTVMKKAASVKSTKDALDQOQNLQRAKTEATNAITHASDLNQAQKQAL TQQVNSAQNVQAVNDI KQTTQSLNIA
 MTGLKRGVAMHNCVVGSDNYVNAADTNKKNDYNNAYNHANDI INQNAQHPVITP SDVMNALSMTSKERHALNGEAKLMAAK
 QEANTALGHLNNTLNNVQONLOSQ INGAHQIDAVNTIKQNAWLNBAHGNLRQAVADKQVQKRTEDYADADTAKQAYNE
 AVSSAETI INQNTANPTMSVDDVNRATSAVTTNKNALNGDEKL VQSKTDAARAIDALPHLNNNAQKADVKSKINAASHIAGV
 NTVKQOQTDLNTANGNLQGA INDBOTTLNSQNYQDTPSKKTA YTNVQAAKDILMKSNQCNKTKDQVTEAMNQVMSAKN
 NLDGTLRLDQAKQTAKQOLNNTLTTAQKTNLTWQINSSTTVAGVHTVQSHANTLDQAMPNLTARQSIAMNDATKASEDYV
 DANNDKQTYANNAVAAETI INANSBPENNPSTITQKAEQVNSKKTALNGDENLATAKQNAKTYLNTLTSTITDAQKRNLI
 SQISSATRVSGVDTVKQNAQHLDDQAMHLQNGINNESQVKSSEKYEADDTNKKQSYDWAITAAKAILMKSTGPTAQNAV
 EALQRVNTAKDALNGDAKLTAAQSAKQHLGTLTHITTAQRNDLTWQIS

SEQ ID NO 13 secuencia de polipéptido

MGNLQTA INDKSUTLASQNF LDADBEQKRNAYNQAI SAETILNKQTGPNTAKTAVEQALADFNVNSAIGHALNGTQNLNNAKQ
 AAITAINASDLNQQKQKDALKAQANGAQRVSNANDVQRNATELNTAMGOLQHA IADKTNITLASSKYVMADSTKQNAVTTK
 VTNAEHI IISGTPTVVITPSEVTAANQVNSAKQELNGDERLRVAKQNAITAIDALTQNLTPQKAKLKEQVQQAARLEDOVQ
 SVQTNQGSILNNAKGLRDSIANETTVKASONTTDA SFNNQSTYNSAVSNAKGI INQTNPTMOTSAITQATTVQVNAKNG
 LNGAENLRNAQNTAKQNLNTLSHLTNKQKSAI SSQIDRAGHVSEVTAANKAATELNAQMGNLQGA INQNTVVKQGVNPTD
 ADKAKEDATYNAVSRAETI LNKTOGANTSKQDVEAAIQNVTSAKNALNGDQNVNTAKNAKALNNTLS INNAQKRLT
 KTDQATTVACVEAVSNTGTQLNTAMNLQNG INDKANTLASENTHDAOSDKKTA YTQAVTNAEMI LNKSGSGLNLEKAAVE
 NALBQVTNAKAGALNGWNLQAKSHANTT INGLQHLTTAQKDKLKKQVQQAQNVAGVDVT KSSANTLNGAMOTLRESIQO
 NTATTGQGVYLDATERKNTYNNAVDSANGVINATSNPNMDANA INQIATQVTSKHALDGTHMLTQAKQTATNAIDGAT
 MLNKAQKDALKAQVTSAGR VANVTSIQQTAEHLNTAMGOLQNG IDDENATKQTKYRDAEQSKKTA YDQAVAAAKAILNK
 QVGSNSDKAAVDALQOVTSTKDALNGDAKLAKAARQNLGTLNHI TNAQRTALEGGQ INQATTVDGVNTVKTANTLQ
 GAMNSLQGA INDKDATLRNQNYLDADES KRNATYQAVTAAEG ILAKQTKGNTSKADVDNALNAVTRAKAALNGAENLRKA
 KTSATNTINQLPNLTQLQKDNLKHOVEQAQNVGVGVKDKNTLNTAMGALRTS IQNDNTTKTSQNYLDAESDKWBYN
 TAVNNANGVITATNPNMDANA INDMANQVNTT KAALNGAQNLAQAKTNAITMT INNAQDLNQQKDALKTQVNAQRVSD
 ANNVQRTATELNGAMTALKAATADKERTKASGNYVHADQSKRQAYDSKVTNAEMI INQTPHATLTVDVNSAASQVMAAK
 TALNGDNLRVAKKHAHNT IDGLAQLNNVQKAKLKEQVQSBATLDGVQTVKMSQTLNTAMKGLRDSIANEATIKAGQNY
 TDASPNRNEYSQAVTAAKAI INQTSNPTMEPNTITQATSQVTTKERHALNGAQNLAQAKTNAITMT INNAQDLNQQKDAL
 TRNIDGATTVAGVMEQATAKATELNNAMHSLQNG INDETQTKQTKYLDAPSKSKSAYDQAVNAAKAILTKAQQVVDKAA
 VEQALQNVNSTKTALNGDAKLNEAKAAAKQTLGTLTHIENNAQRNALDNETQATNVGVMTVKAKAQQLDQAMQGLTSTI
 RDKDTTLQSQNYQDADDAKRTAYSQAVNAATILNKTAGCNTPKADVERANQAVTQANTALNGIQMLERAKQAANTAITN
 AEDLNTKQKALKAQVTSAGRVSAAANGVEHTATELNTAMTALKRAIADKADTKASQNYVHADANKRQAYDEKVTAAEHI
 SGTPTPTLTPSDVTHAATQVNTAKTQLNGHNLLEVAQKQNTAIDGLTSLNGPQKAKLKEQVQSBATLDGVQTVKMSQTL
 LNTAMKGLRDSIANEATIKAGQNYTDASQNKQNDYNNAVTAAKAI IGQTTSPSHIAQE INQAKDQVTAKQOALNGQENLR
 TAQNTAKQHLNGLSDLTNAQKDAAKRQIEGATHVNEVTQACNNADALNTAMTALNGIQOQNTIKQGVNFTDADBAKRNA
 YTNNAVTOAEQILNKAQGPNTAKDQVSTALQFVQRAKNELNGNQVNAKTTAKMALNNTLSIENNAQKAAKLEQIEGATT
 AGVNVQVSTHASELNTAMSNLQNG INDEAATKAAQKYTEADRDKQTA YMDAVTAAKTLLDKTAGSNQNKVAVSQALQRVNT
 AKTALNGDARLNEAJQNTAKQQLATHSHLTNAQKANLTBEQIERGTTVAGVQOIQANACTLNGAMNQLRQSIASKDXTKSSSE
 DYQDAWADLQNA YMDAVTNAEG IISATNPNEMNPDT INOKASQVNSAKSALNGDEKLAAVKQTA KSDIGRLTOLNNAQRT
 AANAEDVQAPHLAAVTAAKQKATSLNTAMGNLKHALASKDNTKRSVNTTADQPKQQAYDTAVTQAEAI THANGSHANET
 QVQALNQLNQAQKNDLNGDNKVAQAKETAKRALASYSLNNAQSTAATSQIDNATTVADVTAQAQNTANLNTAMGOLQNG
 INQNTVVKQGVNPTDADQKQKDAYTNNAVTHAQOI LOKANGQNTKQVBAALNQVTTAKNALNGDANVROAKSDAKANLQ
 TLTHLNNAQKQQLTSQIEGATTVNGVNSVKTAKQDLQAMQRLSBAIANKDQTKASENYIDADPTKKTAFDHAITQAESY
 LNKDHGTNKKQKQVEQA IQSVSTENALNGDANLQCAKTEATQAIDNLTQLNTPQKTALKQGVNAAGRVSQVTDLQKESAT
 SLNNANDQLKQAI GDHDTIVAGGNYTNASPDKQQAYTDAYNAKHI VNGSPHVI TNAADVTAATQRVNMAETS LNDQTL
 ATAQQAQDALRQMTLSDAQKQSI TQIDSATQVTVGVSVKQNAWLNBAHGNLRQAVADKQVQKRTEDYADADTAKQAYNE
 AYNNAVTSANETI NATSPTLDP SAVTQAAKQVNTKNTALNGAQNLANKQETTANINRLSHLNAQKQDLNTQVTKAPN
 ISTVNVQVTKAEQLDQAMERLINGIQDKDQVQSVNFTDADPEKQTA YNNAVTAAENI INQANGTNAHQSVBAALSTVT
 TTKQALNKDQKVTDAKNNANQTLSTLDMNLNNAQKQAVTQNTINQARTVABVTQAIQTAQELNTAMGNLKNLNDKDTLGS
 QNFADADPEKKMAYNEAVRNAENILNKSTGTNVPKQDQVEAMNQVNTTAAALNGTQNLKAKQNAITAIDGLSHLTNAQK
 EALKQLVQOQSTTVAAEQGNEQKANNVDAANDKLRQSIADNATTIKQVQNYTDASPNKQDAYNNAVTTAAGGII DOTTPSLD
 PTVINQAGQVSTSKNALNGNENLEAAKQQATQSLGSLDNLNAQKQAVTQNTINQARTVDEANQIKQNAQNLNTAMGNL
 QALADKDATKATVNTDADQAKQOAYNTAVTNAEMI ISKANGGNATQTEVQAIQVMAAKQALNGNANVQHAIDEATAL
 INNSNDLNGAQKDALKQOVQNAATTVAGVNVKQTAQELNNAHTQLKQGIADKESQTKADGNTVNASDQKQAYNQAVAKAE
 ALISGTPDVVITPSEITTAALNKVTOAJNDLNGHTHLATAKQHVQHAIDQLPHLNGAQRDEYSKQITQATLVPNVNAIQQA

Fig. 1.6

MQLRQSTAKKQVKAQSKYLWEDPQIKQNYDDAVORVETIINSTONPELLKANIDQATQSVONAEQALHGAELMWDQXQ
 TSSTELDGLTDLTDAQREKLREQINTSNRDDIKQKIBQAFALNDAMKLLKSOVAQKQGVRAESDYTHEDSAQKDAYWHA
 LKQAEIINWSENPNLKAQDITNALNNIKQAQONLHGAQKLODDKNTTNQAIQNLNHLNQPQKDALIQAINQATSRQOVA
 EKLKEARALOBANKQLEDQVNOQDDQISNSSPFINEDSDKQETYNOKIQAACEIINQNTENPTLDKQKIDATLQNTIKDAVEN
 LMGDQKLAQSKQDANKQLWELDDLTSEQKXHFKPLTHADTRDEVMKQLEIAKQINGDMSTLHKVINDDKQIQHLSNYIN
 ADNDKKQNYDNAIKEAEDLIHMHPTLDHKAQDOLLNKIDQAHNWLNGESRFEQALDHALMDIDSLNGLVFPQRTVKXN
 INHVTTLESIAQELQKAKELNDAMKAMRDSIMNQSQIRKXWNTYTHEDLAQONAYWHAVDKINNIIIGEDNATMDPQIIKQA
 TQDINTAINGLMDQKLDQAKTDAKQITINFTGLTEPQKQALENIINQOTSRAEVAKQLSHAKFLSGKPEELKVAVAKAS
 LVRQNSNYINEDVSEKEAYEQALAKGQEIINSENPTISSTDIWRTIQEINDABQNLHGDWKLRAQAEIAKNETIQNLDDL
 NGAQITIKLQDIDGRITTKPAVTQKLESAKAINQAMQOLKQSIADKDATLNSNLYNEDSEKKLAYDNVBSQAEQLINQLN
 DPTMDISNIQAITQKVIQAKOSLHGANKLAQNAQDSHLIIINQSTHLNDKQKQALNDLINHAQTQKQVABEIIAQAKLME
 MOTLKTLEVEQSNVHQSSXYINEDPQVQNTYWSIQKGREILNQTDDVLNNKIKADATQNTLTKNDLHGDOKLQKAAQ
 DATNMLNYLTNLNNSQRQSEHDEINBAPSRTEVSDMLSHAKALNEAMRQLENEVALENSVKLSDPFINEDBAQHEYSWA
 LQKAKDIINGVPSSTLDKATIEDALLEQNAHESLHGQKLEAKNQAVAEIDNLQALNPOQVLAETKLVNQASTFPEVQ
 EALQKAKELNEAMKALKTEINKCEQIKADSRVMDSGLOQANYVSALNYGSGQIATTOFFELKOVINRATQITIKAEWN
 LNOQKLABAKSGDNQSIEHLOGLTQSQKDKQHDLINQAQTKQVDDIVNNSKQLDNEMNLOQIIVNNDHTVQKNSDFIN
 EDSQDQDAYWHAIAKAKDLITAHPTTMDKXQIDQALENIKQALNDLHGENKLSKEDKKEALSQQLNLSLTSQKQDITLNE
 IPBAPTRSQVQKELNHLHGDQKLANDKTDAQATLEALNYLNQAQKRLSTKVQMSNSRPEVQKVVQIANQLNDAMKLLDQAL
 VLNKVTQITKQNLHGDQKLANDKTDAQATLEALNYLNQAQKRLSTKVQMSNSRPEVQKVVQIANQLNDAMKLLDQAL
 DAIKQTSNVIINEDTSQVNFDSYTDGKKNIAEQINPMSPTNINFTIADKITEAKNDLHGVQKQKQAAQSSINTINQMTG
 LNQAQKELNQEIQQTQTRSEVHVQVINKAQALNDSMPTLRQSIITDEHEVQTSNINETVGSQTAYNDAVDKVKQIINQTS
 SNFTMNPLEVERATSNVKKISKDALHGERELNDNMSKITFAYNHLNDMLNQAQKALTHEIQATIVSQVNTYKAKALNE
 DMQGLQIVAQQDNVQKSNYINEDSTPQNMVNDTINHAQ31IDQVANPTMSHDEIENAINWIKKAINALDOEKHLQKAK
 EKANLLINSLNDLNAPQORDAINRLVNEAQTRKVAEQLSQAQALNDAMKHLNLSIQNQSSEVRQESKYINASDAKKEQVNE
 AVREVENIINEQHTLDEKIEIKQLTDGVNQAENDLNVELLDADKQNAHQSIPTLMLNQAQNALNEKMAVTRTEVA
 ALIQKAKLDHAKENLESIKDKBQVQKSSNYINEDSDVQETYNDAVDHVTILNQTIVHPTLSIEDIEAHINEVNAKQKQ
 LRGKQKLYQITDLADKELSKLDLTSQSSSISNQIYTTAKITTEVAQAIKKAESLNHAKALNKKVYKADKVLDSERFIN
 EDQPEKKAQQAINHVDSIINHQTNPEMDPTVIRSIITHELSTAQNLRGDQKLAHAQQAABVITNGLTHLVNAQREVMIN
 TYNATTRKVAQNLNDNAQALDKAMETLQOVVAHQWIIINCSKYLWEDSKYQQYDREVLADEQLNQLTNTPTLEPTKVD
 IVKDNVLANEKILPQAEKLSYDKSNANDEIKHNMVILNNAQKQSIKIMISHAALRTEVKQLLQQAQKILDEAMKLEDEKQV
 VITDPTLPHYTEASEDKKERYDQTVSHAQAIIDKINGSNVSLDQVQALEQLTQASBNLDQDQVREARVHANQITDQIT
 HNLNGLQIVAKESVVKATKLEETATVENMAQALNKMQLQFINHADSVEHSDMYRQADDDKIYADALHGGQIQNT
 WATQNETKQALQQLIYAEPTSLNGFERLNBAPRALFYIKSLEKINNAQKSALEKVTQSHDLLESEHTVSESTNLDWIMG
 ELANAIWNYAPTASINYINADNLKDNFTQAINBARDALNKTOQQLNDPWAIDTPKDIPKTKDALNGITERLTAASK
 AEKLDLSLFPINKAQPTHANDEIMNTINSIAQLSRIVNQAFDINDAMKSLRDELNNQAFFVQASSNYINSEDELRQQFDBA
 LSNARKVLAKENGKMLDEKQIQGLKQVIEDTADALNGIQRLSKAKAKAIQYVQSLSEYINDAQNHIAENINHSDDLSELA
 NTLSKASDLNDAMKDLRDTIESNSTSVPSNVYINADENLQIEFDEALQASATSSEKTEENPATIEEVLGLSQAIYDTKN
 ALNGBQRLATEKSKDLKLIKGLKDLKQALEDTNKNVNSANTLTLSQLTQSTLEKNDJMKLLEDKLTLVNFKASLNY
 RNADYNLKRQFNKALKEAKGVNLNKSQTNVNDIQHLLTQIDNAKQDNGERRLKENGQKSEVPIDKELDLNNAQKAA
 IINQIRASKDIKIINQIVDNAIELNDAMQQLKEVVAQLTATTQNTIEYLNADKOKIKQYDYADNLAMNVLDEKNGTNKQA
 NIITIQMIQMDARALLNGIERLKDAQTKAHNDIKDTLKRQIDEISHAMATSNKKAQAKQMVNBEARKALSNINDATSD
 LVNQAQDEQSAITEHIADELPKAKLDANQMDQKVEDINHLISQNPWLSNEEKKLIISQINKLVNGIKWFIQQAIVNQKQ
 IENATTKLDEVIETTKKLIIAKABAKQMIKELSQKRDAINWNTDTPSQKALALADIDKTEHDAHQIENESISDDINW
 NKEHAFNTLANIIIMDTDQQLVPELPFELSLOMALVTSVVVVRDETISLESIIQAMTIDELKVNIVELPSTOKVADHL
 TAKVKVILADGSGYVTVNVPVKVVEKELQIAKDAIKTIDVLVKQKIKDIDSNMELTSTQREDAKASIERLKQQAIDKVN
 SKSIKDIETVKRTDFEEDQDFPKRPTLNKAKNDIITDVNTQIQNGFKEIETIKGLTSHEKTQFDKQLTALQKEFLKVE
 HARNVELSLQLOQEFBNRYKHIIINQAHLLGEKHAESHKLGYYVVKTKQQLNMQSASYPINQWALDRIXQIQLETHNISIR
 QANTVQDVNKAQQIEQILKVNYSIINQSFNDSLNFNHLSKPDARLREKOVANHIVQTSFKEVLKGTGVEPGKINK
 ETQPKLHKNDNDSLFKHLVDNFGKTVGVITLTLGLSSFWLVAKRRKKKEKQSIKNNHNDIRLSDTDKIDPIVITIK
 KIDKEBQIQMDKHSIPVAKRKKSEKQKLSSEDIHSIPVKKRQNSDNKDTQKQKVTSSKKKTPQSTKKVVKTKKRSKX

SEQ ID NO: 16 secuencia de polipéptido

MEDKGFVNKRVDFLSKLNKYSIRKFTVGTASILIGSLNYLGTQQAARAAEMNIENFTTLKMNVSKEVKIEVTKNDT
 APQGVKAESEVTSNKDTIEKASVKARDISEKEDTPKEVANVAEVQKSSVTNBARPKVRKARSVDGSGFDITRDSIONV
 VESTFITIQKKEHFGYGSVDIQNPTDLQVSEVTRFNVCNESGLIGALQLNKKIDFSKDFNFKVXVANDHQSNTTGAD
 GNGFLPSKGAEEYLTRGILGDQGLVSGGFKIDTGYIYTSMDKTERQAGQGYRQYUAFVKHDSGNSQNVGEMIDKS
 KTNFLAYADHSTNTSDGKPHQQLNDVILTYVASTGKQRAEYAGKTWETSITDLGLSKWQAYNPLITSSQBNGLWQGINA
 NQWNRDCLKSSEFTTPEAPKTIITLSEKKVEEIPFKCEBKFPDLAPOTEKVTREQKQKETTITPTLENPLTGBIISKQ
 ESKEEITKDPINELTEYGPETIAPGHRDEFDKLPTEKEEVPKPGIKWPEFGDVVRPPVDSVTYKGPVKGDSIVKKEE
 IPFEKERKFPDLAPOTEKVTREQKQKETTITPTLENPLTGBIISKQSSKEEITKDPINELTEYGPETIAPGHRDEFD
 KLPTGEKESEVPKPGIKNPNPETGDDVVRPPVDSVTYKGPVKGDSIVKKEEIPFKKERKFPDLAPOTEKVTREQKQKETTIT

Fig. 1.7

TFTLKNPLTGEIISKGESKEEITKDPINELTEYQFETITPGHRDEFDPKLPTGKKEVVPKPGIKNPFETGDDVVRPVDVSV
TKYGPVKGDSIVEKEEIPFEKERKPNPDLAPOTEKVTRBOQKDEKTIITFTLKNPLTGEIISKGESKEEITKDPVMELETS
PQGEKIPQGHKOIFDPNLPTDQTEKVPKPGIKNPDGKVIIEFPVDDVIEHGPKTGTPTKTVIIPFETKREFPNKLQPG
SERVKQEGQPGSKTITFTITVNPLTQEKVGEQPTSEITKQPVDKIVEPQGEKPKDPKGPENPKKPSLPNPSQPVNPNM
PGLSKDRAKPNPVPMSDKNDKVKKSKIAKESVANQEKRAELPKTGLESTQKGLIFSSIIIGIAGLMLARRRKN

SEQ ID NO 17 secuencia de polipéptido

HGKRRQGPINKVDPLFMKLNKYSIRKFTVGTASILLGSTLI FGSSSHAKAAEEKQVDPITQANQNDSSERSLENTSQP
TVNNEAPQMSSTLQAEESNAEAPNVPTIKANSNDNTQTQFSEAPTENDLARKEDIPAVSKREELQSSQPNDSKIEPTT
SEPVNLYSSPFMSLLSMPADSSSNMTKNTIDIPFTTVKORDNYDFYGRVDIQSNPTDLMATKLTRYNYGQPPGTTTAAQ
VQFIKQVSEFDKDFPNIRVANNRQSNITGADGQGFMSKIDGDDFLKNGQILREKOTPSAAGFRIDTGYYNDPLDKIQK
QAGQYRQYGTTFVQNDSCQNTSKVQSGTPTSDFLNYADNTTNDLQKPHQKLNKNVNLKYNASHQTTFATYAGKTWTATL
SELOLSPDOSYNFLVTSSQYGHGNSGTYADGVMRADLDGATLTYTPKAVDGDPTTSTKEIIPFKKREFDPNLAPOTEKVY
QKGEFGIETTTTTTYVNPNTGKVKGEPTTKITKQPVDEIVHYGGEIKPGHKDEFDPNAPKGSQITTPGKPGVKNPDT
GEVVTTPVDDVTKYQPVDDPTTSTEEIPFDKKREFPNPLKPGKEERVVKQGEPTTKITITFTTNPLTGEKVGGEPTTEK
ITKQPVDEITEYQGEIKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTKYQPVDDPTTSTEEIPFDK
KREFDPNLAPGTEKVVQGEPTTKITITFTTNPLTGEKVGGEPTTEKITKQPVDEIVHYGGEIKPGHKDEFDPNAPK
GQEDVPKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTKYQPVDDPTTSTEEIPFDKKREFPNPLKPGKEERVVKQGEPTTKITITFTT
NPLTGEKVGGEPTTEKVTQPVDEIVHYGGEIKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTKYQ
VDGDPITSTEEIPFDKKREFDPNLAPGTEKVVQGEPTTKITITFTTNPLTGEKVGGEPTTEKITKQPVDEIVHYGGE
IKPGHKDEFDPNAPKGSQITTPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTKYQPVDDPTTSTEEIPFDKKREFDPNLAPOTEKV
QKGEPTTKITITFTTNPLTGEKVGGEPTTEKITKQPVDEIVHYGGEIKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPKPGVKNPDT
GEVVTTPVDDVTKYQPVDDPTTSTEEIPFDKKREFDPNLAPGTEKVVQGEPTTKITITFTTNPLTGEKVGGEPTTEK
VTQPVDEIVHYGGEIKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTKYQPVDDPTTSTEEIPFDK
TPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPG
ANBGLVQSLALVGLFIPGRKKGNEK

SEQ ID NO. 18 secuencia de polipéptido

MKKLYTSYGTGYGLNQLIKNNPTHQLFQFSASDTSVIFSEIDGSETVLKSPSIEYVIEKEIGEFSEHHFYCAIFIPSTEDHA
YQLEKKLISVDNFRNPGGFKSYRLLRPAKOTTYKIYPGADRHAYEDFKQSDAFNDHPSKDALSHYFGSSQGHSSYFER
LYPIKE

SEQ ID NO 19 secuencia de polipéptido

MYLYTSYGTGYGLNQLIKNNPTHQLFQFSASDTSVIFSEIDGSETVLKSPSIEYVIEKEIGEFSEHHFYCAIFIPSTEDHA
YQLEKKLISVDNFRNPGGFKSYRLLRPAKOTTYKIYPGADRHAYEDFKQSDAFNDHPSKDALSHYFGSSQGHSSYFER
LYPIEDH

SEQ ID NO 20 secuencia de polipéptido

MINRDNKKAITKKGHISNRLNKFIRKFTVGTASILVGTLLIFGLNQBAKAAEWTSTENAKQDDATTEDNKEVVSATEN
NSTTENDSTNPIKKEINTDSQPEAKESSTTSSTOQQNNVTATTEKPKQNIENKVPSTDKTATEDTSVILEKKAPNY
TANDVTXKPSSTSIQTKPTTPQESTNIENSQPPTPSKVDNQVTDATNPKEPVNVSKEELQNNPEKLKELVRNDNHTDRS
TIQVATAPTSVAPKRLNAKMRPAVAQPAVAENNVMDLITVTKQTIKVGDQKONVAAHDKDLEDTTEFTINDKVKKQD
TMTINYDKNVIPSDLTDKNDPIDITDPSGEVIAKQTFDKATKQITTYTFTDYVDKYEDIKARLTLYSYIDKQAVFNETSLN
LTFATAGKETSQNVSDYQDPMVHGDNSIQSIFTKLDEKQTTISQYIYVNPCLKTATNTKVDIAGSQVDDYQNIKLQNGS
TIIDQNTTEIKVYKVNPNQQLPQSNRIYDPSQYEDVTSQPDNKKSFSENVATLDFGDINSAYIIKVVSKYPTPTSDGELDIA
QOTSMTTIDKYGYNYAGYSNFIVTSNDTGQDGTVPKEKLYKIGDYVWEDVDKQVQGTDSKEKPMANVLVTLTYPDG
TTKSVRTDANGHYEPGGLKQGETTYTVKFTPAGYLPKVNQTTDGERDSNGSSITVKINGKDDNSLDNGFYKEPKYNLGD
YVWEDTNKQGIQDANEPOIKDVKVTLDKSTGKVIOTTTTTDASGKYKFTDLNNGWYTVFETPAQYTPFVNTTAEKQDSN
GLTTTTOVIKDADNMTLDSGPYKTPKYSGLGYVWYDSNKGQDSTEGIKDVKVTLLNKGQFVIGTTTIDENKQYRFDNL
DSGKYKVIPEKPAQLTQVTNTTEDDKDADGQEVDTITDHDFFILONGYFEEDTSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD
SD
SD
SD
GGLFAALGSLLLFORRKQNK

SEQ ID NO 21 secuencia de polipéptido

MINKNNLLTKKPIANKSNKYAIRKFTVGTASIVIGATLLFGLGHEAKAEENSVDVKDSNTDDELSDNDQSSDEEK
NDVINWQGINDDNNQIIKKEFTNNDYDQIEKRSERTESTINVDENEATPLQKTPQDNTHLTEEVEKESSEVSESSNSI
DTAQPSHTTINREESVQTSNDNVDSHVSDFANSKIKESNTESQKRENTIYBQPNKVKEDSTTSQPSGYTNIDEKISNQDS
LLNLPINEYENKARPLSTTSAPPSIKRVTVNQLAAEQGSNNHLIKVTDQSITEGYDDEGVIKADDAENLYDVTFEVD

206

HPNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKAEKLLAPYKKAKTTLERQVYZLNKIQDKLPEKLAKEYKQKLEDTKKAL
LDEQYKSAITEFQNVQPTNEKMTLDQTYKVVYVESVEHESMMDTFVKHPIKTGMINGKKYVMETTEDDYKWDPMVQSG
RVRTISKDANKNTRTIIFPYVEGKTLXDALVYHVKTIIDYDQYHVRIVDKEAFTKANTOSKNEKQSGAKKEATPAT
PSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDMKQLPSVEKENASSSESGKTKPATPTKEEVSSESTTPYKVYSTQGVAKFTTASSK
TKTDVQVTSAGSSSEAKDSAPLQKANIKNNTDNGHTSQNNKNTQENKAKSLPQTGEESNKDWTLPWALLALSSIVAFVLP
RERKI

SEQ ID NO 29 secuencia de polipéptido

[illegible]

SEQ ID NO 30 secuencia de polipéptido

[illegible]

SEQ ID NO 31 secuencia de polipéptido

MKNLRYGIRKHKLAGAASVPLGTMIVVGMGQDKEAASBQKTTTVEBNGNSATDNKTSSETQTTATNVNHIETQSYNATV
 TEQPSNATQVTTTEAPKAVQAPQTAQPANVETVKEEEKQPV:ISTTQPPQNGNQQRQVDLTPKVKVTPQGGTSTQVBEAQQP
 TASESPKPRVTRSDADVAGAEASDVSEVKGTDVTSKVTVESGSI EAPQGNVEPHAGQVRVLVYKLYKFDAGLKRGDYDFPT
 LSHNVNTYQVSTARUKVSPRIKNGSVVMATGTEILGNGNIRYFTFNIIEHKVEVTANLEINLFDIPKTPQSGNBQKITSKLG
 ETEKTIIPVYNPQVNSINTVNGSIEITFNKESNKFTHIAYIKPMNGNQNSNTVSVTGTLTBGSNLAGGQPTVKVYEYLCK
 KDELPQSVMYANTSDTNKFKDVTKEHNGKLSVDQNGGYSLENLDKLDKDTYVIHYTGEYLGQSGQVMPFTELXYGPBEAYSG
 YVYGQVRLTWDNQLVLYENKADGNGKNGQIIQNDNFYKEDAKGTMTSGQYDAKQIITEBNQNTPLDIDYRATIDSG
 GYVDGYIETIBEDSSAIDIDYTAVDSVGVHVGTYTESBEISNIPDEESTHNSKHADVVEYEDTTPPOGGQVTTES
 NUVFDEESTKGIQVTAVSDDHTIEDTKEYTTTESNLIELVDZLPEKHGAQQPIIEITENNHHISHSOLGTENHGHNGYV
 IEEISENSHVDLKSELGYEGGQNGSGNGSFEEDTEEDKPYEGQGNIVDIDFDSVPQIHQWNGDQGFEEEDTEKDKPKYR
 GONIIDIDFDSVPQIHGFNKHNEIIEEDTNKDKNPYQFGHNSVDFEEDTLPKVSGQNEGGQTTIEEDTPPTPTPEVPS
 EPETPMPTPEVPDSPEPTPTPEVPSEPETPTPTPEVSEPETPTPTPEVPSEPETPTPTPEVPAEPGKFPVPAK
 EEPKPKSPVGEQKVVTPVLEINEKVKVAPTAKAQSCKSELPTGGEESTNKQMLPGOLF8ILGLALLRENNKKNKA

SEQ ID NO. 32 secuencia de polipéptido

[illegible]

Fig. 2.1

SEQ ID NO 34 secuencia de polinucleótido

ATGTTACAAGTAAGTATGATGTAAGTTTACGTTTGGAGATCGTAAACTATTGGAAGATGTAAATATTAAATTTACAGAGG
 TAATTGTTATGGAATTAATTGGTGGCAATGGTGCAGGTAAATCAACATTCTTAAATATATTATCTGGTGAATTAAGATTCTC
 AAACAGGACATGTTTCATTAGGTAAATTAAGCTCTAAGCTGTTTAAACAGGACCACTATGCTTATGAAGATGAACGC
 GTGCTTGATGTTGTAATTAAAGGTACGAACGTCCTTTATGAGGTTATGAAAGAAAAAGATGAAATCTATGAAGCCAGA
 TTTCAGTGATGAAGATGGTATCCGTGCTGCTGAACCTTGAAGGTGAATTTGCAGAAATGAATGGTTGGAAATGCTGAAGCTG
 ATGCTGCTAAACCTTTTATCTGGTTTAAAGTATCGATCCAACTTTACACGATAAAAAATGGCTGAATTAGAAACACACAA
 AAAATTAAGTATTATTAGCGCAAGTTTATTCGGTGAACCAAGCTACTATTACTGGATGAGCCTACTAACCGTCTCGA
 TATTCAGCAATCAGTTGGTTAGAAGATTCTTAATTAACTTTGATAATCTGTTATCGTAGTATCCCATGACCGTCAAT
 TCTTAAATAATGTATGTACTCATATCGCTGATTTAGACTTCGGTAAATTAAGTTTATGTTGGTAACTATGATTTTTGG
 TATCAATCTAGTCAGTTAGCTCAAAAGATGGCTCAAGAACAAACAGAAAAAGAGAAAAATGAAGAGTTACAGGA
 CTTTATGCAAGCTTTCTCAAGCTAAAGCTTCTAAATCTAAACAGCAACAAAGTCGTAAAAACAACTTGAGAAAAATGAAT
 TAGATGATATTCAACCATCATCAAGAGATATCCCTTCGTTAAATTCACGCTGAGCGTGAGATTGGTAACGACTTATTA
 ATCGTTCAAAATCTTTCTAAACAAATTGACGGCGAAAAAGTATTAGATAATGTATCATTACAAATGAATCCAAATGATAA
 AGCGATTTTAAATGGAGATAGTGAATTTGCAAAACCAACATTACTTAAATATTAAGCTGGCGAAATGGAACCAAGCAAG
 GTTCATTAAATGGGGTGTACTACATCATTAAAGTTACTTCCTTAAAGATAACTCAGAGTTCTTTGAGGGTGAATATG
 AATCTCGTTGATTTGGTTAAGACAATATGCTCTGAGATGAACAAACAGAAACATTTTACGTTGTTCTTAAAGTATG
 GTTATTTAGTGGTGAAGAGTTAAGAAAAAGCTAGTGTGCTTTCAGGTGAGAAAAAGTACGTTGTATGCTAAGTAAAA
 TGATGTTATCAAGTGCATGATGTTACTTTACTTGACGAACCTACTAACCACTTAGACTTAGAAAGTATTACTGCTGTAAT
 GATGGTCTTAAATCATTAAAGGTTCTATCATCTTACTTCTTATGACTTCGAATTTATCAACACGATTGCAAAACGTTG
 TATCGATTTAAATAAACAGGCGCGCTTTCAAAAGAAATTCATATGAAGAATACTTGCAGAAATCGGCGTTTAAAT
 AA

SEQ ID NO: 35 secuencia de polinucleótido

ATGTTACAAGTAAGTATGATGTAAGTTTACGTTTGGTGAATCGTAAACTATTGGAAGATGTAAATATAAAATTTACAGAGG
 TAATTGTTATGGAATTAATTGGTGGCAATGGTGCAGGTAAATCAACATTCTTAAATATATTATCTGGTGAATTAAGATTCTC
 AGACTGGTCTGATCTCTAGGTAAAGATGAGCGTTTGGCTGTTTAAACAGGATCAATTTGCTTATGAAGATGAACGT
 GTTTAGATGTTTGAATTAAGGACATGAACGTTTGTATCAAGTGAATGAAGAGAAAGATGAATTTATATGAACCTGA
 TTTCAGCGATGAGGACGGTATTTCGCGCTGCAAGCTTGAAGAGAAATTTGCAGAAATGAACGTTGGAAATGCTGAAGCTG
 ATGCTGCTAACTTATTATCAGGATTAGGCTAGAACCTGACTTACATGATAAAAAATATGCTGAACTTGAAAAATATCAA
 AAGTTAAGGTATTGTTAGCTCAAGTTTATTTGGTGAATTCCTGACCTTACTAGATGAGCCTACCAATGGTTAGA
 TATACCAGCAATAAGTTGGTTAGAAGACTTTTAAATTAATTTGAAAAATCTGTTATGCTGTTTCGCATGACCGTCACT
 TCTTAAATAATGTTTGTACTCATATTTGCTGATTTAGACTTGGCAAAATTAACCTTTATGTTGGTAACTATGATTTTGG
 TATCAATCAAGTCAATTAGCACAAAAATGGCACAGAACAAATAAGAAAAAGAGAAAAATGAAGAGTTACAGGA
 TTTTCATGCGACGCTTCTCAGCAATGCTTCTAAATCTTAAACAGGCAACAACTCGTAAGAAACAAATTAGAAAAATTAAGAT
 TAGATGATATCCAGCCATCATCTGATAGATACCTTACUTGAAATTTACTCCTGACGTGAATTTGGAATGATTACTT
 ACAGTAGAAAAATCTTTCTAAACAAATTGACGGCGAAAAAGTACTAGACAAATGTTTCAATTCATATGAATCCTAATGATAA
 AGCTATTTAGTTGGTGAATGAGCAATTTGCTTAAACAAACATTTGTTAAAAATTTTAGCTGGAGAAATGGAACCAAGATGAAG
 GTACATTTAAATGGGGTGAACGACATCTTAAAGTTACTTCCCTAAAGATAAAGTCTGAGTTCTTTGATGGTGTGATATG
 AATTTAGTTGAATGTTTACGTCAATACGCTCCAGAGATGAACAACTGAAACATTTTACGTTGTTTCTTAGGTTGCGATG
 GTTATTTAGTGGTGAAGAGTTAAGAAAAAGCAAGCGTCTTTCAGGTGAGAAAAAGTACGTTGCAATGTTAAGTAAAA
 TGATGTTATCAAGTCTAACGTACTTTTACTTATGAGCCAAACAAACCAATTAAGATTTGGAAGATATCACTGCTGTAAT
 GACGGATTAATCAATTTAAAGGTTCTATCATCTTCACTTCTTATGATTTTGAATTTATTAATCAATCAGCAATCGAAT
 GATTGACTTGAATCAAGCTGGTGCCTTTCTTAAAGAAATACCTTATGAGGAATACTTACAGAAATGGTGTATTACAAA
 ATAATTA

