

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 556**

51 Int. Cl.:

A61K 39/102 (2006.01)

C07K 14/285 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2013** **PCT/US2013/069144**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014** **WO14074817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2013** **E 13853424 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018** **EP 2916863**

54 Título: **Vacunas de mannheimia haemolytica atenuadas y procedimientos de fabricación y uso**

30 Prioridad:

08.11.2012 US 201261723979 P

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

03.10.2018

73 Titular/es:

**MERIAL, INC. (100.0%)
3239 Satellite Boulevard
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

**BEY, RUSSELL F.;
LAWRENCE, PAULRAJ KIRUBAKARAN y
SIMONSON, RANDY R.**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 684 556 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas de mannheimia haemolytica atenuadas y procedimientos de fabricación y uso

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere en general a vacunas bacterianas atenuadas, en particular las que proporcionan una protección amplia, segura y eficaz a animales de producción contra las infecciones/enfermedades causadas por bacterias gram-negativas, incluyendo *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. La invención se refiere además a procedimientos de producción de las bacterias atenuadas y a procedimientos de PCR para diferenciar entre los serotipos A1 y A6 de *M. haemolytica*, in vivo.

[0002] La presente invención se refiere por tanto a composiciones inmunogénicas o de vacuna que comprenden las bacterias de la invención; por ejemplo, bacterias atenuadas vivas. Las bacterias también podrían inactivarse en las composiciones, pero puede ser ventajoso que las bacterias sean bacterias vivas atenuadas de *M. haemolytica*, ya sean solas, o en combinación con otras bacterias, tales como *Haemophilus Somnus* y/o *Pasteurella multocida*. También se describen en este documento procedimientos para preparar y/o formular tales composiciones; por ejemplo, cultivar o desarrollar o propagar las bacterias sobre o en medio adecuado, recolectar las bacterias, opcionalmente inactivar las bacterias y, opcionalmente, mezclar las bacterias con un portador, excipiente, diluyente o vehículo aceptables veterinaria o farmacéuticamente adecuados, y/o un adyuvante y/o estabilizador. Por lo tanto, también se describe en el presente documento el uso de bacterias en la formulación de tales composiciones.

25 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0003] *M. haemolytica* es una bacteria gram negativa que se encuentra normalmente en el tracto respiratorio superior de ganado, ovejas y ovejas salvajes sanos. *M. haemolytica* desciende en los pulmones cuando el ganado experimenta estrés, tal como el transporte, el destete, el hacinamiento, o infecciones virales y provoca bronconeumonía fibrinosa y necrotizante, un componente principal del complejo de la enfermedad respiratoria bovina (BRDC). Las pérdidas económicas debido a la BRDC en Norteamérica es de más de mil millones de dólares al año (Bowland y Shewen, 2000). *M. haemolytica* es la bacteria más comúnmente aislada de los pulmones de ganado afectado con BRDC. El serotipo A1 de *M. haemolytica* es responsable de aproximadamente el 60% de la fiebre del transporte, mientras que los serotipos A6 y A2 representan el 26% y el 7%, respectivamente (Al-Ghamdi et al, 2000; Purdy et al., 1997). Tanto A1 como A6 de *M. haemolytica* representan > 85% de los casos de BRDC que implican patógenos bacterianos.

[0004] Las vacunas disponibles actualmente en el mercado contra las infecciones por *M. haemolytica* son sólo moderadamente protectoras contra la fiebre de embarque de ganado vacuno, pero generalmente ineficaces contra la neumonía en terneros neonatales lecheros (Virtala et al, 1996; Rice et al, 2007). La causa principal de neumonía bacteriana grave en ganado lechero de engorde y neonatales es *M. haemolytica* serotipo A1 seguido de serotipo A6 (Schreuer et al., 2000, Rice et al., 2007).

[0005] La evaluación experimental de todas las vacunas comerciales de *M. haemolytica* A1 utilizadas en ganado de engorde mostró sólo una protección parcial en el 50% de los estudios (Perino y Hunsaker, 1997). Además, la protección cruzada contra los serotipos de *M. haemolytica* (ya sea A6 o A2) ha sido difícil de lograr con preparaciones de vacuna convencionales (Purdy et al, 1993; Sabri et al, 2000). Por lo tanto, una vacuna eficaz contra serotipos A1 y A6 de *M. haemolytica* podría mejorar significativamente la producción de leche/carne.

[0006] La inmunidad efectiva contra *M. haemolytica* es multifacética. Son necesarios anticuerpos neutralizantes contra la leucotoxina exotoxina A (LktA) y antígenos de superficie para la inmunidad protectora contra *M. haemolytica* (Shewen y Wilkie, 1988). Debido a la maquinaria genética compleja involucrada en el control de la expresión de diversos factores de virulencia de *M. haemolytica*, los antígenos de superficie específicos que son importantes en la estimulación de la inmunidad no se han determinado claramente (Lawrence et al, 2010). Sin embargo, las proteínas de membrana externa (OMP) de *M. haemolytica* se han implicado en la estimulación de la inmunidad contra los antígenos de superficie (Confer et al, 2003, Morton et al, 1995; Potter et al., 1999).

[0007] La inmunización intranasal de ganado se ha perseguido durante un tiempo utilizando virus de herpes bovino 1 (BoHV-1), virus respiratorio sincitial bovino (BRSV) y virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) (Ellis et al, 2007; Muylkens et al., 2007). INFORCE 3 de Pfizer disponible comercialmente cuando se administra por vía intranasal afirma evitar BRSV y también ayuda en la prevención de la enfermedad respiratoria causada por el virus de IBR y parainfluenza bovina de tipo 3 (PI3). En un estudio experimental cuando se administró un mutante de *M. haemolytica* carente de leucotoxina viva modificada por vía intranasal en terneros de engorde para carne destetados, dio lugar a la reducción de la colonización nasofaríngea con *M. haemolytica* de tipo natural en comparación con terneros de control no vacunados (Frank et al., 2003). Aunque la vacunación intranasal y *M. haemolytica* deficiente en leucotoxina son conocidos, los inventores no son conscientes de ninguna vacuna de *M.*

haemolytica que combine con éxito estos conceptos. WO 99/15670 A1 describe *M. haemolytica* serotipo A1, atenuada por una delección en el gen *lktA*.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

[0008] La presente invención proporciona una vacuna para provocar una respuesta inmunogénica en un animal, comprendiendo la vacuna bacterias que contienen una mutación atenuante en un gen, en el que la mutación modifica la expresión y/o la actividad biológica de un polipéptido o proteína codificada por el gen, dando como resultado una virulencia atenuada de la bacteria, en la que la mutación es una delección en marco que da lugar a las bacterias que segregan una leucotoxina truncada (*LktA*), además en la que las bacterias son *Mannheimia haemolytica* serotipos A1 y A6, además en la que la delección está dentro del locus del gen de *LktCA* que codifica acilasa (*LktC*) y leucotoxina A (*LktA*), además en la que la secuencia de aminoácidos de la forma truncada secretada de *LktA* consiste en la secuencia codificada por la SEQ ID NO: 16 o 17.

[0009] La presente invención también proporciona una vacuna de la invención para su uso en la vacunación de un animal contra las enfermedades causadas por *M. haemolytica*, en la que la vacuna se administra al menos una vez.

[0010] Un objeto de la presente descripción es proporcionar vacunas eficaces que comprenden *M. haemolytica* atenuada de serotipos A1 y A6. En relación a una cepa parental de *M. haemolytica* serotipo A1 o A6, las cepas atenuadas pueden tener modificaciones genómicas, incluyendo delecciones, sustituciones y adiciones, y cuya presencia (o ausencia) está asociada con una virulencia reducida. En una realización, una *M. haemolytica* de tipo natural (serotipo A1 D153) puede modificarse para contener una delección parcial de genes del locus genómico de leucotoxina CA (*lktCA*), dando lugar a una bacteria atenuada, que secreta una forma truncada, no citotóxica, de la proteína *LktA*. Las vacunas idealmente proporcionan inmunidad protectora segura, eficaz y amplia.

[0011] Otro objeto de la descripción es proporcionar vacunas multivalentes, que comprenden la *M. haemolytica* atenuada en combinación con otras bacterias, incluyendo *P. multocida*, *M. haemolytica* serotipo A6, y *Haemophilus somnus* (H. Somni). Por lo tanto, la invención abarca una vacuna de 4 vías no virulenta viva modificada útil contra la enfermedad respiratoria bovina.

[0012] Se describen en el presente documento procedimientos para el tratamiento y la profilaxis de la infección por la enfermedad respiratoria bovina, que comprende las etapas de administrar cantidades eficaces de las vacunas de la invención a los animales bovinos susceptibles.

[0013] En una realización, las vacunas atenuadas comprenden además un adyuvante. El adyuvante puede ser cualquier sustancia que aumenta y/o incrementa la respuesta inmunitaria provocada, en comparación con la vacuna atenuada sola. Los adyuvantes de la mucosa, incluyendo quitosanos y derivados de los mismos, son particularmente útiles para las vacunas atenuadas orales descritas.

[0014] Se describen en el presente documento procedimientos para inducir una respuesta inmunológica (o inmunogénica) o protectora contra *M. haemolytica*, así como procedimientos para la prevención o tratamiento de *M. haemolytica*, o estado o estados patológicos causados por *M. haemolytica*, que comprende administrar las bacterias atenuadas, o una composición que comprende las bacterias atenuadas a los animales en necesidad del mismo.

[0015] Además, la descripción proporciona procedimientos de PCR y reactivos útiles para el diagnóstico y/o discriminar entre los serotipos A1 y A6 de *M. haemolytica*. El análisis comparativo de secuencias genómicas, que se describe más adelante, reveló genes específicos de A1 y A6 que proporcionan la base para los procedimientos y reactivos proporcionados en esta descripción.

[0016] También se proporcionan kits que comprenden al menos la cepa de *M. haemolytica* atenuada e instrucciones de uso.

[0017] Estas y otras realizaciones se describen o son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y están abarcadas por la misma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0018] Una descripción completa y propicia de la presente invención, incluyendo el mejor modo de la misma, para un experto en la técnica, se expone más particularmente en el resto de la memoria descriptiva, incluyendo la referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 presenta el esquema utilizado para producir el plásmido pCT109GA189Δ*lktCA*-Kan (plásmido de sustitución). El producto final para la fabricación de vacunas incorporaba un sitio de unión al ribosoma de consenso (AGGAGG, rbs) en dirección 5' del codón de inicio que sustituyó al rbs pobre en *lktC* y aumentó la expresión de leucotoxina. El gen de *lktA* nativo, eliminado en la cepa de la vacuna, utiliza un rbs fuerte (AGGAGA). Para este producto, se utilizó el cebador *lktRBSr* en lugar del cebador *lktCA*delr. El sitio de consenso está subrayado; la figura 2 ilustra la integración del plásmido de sustitución en el genoma bacteriano;

la figura 3 representa la resolución/escisión del plásmido de sustitución, suprimiendo sólo la secuencia Δ lktCA deseada, integrada de manera estable en el genoma bacteriano, y que codifica la proteína LktA truncada; figura 4A. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR del operón LktCABD de *M. haemolytica* que muestran LktCA truncada (carril 2) y LktCA de tipo natural (carril 3);
 5 figura 4B. Análisis de transferencia Western de LktA truncada expresada por cepa de vacuna de *M. haemolytica* D153 Δ -1-PKL. Carriles: 1- marcador; 2- 5 μ l de sobrenadante de cultivo que contiene LktA truncada (* = 27 kDa, *M. haemolytica* D153 Δ -1-PKL); 3- 5 μ l de sobrenadante de cultivo que contiene LktA de tipo natural (* = 102 kDa, *M. haemolytica*, cepa parental D153);
 10 la figura 5 es un diagrama de Venn que representa los genes únicos y superpuestos presentes en cinco aislados de *M. haemolytica*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0019] La presente invención se refiere a una vacuna o composición de *M. haemolytica* que puede comprender una cepa de *M. haemolytica* atenuada y un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable, que provoca, induce o estimula una respuesta en un animal.

[0020] Con el fin de desarrollar una vacuna de *M. haemolytica* intranasal eficaz, que protege los animales bovinos contra los serogrupos A1/A6, los inventores utilizaron *M. haemolytica* que tiene un gen de LktA parcialmente eliminado. Esta bacteria no causa citolisis, pero es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes. Antes de la presente descripción, no se sabía si la administración intranasal (o la administración por cualquier vía) provocaría en animales bovinos una respuesta inmunitaria protectora.

[0021] Aunque existen procedimientos serológicos para distinguir *M. haemolytica* A1 y A6, estos procedimientos no son siempre fiables y desarrollar antisueros fuertes contra A6 es particularmente difícil. Para superar este problema, los inventores secuenciaron ambos genomas de A1 y A6, realizaron un análisis genómico comparativo y desarrollaron un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) para distinguir entre los aislados de campo A1 y A6 y para realizar un seguimiento de nuestra combinación de vacuna intranasal (*M. haemolytica*, *M. somnus* y *P. multocida*).

[0022] De este modo, una realización de esta descripción proporciona procedimientos RT-QPCR útiles, que permiten al menos las siguientes actividades: a) identificación de aislados de campo de *M. haemolytica* A1 y A6 rápidamente y el cribado de una gran número de colonias; b) seguimiento de la vacunación/colonización de A1 y A6 en las cavidades nasales; c) eliminación de la necesidad de desarrollo de antisueros de título elevado; y d) el desarrollo de kits rápidos y automatizados de pruebas de diagnóstico.

[0023] La presente invención se refiere además a cepas de *M. haemolytica* atenuadas que tienen una delección en al menos un gen de virulencia. La supresión se encuentra dentro de LktCA, un locus que codifica una enzima acilasa (LktC) y leucotoxina A (LktA), la citotoxina líder. Esta delección se puede amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se puede detectar la secreción de una LktA truncada en una transferencia Western para determinar si la bacteria es el mutante o de tipo natural.

[0024] La delección de la secuencia o secuencias genómicas de bacterias parentales virulentas para producir bacterias mutantes avirulentas atenuadas se logra a través una actividad inventiva nueva y no obvia. Dichas bacterias mutantes, también denominadas aquí como microorganismos vivos modificados (MLM), son útiles para la producción de composiciones inmunogénicas o vacunas que tienen un alto grado de inmunogenicidad y un bajo (o inexistente) grado de patogenicidad.

[0025] Estos mutantes también son útiles como vectores que pueden ser útiles para la expresión in vitro de productos de expresión, así como para la reproducción o replicación de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, la replicación del ADN), y para productos de expresión in vivo.

[0026] Ingeniería de las mutaciones de delección proporciona secuencias de nucleótidos y genes nuevos y no obvios, así como productos génicos nuevos y no obvios codificados por las secuencias de nucleótidos y genes. Dichos productos génicos proporcionan antígenos, inmunógenos y epítomos, y son útiles como productos génicos aislados. Dichos productos génicos aislados, así como epítomos de los mismos, también son útiles para generar anticuerpos, que son útiles en aplicaciones de diagnóstico.

[0027] Dichos productos génicos, que pueden proporcionar o generar epítomos, antígenos o inmunógenos, también son útiles para composiciones inmunogénicas o inmunológicas, así como vacunas.

[0028] En un aspecto, la presente invención se refiere a bacterias que contienen una mutación atenuante en una secuencia de nucleótidos o un gen en el que la mutación modifica, reduce o suprime la expresión y/o la actividad biológica de un polipéptido o proteína codificada por un gen, dando como resultado una virulencia atenuada de la bacteria. La mutación es una delección en el marco que da lugar a que la bacteria secreta una leucotoxina

truncada. En una realización particular, la leucotoxina truncada migra a aproximadamente 27 kD en un gel de SDS típico.

[0029] La atenuación reduce o suprime la patogenicidad de las bacterias y la gravedad de los signos clínicos o lesiones, disminuye la tasa de crecimiento de las bacterias y evita la muerte de las bacterias.

[0030] En particular, la presente invención abarca vacunas que comprenden cepas de *M. haemolytica* atenuadas, que provocan una respuesta inmunogénica en un animal, en particular las cepas de *M. haemolytica* atenuadas que provocan, inducen o estimulan una respuesta en un animal bovino.

[0031] Las cepas particulares de *M. haemolytica* atenuadas de interés tienen mutaciones en genes, con relación a la cepa parental virulenta de tipo natural, que están asociados con la virulencia. Se reconoce que, además de cepas que tienen las mutaciones descritas, se describen en este documento cepas atenuadas que tengan cualquier número de mutaciones en los genes de virulencia descritos.

[0032] En otro aspecto, las cepas de *M. haemolytica* atenuadas nuevas se formulan en una vacuna segura, eficaz contra *M. haemolytica* y las infecciones/enfermedades causadas por *M. haemolytica*.

[0033] En una realización, las vacunas de *M. haemolytica* comprenden además un adyuvante. En una realización particular, el adyuvante es un adyuvante de la mucosa, tal como quitosano, quitosano metilado, quitosano trimetilado o derivados o combinaciones de los mismos.

[0034] Tal como se define en el presente documento, el término "gen" se utilizará en un sentido amplio, y abarca secuencias codificantes y secuencias no codificantes (es decir, secuencias reguladoras en dirección 3' y 5', promotores, UTR 5'/3', intrones y exones). Cuando se pretende hacer referencia a solamente una secuencia de codificación de un gen, el término "secuencia codificante del gen" o "CDS" se utilizarán indistintamente en toda esta descripción.

[0035] Por "antígeno" o "inmunógeno" se entiende una sustancia que induce una respuesta inmunitaria específica en un animal huésped. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o parte de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; una pieza o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmunitaria tras la presentación a un animal huésped; un polipéptido, un epítipo, un hapteno, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el inmunógeno o antígeno puede comprender una toxina o antitoxina.

[0036] Los términos "proteína", "péptido", "polipéptido" y "fragmento de polipéptido" se usan indistintamente en este documento para referirse a polímeros de residuos de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados o análogos de aminoácidos, y que puede estar interrumpido por restos químicos distintos de aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado naturalmente o mediante intervención; por ejemplo la formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje o bioactivo.

[0037] El término "polipéptido inmunogénico o antigénico", tal como se usa en el presente documento incluye polipéptidos que son inmunológicamente activos en el sentido de que una vez administrado al huésped, es capaz de evocar una respuesta inmunitaria de tipo humoral y/o celular dirigida contra la proteína. Preferiblemente, el fragmento de proteína es tal que tiene sustancialmente la misma actividad inmunológica que la proteína total. De este modo, un fragmento de proteína comprende o consiste esencialmente en o consiste en al menos un epítipo o determinante antigénico. Una proteína o polipéptido "inmunogénico", tal como se usa en el presente documento, incluye la secuencia de longitud completa de la proteína, análogos de la misma, o fragmentos inmunogénicos de la misma. Por "fragmento inmunogénico" se entiende un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítopos y de este modo provoca la respuesta inmunológica descrita anteriormente. Tales fragmentos pueden ser identificados usando cualquier técnica de mapeo de epítopos bien conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols en Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse mediante, por ejemplo, la síntesis simultánea de grandes cantidades de péptidos sobre soportes sólidos, los péptidos correspondientes a partes de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos están todavía unidos a los soportes. Dichas técnicas se conocen en el estado de la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos. No. 4.708.871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. De manera similar, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente mediante la determinación de la conformación espacial de aminoácidos, tal como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, supra. Los procedimientos especialmente aplicables a las proteínas de *T. parva* se describen completamente en el documento PCT/US2004/022605 publicada como WO2005/007691A. En el presente documento se describen fragmentos activos y variantes del polipéptido antigénico. Por lo tanto, el término "polipéptido inmunogénico o antigénico" contempla además delecciones, adiciones y sustituciones a la secuencia, siempre que el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica, tal como se define en este documento. El término "variación

conservativa" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de manera que el residuo de aminoácido codificado no cambia o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservativa, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos - aspartato y glutamato; (2) básicos - lisina, arginina, histidina; (3) no polares - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga - glicina, asparagina, glutamina, cistina, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces como aminoácidos aromáticos. Los ejemplos de variaciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro residuo hidrófobo, o la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, y similares; o una sustitución conservativa similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado que no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia, pero que poseen sustituciones de aminoácidos menores que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína están, por lo tanto, dentro de la definición del polipéptido de referencia. Todos los polipéptidos producidos por estas modificaciones se incluyen en el presente documento. El término "variación conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido, siempre que los anticuerpos producidos contra el polipéptido sustituido también inmunorreacten con el polipéptido no sustituido.

[0038] El término "epítipo" se refiere al sitio en un antígeno o hapteno al cual responden células B y/o células T específicos. El término también se usa indistintamente con "determinante antigénico" o "sitio determinante antigénico". Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana.

[0039] Una "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta celular y/o inmunitaria mediada por anticuerpos a una composición o vacuna de interés. Por lo general, una "respuesta inmunológica" incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células T auxiliares y/o células T citotóxicas, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en el composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el huésped mostrará una respuesta inmunológica terapéutica o protectora, de manera que la resistencia a una nueva infección se verá reforzada y/o la gravedad clínica de la enfermedad se verá reducida. Dicha protección se demostrará por una reducción o ausencia de síntomas y/o signos clínicos de la enfermedad normalmente mostrados por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título viral disminuido en el huésped infectado.

[0040] Por "animal" se entiende mamíferos, aves, y similares. Animal o huésped, tal como se utiliza en el presente documento, incluye mamíferos y humanos. El animal puede seleccionarse del grupo que consiste en equino (por ejemplo, caballos), canino (por ejemplo, perros, lobos, zorros, coyotes, chacales), felino (por ejemplo, leones, tigres, gatos domésticos, gatos salvajes, otros gatos grandes, y otros felinos incluyendo guepardos y lince), ovino (por ejemplo, ovejas), bovino (por ejemplo, ganado), porcino (por ejemplo, cerdo), aves (por ejemplo, pollo, pato, ganso, pavo, codorniz, faisán, loro, pinzones, halcón, cuervo, avestruz, emu y casuario), primate (por ejemplo, prosimio, tarsier, mono, gibón, simio), hurones, focas y peces. El término "animal" también incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo recién nacido, embrionario y etapas fetales.