SEQ ID NO 36 secuencia de polinucleótido

ATGCCAATTATTACAGATGTTACGCTCGCAAGCTTAGACTCTCGTGGTAACCAACTGTTGAAGTAGAAGTATTAAAC
 TGAAAGTGGCGCATTTGGTGGTGCATTAGTACCATCAGGTGCTTCAACTGGTGAACAGGAGCTGTTGAATACGTGATG
 GAGACAAATCAGTTTATTTAGGTAAAGGTGTTACTAAAGCAAGTTGAACAGCTTAAATGAATCAATCGCACCAAGAAATATT
 GAAGGTGAATTTTCAAGTATTAGATCAAGTATCTATTGACAAAAATGATGATCGCATTAGACGGTACTCCAACCAAGGTAA
 ATTAGGTGCAATGCTATTTAGGTGATCTATCGCAGTAGCAGGTGACGAGCTGACTTATTAGGTCAACCACTTTACA
 AATATTAGGTGAGTTTAAATGGTAAAGCACTTACCAATGATGAACATCGTTAATGGTGGTTCTCACTCAGATGCT
 CCAATTCGATTTCAAGAAATCATGATTTTACCTGAGGTGCTACAACGTTCAAAGAAATCATTACGTTGGGTACTGAAAT
 TTTCCACACTTAAATCAATTTTAAAGCAACGTTGTTTGAAGCTGAGTAAAGTAAAGTGGTTTCGCTCCTAAAT
 TTGAAGGTACTGAAGATGCTGTTGAACAAATTTCAAGCAATCGAAGCAGCTGGTTACAAACCAAGGTGAAGAGTATTC

Fig. 2.2

TTAAGATTGACTGTGCAATCAGAAATTCATGAAAAATGGTGTATATGACTACAGTAAGTTGGAAGGCGAACACGGTGC
 AAAACOTACAGCTGCAGAACAAAGTTGACTACTTAGAACAAATAGTAGACAAATATCCTATCATTAAGATTGAAGACGGTA
 TGGACGAAAAACGACTGGGATGGTTGGAAAACTTACAGAACGATCGGTGACCGGTGTAACAATTAGTAGGTGACGATTTA
 TTCGTAAACAAACACTGAAATTTTAGCAAAAGGTATTGAAACCGGAATTGGTAACCTCAATCTTAATTAAAGTTAACCAAT
 CGGTACATTAACGAAACATTTGATGCAATCGAAATGGCTCAAAAAGCTGGTTACACAGCAGTAGTTCTCACCGGTTCAO
 GTGAAACAGAAATACAAATTTGCTGATATTGCTGTTCCTACAAACGCTGGTCAAAATTAAGCTGGTTCAATTATCACGT
 ACTGACCGTATTGCTAAATACAATCAATTATTACGTATCGAAGATGAATTATTTGAAACTGCTAAATATGACGGTATCAA
 ATCATTCTATAACTTAGATAAATAA

SEQ ID NO 37 secuencia de polinucleótido

ATGCCAATTATTACAGATGTTACGCTCGCGAAGCTCTTAAGACTCACGTTGTAACCCAACAGTTGAAGTTGAAGTATTAAAC
 TGAAGCGGTGCTTTCCGACGTGCATTAGTACCTTCTGGTCTCTACTGGTGAACATGAAGCAGTTGAATTACGTTGATG
 GAGATAAATCAGGTTATTAGGTAAAGGTTGACTAAAGCGGTAGAAAAATGTTAACGAAATGATCGCACCAGAAATCGTT
 GAAGGTGAATTTTCAGTTTATAGATCAAGTATCTATTGATAAAATGATGATTCATTAGACGGTACACACAAACAAAGGTAA
 ATTAGGTGCAAAATGCCATTTTAGGTGTTCTATTGCCGTAGCTCGTGCAGCTGCTGACTTATTAGGTCAACCATTTATATA
 AATATTTAGGTGGATTTAATGGTAAACAAATGCCAGTACCTATGATGAATATTGTTAATGGTGGTTCTCACTCAGATGCA
 CCAATTGCTTTCCAAAGAGTTCATGATTTTACCTGTAGGTCTGAGTCAATCAAGAAATCATTACGTTGGGGTGCAGAAAT
 CTTCCATAACCTTAAATCAATCTTAAGTGAACGTTGGTTAGAACTGCAAGTAGGTGATGAAGGTGGTTTCGCTCCTAGAT
 TTGAAGGCACTGAAGACGCTGTAGAACTATTATTAAAGCTATCGAAAAAGCAGGATACAAACCGGTGAAGATGTTATTC
 TTAGGATTTAGCTGTCTCTCTGAAATCTATGAAATGGTGTATTGATTTACACTAAATTCGAAGGTGAACACGGTGC
 TAAACGTAAGTGCAGCAGAGCAAGTTGACTACTTAGAAGAATTAATTTGGTAAATATCCAATCATCACTATGAAGATGGTA
 TGGATGAAAAACGATTTGGAAAGGTGGAAACAAATTAACCTGATCGTATCGGTGATAAAGTTCAATTAGTTGGTGAATTTA
 TTCGTAACCTAACACTGAAATTTTATCTAAAGGTATCGAACCAAGGTATTGGTAACTCAATCTTAATCAAGTAAACCAAT
 CGGTACATTAACGAAACATTCGATGCTATTGAAATGGCTCAAAAAGCTGGATATCTGCGGTGTATCTCACCGTTCTG
 GTGAACTGAAGATACTACAATTTGCTGATATCGCAGTTGCTACAAATGCAGGCCAAATTAAGAACAGGTTCAATTATCTAGA
 ACTGACCGTATTGCTAAATACAATCAATTATTACGTATTGAAGATGAATTATACGAAACAGCTAAATTTGAAGGAATTA
 ATCTTTCTACAATTTAGATAAATAA

SEQ ID NO 38 secuencia de polinucleótido

ATGAAAAAATCGTTACAGCTACAATCGCTACAGCAGGACTTGCCACTATCGCATTGTCAGGACATGATGCACAGCCGC
 AGAACAAAATAACAATGGATAAATTTCAATGACGCTCAATCATACAGCTATACGTATACAATTCATGCACAGGTAATT
 ATCATTACACTTGGACAGGAAATTTGGAATCCAAAGTCAATTAACGCAAAACACACATACTACTACAACAACTACAATACT
 TATAGTTATAACAATGATCTTACAATAACTACTATAATCATTTCATATCAATACAATAACTATACAAACAACTAGCCAAAC
 AGCAACAAAATAACTATTACTGCTGGTTGAGGTGCAAGTTATAGCACAACAAAGTAAATTAATGTTCAATGTTGACTACAACG
 CAGCGCATCTTCAATGGTGGTTCAATTTCTAATGGTTATGCATCAGGAAGTAAGTTATATACTTCAGGACAATGTACT
 TATTATGATTTGATCGTGTGGTGGGAAAAATGGTTCAACATGGGGTAAACGCAAGTAAATGGGCTAAACGAGCTCATC
 ATCTGGCTATACAGTGAACATACACCAAAAGTTGGTGGCTATCATGCAACCAACACAAGGCTATTACGGTCAATGTGCTT
 ACGTTGAAGGCGTTAACAGCAACGGTTCTGTTGGTGGTTGAGAAATGAAGTATGGACATGGTGGCTGGTGGTTACGTTCT
 COTACAATTTGAGCAAAACCAAGCAGGTTCAATATAATTTCAATTCATTAA

SEQ ID NO 39 secuencia de polinucleótido

ATGAAGAAAAATCGCTACAGCTACTATCGCAACTGACAGGATTCGCTACAATCGCAATTGCAATCAGGAAATCAAGCTCATGC
 TTCGAGCAAGATAACTACGGTTATAATCCAAACGACCCCAACATCATATAGCTATACTTACACTATTGATGCACAGGTA
 ACTACCATTAACATGGAAGGTAAGTGGCATCCAAAGTCAATTAACCAAGATAATGGCTACTACAGCTATTACTACTAC
 AATGGCTACAATAACTACAACAATTACAACAATGGTTATAGCTACAATAATTACAGCCGTTACAACAACACTACTCAATATA
 TAATCAATCATATAACTACAATAACTATAATAGTTACAACACAAACAGCTACCGTACTGGTGGTTTAGGTGCAAGCTACA
 GCACTTCAAGCAACAATGTTCAAGTAACTACAACATATGGCTCCATCATCAAAATGGCCGTTCAATCTCAAGTGGTTATACT
 TCAGGACGTAACTTATACACTTCTGGTCAATGTACATACTACGTATTGATCGGTGATAGGTGGTAAATCGGTTCAACTTG
 GGGCAATGCAAGTAACTGGGCTAACGACGTGCAAGAGCTGGTTACACAGTGAACAAATACACCAAAAGCTGGTGCATTA
 TGCACAACTCAAGGTGCATACGGTCAGTTGCATACGTTGAAAGTGTTAACAACAATGGTTCAAGTAAAGGTTTCAGAA
 ATGAACATATGGTTATGGCCAGGTGTTGTAACCTCAGTACAAATCTCAGTAGCCAAAGCTGGTGGTTATAACTTCATTCA
 CTAA

SEQ ID NO. 40 secuencia de polinucleótido

ATGAAAAAATCGCTACAGCTACAATTCGAACCTGACAGGAATTCGCTACTTTCCGATTGACACACCATGACGCACAGCAGC
 AGAACAAAATAATGATGGGTACAATCCAAACGACCCCTTATTCATATAGCTACACTTACACAATCGATGCTGAAGGTAAC
 ACCACTACACTTGAAGGTAAGTGGATCCAGATCGGTGAATACTTCTATATACTATAATTAATTAATAACTACAAC
 TACTATGGTTACAATAACTATAGCAACTACAATAACTACAGTAATTACAACAATTACAACAACATCAATCAACACACAC
 GCAATCACAAAGAACACTCAACCGACTGGTGGTTTAGGCGCAAGCTATTCAACATCAAGTAGTAATGTTACGTTACAA

Fig. 2.4

AAAATAAATGAACAGACTGAGAAATCGAAGATCTCAAGTACAAAATCTCAAAATTCACAAAATAGTCAATCATTATCC
 GCTACTCATGAAAAATGAGCAACCAAAATAATAGTCAAGCTAATTTAGTAAATCAAAAAGTAGCCAAATCATCTACTACTAA
 TGAAGAACCAACAGCATCTCAAAATGTAAATACAAAGAAAGATTGGCAACGGCTGCGACACACAAACAGATAAAGAA
 AAGTAAGCATAAACAAAACGAAAGTCAATCTGCTAATAAAATGGAACGACAAATAGAGCGGCTCATGTAGAAATCAT
 GAAGCAAAATGATTAACAGCTTCAGATTCAATCTGATAATGGTAACGTACAAATGACCGAAATGAATTACAAAGCATTTT
 TTGACAAAGATTAACTTTATTAGGCAATATGATCCAACTAAACAAATAAGACTTGCAACTTCATACAAAGAAATGGAA
 CAAGCTGTGTCTTAATTCGTACAAATGCTTCAAGCTCAACAACTAGCCGTGATCAACAAATTCAAACGGCTTCTGT
 TGAGTCTAGAGCTGCAGAGCTAGATCAGTATCAGACTACAAAATGCAAAATTCATCATATTATGTTGAAATGCTAATG
 ATGTTTCAGGATATCCTGTAGGTACATATATCAATCTCTAGTAAAGGGGCGCCATATAATTTACCAACTACACCATGG
 AATACATTGAAGGCTCTGACTCAAGGAAATGTCTCTTATGACAGCGAAACAACTGGAGATGGCTACCAATGGCTTAT
 TAAGTTTAAATAAGGACATGCTCCACATCAAAATATGATTTCTGGTTTGCAATTACAGCAAGCTCAAGTGGCAAGGAA
 GAAGTGAATTTGTAACAGTTAATTCAGATGGAACAAATGTACAAATGGAGTCAAGAGCAGGAGCAGGTGCAATAAACCA
 CTTCAACAAATGTGGGAATATGGAGTAAATGATCTGTATCCTTACATGACTTTAAATTAAGAAATAGAAATGGCCAAAT
 AATATATAGCTGGCCAACTGTCCATGTTTATCTTTAGAAATTTATCTAGAGCGAGTGAATTTTATGTTGAAGCTGGAG
 CCAACACCTGCTACTAAAGCATTTGGTAGACAAAATTTTGAATATATTAAATGGTCAAAAACCTGCTGAATCACCGGCTGT
 CCTAAAGTTTATACTTTTCATCGGTCAAGGTGATGCAAGTATACAAATTCATTTAAACACAAAGGTCCAACTGTTAATAA
 ATTGTATTATGACAGCAGGTGGGCGTCTTTAGAGTACAAATCAATTTTATGTACAGTCAACTATACGTCAAGTCAACGC
 AAGACCATCAACCAACGTCTTAATGGTTTAAAGCAAGTGGTAAATCGTACATATCGCATAGGTACAACTAAAGCTGTAGAA
 CTGAGTCAAGGAAATGTACAAACGAAAGGATATTAGAAATGACAACTAAATATAGATGATTTTGTGTATGATCTCTTT
 AAGTTATGTTAAAGACCCGAGTAAATAAGTGTATAGGTTT.TACCCAACTAAATGCAAAATCAAGCTTTTAAAGCGGAG
 GCGTTCAAGAAATTAATGAATATCAATTAAGTCAATTAAT.TACTGATCAAAAATTAACAAAGCAGCAAGAACTAGAAAC
 CCAATAAGATTAAATGATGGTTTTCGACTATCTGTATGGT.TAGGTAAATAGTGAACCTTTAGTTCTGTGTTAACTTAACGGT
 ATTACCTGAAATCCACATATATTAATTTCTTTAAAAA.GACGATACCTCAAAATATGCTGAAACCAATTTTCAAAAC
 AAGCTGGGCATCCAGTTTCTATGTATATGCAAGTAAACCAAGGGAATGCTTCCGTGAATTTAGGTGGTAGCGTAAACATCT
 ATTCAACCATTAATTAATTTAAACAGTAATGAGAATTTTACAGATAAGATTGGCAATTTACAGGTATTTCCCGTAC
 ATTACACATTGAAACTCGACAAATAGAACTAATAATGCTAGAGAACGTAACATTGAACTGTGTGTAATTTATACCAAG
 GGGATTACTTTGGTAGATAGTTTGGAGCTAAAGAACAAATTTTGAATTTCTGTTTAAACCAATACAGCAACAAAT
 ACAAGCAGCTGAGCAATTAAGAGGTACAGCATTAACAAAGTGGCTGTAAATTTTGGGAATACCGTTGGATCCATC
 GGCATTTGGTTTATTTAGTTGACCAACAAATCAAACTACCAATGGTGGTAGTGGAGGCAGATCAAAATACCATCTGTTTATA
 CGATACTTGGGCTGTGTACCTGTATGGGTGCTAATACTAACTACTATACGACCCGCAAGATTATGTTGATTTCAATCA
 CCTGTAGGTAAACAAATTAAGAGGTAGTTTATTAATAAAGTAGTTGATCTCAATATGAGTAAATGCTGTATTTACTTTT
 GCCAGATGACATTTCCACCAACAAATCAATCTGTGTGGAAATAATGCCAAATACTTCGAGGCGACGAAGTCAACTTTA
 CAATGGGAGTCTCTGTATAGACATTTCTGGTATAAAAAATCAAACTATTACTACTTTGCCAAGTGTGTGACATCAAAATTA
 ACTAAATCCGACAAACAAAACGGCTCAATAGCTTATACAGTAGAGTCTCTATGAATCAAGCAATTTAAACAGTGAATTTAC
 ATTTAAAGTATCAGCGACAGCAATGTCAATATACGACAAATGATAGTCAATCTAAACATGTGTCAATTCATGTAGGTA
 AAATTAGTGAAGATGCTCATCCGATTGTATTAGGAATACTGAGAAAGTTGTAGTGTCAATCCGACTGCTGTATCTAAT
 GATGAAAGCAAGCATAAATTAAGTCTTATGAATAAAACCAAAATATAGAGGATTTTACGATCAACTGATCCAGT
 AACTTCGATAAATAAGTGAACGTCAATTAACATTAACCTGATGCTCATCAACAAAGCTTGTGCTACAAATGTGATGA
 CATACGAACCAAGTTGTGAATCTGAATATCAAACTGCCAATGCTGCTAAACAGCAACGTAACGATTGCTAAAGGACAA
 TCATTAAATATGGTGTATTAACAAATTTTACTTTAAGTAATGACAAAGCTATTCCAAATGGCACATTTCAAAATAT
 TACATCTGATAGAACTATTCCAAGTGCACAAAGAAATAGTCAAAATGAATGAGTACGCAAGTTATATCATATAGTTGCTT
 CAAATGCTATATCAAAAGACACTGAGAAATTTCTATATTAGTTTAAAAATCGTTGATGTGAACAACTGAAAGCGGATCAA
 GGTGTCTATCGTACGTCAACATATGATTTAACCAGTGTGAAATCTCAAAAGTAAACAAAGCTTTTATTAATGCAATAG
 AGATGTAATTACGCTTGGCGAAGGTGATTTTCAAGTTACAAATACACCTAATGGTGTAAATGTAAGTACTATTACAGTAA
 ATATTAAATAAGGTGATTTAAGCAAAATCAATCCGCTCAACCTAGCTAATATGAATTTCTTCCGTTGGGTTAAATTTCCCA
 CAAGATTATACAGTACATGGACGAATGCAAAATTTGCAACAGACCAACAGATGGTGGTTTATCATGGTCCGATGACCA
 TAAATCTTTAATTTATCGTTATGATGCTACATTAGGCACACAAATTACAACTAATGATTTTAAAGGATGCTAAAGCGA
 CTACTACAGTGGCTGGATTGGCTAATAATATTACTGTTAATGAAAGGACAAAGCAAGGCAAGGAGGTGGAGACCAACTAT
 AGAACAAGTGGTTATTCAAAATCAATGCAACCTGATGTTCAACGTCAATTTACGTTGAATGTTCAAGTGAATTCAAAT
 ATTAGACATCATCAACCTTCAACGGTTATGGTGGCAACCTGTTACAAATTCAAATCTGTCGCAACCATAGTAAT
 CAACGTGTTTAAAGTAAACGAACCGGAGCTAATGGTGGTGGCGCATTTACAAATGACCAAGCTTGTAAAAAGTAAATCT
 ACACATAATGCAAGTGAATGCAAGTTTATAAGGCGAGTTATTAACCTTAAACGGCATATGGTCCAAACAAATATGTTGAACATTT
 AAATCAAAATACAGGAAATACTACTGAGCTATTAACTTTATTTGTACCAAGTGAATTTAGTGAATCCAAATTTCAAG
 TAGGTAATTACACTAATCATCAAGTGTCTCAGGTGAACATTTACAAATACGATTACAGCGAATGATAACTTTGGTGTG
 CAATCGGTAAGTGTACCAATACATCAAAATACAGGTACTGTTGATAATAACCATCAACATGTTTCTGCAACGGCACCC
 AAATGTGACATCAAGCAACTAGTAAGACAATCAATTTATTAGCAACTGATACAGGTGTAATACAGCTCAACTTTCATTC
 ATGTAACAGTGAACCTTTGGGTGATAAATATCGAGTTGGTACTTCATCAACGGCTGCTAATCTGTTAAGATTGCCAAT
 ATTTGGAATAATGCGACAGTATCAAGCTGATCAACGACAAATTAATTAATCGTTAAGCTTTACAGTAATGCAACAA
 TAGAACTATGCAACAGCAAGCGCAATGAATCACTAGTAAACAGTTAGTAAATGTCAAGTGTACTGCAAAATATGCCA
 ATGTCACAGTAACTGTTACTCATCAAGATGGAACAAATCAACAGTGAATGTTACCTGTAAGCATGTCTATCCAGAAATC

GT TGCACATTCCGATTACACTGTACAAAGCCAGAGCTTCCAGCAGGTAATGGTCTAGTGCAGCAGATTACTTTAAGTT
ATCTAATGGTATGGCATTCCAGATGCAACGATTACATGGTAAAGTGAGCAAGCCGCAATACGAATAATACACGATTATG
GTGAAGATATAAGCAATCTGCACATCTTTAACTGATGGCGAAACACGCCAATTACGAAACAGCAACATATAAGTA
GTGAAGACTGTACGGAACACTGCTTTGAAACAGCCAGAGGGTCTTTATACCCAGGTGTTTCAGATATGTAATGATCGGAA
ACAATATGTTAAGCCAGTAAATAATCTTGGTGCAGCAAAATGCGCAACATATGAATTTTCAATTTTGTGGACATATGGTC
CTAACCAAGATGTTGTAGSTATTGATATCAACGGCGTCTTTAGATGACTTATGATATAAGCAAACTGAAGATTAACTTAT
TTATCTAAAGTTAAACTGACCCACAGAAATGTACGCAAACTCTGTGACATATAAAGCAGGTCTTCAAAACCAAGAAAT
TAAGTTTAATAACGTATTAAATAACTCOTCAGTAAATTTATTAAGCAGATAATACACCAATTAATGTCCAAATATTA
CTCATGGTAGTGGTTTTAGTTTCGGTTGTGACAGTAAAGTACCGGTTACCAATGGCGGAATTAAGACAAATCTTCAATT
TCAATGGAACATGTGACGTATACGACGCAAGACAGATGGCTCAAGTTGTTACGATACAGAAATGAATCTGTGTGATTC
AAATGAGTAGTGCTTCTGTTCAGTAACACCACAATTACAAGCACTACTGAAAGCGCTGTATTATTAAAGGTGGCGAG
GTTTTGATTTTCGGTCATGTAGAACGATTATTCAAATCCGCGACATGGGCAAGTGGTCGATGGCATAGTAGTCAGAT
ACATCGGAAGATACAGTCGGCAACACACATAAAATCTCGGTTGTAACATTACCTAGTGGTCAAGGTACGCGTAATGTTGA
AGTTCCGATCAAAGTTTATCTCAGTTGCTAAGTCTAGGCGCCACTACGTGATGTGAAAGGTCAAATTTGACACATGTA
CAAAGCGCTATTGATTACATTACATTGATCCAAATCTAATACGAATGGTATTACAGCAGCATGGGCAATGACACAA
CCAAATTAACCAACGAGCGGCGTTGAACATTTAAATGTCGATGGTCACATCCAGGTATTTCAGCTGCTAAACGAGTTCC
TGTAAGTGTGAAGCTATCAATTTGAAATCTCCCTCAAACTACTATACAAACAGTGGTGGCGACTTTAGCAAGTGTA
CGCAAGCATCAGGATATGCACATATGCAAAACGCTTCAGGTTTACCAACAGATGGAATTTACGTATAAATGGAAATCGGTAT
ACTACGGGTACAAACGATGCAAACTGGGCGAGCAATGAATTAACCAAACTACTGCAAGTGGTTAACTCAAAATATGAT
CATCTATAATGGACATACATTTGCAACTCTTTACCGCGAAATTTGATGAAGAATGTTCAACAGCGAATACCACTG
TCACTGAAACAGTCGCGCAAGGCGATTACAAATTTGCACCTGGTGGCAACCAACAGTCAATACTCATGCTGTGTAATG
ACATATGCTGACAAATAGTTATTAAACGCTAATGGAAATTTGTGAACGACATTTACAGCTGTAATTAATACGAGCCCAT
GOTGAAGAGGACATCAGCAGATAATGTAAACAGGTTATGTTGGAATCAATAAGTATTACTGTGGCAGAGGACTCTTTCA
ATCTGTGCTACAAATCAAGTTGTTGCAACACAGGTAGTGGCGAAACAACTCAGTGACGAGCAACGTAGTGATGATTTC
ACAGTTGTGCGCACCACAAACGAAACAGCGACTACGCAAAATTTGGCAAAATGGTCATATTTGATATCAGGCTTAATAATCC
ATCAGGACATTTAAATTAATCCAACCAAGCAATGGATATCTTACTACCTGAAAGTGGGTAAATGGTGCAGAACATGTA
AGCAAAATTAATGTTGTTGCTGGTCAAAATCAATGACAAATGCGAATGAAGCTGACATGTGTAACGTTAGATGCAAA
ACTGTTAAAGTGACGTTCAATGCCAATACTATAAAACCAAAATTCATCAATCAAAATTACTCCGAAGCAGGTACAGGTCA
CTCAGTTAAGTATGTAATCCAAGTACATTAATGCACTACCGGCGACTACTCTUTCAACACAGCTGAAATTTGAAGATATTG
GTTCAAATGTAACAGCAGCTGAAATTTAACTGCACTCAGGTTGCTATATAACGCTACTGCAACGATTAATAATGGCA
GCAATGGCTACTAATTTAGCTGGTGGTATGACCAACGACGATTCTGTGACAGTAACTTACAATGATGTTAGTACTGAAGA
AGTACAAGAGTCCATTTTACAAAGCGGATAAACGCTGATTAATCAGCAATAAAATCAATTAAGTATGCTAGCAATGA
CTGAAGGTAAAAAGCCAGGTACAAATTACGAGTACATATGCAATGTCATTAATGGCGCAACAAATCAATACCGGCA
ACGAAGGACAAACAGATGATTTAATAAGTGGCTGCAACACCAACAGATTTTGAAGGCACTAACTAAAGTTGCTGACG
ACAACTAAGATTGATCAAGCTAAGCACTACTTTCAAATTAAGAAGATAATAGCCAATTAGTAAGCTCTAAAAATAACT
TACAAAGTTCTGTGAACCAAGTACCATCAACTGCTGGTATGACGCAACAAAGATTGATACTAATGCGGAAGCGT
GAAGCAGAAATGAAATTAAGTCGAGCTCAAGCTTTATGACAAATGGCGATGCAACTGCAACAAATTTAGATGAAGAA
ACATGTTGTGATAACGCATTAAACAGCATTAACCAAGCGAAACATGATTTAACTGCGATACACATGCTTAGAGCAAG
CAGTGCAACAAATGAAATGCAACAGGTACAAAGCTGGTAGAAGCGGGCAAGTATTACTGCTTACAATTAATCGATTCGT
GCACTTCAAAGTGAATTAACAAAGTCTAAAAATAGGCTTAATGCTCAATTCAGAAAGCAATGAAGACAGTGGCAAGG
ACAATCTGGCTTAAACAAATGTAATCGTGTCAATGAGCGGATTAACGCAAGCAATTAATCAATTAGTACCTTTAGCTGATA
ATAGTGTCTTAAGAACTGCTAAGCGAAACTTGATAGAGAAATCAATTAATCAGTAACACTAGTATGATGACACATCA
TCAATCCAAGCATAGAAATGCGATGCAAGCTCAACGAGCAACAAATTAAGTATTAACAAATGGTATTAACAAATGGTA
CGCGACAGCAACAAATGGCGCAAAAAACAAAGATGAAGAAATTAATAGCTTAAACAGCAATTTGCTGGAT
TAACACCAGACTTGGCACCATTACAACTGCAAAACTCAGTTGCAAAATGATTTGATCAGCCAAGCATAGCACTGGT
ATGACAAAGCCATCTGTTGCTGCAATTTAATGCAAACTTTACAGCACTAGAACTAAAACTCAAGAAATGATCGGCTGT
AGCATCTCATCCAGATGTAGCAACGATTTGCTGCAAACTGACAGCAGCAATGCTGCTTAAACAGCACTTGATCAAGCGC
GCAATGGCTTTAAGCTGATTAAGAGCACTTTAGAAAAATGCGAAAAATCACTACAACTAGTATTGATACGCAACAAAT
ACAACTGGTATGACAAAGACTCTATAAATGCAATACAAATGCAAGTTAACAGCTACAGTAAATAGGTTCAACAAATCA
TCAAGTATTAGCAGTTACCTACTGTAGATCAAAATTAATCAAAATACGCTGCGACAAATCAAGGAAATGATATTAG
ATCATGCAAGCTCAGGCGTTAACACAGATAAAGCGCGCTTCAAAATGCGAAAAACGCAATTAGAACAAAGCAATTAATCA
CCAACAGATACAAAGGATATGCAACCGCTCTGTTAAATGATACAAACCAAAATTTACAGCAGCAGCTCAAAATTAAC
TGAATTTAATCAAGTGTGAAATGGCAACCACTGCTCCAAATCAATGATAAAGTGGCAGAGGCAACCAAGCTAAG
ATCAATTAATACAGCAGCTCAAGGTTTAACTATAGATAGACGCGCATGTTAACCAATTACATGTTGCTACTTAATTA
NACCAAGCACAACAAATTAATTTACGCAACAAATTAATGCTGCTCAAAATCATGCTGCGCTTGAACAAATTAAGTCTAA
CATTAGCGCTTTAAATACTGCGATGACGAAATTAAGAGACGTTTGGGATAATTAACAATTAATCAGGTCAAAT
ACACTGACGCAACACAGCATATAAACAGGCTTAGATAATGCAATTAATGGGCTAAAGGTGCTTTGGAGAAAGCACT
AACTTAAACAGCTGGATGTAAGAGCAACCAATGCGATTACGATGCAAGTGAATTTAAACCAAGCACAAGAAATGCAAT
TAACACAAGAGTGAATAGTGCACAAAGCTGCAGCAATTAATGATTAACAAAGCACTCAAGCTTAATGCTGCT
ATGACAGGTTTAAACAGTGGCTGCTAATCATAACCAAGCTGTCAGAAAGTGAATTAATGTCACGCGAGTACTAATA

214

SEQ ID NO 46 secuencia de polinucleótido

ATGGGTTAACTTACAAACGGCTATCAACGATTAAGTCAGGAACATTAGCGAGGCCAAAACCTCTTGATGCTGATGAGCAAAAC
ACGTAATGCTTACAATCAAGCTATATCAGCTGCCGAAGACCACTTTTAATTAACAAACAACTGGACCGAATACAGCGAAACAG
CGGTTGAACAGACCTTAATAATGTTTAATAGTTCGAACTATGCAATTAATGATACGAAACCTTAATTAATGCGAAACAG
CAGCGGATTACAGCAATTAATGCGCATCTGATTTAATCAAAACAAACAGATGCATTAAGAGCACAAGCTAATGGTGC
TCAACGGCTATCTAATGCAAATGATGTACAACGTAATGGACGTAACCTGAACACAGCGCAATGGGTCAATTACACATGCCA
TCGCAGATAGACGAATACGTTAGCAAGCAGTAATAATGTCAACAGTAGCCTTAACAAACAACTCTTACACCAATAAA
GTTCAACATGCTGAACATTAATTATGCGGTACGCGCAACGCTGTTTACAACACCTTCAGAAGTAACAGCTGCAGCTAATCT
AGTAACAGCGCGAAACAAAGAAATTAATGGTGACGAAAGATTACGTGTTGCAAAAACAAAGCCCAATACCTGCTATTGATG
CATTAAACGCAATTAATATCTCTCTCAAAAAGCTAAATTAAGAAACAGAGTGGGACAAGCCCAATAGATTAGAAGAGCTACA
TCTGTTTCAAAACAAATGGACATCATGTAACATGCAATGAAGGCTTAAGAGTAGTATTCTCAACGAAACAAACAGTCAA
ACCGATTCAAAACCTATACAGACAGCAAGTCCGAATAACCAAICAAACATATAATAGCGCTGTGTCAAATGCGAAAGGTATCA
TTAATCAAACTGAACAACTCAACTATGGATAGTAAATGCGATTACCAAGCTACAAACAGAGTGAATTAATGCTAAAAATGGT
TTAAACCGGTGTGAAAACCTTAAGAAATGCAACAAACCTCTAAGCAAAACCTTAATTAAGTATCACTATCACTATAACAAAT
CCAAAATCTGCAATCTCATCAAAATTTGATCGTGCAAGTCTGTGAGTGAGGTAAACAGCTGCTAAAAATGCAAGCACTG
AGTTAAACCGCGAAATGGGCACTTGGAAACAGCTATCCATGATCAAAACACAGTTAAACAGAGGTGTTAACTTCACTGTAT
CGAGATTAAGCTAAACGCTGATGCTTATACAAATCGGTTAAGCAGAGCGAAACAACTCTGAATAAAGACGAGTGTCAAA
TAGCTGTAAACAGAGATGTTGAAGGCTGTTCAAAATGTTACAGTCTAAAAATGCAATGAATGGTGCAGAAACGTTA
CAAAATGCAAGAAATGCAAGCTAAAAATGCAATTAATTAACCTTACGTCAATTAATAAGCAAAAAACGTCCTTAACAACT
AAATTTGATCAAGCAACAAACAGTAGCTGGTGTGAAGGGGATCTAATACAGGTACACAATTTGAATCAAGTATGCTATG
CTTGCAAAATGATTTAATGATAAGCAATACTTTAGCGAGGAAACCTATCATGATGCTGATTTAGTACAGTGAAGAACTG
CTTATACAGAGCTGTTATGCAACGCGAGAAATATTTTAATTAATAATAGTGGATCAAATTTAGATTAAGCTGCCGTTGAA
AAGCGGTTGTCAACAGTGACAAATGCGAAAGGTGCCCTAAATGCTAACCATTTTAGAGCAAGCTAATCAATGCAAA
CACTACTATAAAGCGGCTTCAACATTTAACAACAGCAAAAGATAATTGAACACAAAGGTGCAACAGCAACAAATG
TTGCAGGTGTAGATCTGTTTAATTAACAGTGCCAAACACATTAAATGGTGCTATGGGTACGTTAAGAAATAGCATACAGAT
AACACAGCTACGAAAAATGGCCAAACATCTTTGATGCTACAGAACCTAACAAACAAACCTATAACAACTGCTGTGATAG
TGCTAATGGTGTCTAATTAATGCAACAGCAATCCAAATGTGATGCTAATGCAATTAACCAATTCGCTACAGTGCAT
CAACGAAAAATGCAATTAGATGTACACATAATTTAAGCGAGCGAAACAGCAACAAATGCCATCGATGGTGCTACT
AACTTAATTAAGCGCAAAAGATGCTTAAAGCACAAGTTACAAGTGGCGCAACGTTGTGCAAAATGAACAGATGCCA
CAAACTGCAAAATGAATTAATACAGCTATGGTCAATTAACATAGGTTATGATGATGAAAAATCAACAAACAACT
AAAAATATCGTAGCTCTGAACAAAGTAGAAAGATGCTTATGATCAAGCTGTAGCTGCTCGGAAAGCAATTTAAATAAA
CAACAGGTTCCAATTCAGATAAAGCAGCAGTTGACCGTGCAATTACAACAGTTAACAGTACGAAGATGCATTTGAATGG
GGATGCTTAACTGGCAGAGCGGAAAGCGGACGTAGACAAACCTTAGGTACTTTAAACCAATTTAGCAATGCACAGCTA
GCGGCTATGAATAGCTTTACRAGGTGCAATCAATGATAAAGATGGCACAATAAGAAATCAAAATTTATGTCAGATGA
ATCAAAACGAATGCAATATACGCAAGCTGTACAGCGGCTGAAGGCATTTTAATTAACAAACAAAGGTGGTACACATCTA
AAGCAGACGGTTGATATGCAATTAATGCGAGTTACAGAGCGAAAGCGGCTTTAAATGGTGCTGAAAACTTAAGAAATGCG
AAAACTTCAGCAACAAATACGATTAATGGTTTACCTAACTTAACACAAATTACAAAAAGCAACTTGAAGCATCAAGTTGA

Fig. 2.7

ACAAGCGCAAAATGTAGTTGGTGTAAATGGTGTAAAGATAAAGGTAAATACATTAATACTGCCATGGGTGCATTACGTA
 CAAGTATCCAAATGATAATACGACGAAACAAAGTCAAAATATCTTGATGCATCTGATAGCAACAAAAATAATACAAAT
 ACTGCTGTAAATATGCAAAATGGTGTATTAATGCAACGAAACAAATCCAAATATGGATGCTAATGGCATTAATGCATATGGC
 AAATCAAGTCAATACAAACAAAGCAGCGTTAAATGGTGCACAAACTTAGCTCAAGCTAAAAACAAATGCGACGAACACAA
 TTAACCAACGCGCAAGACTTAACCAAAACAAAGAGATGCATTAACCAACCAAGTTAAACATGCAACAACTGTATCTGAT
 GCAAAATACGTTCAACATACAGCTACTGAAATGAAACGGTCCGATGACAGCACTTAAAGCAGCTATTGCGGATAAGAAAG
 AACAAAAGCAAGCGGTAAATTAATGCAATGCTGATCAAGAAACAAAGTCAAGCGTATGATTCAAAAGTGACTAACGCTGAAA
 ATATCATTAATGGTACACCAATGCGACATTAACAGTCAATGACGTAATAGTGGCGCATCAAGTCAATGCGGCTAAA
 ACAGCATTAATGGTGTATAACAACTTACGTGTAGCGAAAGAGCATGCTAACAAATCAANTTGACGCGCTTAGCACAAATGAA
 TAAATGACAAAAAGCAAAATTAAGAAACAAAGTTCAAGTGCACACTACATTAGATGGTGTCAAACTGTTAAAAATAGTT
 CTCAACGTTGAATACACGATGAAAGGCTTAAGAGATAGTATTGCGAATGAAGCAACGATTAAGCAGGTCAAACTAC
 ACTGACGCAAGTCCAAATTAATGCTAACGAGTACGACAGCGCAGTTACTGCGACAAAGCAATCATTAATCAACATCGAA
 CCCAACGATGGAACCAAAATACTATTACGCAAGCAACATCAAGTGACAACTAAAGAACATGCAATTAATGGTGGCGCAAA
 ACTTAGCTCAAGCTAAGACAACAGCGAAAAACAACTTGAATTAACCTTAACATCAATTAACAAATGCAACAAAGAGTGGTTA
 ACGGTAAACATTGATGGTGCACACTACAGTACGCTGGTGTAAATCAAGAACTGCAAAAGCAACAGAAATTAATTAACGCAAT
 GCACAGTTTACAAATGGTATCAATGATGAGACACAAACAAACAACTCAGAAATACCTAGATGCTGAGCCAGTAAAG
 AATCAGCTTATGATCAAGCGTAAATGCGACAAAGCAATTTAAACAAAGCTAGTGGTCAAAATGATGACAAAGCAGCA
 GTTGAACAGCATTACAAATGTTAACAGTACGAAAGACGCGTTTGAACGTTGATGCGAAATTAATGAAGCTAAAGCTGC
 TGGAAACAAACGTTAGGTACATTAAACACATTAATTAATGCAACGTTAATGGTGTAGATAATGAATTAACACAAAC
 CAAATGTTGAAGGTGTTAATACAGTTAAAGCCAAAGCGCAACAAATTAGATGGTGTATGGGTCAATTAAGAAACATCAAT
 CGTGATAAAGACACGAGCTTACAAAGTCAAAATTAATCAAGATGCTGATGATGCTAAACGAACGGCTTATTCTCAAGCAGT
 AAATGCAAGCAGCAACTATTTAAATTAACAGCTGGAGGAAATACACTTAAAGCAGATGTTGAAAGAGCAATGCAAGCTG
 TTACACAGTACCAACCAACGTTAAACGGTATTCAAACTTAGAAGCTGCGAAACAGCTGCGAACACAGCGAATTAACAAAT
 GCTTCGAGCTTAAATACAAACAAAGAGAGCATTTGAAGCACAAGTAAACAGTGCAGGACGCGTATCTGCGACAAATGG
 TGTGAAACATACGCACTGAAATTAATTAATGCGATGACGCTTAAACAGTGGCATTTGCTGATTAAGCTGACACAAAG
 CTAGTGGTAAATTAATGCTGATGCGAATTAACGCGCAGCATATGATGAAAGAGTACAGCTGCGAAGCAATATCGTT
 AGTGGTACACCAACCAACGTTAAACCATCAGATGTTACAAATGCGACCAACGCAAGTAAAGCAATGCGAAGACGCGATT
 AAACGGTAAATCATAATTTAGAAGTAGCGAAACAAATGCTAACACAGCAATGATGGTTAACTTCTTTAAATGGTCCGC
 AAAAGCAAACTTAAAGAACAAAGTGGGTCAAGCGACGAGCTTCCAAATGTTCAAACTGTTGCGTATTAATGCAACAAAC
 TAAAGTGTGCAAGGTGCTACGAGATAGCATTTGCGAATGAAGCAACGATTAAGCAAGTCAAAACTTACAGATGCG
 AAGTCAAAACAAACAAATGACTACAAACATGCAAGTCACTGCGACAAAGCAATCATTTGTTCAAAACAGTATGCTCATCA
 TGATTTGCGCAAGAAATTAATCAAGCGAAAGACCAAGTGACAGCTTAAACCAACAGCGTTAAACGCTCAAGAAACCTTAAGA
 ACTGCGCAACAAATGCGAAGCAACATTTGAATGGCTTAAGTGACTTAACTAATGCAACAAAGAGTGCAGCGAAACGCGCA
 AATGCAAGGTGCAACGCAATGTTAATGAAGTAAACCAAGCGCAAAATTAATGCGACGCTTAAATACAGCATATGACGAACT
 TGAAGAAATGGTATTCAAGATCAAAATACGATTAAAGCAAGTGTAACTTCACTGATGCGATGAAGCGAAACGTAATGCA
 TATACAAATGCAAGTGACGAGCTGAACAAATTTAAATTAAGCACAAGGTCCAAATACTGCAAAAGACGCGTGTGCAAAAC
 TGCGTTACAAATGTAACAGGTGCTAAAGAACGAAATGAACGGTAAATCAAAATGTTGCGAACGCTAAGACAACTGCGAAAC
 ATGCAATGAATTAACCTTACATCAATTAATTAATGCAACAAAGCAGCATTTGAATCACAATTAAGAGTGGGACAAACGTT
 OCAGGTGTAATTAAGTGTCTCAATGCGCATCTGAATTAATTAATGCAATGAGCAACTTACAACTGCTATTAAATGACGA
 AGCAGCTACAAAGCAGCTCAGAAATATACTGAAGCAGATAGAGATAAACAACTGCATACAAATGATGCTGTAACAGCAG
 CTAAGACGTTATTAGATAAAACAGCTGGTTCAAAATGACAAATAAGTAGCGCTTGAACAAAGCATTACAACTGTGAATACT
 GCTAAACAGCATTAAATGGTGACGCGGATTAATGAAGCGAAGAACACAGCTAAACCAACATTAAGCGCAATGTGACA
 TTTAACTAATGCTCAAAAGCAAACTTAACGAAACAAATGAACGTTGTACAACTGTTGCTGGTGTCAAGGCATCCAAAG
 CAAATGCTGGTACTTTAAATCAAGCAATGAATCAATTAAGCAACAGTATTGCTTCTAAGATGCGAATTAATCAAGCGAA
 GATTATCAAGAGCGGAATGCAAGTTTACAAATGCAATCAATGATGCGGTAACCTAATGCTGAAGGTATTATTAGTGCAC
 GAATTAACCTGAAATGAATGCTGATACAAATTAACCAAAAGCGGACCAAGTGAACAGTGGCAAGTCTGCAATTGAACGTTG
 ATGAAATTAAGCAGCTAAACAAACTGCGAAATCAGATATGGTGTGTTGACAGACTTGAACAAATGCAACAGCACT
 GCGGCAATGCTGAAGTGGATCAAGCACCAAACTTTCAGCTGTCACAGCGCTAAAAATAAGCAACATCGTTAAACAC
 AGCGATGGGTAAATTTGAACATGCACTTGTGAAAGGATTAATGCAACGTAAGTGTCAATTACACAGATGCGGATCAAC
 CAAACCAACAGCGTATGATGCTGAGTTACCAAGCAGAAAGCAATTAATGCAATGGCAGTAAACGCAATGAACAA
 CAAGTTCAAGCAGCGCTTAACCAATTTGAATCAAGCTTAAAGCAAGCTTGAATGGTGTAAATTAAGTTGCTCAAGCGAAAG
 AACAGCAAAAGCTGCAATTAGCTTCATATAGTAACTTGAATTAAGCGCAATCAACTGCAAGCACTAGTCAAATGACAAATG
 CAACGACAGTACAGAGCTAAGCTGCTGCAAAATACTGCTAATGAATTAATACAGCAATGGGTCAACTTCAAAATGGT
 ATTAATGACCAAAACACTGTTAAACAAACAGTAACTTTACAGATGCTGACCAAGGTAAAGAAAGATGCTTACAAATGCT
 TTTACGAAATGCTCAAGGTATTTAGATAAGCAAAAGGTCAAAATATGCAAAAGCAAGTTGAAGCTGCATTAATC
 AAGTAAACGATGCTAAGAAATGCTTTAAACGGTATGCAATGTAAGCAAGCAAAATCAGATGCGAAAGCAAACTTAGGT
 ACATTAACACACTTAAATTAATGCAACAAACAGATTTAATCATCACAATTCGAAGGTGCACAAACAGTCAACGGTGTAA
 TAGTGTAAAGCAAGCAACAGCTTAGATGGTGCATGCAACGATTAAGTCAAGCAATGCGAAATTAAGATCAAACTA
 AAGCGAGCGAAACTACATTGACGCGATCCAACTAAGAAACAGCAATTTGATAATGCCATCACACAAAGCTGAATCTTAC
 TTAATTAAGATCATGGTACGAATTAAGATAAGCAAGCTGTTGAACAAAGCAATTCAGATGTAACGCTACTGAAATGCT
 TTTGAACGCTGACCGCAACTTACAAATGCTTAAACTGAAGCTACACAAAGCTATCGATAACTTGACACAAATGAATACAC

Fig. 2.9

CAACAATGCGAACTTAAACACTTAAATGATGCAAAAAACAATCATTGAAAGTCAAAATTACACAAGCGCCACTGT
TACAGATGTCACTACGATTAAATCAAAAAGCACAAACGTTAGATCATGCGATGGAATTATTAAAGAAATAGTGTGCGGATA
ATCAAAACGACATTAGCGTCTGAAGATTATCATGATGCAACTGCGCAAAAGACAAATGACTATAACAAGCTGTAAACGCT
GCTAATAATATCATTAATCAAACTACATCGCTACGATGAATCCAGATGATGTTAATGGTGCACGACACAAAGTGAATAA
TACGAAGTTGCATTAGATGATGATGAAAACTTGCAGCACTAAACAACAAGCAAAACAAGACTTGTATCAATTAGATC
ATTTGAATTAATGCGCAAAAGCAACACTTACAAATCAAAATTAAGCAATCATCTGATATTGCTGCACTTAATGGTCACAAA
CAAAACGACGAAATCTTTAAATCTGCGATGGGTAACCTTAATTAATGCGATTGCGATCATCAAGCCGTTGAACAACGTTG
TAACCTTCATCAATGCTGATCTGATTAACAACTGCTTATAATACAGCGGTAAATGAAGCAGCAGCAATGATTAACAAAC
AAACTGCTCAAAATGCGAACCAACAGAAATAGAACAAGCTATTACTAAAGTTCAACAACACTTCAAGCGTTAAATGGA
GATCATAAATTAACAAGTTGCTAAACAATGCGACGCAAGCAATTGATGTTTTAAACAGCTTAAATGATCTCTCAAAAAAC
AGCAATTAAGACCAAGTTACAGCTGCAACTTTAGTAACGCACTTCATCAAAATGAACAATAAGCAAAATATATCAACGAAGATCAA
AAGCAATGCAATGTTTAAAGACAGGACATTCAAGATTAAGCAGCAACTAAAGCAAAATAGCAAAATATATCAACGAAGATCAA
CCAGAGCAACAAACTATGATCAAGCTGTTCAAGCGCAAAATTAATATTATCAATGAACAACCTGCAACATTAAGATTAATA
TGCGATTAAATCAAGTAGCGCAACTGTGAATACAAGCAAGCAGCATTACATGCTGATGTAATTAACAAATGATTAAG
ATCATGCTAAACAACGCTTAGCCAAATAGCACATCTAAACAATGCAAAAAACATATGGAAGATACGTTAATTGATAGT
GAACAACCTAGAACAGCAGTTAAGCAAGATTGACTGAAGTACAAGCATTAGATCAACTTATGGATGCAATTAACAAGAG
TATTGCTGACAAAGATGCAACAGCTGCGAGCAGTGCATATGTCATGCGAAGCCAAATAAACAACAGCTTATGATTAATA
CAGTTCAAAATGCTGAGTCTATCATTCGAGGATTAATAAATCAACTATCAATTAAGGTTAATGATCAAGTGCAGCTCAA
GCAATTAATATCATCTAAATGCAATGATGATGCTGTTGAAGCATTAGCTCAAGATTAAGCAAACTGCTGGAATTTCTAAA
TCAATTAAGATCAATTAACACAGCTCAACAACAGCGCTAGAAATCAAAATTAATAATGCAACAATGCTGATTAAGTGG
CTGAATCATTCACAGCGCAGCATTAAATGAAGCAGTGAAGGATTAAGGATTAAGGATTAAGGATTAAGGATTAAGGATTA
GAAGCAAGTGAATTTAATTAAGGAGATCAAGCGCAAAAGATGATATCAAGCGACACAGCGAGTGTGATGCTAAACA
GATTAACAAAACAACTGATCTACATTAAGTAAATCAATGATCAAGCGACACAGCGAGTGTGATGCTAAACA
ATTTACATGCTGATCAAACTAGCTCAAGATTAAGCAAGCTGCAACAGAAAGCTTAATAACTTGTCTAACTGAATACA
CCACAGCTCAGCACTTGAATTAATCAATCAATGCAAGCACTGCTGGAAGTGAAGCAGCAAAATTAAGTGAAGCAGCA
AGCACTTAACCAAGCAATGGAAGCTTACGTAATGCAATTAAGGATCAAGGATCAACAACAGAACTGCTGATTAAGTGA
ATGAAGATAAAGCGCAAAAGATGCTTACCAAGCAGCACTTCAAAATGCAAAAGATTAAATTAACCAACAGGATTAATCA
ACGCTTGAATAAGCAGCAAGTTGAACAATGACACATGCTTTAAACAAGCTAAAGATAACCTACAGCGGTATCAAAACT
TGCAAGATTAACAACATGCGGTACTGATTTAAATCAATTAATGCTTTGAATAATCCGCAAGCTCAAGCACTTGA
GCCAATAAACAACGAGCACTGCTGCGCAAGTAGCGCAAAATTAAGTGAAGCAAAAGCGCTTGTATCAAGCAATGCA
GCATTACGAATAAGTATTAAGATCAACAACAGCGAAGCGGTAGCAAGTTTCAATGAAGATAAAGCGCAAAAGAG
TGCTTACCAAGCAGCACTTCAAAATGCAAAAGATTAAATTAACCAACAGGATTAATCAACACTGCAACAGTGAAGTGA
AACAATTAACCAAGCAGTAAACAACGCAAAAGATTAATCTACATGCTGATCAAAACTTGTCTGATCAACAACAGGCA
GTAAACAGCTGTAATGCAATGCGCAAACTTAAATCATGCAACAACCAACATTAAGTGAATGCTATTAATGCAAGCGCTAC
AAGAACAGAGGTTGCAACAATGTTCAAACTGCTACTGAAGTGAATTAAGGATTAAGGATTAAGGATTAAGGATTAAGGAT
AAGTGAATACAGATAGGCTCAACCAAAATTAACCTGAAGCGTCAACTGATTAAGGATTAAGGATTAAGGATTAAGGAT
GCTGCAACAAGCATTACAGATCAACTTAATGCTTCAATGCGAATAAGGATGCTGATGAACAAGCATTAACTAAGCTTCA
AGAAAAAGTGAATGATTAATGCTTAATGAGAGGCTGCTGAAGCTAAACAACAGCGAAACAACTATTGACCAATTA
CACATTTAAATGCTGATCAAAATGCAACTGCTAAACAATAATGATCAAGCGCAAGCACTTCAACCAATGCTGATTA
GTAGATCAAGCAACGCAATTAAGCAATCAATGATCAATTAACAACAGCAGTTAATGAACATGCTAAGCTTGAACAAAC
TATAGATTACACAACAGCAGATTGATTAAGCAAAAGCTTAAACAACAGCGATTGCTGATGCTGAAATGATTAAGCAAC
AAATGCGAATAAGCAGCAAGTGAATCAAGCACTTCAAAATTTTAAATGCAAAACAGCATTAAATGCTGATTAAGCOT
GTAGCACTTGTCAAAACAAATGCTTAACATGACATGCAACCAATTTGAATGCAATTAACCAATGCTCAACAGATGATTA
AGGTGCGATGATCAATCAACCAATTTAAATCAATTCACCAAAATTTGATGAAGCTTAAGGCACTTAACTGCTCAATGG
ATCAATTTGTCACAAGAAATCACTGCGCAATGAAGGAGCAGAAAGGTAGCAGCACTTGAATAATGCTGCGCAAACTTAACTGCAAGATCA
AAACAGGATATGATGAAGCGGTTGATTAAGGCAAAACAGCACTTGAATAATGCTGCGCAAACTTAACTGCAAGATCA
AGTTATCAAAATTAATGATGCACTGCACTGAAGGAGCATTAAATGCTGAAGGAGCATTAAATGCTGAAGGAGCATTAAATGCTG
AAGCATTACAAGATTGATCAATTAACACATCTAAACAATGCTCAAGGACAAATAGCAATCAACCAAAATTAATTAATGCT
GAAACGCTAAATTAAGCATCTGAGCAATTAATAGAGCAATTAATTAAGATAATGCAATGCTGAGTACAAACATATAT
TGACGAACAGCCTTGTGTTATCAGCAGCAGAAATTAATCAATGCAATGCAATTTGAAGGCAAAATTAATTAATGATTAAT
CAATTTGCGAATGCGACATGAGTTAGATAAAGTGAAGGATTAATGCAATTTGAAGGCTGAAGGCAAGCAATTAATTAAT
AATAATTAATGATGCTCAAAATGCAATTAATGAGAGCAAAACCTTGAATGCAATGCAATTAAGGATAAAGCAAAATGCTTGTAA
TTGCTTAAATGATTAATCAACAGCAACAGATCTTGACATTAAGCAATTAACCAATGCTGATGCTCAACAGCTGATTAATTA
CAGATATTGTTAAATCAATTAATGATTAATGATGCAATTAAGGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
GCAGAGCAAACTGTCAAATTAACCAAGCGTGAAGATTAATGCAAAACAACTTGAATGATGCAACAGCTGATTAATTAATTA
ATTGCTAAATAGTGAATACCAAAATGATTAATGATTAATGATTAATGATTAATGATTAATGATTAATGATTAATGATTAAT
ATGCTGATCAACGATTAACAGATGCTAAAGCAAGGCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
ATCGAAGCTTCAAAATGCGAGGATCAAGCAAGCTTATTGCAAAATTAAGGAGAAATTAAGCAAACTGATTAATTAATTAAT
CAACATTAATTAAGCAAAAGTAAATCAGGCTGATCTCAAAATTAACAGCAAGGCAACCAAGGATTAACCAAGTGAAT
CTAATGAATACCAAAAGCAAAATTAATTAATTAAGGAGCTTGAATTAAGCAAGTTCAAGCATTAAATTAATTAATTAAT
CGAATTCAAATCTACAGATAAGGAAAAACAGCACTTAAGATGCTTAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT

Fig. 2.10

[illegible]

SEQ ID NO 47 secuencia de polinucleótido

SEQ ID NO: 47 secuencia de polinucleótidos

TGTGATTAATCGTGATAAATACAAAAATTTAGTATTTCGAAAAATACGCAATTGGAAACATTTTCTACTGTGATTGCAACACT
TTGGTTTCATGGGTATCAATACAAACCATGCAAGTGCAGCAGAGTTGAATCAAAATCAAAAGTTAATTAACAAATTAATAT
AAACAGATGATGATGATTCGAATACCGCATAGTCAAGAAATCGAAAAATAACAAACAAAATTTCTAGTGGCGAGACTGGAATCA
TTACGTTTCATCAACTAGTCAAAATCAAGCAAAATGCAAGCTGTCGGATCAATTCAAAGACACTAATGAAACATCGCAACA
ATTACTACAAATTTTTGCGATGATAGTTATCAATCAATCGCATAGTGAAAGCAAAATATGAATAACGAAACCATGGAAGTTA
ATAATAGTACTATTGCAAGCGCATAGTAAAAATAGTAAGCGATAGCGATGGGAATGCTCTTGAAATTAACCATCAAAATTA
ACAGAAATAATGTACTTGCAGAAAGCGAGCAAGTAAAAATGCACAAAGCAAGAAGATATACAGGAAGAAGATAAATCGCA
GCAAGTACATCCACCTATTAGATAAAAAATGCAATCAACAGCTTTTTTTGACGCATCATATCACAAATTACAGATGATTGATA
GAGATCGTGGGATGCAACGAAATATCAAAAGTCAAAATTTTGTACTGTCAGTCAATGACTTACTAGTTAATTAATCA
AATATTTCTTCAGAAACAGCTGTTTTCGGCATATCAACAAATAGAGAAAGCATTTAGAACATTTGACGTTATACCAACACA
ATCTACTACAGAAAAACGTCGTGAGAAAGATACGGAAGCGTTGTTGAGAAATCGTTCATCAAGAGCGGATTACTTAGATG
CTAGAAGTGAATATTATGTTTCAAAAGACGATGATGATTTCTGGTTTCCCTTCGGTACTTTCTTCGATCTTCAAAATAGA
AGATGGCTTTATAAATTTACCAAGCTATGGAACCTTTACGTGCTTCGTATGTAACAGTAATGCTTTATACCTACACAA
ACGACTTAAAGATGATATCAATGCGGATTTTATTATTAAGTAATCAAAAGGCGATGAATATATGTACTATTGGTTT
GACTTCCAAAGTGATCAAAACCAACTGGTCCAGTAATTTTCATATTATCAACCGTGATGGTTTCAAGTACACTACTGGT
GGCGTTGGATTGGATCAAGTGCACCACTACCTCAATTTGGAGATCAGCAGGTCCTTAATTTTACGCTTAGCTAGAGGGGAGAAT
TTTTAAACATGGCTCCGCTACAAATATGCAATTTATGATGGTTTAAATATTTTTCGACTTTGCTAGAGGGGAGAAT
TATCTTTCGACAGAGAAGCGCTACACAAACTAATAAATATTAAGTGGCGATGAAACCTTCGCTATGCTAAATAGTGAAGA
CCAGTCAATTAAGAGGATTAGATACAAATATAGTTTAAAGGTAGTGGTGAATGAAGTTATCGTATTCTTATTAACAA
TCAAGGAGCTCCATAGCTGCAAGATTGATATGCTGCTGGCGCGCTTCGTGGTGAATTAACCAAGCAACGAACTATAAC
AATCTATTGTCGAACCTTATAAGAATTATCGAAATCGAGTACAGTCAAAATGCGAGTTAAAAATGATACACTTCATTAT
AAGAGAACAAATCAGACAAATGGATCTACATACAGAAACTCATGATGTTCTCTTATTTGGATAGTGCAGCGTTCCGGAG
TATTGATTGGTATACGACCACTTAAGTTATGTAAGAAGATGTAAGTGTGACGCTGAGTATTTATCCATTTTATCTTC
CTTATATACAGGAAGATGGCAGGGAGCTAATGCAATGAATGCCATCAAAATGGAAGACTTTTTCACAGAAAAATCTT
CAAAATGCAAGCAGCTTCAAGCGCTCAATTTCAATTTCTGTAGGTTTGTGTTGGAAGATGGCCATCAAGCCCTGAAC
TCTTTTACCGATAAATTTATGTTTAAAGCCTGAGTTTAAACATCAATTTGAGTTATGATACGATTAATGAAGAACAGATA
GAAAGGAATTTCAAGTATCGAAA

12

ATGAGTGGAGACCGCTTCATTAACACTGTAGGATCAGGAATATTAACCTTATCAACAGAGATACGTTATCAAACTACTAGTAA
TGAACCAATTAAAGATAGTGAATGGTCTATTACAGGATATCTCAACACGCTTACATTACAAAACCGCTGTGGGTAAACAA
ATAATGCTACTAGTAAATTAAGCTTTAGCTCTTTGTTGGTCATATGATCCAGGAAATATTTCTCACTGTTAAAGTTTGGTAT
AAGTGTAGCAATTTTTGAATATTAGATCAAAACCAACTCCACCAGAAATCTTCAAACTGCTAATGAATTACGTGGAAATCC
TAACCATTAAGCCTGAAATAAGAGTAACAGATATACCAATGTACTACTGCTAAAAATCAAATCTGTGATGGGGGGAACCG
ATGGCGATCATGATCCGAAATTAATCCATATACTGTCCTTGAACACTACAGTAGTTGCGAAGCATACCTGATTAAT
GATCCCAAGTAAAAATGGGGTTCTTAACATTCGGTTCATCAGACTACCTTAAAGTATCTACCATTAAGCGGTGAATTAAGGC
AATTGTTTATTACAATCAAATGTGCATTAACACTTTAGTAAAGCGTTCCGTTTAAAGTADGCATACACACCACTCAAA
TTAATGAACCGGCAGGACTAGTTCATAAAGTTATACAGGGGATCATGTAGAAATTAAGTTTCCGATCGGATTAAGTAAATTAAT
GGCGGTCAGGTTTAAAGATGTAAACGTAAATCTTAATTAACCAAGTTTGGGTAAGTTGGGTCATGATTATTAAT
TACTGAGGGTACGCTTAAGTTAATGGTAAATATACCTAGTTATGAAGCATATAATACGACATATCATTTCAATTAATTAAT
CAACGCGATAATCTGGAAATACAAACAAATCCAGCTAAAACTTTAATTTAAATGTTTGGTAAAGTTGGGTCATGATTATTAAT
CCAGTCGGATTTATCTAGAGATCAACTACCAATTAAGTGAACAGACTCTTCTTAATTTACTTAATTCGGAACGGAGAGAGGTAA
AAGAAAAATAAGTGAAGCAAAATGCTAATAAGATCATATTTATACAAAAAACCCAATCTCGCTGGAGTAAACCGCGG
TGTGTACATTTTATTATAGAGATGGTTCGTGTAGATGATTTGATGCTGAAAAATGTAATCACAATCTGGAGCCGGAAGAAAA
TCCATTTTCAGTGAATAATGGTATACAAATAAAAAAGGATCAGTAATTAACATTTGCTAGAGGACAAAACTATACCATTTGG
TCCAACTTAAGAAAAATTTCTCATTAAGTATGTTGCTGATTTAACTTAATAGAGATTTCACTGCTATATTCAGCTATAT
GATCTTTTACCTTCATCGAGTGAAATTAAGTGCATCAATGTTGGAATATAACTTAAATGATTAAGATTTAACTGTAAAAATGCTTT
CATAGACTCAACAGAACTTAATTTAAACTTAAATAGTAGAGGTTAATGCACCTACTGGTAATAATCGTGTATATAG
AGTTAGTACTTATAATTTAACTAATGTGAAATCAAATAAATCAAACAGCAATTTAAAGCAGCTAAATTTGAGCTTAAT
TAACAGCATTAACGATTAACGTTTTCGAATAACTTTGACCAAGAAATTAAGTAAATGATTAAGATTTAACTGTAAAAATGCTTT
GATTTGATAAAGAATTTTCTCAAAATCAATAATAGTAATTTCTTACGTTGGGTTAATTAAGGGATGATTATACCAT
TTCGTGGACTTCTAGTAAGATTAAGGTAGAAATACAGATGGTGGATAGAAATGTTCCACCAAGTACATAAATCACTATT
ATAAGTATGATGCAACATTAAGTAGACAAAAATACTAAATGAGCTGTTAACTTTTACTTCAAGCAACAGCTAAAACTCA
AATTTACGTTTCAAAATCAATAGTAAATGAAACAGTTAGCAGACGGGGCTTAATGGGTATCTTAAATCTATAATTAG
AGATGATGGCGAAGAACTTTATTTACTTAACTCAATCTATTACAGTATTAGACTTAGTAAACCCAGATTAATGGTTAGC
GTGGAAGCTCAAGTCAGTCAATCTCAAGTTATATATATTAATGAAAAAATCTTCTATCGTAAATGGTCAAGTTCCAGAGCT
TATGGGGCACTCCGCTTTTAAATTTGATAAGTGTGTTAAAGCTAAAGCGGCAAAATTAAGGTATTTAGGTTTATCTATAA
GGCACAATTACTTTAGCACCATACAGTCCAAAGGTTTACATTGAAAAATTAGGCCAAAATTTAAGCAATACCAATAAC
TCGTTAATGTTTATTTTGTGCTCTCTGATAAAGTAAATCTTAGTAACTGTAGGTAATTAAGCCTTACGCTCATACGTTAT
TCTGGTGAACACTTTAAAAATZACTATCAATGTAAAAATGATTAATATGAGTTAAATCAGTGTCTTACAGGTTATAGTGC
AATTACTATGACCCAGAAACAAACAGAGTTAGTAAAGTCAAGTCTCTTAATGTTACTAATAGCATAAATAAAAATGTAAGA
TAAAGCCACAGATAAAGGTGAAATGAAAGTTTGTCTTTCACAGTAAATATAAACCATTAACAGGAATATAGA
ATAACAACTTCACTAAGTAAATCAACCAAGTGAAGATAGTAAATTTCAAACAAATGCTAACTTTCAATTAAGATCA
AAATAGAGTAAATCTTCACTCAGCATGCTAAATTTTAGGTCACAGAAATTAATGTCATGAGTCAAAATGAAGCTT
GTAGTCAAGTTGATAGTAAAGTAAATAGAGAGTGGGAAGATGCTACAGTTAAATGTTACAACTACATTTTCTGATGAC
ACTAAATACATTAACGTTCCAGTTAAACATGTTGTTATAGAGATGTTTACTACTACTAGAACCAAGTAGAGAGCAACA
ATTTCCAAACCGGCAAGGAAGCTTCCCAAAATGATTTCTTTAGTTTAAAGAACGGGAGGTTCCAGTTGATGCGAAGATAGTTT
GGGTTAATAATCAGGAGCCGATATAAATAGTAAATCAATTTGTTAGAGATTTAACTATACCGCTGAATATTTCTTGAT
CGGTGAACAAACCAATTAAGAAAGATACTACTTACAAAGCTTAGTCAATTAATTTCAAAGCAAAATATATGAACCAACTAT
CAATGGTCGATTTAATTCATCAGGTGATGTCATATCCAGGAAATTTTGTTCAGCAGTAATTAATTAATTTGCCAGACAT
TGAGCTTCAGATGGGGCCAGGATCAGGCACAGCTTCTGTAATGTCAGGTTCAATTACTATAAACAGTTACGGTAGTT
TATCAAAAGCGGCAAACTGAAACGTTTAATGTACTATTCAAAGTCAAAACAAATTAAGCTTTATGATAGTAAATAGTGT
GATTTCAAAGGCAATTAATAGGTGTCACAAATTTTAGTTCGAAATGTTCCACAAATGCAACAGTCACTCTATATCAAT
CAAATGGAAGCTTTATCTCAATACAAATCAACTATAGATTTCAATGGTATAGTCACTGTAAACATTTCAAGGCACCTTA
CCAAACGGAAATATTACTGCTAAAACTCAATGCAAAATATGTAAGGTATACATAACCAAAATAGTAAAGTAAATGCTT
AAATCAACACTGAAGATATAAGTGTTTTTCAGAAAAAGTATCAAGTAAATGTTACCGCTTGGCATGCAAGCTAAAAATG
ATGATATAAAAAATTAAGGTGACAAACTATAATTTAATGCTCAATAGTTTCAATAGTAAATATACAGGCCATCTT
ACTCTTACATGGAACGAGGAGCTTAATAGTTGGAAGAACCAACTGCGTACTACACAAAGCTGTACAGTACTCTCTCC
TAATCATCAAGGTACGAGAAGCTGATGATTTCCAATAACAACTCTATCCAACAGTTACAGCTAAGAAATCCGTAAGAGAT
AAAAAGGACGAAACTTAACCAATGGTACTGAGGTTTATAATTTATTTTGAATAATAACCGTTCTGAGAGAAC
GCTTCTTGAAGAACAACTGTCACCTGATAAAAACTAGCGGTGTACAAAATTTAATGCACTTGTAAATATCTCTGG
CATATCTACACCATTAAGAAATCTCTGTTAAAGTGTGGGTATATAATTTGATTTCACTCAACCTATCTACAAAATTCAG
TAGGAAATCATTTCCGTAAGGCAAGTACGGCGAGCTATTACAACTCTGGAATAGGAGGATTAACCAATAGATGTT
TGGAAATTTATTCGAACCCAGCAAGTACAGGACTACTAGTGAATGGCAATTTAGCATATTTAGCATATAGAACTCTTT
TGTAAAACTGTGACTTATGATGTCGTTAATCTTAGCACTGGGGTGTGTCGAAACATCAAACTCAGCTAAATTTATAG
TTACAAATGCTTAACTTATCAACCAACCAATCACTCACTCACTTAAACTGCTGATTAAGCAATCACTGTTGCTGGT
AATATACATTAATAGTGGGCAATGATTTATATCCAAGCATCTGCAGTAGATTTGTTATTAATAAAATGAAATTAAT
AACTACTATTTGTAATAATATGATGTCGTTGCACTGTTGAACCTGGGTCACCTGACATAAATGGTATCGGACCAACA

Fig. 2.12

ATAACGGAACTGCTATATCTTTAAGTCGATTAGCAGTTAGACCTGGGGATTCAATAGAGCAATAGCGACTGAAGGTTCC
 GGAGAAACTATAAGTACTTCAGCAACTAGTGAATTTATATTGTCAGAGCTCCACAACTGAAACAGTAGCACTCATAC
 TTATGATAATGGAACATTTCGATATATTACCTGACAAATTCACGTAATTCCTTTAAATCCAACTGAAAGTGTGAAATTAAT
 ACAGTGAATAATTAATGGCAATGAAACACAAAAATCATTCACTATTACTAAAAATAACAACGGCAATGACGATAAAT
 AATAAACCAAAATTAATGCGAGTTCAATCAGGATAATGGTAAAGTTGTATTTTCGGCCAAATACAATTAACCTTAATCTCA
 AATTACAATAACTCCTAAAGCAGGTTCAGGGTAACACTGAAAAACAAATCCTACTGTAAATTCAGCACTTCGGCAACATA
 CTTTAAACAATCAATGAAATTTGTTAAAGAACAGGGTCAAAATGTGACTAATGATGATTAATAATGCGGTTCAAGTGCCA
 AATAAAATAGAGTTGCGATTAAACAGGAAACGGCTTCCAAACAAATTTAGCTGTTGTTAGTACATCACAATTTCCAGT
 AGTEATTATTACAGTGATGGAAGTTCTGAAGAAGCTACTGAGACTGTTAGAACTAAAGTTAATAAAACCGAAATTAATCA
 ATGCTCGTCTGCTGAGTAGATGAAGAAATTAAGTAAAGAGAACAAAAACCATCAAGTATCAGAACTTTGATCAAGCTATG
 AATCGTGCTCAATCACAATTAATACAGCTAAAGTTGATGCTGACCAAGTTATAGBCACAGAAATTTGCAACACCTCAACA
 AGTAAATTCAGCTTTATCTAAAGTTCAAGCGGCACAAAAATAAATAAATGAAGCTAAAGCAITATTACAAAAACAGGCTG
 ATATAGTCAACTTGTGAGAGCAAAAGAACAAATTAACAACAAATCGATTCAACCAAGCGCTTCAACTGATGTTATGACTCAA
 GATAGCAAGAACTACAAACAAATAAACGCCAGGAGCTGAAACAAGCAATACACATGCAAAATAGCGTTATAAATAATG
 AGATGCAACATCCCAACAAATTAATGRTGTCTAAACACAGTTGAACAGGCACAGAGAGATTATGTTGAAGCTAAAGCA
 ACTTACGTGCTGATTAAGTACAGTTACAAAGCGCTTATGATACGTTAAATAGAGATGTTTAAACAATGATAAAGGCCA
 GCATCTGTAAGAGCTATTAATGAAGCCATTTCAAAATATTAGAAAGAAATTAGATACAGCTAAAGAACTTTGATCAAGCTATG
 TTTGCGAAACACCAATCCTTCCGTTGAACAAGTTAGAGAGCTTTAAATAAAATAAATACTGTTCAACCTTAAGTGAATC
 AAGCAATTTGCTTTACTTCAACCAAAAGAAATAATTCAGAAATTTGTAACAAGCTAAAGAACTTTACAGAGCGCTGAAT
 GACATACCTCAACACAGGATATGACACAAACAAATTAATTAATTAATGACAAACAGCTGAAGCTCAAGAGCACT
 TACATCTGCAACAAAGAGTATTGATAAGTGGGATGCTACAACTCAAGAAATTACTTCTGAAAAATCTAAAGTAGAGCAAG
 CAATGCAAGCTTTAACTAATGCTAAAGTAATCTGAGAGCTTAATAAGAAATGATTACAGACTGCATATAACCAATTAAT
 GAGAAAGCTATCTAACCAATGCTAAAGAAACCGGCGAGTATAGTCAATACGAAACAGCCAAAGCCAGAAATACAAATCAAT
 TAATGATGCTAAAGTGAAGCGGAGCGAAATTTAGGTAATGATAATCCACAAGTATACAAAGTAATCAAGCTATGATCA
 AAATCAAGCTATTCAACCAAAATTAACAGAGCTATCAACATGCTTCAAAACAAAGAAATAATACAGAAATTAAGTCAAT
 GCTAAACAGACTTGAAGATGCAATTAATGATACAGATCCAACACAGCTATGACTCAAGAAACAAATTAATTAATTAACA
 CGCTAAAGAGCGAGAGCTCAAAATGAATACAAAGCGAAGTATGATTATTAATTAATGAGATGCTACTGCTCAAGATA
 TTTCTCTGAAAAATCTAAAGTAGAGCAAGTATTACAAAGCAITACAAATGCTAAGAAATGACTTAAGAGCTGATAAAGAA
 GAATTACAGACTGCATACAAATAACTTATACAAATGTTAATACCAATGCTAAAGAAACCTATCTAGTATTCAAACCTATAA
 GTCTGCAAGAGCGAAATATCGAAACCAATATAATACCGCTAAAGAAAGGACATATGTTCTTGAAGAAATCAAGCCCTA
 CTGTAATGCAAGTAGAGATGCTTACGTAAAGTAAATGCAATTCACCAAGAGGTTACAAAGCTATTAAATATCTTCA
 GATAAGAGAGTAAATAGCGACTTGTAGAGCAAAAGAAATTAGATCAAGCGATTAAATGCTCAACCTACTAAATG
 TATGACTCAAGAAATCTATTAAATTAACACAAACCGTAGAGAGCACAAATATAGCAAGTTCTGCTGACACTATTA
 TTAATTAATGCGGATGCTATCTATTGAACAAATACAGAAATTAATTCGAGTTGAAGAGGCAACTAATGCTTAAACGAA
 GCAAAACACAGCTTTAAGCGGAGATACAACTCTTTAAAACTGAGTACGAAATTAAGTGAAGAGGCGACACAAACAA
 CAAAAGCTTAGCAGTGTAGTGTCTTAAACAACTATTCATTTCGCTACAAATCTGAAATTAACAGACTGAAAAATAGAG
 CAAATACTATCAATTAAGCTTATCTGTTCTGTTGAAGAGTAAATTAATGCAATTCATGAAATTAAGCAAGCTAAATTAAGCTC
 CGCTTAACAGATACAAATTAACCTTATTAACAACTTTAGCGAAATAAGAAAGCTTAAAGAGAGCTCGTAATCGACTTGAAG
 TAAATTAATGAAGCTTTAAGCGGAGATACAACTCTTTAAAACTGAGTACGAAATTAAGTGAAGAGGCGACACAAACAA
 AAAATGAATCTAGTATGCAACAACTCTTATTAATTAATGTTGATGCACTGATCAAGAAAGTTTCTACAGAAATAGAAAA
 TTAATCAAAAGCTGTCTGAATTAACAAATTCATCAATCACTTAACAGTTAATAAGAACTTTAGAACTTCCAAAAA
 TCAGTTACAGCAAAATATTGACCAAAACCTTAGCAGCTGATGTTATGACGCAACAACTGTACAAAGCTATGAAGTAAAC
 TACAAGAGCCAAAGATAAAATAACTCAATTAATTAATGCTTACGCTAACAACTCCAGATGTTAATGCTATCAGAACAAAC
 AAAGTTGAGAGCGAACAATCAATAATGAATTAACACAGGCGAAACAGGCTTACTGTTGATAAACCACTTGAATTA
 TGCAAAACTGCTTTGCAACAAAGTCTAGATAATCAACCAAGTACTACTGTTATGAGTGAAGCAACAAATCAAAATTATA
 ACGCTAAACCTCAAAAGCAGAGCAAGTTATACAAATGCAATTAATTAATTAATGAAGAACTCAACCTAGTGTACAAACAA
 GTGCTGATGAGAAATCTAAGGTAGAGCAAGCACTCAGTGAATTAACCAACCGCAATCAGCGCTTAGAGCTGATAAACA
 AGAATTACAGCAAGCATATAATCAGTTGATTCAACCAACGAAATTAATAATTAAGAAACCGCTTCTATCACTGCGTACA
 ATCAAGATATCAACAAATTTAGTAAAGTGAAGCAAGTAAACCAAAATTAACCAAGGCGAGCACTTTTACA
 AGTGTAGCTGATGTCACAAATGCACTAAATTAAGTAAAGAGTAAACCAAAATTAACCAAGGCGAGCACTTTTACA
 AAATAAGAGATAATAGTGCAGTGTTCGAGCCAAAGAACAACTTCAACAGGCAAGTTGACCAAGTCCCTTCAACAGAAAG
 GTATGACGCAACAACTAAGATGATTACAAATCAAAACAAACAGCTGCTCAACAGAAATATCAAAAGCACAAACAGTT
 ATCGATAATGCGGATGCGACTACACAAACAAATTTCAACGCAAAACAAATGTTGAAGCGCTTTAGAGGATTAATTA
 TGCAAAACTGCTTTAAGAGCAGATAAAGAGGAACCTTCAAAATGCATATAATCAATTAACCTAAATATTGATACGAGCG
 GTAAATGTTAATGAAGTAGATCCAACACAGGCGATGACAAACAGATACTGCTAATAACTATAAATCAAAAAACCGTGAAGCT
 GAAGATGAATACAAAAAGCTCAACAAATCAATTAACAAATGGCGATGCCACTGAGCAACAAATTAACAGAAACAAATAG
 AGTAAATCAAGCGATTAATGCAATTAACAAAGCCAAACGATTTACGCTGATTAAGTCTCAATTTGAAATGCTTTATA
 ACCAATTAATACAAATGTTGATACAAATGGTAAAGAACTGCTAGTATTCAACAAATACCAAGCTGCTGACAGCTATT