[0041] A menos que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta descripción. Los términos singulares "un", "una", y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, la palabra "o" pretende incluir "y" menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0042] Se observa que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones y/o párrafos, los términos, tales como "comprende" "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado "incluye", "incluido", "que incluye", y similares. Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se refieren a ARN o ADN que es lineal o ramificado, monocatenario o bicatenario, o un híbrido de los mismos. El término también abarca híbridos de ARN/ADN. Los siguientes son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos de unión, tales como fluororibosa y tiolato, y ramas de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación, con un componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluidas en esta definición son los bloqueos, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, y la introducción de medios para unir el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componentes de marcaje, otros polinucleótidos o soporte sólido. Los polinucleótidos se pueden obtener por síntesis química o derivar de un microorganismo.

[0043] El término "gen" se utiliza ampliamente para referirse a cualquier segmento de polinucleótido asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen intrones y exones como en la secuencia genómica, o sólo las secuencias codificantes como en ADNc y/o las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Por ejemplo, el gen también se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm o ARN funcional, o codifica una proteína específica, y que incluye secuencias reguladoras.

[0044] Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico o proteína u orgánulo) se refiere a un componente que se ha separado sustancialmente o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que se produce el componente de forma natural, por ejemplo, otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y proteínas que se han "aislado" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante procedimientos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante tecnología recombinante, así como la síntesis química.

[0045] El término "variación conservativa" indica la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de tal manera que el residuo de aminoácido codificado no cambia o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservativa, tal como se describe anteriormente. El término "recombinante" significa un polinucleótido de origen semisintético o sintético que, o bien no se produce en la naturaleza o está ligado a otro polinucleótido en una disposición no hallada en la naturaleza.

[0046] "Heterólogo" significa derivado de una entidad genéticamente distinta del resto de la entidad a la que se está comparando. Por ejemplo, un polinucleótido puede colocarse mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una fuente diferente, y es un polinucleótido heterólogo. Un promotor extraído de su secuencia codificante nativa y unido operativamente a una secuencia codificante distinta de la secuencia nativa es un promotor heterólogo.

[0047] Los polinucleótidos descritos en este documento pueden comprender secuencias adicionales, tales como secuencias codificantes adicionales dentro de la misma unidad de transcripción, elementos de control, tales como promotores, sitios de unión a ribosomas, 5'UTR, 3'UTR, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, unidades de transcripción adicionales bajo el control del mismo o un promotor diferente, secuencias que permiten la clonación, expresión, recombinación homóloga y transformación de una célula huésped, y cualquier constructo, según pueda ser deseable.

Procedimientos de uso y artículo de fabricación

[0048] La presente descripción incluye los procedimientos siguientes. En una realización, se describe un procedimiento de vacunación de un animal que comprende administrar una composición que comprende una cepa de *M. haemolytica* atenuada y un portador/vehículo farmacéutico o veterinariamente aceptable a un animal. En un aspecto de esta realización, el animal es un animal bovino.

[0049] El volumen de dosis de composiciones para las especies diana que son mamíferos, por ejemplo, el volumen de dosis de composiciones para cerdos o puercos, basado en antígenos bacterianos, es generalmente de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 2,0 ml, de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1,0 ml, y de entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 1,0 ml.

[0050] La eficacia de las vacunas puede ser analizada aproximadamente de 2 a 4 semanas después de la última inmunización mediante la estimulación de los animales, tales como animales bovino, con una cepa virulenta de *M. haemolytica*. Ambas cepas homóloga y heteróloga se utilizan para la estimulación para probar la eficacia de la vacuna. El animal puede ser estimulado mediante inyección IM o SC, aerosol, intra-nasal, intra-ocular, por vía intratraqueal, y/o por vía oral. Se pueden recoger muestras de las articulaciones, los pulmones, el cerebro y/o la boca antes y después de la estimulación y se pueden analizar para la presencia de anticuerpo específico de *M. haemolytica*.

[0051] Las composiciones que comprenden las cepas bacterianas atenuadas de la invención utilizadas en los protocolos de sensibilización-refuerzo están contenidas en un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutico o veterinariamente aceptable. Los protocolos de la invención protegen al animal de *M. haemolytica* y/o previenen la progresión de la enfermedad en un animal infectado.

[0052] Las diversas administraciones se realizan preferiblemente de 1 a 6 semanas de diferencia. El intervalo de tiempo preferido es de 3 a 5 semanas, y óptimamente 4 semanas de acuerdo con una realización. También se prevé un refuerzo anual. Los animales, por ejemplo, cerdos, pueden tener al menos 3-4 semanas de vida en el momento de la primera administración. A partir de la descripción de este documento y el conocimiento en la técnica, el experto puede determinar el número de administraciones, la vía de administración, y las dosis a utilizar para cada protocolo de inyección sin gran experimentación.

[0053] También se describe en el presente documento un kit para llevar a cabo un procedimiento de producir o inducir una respuesta inmunológica o protectora contra *M. haemolytica* en un animal que comprende una composición inmunológica o vacuna de *M. haemolytica* atenuada y las instrucciones para realizar el procedimiento de liberación de una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en el animal.

[0054] También se describe en el presente documento un kit para realizar un procedimiento de inducir una respuesta inmunológica o protectora contra *M. haemolytica* en un animal que comprende una composición o vacuna que comprende una cepa de *M. haemolytica* atenuada de la invención, y las instrucciones para realizar el procedimiento de liberación en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en el animal.

[0055] También se describe en el presente documento un kit para la vacunación de sensibilización-refuerzo de acuerdo con la presente invención tal como se describe anteriormente. El kit puede comprender al menos dos viales: un primer vial que contiene una vacuna o composición para la vacunación de sensibilización de acuerdo con la presente invención y un segundo vial que contiene una vacuna o composición para la vacunación de refuerzo según la presente invención. El kit puede contener ventajosamente primeros o segundos viales adicionales para vacunas de sensibilización adicionales o vacunas de refuerzo adicionales.

[0056] Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una solución de NaCl (por ejemplo, solución salina) al 0,9% o un tampón fosfato. Otro portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable que se puede utilizar para los procedimientos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, poli-(L-glutamato) o polivinilpirrolidona. El portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser cualquier compuesto o combinación de compuestos que facilitan la administración del vector (o proteína expresada a partir de un vector de la invención in vitro); ventajosamente, el portador, vehículo o excipiente pueden facilitar la transfección y/o mejorar la conservación del vector (o proteína). Las dosis y volúmenes de dosis se describen en el presente documento en la descripción general y también pueden ser determinadas por el experto en la materia a partir de esta descripción en relación con el conocimiento en la técnica, sin gran experimentación.

[0057] Las composiciones inmunológicas y vacunas de acuerdo con la invención pueden comprender uno o más adyuvantes. Los adyuvantes adecuados para uso en la práctica de la presente invención son (1) polímeros de ácido acrílico o metacrílico, anhídrido maleico y polímeros derivados de alqueno, (2) secuencias inmunoestimulantes (ISS), tales como secuencias de oligodesoxirribonucleótidos que tienen uno o más unidades de CpG no metiladas (Klinman et al, 1996; WO98/16247), (3) una emulsión de aceite en agua, tal como la emulsión SPT descrita en la página 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach", publicado por M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de la misma obra, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, por ejemplo, DDA (5) citocinas, (6) hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, (7) saponina u (8) otros adyuvantes descritos en cualquier documento citado, o (9) cualquier combinación o mezclas de los mismos.

[0058] En una realización, los adyuvantes incluyen aquellos que promueven una mejor absorción a través de revestimientos de la mucosa. Algunos ejemplos incluyen MPL, LTK63, toxinas, micropartículas de PLG y varios otros (Vajdy, M. Immunology and Cell Biology (2004) 82, 617-627). En una realización, el adyuvante puede ser un quitosano (Van der Lubben et al 2001; Patel et al 2005; Majithiya et al 2008; patente de Estados Unidos N° de serie 5.980.912).

[0059] En una realización, el adyuvante pueden ser bacterias inactivadas, un virus inactivado, fracciones de bacterias inactivadas, lipopolisacáridos bacterianos, toxinas bacterianas o derivados o

Referencias.

[0060]

Ackermann, M. R, Brogden, K.A. 2000. Response of the ruminant respiratory tract to Mannheimia (Pasteurella) haemolytica. Microbes Infect. 2:1079-1088.

Al-Ghamdi, G.M., et al, 2000. Serotyping of Mannheimia (Pasteurella) haemolytica isolates from the upper Midwest United States. J. Vet. Diagn. Invest. 12, 576-578.

Bowland, S., Shewen, P., 2000. Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. Can. Vet. J. 41, 33-38.

Briggs R.E, Tatum F.M. 2005. Generation and molecular characterization of new temperature-sensitive plasmids intended for genetic engineering of Pasteurellaceae. Appl Environ Microbiol 71:7187-7195.

Burriel, A.R. 1997. News & Notes: Isolation of Pasteurella haemolytica from Grass, Drinking Water, and Straw Bedding Used by Sheep. Curr. Microbiol. 35: 316-318.

Confer, A.W., et al., 2003. Immunogenicity of recombinant Mannheimia haemolytica serotype 1 outer membrane protein PlpE and augmentation of a commercial vaccine. Vaccine 21, 2821-2829.

Davies, R.L., et al. 2002. Mosaic structure and molecular evolution of the leukotoxin operon (lktCABD) in Mannheimia (Pasteurella) haemolytica, Mannheimia glucosida, and Pasteurella trehalosi. J Bacteriol. 184(1):266-277.

- Davies, R.L., et al. 2001. Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (*lktA*) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*. *J Bacteriol.* 183(4):1394-1404.
- Ellis, J., et al., 2007. Response of calves to challenge exposure with virulent bovine respiratory syncytial virus following intranasal administration of vaccines formulated for parenteral administration. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230, 233-243.
- Frank, G.H., et al. 2003. Effect of intranasal exposure to leukotoxin-deficient *Mannheimia haemolytica* at the time of arrival at the feedyard on subsequent isolation of *M. haemolytica* from nasal secretions of calves. *Am J Vet Res.* 64(5):580-585.
- Gioia, J. et al. 2006. The genome sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: insights into virulence, natural competence, and Pasteurellaceae phylogeny. *J Bacteriol.* 188(20):7257-7266.
- Lawrence, P.K., et al., 2010. Three-way comparative genomic analysis of two *Mannheimia haemolytica* isolates. *BMC Genomics.* 11:535 (Open access).
- Morton, R.J., et al., 1995. Vaccination of cattle with outer membrane protein-enriched fractions of *Pasteurella haemolytica* and resistance against experimental challenge exposure. *Am. J. Vet. Res.* 56, 875-879.
- Miller, M. W. 2001. Pasteurellosis, In E. S. Williams and I. K. Barker (ed.), *Infectious diseases of wild mammals*. Iowa State University. Press, Ames, IA. p. 330-339
- Mosier, D. A. 1997. Bacterial pneumonia. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 13:483-493.
- Muyikens, B., et al., 2007. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* 38, 181-209.
- Potter, A.A., et al., 1999. Protective capacity of the *Pasteurella haemolytica* transferrin-binding proteins TbpA and TbpB in cattle. *Microb Pathog* 27, 197-206.
- Perino, L.J., Hunsaker, B.D., 1997. A review of bovine respiratory disease vaccine field efficacy. *The Bovine Practitioner* 31, 59-66.
- Purdy, C.W., et al, 1993. Efficacy of *Pasteurella haemolytica* subunit antigens in a goat model of pasteurellosis. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1637-1647.
- Purdy, C.W., et al., 1997. Efficacy of a subcutaneously administered, ultraviolet light-killed *Pasteurella multocida* A:3-containing bacterin against transthoracic challenge exposure in goats. *Am. J. Vet. Res.* 58, 841-847.
- Rehmtulla, A. J, Thomson, R.G. 1981. A review of the lesions in shipping fever of cattle. *Can. Vet. J.* 22:1
- Rice, J.A., et al., 2007. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim. Health Res. Rev.* 8, 117-128.
- Sabri, M.Y., et al., 2000. Efficacy of an outer membrane protein of *Pasteurella haemolytica* A2, A7 or A9-enriched vaccine against intratracheal challenge exposure in sheep. *Vet. Microbiol.* 73, 13-23.
- Schreuer, D., et al. 2000. Evaluation of the efficacy of a new combined (*Pasteurella*) *Mannheimia haemolytica* serotype A1 and A6 vaccine in pre-ruminant calves by virulent challenge. *Journal Cattle Practice* Vol. 8 No. 1 pág. 9-12
- Shewen, P.E., Wilkie, B.N., 1988. Vaccination of calves with leukotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. *Can. J. Vet. Res.* 52, 30-36.
- Virtala, A.M., et al., 1996. Epidemiologic and pathologic characteristics of respiratory tract disease in dairy heifers during the first three months of life. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 2035-2042.

[0061] La invención se describirá ahora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Producción de *M. haemolytica* atenuada

[0062] *M. haemolytica* es un organismo comensal del tracto respiratorio superior de los terneros y otros rumiantes. En situaciones de estrés y en animales inmunocomprometidos, *M. haemolytica* desciende en los pulmones y causa una enfermedad sistémica grave con resultado de pasteurellosis neumónica o "fiebre de embarque". El patógeno puede ser transmitido por contacto de nariz a nariz. Para atenuar la bacteria, hemos suprimido los nucleótidos dentro del locus *LktCA*, que codifica una enzima acilasa (*LktC*) y leucotoxina A (*LktA*), la citotoxina líder de la bacteria. Esta supresión se puede amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se puede detectar la secreción de una *LktA* truncada en una transferencia Western para determinar si la bacteria es el mutante o de tipo natural. La ingeniería genética se resume en las figuras 1-3. Todos los reactivos, incluido los vectores lanzadera pCR2.1, pBC SK, pSK, y pCT109GA189 ts ori, y la célula huésped *E. coli* DH11S, son bien conocidos y accesibles por los expertos en la técnica.

[0063] Construcción de la supresión de *lktCA*. pCT109GA189-KanAlktCA y pCT109GA189-KanAlktCA-rbs se construyeron como se indica en las figuras 1-3. Brevemente, dos fragmentos de ADN, en dirección 5' (1,06 kb, SEQ ID NO: 6) y en dirección 3' (1,29 kb, SEQ ID NO: 7) se amplificaron por PCR de la cepa de *M. haemolytica* NADC D153 (Figura 1). Se utilizaron células completas como plantilla usando los conjuntos de cebadores, lktCAf (SEQ ID NO: 1)/lktCAdeR (SEQ ID NO: 4) y lktCAr (SEQ ID NO: 2)/lktCAdeL (SEQ ID NO: 3). Los productos de PCR se extrajeron con fenol-cloroformo para inactivar la Taq polimerasa y a continuación se digirieron con MunI antes de la ligadura. Los productos de ligación se amplificaron por PCR con el par de cebadores lktCAf/lktCAr y los productos se clonaron utilizando un vector disponible comercialmente (PCR2.1, Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0064] Se seleccionó un producto que contenía un inserto de aproximadamente 2,3 kb y se confirmó la secuencia correcta a través de la delección mediante secuenciación de ADN y se denominó pTAΔlktCA. Un casete de kanamicina derivado de pUC4K se colocó en el sitio Sall de pBC SK (Stratagene Inc.) para generar pBCKan. Se transfirió en pBCKan el inserto de leucotoxina con 2,3 kb eliminados en pTAΔlktCA mediante digestión con EcoRI y ligadura en el sitio EcoRI único para formar pBCKanΔlktCA. Este producto se amplificó por PCR usando el par de cebadores lktCA_{del} (SEQ ID NO: 3) y lktRBSr (SEQ ID NO: 5) para reemplazar el sitio de unión a ribosoma (RBS) lktC nativo por un RBS consenso (figura 1). El producto se digirió con MunI y se ligó a sí mismo para formar pBCKanΔlktCARbs. Se confirmó la secuencia apropiada adyacente a la delección mediante secuenciación de ADN. Finalmente, el esqueleto del plásmido pBC de pBCKanΔlktCA y pBCKanΔlktCARbs se reemplazó con el origen de replicación del plásmido sensible a la temperatura de pCT109GA189 (Briggs y Tatum, 2005) mediante la unión de preparaciones digeridas con BssHII de cada uno para generar pCT109GA189KanΔlktCA y pCT109GA189KanΔlktCARbs.

[0065] Se transformaron células D153 de serotipo de *M. haemolytica* electrocompetentes (cepa parental virulenta) con pCT109GA189KanΔlktCA y pCT109GA189KanΔlktCARbs mediante los procedimientos descritos anteriormente, excepto que el producto de de ligadura no metilado se introdujo directamente en las células competentes. (Briggs y Tatum, 2005) Brevemente, las células se hicieron electrocompetentes haciéndolas crecer hasta fase logarítmica en 100 ml de caldo Columbia (Difco Laboratories, Detroit, MI) a 37°C con agitación suave. Las células se sedimentaron por centrifugación a 5.000 µg y se lavan en 100 ml de sacarosa 272 mM a 0°C, y el sedimento se suspendió en un volumen igual de sacarosa 272 mM a 0°C. Después de la electroporación, las células se recuperaron durante la noche en 10 ml de caldo Columbia a 30°C. Se extendió el crecimiento (50 µl) sobre placas de agar Columbia que contenían 50 µg/ml de kanamicina, que a continuación se incubaron 36 horas a 30°C. Se pasaron colonias individuales al caldo que contenía 50 µg/ml de kanamicina y se incubaron durante la noche a 30°C. El crecimiento (100 µl) se hizo pasar de nuevo a placas de agar Columbia con kanamicina que se incubaron durante la noche a 39°C. Se pasaron colonias individuales a placas de agar de tripticasa de soja (TSA) que contenía un 5% de sangre de oveja defibrinada (placas de BA, incubadas durante la noche a 39°C) y a caldo Columbia sin selección (incubada durante la noche a 30°C). El crecimiento en caldo se extendió para el aislamiento en placas de BA y se pasó de nuevo en el caldo a 30°C. Se detectaron colonias no hemolíticas que eran sensibles a la kanamicina en placas de BA después de 1 a 3 pases sin selección. Se seleccionaron colonias representativas de cada cepa receptora y el plásmido de sustitución para un estudio adicional.

[0066] Debido a que el origen del plásmido sensible a la temperatura funciona mal en huéspedes de clonación de *E. coli*, estos productos de ligadura finales se introdujeron directamente en *M. haemolytica*. Las etapas de clonación anteriores utilizaron *E. coli* DH11S (Life Technologies, Rockville, MD) como huésped de clonación.

[0067] Se desarrollaron mutantes no hemolíticos en caldo Columbia a 37°C durante 3 horas y se recogieron en crecimiento logarítmico tardío. Los sobrenadantes se colocaron en puntos sobre nitrocelulosa junto con los sobrenadantes del parental de tipo natural y un mutante isogénico de leucotoxina negativa. Después del bloqueo y lavado apropiados, la transferencia se sondó con el anticuerpo monoclonal anti-leucotoxina 2C9-1E8 (anticuerpo neutralizante producido por NADC, Ames, IA). Se encontró que los productos mutantes que contienen el sitio de unión al ribosoma nativo expresaban bajos niveles de proteína reactiva con el anticuerpo monoclonal, menos que el producido por la cepa parental de tipo natural. Los productos que contenían el nuevo sitio de unión a ribosomas produjeron niveles mucho más altos de proteína reactiva. Los sobrenadantes de dos productos que expresan altos niveles de leucotoxina se concentraron 15 veces en un filtro de PM 10.000 (Centriprep, Amicon). Los concentrados (1,5 µl) se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se sondaron con anticuerpo 2C9-1E8. El análisis de transferencia Western indicó una nueva proteína reactiva con anticuerpo monoclonal neutralizante anti-leucotoxina en un peso molecular aparente consistente con el producto de proteína predicha de 27 kDa (LktA trincada). Estos mutantes representativos y los controles de entrecruzamiento simple se analizaron por PCR para demostrar la ausencia de origen sensible a la temperatura y el casete de resistencia a kanamicina (Etapa G). El mutante de *M. haemolytica* de serotipo A1 fue designado como D153ΔlktCA4-707, que se refiere a las posiciones de aminoácidos en LktC y LktA respectivamente, donde la región suprimida comienza y termina. La inserción de genes se caracterizó por amplificación por PCR usando los cebadores LktCAf (SEQ ID NO: 1) y LktCar (SEQ ID NO: 2), que flanquean el sitio de delección. Tal como se ha indicado en la imagen del gel, la amplificación por PCR produjo los esperados ~ 2,3 kb para LktCA troncada y ~ 5,0 kb para la bacteria de tipo natural (Figura 4A). Finalmente, la PCR realizada con los cebadores (SEQ ID NOS: 1 y 2) que flanquean los genes ts ori y genes de resistencia a kanamicina confirmó que esos elementos ya no estaban presentes en el mutante LktCA final para Master Seed (MS). Se aplicaron cinco microlitros del sobrenadante del cultivo concentrado sobre un sistema de SDS-PAGE, se transfirieron sobre una membrana de PVDF y se sondaron con el anticuerpo neutralizante anti-LktA de ratón 2C9-1E8 (1:1000) como anticuerpo primario. Se utilizó anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (1:4000) acoplado con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario y se desarrolló en una solución de sustrato que contenía NBT/BCIP durante 1-5 min (figura 4B). La falta de acilasa funcional previene la activación de LktA, y además, la delección N-terminal de LktA evita la formación de poros en los neutrófilos o macrófagos del animal huésped.

Ejemplo 2 - Eficacia de *M. haemolytica* atenuada en terneros

[0068] Los terneros se asignaron aleatoriamente a uno de tres grupos, recibiendo cada uno 10^6 o 10^7 UFC de la vacuna MH A1 + A6, o el control de RPMI (diluyente). se resuspendieron los serotipos A1 y A6 de *Mannheimia haemolytica* (MH) liofilizada y se administraron por vía intranasal, 1 ml a cada fosa nasal, de nueve terneros, con edades entre 5-6 semanas. Se observaron los terneros para el consumo de alimento y se tomó la temperatura rectal mañana y la tarde durante 3 días después de la vacunación. La colonización nasal de *M. haemolytica* A1 y A6 después de la vacunación se analizó por RT-QPCR (diferenciado entre *M. haemolytica* A1 y A6 a lo largo del estudio). Las vacunas se emplacaron en TSA para recuento exacto de UFC/ml en cada vacuna al día siguiente.