Fig. 2.13

GAGACGCAATACAAZAAACGCTAAATCAGAAACACATCAAATCTTGAATAAGTAAACCTTCAATTAATGAAGTAGCACA
 AGCATTACAAAAGTTGAAGCTGTACAACTTAAAGTTAATGACGCGATTCATATACCTCAAAATAAAGAGAAATAAGT
 CACTTGTTCACAGCTAAATAACAACCTTCAAGCAATCAATTAATGATCAACCAATTAACAAAGGATGACTCAAGATTCTATT
 AATAACTATGAAGCTAAGAGAAATGAAGCTCAAAGTGTATCAAGAAATGACAAAGCTGTATCAACAAATGGCGATGCAAC
 TGCAAAACAAATTTACAGACGAGAAATCTAAAGTTGAACAGCACTAGCACAATTTGAATGATGCTAAACAGCAATTAACG
 CAGATACCTATGAATTAACAACAGCAATTCACAAATTAACAAGAGAGGCGATACAAATAATAAAGGCAAGAGATATC
 AATGCAATATAATAAGCAATTCATCAATTAGAAACACAAATTAATCTTGTCTAAAGATTAATGCCAAGCTGTGTATACAAA
 ACCTATACGCTACTGTTCAAGAGGTAAATAATGCAATTACAACAGTAAATCAAGTTGAATCAACAATTAACGTAAAGCAATTA
 ATCAACTTCAACCGCTATCAAAATAATGATGCTTAAAGCTGCAAGATTAAATTTAGAAAATAAATAATTAATCAACTGT
 CAACTGATGCTATGACACAACTCTATAGAGGCTTAACAAGGCTAAACGCTAGCCCAAAATGAATCTAACACTGCT
 TTAGCAATTAATTAACGCGGATGCGGATGAACAAACAAATTAACAAGTAAACAGAGCGATCAATCAACAACTACAA
 ACTTAACCAAGCAATTAACGCGGTTAACAGTTAAATAAAGAACCAATTAAGAAACCGCTAAACAGCGTTACAAATAACATC
 GACCAAGTACCTAGTACAGATGCTATGACTCAGCAATCTGTTGCAATTAATAATCAAAACTACAAATAGCTAAACAAAG
 AATTAACCAATTAATAACGTTTAGCGAAACAAATTCAGGTTAATGCAATCAAAACGATTAAGAGAGAGCGGATGCTAATG
 CTGATTAACGATTAACAACAGCTAAGAAATTAATTAACACTGATTAACACTTGAATCAACCTTTAGAAAATAAATAAGCAACTTCA
 GATGAAATGATCAAGTACTAACACAGATGCAATGACTCAAGATTCAAGTGAATTAATCAATGATAGCTTAAGTGCAGC
 AATTAGAGAAAAGGCAAGTAAATAATTAATTAACGCTTAATCGACAGTAGAACAAATTAAGAGAGCGGTTGCTAATG
 CACAAAGCTTACACAACTTGAAGAAATTAATTAAGCTTCAACTTGAATCAACCTTTAGAAAATAAATAAGCAACTTCA
 AGATTAGAAAACGATTAACCAACAAACAGATGACTGACGCGATGACTCAAGATTGCTTAACAAATTAATGATAAAT
 AGCAAAAGCTAGCAAAACCTTGAAGAAATTAATTAAGCTTGAAGTGAATCAACCTTGAATGCTAAGTAAAGCAAAAT
 CAGATGAAGCAAGTGCACATAACAGCAATTAAGCACTGACGCTTCAACTTACATTAATAGAGAGCAATTAATCAAT
 CATATTAATAAGAAAGTCAATTAATAACGCGCAAAAGATAATTTAAAGCTCAAGTTAACTCAGCACTTAATCATAA
 TACTTTAGAAACGATTAATAATGAAGCTGATCTTAATCAATCTATGACAGCAATTAAGTGAAGTATTCAGATTACG
 AAAATCAAAACACAAAGAAATTAATTAAGTGCATTAACAAATAACGCTCAAGACTATGCAATGCAATGCAATGCGGCT
 AAAGGTTATTTAAACCAACTCAAGCTCGACAAATGAGTGTGATGATGATGATCAAAAGCTGAAGATGTTAAACGCTAC
 GAAAGCTGCTTGAATGGAATCAAGATTAGAAATGCTAAACAAACAGCACTTAATCATTTAAATACCTTAAATGAT
 TAAACGATGCTCAGCGCAAACTTTAACTGATCTATAATCACTTCCAAACATCAATTCAGTGAATCAAGCTAAAGCA
 AAAGCTAATACTGTTAACACAGCAATGACTCAACTGAAACAACTATTGCTAATATGACGATGAATTCATGACGCGCA
 TTACATTAATGCGATTAAGACAAAGATGCTTATAATACGCTGTTAAACATGCTAAACAACTGATTAATCAATCTG
 ATGCTAATCAAGCAAACTTGAATCCAGCTGAATTAATAAGTTACACAAAGAGTCAATACGACTAAAGATGATCTAAAT
 GGTAAATGACAAATGGCTGAAGCTAAAGAGATGCTAATACCACTGATGCTTAACTTATCTAAATGAAGCTCAAG
 TAACAAAGCTTAAGAAATGTAAGCAAGCTTACAAACAAATATTAACAGTCAATTAACAGATTCAATCAATGTA
 ATATTGCTATGCAAGCAATTAAGTGAAGCTGTAAGCAAGCTTAACAAATGTAATAATGCAATCTAACCTGAAATGAG
 AATGCTCAAAAGAGCTTACAACTCAAGCGTTACTCATGCTCAACATGTAATAATGCAATCTAACCTGAAATGAG
 CCGTGAAGCTAGTAAATCAAAACACAGCAATTAATGCTGCTCAAGATTAACATGCAATTAACCTGAAATGAG
 CACAAAGTATGCTAATACAGAAATCGGTAATTAACAACTTAACTAATCTCAAAAGCTAAAGAAAGGAACTGTA
 AATAGTAAACAAACTCTGACGAAATTAACAGCAAACTTAACCAAGCTAAGTCACTAGATAGTTCTATGCGACGTTAA
 ATCATTAGTTGCTAAACAACTTACAGTACAAACAAAGTGTATATTAACGAAAGTCAACTGAGCAATCTGCTTACA
 ATCAGTAACTTTCACTAAAGAGAAATGCACTGCTATGCTAACAAATTAACAACTGCTAAACGCAAGCAATTAATG
 ACTAATACATTAAGTGTATTAACACACCTCAGAAAGAGCTATTAACAAAGCTATTAACACTGCTATACAGAACTG
 ATGTAATGCAAGCAAGTAAAGCTAATCAATTAATAATGCAATGCAACCTTGAAGCAAGCTTAAATTAATGCTAA
 TCAATTAACAAAGCAAGTAAATTAATTAATTAACCTGAACTTAAACAAACATGCTTAACTGAGGCTTAAATTAATGCTAA
 AGAAATAGTTAATGAACACAAAGCTTCTGATGCTCAATTAACAAACAAAGCAAGCTTCTTACTACTAAAT
 ATGCTTTAGATGCTGAAGCAATTAAGTGTGCTAAGAAATGCTCAAGTAAAGAAATCAATGCTTAAATCAATGACT
 GATGCGCAAGAAATAGTGAAGAAAGTTTAGTCAACAGTTCTCAAACTAGAACAGAGTGTCTCTCAATTAACAAAGC
 TAAAGAACTAAATAAGGTGATGGAACAACTGAATCACTTATCAATGCTAAACAAAGTAAATTAAGCAAGTAAATTA
 TCAATGAAGTGAAGCAACCAACAGCAATTCAAATGCTGATGCAAGTGAAGGCTTAAACAACTCAACAAAC
 CCGTGAATTAAGTGAAGTGAACAAAGCAATTAATTAATTAATTTCTGCAATTAACAACTTAAACGCTGAAGCTAA
 ACTGACTAAAGCTAAAGAGATGCTGTTGCTTCAATAAACAACTTAAAGCGGATTAACAAACGAGCAAAACAAAGGAA
 ATCAAGCGGTTAATGGCGCTCAAACTAGAGACCAAGTGTCTAATTAATTAAGTGAATGCTGAAGCAATTAATCAATG
 CAAACATTACGCTGACTTAGTTAAACAAATCAAAATGCAATACATTCACAAAGTAAATTTAATCAAGGATTAACCTCAAA
 GAATACTTATGATTAATGCAATTAATGCTGCTGACATATAACTGCTCAACCAATCCAGAAATTAATTAATTAATTA
 TTGATCAACGATTAAGCGAATTAACACAGCTAAAGTATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 GCTAATCAAGAAATGAGCAATTAAGTTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 TACACGTTCTGAAGTAGAGAGCTTCTAATGAAGCTAAATCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 CTGAAAGACTAATGTCAACAAAGTAGCGATTACATTAATGATTAACCTGAACATCAACGCTGCTATGATCAAGCACTT
 CAAGAGCAGAAATATTAATTAATGAAGTGAATCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 GACTGACGCTCAAAATGCTTACAGGTTTACATCTATTAAGAGAGCTAAATAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 TTACAGCTTAATTAATGATGCAACGCTCAAAAGCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 CAATTAATTTGATTAAGAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT

Fig. 2.14

ACAAGTAATTATTTCAATGAAGATGAACAACCAAAACATAACTATGATAATTCGTACAGCCGGTCAAACTATTATTG
 ATAACTTCAAGATCCCAATCATGAACAAAAATGAAATTTAGCAGGCTATTAAATCAAAATCAATACGACTCAAAACAGCGTTA
 AGTGGAGAAAAATAAATTACACACTGACCAAGAAAGCACAAATAGACAAATAGAAAGTTTATCTAGTTTGAACACAGCTCA
 AATCAACGCCGAAAAAGATTTAGTCAATCAAGCTAAAAACAAGACAGATGTTGCTCAAAAGTTAGCTGACGTAAGAA
 TAAATTCGCTATGAGTAATTTAAGAGATGOCATTCAAAATAAAGAGGACATCAAAACGTAGCAGTGCATATATCAACGCA
 GATCCGACTAAGTTACAGCTTACGATCAAGCACTACAGCAACGCAAGAAATATCATCAATGCCACACCAACGTTAGAGCT
 TAATAAGCTACAATTGAACAAAGCCTATCAAGCGTTCAACAAAGCAACAAAGATCTTGATGGTTTCAACAATTAGCTA
 ATGCTAAACAACAGCTACACAACTGTCATGGGTTAAATAGCTTAAATGACGGTCAAAAGCGTGAATTAAATCTATT
 ATTAATTCAGCTAATACCGTACAAAGTACAAAGAAATTAACAAAGCAACTGAATTGAACCATCGGATGGAAGCTTT
 AAGAAACAGTGTTCAAACGTTGATCAAGTAAACAAAGTAAAGCAATTTATGTCATGAAGATCAACCTGAACAGCACAATT
 ATGATAATGCTGTCATGAAGCTCAAGCTACAACTACAAACAACTGCTCAACCTGTTCTAGACAAATTAGCTATAGAACGT
 TTAACCTCAAACTGTTAACTACAAAGATGCTTACATGGTCTCAAAACTGACACAAAGCAACAAAGCTGCTGAAC
 TUGAATACGTGTTTAAAGAGCTCAATGAACCTCAAGAAATGCTGAAGTAGCTAAAGTAACTGACCAACCAACAGCT
 ATGAAGTGAGAAATATTCGTCAAGAAAGCAACAACTTAGATAGTCTGCAATGCTTGGTTTACGTAAGAGCAATTAAGATAAA
 AACGATACATAAAATAGTATGTAATATTAATGAGGATCATGACCAACCAAGCTTATGACAAATGCTGTAATTAATGTC
 TCAACAAAGTTATCGATGAACCTCAAGCAACGTTAAGCTCAGATCAATCAATCAATGGCAATGCCGTAACCTCAAGCTA
 AATTCAGCTCAAAACATATGAACTACAAAGATGCTTACATGGTCTCAAAACTGACACAAAGCAACAAAGCTGCTGAAC
 AGCTCAAGCTTAGATGCTTAAAGAGCTTAAAGAGAAAGTATTAAGATTAATGCTCAAAATTAATTAATTAATGCT
 ACATCAATGGGAACTCATTAAGAAACAGCTATGATGCAAGCTTACAAATGCTCAAAATTAATTAATTAATGCT
 CAACCAACAAATTAATTAAGAGTAAATGCTCACTACAGCAACCAACCGTGAAGAAATTAATTAAGATGCTTGAAGCTGATCA
 TAGATTAGAGGAGCTAAAAATTAATGCCAATCAACCAATCAAGAAATCTATCAATTTGAACAAATGCCCAAAAGATGCA
 AGAAAAATCTAGTTAATAGCGCATCAACATAGACAAAGTTCAACAAACTTACAAACCGCTCAACCAATTAGATTAATGCT
 ATGGGTGATTTAGCAAAAGTATTTGCTAAAAAGATCAAGTGAAGCAGATAGTAATATCTAAATGAAGATGCTCAAAAT
 TAAGCAAACTATGATGATGCGATTCAAGCTGTTAAAGCTATTAATGAAGAACTCAAAACCTGAAATTAATTAAGCA
 ACATTGACCAAGCAACTCAATCGGTTCAAAATGCAAGCAAGCTTTACATGGTCTGAAGAAATTAATTAAGCAAGCA
 AGCTCTTGAAGAGATGATTAAGCAAAATTTAGCAAGCAAGCAAGCTTAATGAAGATGCTGAAGAAATTAATTAAGCA
 TTAATAGTGAAGATGATTAAGCAAAATTTAGCAAGCAAGCAAGCTTAATGAAGATGCTGAAGAAATTAATTAAGCA
 TTGCGCAAAAGATGCTGCTCAACAGTATTAATCAAAATGCTGAAGATGCTGAAGAAATTAATTAAGCAAGCAAGCT
 CTTAAACAAAGCGGAGACATTAATTAATCAAGCTCAATCTCAACTTAAATGACCAAGCAATTAATTAAGCAAGCAAGCT
 TATTAACAAAGCAACAGATAACCTTCATGGAGCTCAAAATTAACAGCAAGCAAAATTAACACTTAATTAAGCAAGCA
 ACTTAATCATCTTAATCAACTCAAAAGATGCGCTTATACAAAGCTTAAATGCAAGCAATTAATTAAGCAAGCAAGCT
 GAAAAATTAAGAGCGGAGCGCTTGAAGCTATGAAGCAACTTGAAGATCAAGTGAATCAAGATGATCAAAATTT
 AATAGCAGCCCACTTCAATTAAGAGCTCAGACAAACAAAAATTTAATGAATTAATTAAGCTGCAAGCAATTAATTAAGCA
 TTAATCAACATCTAATCCAACTTAGATTAACAAAGATGCTAATTAATCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 TTAGATGATGAATGAATTAAGCTCAATCTAATCAAGATGCTAATTAATCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 ACAAAAAACCACTTTAAACCGTTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 AATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 GCTGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 AGATCAATTAAGCAATTAAGCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 AGGCTTTAGCAATGCTTTAAAGCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 ATCAACCATGATGAACCTTAGAAAGTTAGCTCAAGATTTGCAAGAAAGCAAAAGAGCTTAATGATGCTATGAAGCAAT
 GAGAGATAGCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 ATTAATCATGCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 ACTCAAGATATAAATAAGCTATAAATGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 AATTACTAATTTACTGTTTAACTGAACCAAAACCAAGCAATTTGAAGAAATCAATTAACCAACAAACCAAGCAAGCA
 ATGTTGCTAAACAGTTAAGTCACTAAATCTTAAATGGAAGAAATGAAGAAATTAAGAAATTTGAAGAAATTTGAAGAAAT
 TTAGTAAGCAAAATAGTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 GGAATAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 AACAAATCTTCAATGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 AATTCACTCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 AGCAAAAGCAATTAACCAAGCTATGCAACAACTTAACCAAGTATAGCCGATAGGATGCTACTCAAAATCTAATTAATTAAT
 ATCTCAATGAAGATTTGAGAAAAAGTTAGGCTACGATAATGCTGTAAGCCAGCTGAACCACTCAAAATCAACTTAAC
 GACCAACTATGGATATAAGTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 TAACTTGCAAAATCAAGCAGATTCAATTTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 TAAATGACTTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 ATGCGCACACTAAAAACACTGATAGAAAGCAAGTCAAAAGCTTCAACCAAGTAAATATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 TCAAAATATTATAATGACTCCATTTCAAAAGGTCGAAGAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 AATAGCAGATGCAATTAACCAATTTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 GATGCAACCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 TCCCTCAAGAACTGAAGTTTCAATGATTTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT

Fig. 2.15

221

TTGCTCTTGAAAAACAGTGTGTTAAAAAATTAAAGCGACTTTATCAATGAAGATGAAGCGGCACAAAAATGAATATAGTAATGCA
 CTTCAAAAAGCTAAAGACATTTATCAACGGCTTCCAAGTAGCACTTTAGATAAAGCTACAAATGAAGATGCTTTATTAGA
 ATTGCAAAAATGCTAGAGAAAGTTTACATGGTGAGCAAAAACCTTCAGAGAGCTAAAAATCAAGCTGTGCTGAAATTTGATA
 ATTTACAGCATTAAATCTCGACAGGTTCTTGCTGAAAAAACATTAGTTAACCAAGCATCAACCAACAGAAAGTTCAA
 QAGCCCTTACAAAAAGCAAAAGAACTTAATGAAGCTATGAAGCACTGAAAACTGAAATAAATAAAAAGAACAAATCAA
 GGCTGATAGTAGATATGTAAATGCTGACAGTGGTCTTCAAGCAAAATACAAATTCGCGTTAAATTTATGTTCTCAAAATTA
 TTGCAACTACCCCAACCACCAGAGCTTAATAAGATGTAATAAATAGAGCAACTCAACGATTAACAACTGCTGAAAAATTAAT
 TTAATGGGCAATCTAAATTAGCAGAGGCTAAGTCAGACGGAATCAAAAGCATCGAACATTTGCAAGGATTACACAATC
 ACAAAAAGATAAACCAACATGATTTAATTAATCAAGCTCAAACTAAACAACAGGTAGATGATATCOTAAATAACTCTAAAC
 AATTAGATAACTCTATGAATCAAGTACACAAATTTGTTAACTGACAAATACAGTAAACAAAAATAGTGAATTTCAATTAAT
 GAAGATTCCAGCCCAACAGGATGCTTAAATCAATGCAATTCAGCGAGCAAAAGATTGATAACTGCTCATCCAATATCAT
 OGATAAAAATCAAAATAGATCAAGCTATGAATAATCAAAACAGCACTTAAATGATTTACACGGTAAATTAATAACTATCAG
 AAGATAAAAAAGAGCTTCAGAACAACTCAAAACCTTAATAGCTTGACGAACGGGCAAAAAGATACGATTTTAAATCAT
 ATTTTCAGTGCACCAACAGAGAGCCAAAGTAGAGAAAAAATTGCAAGTGTAAACAAATTAATTAATACAAATGAAGCACT
 TAGAAGATTCTATGCTGATATTAATGAAATTTTACAAAGTAACTGATTTCAATGAAGATTCTGAAACCAAAATGCTT
 ATAATCAAGCCGTAATTAAGCTAAAAATATAATTAATGAATGACAACTCAACCAACCAAGTAATGGCAAAATGATGATTTCAAT
 GTCTTAAATGAAGTTAAACAACTAAAGATATTTACATGGTATCAAAACTTCTGTAACGACAGACAGATGCTCAAGC
 AACATTAATGCGTTAAATTAATTAATTAAGCGCAAAAGGATTAATCTTGAACATTAAGTTCAAAACTCTAATTTCTAGAC
 CAGAGTAAATAAGTAACTCAATTAAGCAATCAACTTAATGAATGCGATGAATAAATTAAGATGCTTTAAATCAT
 GACGCAATAAACCAACAGGATTAATTAATTAAGGATTAATTTCAACAAAGTTAACTTTGATGATATACAGATAGGG
 TAAAAACATAGTTGCTGAACAAACAAATTCAAATATGTTCCAACTAATTTAACTATTTGCTGATTAATTAATTAATGAG
 CTAAAGCTTACATGCGTACAAACCTAAACCAAGCTCAACCAACAGTCCATCAATCTATTAATCAAAATGATGCTTAAATCAT
 CTAACCAAGCTCAAAAGAACAAATTAATCAAGAAATTCACAACTCAACACCGTCTGAAATACATCAAGTAATTAAT
 TAAAGCTCAAGCTTAAATGATTAATGAATTAATTCAGTCAAAAGTATTACTGATGAACATGAAGTTAAACCAACAGTA
 ACTAGCTCAATGAAGTTGTTGGTAACTCAACTGATATTAACAAATGCGGTTGATCOTGTAAAAACAAATTAATCAATCAAACT
 TCTAATCCAATTAATGCTTTAGAGGTGAACOTGCAACATCAAAATGTAATAATTTCTAAAGATGCACTTCTAGGTGA
 ACCTGAATTAATGACATTAATAATTCAAAACTTTTGCACTCAATCACTTAGATAACCTCAATCAAGCTCAAAAGGAG
 CATTAACTGATGAATTAAGCAAGCACTATAGTTTCAAACTAAATTAATCTATTAACAAAGCGAAAGCTTTAAATTAAT
 GATATGAAAAACCTTAAGATATGTTGCTCAACCAAGTAAATGTTAGACAACTCAACCAATTAATTAAGCGAGGATGATC
 ACCTCAAAATATGTAACAGATCAATTAATTCATGCAACATCAATCAATGATCAAGTAGCAACCTCAAGATGCTCATG
 ACAGTCAAAAGGAGAAAGAGTACGTAACAACTTCAAGGTGCTCAAGCTTTAAATGACGCTATGAAGCATTTAAGAAACA
 QCAATTAATAATCAATCATCGTAAAGCAAGAGCAATTAATTAATGCAAGTATGCTAAAAAAGAGCAATTAATCAAC
 GCAGTTAGAGAGTCAAAATTAATTAATGAACCAATCAACCAATTTGATTAAGAAATTAATTAAGCAACTCAACGAGATG
 TGTAAATCAAGCGAATTAATGCTTAAATGGCGTTGAATTAATGATGCTGATAAGCAAAACGACATCAATGATACCTA
 CATTGATGCACTTAAATCAAGCAACAAACGCAATTAATGAATAAATTAATTAAGCAAGTTACGAGAAAGTTGCG
 GCTATTATTGGCCAAAGCAAACTACTGATCATGCTATGAGAAATTTAGAGAAAGTATCAAGATTAAGAGCAAGTCAA
 ACAGTCAAGTAATTAATTAATGAGATTTGATGTTCAAGAAACATACGATAACCGCTTGAATCATGTTGACAAATTAAC
 TTAATCAAAACAGTAAATCCAACTTTATCTATTGAGATATAGAGCATGCTATCAACGAGTTAATCAAGCGAAAAACAA
 CTCAGAGGTAAACAAAACTTTATCAAACTATCGATTAGCTGATAAGAAATTAAGTAAATTTGATGATTTAATCATCA
 ACAAGGCAATTAATTAATCAATTAATTAATGCTTAAACGAGAAACAGAAATTTGCCAAGCAATTAAGAAAGCAAAAT
 CATTAAATCATGCAATGAAGCACTTAACAAAGTATATAAAATGCAAGATAAGGTTTGAATAGTATGATTCATTAAC
 GAAGATCAACTGAAAAAAGGCGTATCAACAACTATAATCATGTTGATTTCAATCAATCATAGACAAACAAATTCCTGA
 AATGATCCCAACAGTAATCAATAGCATAACTCATGAACCTCGAAACAGCTCAAAATAACTTACATGTTGATCAAGAACTTG
 CTCATGCAACAAAGATGCGCTAATGTAATTAATGCTTAATTCATCTTAATGTTGCTCAACGTTGATTAATGATTAAT
 ACGAATACAAATGCTACAAACGCGAAAAAGTTGCAAGAACTTAGATAATGCTCAAGCTCTTGAATAAGCTATGGAAC
 ACTACAAACAGTAGTTGCTCATAAAAATATAATTAATGACGATAGTAAATTTAAATGAAGATTCAAAATATCAACAA
 AATACGATGAGTTATTGCTGATGCGCAACACTTAAATCAAGACAAACAAATTCACCAATTAGAACCTTTAAGGTCGAT
 ATTGTTAAGGATTAATGCTAGCTAACGAAAAATTAATTTGGCGCAGAAAACTATCATATGACAAATCAATGCAAA
 TGATGAAATTAACATATGAATTAATTAATTAATGCAAAAGCAATCTATAAAGATATGATTTCTCAACGAGCAATTA
 GAAGTAAAGTTAAACAACTTCTGCAACAGCTAAATCTTGAATGAAGCCATGAATCACTTGAAGATAAAGCTCAAGTA
 GTGATTACAGATACTACTTTGCTAATTAACCTGAAGCTTCAGAGGATAAAAGGAAAAAGTGAACCAAACTGATCA
 TGCTCAAGCGATTATTGATTAATTAATGCTCAATGTAAGTTTAGATCAAGTACGACCAAGCACTAGAACAAATTAACCTC
 AAGCATCAGAAAACTCGATGTTGATCAGCGAGTTGAAGAGCTAAAGTTCAATGCTAATCAACAAATTTGATCAATTAACA
 CATCTTAATTCATTACAAACAACTGCGAAAGAAAGTTTAAACGCAACAACTAGAAAGAAATGCGTACTGTTAG
 TAACAATGCTCAGGCATTAAACAAAGTAATGAGTAAATTAAGAACAAATTAATTAATCATGCTGATTTCTGTTGAAATTAAGTG
 ATAATTTAGACAAGCGAGACGACAAATCATGCTTATGATGAAGCACTTGAACATGCAACAGATATACAAAAACT
 AACGCAACCCAAATGAACCAAAACAGCGTTTACAACAAATTAATATATGCAAGAACTGTTAAATGCTTTGCAAGAGATT
 AAATCATGCTAGACCAAGCTTTAGAAATATCAATCACTAGAAAAATTAACAAATGCTCAAAAGTCTGCTTTAGAGG
 ATAAAGTAACGCAATCGCATGATTTATTAGAAATAGAACATATTGTTCAACGAGGCACAAACCTCAATGACATTTAGGGT

Fig. 2.16

222

GAATTAGCTAACGCAATCGTTAATACTATGCTCCAAACCAAGCAAGTATAAATTATTAACGCCGATAACCTACGCAA
 AGATAACTTTACTCAAGCTATCAACAATCGACGTGATGCACCTCAACAAACTCAAGGTCAGAACTTAGATTTCATGCAA
 TTGATACATTTAAAGATGATATATTCAAACCTAAAGATGCACCTTAACGGTATTGAACGTTTAAACAGCTGCAAAATCAAAA
 GCAGAAAACTTAATTGATAGTTTAAATTTATTAATAAGCTCAATTCACACATGCATAATGATGAATTTATGAATACTAA
 TTCTATTGCACAATTTGCTAGAAATCGTGAATCAAGCATTTGATTTAAATGATGCAATGAATCTTTAAGAGATGAACCTTA
 ATAATCAAGCTTTTCTGCTCCAAGCAAGCTCAAAATTATATAAATTCAGATGAAGATTTAAACAAACAAATTTGACCATGCT
 TTAAGTAAATGCTCGAAAAGTTCTTGCAAAAGAAAAAGGTAATAATTTAGATGAATAACAAATTCAGGGACTCAACCAAGT
 GATTGAGGATACTAAAGATGCTTTAAATGCTATCCACGTTTATCAAAAGCTAAAGCTAAAGCAATTCATACGTACAAAT
 CTTTATCTTATATCAATGATGCACAGCGTCATATTGCTGAAAAATAATTCACAACTCTGATGATTTATCATCTTTAGCA
 AATACATTTATCTAAAGCTAGTCAATTTAGATAATGCAATGAAGACTTACGAGATACTATAGAAGTAAATTCACCTTCTGT
 TCCAAATAGTGTGAATTTATTAATGCTGATAAGAAATTCACAAATGAATTTGATGAGCGCTACAACAAGCAAGTGCAC
 CAAGTTCTAAAACTTCAGAAAAATCCAGCAACGATTGAAGAAATTTAGGTTCTTAATCAAGCCATTACGATACAAAAAT
 GCATTAATTTGAGAACCAAGCTTGCACCTGAGAAGAGCAAGATCTAAATTAATTAAGGATTAAGATTTAAATTA
 AGCACAATTTGAAGATGTCACAAACAGGTAAATTCAGCAATACTTTAACAGAGTTATCTCAGCTCACTCAATCAACGT
 TAGAATTAACGATAAAATGAATTTATGAGAGATAAGCTTAAAACTTTAGTAAATCTGTTTAAAGCAAGTTTAAATTA
 AGAACGCTGATTTATAATTTAAACGCTCAATTTAACAAAGCTTTAAAGAAAGCTAAAGCGCTATTAAATTAATTAAGCG
 TACAAATGCTCAATATCAATGACATTCACATCTTTTAAACCAAAATAGATAATGCTAAAGACCAATTAATGCTGAAGCAG
 GTCTAAAGAACATCAACAAAAATCTGAAGTATTATTTAAAGAAATTAAGTAAATTAATTAATCAATCTTTGATAATGCAATGAATTAATGATGC
 ATTAATTAATCAGATTAGAGCGCTAAAGACATTAATTAATTAATCAATCTTTGATAATGCAATGAATTAATGATGC
 TATGCAAGGTTTAAAGAACATGATGCTCAATTAACAGCAACTACAAAGACCAACATTTGAATTTAAATGCTGATGAAG
 ACCATAAATTAACATTAATGATTAAGCTATCACTTAAGCAATTAATGCTTCTAAATGCAATTTGAAGACTTAAAGATGCTCA
 AATATCAATTAATGGAATGATTTCAAAACATGGAATGCTTACAGCACTTCTAAATGCAATTTGAAGACTTAAAGATGCTCA
 AACAAAGCAGATTAATGACATTAAGATACGCTCAAAAGCTCAACTTGATGAATTTGAACAGCTAATGCAACATCAAAAT
 TTAAGCTCAAGCTAAACCAATGGAATTAAGAGAAAGCTAGAAAGCGCTTTCTAATTAATGAAGCAACATCAAAATGAT
 CTAGTTAAATCAAGCAAAAGATGAAGGCAATCTGCAATTCACACATACATGCAATGAATTTACCTAAAGCAAACTAGA
 TUCTAATCAATGATTTGACCAAAAGTTGAAGATATAATCACTTAATTTAGTCAAAATCCAACTTATCAAAATGAAGAA
 AAATTAACCTAATATCTCAATTAATTAAGTTAGTAAATGAATTAAGATGAATTTCAACAAAGCTAATAACCAACAA
 ATAGAAAAATGCTACAACAAACTAGATGAAGTCAATGAACCTACAAAAATTAATTTATGCGCAAGCAGAAAGCTAAAC
 AATGATAAAGAGTTATCAACAAAGAACAGAGATGCAATTAATTAACCAACTGATTTAACACCTTCTCAAAAGGCAATG
 CTTTAGCAAGTTATGATTAACCAAGAAAGATGCACTTCAACATATCGAAATTTCAATTTCAATTTGATGATCAATTAAC
 AATTAAGAGCATGCAATTTAATCTTTAGCTCATATCATTTTGGGATCTGATCAGCAACCAATTTAGTTTGAACCTACC
 TGAATTTAGGCTTCAAAATGCTCTAGTAAACAGTGAAGTGGTTGTTTACAGAGATGAAGATTTTCAATTAAGATCTATA
 TTGGAGCTAGCACTTTAACTGATGAACCTTAAAGTCAATTTGTTTCTATTACCGAACCTGATAAAGTACGCTGATCACCTA
 ACCGCTAAGTTTAAAGTTATTTTAGCTGATGGCTCATATGCTCAGTGAATTTGCCAGTCAAAATTTGAGAAAAAGAAAT
 ACAATAGCTTAAAGAGGATGCTATAAAACCAATTTGATGTTCTGTTAAACAAAAATCAAGATATAGATTTCAATTAAG
 AATTAAGCTTCACTCAACGTTGAAGATGCAAAAGCTGAAATTTGAAGATTTGAAGAAAGCAAGCCATCGATAAAGTGAATCAT
 TCAAAATCGATTAAGATTTGAAGATTTGAAGCAAGTGAATTTGAAGAAATTAGATCAGTTTGAATTTGAATTTTAC
 GCTAAATTAAGCTTAAAGGATATCACTTATGATTTAATCTCAAAATCCAAATGCTTTCAAGAAATTTGAAGCAATTA
 AAGTTTAACTTCTAATGAAGAAACTCAGTTTGAATTAACCAATTAACCTGCACTACAAAAAGAAATTTTGAAGAAAGTGAAG
 CATGCTCATATTTAGTGAATTAATCAATTAACCAAGAGTTTAAATTAAGATATTAACATATTTTAAACCAAGCACA
 TTTACTAGGTTGAAGAACTATAGCAGAACATTAATTAGGATATGTTGATTAACCAAACTCAGCAATTAATTAATTAATC
 AATCTGCTTCTTACTTTAATAACCAATGCGCACTTGAATGAATTAACCAATTAACCTAGAAACGATGAATTTCAATTCGT
 GGTGCGCATACCGTACAAGATGTACACAAAGCATTTATCAAGGTATAGAACCAATCTTGAAGTAAATGTAAGTATTAT
 AATCAATCTTTCAACGATTTCTTGATAACTTTAATTTCTTCAATTTCAAAATTTGATGCTAGATTAGAGAAAGGATG
 TTGCAACCATATCGTACAACTGAAGCATTTCAAGAAAGTTCTAAAGGAAACGCTGTTGAAGCAGGTAATTCACAA
 GAACACAGCAACCAAACTTCATAAGAAATGATATGATAGCTATTCAAACTTTAGTTGATAATTTTGGCAAACTGT
 AGGTGTTATTACATTAACCTGTTTACTTTCTAGTTTCTGTTTACTTTTGGCTAAAGAGCTAAAAAGAGAGAGAGAA
 AACATCGATAAAAAATCATCAACAGATTTCTGCTTTTCAAGTACTGATAAATAGATCCAAATTTGATTAATTAAGCGT
 AAATAGATTAAGAAAGAAACAAATTCAAACGATGACAAACATTCATTTCCAGTTGCTAAACATAAGAAATCTAAAGAA
 GCAATTTAGTTGAAGAGGATATTCAATTCATTTCCCGTCTTGAAGCTTAAACAAACAGTGAATTAACAGATACAAACAG
 AGAAAGTTACTTTTAAAGAAAGAAACGCTCACTCAACTAAAAAGTTGTAAGAAACCAAAAGCGTTCTAAAAAG

SEQ ID NO 49 secuencia de polinucleótido

ATGAGAGATAAGAAAGGACCGGTAATAAAGAGTAGATTTTCTATCAATTAATTTGAATTAATTTCAATTAAGAAAAAT
 TACAGTTGGAACAGCATCTATTTAATTTGGCTCACTAATGTAATTTGGGAACCTCAACAAAGAGCAGAAAGCAGCTGAAACCA
 ATATTGAAATCCAACTACATTTAAAGATTAATGTCCTAATCAAAAGAGTGAAGATTTGAAGAAATTAACAAACAAAGACACT
 GCACCACAAGGTGTAAGCTAATCTGAAGTAACTTCAACAAAGAGCACAAATCGAACAATGAAGCATCAGTAAAGACTGA
 AGATATATCAAAAAAGGAGGATACACCAAAAGAGTAGCTAATGTTGCTGAAGTTTCAAGCCAAATCGTCACTCACTATA
 ACGCAGAGGCACTTAAGGTTAGAAAAAGCTGTTCTGTTGATGAAGGCTCTTTGATATTACAAAGAGATTCTAAAAATGTA
 GTTGAATCTACCCCAATTACAAATTCAGGTTAAAGAACATTTTGAAGTTTACGGAAGGTTGATATACAAAAAACCCCAAC
 AGATTTAGGGGTATCAGAGGTAACCAAGTTTAAATTTGTTGAATGAAGTAAATGTTTGAAGAGCTTTCAATTAATAA

222

Fig. 2.17

223

ATAAAA TAGATTT TAGTAAGGATT TCAATTTTAAAGTTAAGAGTGGCAAAATAACCATCAATCAAAATACCACAGGTGCTGAT
 GGTTOGGGGTCTTATTTAGTAAAGGAAATGCAGAGAAATTTAACTAATGGTGGAAATCCTTGGGGAATAAGGTCTGGT
 AAATTCAGGCGGATTTAAAAATTGATACTGATACATTTATACAAGTCCATGGACAAAACAGGAAAGCAAGCTGACAAAG
 GTTATAGAGGATACGGAGCTTTGTGAAAAATGACAGTCTGTTAATTCACAAATGGTTGGAGAAAATATTGATAAATCA
 AAACTAATTTTAACTATCCGGACAATTCACATAATCATCAGATGGAAAGTTTCATGGGCAACGTTTAAATGATOT
 CATCTTAACCTTATGTTGCTTCACTGGTAAAAATGAGAGCAAAATATGCTGGTAAAACCTGGGAGACTTCAATAACAGATT
 TAGGTTTATCTAAAAATCAGGCATATAATTTCTTAATTACATCTAGTCAAGATGGGGCCTTAATCAAGGGATAAATGCA
 AATGGCTGGATGAGAACTGACTTGAAGGTTTCAGAGTTTACTTTTACACCAGAAGCGCCAAAACAATAACAGAAATTAGA
 AAAAAAGTTGAAGAGATTCCATTCAAGAAAGAACGTAATTTAATCCGGATTAGCACCAGGACAGAAAAAGTAACAA
 CAGAAGGACAAAAGGTGAGAAGACAATAACACACCAACACTAAAAATCCATTAACTGGAGAAATTTATTAGTAAGGT
 GAATCGAAAGAGAGATCAAAAAGATCCGATTAAATGAATTAACAGAAATACGGACCAGAAAACATAGCACCAGGTCTCG
 AGACGAATTTGATCCGAAGTTACCAACAGGAGAGAAAGAAAGTTCCAGGTAAACAGGAATTAAGAAATCCAGAAACAG
 GAGACGTTAGTACACCGGTCGATAGTGAACAAATAATGACCTGTAAAAGGAGACTCGATTGTAGAAAAAGAGAA
 ATTCCATTTCAGAAAGAACGTAATTTAATCTGATTAGCACCAGGACAGAAAAAGTAACAAAGAGAGACAAAAGG
 TGAGAAGCAATAACGACACCAACTAAAAATCCATTAACTGGAGAAATTTAGTAAAGGTGAATCGAAAGAGAGAA
 TCACAAAAGATCCGATTAAATGAATTAACAGAAATACGGACCTGAAAACAATAGCCCGAGGTCAACGAGAGAAATTTGATCCG
 AAGTTACCAACAGGAGAGAAAGAAAGATTTCAGGTAAACAGGAATTAAGAAATCCAGAAACAGGAGAACGTTAGTACCC
 CCCCCTCGATAGCGTAAACAAATAATGACCTGTAAAAGGAGACTCGATTGTAGAAAAAGAGAAATTTCCATTCAAGAAAG
 AACGTAAATTTAATCTGATTAGCACCAGGACAGAAAAAGTAACACCAAGGTCAACGAGAGAAATTTGATCCGAAGTTACCAACAGGAG
 ACGCCAACCTAAAAATCCATTAACTGGAGAAATTTAGTAAAGGTGAATCGAAAGAGAGAAATCAAAAAGATCCGAT
 TAATGAATTAACAGAAATACGGACCAAGAAACGATAACACCAAGGTCAACGAGAGAAATTTGATCCGAAGTTACCAACAGGAG
 AGAAAGAGAGAGATTCCAGGTAAACAGGAATTAAGAAATCCAGAAACAGGAGAGATGATTAGAACCCCGGTCGATAGCGTA
 ACAAAATATGGACCTGTAAAAGGAGACTCGATTGTAGAAAAAGAGAAATTTCCATTTCAGAAAGAGAGTAATTTAATCC
 TGATTAGCACCAGGACAGAAAAAGTAACAGAGAGAGGACAAAAGGTGAGAAAGAGACAAATACGACGCCAACCTAAAAA
 ATCCATTAACTGGAGAAATTTAGTAAAGGTGAATCGAAAGAGAGAAATCAAAAAGATCCGATTAAATGAATTAACAGAA
 TTCGGTGGCGAGAAAAATACCCAAAGTCAATAAGATATCTTTGATCCAACTTACCAACAGATCAAAAGAGAGAAATGATCC
 AGGTAAACCAAGATCAAGAAATCCAGACACAGGAAAGGTGATCGAAGAGCCAGTGGATGATGATTAACACAGGACCAA
 AAACGGGTACACAGAAACAAAACAGTAGAGATACCGTTTGAACAAACAGTGAGTTTAATCCAAATTTACACCTGAT
 GAGAGCGAGTGAACAAAGAGAGACAAACGGAAGTAAGACAAATCAACACCAATCAAGTGAACCCATTACAGAGTGA
 AAAAGTTGGCGAGGTCAACCAACAGAAAGAGATCAAAAACCAACAGTGAATTAAGATTTGATAGTTTGGTGGAGAGAAAC
 CAAAAGATCCAAAGGACCTGAAAACCCAGAGAGAGCCAGGACCAACTCATCAAGTGGGCCAGTAAATCCTTAACAT
 CCAGGATTATCGAAAGACAGAGCAAAACCAATGGCCCACTTCAATGATTAATAAGTAAAGTTAAAAATCTAA
 AATTGCTAAGAAATCAOTAGCTAATCAAGAGAAAAACGAGCAGAAATTAACAAAACAGGTTTGAAGAGCAGCAAAAAG
 GTTGTGATCTTTAGTATATAATTTGAATTTGCTGATTAATGTTATTGGCTCGTAGAAGAAAGAAATTA

SEQ ID NO 50 secuencia de polinucleótido

ATGCCCAACGTAAGACAAAGTCTTATTAATAAAAAAGTGAATTTTACCTAACAAATTAACAAGTATTCTATAAGAAA
 ATTCCGCTTGGTACGGCCTCAATATTACTTGGTTCGACACTTATTTTGGAAAGTAGTAGCCATGAAGCGAAAGCTGCA
 AAGAAAAACAAGTTGATCCAAATTACACAAGCTAATCAAAATGATAGTAGTGAAGAGTCACTTGAACACACAAATCAACCT
 ACTGTAAACAATGAAGCACCACAGATGCTTCTACATTGCAAGCAGAAAGAGGAAGCAATGCAGAAAGCAGCAATGTTCC
 AACTATCAAGCTAATTCAGATAATGATACACAAACAAATTTTCAGAAAGCCCTACAAAGAAATGACCTAGCTAGAAAG
 AAGATATCCCTGCTGTTTCTAAAAACGAGGAATTAACATCATCAACCAACACTGACAGTAAATAGAACCTACAACT
 TCAGAACCTGTGATTTAAATTTATAGTTTCTCCGTTTATGTCCTTATTAAGCATGCTGCTGATAGTTTATCCAATTAACAC
 TAAAAATACAATAGATATACGCCAACTACGGTTAAAGGTAGAGATAATTACGATTTTACGGTAGAGTAGATATCCAAA
 GTAATCCTACAGATTTAAATGCGACAAATTTAACGAGATATAATTATGACAGCCACCTGGTACAACACAGCTGGTGC
 GTTCAATTTAAAAATCAAGTTAGTTTGTATTAAGATTTGACTTTAACATTAGAGTAGCAACAAATCGTCAAGTAAATAC
 AACTGCTGATAGTGGTGGGGCTTTATGTTTCAGCAAGAAAGATGGGGATGATTTCTTAAAAACGGTGGTATCTTACGTG
 AAAAAAGTACACCTAGTGCAGCTGGTTTCAGAAATGATAAAGGATATTATAATAACGATCCATTAGATAAAATACAGAAA
 CAAGCTGGTCAAGGCTATAGAGGATAGGACATTGTTAAAAATGACTCCCAAGGTAATCTTCTAAAGTAGGATCAGG
 TACTCCATCAACAGATTTTCTTAACCTACGACATAATCTACTAATGATTTAGATGTTAAATTCATGGTCAAAAATTA
 ATATGTTAATTTGAAATATAATGCTTCAATCAACTTTTACAGCTACTTATGCTGGTAAAACTTGGACGGCTACGTTA
 TCTGAATTAGAGTTGAGTCCAACTGATAGTTACAAATTTTATGTTACATCAAGTCAATATGAAAAAGGTAATAGTGGTAC
 ATACGAGATGGCGTTATGAGAGCTGATTTAGATGTTGCAACATTGACATATACTCTTAAAGCAAGTGGATGAGAGCCAA
 TTACATCAACTAAGGAAATACCAATTTAATAAAAAACGGAATTTGATCCAACTTAGCGCCAGGTACAGAAAAAGTGGT
 CAAAAGGTGAACAGGAATTTGAACAAACAAACACCACTTATGTCATCTTAATACTGGAGAAAAAGTAGGTGAAGG
 CACACCTACAAACAAAGATCACTAAACACCAAGTGGATGAATGTTTCAATTATGTTGGCAGAAATCAAGCCAGGACATA
 AAGATGAATTTGATCCAAATGACCCGAAAGGTAGTCAACAAACGCAACCAAGGTAAAGCCAGGAGTTAAAAATCCTGATACA
 GGCGAAGTAGTACACCCAGTGGATGATGTCACAAATATGGTCCAGTTGATGGAGATCCGATTACGTCAACGGAAGA
 AATTCATTCCGACAAAGAACGTAATTTCAATCCTGATTTAAACCAAGGTGAAGAGCTGTTAAACAAAAAGGTGAACCAAG
 GACAAAAACAATTAACACCAACCACTAAGAACCCATTAAACAGGGGAAAAAGTTGGCGAAGGTGAACCAACAGAAAAA
 ATAACAAAAACACCAAGTGAATGAATCAAGAAATATGGTGGCAGAAATCAAGCCAGGCCATAAGGATGAATTTGATCC

Fig. 2.18

CAACCCACCCGAAAGGTAGCCAGAGGACGTTCCAGGTAAACAGGAGTTAAAAATCCTGATACAGGCCAAGTAGTCACAC
 CACGAGTGGATGATGTGACAAAATATGTTCCAGTTGATGGATATCCGATTACGTCAACGGAAAGAAATTCGTTTGTATAAA
 AAACGGGAAATTTGATCCAACTTAGCGCCAGGTACAGAGAAAGTCGTTTCAAAAAGGTGACCCAGGAAACAAAACAAATTAC
 AACACCAACAACTAAGAACCCATTAAACAGGAGAAAAAGTTGCGAAGGTGAAACCAACAGAAAAATTAACAAAACCAACCAAG
 TGGATGAAATCCTTCATTATGTTGGCGAAGAAATCAAGCCAAGCCATAAGGATGAATTTGATCCGAACCCACCGAAAGGT
 AGCCAAAGAGGACGTTCCAGGTAAAGCCAGGAGTTAAAAATCCTGATACAGGCCAAGTAGTCACACCCACCAAGTGGATGATGT
 GACAAAATATGTTCCAGTTGATGGAGATCCGATTACGTCAACGGAAAGAAATTCGATTGACAGAAACGTGAATTCGAATC
 CTGATTTAAACCAAGGTGAAGAGCGTTGTTAAACAAAAAGGTGAACCCAGGAAACAAAACAAATTACAAACCAACCAACTAAG
 AACCCATTACAGCGGAAAAAGTTGCGAAGGTGAACCAACAGAAAGTAACAAAACAAACCAAGTGGATGAGATGTTTCAATTC
 TTAATGTTGCGAAGAAATCAAGCCAGGCCATAAGGATGAATTTGATCCAAATGACCCGAAAGGTAGCCAAAGAACGTTTC
 CAAGTAAACCAAGGAGTTAAAAACCTTGATACAGGCCAAGTAGTTACTCCACCAAGTGGATGATGTGACAAAATATGTTCCA
 GTTATGATGGAGATCCGATTACGTCAACGGAAAGAAATTCGTTTGTATAAAAAACCGGAAATTTGATCCAACTTAGCGCCAGG
 TACAGAGAAAGTCGTTTCAAAAAGGTGAACCCAGGAAACAAAACAAATTACAAACCAACCAACTAAGAACCCATTAAACAGGAG
 AAAAGTTGCGAAGGTGAACCAACAGAAAGTAACAAAACAAACCAAGTGGATGAGATGTTTCAATTCGTTTGGCGAAGAA
 ATCAAGCCAGGCCATAAGGATGAATTTGATCCGAACCGCACCGAAGGTGAACCAACCGCAACCAAGTTAAAGCCAGGAGT
 TAAAGTCTCTGATACAGGCCAAGTAGTCACACCCAGTGGATGATGTGACAAAATATGTTCCAGTTGATGGAGATGCGAA
 TTACGTCAACCGGAAAGAAATTCGTTTGTATAAAAACCGGAAATTTGATCCAACTTAGCGCCAGGTACAGAGAAAGTCGTT
 CAAAAGGTGAACCCAGGAAACAAAACAAATTACAAACCGCCAAACCAACTAAGAACCCATTAAACAGGAGAAAAAGTTGCGAAGG
 TGAACCAACAGAAAAATTAACAAAACCAACCAAGTGGATGAGATGTTTCAATTCGTTTGGTGAACAAATACCAACAGGTGATA
 GGTGAAGTTGTTACCCACCAAGTGGATGATGTGACAAAATATGTTCCGAAAGTTGGTAAATCCAAATCAATCAACCGAAGAA
 GATTCCATTGATAGAAAGCTGTATTTAATCCTGATTAAACCAAGGTGAAGAGCGCGTTAAACAAAAGGTGAACCAAG
 GAACAAAACAAATTACAAACCAATATTAGTTAATCCTATTACAGGAGAAAAAGTTGCGAAGGTAAATCAACAGAAAAA
 GTCACTAAACAAAGCTGTTGACGAAATTTGATGATGTTGTTCAACAAAAGCGAACCAAGTAAACCAAGCGGAAACCAAGTTAA
 ACCAGCGGAAACCAAGTAAACCAAGCGGAAACCAAGTAAACCAAGCGGAAACCAAGTAAACCAAGCGGAAACCAAGTAAACCAAGCGG
 AACCAAGTAAACCAAGCGGAAACCAAGTAAACCAAGCGGAAACCAAGTAAACCAAGCGGAAACCAAGTAAACCAAGCGGAAACCAAGT
 ACCGACAGCAACCAAGTAAACCAAGCGGAAACCAAGTAAACCAAGCGGAAACCAAGTAAACCAAGCGGAAACCAAGTAAACCAAGCGG
 AGAACCAAGTAAACCAAGCGGAAACCAAGTAAACCAAGCGGAAACCAAGTAAACCAAGCGGAAACCAAGTAAACCAAGCGGAAACCAAG
 GTGACCAAGAAACCAAAATAGATCAATGCAATTCACAGATAATAAAAATCAATTACCTGATACAGGTGAAAAATCGTCAAG
 GCTAATGAGGAACTTAGTCGATCTCTATTAGCAATTTGCGATCATTTGTCATATTGCTGCTGTAATAAAGGTAA
 TGAATAATA

SEQ ID NO 51 secuencia de polinucleótido

ATGAAGAACTATATACATCTTATGGCACTTATGGATTTTACATCAAAATAAAAATCAATAACCCGACCCATCAACTATT
 CCAATTTTCAGCATCAGATACCTTCAGTTATTTTGAAGAACTGATGTTGAGACTGTTTAAATTCACCTTCATATATATG
 AAGTTATTAAGAAATTTGGTAAATTCAGTGAACATCATTTCTATTGTCATCTTCATTCTCTTCAACAGAGATCATGCA
 TATCACTTGAAGAAAGTGAATTAAGTGTAGAGATTTTCAAGAACTTTGGTGGCTTTAAAGCTATCTGTTTGAAG
 ACCTGGTAAAGGTACAACTATAAAAATTTATTTGGATTGCTGATCGACATGATACAGAGACTTTAAGCAATCTGATG
 CCTTAAATGACCATTTTCAAAAGACGATTAAGTCATTACTTTGTTTCAAGCGGAAACCAATTCAGTTATTTTGAAGAA
 TATCTATACCAATATAAGAAATAG

SEQ ID NO 52 secuencia de polinucleótido

ATGATTTATATACATCTTATGGCACTTACCAATTTTAAATCAAAATAAACTTAATCATCAAGAACGATGTTTATTTC
 ATTTCCACTAATGATTCCTCAATAATCTTAGAAGAGTCTGAGGAAAAATCAATCTTAAACATCTTAGTGCATATCAAG
 TGATGATAGCACAGGTGAATTTAACGAACATCATTTTATAGTCTATTTTGGCTACATCTGAGATCATCTGTCAA
 CAGCTAGAGAAAAATTTACTCGTAGACGTACCTTTAAGAAATTTGTTGTTTAAAGCTATCTGTTTATTAAGCC
 CACTGAGGAGTCTACCTACAAAATTTACTTTGTTTTCAAATCGAACAGCATATGAGATTTCAAGCTTCTGATATAT
 TTAATGAAATCTTTCAAAAGATGATGAGCCAACTTTGGTGTGATGTTCAACATTTAGCTACTTTGAAAGATAT
 TTATATCCAATAGAGATCATTA

SEQ ID NO 53 secuencia de polinucleótido

ATGATTAAACAGGATATATAAAGGCAATAACAAAAAGGCTATGATTTCAAATCGCTTAAACAAATTTTCGATTAGAAA
 GTATACTGTAGGAACCTGCATCGATTTTAGTAGGTACGACATTTGATTTTGGTCTAGGGAAACCAAGAACTAAAGCTGCTG
 AAAACACTAGTACAGAAATGCGAAACAAAGATGATGCAACCACTAGTGATATTAAGAAAGTATGTTGCGAAACTGAAAT
 AATTGCAACAGAAATGATTTCAACAAATCCAATTAAGAAAGAAACAAATACGTATTCACAAACCAAGGCTAAGAGAA
 ATCAACTACATCAAGTACTCAACAAACGCAAAATACGTTACAGCTACAACTGAACCTAAGCCCTCAAAACATTTGAAAG
 AAAATGTTAAACCTTCAACTGATAAAACTGCGACAGAGATACATCTGTTATTTAGAAAGAGAAAGCAACCAATTAAT
 ACAATTAACGATGTAACACAAACCACTCAAGTGAATTTCAACAAACCAACTACACCTCAAGAAATTCACAAATAT
 TGAAATTCACAAACCAACCAAGCCCTTCAAAAGTAGACATCAAGTTACAGATGCAACTAATCCAAAGAAACCAAGTAA
 ATGTTGCAAAAGAAAGAACTTAAAAATATCTGAGAAATTAAGAAATTAGTTAGAAATGATAACCAATACAGATCGTTCA

Fig. 2.19

ACTAAACAGTTGCTACAGCTCCAAACAGTGTTCACCAAAACGATTAAATGCGAAATOCCTTTTCAGTTGACACACC
 AGCAGCAGTTGCTTCAAATTAATGTAATGACTTAATTACAGTTAGGAAACAGACGATCAAGTTGGCGATGGTAAAGATA
 ATGTGGCAGCAGCGCATGTCGGTAAAGATAATGAAATATGATACAGAGTTTACAATTGACAAATAAAGTCAAAAAGCGGAT
 ACAATGACGATTAAATATGATAAGAAATGTAATTCCTTCGGATTACACAGATAAAATGATCCTATCGATATTACTGATCC
 ATCAGGAGCGGTCTATGCCAAGGAACATTTGATTAAGCGACTAAGCAAAATCAGATATACATTACAGATTATGAGATA
 AATATGAGATATAAAAGCGCTTAACTTTATACCTATAATTGATGATTAAGCAAGCACTACCTAATGAAACTAGTTTGAAT
 TTAACCTTTGCAACAGCAAGTAAAGAACTAGCCCAAAACGTTTCCTGATTATCAAGACCCAGTGGTTATGATGATTC
 AAACATTCAATCTATCTTTACAAAGTTAGATGAAACAAACAAACTATTGAAACAAAAATTTATGTTAACTCTTGA
 AAACACCAACTAACACTAAAGTTGATATAGCTGGTAGTCAAGTAGATGATTATGAAATATTAAGTACCAAAATGGTAGT
 ACCATTATTGACCAAAATACAGAAATATAAGTTTATAAGTTAAACCTAATCAACAAATTCCTCAAAAGTAAATAGATCTA
 TGATTTTATGCTCAATACGAAGATGTAACCAAGTCAATTTGATATAAAATCATTAGTAAATATGAGCAACATTGATTT
 TTGCTGATATTAATTCAGCTTATATTATCAAGTTGTTAGTAAATATACACCTACATCAGATGCGCACTAGATATTGCT
 CAAAGTACTAGTATGAGAACCAACTGATAAATATGTTATTAATATGACAGGATTTCAAACTTCATGTAATCTCTAA
 TGACACTGCGCGTGGCAGCGTACTGTTAAACCTGAGAAAGTTATACAAATTTGCTACTATGATGAGAAAGCGTTG
 ATAAAGCGGTGTCAGAGTTGCAAAAGAAAGCCAAATGCGAAAGCTTTAGTTACATTAACTTACCGGAGCGGT
 ACTACAAATTCAGTAAAGAACAGATGCTTAACCGTCAATTATGATTTGCGGTGTTGAAAGACCGGAAACTTATACAGTTAA
 ATTGCAACCGCGCTGGATATCTTCCAAAGTAAGTAAATGAACTGCTGCTTATTAAGAACCTAAATATAATCTTGTGAC
 TAACTGTTAAATTAATGGTAAAGATGATATGCTTTAGACACTGCTTTTATAAGAACCTAAATATAATCTTGTGAC
 TATGTTAGGAAAGATACAAATAAAGATGATATGCTTAAGATGCTAAATGAACTGCTTATCAAGATTTAAAGTTACATTA
 AGTATGACTGGAAGAAATTTATGCTACAACTACTGATGCTGCGGTAATATAAATTTACAGATTAGATTAATGTTA
 ACTAGCAGTAAATTTGAAACACCAAGCGTTTACACCCAAAGCTTAAATTAAGTACAGCTGAGATTAAGATTTCTAAT
 GGTAAACAAACAGCGTTCATTAAAGATGCGATATAATGACATTAGACAGTGGTTCTATTAAGAACCCAAATACAG
 TTTAGGTGATTATGTTTGGTACGACAGTAAATGAAGACCGTAAACAGATTCACTGAAAGATGATCAAGATTTTAAAG
 TTACTTTTAAATGAAAGCGGAGTAAATTTGAAACCACTAAACAGATGAAATGTTAAATATGTTTGTGATTAATTTA
 GATAGCGGTAAATACAAAGTTATTTTGAAGACCTGCTGCTTAAACAAACAGTTACAAATACAACTGAGATGATTA
 AGATGCGGATGGTGCGGAGTTGACGTAACTTACGATCAATGATTTTCACTGTAACCGGATCTTGAAGAG
 ATACACTGACAGCGTATTCAGACTCAGACAGTGTATTCAGACTCAGACAGCGACTCAGATTTCAGACAGTGTATTCAGACTCA
 GATAGCGGATTCAGATTCAACAGCGACTCAGACTCAGATAGCGACTCAGACTCAGACAGCGGACTCAGACTCAGATAGCGG
 CTCAGATTTCGACAGCGGATTCAGACTCAGATAGCGGACTCAGATTTCAGACAGCGGATTCAGATTTCAGATAGCGG
 CAGACAGTGTATTCAGACTCAGATAGCGGACTCAGATTTCAGACAGCGGATTCAGATTTCAGATAGCGGACTCAG
 GACTCAGATTTCGACAGCGGATTCAGACTCAGATAGCGGACTCAGATTTCAGACAGCGGATTCAGATTTCAGATAGCGG
 CTCAGACAGTGTATTCAGACTCAGATAGCGGATTCGAGCTGCGATGCGGAAACATACACTGTTAAACCAATGAGTACTA
 CTAAAGACCTACAAATAAGCAAAAGCATTAACGAAACAGGTTAGTGAAGAAACCGCTCAATTAACCGCAAGCTTATT
 GGTGATTAATTTGACGATTAGGTTCAATTATGTTATTCGCTGCTGCGCAAAACAAACAAATAA

SEQ ID NO 54 secuencia de polinucleótido

ATGATTAATAAAAAATTAATTTACTAACTAAAAAGAACCTATAGCAATTAATCCAAATTAATATGCAATTAGAAAAAT
 CAGAGTAGGTACAGCGCTATTTGTAATAGGTGCAACATTATTTGTTGGTTTAGGTCNTAATGAGGCCAAGCGGAGAG
 ATTCACTACAGAGCGTTAAAGATTGGAATACCGATGATGAAATTTACAGACAGCAATGATCACTGCTAGTGATGAAGAAAG
 AATGATGATGATCAATAATAATCAATCAATAAACACCGGAGTAAATGAACCAATTAATTAAGAAAGAGAAACGAAATTA
 CGATGCGATAGAAAAACGCTCAGAGATAGAACAGAGTCAACAAACAAATGTTAGATGAAAGCAAGCAACATTTTACAA
 AGACCCCTCAAGATAATACTCATCTTACAGAAAGAGAGGTAAGAAATCCTCATAGTGAATCCTCAAAATTCATCAAT
 GATACTGCCCCAACCAACCTCTCACAACAAATAAATACAGAGAAATCTGTTCAACAAAGTGAATGATGAGAGATTGACA
 CGTATCAGATTTTGCTAACTTAAATAAAGAGAGTAACTGAAATCTGGTAAAGAAAGAAATACTATAGAGCAACCTA
 ATAAAGTAAAGAGAGATTCAACAAAGTCAAGCGCTGCTGCTATACAAATATAGATGAAAGAAATTTCAAAATCAAGATGAG
 TTTTAAATTTACCAATTAATGAAATATGAAGTAAAGCTAGACCTTATCTCAACATCTGCCCAACCTCGATTAAAGC
 TGTAAACGTTAAATCAATTAAGCGCGGAAACAGGTTGGAATGTTAAATCAATTTAATTAAGTTACTGATCAAGATTTACTG
 AAGGATATGATGATGATGAGAGGTTTATTAAGCACATGATGCTGAAACTTAATCTATGATGATGATTTTGAAGTAGAT
 GATAGGTTGAAATCTGTTGATACGATGACAGTGGATATAGATAAGAAATACAGTTCCATCAGATTTAACCGATAGCTTTAC
 AATACCAAAATTAAGATTAATTTGAGAGAAATCAATCCTACAGGTAATTTATGATACAAATTAACAAATTCACCTATA
 CTTTACAGATTATGATAGATAGATGAAATATTAAGCACAGCTTAAATTAAGCTCATACATTGATTAATCAAGGTT
 CCAATATAATAACCAAGTTAGATGATGAAATATAAAGCGGCTTTCACTAGTAAATTAAGCAATTAAGGTTGAAATATCA
 AAGACCTAACGAAATCGGACTGCTAACCTTCAAGATATGTTTACAAACATAGATACGAAATTCATACAGTTGAGCAAA
 CGATTTATATTAACCTCTTCTGTTATTCAGCCAAAGGAAACAAATGTAATATTTCAAGGAAATGTTGATGAAAGTTCAAC
 ATTATAGAGGATAGCACAATTAATTAAGTTTATAAGTTGGAGATAATCAAAATTTACAGATAGTAAACAGAAATTTATG
 TTACAGTGAATATGAGATGTCACAAATGATGATTATGCCCCAATTAGGAAATTAATGATGATGATTAATTTTGGT
 ATATAGATTCAOCATATATTTAAAGTTTATAGTAAATATGACCTTAATAGGATGATTAACAGACTATACAGCAACT
 GTGCAATTCAGACGACTATAAAGGATATCTGGTGAATTTAGAACACATCCTATGATTAATACAAATTTCTCTAC
 AAGTTCAAGGTCAGGACAAAGTGAATTTGCTCTGAAAGAACTTATAAATCGGAGATTACGATGCGGAGATGATGAT
 AAGATGTTATTTAAATACAAATGATTAATTAAGAAACCGCTTAGTAAATGATTTGATTAATTTGAGCTATCCTGATGAGT
 TCAAAATCACTCAGAACAGATGAGATGCGAAATATCAATTTGATGATGAAAGACGATGACTTATAAATTTACATT

Fig. 2.20

CGAAACACCTGAAGGATATACCCGACGCTTAAACATTACGAAACAAATCCTGCACTAGACTCAGAAGGTAAATCTGTAT
 OGGTAACTATTAATGGACAAGACGATATGACGATTGATAGTGGATTATCAAAACACCTAAATACAGCTTAGGGAACTAT
 GTATGGTATGACACTAATAAAGATGGTATTCAAGCTGATGATGAAAAAGGAATCTCTGGAGTTAAAGTGACGTTAAAGA
 TGAAGACGGAATATCATTAGTACAACTACAACCGATGAATATGGAAGTATCAATTTGATAATTTAAATAGTGGTAAT
 ATATTGTTCAATTTGATAAACCTTCAGGTATGACTCAAAAC/ACAACAGATTCTGGTGATGATGACGAACAGGATGCTGAT
 GGGGAAGAAAGTTGATGTAACAATTACTGATCATGATGACTTTAGTATAGATAACCGATACATAATGATGACGAATCCGATT
 CGATAGTGAICTCAACACGCGACTCAGATTCCGATAGTGTTCAGACTCCGATAGCGACTCGGATTCAACACGCGACTCAG
 ATTCAGACAGCGACTCGGATTCTGATAGCGACTCGGATTCAACACGCGACTCAGACTCAGACAGTGAATTCAGATTCAAGAC
 AGCGACTCAGATTCCGATAGTGTTCAGACTCAGACACGCGACTCAGATTCTGATAGTGTTCAGACTCAGACAGTGAATTC
 AGATTCAACACGCGACTCAGATTCCGATAGTGTTCAGACTCAGACACGCGACTCAGATTCCGATAGTGTTCAGACTCAG
 ACAGCGACTCAGATTCTGATAGTGTTCAGACTCAGACAGTGAATTCAGATTCCGATAGTGTTCAGACTCAGACAGTGAATTC
 TCAGACTCGGATAGTGTTCAGATTCTGATAGTGTTCAGACTCAGACAGTGAATTCGGAATTCGATAGTGTTCAGACTC
 AGACAGCGACTCAGATTCTGATAGTGTTCAGACTCAGACACGCGACTCAGATTAGGCAATAGCTCAGATAAGAGTACAA
 AAGATAAATTACTGATACAGAGCTAATGAAGATTATGGCTCTAAAGGCAGTTACTTGGAACTCTGTTTCAGGTTTA
 CGAGCGTTATTATTAGGGAACGTCGCAAAATAGAAAAA TAAAAATTAA

SEQ ID NO 55 secuencia de polinucleótido

ATGCTCTAATAATTTTAAAGATGACTTTGAAAAAATCGTCAATCGATAGACACAAATTCACATCAAGACCATACGGAGA
 TGTGAAAAAGACCAATCAGATTAGAATCAGGATACAAATAGAGATACGGAGCAACAGTTTCCGCAAGAAATGCC
 AAAGAAGAAAAAGACGCGGTGATTAGCAACGAATCATTAATAAACAGTTTCAATGAATCAACAACATCTGAAGACAAT
 GTTCAAAATGAGGCTGGCACAATAGATGATCGTCAAGTGAATCATCACAGTACTGAAAGTCAAGAACCTTAGCCATCA
 AGCAGTACACCTCAACATGAGAGCAATATTATAATAGAAATGCTTTTGCATGATATAATCACATCCAGAACCAATCG
 AAGCAATGATATAACACGAGACTATTAAAGATGCAAAAATACACTGAGCATTCAACAGTTTCTGATAAGAGTATAGCT
 GAACAATCTCAGCAACCTAAACCATATTTTGCACAGGTGCTAACCAAGCAAAATACATCAAAAGATAAACATGATGATGT
 AACTGTTAAGCAAGACAAAGATGAATCTAAAGATCATATAGTGGTAAAAAGGCGCAGCAATTTGGTCTGGAAACAGCG
 GTGTTGCAAGGTGCAAGCTGGTCAATGGGTGTTTCTAAAGCTAAGAAACATTCAATGACGCTCAAAACAAAGTAAATCT
 GACAACTCGAATTAACTCGACTGAGGATAAAGCGTCTCAAGATAAGTCTAAAGATCATATAATGGCAAAAAGGTGCGAGC
 GATCGGTGCTGGAACAGCAGGTTTGGCTGGAGGCGCAGCAAGTAAAGTGTCTTGGCCGCTTCAAAACCAATGCTCTTA
 ATATGCAAGCCAAAACCATGATGAACATGACAAATCATGACAGAGATAAAGAACGTTAAAAAGGTGGCATGGCCAAAGTA
 TTGTTACCATTAATTCAGCTGTACTAATATCGGTGCTATTAGCGATATTGGAGCATGGCATTAAACAAATCATATAATTA
 TGTTACAAAAGAAAAATAAATCGCGAATACAAATAAATAATATGCTGATGAAAGTAAAGCAAAAGACACATCTAAAGAG
 CTCTTAAGATATAATCAAAATCTACAGACAGTGAATAATCAAAAGAGGATCAAGCAAAAGCGACTAAAGATGAATCTGAT
 AATGATCAAAACCAAGCTTAATCAAGCAAAACAAATCAAGCAAAATATAATCAAAATCAACCAAGCTAATCAAAATCAACA
 ACAGCAACCAACAGCTCAAGCTGGTGGCCAAAGACATACAGTGAATGGTCAAGAAACTTATACCGTATCCCAATCAAT
 ACTACGGTTCAAGTTTACCUGAAAAATGTTGAAAAAATTAGAGCTGCCAATGGTTAAGTGGTAACAATATTAGAAACGCT
 CAACAAATCGTTATTCCATAA