[0069] Estimulación. Se cultivó O/N una solución madre de glicerol fresco de MH A1 virulento en medio BHI, se puso en placas (TSA) al día siguiente y se incubó a 37°C. Al día siguiente, las placas se rasparon y se diluyeron en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal inactivado al 2%. El inóculo se cultivó a 37°C/200 rpm hasta que se alcanzó la DO_{600} deseada y el cultivo se diluyó a la dosis deseada de UFC/estimulación y la dilución se puso en placas para enumerar las UFC/ml al día siguiente. El inóculo restante se puso en placas con dilución inmediatamente en el laboratorio. Los terneros se expusieron en el Día a través de la administración transtraqueal de $2,4 \times 10^9$ UFC en 20 ml de RPMI, seguido con 60 ml de RPMI. Los terneros fueron monitorizados para el cambio en el comportamiento incluyendo letargo, tos, secreción nasal y se puntuaron como se muestra en la Tabla 3. Las temperaturas rectales se monitorizaron en los terneros que mostraban signos clínicos. Los pulmones se puntuaron para lesiones neumónicas y se registraron como % de lesión en cada lóbulo y el tejido pulmonar también se recogió para histopatología. Se tomaron frotis de las lesiones pulmonares y la tráquea para recuperar el organismo de estimulación. La Tabla 1 presenta la programación de estudio.

Tabla 1. Programación de estudio

Edad	Día	Suceso
5-6 semanas de vida	0	Día 0 – Sangrado, frotis y vacunación intranasal
	7	7 días después de Vax - sangrado y frotis
	14	14 días después de Vax - sangrado y frotis
	21	21 días después de Vax - sangrado por Vax y frotis
	22	22 días después de Vax - sangrado y frotis y estimulación con <i>M. haemolytica</i> A1
	22-29	Observar signos clínicos partiendo 8/7, realizar eutanasia a los terneros, si es necesario. La eutanasia y necropsia todos en 8/13
* Se observaron en los terneros el consumo de alimento y la temperatura rectal (mañana/tarde) durante 3 días, después de la vacunación.		

Las muestras de cada ternero se evaluaron utilizando células completas, ELISA de Lkt y RT-QPCR.

Tabla 2. Criterio de los signos clínicos

0 =	normal
1 =	depresión, anorexia, tos, secreción nasal, disnea
2 =	severamente deprimida, son incapaces de levantarse o caminar, se practicó la eutanasia por razones humanitarias
3 =	muerto al llegar (DOA)

[0070] Resultados. Tres días después de la estimulación, uno de los terneros de control mostró signos graves de neumonía y fue sacrificado (36,92% de lesiones típicas de *M. haemolytica*). Los 8 terneros restantes se sacrificaron en el día 6 y su porcentaje de implicación pulmonar se describe en la Tabla 3. Los resultados indican claramente que la vacuna proporciona protección cuando se administra por vía intranasal. Tal como se indica en la Tabla 4, la vacunación intranasal de *M. haemolytica* A1/A6 combinado redujo significativamente (62,0% y 76,7% para el grupo de 6 log y 7 log, respectivamente) las lesiones pulmonares en comparación con el tratamiento simulado. Además, el análisis histopatológico indicó claramente una bronconeumonía necrotizante típica característica de *M. haemolytica*.

Tabla 4

Animal #	dosis real de vacuna A1/A6 UFC/animal	Lesión pulmonar (%)	Lesión pulmonar promedio (%)	% de reducción promedio en lesión pulmonar en comparación con la simulación
125	$1,19 \times 10^6 / 9,2 \times 10^5$	24,03*		
176	$1,19 \times 10^6 / 9,2 \times 10^5$	0,0		
188	$1,19 \times 10^6 / 9,2 \times 10^5$	6,40	10,43	62,0
179	$1,19 \times 10^7 / 9,2 \times 10^6$	0,87		
185	$1,19 \times 10^7 / 9,2 \times 10^6$	1,837		
189	$1,19 \times 10^7 / 9,2 \times 10^6$	14,91*	6,48	76,7

122	Simulado	8,85		
177	Simulado	37,75		
182	Simulado	36,92	28,84	

* Las lesiones (patología macroscópica) fueron debidas a la infección crónica típica por *Mycoplasma bovis*

Ejemplo 3 - Desarrollo del procedimiento de RT-QPCR para distinguir entre serotipos A1/A6

5 **[0071]** La eficacia de la colonización intranasal de *M. haemolytica* A1/A6 se siguió durante el transcurso del experimento mediante un nuevo procedimiento de QPCR. Brevemente, los genomas de las bacterias de serotipo A1 y A6 descritos anteriormente se compararon contra un genoma A1 y dos A2 disponibles en GenBank. La comparación reveló 63 genes específicos para A1 (D153) y 42 genes específicos para A6 (D174). De estos 105 genes se eligió una metaloendopeptidasa específica de IgA de familia S6 (SEQ ID NO: 14) específica para A1 y el gen transportador de betaína/carnitina/colina de la familia de BCCT (SEQ ID NO: 12) específico para A6, respectivamente, para PCR diferencial de tiempo real. Estas secuencias de genes se amplificaron mediante el uso de cebadores específicos de genes, se secuenciaron mediante el procedimiento de Sanger estándar y se verificaron. A continuación, se diseñaron cebadores de PCR a tiempo real y se marcaron las sondas con dos colorantes diferentes (A1-5'6 FAM/ZEN/3 y A6-5'Cy5/3'IBRQ) dentro de cada gen. Para verificar la eficacia de este procedimiento de ensayo se eligieron colonias de *M. haemolytica* de frotis nasales obtenidos de terneros mantenidos en las instalaciones 7 días después de la vacunación. Las colonias individuales fueron amplificadas mediante PCR a tiempo real Multiplex de colonias usando el kit QuantiTect Probe PCR Mastermix (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante en una máquina MX3000P qPCR (Stratagene). Las colonias A1 y A6 verificadas por el serotipado se utilizaron como controles positivos para PCR en tiempo real Multiplex cuantitativa (RT-qPCR). Los valores de Ct se fijaron en la configuración por defecto de la máquina y cada colonia verificada mediante PCR a tiempo real Multiplex se confirmó mediante PCR específica de leucotoxina (LktA). Los resultados de RT-QPCR 7 días después de la vacunación indicaron una colonización preferencial de A1 sobre A6 (Tabla 5), que se confirmó adicionalmente mediante la PCR de delección específica del gen de leucotoxina (Tabla 6). Pero los días 14 y 21 después de la vacunación indicaron la colonización esencialmente exclusiva de A1 (Tablas 7 y 8).

Tabla 5. Resultados RT-QPCR para frotis nasales de D7 después de la vacunación

ID	A1	A6	ΔLkt	ID	A1	A6	ΔLkt
151-1	17	11	+	183-1	16	12	+
151-2	15	-	+	183-2	-	35	
151-3	16	-	+	183-3	17	-	+
152-4	17	-	+	183-4	16	-	+
151-5	15	-	+	183-5	-	17	+
154-1	-	-		186-1	-	42	
154-2	-	39		186-2	-	43	
154-3	-	-		186-3	-	-	
154-4	-	-		186-4	-	-	
154-5	-	22		186-5	-	20	
157-1	15	-	+	190-1	-	-	
157-2	22	-	+	190-2	-	-	
157-3	17	-	+	190-3	-	10	
157-4	15	33	+	190-4	-	-	
157-5	16	-	+	190-5	-	-	
160-1	18	13	+	193-1	15	38	+
160-2	-	12	+	193-2	15	-	+
160-3	-	12	+	193-3	-	36	
160-4	-	12	+	193-4	16	20	+
160-5	-	11	+	193-5	-	-	
178-1	-	-		A1 mut. Vx	15	-	+
178-2	-	-		A6 mut. Vx	-	11	+
178-3	-	-		Neg.	-	-	
178-4	-	24					
178-5	-	31					
181-1	15	15	+				
181-2	17	-	+				
181-3	-	13	+				
181-4	17	-	+				
181-5	15	-	+				

Tabla 6. Resultados PCR para frotis nasales de D7 después de la vacunación

ID/colonia	A1	A6	LktΔ	~2300 pb	ID/colonia	A1	A6	LktΔ	~2300 pb
122-1	-	-			182-1	-	-		
122-2	-	-			182-2	-	-		
122-3	-	-			182-3	-	-		
122-4	-	-			182-4	-	-		
122-5	-	-			182-5	-	-		
125-1	16	-	+	Y	185-1	-	15	+	Y
125-2	17	-	+	Y	185-2	18	-	+	Y
125-3	17	-	+	Y	185-3	16	-	+	Y
125-4	16	-	+	Y	185-4	-	-	+	Y
125-5	17	-	+	Y	185-5	22	-	+	Y
176-1	17	-	+	Y	188-1	-	-		
176-2	17	-	+	Y	188-2	-	-		
176-3	16	-	+	Y	188-3	-	-		
176-4	16	-	+	Y	188-4	-	-		
176-5	16	-	+	Y	188-5	-	-		
177-1	-	-			189-1	16	-	+	Y
177-2	-	-			189-2	16	-	+	Y
177-3	-	-			189-3	21	-	+	Y
177-4	-	-			189-4	16	-	+	Y
177-5	-	-			189-5	17	-	+	
179-1	17	-	+	Y	Neg.	-	-		
179-2	16	-	+	Y					
179-3	-	-							
179-4	16	-	+	Y					
179-5	29	-	+	Y					

Tabla 7. Resultados PCR para frotis nasales de D14 después de la vacunación

5

ID-colonia #	A1	A6	Lkt ΔPCR	Lkt Δ	ID-colonia #	A1	A6	Lkt ΔPCR	Lkt Δ
122-1 (Con.	0	0	Neg		182-1 (Con.	0	0	Neg	
122-2 (Con.	0	0	Neg		182-2 (Con.	0	0	Neg	
122-3 (Con.	0	0	Neg		182-3 (Con.	0	0	Neg	
125-1 (6 log)	15	0	Pos	Y	185-1 (7 log)	0	0	Neg	
125-2 (6 log)	16	0	Pos	Y	185-2 (7 log)	0	0	Neg	
125-3 (6 log)	16	0	Pos	Y	185-3 (7 log)	0	0	Neg	
176-1 (6 log)	0	0	Neg		188-1 (6 log)	0	0	Neg	
176-2 (6 log)	0	0	Neg		188-2 (6 log)	0	0	Neg	
176-3 (6 log)	0	0	Neg		188-3 (6 log)	0	0	Neg	
177-1 (Con.	0	0	Neg		189-1 (7 log)	15	0	Pos	Y
177-2 (Con.	0	0	Neg		189-2 (7 log)	15	0	Pos	Y
177-3 (Con.	0	0	Neg		189-3 (7 log)	15	0	Pos	Y
179-1 (7 log)	0	0	Neg		A1 Mutante Pos	15	0	Pos	Y
179-2 (7 log)	0	0	Neg		A6 Mutante Pos	0	16	Pos	Y
179-3 (7 log)	0	0	Neg		Neg. con.	0	0	Neg	

Tabla 8. Resultados PCR para frotis nasales de D21 después de la vacunación

ID-colonia #	A1	A6	Lkt ΔPCR	Lkt Δ	ID-colonia #	A1	A6	Lkt ΔPCR	Lkt Δ
122-1 (Con.	0	0		Δ	185-1 (7 log)	15	0	+	Y
122-2 (Con.	0	0			185-2 (7 log)	14	0	+	Y
122-3 (Con.	0	0			185-3 (7 log)	15	0	+	Y
125-1 (6 log)	14	0	+	Y	188-1 (6 log)	14	0	+	Y
125-2 (6 log)	15	0	+	Y	188-2 (6 log)	15	0	+	Y
125-3 (6 log)	15	0	+	Y	188-3 (6 log)	14	0	+	Y
176-1 (6 log)	15	0	+	Y	189-1 (7 log)	16	0	+	Y
176-2 (6 log)	15	0	+	Y	189-2 (7 log)	17	0	+	Y
176-3 (6 log)	15	0	+	Y	189-3 (7 log)	15	0	+	Y

177-1 (Con.	0	0	+	Y	A1 Mutante Pos	15	0	+	Y
177-2 (Con.	0	0			A6 Mutante Pos	0	16	+	Y
177-3 (Con.	0	0			Neg. con.	0	0	neg	
179-1 (7 log)	0	0			Pre-estimulación A1 wt.	15	0	+	WT
179-2 (7 log)	0	0			Post-estimulación A1 wt.	16	0	+	WT
179-3 (7 log)	0	0							
182-1 (Con.	0	0							
182-2 (Con.	0	0							
182-3 (Con.	0	0							

Ejemplo 3 - Vacunación intranasal de terneros usando vacunas A1 y A6 contra *Mannheimia haemolytica* seguido de estimulación virulenta

- 5 [0072] Se asignaron aleatoriamente quince terneros, 4 semanas de vida y alojados en 3 jaulas diferentes/5 terneros por jaula, a uno de los dos grupos de tratamiento. Los terneros fueron vacunados por vía intranasal con los serotipos A1 y A6 de *Mannheimia haemolytica* viva modificada (reconstituidos a partir de liofilizado, Tabla 9), y la colonización intranasal de A1 y A6 se controló por PCR en tiempo real. Los terneros fueron finalmente estimulados con *M. haemolytica* A6 virulenta (tipo natural) para determinar la eficacia de la vacuna.

10

Tabla 9. Grupos de tratamiento.

Grupo	Tratamiento	dosis total/CFU por animal	ruta/volumen	Id. del ternero
1	<i>M. haemolytica</i> A1 + A6	10^7 ($1,43 \times 10^6 + 8,63 \times 10^5$)*	intranasal 1 ml por orificio nasal	2, 4, 6, 8, 10
2	<i>M. haemolytica</i> A1 + A6	10^8 ($1,43 \times 10^7 + 8,63 \times 10^6$)*	intranasal 1 ml por orificio nasal	1, 3, 5, 7, 9
3	RPMI liofilizado de control + estabilizante	control	intranasal 1 ml por orificio nasal	162, 166, 170, 174, 175
*UFC/ml real basadas en el recuento de placas				

- 15 [0073] *Vacunación.* Los cultivos liofilizados de *M. haemolytica* A1 y A6 se enumeraron de un lote almacenado a 4°C. En el día de la vacunación, se diluyeron las vacunas en RPMI (incoloro) a CFU/ml requeridas para cada aislado. Del mismo modo, se diluyó la vacuna simulada (RPMI liofilizado en estabilizante) en RPMI. Las vacunas se emplacaron en TSA para determinar el recuento exacto de UFC/ml en cada vacuna al día siguiente. Las vacunas se mezclaron y se administraron 1 ml/orificio nasal usando una jeringa de repetición unida con una cánula de acuerdo con la dosis en la Tabla 9. El grupo de control fue vacunado primero, seguido por el grupo log de más alto a más
- 20 bajo. Después de la vacunación, se recogieron las muestras como se describe en la Tabla 10, y se observaron los terneros para el consumo de alimento y se tomaron las temperaturas rectales mañana y tarde durante 3 días después de la vacunación. La colonización nasal de *M. haemolytica* A1 y A6 después de la vacunación se analizó mediante Q-PCR tal como se describe anteriormente.

- 25 [0074] Cultivo de estimulación de *M. haemolytica* A6. Se cultivó una solución madre en glicerol fresco de *M. haemolytica* A6 O/N en medio BHI, se puso en placas (TSA) al día siguiente y se incubó a 37°C. El día siguiente, las placas se rasparon y se diluyeron en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal inactivado al 2%. El inóculo se cultivó a 37°C/200 rpm hasta que se alcanzó la DO₆₀₀ deseada. El cultivo se diluyó hasta la dosis deseada de UFC/estimulación y la dilución se puso en placas para enumerar las UCF/ml exactas al día siguiente. El inóculo fue
- 30 transportado en hielo y se mantuvo en hielo durante la estimulación, y se administró transtraquealmente utilizando una aguja 14G x 1 pulgada. La dosis fue de $1,09 \times 10^9$ UFC/animal en 20 ml de RPMI, seguido por 60 ml de RPMI. Una vez completado, el inóculo restante se puso inmediatamente en placas con dilución. Los terneros fueron monitorizados por cambios de comportamiento incluyendo letargo, tos y secreción nasal y se puntuaron tal como se muestra en la Tabla 11. Se monitorizaron las temperaturas rectales de los terneros que mostraban signos
- 35 clínicos. Los pulmones se puntuaron para las lesiones neumónicas y se registraron como % de lesión en cada lóbulo, y se recogieron tejidos para histopatología. Se tomaron frotis también de los pulmones (lesiones) y la tráquea para recuperar el organismo de estimulación.

Tabla 10. Programa de Estudio

Edad	Fecha	Suceso
4 semanas de vida	0	Día 0 – Sangrado, frotis y vacunación intranasal
	7 días después de vax	7 días después de vax-sangrado y frotis
	15 días después de vax	15 días después de vax-sangrado y frotis y estimulación con <i>M. haemolytica</i> A6
	15 a 20 días después de vax	Observar signos clínicos partiendo del día 15, realizar eutanasia a los terneros, si es necesario. La eutanasia y necropsia todos en el día 20
* Se monitorizaron el consumo de alimento (diario) y la temperatura rectal (dos veces al día) 3 días después de la vacunación.		

Tabla 11. Signos clínicos.

Criterio para observaciones	
0 =	normal
1 =	depresión, anorexia, tos, secreción nasal, disnea
2 =	severamente deprimida, son incapaces de levantarse o caminar, se practicó la eutanasia por razones humanitarias
3 =	muerto al llegar (DOA)

- 5 **[0075] Resultados.** Dos días después de la inoculación, los terneros # 5 y 174 mostraron signos graves de neumonía y se sacrificaron. El ternero # 7 murió el día 3, después de la estimulación. Los 12 terneros restantes se sacrificaron el día 5 y su % de implicación pulmonar se describe en la tabla 4. Los resultados indican que el 80% de los animales vacunados estaban protegidos por la vacuna de *M. haemolytica* A1/A6 modificada viva. Del grupo de 7 log, tres animales (1, 3 y 9) fueron protegidos, mientras que los otros dos animales (5, 7) tenían lesiones significativamente grandes en comparación con los controles. Las grandes lesiones podrían haber sido causadas por un *Mannheimia*, micoplasma o infección viral existente, que habían sido exacerbadas por la estimulación. En general, el 80% de los vacunados (1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 y 10) habían reducido significativamente (reducción del 89,55%) la lesión de pulmón en comparación con el control, y el análisis histopatológico indicó una bronconeumonía necrotizante típica en los animales control.

15

Tabla 12. Grupos de dosificación

Grupo	Animal #	dosis de vacuna A1/A6 real UFC/animal	Lesión pulmonar (%)	Lesión pulmonar promedio (%)	% de reducción promedio en la lesión pulmonar en comparación con la vacuna simulada
10 ⁷	2	1,43x10 ⁶ /8,63x10 ⁵	0,0		
	4	1,43x10 ⁶ /8,63x10 ⁵	8,67		
	6	1,43x10 ⁶ /8,63x10 ⁵	5,92		
	8	1,43x10 ⁶ /8,63x10 ⁵	4,83		
	10	1,43x10 ⁶ /8,63x10 ⁵	0,0	3,88	85,04
10 ⁸	1	1,43x10 ⁷ /8,63x10 ⁶	0,0		
	3	1,43x10 ⁷ /8,63x10 ⁶	0,0		
	5	1,43x10 ⁷ /8,63x10 ⁶	41,58		
	7	1,43x10 ⁷ /8,63x10 ⁶	64,47		
	9	1,43x10 ⁷ /8,63x10 ⁶	2,295	21,66	14,47
	162	Simulada	37,11		
	166	Simulada	29,82		
	170	Simulada	11,235		
	174	Simulada	25,54		
	175	Simulada	25,97	25,93	

- 20 **[0076]** La eficacia de la colonización intranasal de *M. haemolytica* A1/A6 fue controlada durante el transcurso del experimento mediante procedimientos QPCR descritos anteriormente. Los resultados para 7 y 15 días después de la vacunación indicaron que los animales vacunados tuvieron una colonización preferencial de A1 sobre A6 que se confirmó adicionalmente mediante PCR de delección específica de gen de leucotoxina (Tablas 13 y 14).

ES 2 684 556 T3

Tabla 13. Día 7 después de la vacunación

Muestra #	Animal #	FAM MH A1	MH A1?	CY5 MHA6	MH A6?
1	1	No Ct		16,5	+
2	1	No Ct		38,26	+
3	1	No Ct		16,53	+
4	1	No Ct		25	+
5	2	No Ct		No Ct	
6	2	No Ct		No Ct	
7	2	No Ct		No Ct	
8	2	17,01	+	No Ct	
9	3	No Ct		15,87	+
10	3	25,11	+	20,81	+
11	3	21,91	+	19,69	+
12	3	22,35	+	21,8	+
13	4	16,52	+	No Ct	
14	4	17,11	+	No Ct	
15	4	16,26	+	No Ct	
16	4	16	+	No Ct	
17	5	39,07	+	41,17*la representación estaba mal - NEG	
18	5	15,98	+	No Ct	
19	5	16,4	+	No Ct	
20	5	16,44	+	No Ct	
21	6	17,08	+	No Ct	
22	6	18,24	+	No Ct	
23	6	16,8	+	No Ct	
24	6	17,94	+	No Ct	
25	7	17,98	+	No Ct	
26	7	No Ct		16,34	+
27	7	26,57	+	15,46	+
28	7	16,7	+	17,52	+
29	8	16,7	+	No Ct	
30	8	16,71	+	No Ct	
31	8	16,1	+	No Ct	
32	8	15,16	+	No Ct	
33	9	16,32	+	No Ct	
34	9	17,03	+	No Ct	
35	9	16,63	+	No Ct	
36	9	16,04	+	No Ct	
37	10	No Ct		No Ct	
38	10	No Ct		No Ct	
39	10	No Ct		No Ct	
40	10	No Ct		No Ct	
41	162	No Ct		No Ct	
42	162	No Ct		No Ct	
43	162	No Ct		No Ct	
44	162	No Ct		No Ct	
45	166	No Ct		No Ct	
46	166	No Ct		No Ct	
47	166	No Ct		No Ct	
48	166	No Ct		No Ct	
49	170	No Ct		No Ct	
50	170	No Ct		No Ct	
51	170	No Ct		No Ct	
52	170	No Ct		No Ct	
53	174	No Ct		No Ct	
54	174	No Ct		No Ct	
55	174	No Ct		No Ct	
56	174	No Ct		No Ct	
57	175	No Ct		No Ct	
58	175	No Ct		No Ct	
59	175	No Ct		No Ct	
60	175	No Ct		No Ct	

ES 2 684 556 T3

61	A1 mut+	16,66		No Ct	
62	A6 mut+	No Ct		13,85	
63	A1 wt +	15,87		No Ct	
64	Neg	40,77		No Ct	

Tabla 14. Día 15 después de la vacunación

Animal #	FAM MH A1	MH A1?	CY5 MHA6	MH A6?	Lkt del PCR
1	No Ct		40,53		
1	No Ct		No Ct		
1	No Ct		No Ct		
1	No Ct		No Ct		
1	No Ct		No Ct		
2	No Ct		No Ct		
2	No Ct		No Ct		
2	No Ct		No Ct		
2	No Ct		No Ct		
2	No Ct		No Ct		
3	No Ct		No Ct		
3	No Ct		15,1	+	Mutante
3	No Ct		15,08	+	Mutante
3	No Ct		15,19	+	Mutante
3	No Ct		15,3	+	Mutante
4	15,82		15,1	+	Mutante
4	No Ct		No Ct		Mutante
4	No Ct		No Ct		
4	No Ct		No Ct		
5	16,13	+	No Ct		Mutante
5	15,27	+	No Ct		Mutante
5	17,03	+	No Ct		Mutante
5	16,49	+	No Ct		Mutante
5	18,06	+	No Ct		Mutante
6	No Ct		No Ct		
6	No Ct		No Ct		
6	No Ct		No Ct		
6	40,05		No Ct		
6	No Ct		No Ct		
7	No Ct		16,83	+	Mutante
7	No Ct		No Ct	+	
7	No Ct		14,92	+	Mutante
7	No Ct		15,21	+	Mutante
7	No Ct		16,16	+	Mutante
8	No Ct		No Ct		
8	No Ct		No Ct		
8	No Ct		No Ct		
8	No Ct		No Ct		
8	No Ct		No Ct		
9	No Ct		No Ct		
9	No Ct		No Ct		
9	No Ct		No Ct		
9	No Ct		No Ct		
9	No Ct		No Ct		
10	15,94	+	No Ct		Mutante
10	No Ct	+	No Ct		
10	No Ct	+	No Ct		
10	23,82	+	No Ct		Mutante
10	30,04	+	No Ct		Mutante
162	No Ct		No Ct		
162	No Ct		No Ct		
162	No Ct		No Ct		
162	No Ct		No Ct		
162	No Ct		No Ct		

166	No Ct		No Ct		
166	No Ct		No Ct		
166	No Ct		No Ct		
166	No Ct		No Ct		
166	No Ct		No Ct		
170	No Ct		No Ct		
170	No Ct		No Ct		
170	No Ct		No Ct		
170	No Ct		No Ct		
170	No Ct		No Ct		
174	No Ct		No Ct		
174	No Ct		No Ct		
174	No Ct		No Ct		
174	No Ct		No Ct		
174	No Ct		No Ct		
175	16,24	+	No Ct		Mutante
175	No Ct	+	No Ct		
175	16,54	+	No Ct		Mutante
175	No Ct	+	No Ct		Mutante
175	23,06	+	No Ct		Mutante

LISTADO DE SECUENCIAS

5 [0077]

<110> Merial Limited
Lawrence, Paul

10 <120> Vacunas de mannheimia haemolytica atenuadas y procedimientos de
fabricación y uso

<130> MER 12-209P

15 <160> 26

<170> PatentIn version 3.5

20 <210> 1
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador lktCAf

<400> 1
gcattgaatt gatcaactaa tacttg

26

30

<210> 2
<211> 25
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador lktCAR

40 <400> 2
caaggtttct agaaagattt ttcgg

25

45 <210> 3
<211> 31

	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
5	<223>	cebador 1ktCAde1f		
	<400>	3		
		gatcaattga aagctgttga agaaattatc g		31
10				
	<210>	4		
	<211>	29		
	<212>	ADN		
15	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	cebador 1ktCAde1r		
20	<400>	4		
		atacaattga ttcataattt gcactcgat		29
25	<210>	5		
	<211>	48		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
30	<220>			
	<223>	cebador 1ktRBSr		
	<400>	5		
35		caacaattga ttcataattt gcctcctata attattctaa attaggtc		48
40	<210>	6		
	<211>	1068		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
45	<223>	fragmento de PCR 5' deltalktCA		
	<400>	6		
		gcattgaatt gatcaactaa tacttggttt ttcaagttag ttgcaatgcc taaaccatca		60
		ccaaaatagt ttggattatt gatttttctcc cctacaaaat ctagcccttc gtgttttctt		120
50		gccatctcag ccaataccgg cacatcgcca aaaatagcat caattcgccc attttgcaca		180
		tctaaaatag catttttgata agaggcataa gatttcacat tgtactcttt tttctctttt		240
		gctaaatagt gttggtaagt agtcccattt tgcacaccaa tcgttttcac cttagcaaaa		300
		tctgtatctt ttttcgcaat gaaggcagca gagcttggaa agtaaggctc gctaaataat		360
		acttgtttct tacgtgggtc cgtaataccc atacctgaaa ttgcagcatc aaattgtttt		420
55		tgtttttaggc tttggattaa gctatcaaaa gggttggtat ggaatgtaca atttgcattc		480
		atctcttttac agatagcatt tgcaatatcc acatcaaaac cgataatttc tcccttctct		540
		tcggtcattt caaatggagg atagcttggc tccatcacaa atttgatatc ttgtgcctgc		600
		gcagtaacca cacaccgaa taaaagggtc aaaagtgttt ttttcataaa aagtcctgt		660
		gttttcatta taaggattac cactttaacg cagttacttt cttaaaaaaa gtcttctttt		720
60		cataaagttt gttttatgtc atacaaacac atcaaattga gatgtagttt ctcaatcctc		780
		ttgattcctc tatctcaaaa aaacaacca aaagaaaaaa gaaaagtata tgttacatta		840
		atattacaat gtaattattt tgtttaattt ccctacattt tgtataactt taaaacactc		900
		ctttttctct tctgattata taaaagacaa aaaatacaat ttaagctaca aaaaacaaca		960
		aaaaacaaca aaaaacacga caataagatc gagtaatgat tatattatgt tataattttt		1020
65		gacctaattt agaataatta tcgagtccaa attatgaatc aattgtat		1068

	<210>	7					
	<211>	1295					
	<212>	ADN					
	<213>	Secuencia artificial					
5	<220>						
	<223>	Fragmento de PCR 3' del taktCA					
	<400>	7					
10	caattgaaag	ctgttgaaga	aattatcggg	acatcacata	acgatatctt	taaaggtagt	60
	aagtccaatg	atgccittta	cgggtggatg	ggtgtcgata	ctattgacgg	taacgacggc	120
	aatgacgcgt	tatttggtgg	taaaaggcga	gatattctcg	atggtggaaa	tggtgatgat	180
	ttttatcgatg	gcggttaaagg	caacgacctt	ttacacgggtg	gcaaggggcga	tgatatatttc	240
	gttcaccgta	aaggcgatgg	taatgatatt	attaccgatt	ctgacggcaa	tgataaatta	300
15	tcattctctg	attcgaactt	aaaagattta	acatttgaaa	aagttaaaca	taatcttgtc	360
	atcacgaata	gcaaaaaaga	gaaagtgacc	attcaaaaact	ggttccgaga	ggctgatttt	420
	gctaagaag	tgccctaatta	taaagcaact	aaagatgaga	aaatcgaaga	aatcatcggg	480
	caaaatggcg	agcggatcac	ctcaaagcaa	gttgatgatc	ttatcgcaaa	aggtaacggc	540
	aaaattaccc	aagatgagct	atcaaaaagt	gttgataact	atgaattgct	caaacatagc	600
20	aaaaatgtga	caaacagctt	agataagtta	atctcatctg	taagtgcatt	tacctcgtct	660
	aatgattcga	gaaatgtatt	agtggctcca	acttcaatgt	tggatcaaag	tttatcttct	720
	cttcaatttg	ctagagcagc	ttaattttta	atgattggca	actctatatt	gtttcacaca	780
	ttatagagtt	gccgttttat	tttataaaaag	gagacaatat	ggaagctaac	catcaaagga	840
	atgatcttgg	tttagttgcc	ctcactatgt	tggcacaata	ccataatatt	tcgcttaatc	900
25	cggagaagaa	aaaacataaa	tttgatcttg	acggaaaagg	gctttcttta	actgcttggc	960
	tttttagctgc	aaaatcgтта	gcgttgaaag	cgaaacacat	taaaaaagag	atttcccgc	1020
	tacacttggg	gaattttacc	gcattagttt	ggcaagataa	cggtaaacat	tttttattgg	1080
	taaaagtggg	taccgataat	aaccgctatt	taacttacaa	tttggaaaca	gatgctccac	1140
	aaattctgtc	acaagacgaa	tttgaagcct	gctatcaagg	gcagttaatt	ttggtcacgt	1200
30	ccagagcttc	cgtagtaggt	caattagcaa	agttcgattt	cacctgggtt	attccggcgg	1260
	tgatcaaata	ccgaaaaatc	tttctagaaa	ccttg			1295
35	<210>	8					
	<211>	27					
	<212>	ADN					
	<213>	Secuencia artificial					
40	<220>						
	<223>	cebador directo de la familia BCCT transportador de BETAÍNA-CARNITINA-					
		COLINA					
	<400>	8					
45	atgttattcg	ccgccggaat	ggggatc				27
50	<210>	9					
	<211>	25					
	<212>	ADN					
	<213>	Secuencia artificial					
55	<220>						
	<223>	cebador inverso de la familia BCCT transportador de BETAÍNA-CARNITINA-					
		COLINA					
60	<400>	9					
	acctgcatca	ccccaaagcc	aagtg				25
65	<210>	10					
	<211>	26					
	<212>	ADN					
	<213>	Secuencia artificial					

<220>		<223> cebador directo de SERINA METALO-ENDOPEPTIDASA ESPECÍFICA DE IGA	
<400> 10			
5	atgaagacca aaacatttac tcgttc	26	
<210> 11			
10	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
<220>		<223> cebador inverso de SERINA METALO-ENDOPEPTIDASA ESPECÍFICA DE IGA	
<400> 11			
15	agcgcttggtg tccctgaacc agcac	25	
<210> 12			
	<211> 2007		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
<220>		<223> Gen específico de A6-familia BCCT transportador de	
30	BETAÍNA/CARNITINA/COLINA		
<400> 12			
	ttggatttaa tcaaaaaatt aaacacagga agtaccttta gggtagccgat tttcctaccg	60	
	agtttactct ttgtcagctt tggtgcccgtt ttctgtatca tctttccaca gcaagcacaa	120	
	acctcacttg ataccatcaa aaatagtctc ttccaacatt ttagctgggt ctatatatttt	180	
35	gcaggctcta tctttttcct gtttctaatt ttctctctt tcagccgatt gggatgatatt	240	
	aaattagggg cagataccga tgagcctgaa ttgtgttttg gctcttggt tgcgatgtta	300	
	ttcgccgccc gaatggggat cgggttaatg tattttgggg tagcagaacc tattttgcat	360	
	taccttaaac ccgtccaaca aaatttaact gagccggagc gtatgaaaga agcgatgatg	420	
	acaacgttct atcattgggg tattcacgct tgggcaattt atggtgtgat tgccttagct	480	
40	cttgcttatt ttggcttcag atataagtta gcactcacta ttcgttccgg attttatccc	540	
	ttactaaaac atcgtatttc aggccttctg gggcatttaa ttgatattat tgccctttgt	600	
	agcacgattt tcggtttaac gactacactt ggctttgggg tgatgcaggc cagtgcctggc	660	
	tttaacaatc taggtttaat tgaacagagc aattttactg ttcttgcat tatcgtaaca	720	
	gtagcaatgg ctcttgccgt gttatctgcc gtttcgggag taggcaaagg ggtaaaatc	780	
45	ttaagtgaat tcaatctcac attagccgga ttgctactta tttttgtgat aatcaccggc	840	
	ccaactctat tactttttct aagcttcacc gaaaatttag gctattattt tagctcgtg	900	
	cttgagatga gtttcggtac ctctgcttat gaaccggaac atcaaggctg gctaagcggc	960	
	tggacgggtc tttattgggc atgggtggga tcttgggagc catttggttg tttgtttatt	1020	
	gccaagatct ctaaaggcag aaccattcgt gaattttatt taggggtgct atttggtcca	1080	
50	tcgctgttta acattttatg gatgaccagc ttccggcagc ctgccatttg gttcgatcaa	1140	
	caaactgccg gtgcttttagc tgaagtcagc ggcaataccg aacaactggt atttaccttt	1200	
	tttgagcaat taccgttttg ctctattgcc tctttcgttg ccgtcattgt tatcagtatt	1260	
	ttctttatca cctctgccga ctccgggatt ttgtgttcca acagcattgc ttcacaaggc	1320	
	gaagaaaatg caccgaaatg gcaaagcgtg ctttggggag cattattagc catcttagcg	1380	
55	ttatcactac tctattcggg tggcttggtt tctctgcaaa caatgacact gattatcgcc	1440	
	ttaccattta ctttcattat gctgattctc tgtatcggct tatggaaagg ataatggta	1500	
	gataaccaat acttcaacaa aaaattctcg caaggtagcc aacattgggc gggtaaagat	1560	
	tggaaacaac gcttgagaa aatcatcaac ccaagcaata agcaagatgt ccgtcacttc	1620	
	tttattaaag ttgccagacc agcattttta gaacttatcg aggaatttga aagctatggc	1680	
60	ttaatcgcta aaatgaattt caccaacgaa caaaaccgga aatttagagt tgaagtggg	1740	
	aaagaaaatt tacgcaattt catttacggc attgaaaagt tgccacggga attatcggat	1800	
	ttggtggtag gtgacgacaa cctaccgaac attgagcaaa ataccattta cgagccgatt	1860	
	acttatttct tagacgggag gaaagggtat gatgtgcaat atatgaccaa agaagagttg	1920	
	attgccgacg tgctgcaaca gtatgaacgc tttatcaatt tagcgatgga caactcgcac	1980	
65	gacttaatatg cggctgattt caatcac	2007	

<210> 13
 <211> 669
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> traducción de la seq ID NO: 12

<400> 13

10	Leu	Asp	Leu	Ile	Lys	Lys	Leu	Asn	Thr	Gly	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Pro
	1				5					10					15	
	Ile	Phe	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Phe	Val	Ser	Phe	Val	Ala	Val	Phe	Cys
				20					25					30		
	Ile	Ile	Phe	Pro	Gln	Gln	Ala	Gln	Thr	Ser	Leu	Asp	Thr	Ile	Lys	Asn
15			35					40					45			
	Ser	Leu	Phe	Gln	His	Phe	Ser	Trp	Phe	Tyr	Ile	Phe	Ala	Gly	Ser	Ile
		50					55					60				
	Phe	Phe	Leu	Phe	Leu	Ile	Phe	Leu	Ser	Phe	Ser	Arg	Leu	Gly	Asp	Ile
	65					70					75				80	
20	Lys	Leu	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp	Glu	Pro	Glu	Phe	Gly	Phe	Gly	Ser	Trp
				85						90					95	
	Ile	Ala	Met	Leu	Phe	Ala	Ala	Gly	Met	Gly	Ile	Gly	Leu	Met	Tyr	Phe
				100					105					110		
	Gly	Val	Ala	Glu	Pro	Ile	Leu	His	Tyr	Leu	Lys	Pro	Val	Gln	Gln	Asn
25			115					120					125			
	Leu	Thr	Glu	Pro	Glu	Arg	Met	Lys	Glu	Ala	Met	Met	Thr	Thr	Phe	Tyr
		130					135					140				
	His	Trp	Gly	Ile	His	Ala	Trp	Ala	Ile	Tyr	Gly	Val	Ile	Ala	Leu	Ala
	145					150					155				160	
30	Leu	Ala	Tyr	Phe	Gly	Phe	Arg	Tyr	Lys	Leu	Ala	Leu	Thr	Ile	Arg	Ser
					165					170					175	
	Gly	Phe	Tyr	Pro	Leu	Leu	Lys	His	Arg	Ile	Ser	Gly	Phe	Trp	Gly	His
				180					185					190		
	Leu	Ile	Asp	Ile	Ile	Ala	Leu	Cys	Ser	Thr	Ile	Phe	Gly	Leu	Thr	Thr
35			195					200					205			
	Thr	Leu	Gly	Phe	Gly	Val	Met	Gln	Val	Ser	Ala	Gly	Phe	Asn	Asn	Leu
		210					215					220				
	Gly	Leu	Ile	Glu	Gln	Ser	Asn	Phe	Thr	Val	Leu	Ala	Ile	Ile	Val	Thr
	225					230					235				240	
40	Val	Ala	Met	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Val	Gly	Lys
				245						250					255	
	Gly	Val	Lys	Ile	Leu	Ser	Glu	Ile	Asn	Leu	Thr	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu
				260					265					270		
	Leu	Ile	Phe	Val	Ile	Ile	Thr	Gly	Pro	Thr	Leu	Leu	Leu	Phe	Ser	Ser
45			275					280					285			
	Phe	Thr	Glu	Asn	Leu	Gly	Tyr	Phe	Ser	Ser	Leu	Leu	Glu	Met	Ser	
		290					295					300				
	Phe	Arg	Thr	Phe	Ala	Tyr	Glu	Pro	Glu	His	Gln	Gly	Trp	Leu	Ser	Gly
	305					310					315				320	
50	Trp	Thr	Val	Leu	Tyr	Trp	Ala	Trp	Trp	Ala	Ser	Trp	Ala	Pro	Phe	Val
					325					330					335	
	Gly	Leu	Phe	Ile	Ala	Lys	Ile	Ser	Lys	Gly	Arg	Thr	Ile	Arg	Glu	Phe
				340					345					350		
	Ile	Leu	Gly	Val	Leu	Phe	Val	Pro	Ser	Leu	Phe	Asn	Ile	Leu	Trp	Met
55			355					360					365			
	Thr	Ser	Phe	Gly	Ser	Ser	Ala	Ile	Trp	Phe	Asp	Gln	Gln	Thr	Ala	Gly
		370					375					380				
	Ala	Leu	Ala	Glu	Val	Ser	Gly	Asn	Thr	Glu	Gln	Leu	Leu	Phe	Thr	Phe
	385					390					395				400	
60	Phe	Glu	Gln	Leu	Pro	Phe	Gly	Ser	Ile	Ala	Ser	Phe	Val	Ala	Val	Ile
				405						410				415		
	Val	Ile	Ser	Ile	Phe	Phe	Ile	Thr	Ser	Ala	Asp	Ser	Gly	Ile	Phe	Val
				420					425					430		
	Leu	Asn	Ser	Ile	Ala	Ser	Gln	Gly	Glu	Glu	Asn	Ala	Pro	Lys	Trp	Gln
65			435					440					445			
	Ser	Val	Leu	Trp	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Ile	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu
		450					455					460				
	Tyr	Ser	Gly	Gly	Leu	Ala	Ser	Leu	Gln	Thr	Met	Thr	Leu	Ile	Ile	Ala