SEQ ID NO 56 secuencia de polinucleótido

GTGATTGAATTAATTTAAATGGAAGGATGATAGTTGTGCTAATAATAATTTAAAGATGATTTGAAAAAGAAATCGTCA
 ATCTATTAAATCCAGACGAACAGCAAAACAGAAATTAAGAAGATGATAAAACAAATGAAAAATAAAGAGGCTGACTCTC
 AAAACAGTTTATCTAATAACTCAAAATCAACAATTTCTCCGAGAAATGCCCAACGACGAAAAAGAGCTAGAGAGACAGCA
 ACTAATCAAGCAAAACAAAGACGACAAACATCAAAAAATAGTGACGCTAAAACTACAGAAAGTTTCAATTAGATGACCG
 TTATGACGAAGCAGATTACAGCAACAACATGATAAATCGCAACAACAAATAAACTGAAAAACAATCACAAGATAATA
 GAATGAAAGATGAAAAAGATGACGCTATTGTAATGGAACATCTGAGTCACCAAGACATAAATCAAAATCAACACAAAT
 AGACCCGGCCCTAAAGCTCAACAACAAAGCGTAAATCAGAAAGTACGCAATCAAAACCGTCAACAACAAAGATAAAAA
 AGCAGCTACAGGTGCTGGAATAGCTGGTGCAGCTGGTGTCTGGTGCAGCAGAAACATCCAAACGTCATCATATAATAAA
 AAGATAAACAAGATTCTAAACACTCAAACTGAGAAATGACGAAAAATCTGTTAAAAATGATGACCAAAAGCAATCTAAA
 AAAGGCAAAAAGCAGCAGTGGTGTCTGGCGCAGCTGCAAGCAGTTGGTGGCGCTGGTGTTCGCGCATATAATTAATCAAAA
 TAAACATCATATAGAGAAAAAATCTAATCAAAACAAATCAATACAAATGACCAATCAGAAAGTAAAGAAAAAGGTGTT
 TCATGAAAAATCTTGTACCCTTATAGCAGCCATTCTTATCTAGGTGCAATAGCAATATTCCGTGGTATGGCTCTAAAT
 AATCAACAGATAGTAAAGTGTGACCAAAAAATAGCGA/TCAAAGTAAAGAAAGACTCAGATAAAGAGATGGTGGCGCA
 ATCCGAAGATAACAAAGACAAAAATCTGATAGTAAACAAAGACAAAAATCTGATTCTGATAAGAACCGCAGATGATGACT
 CTGATAATAGTTCTCAAAATCTAACGCTACTTCAACTAATAATAACGATAATGTAGCCAAATAAATCAACTCAAAATATACA
 AACCAAAATCAACAAGATAATGCAAAACAAAAATAGCAATTAATCAACAGGCAACTCAAGGTCAACAATCACAATACAGTATA
 CGGTCAAGAAACTTATATCGTATCGCCATACAAATATTATCGAGAAAGAACTCAAGCTAACGATAGATAAATTAACGCTG
 CGAATGGTTAAGCAATAATATTCTAATGGTCAAACTTATGTTATTCCTCAATAA

SEQ ID NO 57 secuencia de polinucleótido

ATGAAAAATAAATTGATAGCAAAATCTTTATTAACAATAGCGGCAATTGGTATTACTACAACTACAATTCGCTCAACAGC
 AGATGCGAGCGAAGGATACGCTCAAGCAGAAAAAGAAACCATGAGTATTAAATCACAATATCGTAGAGTACAATGATGGTA

Fig. 2.21

CTTTAAATATCAATCTAGACCAAAATTTAACTCAACACCTAAATATATTAAATTCAAACATGACTATAATATTTAGAA
TTTAACGATGTACATTTCGATATGTTGACGTCACCAATTTAATAAACAGCAACGAAACTGATGCAACTATTAAAA
AGAACAAAAATTGATTCAAGCTCAAAATCTTGTGAGAGAAATTTGAAAAACACATACTGTCACTGACACAGAAAGCAC
AAAAGGCAGTCAACTTAGTTTCGTTTGAATACAAAGTGAAGAAAAATGGTCTTACAAGAGCGAATTGATAATGTATTAAAA
CAAGGATTAGTGAGATAA

SEQ ID NO 58 secuencia de polinucleótido

ATGAAAACACGTATAGTCACTCAGTAAACACACACTATTGCTAGGTTCCATATTAATGAATCCTGTGCTAATGCCGC
AGATTCTGATATTAATATTTAAACCGGTACTACAGATATTGGAAGCAATACTACAOTAAAAACAGGTGATTAGTCACTT
ATGATAAAGAAAAATGGCATGCACAAAAAGTATTTATAGTTTATCGATGATAAAAATCACAATAAAAAACTGCTAGTT
ATTAGAACGAAAGGTACCATTTGCTGGTCAATATAGAGTTTATAGCGAAGAAGGTGCTAACAAAAGTGGTTTAGCCTGGCC
TTGAGCCTTTAAGGTACAGTTGCTACTCCTGATAATGAAGTAGCTCAAAATATCTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG
ATACAAAAGAGTATATGAGTACTTTAACTTATGGATTCAACGGTAAATGTTACTGGTATGATACAGGAAAAATTOGGGGC
CTTATTGGTGCAAAATGTTTCGATTGGTCATACACTGAAATATGTTCAACCTGATTTCAAAAACAATTTAGAGAGCCCAAC
TGATAAAAAAGTAGGCTGGAAAGTGATATTTAACAATATGGTGAATCAAAATTTGGGGACCATATGATAGAGATTCTTGGA
ACCCGGTATATGGCAATCAACTTTTCATGAAAACCTAGAAAATGGTTCTATGAAAAGCAGCAGAGAACTTCCTTGATCCTAAC
AAAGCAAGTTCTCTATTATCTTCAGGGTTTTCACCAGACTTCGCTACAGTTATTACTATGGATAGAAAAGCATCCAAACA
ACAAACAAATATAGATGTAATATACGAACGAATTCGGTATGACTACCAATTGCTATGGACTTCAACAAATTTGAAAGGTA
CCAACTACTAAAGATAAATGGACAGATCGTTCTTCAGAAAGATATAAAATCGATTGGGAAAAAGAGAAATGACAAATTA

SEQ ID NO 59 secuencia de polinucleótido

ATACACATGAAAAATAAATATATCTCGAAGTTGCTAGTTGGGGCAGCAACAATTACTTTAGCTACAATGATTTCAAATGG
GGAGCAAAAGCGAGTGAAAACACGCAACAACCTTCAACTAAGCACCACCAACTCAAAACAACTACGTAACAGATCAAC
AAAAAGCTTTTATCAAGTATTACATCTAAAAGGTATCAGAGAAGAACACGTAAACCAATACATCAAAACATTACGGGAA
CACCCAGAAGCTGCACAGAAGTATTTCTGAACTCACTTAAAGACAGCAAGAACCAGACCGGCTGTTGCACAAACAAA
CGCTTTTACATGTTCTTAAAAATGATAACTTAACTGAACAAGAAAAAAATTAATTACATTGCAACAAATTAAGAAAAACC
CTGATAGAAGCCAACAAGTTTGGGTAGAACTAGTACAATCTTCTAAAGCTAAAGAACGTCAAAATATTGAAAAATGCCGAT
AAAGCAATTAAGATTTTCCAAGATAACAAGCACCACAGATAAATCAGCAGCATATGAAGCTAACTCAAAATTAACCTAA
AGATTTACGGCATAAAAATAACCGCTTTGTAGAAAAAGTTTCAATTGAAAAAGCAATCOTTCGTATGATGAGCGTTGGA
AATCAGCAATGATGCAATCTCAAAATTAATGAAAAAGATTCAATTGAAAACAGACGTTTAGCACAACGTOAAGTTAAC
AAGCAGCTTATGGATGTAAAGAGCATTACAGAAAACAATTAGACGCTATTAGTAGCTCAAAAAGTGTCTGAAAAGAAAGT
GGCGCCAAAAGTTGAGGCTCCTCAAATTCATCACCACAAATTGAAAAACCTAAGCAGAAATCACCAAAAGTTGAAGTCC
CTCAATCTAAATTAATTAGGTTACTACCAATCATTAAGAGATTCAATTAACTATGOTTACAAGTATTAAACAGATCTTAT
AAAAGCTATAAAGAAAAATATGATACAGCAAGTACTACTATAATACGTACTATAAATACAAAGGTGCGATTGATCAAC
AGTATTAAACAGTACTAGGTATGTTGTTCTAAATCTTACATCCAACCTTGAAGTTGATGATAAAACCGGCTACTTAGCTA
AATCATATGACACAAGTAAGAACTATGTAAGTGAATCAATCAATCTGTTAAAGTATTATATACTTTCTACCAAAACCCA
ACATTAGTAAAAACAGCTATTAAAGCTCAAGAACTGCATCATCAATCAAAAATACATTAAAGTAATTTATTATCATTCTG
GAAATAA

SEQ ID NO 60 secuencia de polinucleótido

ATGACAAAACATTATTTAAACAGTAAGTATCAATCAGAACACGTTCACTAGCTATGAAAAAGATTACAATGGGTACAGC
ATCTATCATTTTAGGTTCCCTTGTATACATAGGCGCAGACAGCCACAAAGTCAATGCGGCAACAGAGCTACGAACGCA
CTAATAATCAAAGCACACAGTTTCTCAAGCAACATCACAACCAATTAATTTCCAAGTGCAAAAAGATGGCTCTTCAGAG
AAGTCACACATGGATGACTATATGCAACACCGTGGTAAAGTAATTAACAAAAATAATAAATATTATTTCCAACCGTGT
AAACAAATGCATCATTCTGAAAAGAAATACAAATTTTACAATGCAACAAATCAAGAAATTAGCAACAACTGTTGTTAACGATA
ATAAAAAAGCGGATACTAGAACAATCAATGTTGCAGTTGAACCTGGATATAAGAGCTTAACCTACTAAAGTACATATTGTC
GTGCCACAAATTAATTACATCATAGATATACTACGCATTGGAAATTTGAAAAAGCAATTCCTACATTAGCTGAGCGCAGC
AAAACCAACAATGTTAAACCGGTTCAACCAAAACAGCTCAACCTAAAAACCTACTGAGCAAACTAAACCGATTCAAC
CTAAAGTTGAAAAAGTTAAACCTACTGTAACCTACAACAAGCAAGTTGAAAGCAATCACTCTACTAAAGTTGTAAGTACT
GACACAACAAAGATCAAACTAAACACAAACCTGCTCATACAGTTAAACAGCACAACCTGCTCAAGAACAAAAATAAGT
TCAAACACCTGTTAAAGATGTTGCAACAGGAAATCTGAAAGCAACAATCAAGCTGTAAAGTATAATAATCAACAACAA
CTAACAAAGTTACAAAACATAACGAAACGCTTAAACAAAGCATTAAGCTAAAGAAATTAACAAAACCTGTTTAACTTCA
GTTGATAACTTTATTAGCACAGTTGCCTTGCAACACTTGCCCTTTTAGGTTCAATTATCTTTATTACTTTTCAAAAGAAA
AGAATCTAAATAA

SEQ ID NO 61 secuencia de polinucleótido

ATGAACAAACAGCAAAAAGAAATTTAAATCATTTTATTCAATTAGAAAGTCATCACTAGGCGTTGCATCTGTAGCGATTAG
TACACTTTTATTATTAAATGTCAAATGGCGAAGCACAGCACAGCTGAAGAAACAGGTGGTACAAATACAGAAGCACAAAC
CAAAAACCTGAAGCAGTTGCAAGTCCAACAACAACATCTGAAAAAGCTCCAGAAACTAAACAGTAGCTAATGTCTGTCTCA

Fig. 2.24

GOTTATOTTGATGGGTATATTGAAACAATAGAAGAAACGGATTTCATCAGCTATTGATATCGATTACCATCTGCTGTGGA
TAGTGAAGTGGGTACCGTTGGAGGATACACTGAGTCTCTGAGGAATCAAAATCCAATTGACTTTGAAAGAAATCGACACATG
AAAATTCAAAACATCACGCTGATGTTTGTGAATATGAAGAGGATACAAAATCCAGCTGGTGGCCAAATTAACAACTGAGTCT
AACTTAGTTGAATTTGACGAGAGTCTACAAAAGGTATTGTAACTGGCCAGTGAGCGACCATACAACAAATGGAAGATAC
GAAAGAAATATACGACTGAAAGTAATCTGATTGAACCTAGTAGATGAACCTACCTGAAAGAAATGCTCAAGCACAAGACCAA
TCGAGGAAATTAAGTGAACAAATCATCATATTTCTCATTTCTGGTTTAGGAACTGAAATGGTCACGGTAATTTATGGCTGT
ATTGAAGAAATCGAAGAAATAGCCACGTTGATATTAGAGTGAATTAGGTTAGCAAGGTGGCCAAATAGCCGTAACCA
GTCAATTCGAGGAAGACACAGAGAGACAAACCTAAATATGAACAAGGTGGCAATATCGTAGATATCGATTTCGACAGTGT
TACCTCAAAATTCATGGTCAAAATAAAGGTGACCACTCATTCGAAGAAATACAGAGAAAGACAAGCTAAATATGAACAT
GGCGGTAATATCATTTGATATCGACTTCGACAGTGTGGCACAATTCATGGATTCAATAAGCATAAATGAATTTATGAAGA
AGATACAAACAAAGATAAACCTAATTTCAATTCGTTGACACAATAGTGTGACTTTGAAGAAGATACACTTCCAAAAG
TAAGCGGCCAAAATGAAGGTCAACAAACGATTTGAAGAAATACAAAGCCGCCAACCCACCGACACAGAGTACCGAGT
GAGCCGGAACACCAATGCCACCGACACCAAGATACCGAGTGAGCCGGAACACCAACGCCACCAACACCGAGAGTACC
AAGTGAGCCGGAACACCAACACCGAGTCCGGAAGTACCAAGTGAGCCGGAACACCAACACCAACCGACACAGAG
TGCCGAGTGAAGCAGAAACACCAACCGGCAACACCGAGGTACCAAGCTGTAACCTGTTAAACCAAGTACCAACCGCAAA
GAAGAACTAAAAGCCTTCTAAACCAAGTGAAGAAAGTAAAGTGAACACCTGTTATTGAATCAATGAAGAGTTAA
AGCAGTGGCACAACCTAAAAGAGCACAAATCTAAGAAATCTGACTACCTGAAACAGGTGGAGAGAAATCAACAAACAAAG
GTATGTTGTTGGCGGATTATTACAGCATTTAGGTTTAGCAITATTACGCAGAAATAAAAGAAATACAAAGCATAA

SEQ ID NO 65 secuencia de polinucleótido

TTGAAAAAAGAAATGATTATTGTCGAATTAAGCAGAAATAATTTTCGATTAGACGTTTACAGTAGGTACCACATCAAT
AATAGTAGGGGCACTATACATTTTGGGATAGGCAATCATCAAGCACAAGCTTCAGAACAATCGAACGATACAAAGCAAT
CTTCGAAATTAATGCAAGTGCAGATTCCGAAAAAACCAATATGATAGAAACACCTCAATTAATACAAAGCTAATGAT
ACATCTGATATTAGTGCAAAACACAAACAGTCCGAATGTAGATAGCACAACAAACCAATGTCTACACAACAGCAATATC
CACTACAAACAGAGCCAGCTTCAACAAATGAACACCTCAACCGACCGCAATTAAGAAATCAAGCAACTGCTGCAAAATGTC
AAGATCAAACTGTTCTCAAGAAAGCAATTTCTCAAGTAGATAATAAACCAACCAATGATGCTAATAGCATAGCAACAAAC
AGTGAGCTTAAAAATCTCAACATTTAGATTACCAATCATCAACCAACCAATTTCCAAATGCGCAAGCACTAGTAA
AGCAAGTTAGAAACGAGAGCTGTACGTAGTTTACCTGTTGCTGAACCGTAGTAAATGCTGCTGATGCTAAAGGTACAA
ATGTAATGATAAAGTTACGCGCAAGTAAATTTCAAGTTAGAAAGACTACATTTGACCTTAATCAAGTGTGTAACATTT
ATGGCGGCAAAATTTACAGTGACAGATAAAGTGAATCAGGGGATTTATTTACAGCGAAGTTACCAAGTGTGTAACATTT
TAATGGAGACGTGGATTATTCTAATTCAAATAATACGAAGCCAAATTCAGGAATTGATTAACCAAAATGGCGCAACA
CTAAAGCAACATATGATATCTTGACTAAGACGTATACATTTGCTTTACAGATTATGTAATATAAAGAAATATTAAAC
GGACAAATTTCAATTACCTTTATTTACAGACCGGCAAGGCACTTAATCAGGAACATATGATGCGAATATTAAATTTGC
GGATGAAATGTTTAATAAATAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
TTTCTTCTCAAAATTTTGGTGTAGATACAGCTTCAGGTCAAAACACATACAGCAACAGTATTTGTTAACCTTAAGCA
CGAGTTTAAAGTAATACGTGGGTGTATATTAAAGGCTACCAAGATAAAGTGAAGAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGT
AGATACAAACTGAGAAATTTTGAAGTGAATGATACATCTAATTTATCAGATAGCTACTATGAGATGCTAAATTAATTA
ACCTTAAAGAAAGTAAACAGACCAATTTAAAAATAGAACTTATTATGAGCATCCAAATGTTAGCTAGTATTAAATTTGGT
ATTACTAAACATATGTAGTATTAGTAGAAGGGCATTAACCAATACAGGTAAAGAACTTAAAAACTCAGGTTATTCAAGA
AAATGTTGATCTGTAAACAAATAGAGACTACAGTATTTTCGTTGGAAATTAAGAAATGTTTATGTTATGTTGTTGAA
GTGCTGATGGTGTATTCAGCAGTAAATCCGAAGAGCCCAACTCCAGGGCCCGGTTGACCCAGAAACCAAGTCCAGACCA
GAACCAAGACCAACCGCCAGATCCAGAACCAAGTCCAGACCCAGAACCGGAACCAAGCCAGACCCGATCCGATTCGGA
TTACAGACAGTCACTCAGGCTCAGACAGGAGTCAAGGTTTCAGATAGCGACTCAGAAATCAGATAGCGATTTCGATTTCAGACA
GTGATTTCAGATTTCAGACAGCGACTCAGAAATCAGATAGCGATTTCAGAAATCAGATAGCGACTCAGATTTCAGATAGCGATTTC
GATTTCAGATAGCGATTTCAGAAATCAGATAGCGATTTCGATTTCAGACAGTGAATTCAGATTTCAGACAGCGACTCAGAAATCAG
TAGCGACTCAGAAATCAGATAGTCAAGTCAAGTTTCAGACAGTGAATTCAGATTTCAGACAGCGACTCAGAAATCAGATAGCGATT
CAGACTCAGATAGCGATTTCAGACTCAGACAGCGATTTCAGATTTCAGACAGCGACTCAGAAATCAGACAGCGACTCAGAAATCAG
GATAGCGACTCAGACTCAGACAGCGACTCAGATTTCAGATAGCGATTTCAGACTCAGACAGCGACTCAGAAATCAGACAGCGACT
CTCAGACTCAGATAGCGATTTCAGACTCAGACAGCGACTCAGATTTCAGATAGCGATTTCGAGACTCAGACAGCGATTTCAGATT
CAGACAGCGACTCAGACTCAGATAGCGATTTCAGATTTCAGACAGCGACTCAGACTCAGATAGCGATTTCGAGACTCAGATAG
GACTTCGATTCAAGAGTTACACCAACCAAAATTAAGAAACAGAAAGCACCATCAAAATCTAAAGGTGAAGTAAACCAATTTAA
TAAGGTATCAAAACAAACAAACTGATGCTTTACCAGAAACAGGAGATAAGAGCGAAACCAAAATGCAACTTTATTG
GTCAATGATGGCAATTATTAGGATCATTAATTTGTTAGAAACGCAAGCAAGATCATAAAGAAAGCGTAA

SEQ ID NO 66 secuencia de polinucleótido

ATGAAAAAGCAAAATATTTGCTAGGCGCATTAGCAGTTGCACTAGCTTATTTACATGAGATAACAAAGCAGATGCGAT
AGTAACAAAGGATTATAGTAAGAAATCAAGAGTGAATGAGAAAGTAAAAAGGAGCTACTGTTTCAGATTATTACTATT
OGAAAAATATGATAGTTTAGAGGCACAATTTACTGAGCAATAGACTTATTGGAAGATTATAAATATGAGATCTCTATC
TATAAAGAGCGAAAGATAGATTGATGCAAGAGTATTAGGAGAAAGACCAATTTTATTAAAGAAAGAGTGAATGAATA
TGAGCTTTATAAAGTGGTATAAAGTTCAAAATGAAGACCTAATATGCTTACTTTCCATAAATATAATCTTTCAAAAT

Fig. 2.25

TAACAATGAATGAATATAACGATATTTTAACTCTTTGAAGATGCACTTTTCAATTTAATAAGAGTTTAAAGAAATA
GAGCATAAAAAATGCTTGAAGCAGTTTGTATAAGATGGAGAGCAAGGCAACTAAAGAAATTTATGACCTTGTTC
TGAAATTTGATACATTAGTTTGAATTTATATGCTGATAAGGATTTATGGGAGCATGCGAAGAGTTTACGAGCAAACTGG
ACTTAATCCTTGGAGATACAGACAAATCCACATAAAATTACAAATGAGCGTATAAAAAAGAAATGATCGATGACTTAAAT
TCAATTTAGATGATTTCTTTATGGAGACTAAACAAAAATACACCGAATTTCTATAACAAATATGATCCAAACAAACACAA
TTTTAAAGAGAGAGTGAAATTAACCTAATTTTGATAAATTAAGTTGAAGAAACAAAAAGCAGTTAAAGAACGAGAG
AATCTTGGAAAAATAAACTGTCAAAAAATACGAGGAACTGTAAACAAATCTCCTGTTGTAAAGAGAGAGAGAAAGTT
QAAGAACCTCAATTACCTAAAGTTGGAACCCAGCAAGAGTTAAACTACGGCTGGTAAAGCTGAAGAAACACACAAACC
AGTGGCAGAGCCATTAGTAAAAATCCACAAAGAACTATATGGTGAAGCTGTAAAGGTTCCAGAAATATCCAAAGATGG
AAAAATAAACCTTACAGGTGAAGATCGTTCAAGGTCCCGATTTTCTAACAAATGGAACAAACAGACCATCTTTAGCGAT
AATTTACTCAACCCGACGACACCGAACCTATTTTGAAGGTCTTGAAGGTAGCTCATCTAACTTGAATTAAGCCACA
AGGTACTGAATCAACCTTGAAGGTATCAAGGAGAAATCAAGTGATTTGAAGTTAAACCTCAAGCACTGAAACACAG
AAGCTTCTCAATATGCTCCGAGACCCCAATTTAAACAAACACCTAAGTATGTGAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATC
CGTGAATACAAGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAACAGCCAAAGTGAACAAATGCATACAACT
AACGACAAATCAAGATGGCAGATATCATACGAGCTCGCCCAACACAAACAAAGCCAAAGTGAACAAACGATATTAACG
TAACACACATGCAATGGTCAAGTATCATACGCTGCTCGCCCAACACAAACAAAGCCAAAGCAAAACAAATGCATACAC
GTAAACACATGCAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAACAAAGCCAAAGCAAAACAAATGCATATA
CTTAACCAACATGCAATGGTCAAGTATCATACGAGCTCGCCCGACATACAAGAGCCAAAGCAAAACAAATGCATACA
ACGTAAACACATGCAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAACAAAGCCAAAGCAAAACAAAGCATAT
AACGTAAACACATGCAATGGTCAAGTATGCGCATATGGCGCTAGAGTAAACAAATAA

SEQ ID NO. 71 secuencia de polinucleótido

GTGAAAGCAATCTTAGATACGGCATAAGAAAAACAAATTTGGAGCGGCCTCAGTATTCTTAGGAAACATGATCTTTOT
TGGATTTGGACAAAGAAAAAGAACTGAGCATCGAACAACAAATACTACAGTAGAGGAAAGTGGGAGTTTCAGCTACTG
AAAGTAAAGCAAGCGAAACACAAACAACTACAAATACGTTAATACAAATAGATGAACACAAATCATACAGCGGACATCA
ACTGAGCAACCATCAAAATCAAGTAAACACAGAGAAAGCACCAACAACTGTGCAAGCACCAAAAGTAGAAACCGA
AATGAATACACAGAGATTTACCATCAAAAAAGTTGCTGATAAGGAACTACAGGAACTCAAGTTGACATAGCTCAAC
CAAGTAAAGTCTCAGAAATTAACCAAGAAATGAAGAGTCAAGTACGTTACAGCAGTTTCAGAGAAAGAGTACCGGAA
GAAGCTAAAGCGACAGGTACAGATGTAAACAAATAAGTGAAGTTACTGAAAGCTCTTTAGAGGACATAATTAAGATTTC
GAATATTGTTAATCCCATATAGTCTCAAGAGTAACTTTAAATACAAATGGAATTTGGAGAGGAAATTAAGCAGGAG
ATTATTATTGATTTTCACTTAAGTGATTAATTTGAACACATGATATATCAACACTGCTAAAGTTCCGGAGATAAAAAGT
TCAACAGAGATTAAGTTATGCAAAATGGTCAAGTTATAAAATGAACGTACAATTCGCTATACATTTTATGATTATATAA
TAACAAAAAGATTTAACTGTGAATTAAGCTTAACCTTATTCATTGACCCAAACACAGTGACAAAGCAAGGGAGTCAAA
AAGTTGAAGTAACTAGGTCAAAATTAAGTCTCAAAAGAAATTTGATATCAAAATTTAGACGGCTTAAAGATAGAAATG
GGTGTACTGTTAATGGTCTGATTTGATACTTTGAATAAAGAGAGAGGTAATTTAGCCATTTTGCATATGTGAAGCTTAA
CAACCAAGTCCTTAAGTCTGTCACAGTAACTGCTCAAGTAAACATCTGGATATAACCAAGTGTAAATTCACAGTCA
AAGTATATAACACATTTGTTTCAAGTAAATAGCTGAAGTGTATTATGCAAGCTTGATGATACAGTAAATTTGAAGAT
GTGACTGAAAAAGTAAATCTATCTTACACAAAGTAAATGGTGGGTACACATTTGAACCTTGGCGATTTAGATTAATTCGAAGA
CTATGTAATTAATATGAAGGTGAATATGATCAAAATGCTAAGGATCTAAATTTCCGAACACATCTTTCAAGATATCAT
AATACTACCCATATCTTATTACCCGTATTATCCAGTTCAATTAACCTGGAACACAGGTGTTGCAATTTTACTCTAAT
AATGCTAAAGGCGATGGTAAAGATAAACCAATGATCTTATCATTTGAGAGAGTGAACCAATGATTTAGACATTAATC
AGAGCCACAGTGGAGAGAGATGAATTTGACTGGTACAATCGAAGAAAGTAAACGATTTAAGCCAAATTTGATTTGAATATC
ATACAGCTGTTGAAGGTGCAGAAAGTCAATGCAGAAAGTATTATTGAACTGAAGAGATTTCTATTATGTTGAAATTTGAA
GAATCTACACATGAATAATCAAAACATCAGCTGATGTTGTGAAATATGAAGAGGATACAAACCCAGGTGGTGGCCAGT
AACAACCTAGTCTAAGTTAGTTGAATTTGACGAAGAGTCTACAAAGGTATTGTAACTGGCGCAGTGAGCGACCATACAA
CAGTTGAAGATACGAAGAAATATACAACTGAAGTAACTGATTTGAATTTAGTGGATGAATTTACCTGAAGAACATGGTCAA
GCACAGGGCCAAATCGAGGAAATTTACTGAAACAAATCATCAATTTCTCATTCTGTTTAGGAACGTAAATTTGTCAGG
TAATTTAGGCGTATTTGATGAATCGAAGAAATAGCCAGTTGATATTAAGAGTGAATTAGGTTATGAAGGTGGCCAAA
ATAGCGGTAATCAGTCAATTCGAGGAAGACACAGAGAGATTAACCTAAATATGAACAGGTGGTAAATATCGTAGATATC
GATTTGACAGTGTACCTCAATTTAGTGTCAAAATAAGTGAACCAAGTCAATTCGAGGAAGACACAGAGAGAGACAAGCC
TAAGTATGAACAGGTGGTAAACATCTTATATCAGTCTGACAGTGTGACCAAAATTCATGATTTCAATGAAGCATATG
AAATTTTGAAGAGATACAAACAAAGATAAACCTAATTTATCAATTTGGTGGACACAAAGTGTGATTTTGAAGAGAT
ACATTTCAAAGTAAATGTTCAAAATGAAGGTCAACAAAGGATGAAGAGATACAAAGCGCCCAACCCGCAACCC
AGAGGTACCAAGTGAAGCCGGAACACCAACACCAACCAACAGAGTACCGAGTGAAGCTAGCCGAACCAACCCCAAC
AACCGGAAGTACCAAGTGAAGCCGGAACACCAAGTACCAACCAACCAAGAGGTACCATCTGAACCTGGTAAACAGTACCA
CCTGCTAAAGAGAACTTAAACAACTTTAAACCAAGTGAACAAAGTAAAGTAAACCACTGTTATTGAATCAATGA
AAAGGTTAAAGCAAGTGGCACCACCTAAACAAACAAATCTAAGAAATCTGAACCTGTAACAGGTGGAGAGAAATCAA
CAACAAAGGTATGTTGTTCCGCGGATTTATCAGCATTTAGGTTTATGATTTATACGAGAAATAAAAAGAAATACAA
GCATAA

Fig. 2.26

SEQ ID NO 72 secuencia de polinucleótido

ATGAAATTTAAGTCATTGATTACAAACACATTAGCATTAGGCGTTATAGCATCAACAGGAGCAAACCTTTAATACTAACGA
 AGCATCTGCCCGCAGCTAAGCCATTAGATAAATCATCAAGTACATTACACCATGGACATTCTAACATCCAGATTCCATATA
 CAATTACTGTGAACCGTACAAAGCCAAAACATTTTATCAAGCTTAACATTTAATAAGAAATCAAAATATTAGTTATAAAGAT
 ATAGAGAATAAAATTAATCAATTTTATCTTTAATAGAGCTATTAGTGATATCGATTAAAGACTTTCAAAGCAAGCGGA
 ATATACGGTTTCATTTTAAAAATGGAACAAAAGAGTTATCGATTTGAAATCAGGTATCTACACAGCTGACTTAATCAATA
 CAAGTGACATTAAAGCTATCAAGTGTAAAGTAGATCTAAAAGCAACCTAAAGATAAAGCTAAAGCAAATGTTCAAGTG
 CCAATATACAAATCACAGTGAAACGACCAAGCCAAAACATTTTATCAACCTAACATTTAATAAAATCAAATATTAGTTA
 CAAAGATTTAGAGGGTAAAGTTAAATCAGTTTACAATCAAATAGAGGTATTACTGATGTTGATTAAAGACTTTGGAAGC
 AAGCGAAATATACAGTTAATTTTAAAAATGGAACGAAGAAAGTTATCGATTTGAAATCAGGTATTTACACAGCGAATTTA
 ATCAATTCAGGTGATTTAAAGTATCAATTTAACTAGATACAAAAAACATATCGAAATAAAGCTAAAGGAACTA
 TCAAGTCCCATATTCATTAATCTAAATGGTACATCTACAAACATTTTATCGAATCTTTCAATTTTCAAATAAACCTTGGG
 CAAATTACAAAAATTTAAGTCTAAATAAATCAGTACTGAAGCATCATAGAGGTATTAGTGAACAGATTTTAAATAT
 GCTAAGAAAGCTTTATATCTGTTTATTTTAAAAATGTTGTTAAAGAAATCTTACAGTTAAATTCAAAAATTACACAGC
 AAACCTTAGTTTCAAGCAAGATGTTAAGAGAAATGAAATTTACTGTTTAAACAGGAACTAAAGCGAAGCAGACAGATATG
 TACCATACCAATTCAGTAAATGGCAGTCAACACCAATTTTATCAAACTAAAAATTTGAAATTAACAAATTAATTAAT
 TACAAATATTTAAAGCAAGTCAATCTGTATTTAAAGTAGAAAGAGGTATCAGTGATCTTCACTTAAATTTGCGAA
 ACAGCAAAATATACAGTATATTTCAAATAAGCAAGAAACAGTAAATTTAAATCAGACATCTTTACACCTAAT
 TATTTAGTGGCAAGATATTTAAAGATTTGATATTTGATGTTAAACAAATACACTAAATCAAAAAAATAAATAAATCT
 AATAATGTAATTTCCAGTAAACATTAATTAATTTGAAACATAGTTTCAATGAAATTTGTTCTATTAATGCAAGCAA
 AATTACAAATTAATGATTTAAGTATAAACTTAAATCAGCAATGGCAATGATCAAGGGATTAACAAATGACATAGGAC
 TTGCTGAAACGCGCAGTGTATAAAGTGTATTTAAAAATGGTTTCGTCAAAATATGTAGACTTAAAACTGAGTATAAAGAT
 GAAAGAGTATTTAAAGCAACTGACATTTAAAAAGGTAGATATGAACTTAAATTTCTAA

SEQ ID NO 73 secuencia de polinucleótido

ATGAATAATAAAAGACAGCAACAAATAGAAAAGGCATGATACCAAAATCGATTAAACAAA
 TTTTCGATAAGAAAGTATTCTGTAGGTACTGCTTCAATTTTAGTAGGACAACATTGATT
 YTTGGGTAAAGTGTGATGAAGCTAAAGCGGCAGAACATACGAAATGGAAGATTTAAATCAA
 TCAAAAATGAAACGACGCCCCAAGTGAGAAATAAACAACTAAAAAGTTGATAGTGT
 CAACATAAGACAAATACGCAAACTGCAACTGCAGATCAAGCTTAAAGTGAATGAGTGT
 AGTGCAACAGTTAAAGAACTAGTAGTAACATGCAATCACCACAAACGCTACAGCTAAT
 CAATCTACTACAAAACCTAGCAATGTAAACAAATGATAAATCATCAACTACATATAGT
 AATGAACTGATAAAGATTAATTTAACCAAGCAAAAGATGTTTCAACTACACTAAACAA
 ACUACTATTAAACCAAGAACTTTAAATCGCATGGCAGTGAATCTGTTGCACTCCACAA
 CAAGCAACAAATGTTAATGATAAAGTACATTTTCAAATATTGACATTGCGATTTGATAAA
 GACATGTTAATCAGACTACTGGTAAACCTGAATTTGGGCAACTTCAAGTGTATTTTA
 AATTTAAAGCAAAATTACCAATCGATGATTCTGTTAAAGAGGGCGATACATTTACTTTT
 AATATGTTCAATATTTCCGTCCAGGATCAGTAAGATTACCTTCACAAACTCAAAATTTA
 TATATGCCCCAAGGTAAATATTATTCAAAAGGTATTTATGATAGTACAACAAACACAA
 ACATATATCTTTTACGAATATGTAGATCAATATACAAATGTTAGAGGTAGCTTTGAAACAA
 GTTGCAATTTGCGAAACGTAAAAATGCAACAACTGATAAACAGCTTATAAAATGGAAGTA
 ACTTTAGGTAAATGATACATATAGCGAAGAAATCATTTGTGATTTATGTTAATAAAAGCA
 CAACCGCTTATTTCAAGTACAAACTATATTAAACAAAGAGTTTATCCGTAATATGACT
 GCATATGTAATCAACCTAAAAATACATATACTAAACAAACGTTTGTACTAATTTAACT
 GGATATAAATTTAATCCAAATGCAAAAACCTTCAAAATTTACGAAGTGACAGATCAAAAT
 CAATTTGTGGATAGTTTCAACCTGATACCTTCAAACTTAAAGATGTTACTGATCAATTC
 GATGTTATTTATAGTAATGATAAATAAACAGCTACAGTGAATTTAATGAAAGGCCAAACA
 AGCAGCAATAAACAATACATATTCAACAAGTTGCTTATCCAGATAATAGTTCAACAGAT
 AATGGAAAAATGATTATACCTTTAGACACTGACAAAACCTAAATATAGTTGGTCAAATAGT
 TATTCAAATGTGAATGCTCATCAACTGCTAATGGCCGCAAAAGAAATATAATCTAGGT
 GACTATGATGGAAGATACAAATAAAGATGTTAAACAAAGATGCCAATGAAAAAGGGATT
 AAAGGTGTTTATGTCATTCTTAAAGATAGTAACGGTAAGAAATTAGATCGTACGACAACA
 GATGAAATGTTAAATATCAGTTCACTGGTTTAAAGCAATGAACTTATAGTGTAGAGTTT
 TCAACACCAGCCGTTATACACCGCAACTGCAAAATGTAAGTACAGATGATGCTGTAGAT
 TCTGATGACTAACTACACAGGTGTCATTAAAGACGCTGACAACTGACATTAGATAGT
 GGATCTCAAAACACCAAAATATAGTTTAAAGTGAATGTTTGTGATGACAGTAATAAA
 GATGGTAAACAGATTTCGACTGAAAAAGGAATTAAGGTGTTAAAGTTACTTTGCAAAAC
 GAAAAAGCCGAGTAATTTGGTACAACTGAAACAGATGAAATGTTAAATACCGCTTTGAT
 AATTTAGATAGTGTAAATACAAAGTTATCTTTGAAAAACCTGCTGGCTTAACTCAAAACA
 GGTACAAATACAACTGAAGATGATAAAGATGCCGATGGTGGCAAGTTGATGTAACAAT