	465	Leu	Pro	Phe	Thr	Phe	Ile	Met	Leu	Ile	Leu	Cys	Ile	Gly	Leu	Trp	Lys	480
					485	Asp	Asn	Gln	Tyr	Phe	Asn	Lys	Lys	Phe	Ser	Gln	Gly	495
5		Gly	Leu	Met	Val	500				505	Trp	Lys	Gln	Arg	Leu	Glu	Lys	Ile
		Ser	Gln	His	515	Trp	Ala	Gly	Lys	520					525			
		Ile	Asn	Pro	Ser	Asn	Lys	Gln	Asp	Val	Arg	His	Phe	Phe	Ile	Lys	Val	
10		Ala	Arg	Pro	Ala	Phe	Leu	Glu	Leu	Ile	Glu	Glu	Phe	Glu	Ser	Tyr	Gly	560
		Leu	Ile	Ala	Lys	Met	550	Asn	Phe	Thr	Asn	Glu	Gln	Asn	Pro	Lys	Leu	Glu
		Phe	Glu	Val	Val	Lys	Glu	Asn	Leu	Arg	Asn	Phe	Ile	Tyr	Gly	Ile	Glu	575
15		Ser	Val	Pro	Arg	Glu	Leu	Ser	Asp	Leu	Val	Val	Gly	Asp	Asp	Asn	Leu	590
		Pro	Asn	Ile	Glu	Gln	Asn	Thr	Ile	Tyr	Glu	Pro	Ile	Thr	Tyr	Phe	Leu	605
20		Asp	Gly	Arg	Lys	Gly	Tyr	Asp	Val	Gln	Tyr	Met	Thr	Lys	Glu	Glu	Leu	620
		Ile	Ala	Asp	Val	Leu	Gln	Gln	Tyr	Glu	Arg	Phe	Ile	Asn	Leu	Ala	Met	635
		Asp	Asn	Ser	His	645	Asp	Leu	Met	Thr	Ala	Asp	Phe	Asn	His			655
25					660						665							
		<210> 14																
30		<211> 4017																
		<212> ADN																
		<213> Secuencia artificial																
		<220>																
35		<223> Gen específico de A1 - Serina metalo-endorpeptidasa específica de IgA																
		<400> 14																
		atgaagacca	aaacattttac	tcgtttcttat	cttgcttctt	ttgtaacaat	cgtattaagt	60										
		ttacctgctg	tagcatctgt	tgtacgtaat	gatgtggact	atcaatactt	ccgcgatttt	120										
40		gccgaaaata	aaggaccatt	ttcagttggt	tcaatgaata	ttgatattaa	agacaacaat	180										
		ggacaacttg	taggcacgat	gcttcataat	ttaccaatgg	ttgatattag	tgctatggta	240										
		agaggtggat	attctacttt	aattgcacca	caatatttag	ttagtgttgc	acataatact	300										
		ggatataaaa	atgttcaatt	tgggtgctgca	ggttataacc	ctgattcaca	tcactatact	360										
		tataaaattg	ttgaccgcaa	tgattatgaa	aagggttcaag	gaggggttgc	cccagactat	420										
45		catactcctc	gattaaataa	attagtaaca	gaagttgtgc	ctgccgcagt	caccaatgca	480										
		ggtacatcta	ttaaacccta	cttaaataag	gaacgcttcc	ctatgtttct	tcgtgctggg	540										
		tcagggacac	aagcgctaag	aggaaaagaa	agtaataaaa	caactggaat	cgctgggtgct	600										
		tatgaatatc	ttactggcgg	taccacatta	caattatcta	aaagctcccc	tgatcactgg	660										
		ttagattatt	caagtaacct	ttatcaagta	agctatggac	cactttcaac	ctatgcacta	720										
50		cctgggtgata	gtgggttcagg	ttcttacgcc	tatgatatga	acgaaaaacg	atgggtatta	780										
		gttggtgtgc	tcaattttcta	taatgggtatg	gataatcaat	tcaaccgctc	tgcgattatc	840										
		cgtaaagatt	tccacgagaa	aaaatttgcc	gaagatatgt	caggaacaat	caataatacc	900										
		gtacaaaattg	cacaattcaa	ttggactgct	caaggtaaat	ccagctctct	tagtcaatca	960										
		aataatgtgc	aaaaactcaa	cgttgatcta	aaagatagta	gcattgcaaa	ccaaaacact	1020										
55		tctctgccac	aagaaaatca	cggtaaaacc	attaatttta	atggtaaaga	tgcaactatt	1080										
		gtactaaaac	aggatattga	ccaagggtgca	ggtgcattaa	atctgaacgc	taatctcact	1140										
		attcgtcctg	aaacagacca	aacttggtcaa	ggtgcaggta	ttatcgtcgg	taaagataaa	1200										
		aaagtgaatt	ggcaagtaaa	aaatccacaa	ggcgtatcgt	tatctaaact	cggggaagga	1260										
		acactctatg	taaatggacg	tggacagaat	cttggcgata	tcagtgtagg	tgatggattt	1320										
60		gtaatactta	accagcaagc	cgatcaccaa	ggaagaaaac	aggcctttta	tacagttaga	1380										
		atcgtaaagt	gtcgtccccc	tgttggtgcta	ggtagtgcag	atcaagttaa	tccccgataat	1440										
		atttactttg	gatttcgcgg	aggctcgttta	gacctaaacg	gtaacagcat	cgccttttaa	1500										
		cgtattcaaaa	acagcgataa	acatgctcgt	attgtaaacc	acaatcgcca	tcacatttct	1560										
		accttaataa	tacaaggcca	agatcctctc	actagtaatg	atcttatatg	gggaaaatgg	1620										
65		gcaagtaata	gcccagcaga	catttacgaa	tataccaatc	cttatcaaaa	taaacgcaaa	1680										
		gattactttc	gtctgaaagg	taatttcgaga	gtatattatc	caacgaatgc	tacaagtaac	1740										
		gatcactggg	aattttcttc	cagtaaccgc	gagcaagcaa	tacagaaaat	cctagatgcc	1800										
		aaaaacttaa	gacagcgcta	tgacacgttt	aatgggtttta	taggggaaga	tgcttccaat	1860										

ES 2 684 556 T3

	aaaactaatg	ggatattaaa	tgtcgtgttt	gatacaaaaa	cagaagtaaa	tacagaacaa	1920
	gataaattaa	agaatatcta	cacaatgtcg	ggaggattta	accttaatgg	tgaactcacc	1980
	cttaaagggtg	gtacattggt	gctttctggt	cacccaacgc	cacacgctta	tgatattaag	2040
	aataagcatg	atgtttgtgcg	tgaaaacgat	tggaagaca	gccattttac	tgctaaaaat	2100
5	atcacggtaa	ataaaaatggc	acaactctat	atcggggagaa	atgtcaatga	agtaaatagt	2160
	cacttttactg	cgactgataa	agccaaactc	aatttaggat	ttattaatcg	ttcaacgcc	2220
	agtttctatg	atttctgaata	cacaggcact	acacattgtg	aagtgcgaagc	ggtcattttcc	2280
	gataatattt	ttgcaaatct	agcaacaacc	gccattaaag	gtaatgttaa	attacaaaac	2340
	catagccaat	taaatttagg	caaagcaaac	ctcactgggt	ctgtacaagc	tgatcaaaca	2400
10	actcatatca	cttttagcaaa	tcacagtcac	tggttaaaca	atggtacgag	ccagattggg	2460
	catctttacaa	tggaaaaagg	gtcgaatcct	agcctaaacg	ataaaattgc	taccacggaa	2520
	atcccagttc	gattcaacaa	gatgatcatc	caaggtaac	taaaaggtaa	tgacgaatt	2580
	aactataccg	caaatttagc	caagggcgaa	tctgatcatc	tccaagttga	cggtatttgct	2640
	gaaggaaatt	ttgtccttgc	cgtagaagt	agcacaactg	aagcaaattcc	aaaaagctca	2700
15	ttaaacctac	taagcttaaa	aaatagcaac	caagaaggca	ataaagcttc	tatttctcta	2760
	gaaaataatt	atgttgatct	agggtacttat	cggtatgtat	tagaaaatcg	taatcacaat	2820
	taccattttat	ttaatccatt	aataccttat	tcaacctcta	aagagatgaa	tgctacattct	2880
	gtatcctcta	ttccaaaaaa	ggaatctggt	actaatgttc	ctactttaga	taagaaagaa	2940
	actgaacaaa	atcttactca	actacaaaaa	gattttttcag	cacaccaatt	agaaaatcaa	3000
20	aaagcaaaaac	aatctatgat	aaatgctcaa	tctgagctaa	gacgactcaa	ttcacaactg	3060
	aatgtattgc	aaaaatatgt	gaatttctcg	cgcttagggt	actatactca	gcaggcagtt	3120
	ttagaacaaa	ttagcattat	tcaaaataaa	attaaacaaa	cacaaacaat	atttaatgac	3180
	gctaagtcaa	ctgtaaaact	cacagatcaa	aagctagaag	aagccaaatt	agctctaggc	3240
	tctgtaaacg	atcttgtatt	aataaaagcc	tctgctccag	caatgcaagc	aactaatcaa	3300
25	gatacgagta	tgatgaatat	tattcaagca	gattggataa	gccaatacgc	taacacagca	3360
	cttttctgaac	tctcggcaca	ggctaattct	gctctgcaaa	tcagtaatat	cttagatcgc	3420
	caactcttca	aacaaagcga	taaattcaac	gtatggagca	gcgtcgaaca	tcagaaaacc	3480
	gagcataaat	cagattttata	ccgcccgtat	aaacaacaaa	ccaacctgac	ccaactgggc	3540
	atacaaatgc	cgatagataa	cggttttaatt	tttggagttg	cattatctaa	aaaccacgct	3600
30	aacgcggaat	ttaacgaggg	tgtaaacggt	aaatcgaatc	tactaatggc	aagcctatat	3660
	ggtaagtggc	aatctcaaca	aggcactttt	atcagccttg	atggcagcta	cggtaaagca	3720
	aaaaaccaac	tctacctatt	tggtgaaaac	cactttaccc	gccgaatttc	ctctattgggt	3780
	gctaacattg	gacatcaatt	tgacctcgca	ggagttcaaa	ttcagccaac	aataggagca	3840
	agatactacc	atttcagcgg	ccaagactat	acactaggag	gagcgaaaat	cagctcacca	3900
35	aatacccact	ttatgacata	tcaagcgggt	ctaaaagcta	gtaaaacttt	tcattggatg	3960
	actggaaagt	tgaaccaagc	attacaaccc	actatgtgga	tgcaagtaac	aaacgct	4017

40 <210> 15
 <211> 1339
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> traducción de seq ID NO:14

<400> 15
 Met Lys Thr Lys Thr Phe Thr Arg Ser Tyr Leu Ala Ser Phe Val Thr
 1 5 10 15
 Ile Val Leu Ser Leu Pro Ala Val Ala Ser Val Val Arg Asn Asp Val
 20 25 30
 Asp Tyr Gln Tyr Phe Arg Asp Phe Ala Glu Asn Lys Gly Pro Phe Ser
 35 40 45
 Val Gly Ser Met Asn Ile Asp Ile Lys Asp Asn Asn Gly Gln Leu Val
 50 55 60
 Gly Thr Met Leu His Asn Leu Pro Met Val Asp Phe Ser Ala Met Val
 65 70 75 80
 Arg Gly Gly Tyr Ser Thr Leu Ile Ala Pro Gln Tyr Leu Val Ser Val
 85 90 95
 Ala His Asn Thr Gly Tyr Lys Asn Val Gln Phe Gly Ala Ala Gly Tyr
 100 105 110
 Asn Pro Asp Ser His His Tyr Thr Tyr Lys Ile Val Asp Arg Asn Asp
 115 120 125
 Tyr Glu Lys Val Gln Gly Gly Leu His Pro Asp Tyr His Thr Pro Arg
 130 135 140
 Leu Asn Lys Leu Val Thr Glu Val Val Pro Ala Ala Val Thr Asn Ala
 145 150 155 160

ES 2 684 556 T3

	Gly	Thr	Ser	Ile	Lys	Pro	Tyr	Leu	Asn	Glu	Glu	Arg	Phe	Pro	Met	Phe
	Leu	Arg	Ala	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Ala	Leu	Arg	Gly	Lys	Glu	Ser	Asn
5	Lys	Thr	Thr	Gly	Ile	Ala	Gly	Ala	Tyr	Glu	Tyr	Leu	Thr	Gly	Gly	Thr
	Thr	Leu	Gln	Leu	Ser	Lys	Ser	Ser	Pro	Asp	His	Trp	Leu	Asp	Tyr	Ser
10	Ser	Asn	Leu	Tyr	Gln	Val	Ser	Tyr	Gly	Pro	Leu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Leu
	Pro	Gly	Asp	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Met	Asn	Glu	Lys
	Arg	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Val	Leu	Asn	Phe	Tyr	Asn	Gly	Met	Asp	Asn
15	Gln	Phe	Asn	Arg	Ser	Ala	Ile	Ile	Arg	Lys	Asp	Phe	His	Glu	Lys	Lys
	Phe	Ala	Glu	Asp	Ile	Ala	Gly	Thr	Ile	Asn	Asn	Thr	Val	Gln	Asn	Ala
20	Gln	Phe	Asn	Trp	Thr	Ala	Gln	Gly	Lys	Ser	Ser	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser
	Asn	Asn	Val	Gln	Lys	Leu	Asn	Val	Asp	Leu	Lys	Asp	Ser	Ser	Ile	Ala
	Asn	Gln	Asn	Thr	Ser	Leu	Pro	Gln	Glu	Asn	His	Gly	Lys	Thr	Ile	Asn
25	Phe	Asn	Gly	Lys	Asp	Ala	Thr	Ile	Val	Leu	Lys	Gln	Asp	Ile	Asp	Gln
	Gly	Ala	Gly	Ala	Leu	Asn	Leu	Asn	Ala	Asn	Leu	Thr	Ile	Arg	Pro	Glu
30	Thr	Asp	Gln	Thr	Trp	Gln	Gly	Ala	Gly	Ile	Ile	Val	Gly	Lys	Asp	Lys
	Lys	Val	Asn	Trp	Gln	Val	Lys	Asn	Pro	Gln	Gly	Asp	Arg	Leu	Ser	Lys
	Leu	Gly	Glu	Gly	Thr	Leu	Tyr	Val	Asn	Gly	Arg	Gly	Gln	Asn	Leu	Gly
35	Asp	Ile	Ser	Val	Gly	Asp	Gly	Ile	Val	Ile	Leu	Asn	Gln	Gln	Ala	Asp
	His	Gln	Gly	Arg	Lys	Gln	Ala	Phe	Asn	Thr	Val	Gly	Ile	Val	Ser	Gly
40	Arg	Pro	Thr	Val	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	Asp	Gln	Val	Asn	Pro	Asp	Asn
	Ile	Tyr	Phe	Gly	Phe	Arg	Gly	Gly	Arg	Leu	Asp	Leu	Asn	Gly	Asn	Ser
	Ile	Ala	Phe	Lys	Arg	Ile	Gln	Asn	Ser	Asp	Lys	His	Ala	Arg	Ile	Val
45	Asn	His	Asn	Arg	Asp	His	Ile	Ser	Thr	Leu	Ile	Ile	Gln	Gly	Gln	Asp
	Pro	Leu	Thr	Ser	Asn	Asp	Leu	Ile	Trp	Gly	Lys	Trp	Ala	Ser	Asn	Ser
50	Pro	Ala	Asp	Ile	Tyr	Glu	Tyr	Thr	Asn	Pro	Tyr	Gln	Asn	Lys	Arg	Lys
	Asp	Tyr	Phe	Arg	Leu	Lys	Gly	Asn	Ser	Arg	Val	Tyr	Tyr	Pro	Thr	Asn
	Ala	Thr	Ser	Asn	Asp	His	Trp	Glu	Phe	Leu	Ser	Ser	Asn	Arg	Glu	Gln
55	Ala	Ile	Gln	Lys	Ile	Leu	Asp	Ala	Lys	Asn	Leu	Arg	Gln	Arg	Tyr	Asp
	Thr	Phe	Asn	Gly	Phe	Ile	Gly	Glu	Asp	Ala	Ser	Asn	Lys	Thr	Asn	Gly
60	Ile	Leu	Asn	Val	Val	Phe	Asp	Thr	Lys	Thr	Glu	Val	Asn	Thr	Glu	Gln
	Asp	Lys	Leu	Lys	Asn	Ile	Tyr	Thr	Met	Ser	Gly	Gly	Phe	Asn	Leu	Asn
	Gly	Glu	Leu	Thr	Leu	Lys	Gly	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Ser	Gly	His	Pro
65	Thr	Pro	His	Ala	Tyr	Asp	Ile	Lys	Asn	Lys	His	Asp	Val	Val	Arg	Glu
	Asn	Asp	Trp	Gln	Asp	Ser	His	Phe	Thr	Ala	Lys	Asn	Ile	Thr	Val	Asn

ES 2 684 556 T3

	Lys	Met	Ala	Gln	Leu	Tyr	Ile	Gly	Arg	Asn	Val	Asn	Glu	Val	Asn	Ser
	705					710					715				720	
	His	Phe	Thr	Ala	Thr	Asp	Lys	Ala	Lys	Leu	Asn	Leu	Gly	Phe	Ile	Asn
					725					730					735	
5	Arg	Ser	Thr	Pro	Ser	Cys	Tyr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Thr	Gly	Thr	Thr	His
				740					745					750		
	Cys	Glu	Val	Gln	Ala	Val	Ile	Ser	Asp	Asn	Ile	Phe	Ala	Asn	Leu	Ala
			755					760					765			
10	Thr	Thr	Ala	Ile	Lys	Gly	Asn	Val	Lys	Leu	Gln	Asn	His	Ser	Gln	Leu
		770					775					780				
	Asn	Leu	Gly	Lys	Ala	Asn	Leu	Thr	Gly	Ser	Val	Gln	Ala	Asp	Gln	Thr
	785					790					795					800
	Thr	His	Ile	Thr	Leu	Ala	Asn	His	Ser	His	Trp	Leu	Asn	Asn	Gly	Thr
					805					810					815	
15	Ser	Gln	Ile	Gly	His	Leu	Thr	Met	Glu	Lys	Gly	Ser	Ile	Leu	Ser	Leu
				820					825					830		
	Asn	Asp	Lys	Phe	Ala	Thr	Thr	Glu	Ile	Pro	Val	Arg	Phe	Asn	Lys	Met
			835					840					845			
20	Ile	Ile	Gln	Gly	Asn	Leu	Lys	Gly	Asn	Gly	Arg	Ile	Asn	Tyr	Thr	Ala
		850					855					860				
	Asn	Leu	Ala	Lys	Gly	Glu	Ser	Asp	His	Leu	Gln	Val	Asp	Gly	Ile	Ala
	865					870					875					880
	Glu	Gly	Asn	Phe	Val	Leu	Ala	Val	Arg	Asn	Ser	Thr	Thr	Glu	Ala	Asn
					885					890					895	
25	Pro	Lys	Ser	Ser	Leu	Asn	Leu	Leu	Ser	Leu	Lys	Asn	Ser	Asn	Gln	Glu
				900					905					910		
	Gly	Asn	Lys	Ala	Ser	Ile	Ser	Leu	Glu	Asn	Asn	Tyr	Val	Asp	Leu	Gly
			915					920					925			
30	Thr	Tyr	Arg	Tyr	Val	Leu	Glu	Asn	Arg	Asn	His	Asn	Tyr	His	Leu	Phe
		930					935					940				
	Asn	Pro	Leu	Ile	Pro	Asn	Ser	Thr	Ser	Lys	Glu	Met	Asn	Ala	Thr	Ser
	945					950					955					960
	Val	Ser	Ser	Ile	Pro	Lys	Lys	Glu	Ser	Val	Thr	Asn	Val	Pro	Thr	Leu
					965					970					975	
35	Asp	Lys	Lys	Glu	Thr	Glu	Gln	Asn	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Lys	Asp	Phe
				980					985					990		
	Ser	Ala	His	Gln	Leu	Glu	Asn	Gln	Lys	Ala	Lys	Gln	Ser	Met	Ile	Asn
			995					1000					1005			
40	Ala	Gln	Ser	Glu	Leu	Arg	Arg	Leu	Asn	Ser	Gln	Leu	Asn	Val	Leu	
		1010					1015					1020				
	Gln	Lys	Tyr	Val	Asn	Ser	Arg	Arg	Leu	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Gln	Gln	
		1025					1030					1035				
	Ala	Val	Leu	Glu	Gln	Ile	Ser	Ile	Ile	Gln	Asn	Lys	Ile	Lys	Gln	
		1040					1045					1050				
45	Thr	Gln	Thr	Ile	Phe	Asn	Asp	Ala	Asn	Ala	Thr	Val	Lys	Leu	Thr	
		1055					1060					1065				
	Asp	Gln	Lys	Leu	Glu	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala	Leu	Gly	Ser	Val	Asn	
		1070					1075					1080				
50	Asp	Leu	Val	Leu	Ile	Lys	Ala	Ser	Ala	Pro	Ala	Met	Gln	Ala	Thr	
		1085					1090					1095				
	Asn	Gln	Asp	Thr	Ser	Met	Met	Asn	Ile	Ile	Gln	Ala	Asp	Trp	Ile	
		1100					1105					1110				
	Ser	Gln	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ala	Leu	Ser	Glu	Leu	Ser	Ala	Gln	Ala	
		1115					1120					1125				
55	Asn	Ser	Ala	Leu	Gln	Ile	Ser	Asn	Ser	Leu	Asp	Arg	Gln	Leu	Phe	
		1130					1135					1140				
	Lys	Gln	Ser	Asp	Lys	Phe	Asn	Val	Trp	Ser	Ser	Val	Glu	His	Gln	
		1145					1150					1155				
60	Lys	Thr	Glu	His	Lys	Ser	Asp	Leu	Tyr	Arg	Pro	Tyr	Lys	Gln	Gln	
		1160					1165					1170				
	Thr	Asn	Leu	Thr	Gln	Leu	Gly	Ile	Gln	Met	Pro	Ile	Asp	Asn	Gly	
		1175					1180					1185				
	Leu	Met	Phe	Gly	Val	Ala	Leu	Ser	Lys	Asn	His	Ala	Asn	Ala	Glu	
		1190					1195					1200				
65	Phe	Asn	Glu	Gly	Val	Asn	Gly	Lys	Ser	Asn	Leu	Leu	Met	Ala	Ser	
		1205					1210					1215				
	Leu	Tyr	Gly	Lys	Trp	Gln	Ser	Gln	Gln	Gly	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu	
		1220					1225					1230				

ES 2 684 556 T3

	Asp	Gly	Ser	Tyr	Gly	Lys	Ala	Lys	Asn	Gln	Leu	Tyr	Leu	Phe	Gly
		1235					1240					1245			
	Glu	Asn	His	Phe	Thr	Arg	Arg	Ile	Ser	Ser	Ile	Gly	Ala	Asn	Ile
		1250					1255					1260			
5	Gly	His	Gln	Phe	Asp	Leu	Ala	Gly	Val	Gln	Ile	Gln	Pro	Thr	Ile
		1265					1270					1275			
	Gly	Ala	Arg	Tyr	Tyr	His	Phe	Ser	Gly	Gln	Asp	Tyr	Thr	Leu	Gly
		1280					1285					1290			
10	Gly	Ala	Lys	Ile	Ser	Ser	Pro	Asn	Thr	His	Phe	Met	Thr	Tyr	Gln
		1295					1300					1305			
	Ala	Gly	Leu	Lys	Ala	Ser	Lys	Thr	Phe	His	Trp	Met	Thr	Gly	Lys
		1310					1315					1320			
	Leu	Asn	Gln	Ala	Leu	Gln	Pro	Thr	Met	Trp	Met	Gln	Val	Thr	Asn
		1325					1330					1335			
15	Ala														

20 <210> 16
 <211> 2354
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> deltaLKTCA completo con RBS original

	<400>	16															
30	gcattgaatt	gatcaactaa	tacttggttt	ttcaagtga	ttgcaatgcc	taaaccatca											60
	ccaaaatagt	ttggattatt	gattttctcc	cctacaaaat	ctagcccttc	gtgttttctt											120
	gccatctcag	ccaataccgg	cacatcgcca	aaaatagcat	caattcgccc	attttgcaca											180
	tctaaaatag	cattttgata	agaggcataa	gatttcacat	tgtactcttt	tttctctttt											240
	gctaaatagt	gttggttaagt	agtccccatt	tgcacaccaa	tcgttttcac	cttagcaaaa											300
	tctgtatctt	ttttcgcaat	gaaggcagca	gagcttggaa	agtaaggctc	gctaaataat											360
35	actttgtttt	tacgtgggtc	cgtaataccc	atacctgaaa	ttgcagcatc	aaattgtttt											420
	tgttttaggc	tttgatttaa	gctatcaaaa	ggttggctat	ggaatgtaca	atttgcattc											480
	atctctttac	agatagcatt	tgcaatatcc	acatcaaaac	cgataatttc	tcccttctct											540
	tcggtcattt	caaattggagg	atagcttggc	tccatcacaa	atttgatata	ttgtgcctgc											600
	gcagtaacca	cacacccgaa	taaaagggtc	aaaagtgttt	ttttcataaa	aagtcacctgt											660
40	gttttcatta	taaggattac	cactttaacg	cagttacttt	cttaaaaaaa	gtcttctttt											720
	cataaagtgt	gttttatgtc	atacaaacac	atcaaatgaa	gatgtagtgt	ctcaatcttc											780
	ttgattcctc	tatctcaaaa	aaacaaccca	aaagaaaaaa	gaaaagtata	tgttacatta											840
	atattacaat	gtaattattt	tgtttaattt	ccctacattt	tgtataactt	taaaacactc											900
	ctttttctct	tctgattata	taaaagacaa	aaaatacaat	ttaagctaca	aaaaacaaca											960
45	aaaaacaaca	aaaaacacga	caataagatc	gagtaatgat	tataattatgt	tataattttt											1020
	gacctaat	agaataatta	tcgagtccaa	attatgaatc	aattgaaagc	tggtgaagaa											1080
	attatcggtg	cgatacataa	cgatatcttt	aaaggtagta	agttcaatga	tgcccttaac											1140
	gggtggtgat	gtgtcgatac	tattgacggt	aacgacggca	atgaccgctt	atttggtggt											1200
	aaaggcgatg	atattctcga	tggtggaaat	gggtgatgatt	ttatcgatgg	cggtaaaggc											1260
50	aacgacctat	tacacggtgg	caaggcgcat	gatattttcg	ttcaccgtaa	aggcgatggt											1320
	aatgatatta	ttaccgattc	tgacggcaat	gataaattat	cattctctga	ttcgaactta											1380
	aaagatttaa	catttgaaaa	agttaaacat	aatcttgtca	tcacgaatag	caaaaaagag											1440
	aaagtgacca	ttcaaaactg	gttccgagag	gctgattttg	ctaaagaagt	gcctaattat											1500
	aaagcaacta	aagatgagaa	aatcgaagaa	atcatcgggt	aaaatggcga	gcggtaccac											1560
55	tcaaagcaag	ttgatgatct	tatcgcaaaa	ggtaacggca	aaattaccca	agatgagcta											1620
	tcaaaagtgg	ttgataacta	tgaattgctc	aaacatagca	aaaatgtgac	aaacagctta											1680
	gataagttaa	tctcatctgt	aagtgcattt	acctcgtcta	atgattcgag	aatgtatta											1740
	gtggctccaa	cttcaatggt	ggatcaaaat	ttatcttctc	ttcaatttgc	tagagcagct											1800
	taatttttaa	tgattggcaa	ctctatatgt	tttcacacct	tatagagtgt	cgtttttatt											1860
60	ttataaaagg	agacaatatg	gaagctaacc	atcaaaggaa	tgatcttggt	ttagttgccc											1920
	tcactatggt	ggcacaatac	cataatat	cgcttaatac	ggaagaaata	aaacataaat											1980
	ttgatcttga	cggaaaaggg	ctttctttta	ctgcttggct	tttagctgca	aaatcgttag											2040
	cgttgaaagc	gaaacacatt	aaaaaagaga	tttcccgtct	acacttggtg	aatttaccgg											2100
	cattagtttg	gcaagataac	ggtaaacaat	ttttattggt	aaaagtggat	accgataata											2160
65	accgctattt	aacttacaat	ttggaacaa	atgtccaca	aattctgtca	caagacgaat											2220
	ttgaagcctg	ctatcaaggg	cagtttaatt	tggtcacgtc	cagagcttcc	gtagtaggtc											2280
	aattagcaaa	gttcgatttc	acctggttta	ttccggcggt	gatcaaatac	cgaaaaatct											2340
	ttctagaaac	cttg															2354

ES 2 684 556 T3

```

5  <210> 17
   <211> 2354
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

10 <220>
   <223> deltaLKTCA completo (con RBS de consenso)

   <400> 17
gcattgaatt gatcaactaa tacttgggttt ttcaagtggag ttgcaatgcc taaaccatca      60
ccaaaatagt ttggattatt gatttttctcc cctacaaaat ctagcccttc gtgttttctt      120
15 gccatctcag ccaataaccgg cacatcgcca aaaatagcat caattcgccc attttgcaca      180
tctaaaatag catttttgata agaggcataa gatttccatc tgtactcttt tttctctttt      240
gctaaatagt gttggtaagt agtcccattt tgcacaccaa tcgttttcac cttagcaaaa      300
tctgtatctt ttttcgcaat gaaggcagca gagcttggaa agtaaggctc gctaaataat      360
acttgtttct tacgtgggtc cgtaataccc atacctgaaa ttgcagcatc aaattgtttt      420
20 tgttttaggc tttggattaa gctatcaaaa gggtggctat ggaatgtaca atttgcattc      480
atctctttac agatagcatt tgcaatatcc acatcaaaaac cgataatttc tcccttctct      540
tcggtcattt caaatggagg atagcttggc tccatcacaa atttgataatc ttgtgcctgc      600
gcagtaacca cacaccgaa taaaagggtc aaaagtgttt ttttcataaa aagtcctctgt      660
gttttcatta taaggattac cactttaacg cagttacttt cttaaaaaaa gtcttctttt      720
25 cataaagttt gttttatgtc atacaaacac atcaaattga gatgtagttt ctcaatcctc      780
ttgattcctc tatctcaaaa aaacaacca aaagaaaaaa gaaaagtata tgttacatta      840
atattacaat gtaattattt tgtttaattt ccctacattt tgtataactt taaaacactc      900
ctttttctct tctgattata taaaagacaa aaaatacaat ttaagctaca aaaaacaaca      960
aaaaacaaca aaaaacacga caataagatc gagtaatgat tataattatgt tataattttt      1020
30 aaagattttt agaataatta taggaggcaa attatgaatc aattgaaagc tgttgaagaa      1080
attatcggtc catcacataa cgatatcttt aaaggtagta agttcaatga tgcctttaac      1140
gggtggtgat gtgtcgatac tattgacggg aacgacggca atgaccgctt atttgggtgg      1200
aaaggcgatg atattctcga tgggtggaaat ggtgatgatt ttatcgatgg cggtaaaggc      1260
aacgacctat tacacggtgg caagggcgat gatattttcg ttcaccgtaa aggcgatggg      1320
35 aatgatatta ttaccgattc tgacggcaat gataaattat cattctctga ttcgaactta      1380
aaagattttt ctttgaaaaa agttaaacat aatcttgtca tcacgaatag caaaaaagag      1440
aaagtgaacca ttcaaaactg gttccgagag gctgattttg ctaaagaagt gcctaattat      1500
aaagcaacta aagatgagaa aatcgaagaa atcatcggtc aaaatggcga gcggtaccac      1560
tcaaagcaag ttgatgatct tatcgcaaaa ggtaacggca aaattacca agatgagcta      1620
40 tcaaaagttg ttgataacta tgaattgtc aaacatagca aaaatgtgac aaacagctta      1680
gataagttaa tctcatctgt aagtgcattt acctcgtcta atgattcgag aaatgtatta      1740
gtggctccaa cttcaatggt ggatcaaagt ttatcttctc ttcaatttgc tagagcagct      1800
taatttttaa tgattggcaa ctctatatgt tttcacacat tatagagttg ccgttttatt      1860
ttataaaagg agacaatatg gaagctaacc atcaaaggaa tgatcttggg ttagttgccc      1920
45 tcactatggt ggcacaatac cataatattt cgcttaatcc ggaagaaata aaacataaat      1980
ttgatcttga cggaaaaggg ctttctttta ctgcttggct tttagctgca aaatcgtag      2040
cgttgaaagc gaaacacatt aaaaaagaga tttcccgtt acacttgggt aatttaccgg      2100
cattagtttg gcaagataac ggtaaacatt ttttattggt aaaagtggat accgataata      2160
accgctattt aacttacaat ttggaacaag atgctccaca aattctgtca caagacgaat      2220
50 ttgaagcctg ctatcaaggg cagttaattt tggtcacgtc cagagcttcc gtagtaggtc      2280
aattagcaaa gttcgatttc acctggttta ttccggcggt gatcaaatac cgaaaaatct      2340
ttctagaaac cttg                                     2354

55 <210> 18
   <211> 249
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

60 <220>
   <223> Traducción de deltaLKTCA

   <400> 18
65 Met Asn Gln Leu Lys Ala Val Glu Glu Ile Ile Gly Thr Ser His Asn
   1      5      10      15
Asp Ile Phe Lys Gly Ser Lys Phe Asn Asp Ala Phe Asn Gly Gly Asp
   20      25      30

```

ES 2 684 556 T3

Gly Val Asp Thr Ile Asp Gly Asn Asp Gly Asn Asp Arg Leu Phe Gly
 35 40 45
 Gly Lys Gly Asp Asp Ile Leu Asp Gly Gly Asn Gly Asp Asp Phe Ile
 50 55 60
 5 Asp Gly Gly Lys Gly Asn Asp Leu Leu His Gly Gly Lys Gly Asp Asp
 65 70 75 80
 Ile Phe Val His Arg Lys Gly Asp Gly Asn Asp Ile Ile Thr Asp Ser
 85 90 95
 10 Asp Gly Asn Asp Lys Leu Ser Phe Ser Asp Ser Asn Leu Lys Asp Leu
 100 105 110
 Thr Phe Glu Lys Val Lys His Asn Leu Val Ile Thr Asn Ser Lys Lys
 115 120 125
 Glu Lys Val Thr Ile Gln Asn Trp Phe Arg Glu Ala Asp Phe Ala Lys
 130 135 140
 15 Glu Val Pro Asn Tyr Lys Ala Thr Lys Asp Glu Lys Ile Glu Glu Ile
 145 150 155 160
 Ile Gly Gln Asn Gly Glu Arg Ile Thr Ser Lys Gln Val Asp Asp Leu
 165 170 175
 20 Ile Ala Lys Gly Asn Gly Lys Ile Thr Gln Asp Glu Leu Ser Lys Val
 180 185 190
 Val Asp Asn Tyr Glu Leu Leu Lys His Ser Lys Asn Val Thr Asn Ser
 195 200 205
 Leu Asp Lys Leu Ile Ser Ser Val Ser Ala Phe Thr Ser Ser Asn Asp
 210 215 220
 25 Ser Arg Asn Val Leu Val Ala Pro Thr Ser Met Leu Asp Gln Ser Leu
 225 230 235 240
 Ser Ser Leu Gln Phe Ala Arg Ala Ala
 245

30
 <210> 19
 <211> 372
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> lisina-aciltransferasa activadora de leucotoxina lktc d153_00985
 40 d153_00985 serotipo A1 (EC 2.3.1.) (Proteína C activadora de toxina)
 (Leucotoxina C) - LKTC

<400> 19
 atgctactta tagataacgg tattccgata gcttattgta gttgggcaga tttaaacctt 60
 gagactgagg tgaaatatat taaggatatt aattcgtaa caccagaaga atggcagtct 120
 45 ggtgacagac gctggattat tgattgggta gcaccattcg gacattctca attactttat 180
 aaaaaaatgt gtcagaaata ccctgatatg atcgtcagat ctatacgctt ttatccaaag 240
 cagaaagaat taggcaaat tgcctacttt aaaggaggta aattagataa aaaaacagca 300
 aaaaaacggt ttgatacata tcaagaagag ctggcaacag cacttaaaaa tgaatttaat 360
 50 tttattaaaa aa 372

<210> 20
 <211> 124
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Traducción de SEQ ID 19

<400> 20
 Met Leu Leu Ile Asp Asn Gly Ile Pro Ile Ala Tyr Cys Ser Trp Ala
 1 5 10 15
 65 Asp Leu Asn Leu Glu Thr Glu Val Lys Tyr Ile Lys Asp Ile Asn Ser
 20 25 30
 Leu Thr Pro Glu Glu Trp Gln Ser Gly Asp Arg Arg Trp Ile Ile Asp
 35 40 45
 Trp Val Ala Pro Phe Gly His Ser Gln Leu Leu Tyr Lys Lys Met Cys

ES 2 684 556 T3

50 55 60
Gln Lys Tyr Pro Asp Met Ile Val Arg Ser Ile Arg Phe Tyr Pro Lys
65 70 75 80
Gln Lys Glu Leu Gly Lys Ile Ala Tyr Phe Lys Gly Gly Lys Leu Asp
5 Lys Lys Thr Ala Lys Lys Arg Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Glu Leu Ala
100 105 110
Thr Ala Leu Lys Asn Glu Phe Asn Phe Ile Lys Lys
115 120

10

<210> 21
<211> 2859
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> precursor de hemolisina-adenilato ciclase bifuncional d153_00984
20 d153_00984 - LKTA

<400> 21
atgggaacta gacttacaac cctatcaaat gggctaataaa acactttaac ggcaaccaa 60
agtggccttac ataaagccgg tcaatcatta acccaagccg gcagttcttt aaaaactggg 120
25 gcaaaaaaaaa ttatcctcta tattcccaa aattaccaat atgatactga acaaggtaat 180
ggttttacagg atttagtcaa agcggccgaa gagttgggga ttgaggtaca aagagaagaa 240
cgcaataata ttgcaacagc tcaaaccagt ttaggcacga ttcaaaccgc tattggctta 300
actgagcgtg gcattgtgtt atccgctcca caaattgata aattgctaca gaaaactaaa 360
gcaggccaag cattaggttc tgccgaaagc attgtacaaa atgcaaataa agccaaaact 420
30 gtattatctg gcattcaatc tatttttagg tcagttattg ctggaatgga tttagatgag 480
gccttacaga ataacagcaa ccaacatgct cttgctaaag ctggccttga gctaacaaat 540
tcattaattg aaaatatgtc taattcagta aaaacacttg acgaatttgg tgagcaaat 600
agtcaatttg gttcaaaaact acaaaatatc aaaggcttag ggacttttag agacaaaactc 660
aaaaatatcg gtggacttga taaagctggc cttgggttag atgttatctc agggctatta 720
35 tcgggcgcaa cagctgcact tgtacttgca gataaaaatg cttcaacagc taaaaaagtg 780
gggtgcgggtt ttgaattggc aaaccaagtt gttggtaata ttaccaaaagc cgtttcttct 840
tacatttttag cccaacgtgt tgcagcaggt ttatcttcaa ctgggcctgt ggctgcttta 900
attgcttcta ctgtttctct tgcgattagc ccattagcat ttgccggtat tgccgataaa 960
40 tttaatcatg caaaaagttt agagagttat gccgaacgct ttaaaaaatt aggctatgac 1020
ggagataatt tatttagcaga atatcagcgg ggaacagggga ctattgatgc atcggttact 1080
gcaattatata ccgcattggc cgctattgct ggtggtgtgt ctgtctgtgc agccggctcg 1140
gttattgctt caccgattgc cttattagta tctgggatta ccggtgtaat ttctacgatt 1200
ctgcaatatt ctaacaagc aatgtttgag cacgttgcaa ataaaattca taacaaaatt 1260
45 gtagaatggg aaaaaataa tcacggtaag aactactttg aaaaatggta cgatgcccg 1320
tatcttgcca atttacaaga taatatgaaa ttcttactga acttaaacaa agagttacag 1380
gcagaacgtg tcatcgctat tactcagcag caatgggata acaacattgg tgatttagct 1440
ggatttagcc gtttaggtga aaaagtcctt agtggtaaa cctatgtgga tgcgtttgaa 1500
gaaggcaaac acattaaagc cgataaaatta ttacagttgg attcggcaaa cgttattatt 1560
gatgtgagta attcgggtaa agcgaaaact cagcatatct tattcagaac gccattattg 1620
50 acgccgggaa cagagcatcg tgaacgcgta caaacaggta aatatgaata tattaccaag 1680
ctcaatatta accgtgtaga tagctggaaa attacagatg gtgcagcaag ttctaccttt 1740
gatttaacta acgttggtca gcgtattggt attgaattag acaatgctgg aaatgtaact 1800
aaaaccaaag aaacaaaaat tattgcaaaa cttgggtgaa gtgatgacaa cgtatttggt 1860
ggttctggta cgacggaaat tgatggcggg gaagggttac accgagttca ctatagccgt 1920
55 ggaaactatg gtgctttaac tattgatgca accaaagaga ccgagcaagg tagttatacc 1980
gtaaatcggt tcgtagaaac cggtaaagca ctacacgaag tgacttcaac ccataaccgca 2040
ttagtgggca accgtgaaga aaaaatagaa tatcgtcata gcaataacca gcaccatgcc 2100
ggttattaca ccaaagatac cttgaaagct gttgaagaaa ttatcggtac atcacataac 2160
gatattcttta acggtagtta gttcaattat gcccttaacg gtggtgatgg tgcgtact 2220
60 attgacggta aagcaggcaa tgaccgctta tttggtggta aaggcgatga tattctcgat 2280
ggtggaaatg gtgatgattt tatcgatggc ggtaaaggca acgacctatt acacggtggc 2340
aagggcgatg atattttcgt tcaccgtaaa ggcgatggta atgatattat taccgattct 2400
gacggcaatg ataaattatc atttctctgat tcgaacttaa aagattttaa atttgaaaaa 2460
gttaaacata atcttgtcat cacgaatagc aaaaaagaga aagtgaccat tcaaaaactg 2520
65 ttccgagagg ctgattttgc taaagaagtg cctaattata aagcaactaa agatgagaaa 2580
atcgaaagaa tcatcggtca aaatggcgag cggatcacct caaagcaagt tgatgatctt 2640
atcgaaaag gtaacggcaa aattacccaa gatgagctat caaaagtgtg tgataactat 2700
gaattgctca aacatagcaa aaatgtgaca aacagcttag ataagttaat ctcatctgta 2760

agtgcatTTta cctcgtctaa tgattcgaga aatgtattag tggctccaac ttcaatgttg 2820
gatcaaagtt tatcttctct tcaatttgct agagcagct 2859

5
<210> 22
<211> 953
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Traducción de SEQ ID 21

15
<400> 22
Met Gly Thr Arg Leu Thr Thr Leu Ser Asn Gly Leu Lys Asn Thr Leu
1 5 10 15
Thr Ala Thr Lys Ser Gly Leu His Lys Ala Gly Gln Ser Leu Thr Gln
20 25 30
Ala Gly Ser Ser Leu Lys Thr Gly Ala Lys Lys Ile Ile Leu Tyr Ile
35 40 45
Pro Gln Asn Tyr Gln Tyr Asp Thr Glu Gln Gly Asn Gly Leu Gln Asp
50 55 60
Leu Val Lys Ala Ala Glu Glu Leu Gly Ile Glu Val Gln Arg Glu Glu
65 70 75 80
Arg Asn Asn Ile Ala Thr Ala Gln Thr Ser Leu Gly Thr Ile Gln Thr
85 90 95
Ala Ile Gly Leu Thr Glu Arg Gly Ile Val Leu Ser Ala Pro Gln Ile
100 105 110
Asp Lys Leu Leu Gln Lys Thr Lys Ala Gly Gln Ala Leu Gly Ser Ala
115 120 125
Glu Ser Ile Val Gln Asn Ala Asn Lys Ala Lys Thr Val Leu Ser Gly
130 135 140
Ile Gln Ser Ile Leu Gly Ser Val Leu Ala Gly Met Asp Leu Asp Glu
145 150 155 160
35 Ala Leu Gln Asn Asn Ser Asn Gln His Ala Leu Ala Lys Ala Gly Leu
165 170 175
Glu Leu Thr Asn Ser Leu Ile Glu Asn Ile Ala Asn Ser Val Lys Thr
180 185 190
Leu Asp Glu Phe Gly Glu Gln Ile Ser Gln Phe Gly Ser Lys Leu Gln
195 200 205
40 Asn Ile Lys Gly Leu Gly Thr Leu Gly Asp Lys Leu Lys Asn Ile Gly
210 215 220
Gly Leu Asp Lys Ala Gly Leu Gly Leu Asp Val Ile Ser Gly Leu Leu
225 230 235 240
45 Ser Gly Ala Thr Ala Ala Leu Val Leu Ala Asp Lys Asn Ala Ser Thr
245 250 255
Ala Lys Lys Val Gly Ala Gly Phe Glu Leu Ala Asn Gln Val Val Gly
260 265 270
Asn Ile Thr Lys Ala Val Ser Ser Tyr Ile Leu Ala Gln Arg Val Ala
275 280 285
50 Ala Gly Leu Ser Ser Thr Gly Pro Val Ala Ala Leu Ile Ala Ser Thr
290 295 300
Val Ser Leu Ala Ile Ser Pro Leu Ala Phe Ala Gly Ile Ala Asp Lys
305 310 315 320
55 Phe Asn His Ala Lys Ser Leu Glu Ser Tyr Ala Glu Arg Phe Lys Lys
325 330 335
Leu Gly Tyr Asp Gly Asp Asn Leu Leu Ala Glu Tyr Gln Arg Gly Thr
340 345 350
Gly Thr Ile Asp Ala Ser Val Thr Ala Ile Asn Thr Ala Leu Ala Ala
355 360 365
60 Ile Ala Gly Gly Val Ser Ala Ala Ala Ala Gly Ser Val Ile Ala Ser
370 375 380
Pro Ile Ala Leu Leu Val Ser Gly Ile Thr Gly Val Ile Ser Thr Ile
385 390 395 400
65 Leu Gln Tyr Ser Lys Gln Ala Met Phe Glu His Val Ala Asn Lys Ile
405 410 415
His Asn Lys Ile Val Glu Trp Glu Lys Asn Asn His Gly Lys Asn Tyr
420 425 430