Fig. 2.27

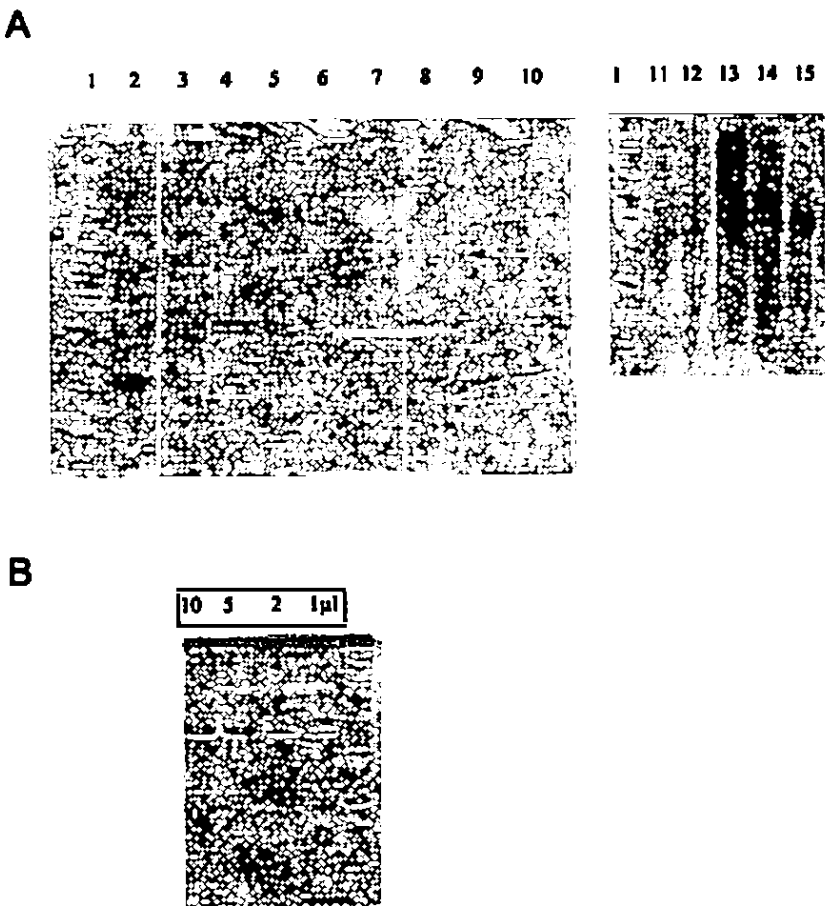
ACGGATCATGATGATTTACACTTGATAATGGCTACTACGAAGAAGAAACATCAGATAGC
 GACTCAGATTCTGACAGCGATTTCAGACTCAGATAGCGACTCAGATTTCAGATAGCGACTCA
 GATTTCAGACAGCGATTTCAGACAGCGACTCAGACTCAGATAGCGATTTCAGATTTCAGACAGC
 GACTCAGACTCAGACAGCGATTTCAGACTCGGATAGCGACTCAGACTCAGATAGCGACTCA
 GATTTCGGATAGCGACTCAGACTCAGATAGCGATTTCAGATTTCAGATAGCGATTTCGGACTCA
 GACAGTGATTTCAGATTTCAGACTCAGATAGCGACTCAGATTCTGACAGCGATTTCAGACTCA
 GACAGCGACTCAGACTCAGACAGTGATTTCAGATTTCAGACAGCGACTCAGATTTCAGATAGC
 GACTCAGACTCAGATAGCGACTCAGATTTCAGATTTCAGATTTCGGACTCAGACACCGACTCA
 GATTTCAGATAGCGATTTCAGATTTCAGATAGCGACTCAGATTTCGGACAGCGATTTCAGACTCA
 GATAGCGATTTCAGACTCAGACACCGATTTCAGATTTCAGATAGCGACTCAGACTCAGATAGC
 GACTCAGACTTCGGATAGCGATTTCAGATTTCAGACAGCGACTCAGATTTCAGATAGCGATTTCG
 GACTCAGACACCGACTCAGATTTCAGATAGCGATTTCAGATTTCAGATTTCAGATTTCAGATTTC
 CCGGCTAAACCAATGAGTACGGTTAAAGATCAGCATAAACAGCTAAAGCATTACCAGAA
 ACAGGTAGTGAAAATAATAATTCAAATAATGGCACATTATTTCGGTGGATTATTTCGGGCA
 TTAGGATCATTATTGTTATTTCGGTCGTCTGTAACCAACCAATAATAA

SEQ ID NO 74 secuencia de polinucleótido

GAGGAGAATTTCAGTACAAGACGTTAAAGATTCTAATACGGATGATGAATTATCAGACAGC
 AATGATCAGTCTAGTGATGAAGAAAAGAAATGATGTGATCAATAATAATCAGTCAATAAAC
 ACCGACGATAATAACCAATAATTAAGAAAAGAAAGCAATAACTACGATGGCATAGAA
 AAACGCTCAGAAGATAGAACAGAGTCAACACAAATGTAGATGAAAACGAAGCAACATTT
 TTACAAAAGACCCCTCAAGATAATACTCATCTTACGAAGAAGAGGTAAAAGAAATCCTCA
 TCAGTGAATCCTCAAATTCATCAATTGATCTGCCCAACAACCATCTCACACAACAATA
 AATAGAGAAGAATCTGTTCAAACAAGTGATAATGTAGAAGATTACACGTATCAGATTTT
 GCTAATCTTAATAAAGAGAGTAACTGAAATCTGGTAAAGAGAGAACTATATAGAG
 CAACCTAATAAAGTAAAAGAGATTCAACAACAAGTCAGCCGCTGGCTATACAAATATA
 GATGAAAAAATTTCAAATCAAGATGAGTTATTAAATTTACCAATAAATGAATATGAAAAAT
 AAGGCTAGACCATTTATCTACAACATCTGCCCAACCATCGATTAAACGTGTAAACCGTAAAT
 CAATTAGCGGCGGAACAAGGTTCAATGTAAATTCATTAAATTAAGTTACTGATCAAAGT
 ATTACTGAAGGATATGATGATAGTGAAAGGTGTTATTAAGCACATGATGCTGAAAACCTTA
 ATCTATGATGTAACTTTGAAGTAGATGATAAGGTGAAATCTGGTGATACGATGACAGTG
 GATATAGATAAGAATACAGTTCCATCAGATTTAACCGATAGCTTTACAATACCAAAAAATA
 AAAGATAATTTGGAGAAATCATCGCTACAGGTACTTATGATAACAAAAATAAACAATC
 ACCTATATCTTTACAGATTATGTAGATAAGTATGAATAATTAAGCACACCTTAAATTA
 ACGTCATACATTGATAAATCAAAGGTTCCAAATAATAATACCAAGTTAGATGTAGAATAT
 AAAACGGCCCTTTTCATCAGTAAATAAACAATTACGGTTGAATATCAAAAGACCTAACGAA
 AATCGGACTGCTAACCTTCAAAGTATGTTTACAACATAGATACGAAAAATCATACAGTT
 GAGCAAAACGATTTATATTAACCTCTCTCGTTATTCAGCCAAGGAAACAAATGTAAATATT
 TCAGCGAATGGTGATGAAGGTTCAACAATTATAGACGATAGCACAAATAATTAAAGTTTAT
 AAGGTTGGAGATAATCAAAATTTACAGATAGTAACAGAAATTTATGATTACAGTGAATAT
 GAAGATGTCACAAATGATGATTATGCCCAATTAGGAATAATAATGATGTGAATATTAAT
 TTTGATAATATAGATTACCATATATTTAAAGTTATTAGTAAATATGACCTAATAAG
 GATGATTACAGACTATACAGCAAACTGTGACAAATGCAGACGACTATAAATGAGTATACT
 GGTGAGTTTAGAACAGCATCTATGATAATACAATTGCTTTCTCTACAAGTTCAAGTCAA
 GGACAAGGTGACTTGCCCTCTGAAAAAATCTATAAAATCGGAGATTACGTATGGGAAGAT
 GTAGATAAAGATGGTATTCAAAATACAAATGATAATGAAAAACCGCTTAGTAAATGTATTG
 GTAATTTGACGTATCTGATGGAATCTCAAAATCAGTCAGAACAGATGAAGATGGGAAA
 TATCAATTTGATGGATTGAAAAACGGATTGACTTATAAAATTACATTCGAAACACCTGAA
 GGATATACGCCGACGCTTAAACATTCAAGAACAAATCTGCACTAGACTCAGAAAGGTAAT
 TCTGTATGGGTAACTATTAATGGACAAGACGATATGACGATTGATAGTGGATTTTATCAA
 ACACCTAAATACAGCTTAGGGAACTATGTATGGTATGACACTAATAAAGATGGTATTCAA
 GGTGATGATGAAAAAGAAATCTCTGGAGTTAAAGTGACGTTAAAGATGAAAAACGAAAT
 ATCATTAGTACAATACAACCGATGAAAAATGGAAGTATCAATTTGATAATTTAAATAGT
 GGTAAATATATTGTTCAATTTTGATAAACCTTCAGGTATGACTCAACAACAACAGATTCT
 GGTGATGATGACGAACAGGATGCTGAAGGGAAGAGTTTATGTAACAATTACTGATCAT
 GATGACTTTAGTATAGATAACGATATCTATGATGACGAA

Fig. 3

Purificación de toxina alfa

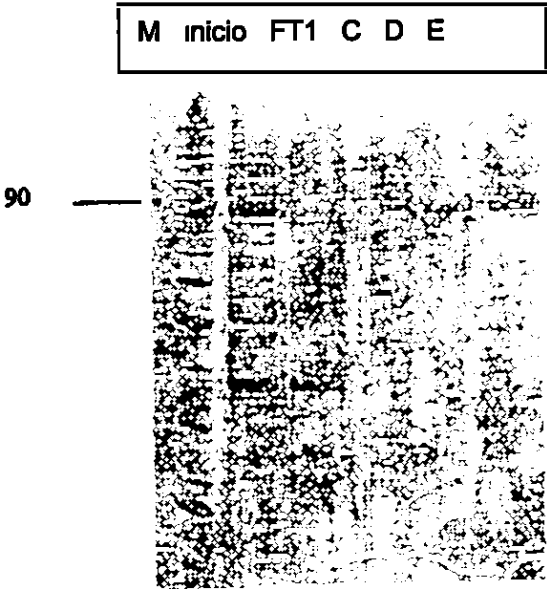


235

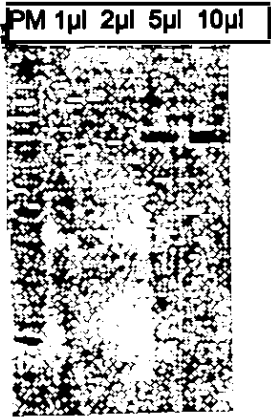
Fig. 4

Purificación de SdrC

A



B



237

Fig. 5.1

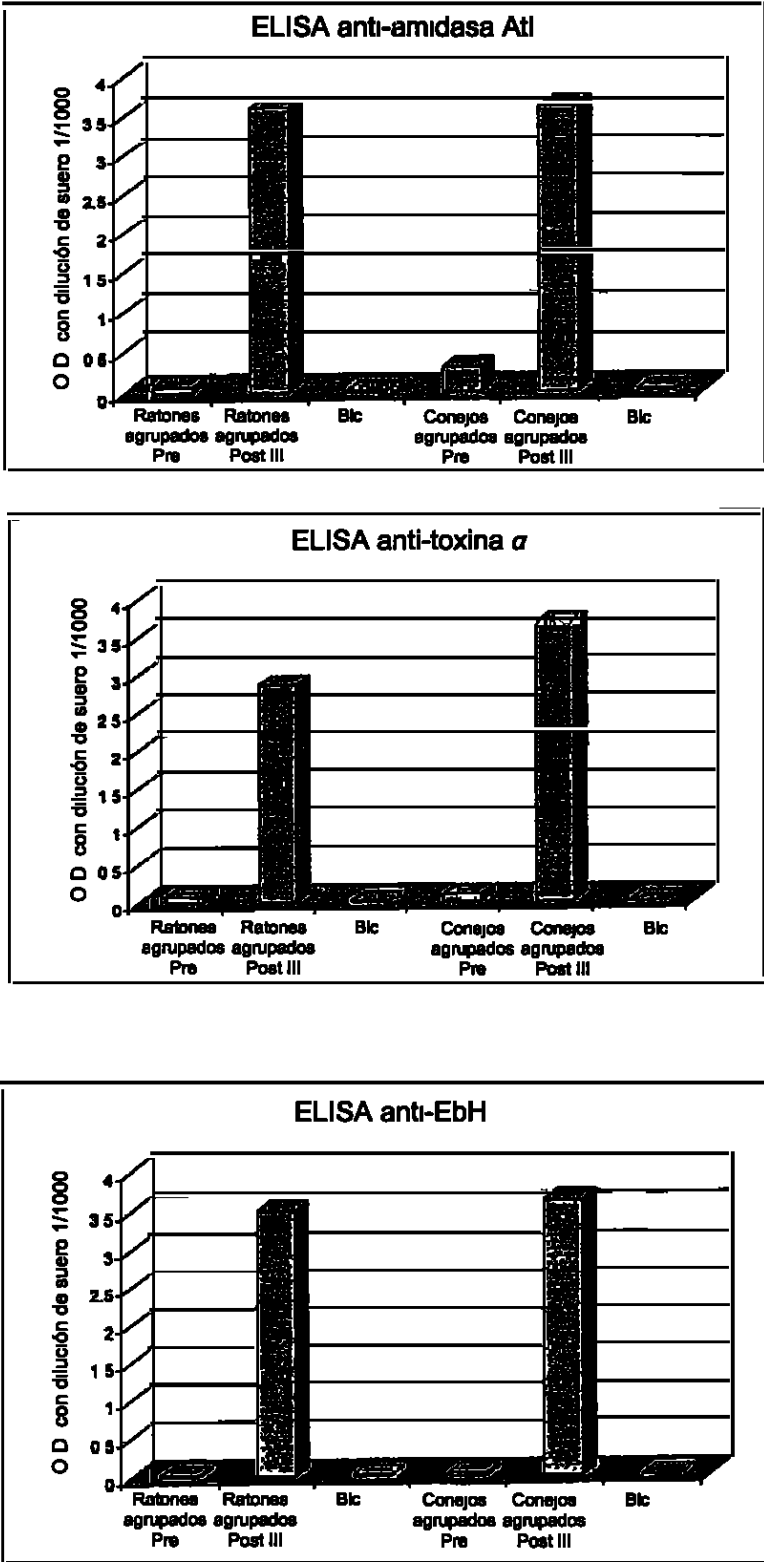
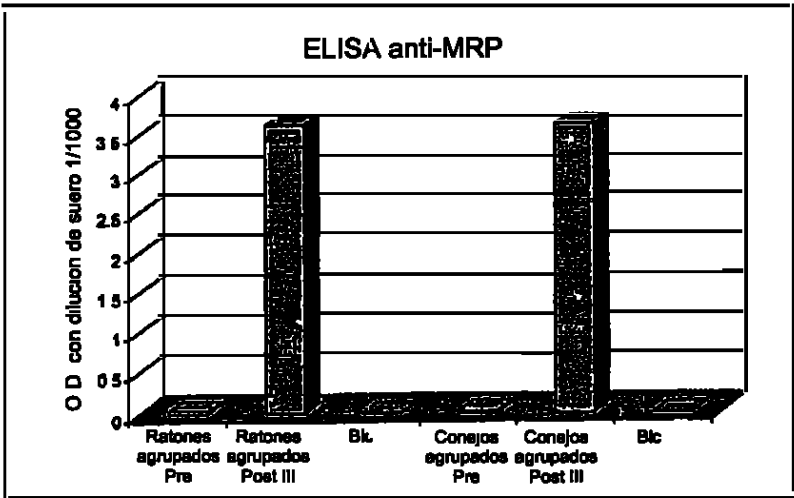
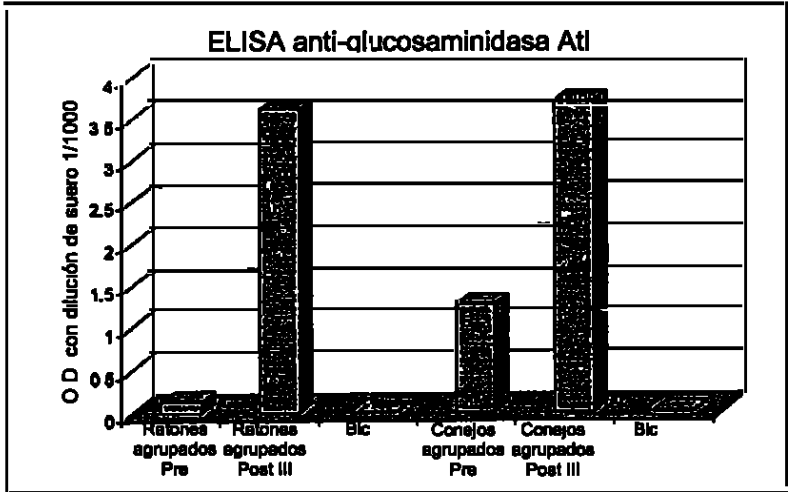
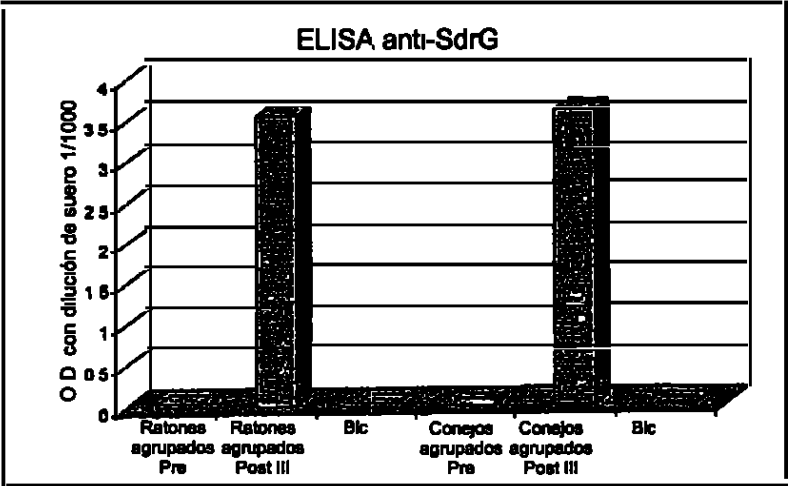


Fig. 5.2

237



238

Fig. 5.3

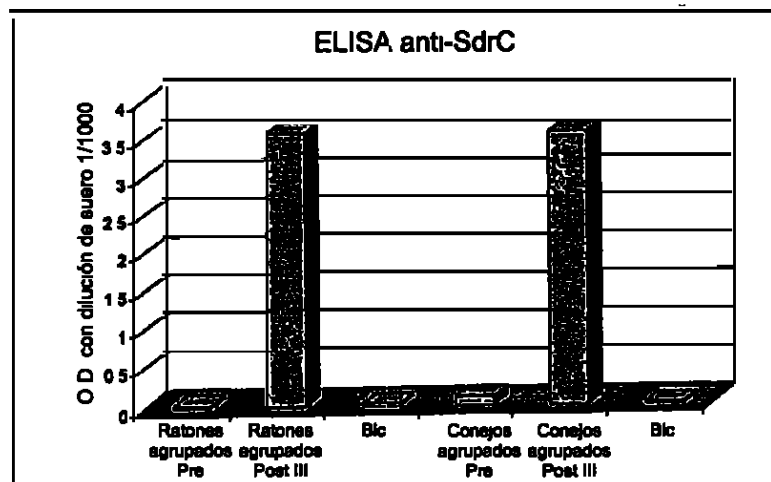
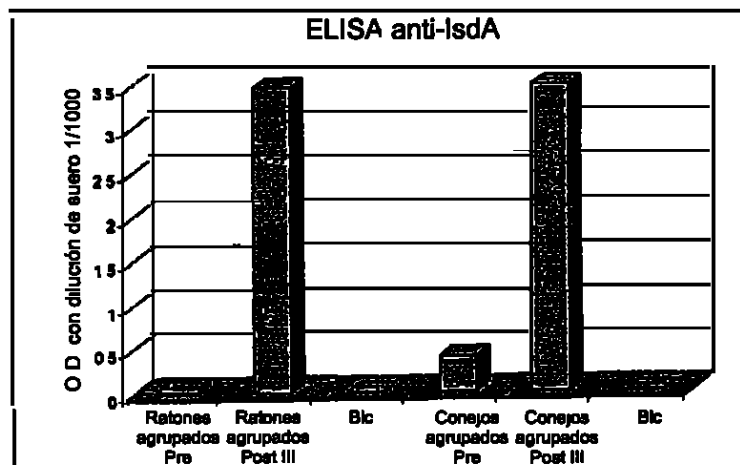
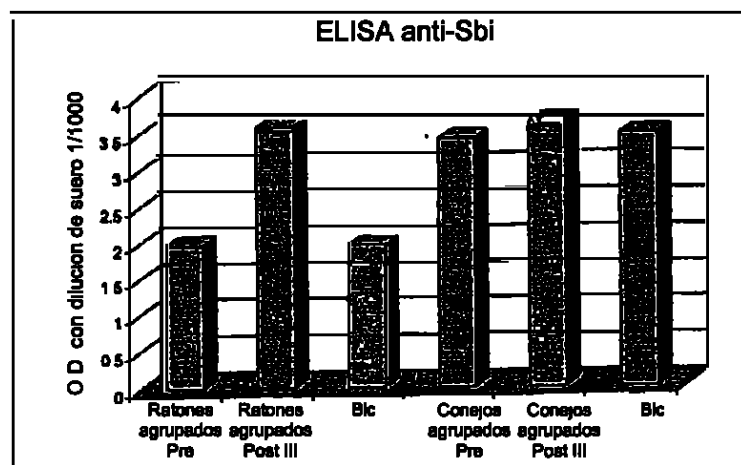


Fig. 5.4

239

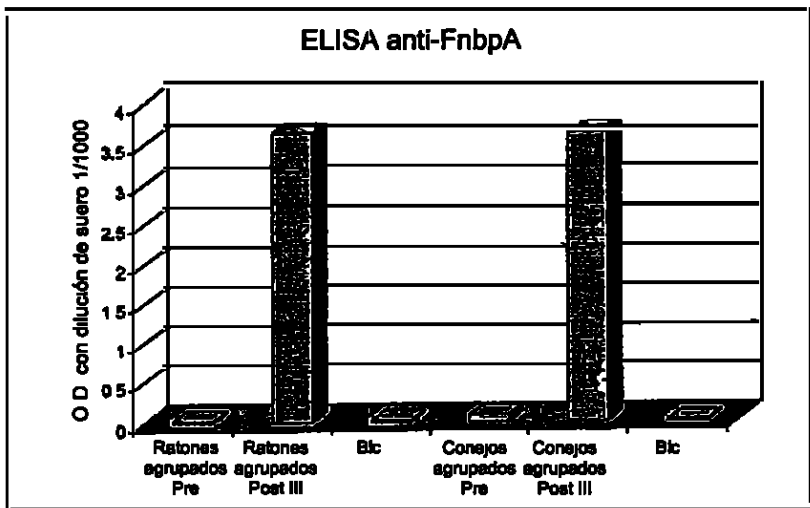
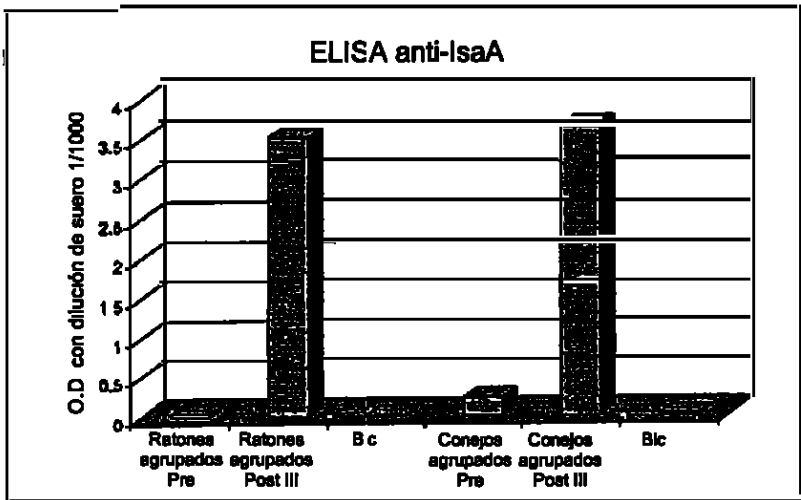
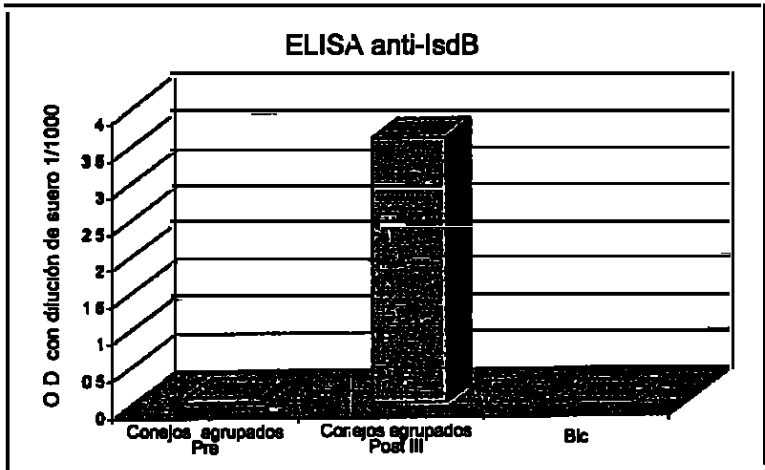
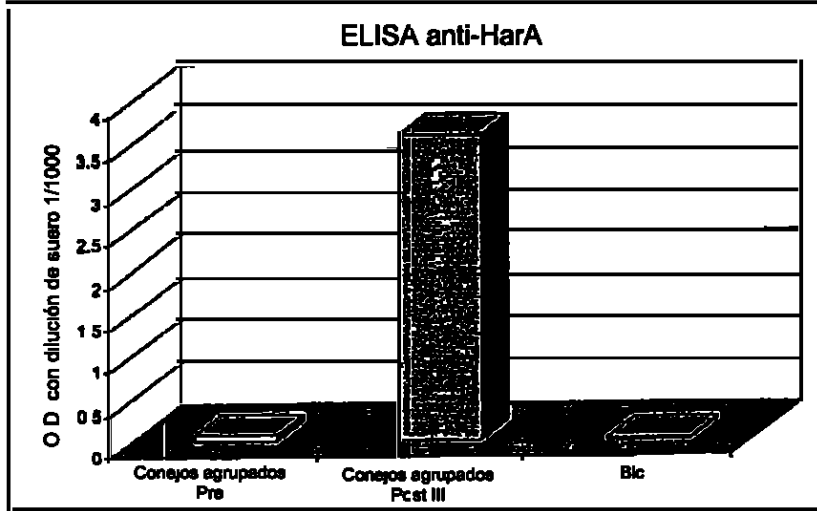
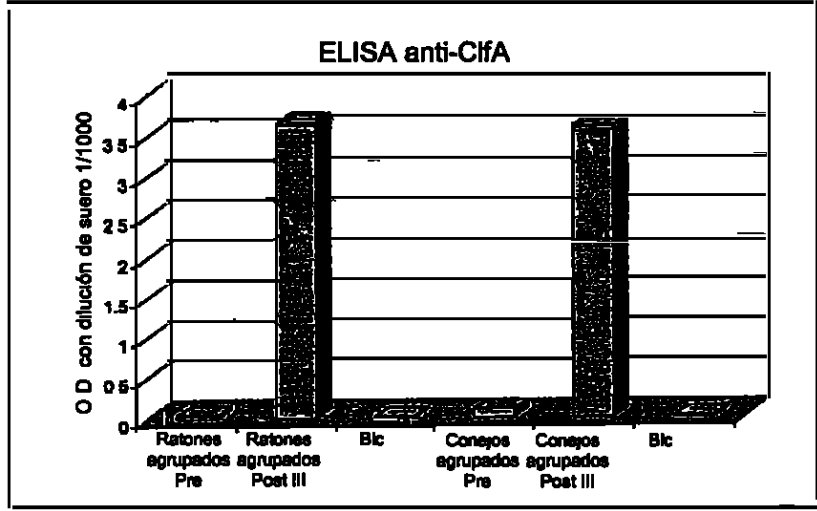
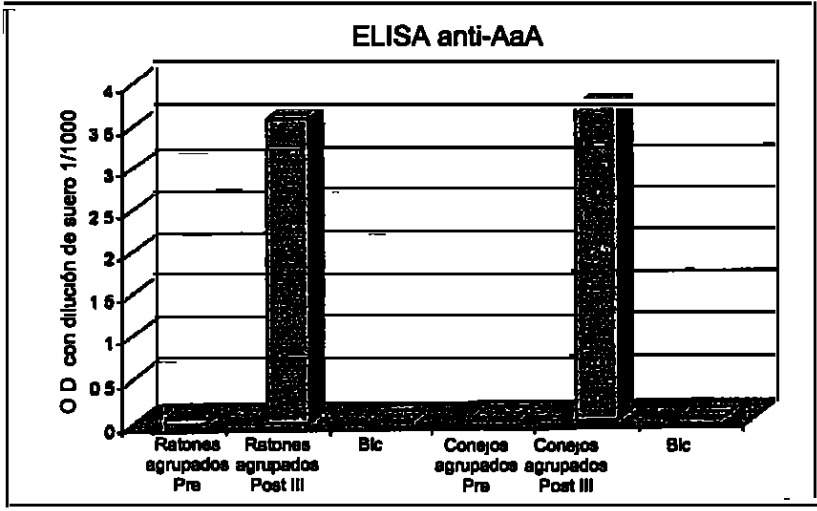