ES 2 684 556 T3

	Phe	Glu	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ala	Asn	Leu	Gln	Asp	Asn
			435					440					445			
	Met	Lys	Phe	Leu	Leu	Asn	Leu	Asn	Lys	Glu	Leu	Gln	Ala	Glu	Arg	Val
		450					455					460				
5	Ile	Ala	Ile	Thr	Gln	Gln	Gln	Trp	Asp	Asn	Asn	Ile	Gly	Asp	Leu	Ala
	465					470					475				480	
	Gly	Ile	Ser	Arg	Leu	Gly	Glu	Lys	Val	Leu	Ser	Gly	Lys	Ala	Tyr	Val
				485						490					495	
10	Asp	Ala	Phe	Glu	Glu	Gly	Lys	His	Ile	Lys	Ala	Asp	Lys	Leu	Val	Gln
			500						505					510		
	Leu	Asp	Ser	Ala	Asn	Gly	Ile	Ile	Asp	Val	Ser	Asn	Ser	Gly	Lys	Ala
			515					520					525			
	Lys	Thr	Gln	His	Ile	Leu	Phe	Arg	Thr	Pro	Leu	Leu	Thr	Pro	Gly	Thr
		530					535					540				
15	Glu	His	Arg	Glu	Arg	Val	Gln	Thr	Gly	Lys	Tyr	Glu	Tyr	Ile	Thr	Lys
	545					550					555					560
	Leu	Asn	Ile	Asn	Arg	Val	Asp	Ser	Trp	Lys	Ile	Thr	Asp	Gly	Ala	Ala
				565						570					575	
20	Ser	Ser	Thr	Phe	Asp	Leu	Thr	Asn	Val	Val	Gln	Arg	Ile	Gly	Ile	Glu
				580					585					590		
	Leu	Asp	Asn	Ala	Gly	Asn	Val	Thr	Lys	Thr	Lys	Glu	Thr	Lys	Ile	Ile
			595					600					605			
	Ala	Lys	Leu	Gly	Glu	Gly	Asp	Asn	Val	Phe	Val	Gly	Ser	Gly	Thr	
		610					615				620					
25	Thr	Glu	Ile	Asp	Gly	Gly	Glu	Gly	Tyr	Asp	Arg	Val	His	Tyr	Ser	Arg
	625					630					635					640
	Gly	Asn	Tyr	Gly	Ala	Leu	Thr	Ile	Asp	Ala	Thr	Lys	Glu	Thr	Glu	Gln
				645						650					655	
30	Gly	Ser	Tyr	Thr	Val	Asn	Arg	Phe	Val	Glu	Thr	Gly	Lys	Ala	Leu	His
				660				665						670		
	Glu	Val	Thr	Ser	Thr	His	Thr	Ala	Leu	Val	Gly	Asn	Arg	Glu	Glu	Lys
			675					680					685			
	Ile	Glu	Tyr	Arg	His	Ser	Asn	Asn	Gln	His	His	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Thr
		690					695					700				
35	Lys	Asp	Thr	Leu	Lys	Ala	Val	Glu	Glu	Ile	Ile	Gly	Thr	Ser	His	Asn
	705					710					715					720
	Asp	Ile	Phe	Lys	Gly	Ser	Lys	Phe	Asn	Asp	Ala	Phe	Asn	Gly	Gly	Asp
				725						730					735	
40	Gly	Val	Asp	Thr	Ile	Asp	Gly	Asn	Asp	Gly	Asn	Asp	Arg	Leu	Phe	Gly
			740						745					750		
	Gly	Lys	Gly	Asp	Asp	Ile	Leu	Asp	Gly	Gly	Asn	Gly	Asp	Phe	Ile	
			755					760					765			
	Asp	Gly	Gly	Lys	Gly	Asn	Asp	Leu	Leu	His	Gly	Gly	Lys	Gly	Asp	Asp
		770					775					780				
45	Ile	Phe	Val	His	Arg	Lys	Gly	Asp	Gly	Asn	Asp	Ile	Ile	Thr	Asp	Ser
	785					790					795				800	
	Asp	Gly	Asn	Asp	Lys	Leu	Ser	Phe	Ser	Asp	Ser	Asn	Leu	Lys	Asp	Leu
				805						810					815	
50	Thr	Phe	Glu	Lys	Val	Lys	His	Asn	Leu	Val	Ile	Thr	Asn	Ser	Lys	Lys
			820						825					830		
	Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Gln	Asn	Trp	Phe	Arg	Glu	Ala	Asp	Phe	Ala	Lys
			835					840					845			
	Glu	Val	Pro	Asn	Tyr	Lys	Ala	Thr	Lys	Asp	Glu	Lys	Ile	Glu	Glu	Ile
		850					855					860				
55	Ile	Gly	Gln	Asn	Gly	Glu	Arg	Ile	Thr	Ser	Lys	Gln	Val	Asp	Asp	Leu
	865					870					875				880	
	Ile	Ala	Lys	Gly	Asn	Gly	Lys	Ile	Thr	Gln	Asp	Glu	Leu	Ser	Lys	Val
				885						890					895	
60	Val	Asp	Asn	Tyr	Glu	Leu	Leu	Lys	His	Ser	Lys	Asn	Val	Thr	Asn	Ser
			900						905					910		
	Leu	Asp	Lys	Leu	Ile	Ser	Ser	Val	Ser	Ala	Phe	Thr	Ser	Ser	Asn	Asp
			915					920					925			
	Ser	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Ala	Pro	Thr	Ser	Met	Leu	Asp	Gln	Ser	Leu
		930					935					940				
65	Ser	Ser	Leu	Gln	Phe	Ala	Arg	Ala	Ala							
	945					950										

<210> 23
 <211> 2124
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> exportadores de bacteriocina/lantibiótico de tipo ABC d153_00983
 d153_00983 contienen un dominio doble de glicina peptidasa N-terminal - LKTB

10 <400> 23
 atggaagcta accatcaaag gaatgatctt gggttagttg ccctcactat gttggcaciaa 60
 taccataata tttcgcttaa tccggaagaa ataaaacata aatttgatct tgacggaaaa 120
 gggctttctt taactgcttg gcttttagct gcaaaatcgt tagcgttgaa agcgaaacac 180
 15 attaaaaaag agatttcccg cttacacttg gtgaatttac cggcattagt ttggcaagat 240
 aacggtaaac attttttatt ggtaaaagtg gataccgata ataaccgcta tttacttac 300
 aatttggaac aagatgctcc acaaattctg tcacaagacg aatttgaagc ctgctatcaa 360
 gggcagttaa ttttgggtcac gtccagagct tccgtagtag gtcaattagc aaagttcgat 420
 ttcacctggg ttattccggc ggtgatcaaa taccgaaaaa tctttctaga aaccttgatt 480
 20 gtttcgatct ttttgcaaat ttttgccta attacaccgc tattcttcca agttgttatg 540
 gataaagtac tgggtgcatcg aggtttttca accttgaata tcattacggg tgccttagct 600
 attgtgatca tctttgaaat tgtactaagt gggttgagaa cctatgtttt ttctcatagc 660
 actagccgta ttgatgttga attagggcgt aaattatttc gacatttatt atcactaccc 720
 atttcttatt ttgaaaacag acgagttgga gatacagtcg ctagggttag agaattagat 780
 25 caaattcgta atttccttac cggacaagca ttaacctcgg tgttagatct cttattctct 840
 tttatctttt ttgccgtaat gtggtattac agcccaaaat taaccttggg aattcttggg 900
 tcattgccct gctatatttt atggtcaatt tttattagtc cgatttttaag acggcgttta 960
 gatgagaaat ttgcccgaag tgctgataac caagcattct tagttgagtc ggtaacagcc 1020
 atcaatatga ttaaagcgat ggcggttgct ccacaaatga cggatacatg ggataaacag 1080
 30 ctggcaagct atgtttcatc aagtttccgt gtcaccgtat tagcaaccat tgggcaacaa 1140
 ggtgtacaac ttattcaaaa aaccggtatg gtgattaacc tttgggttagg ggcacactta 1200
 gttatttcag gcgatctgag tattgggcaa ttaattgcct ttaatatgct atcagggcaa 1260
 gtgattgcac cgggtgattcg gctggctcag ctctggcaag atttccaaca agttgggatt 1320
 tccgtcactc gcttaggtga tgttttaaac tctccaaccg aacaatatca aggcaaatta 1380
 35 tcactaccag aaataaaaagg cgatatctca tttaaaaata tccgcttag atataaacca 1440
 gatgcaccaa ctattttaaa taatgtgaat ttagaaaatta ggcaaggaga agtgattggg 1500
 attgttggac gttccgggtc aggcaaaagt actctgacta aattactgca acgtttttat 1560
 attcctgaaa atgggcagggt ttgattgat ggacatgatc tagccttagc tgatccaaac 1620
 tggctacgcc gtcaaatagg tgtagtgtcg caagataatg tgtattataa ccgcagtatc 1680
 40 cgagaaaata ttgcgctatc agatccagga atgccaatgg agcgagtaat ttatgcagca 1740
 aaattagcag gggctcacga tttatttcca gaattgcgtg aagggtataa caccattgtg 1800
 ggtgaacaag gagcggggct ttcaggcggg caacgccaac ggattgcat tgctcgagct 1860
 ttggtaaaca acccgaaaat cctgattttt gatgaggcaa ccagtgccct cgattacgaa 1920
 tctgagcata ttattatgca aaatatgcaa aaaatatgcc aaggcagaac cgtgattttg 1980
 45 attgcacatc gtttatcgac cgtcaaaaat gcggatcgaa ttattgtgat ggaaaagggg 2040
 gaaattgttg agcaaggcaa gcaccacgaa ttactgcaaa acagtaacgg actttatttc 2100
 tacttacacc aattacaact taat 2124

50 <210> 24
 <211> 708
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Traducción de SEQ ID 23

<400> 24
 60 Met Glu Ala Asn His Gln Arg Asn Asp Leu Gly Leu Val Ala Leu Thr
 1 5 10 15
 Met Leu Ala Gln Tyr His Asn Ile Ser Leu Asn Pro Glu Glu Ile Lys
 20 25 30
 His Lys Phe Asp Leu Asp Gly Lys Gly Leu Ser Leu Thr Ala Trp Leu
 35 40 45
 65 Leu Ala Ala Lys Ser Leu Ala Leu Lys Ala Lys His Ile Lys Lys Glu
 50 55 60
 Ile Ser Arg Leu His Leu Val Asn Leu Pro Ala Leu Val Trp Gln Asp

ES 2 684 556 T3

	65					70					75					80
	Asn	Gly	Lys	His	Phe	Leu	Leu	Val	Lys	Val	Asp	Thr	Asp	Asn	Asn	Arg
					85					90				95		
5	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Asn	Leu	Glu	Gln	Asp	Ala	Pro	Gln	Ile	Leu	Ser	Gln
				100					105					110		
	Asp	Glu	Phe	Glu	Ala	Cys	Tyr	Gln	Gly	Gln	Leu	Ile	Leu	Val	Thr	Ser
			115					120					125			
	Arg	Ala	Ser	Val	Val	Gly	Gln	Leu	Ala	Lys	Phe	Asp	Phe	Thr	Trp	Phe
		130				135						140				
10	Ile	Pro	Ala	Val	Ile	Lys	Tyr	Arg	Lys	Ile	Phe	Leu	Glu	Thr	Leu	Ile
	145					150					155				160	
	Val	Ser	Ile	Phe	Leu	Gln	Ile	Phe	Ala	Leu	Ile	Thr	Pro	Leu	Phe	Phe
					165					170					175	
	Gln	Val	Val	Met	Asp	Lys	Val	Leu	Val	His	Arg	Gly	Phe	Ser	Thr	Leu
				180					185					190		
15	Asn	Ile	Ile	Thr	Val	Ala	Leu	Ala	Ile	Val	Ile	Ile	Phe	Glu	Ile	Val
			195					200					205			
	Leu	Ser	Gly	Leu	Arg	Thr	Tyr	Val	Phe	Ser	His	Ser	Thr	Ser	Arg	Ile
		210					215					220				
20	Asp	Val	Glu	Leu	Gly	Ala	Lys	Leu	Phe	Arg	His	Leu	Leu	Ser	Leu	Pro
	225					230					235					240
	Ile	Ser	Tyr	Phe	Glu	Asn	Arg	Arg	Val	Gly	Asp	Thr	Val	Ala	Arg	Val
					245					250					255	
	Arg	Glu	Leu	Asp	Gln	Ile	Arg	Asn	Phe	Leu	Thr	Gly	Gln	Ala	Leu	Thr
				260					265					270		
25	Ser	Val	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Ser	Phe	Ile	Phe	Phe	Ala	Val	Met	Trp
			275					280					285			
	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Lys	Leu	Thr	Leu	Val	Ile	Leu	Gly	Ser	Leu	Pro	Cys
		290					295					300				
30	Tyr	Ile	Leu	Trp	Ser	Ile	Phe	Ile	Ser	Pro	Ile	Leu	Arg	Arg	Arg	Leu
	305					310					315					320
	Asp	Glu	Lys	Phe	Ala	Arg	Ser	Ala	Asp	Asn	Gln	Ala	Phe	Leu	Val	Glu
					325					330					335	
35	Ser	Val	Thr	Ala	Ile	Asn	Met	Ile	Lys	Ala	Met	Ala	Val	Ala	Pro	Gln
				340					345					350		
	Met	Thr	Asp	Thr	Trp	Asp	Lys	Gln	Leu	Ala	Ser	Tyr	Val	Ser	Ser	Ser
			355					360					365			
	Phe	Arg	Val	Thr	Val	Leu	Ala	Thr	Ile	Gly	Gln	Gln	Gly	Val	Gln	Leu
		370					375					380				
40	Ile	Gln	Lys	Thr	Val	Met	Val	Ile	Asn	Leu	Trp	Leu	Gly	Ala	His	Leu
	385					390					395					400
	Val	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	Ser	Ile	Gly	Gln	Leu	Ile	Ala	Phe	Asn	Met
					405					410					415	
45	Leu	Ser	Gly	Gln	Val	Ile	Ala	Pro	Val	Ile	Arg	Leu	Ala	Gln	Leu	Trp
				420					425					430		
	Gln	Asp	Phe	Gln	Gln	Val	Gly	Ile	Ser	Val	Thr	Arg	Leu	Gly	Asp	Val
			435				440						445			
	Leu	Asn	Ser	Pro	Thr	Glu	Gln	Tyr	Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Leu	Pro	Glu
		450					455					460				
50	Ile	Lys	Gly	Asp	Ile	Ser	Phe	Lys	Asn	Ile	Arg	Phe	Arg	Tyr	Lys	Pro
	465					470					475					480
	Asp	Ala	Pro	Thr	Ile	Leu	Asn	Asn	Val	Asn	Leu	Glu	Ile	Arg	Gln	Gly
					485					490					495	
55	Glu	Val	Ile	Gly	Ile	Val	Gly	Arg	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Leu
				500					505					510		
	Thr	Lys	Leu	Leu	Gln	Arg	Phe	Tyr	Ile	Pro	Glu	Asn	Gly	Gln	Val	Leu
			515					520					525			
	Ile	Asp	Gly	His	Asp	Leu	Ala	Leu	Ala	Asp	Pro	Asn	Trp	Leu	Arg	Arg
		530					535					540				
60	Gln	Ile	Gly	Val	Val	Leu	Gln	Asp	Asn	Val	Leu	Leu	Asn	Arg	Ser	Ile
	545					550					555					560
	Arg	Glu	Asn	Ile	Ala	Leu	Ser	Asp	Pro	Gly	Met	Pro	Met	Glu	Arg	Val
					565					570					575	
65	Ile	Tyr	Ala	Ala	Lys	Leu	Ala	Gly	Ala	His	Asp	Phe	Ile	Ser	Glu	Leu
				580					585					590		
	Arg	Glu	Gly	Tyr	Asn	Thr	Ile	Val	Gly	Glu	Gln	Gly	Ala	Gly	Leu	Ser
			595					600					605			
	Gly	Gly	Gln	Arg	Gln	Arg	Ile	Ala	Ile	Ala	Arg	Ala	Leu	Val	Asn	Asn

ES 2 684 556 T3

```

        610                615                620
Pro Lys Ile Leu Ile Phe Asp Glu Ala Thr Ser Ala Leu Asp Tyr Glu
625                630                635                640
Ser Glu His Ile Ile Met Gln Asn Met Gln Lys Ile Cys Gln Gly Arg
5 Thr Val Ile Leu Ile Ala His Arg Leu Ser Thr Val Lys Asn Ala Asp
        645                650                655
Arg Ile Ile Val Met Glu Lys Gly Glu Ile Val Glu Gln Gly Lys His
        660                665                670
His Glu Leu Leu Gln Asn Ser Asn Gly Leu Tyr Ser Tyr Leu His Gln
10        675                680                685                690                695                700
Leu Gln Leu Asn
705

15
<210> 25
<211> 1434
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína de secreción de microcina H47 d153_00982 d153_00982 - LKTD

25 <400> 25
atgaaaatat ggcttagtggt tatttatgaa tttttcctac gctataaaaa catttgggca 60
gaagtattgga aaattcgtaa agaattagac caccctaaaca gaaaaaaaaga cgaaagtga 120
tttttaccgg cacatttaga actgattgaa acccccggtt ctaaaaaacc acgtctaatt 180
gcttatttga ttatgctatt tttagttgtg gcaattgtgc ttgccagtgt aagcaaagtt 240
30 gaaattgtgg cgactgctcc cggtaaatga acttttagtg gcagaagtaa agaaattaaa 300
ccgattgaaa acgccattgt acaagaaatt ttcgttaaag atgggcagtt tgtggaaaaa 360
gggcaattat tagtcagctt aactgcattg ggttctgatg cagatatcaa aaagaccatg 420
gcttcacttt ctttagctaa actggagaac tatcgctacc aaactttgct tactgccatt 480
gaaaaagagt ctttgccggt gattgattta tctagaaccg aatttaaaga ttcattcgaa 540
35 gaagatcgac tacgtattaa acacttaatt gaggagcaat acaccacttg gcaaaaaaca 600
aaaacacaga aaacttttagc gtataagcgt aaagaggctg aaaaacaaac aatatttgcc 660
tatgtccgta aatatgaagg tgcaacacgt attgaacaag aaaaattaaa agactttaag 720
gcactttata aacagaagtc tttatctaag cacgaacttc ttgcgcaaga aaataaatta 780
attgaggctc agaatgagct agctgtttat cgctcaaaat taaatgaatt agaaaatgat 840
40 ctactcaatg taaaagaaga acttgaattg atcacgcaat tctttaaag cgatgtgttg 900
gaaaaattaa agcaacatat tgaaaatgaa cgccaacttc ggctcgagtt agaaaaaat 960
aatcaacgca gacaggcctc gatgatcaga gcaccgggtt ccggtacggt tcagcaactg 1020
aaaattcaca ctataggtgg tgttggtacg actgctgaaa ccttgatgat cattgtgccg 1080
gaagacgatg tgttagaggc caccgctctg gttccaaaca aagatatcgg ctttgttgca 1140
45 gcagggcagg aggtgattat taaagtggaa actttccctt atacacgcta tggttatcta 1200
actggtcgaa ttaaacatat tagcccggat gcgattgaac aacctaatgt aggcttagtt 1260
tttaattgcaa ctatagctat agataggaag aatctaacat cgctgatgg gcgaaaaatt 1320
gatttgagtt caggtatgac aataactgct gaaatcaaaa ccggtgaacg gagtgaatg 1380
50 agttatttac tcagcccatt agaagaatct gtcacagaaa gttaaaggga acgc 1434

<210> 26
<211> 478
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Traducción de SEQ ID 25

60 <400> 26
Met Lys Ile Trp Leu Ser Gly Ile Tyr Glu Phe Phe Leu Arg Tyr Lys
1 5 10 15
Asn Ile Trp Ala Glu Val Trp Lys Ile Arg Lys Glu Leu Asp His Pro
20 25 30
65 Asn Arg Lys Lys Asp Glu Ser Glu Phe Leu Pro Ala His Leu Glu Leu
35 40 45
Ile Glu Thr Pro Val Ser Lys Lys Pro Arg Leu Ile Ala Tyr Leu Ile