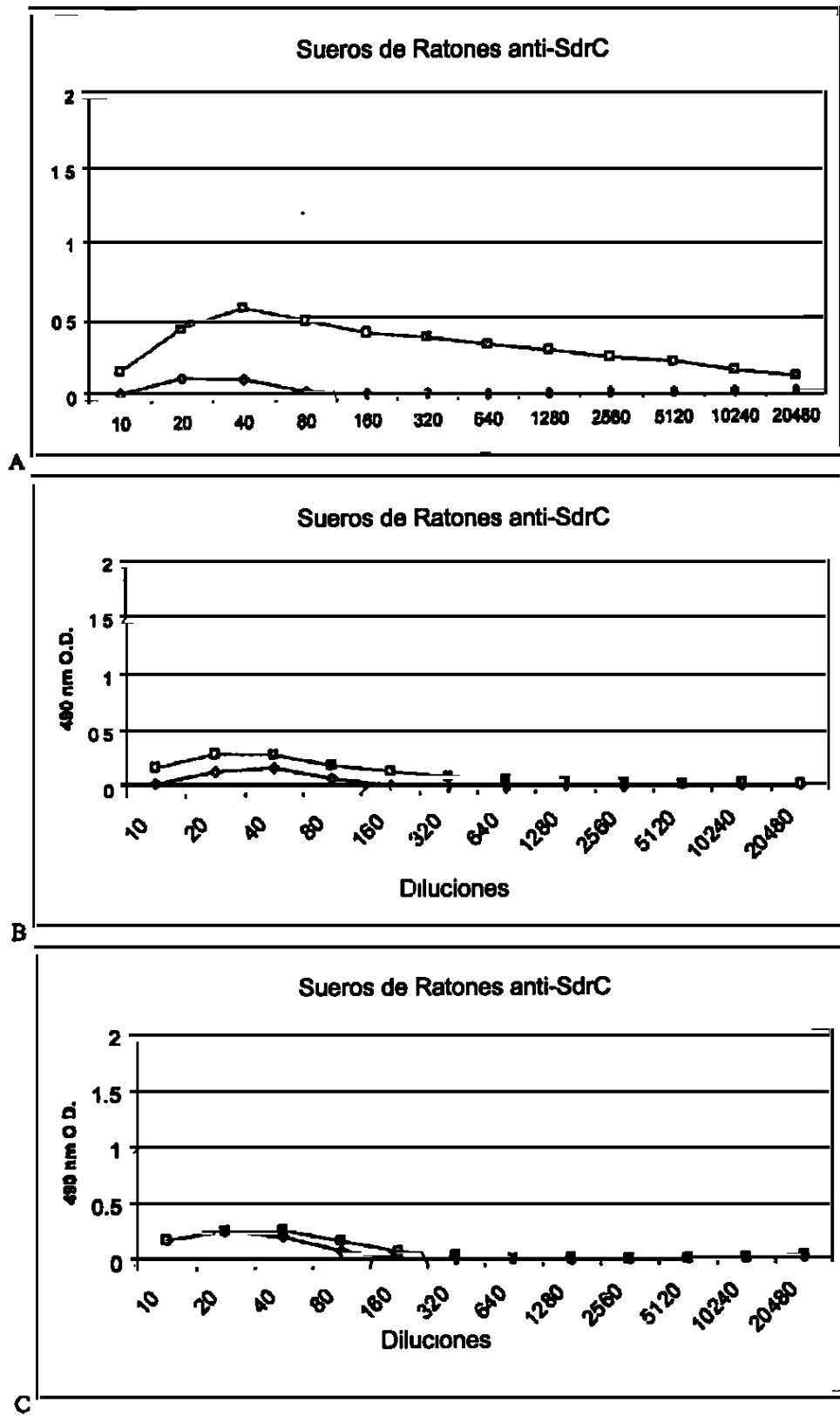
Fig. 5.5



842

241

Fig. 6.1



242

Fig. 6.2

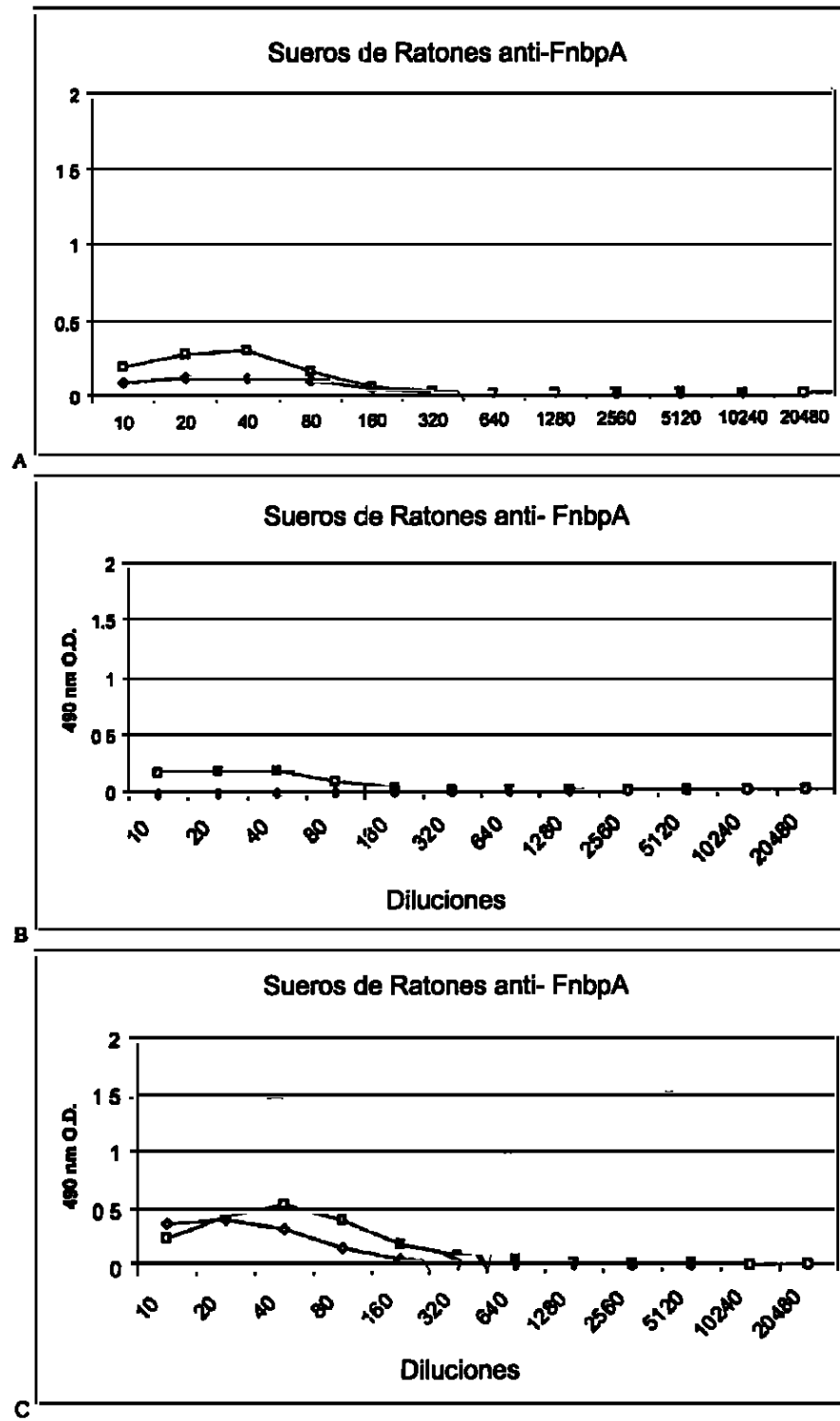


Fig. 6.3

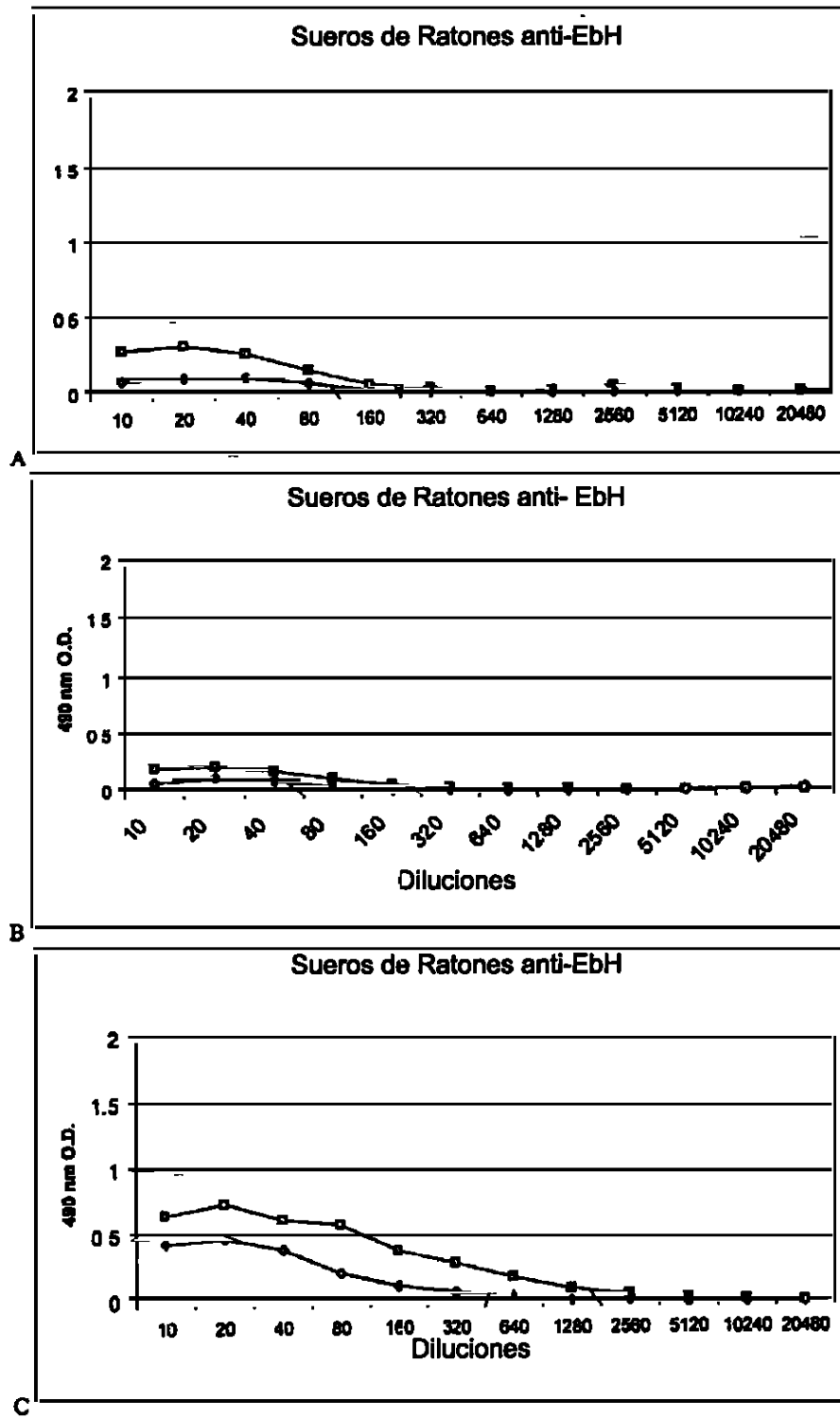
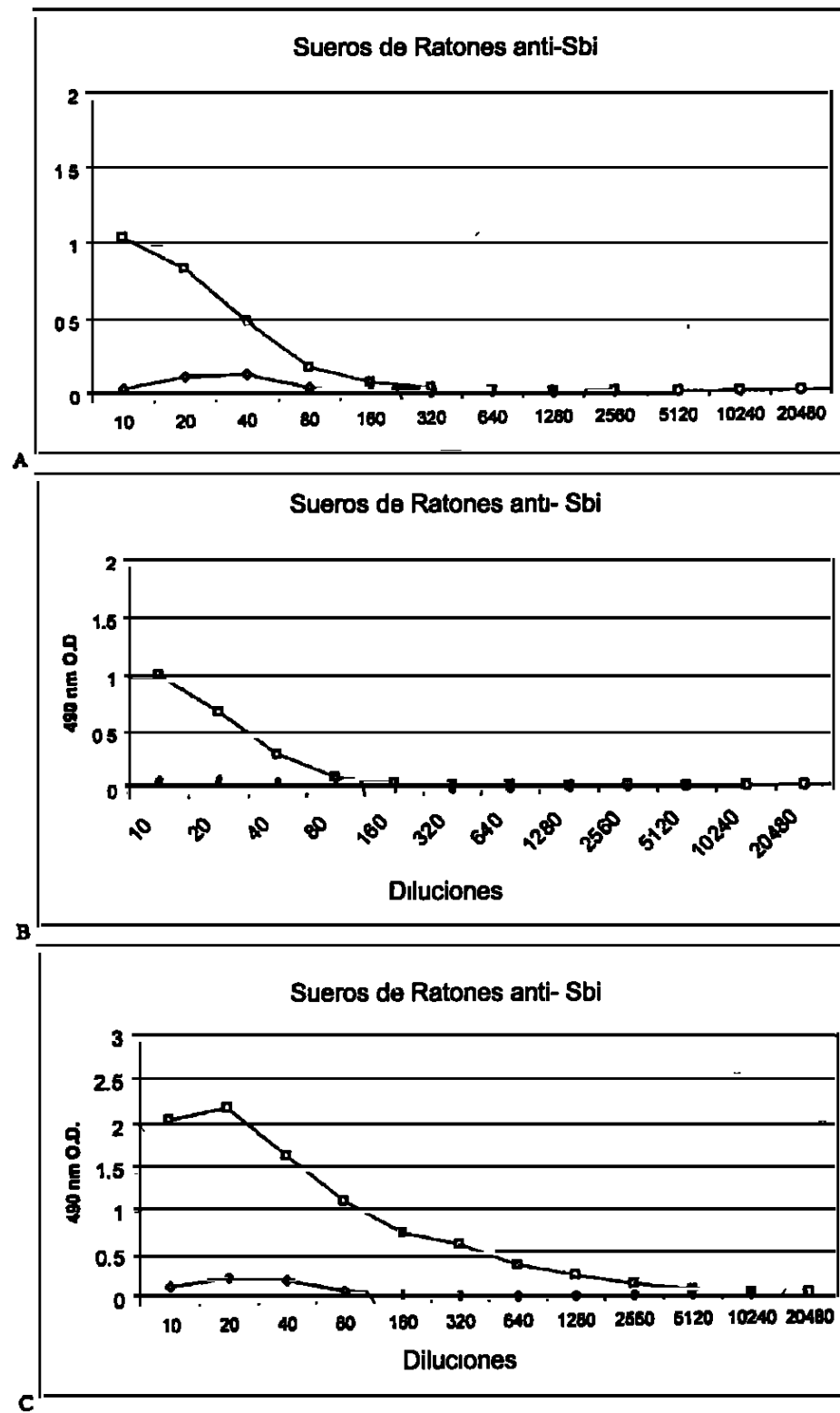
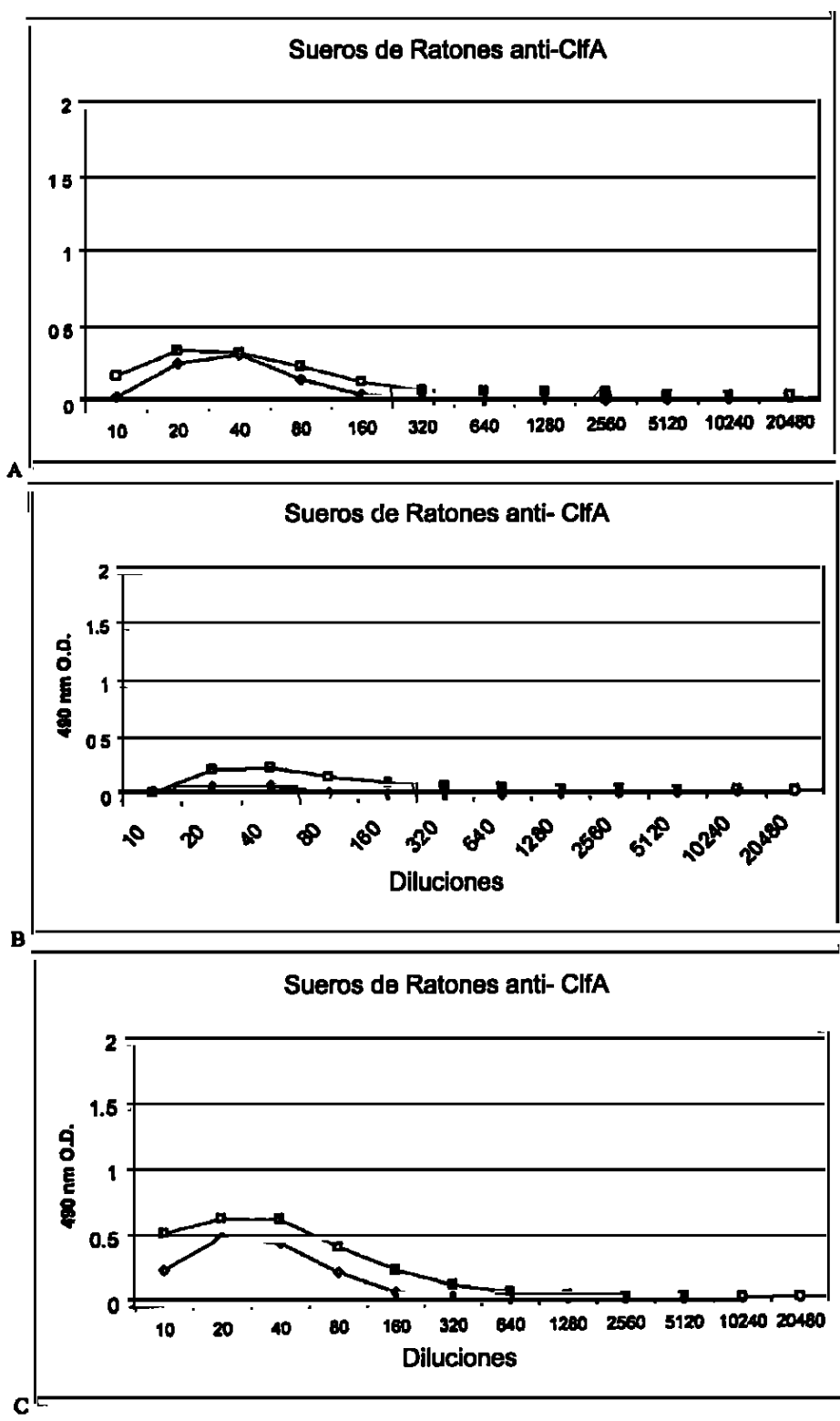


Fig. 6.4



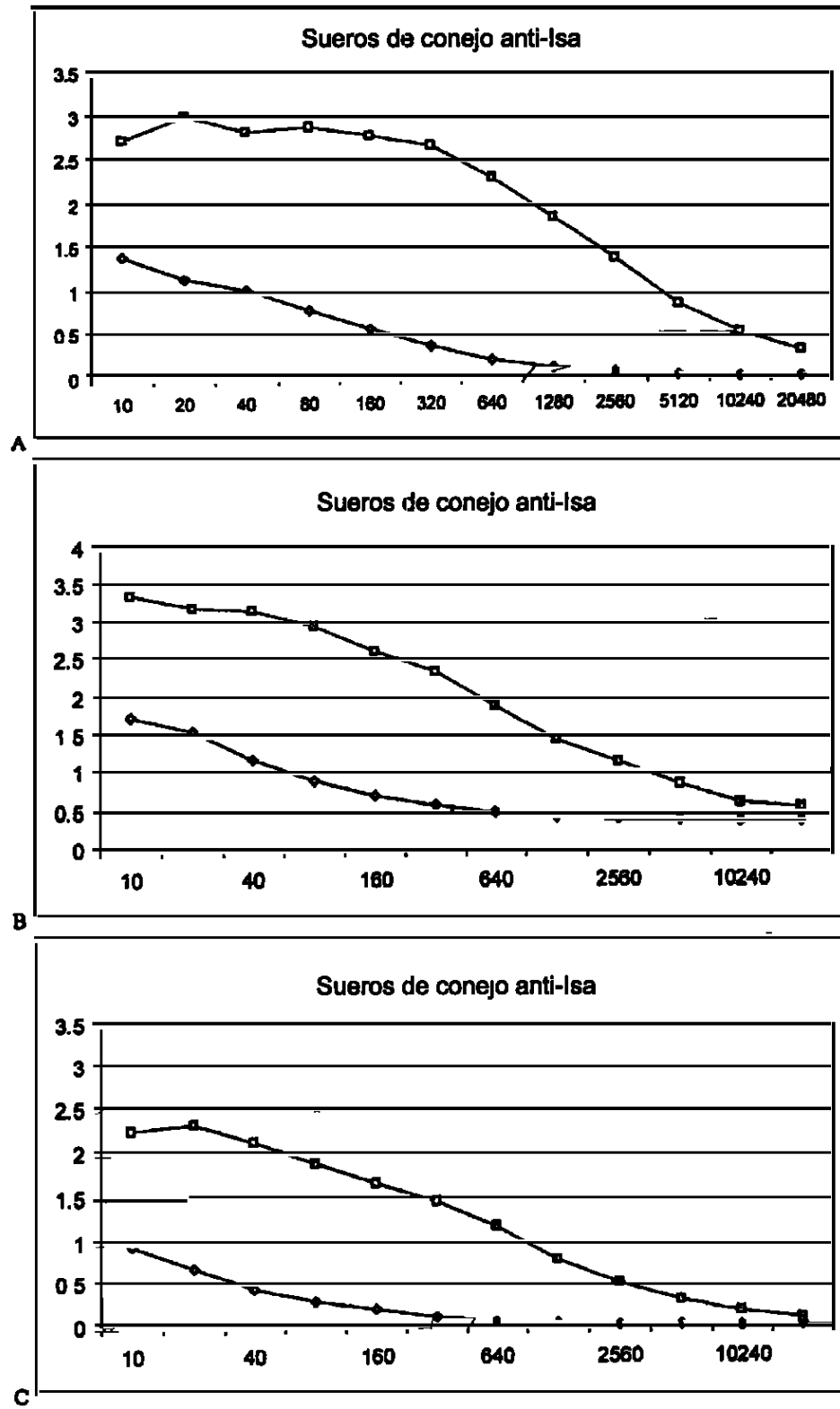
245

Fig. 6.5



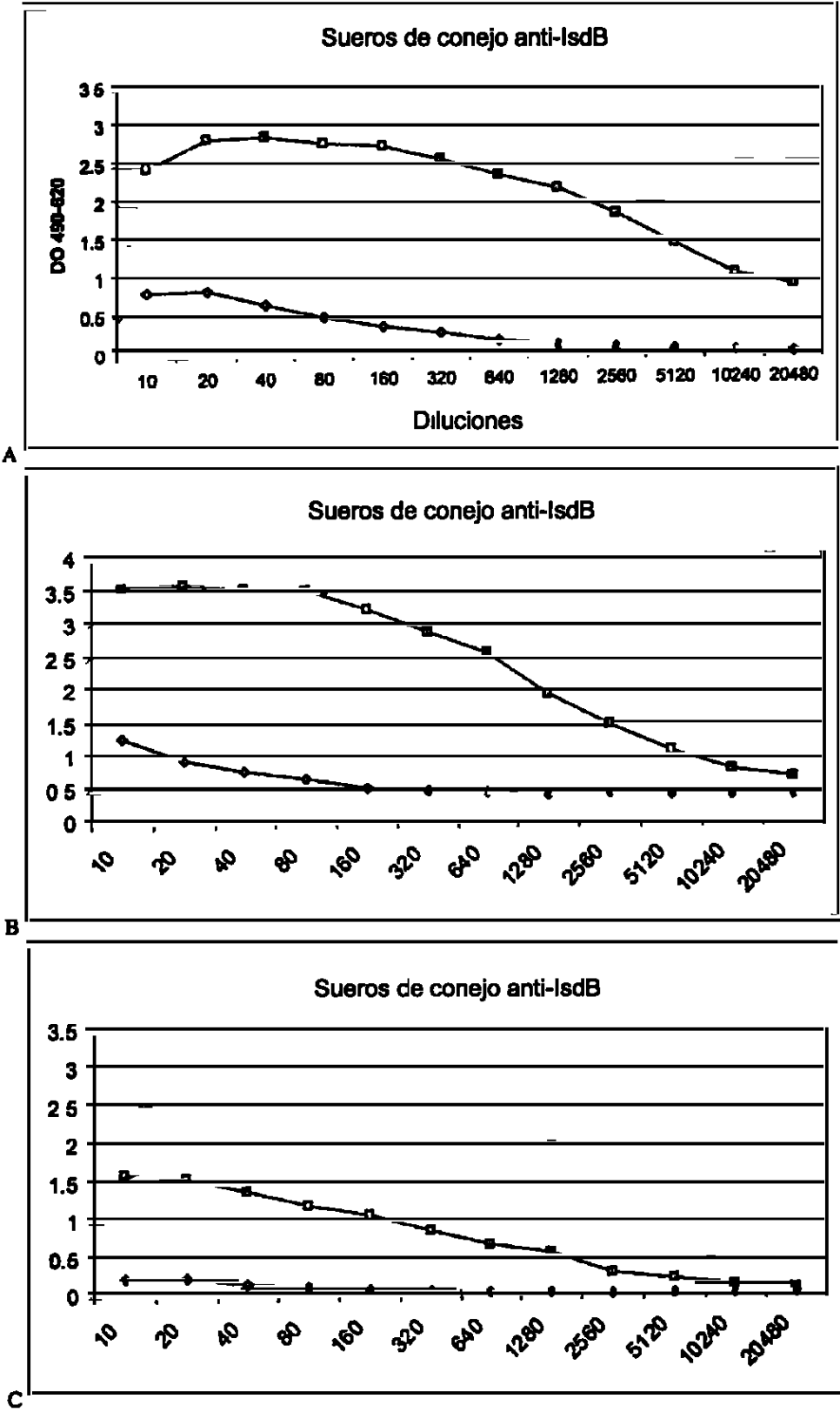
442

Fig. 7.1



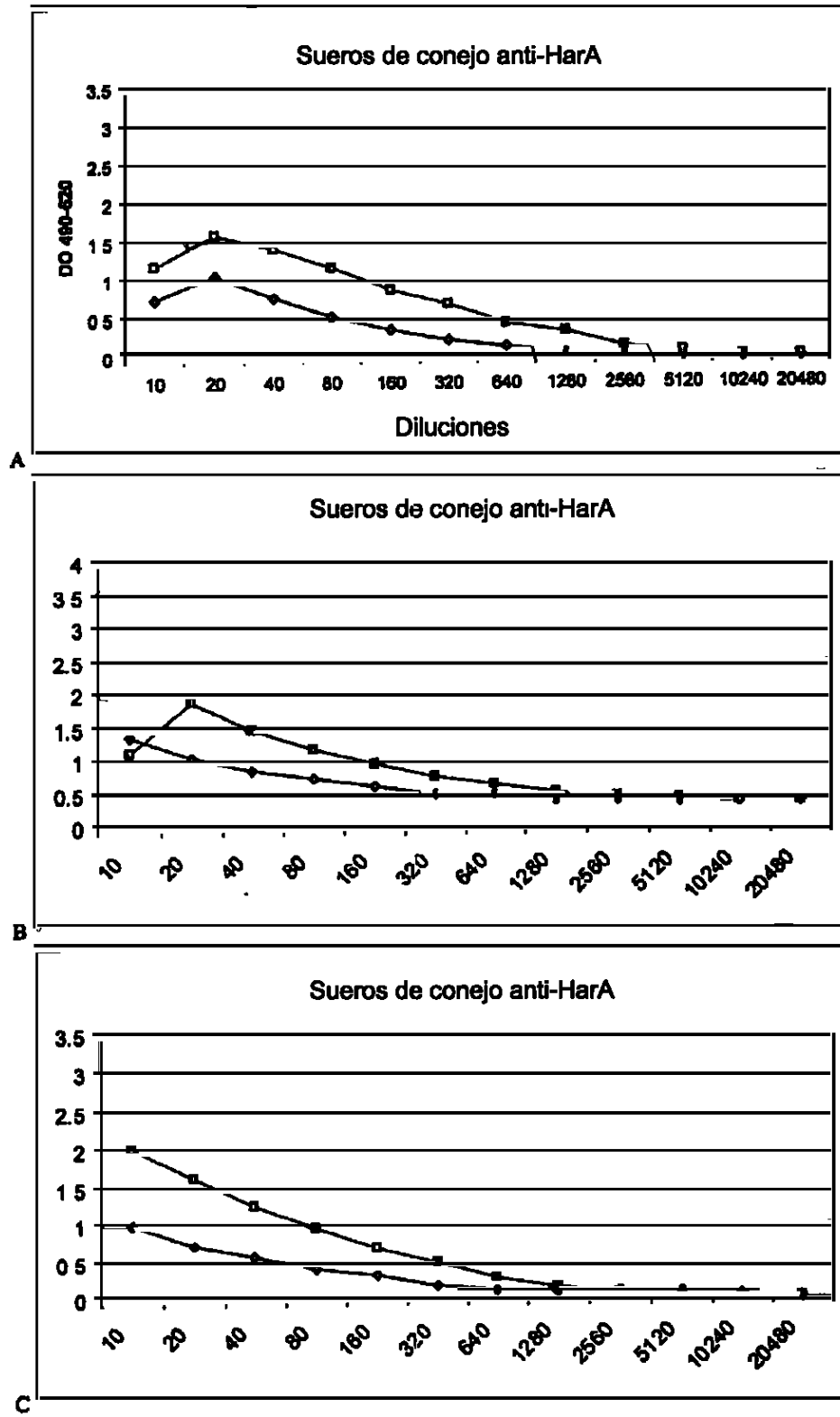
247

Fig. 7.2



242

Fig. 7.3



249

Fig. 7.4

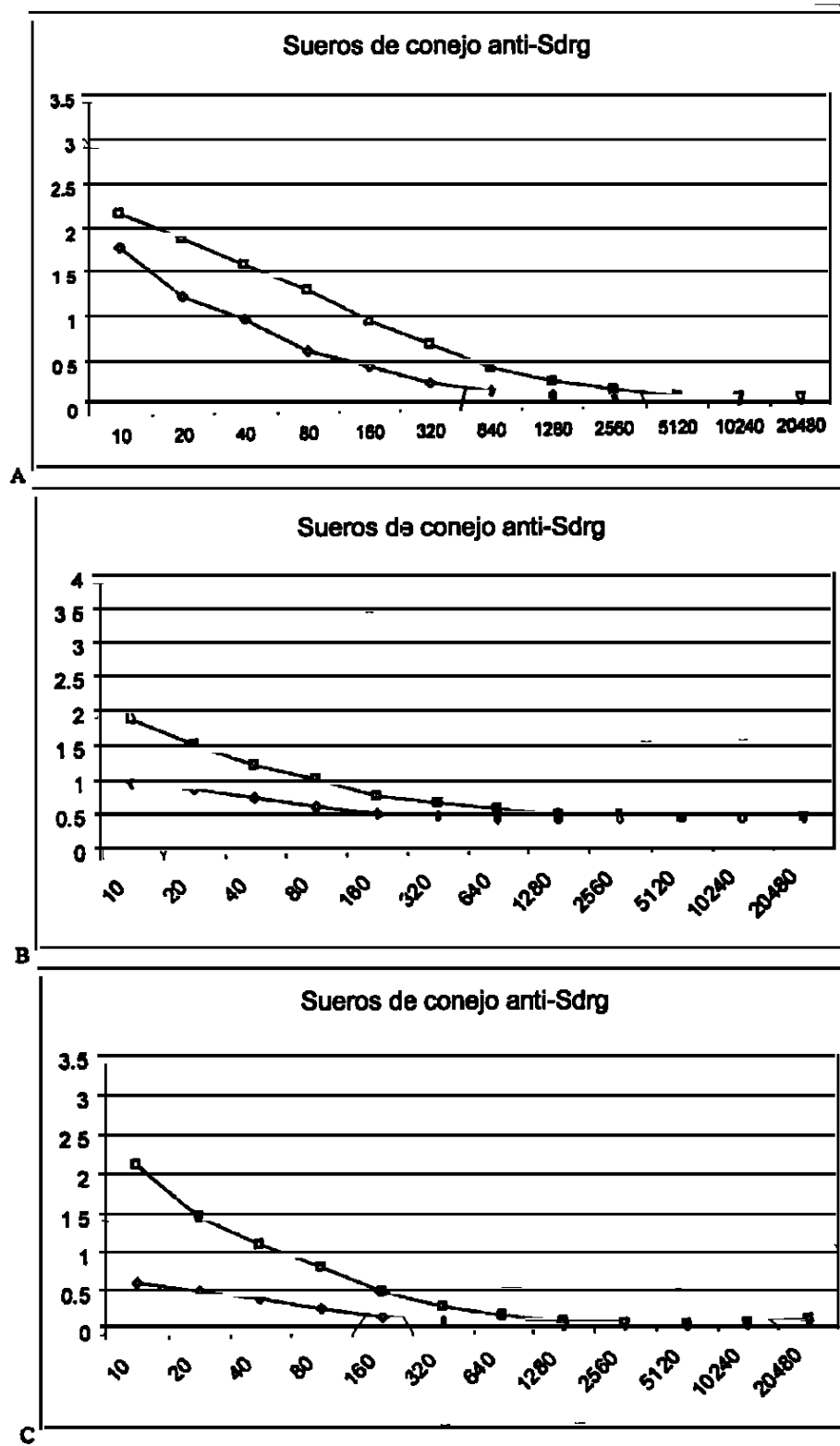


Fig. 7.5

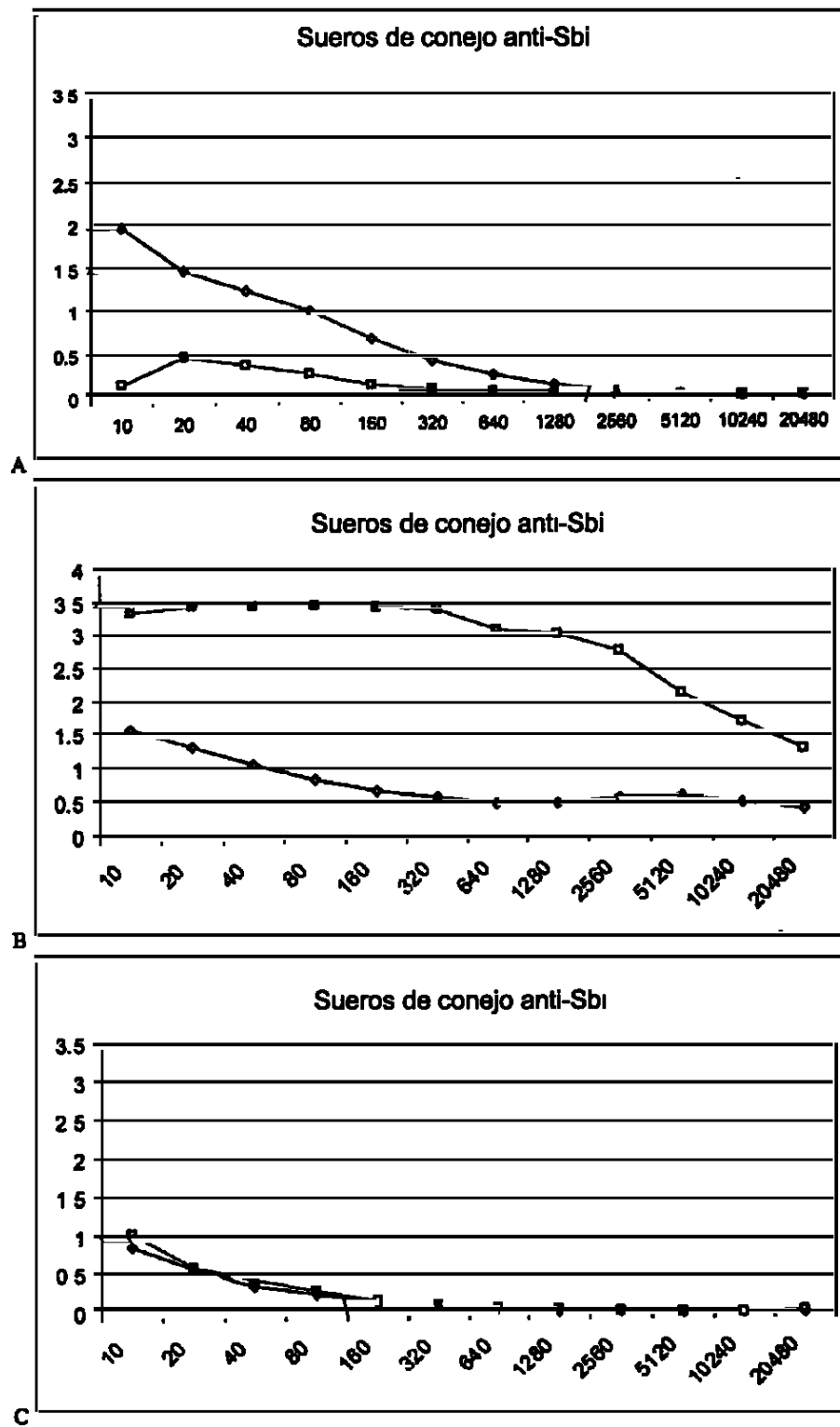
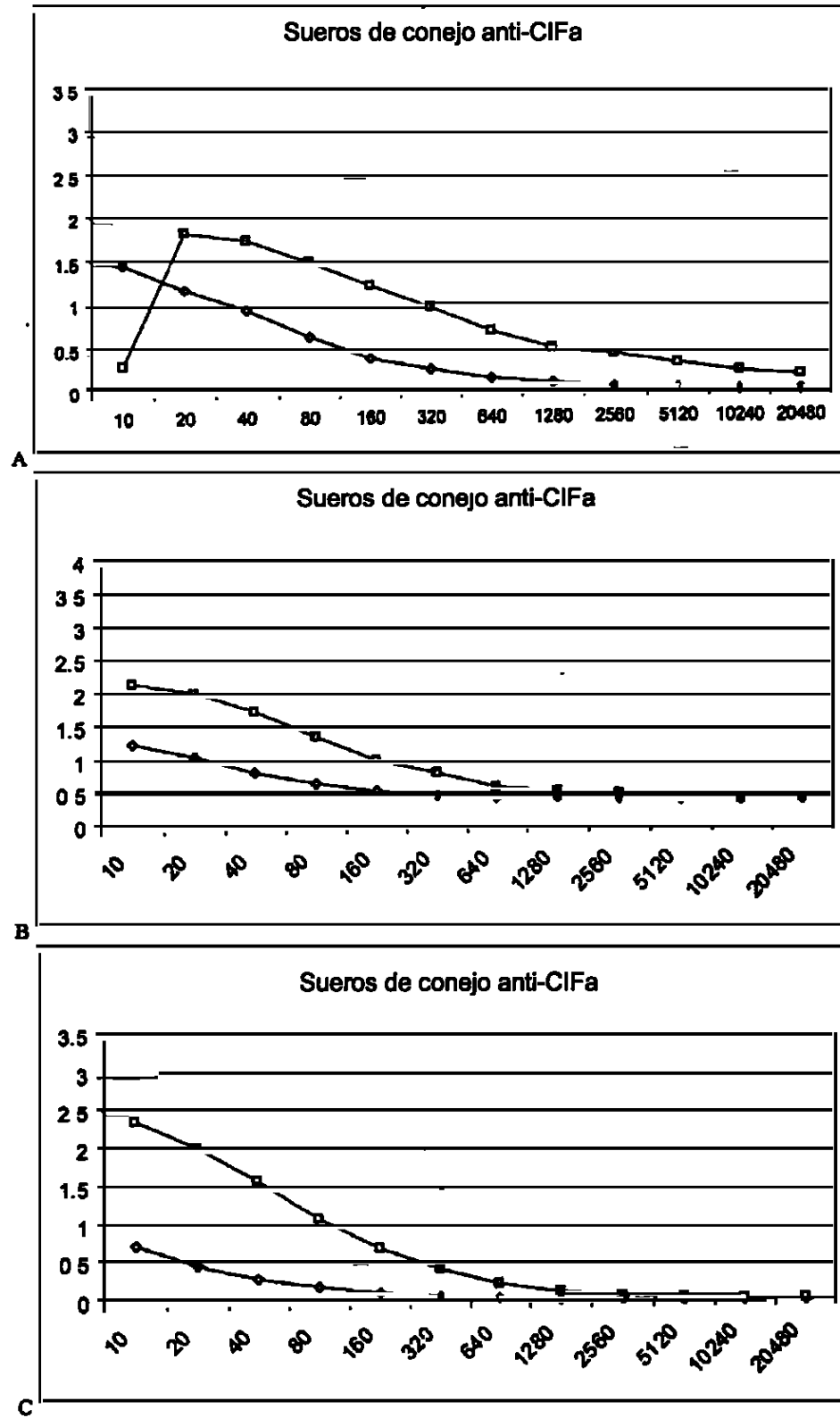


Fig. 7.6



252

Fig. 7.7

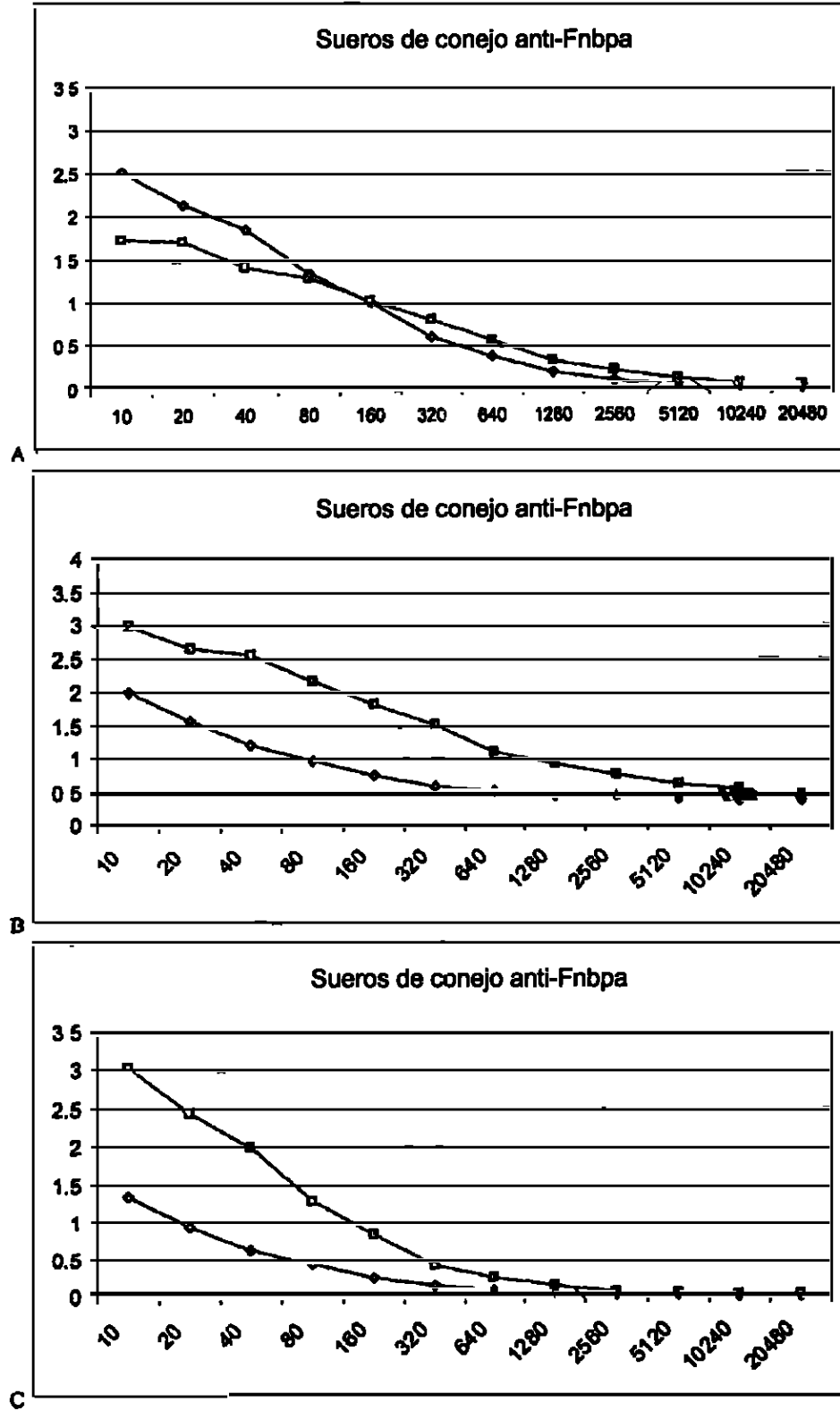


Fig. 7.8