```

ES 2 684 556 T3

		50				55			60								
		Met	Leu	Phe	Leu	Val	Val	Ala	Ile	Val	Leu	Ala	Ser	Val	Ser	Lys	Val
		65					70				75					80	
5		Glu	Ile	Val	Ala	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Leu	Thr	Phe	Ser	Gly	Arg	Ser
						85					90				95		
		Lys	Glu	Ile	Lys	Pro	Ile	Glu	Asn	Ala	Ile	Val	Gln	Glu	Ile	Phe	Val
					100					105					110		
		Lys	Asp	Gly	Gln	Phe	Val	Glu	Lys	Gly	Gln	Leu	Leu	Val	Ser	Leu	Thr
				115					120					125			
10		Ala	Leu	Gly	Ser	Asp	Ala	Asp	Ile	Lys	Lys	Thr	Met	Ala	Ser	Leu	Ser
			130					135					140				
		Leu	Ala	Lys	Leu	Glu	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Gln	Thr	Leu	Leu	Thr	Ala	Ile
		145					150					155				160	
		Glu	Lys	Glu	Ser	Leu	Pro	Val	Ile	Asp	Leu	Ser	Arg	Thr	Glu	Phe	Lys
15						165					170					175	
		Asp	Ser	Ser	Glu	Asp	Arg	Leu	Arg	Ile	Lys	His	Leu	Ile	Glu	Glu	
					180				185					190			
		Gln	Tyr	Thr	Thr	Trp	Gln	Lys	Gln	Lys	Thr	Gln	Lys	Thr	Leu	Ala	Tyr
				195					200					205			
20		Lys	Arg	Lys	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Thr	Ile	Phe	Ala	Tyr	Val	Arg	Lys
			210					215					220				
		Tyr	Glu	Gly	Ala	Thr	Arg	Ile	Glu	Gln	Glu	Lys	Leu	Lys	Asp	Phe	Lys
		225					230					235				240	
		Ala	Leu	Tyr	Lys	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Lys	His	Glu	Leu	Leu	Ala	Gln
25						245					250					255	
		Glu	Asn	Lys	Leu	Ile	Glu	Ala	Gln	Asn	Glu	Leu	Ala	Val	Tyr	Arg	Ser
					260					265					270		
		Lys	Leu	Asn	Glu	Leu	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Asn	Val	Lys	Glu	Glu	Leu
				275					280					285			
30		Glu	Leu	Ile	Thr	Gln	Phe	Phe	Lys	Ser	Asp	Val	Leu	Glu	Lys	Leu	Lys
			290					295					300				
		Gln	His	Ile	Glu	Asn	Glu	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Asn
		305					310					315				320	
		Asn	Gln	Arg	Arg	Gln	Ala	Ser	Met	Ile	Arg	Ala	Pro	Val	Ser	Gly	Thr
35						325					330					335	
		Val	Gln	Gln	Leu	Lys	Ile	His	Thr	Ile	Gly	Gly	Val	Val	Thr	Thr	Ala
					340					345					350		
		Glu	Thr	Leu	Met	Ile	Ile	Val	Pro	Glu	Asp	Asp	Val	Leu	Glu	Ala	Thr
				355					360					365			
40		Ala	Leu	Val	Pro	Asn	Lys	Asp	Ile	Gly	Phe	Val	Ala	Ala	Gly	Gln	Glu
			370					375					380				
		Val	Ile	Ile	Lys	Val	Glu	Thr	Phe	Pro	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Gly	Tyr	Leu
		385					390					395				400	
		Thr	Gly	Arg	Ile	Lys	His	Ile	Ser	Pro	Asp	Ala	Ile	Glu	Gln	Pro	Asn
45						405					410					415	
		Val	Gly	Leu	Val	Phe	Asn	Ala	Thr	Ile	Ala	Ile	Asp	Arg	Lys	Asn	Leu
					420					425					430		
		Thr	Ser	Pro	Asp	Gly	Arg	Lys	Ile	Asp	Leu	Ser	Ser	Gly	Met	Thr	Ile
				435					440					445			
50		Thr	Ala	Glu	Ile	Lys	Thr	Gly	Glu	Arg	Ser	Val	Met	Ser	Tyr	Leu	Leu
			450					455					460				
		Ser	Pro	Leu	Glu	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Ser	Leu	Arg	Glu	Arg		
		465					470					475					

REIVINDICACIONES

1. Vacuna para provocar una respuesta inmunogénica en un animal, comprendiendo la vacuna bacterias que contienen una mutación atenuante en un gen, en la que la mutación modifica la expresión y/o la actividad biológica de un polipéptido o proteína codificada por el gen, dando lugar a una virulencia atenuada de las bacterias, en la que la mutación es una delección dentro del marco que da lugar a que las bacterias secreten una leucotoxina (LktA) truncada,
5 en la que además las bacterias son los serotipos A1 y A6 de *Mannheimia haemolytica*,
10 en la que además la delección está dentro del locus del gen de LktCA que codifica acilasa (LktC) y leucotoxina A (LktA),
en la que además la secuencia de aminoácidos de la forma truncada secretada de LktA consiste en la secuencia codificada por la SEQ ID NO: 16 o 17.
2. Vacuna, según la reivindicación 1, que comprende además un portador, vehículo, diluyente o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable.
15
3. Vacuna, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un adyuvante.
4. Vacuna, según la reivindicación 3, en la que el adyuvante es bacterias inactivadas, virus inactivados, fracciones de bacterias inactivadas, lipopolisacáridos bacterianos, toxinas bacterianas, o derivados o combinaciones de los mismos.
20
5. Vacuna, según la reivindicación 3 ó 4, que comprende además bacterias adicionales en combinación con *M. haemolytica*.
25
6. Vacuna, según la reivindicación 5, que comprende *P. multocida* e *Histophilus somni* (H. Somni).
7. Vacuna, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para usar en la vacunación de un animal contra las enfermedades causadas por *M. haemolytica*, en la que la vacuna se administra al menos una vez.
30
8. Vacuna para usar, según la reivindicación 7, en la que el animal es un animal bovino.
9. Vacuna para usar, según la reivindicación 8, en la que el animal bovino es un ternero que tiene 28 días o más.
10. Vacuna para usar, según la reivindicación 7, en la que la vacuna se administra por vía intranasal.
35
11. Vacuna para usar, según la reivindicación 7, en la que la vacuna es para la protección de los animales bovinos contra la cepa de *M. haemolytica* A1 o A6, en la que la vacuna se administra por vía intranasal.

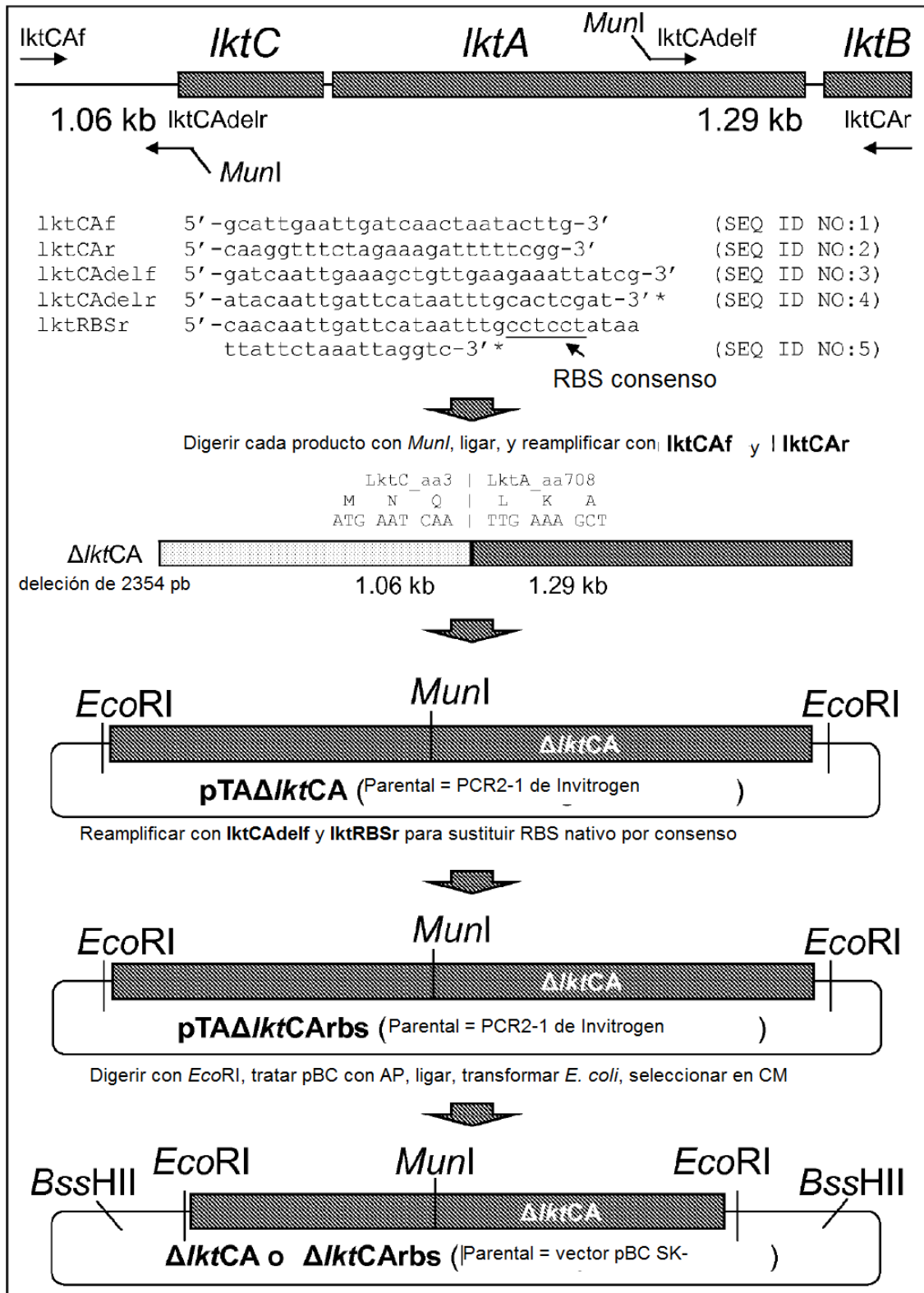


Figura 1 (1/2)

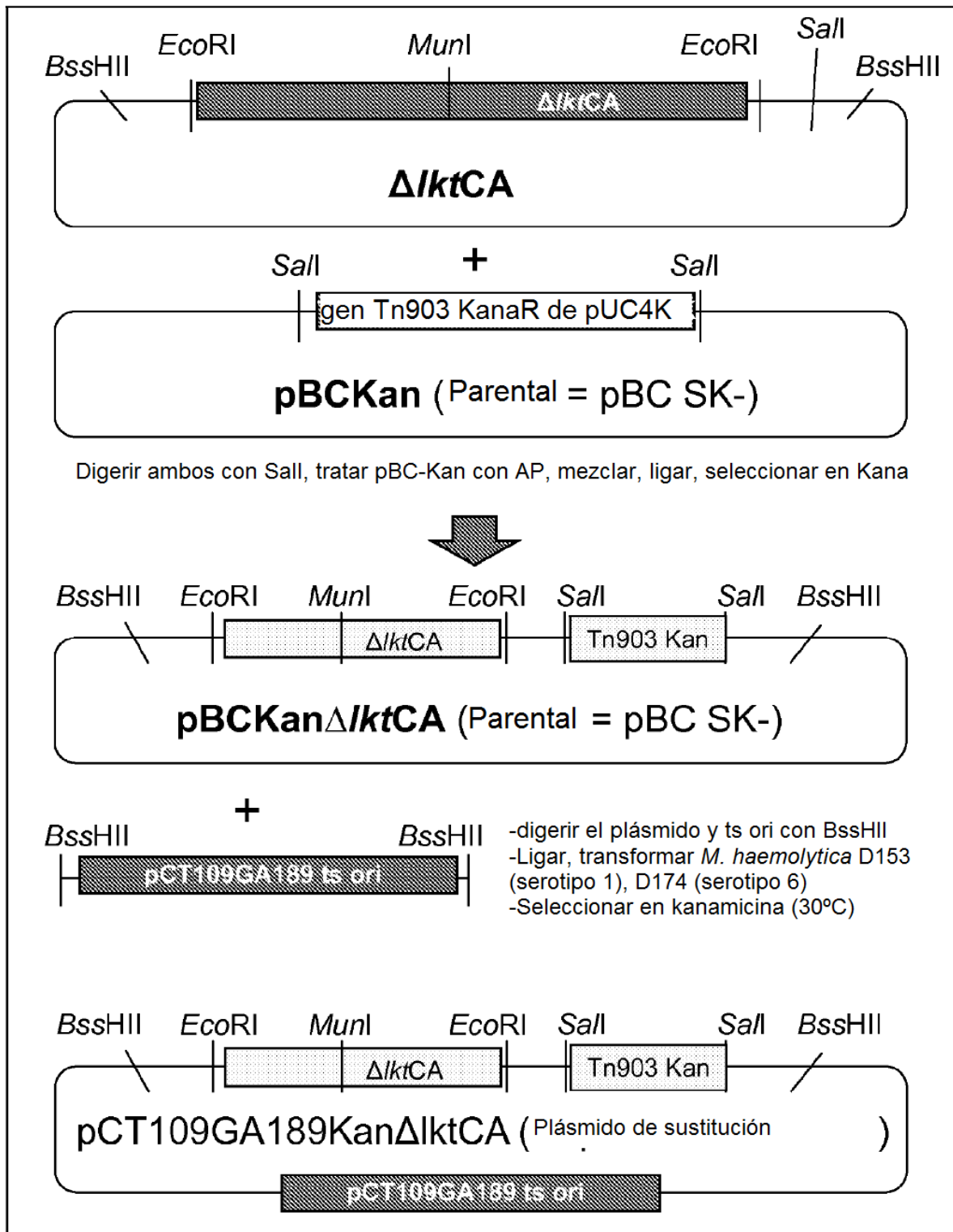


Figura 1 (2/2)

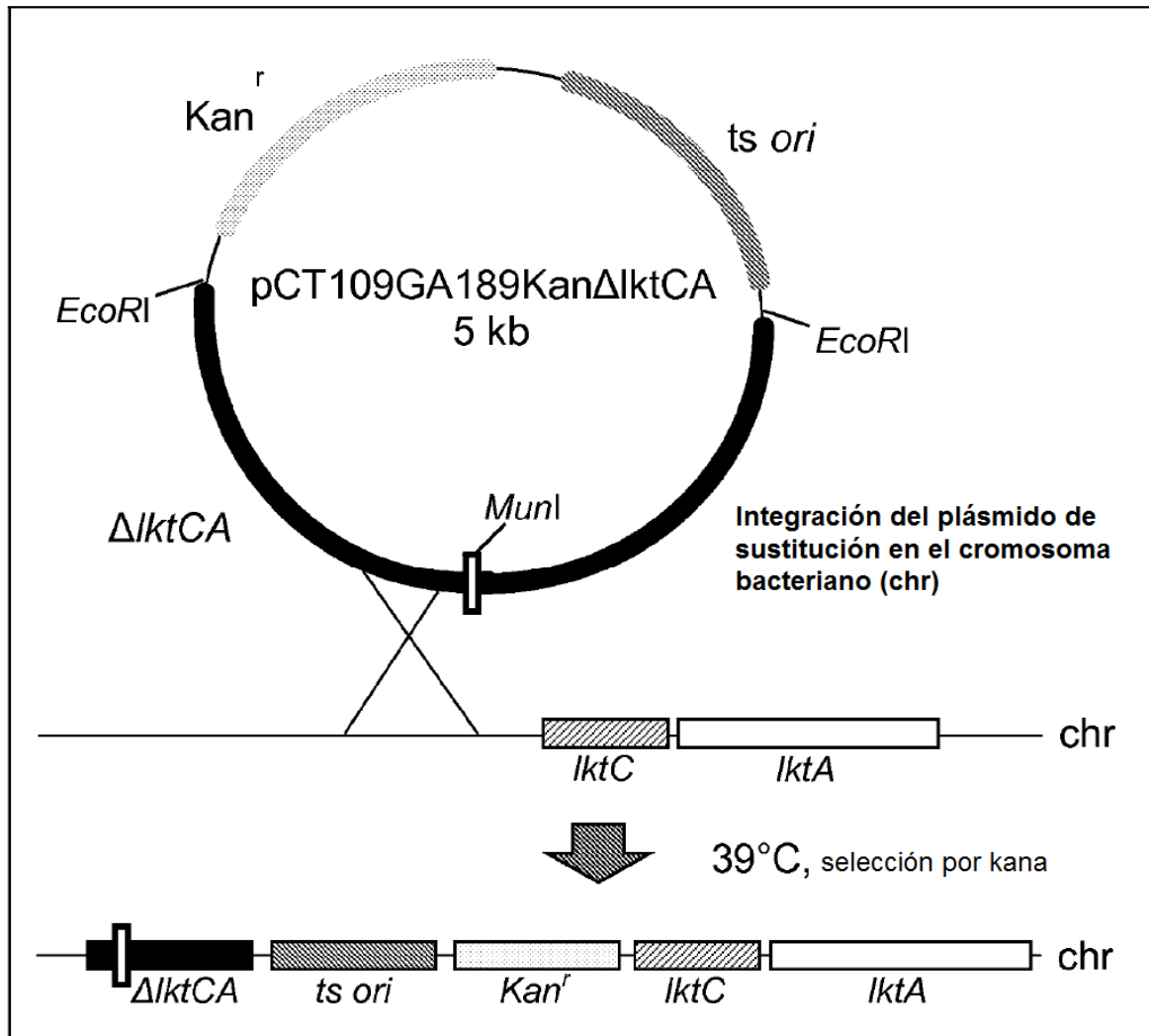


Figura 2

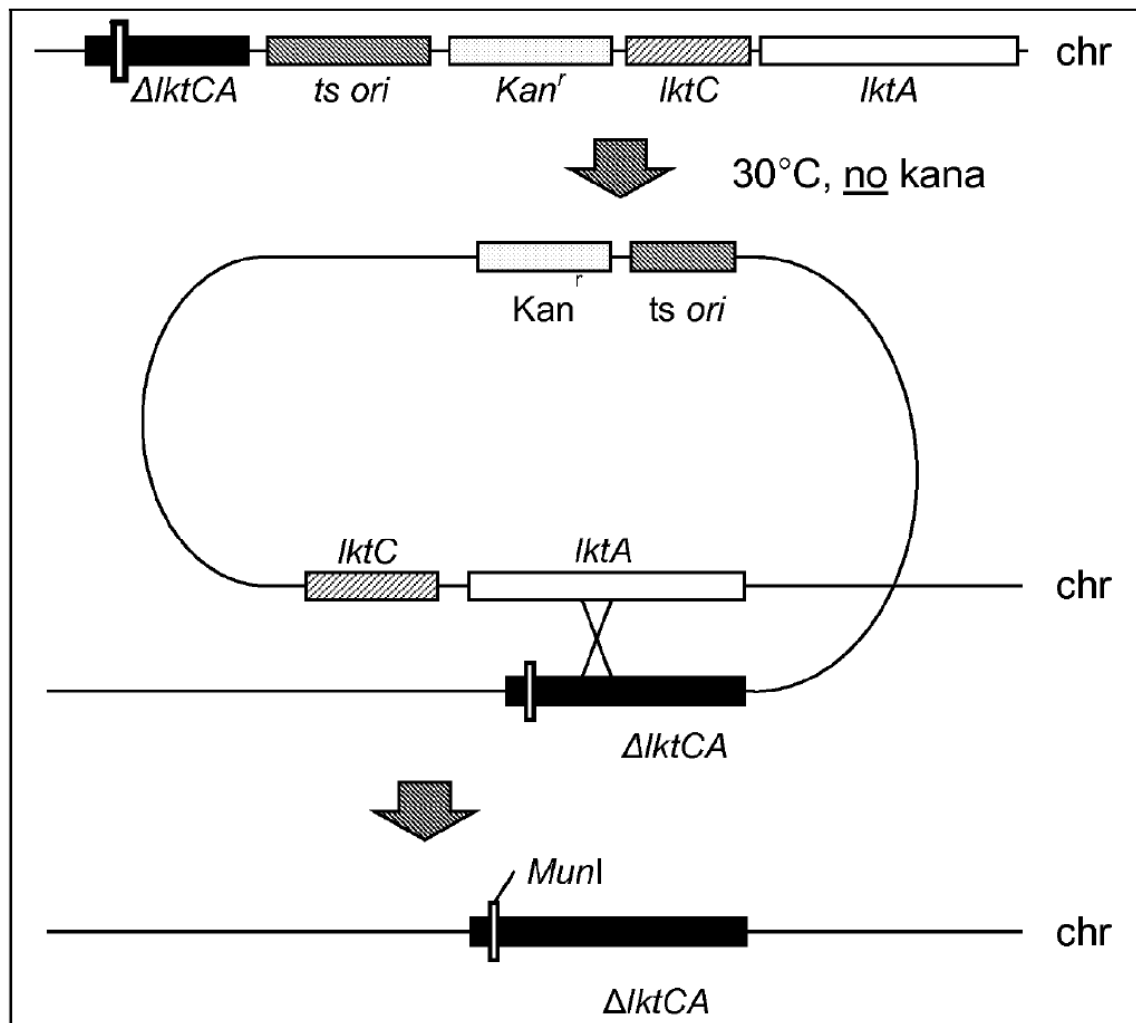


Figura 3

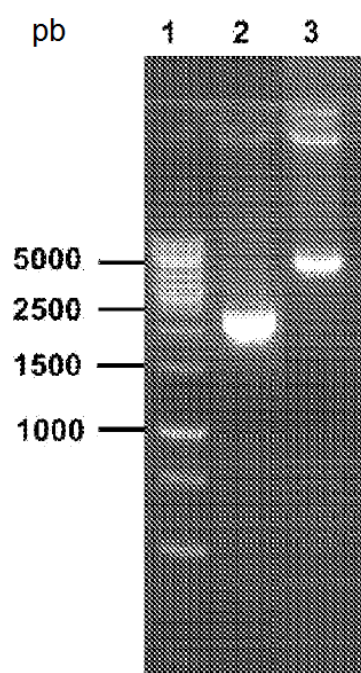


Figura 4A

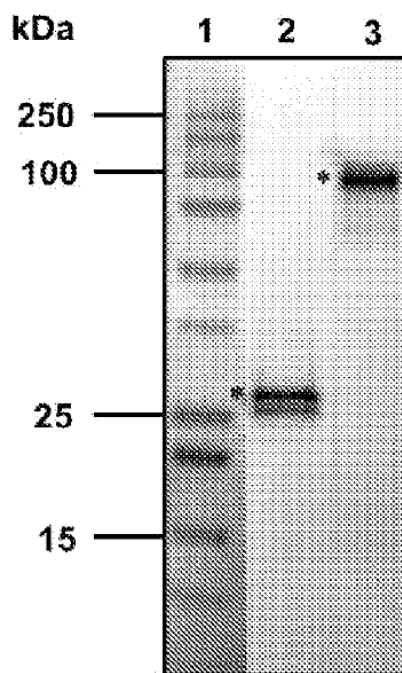


Figura 4B

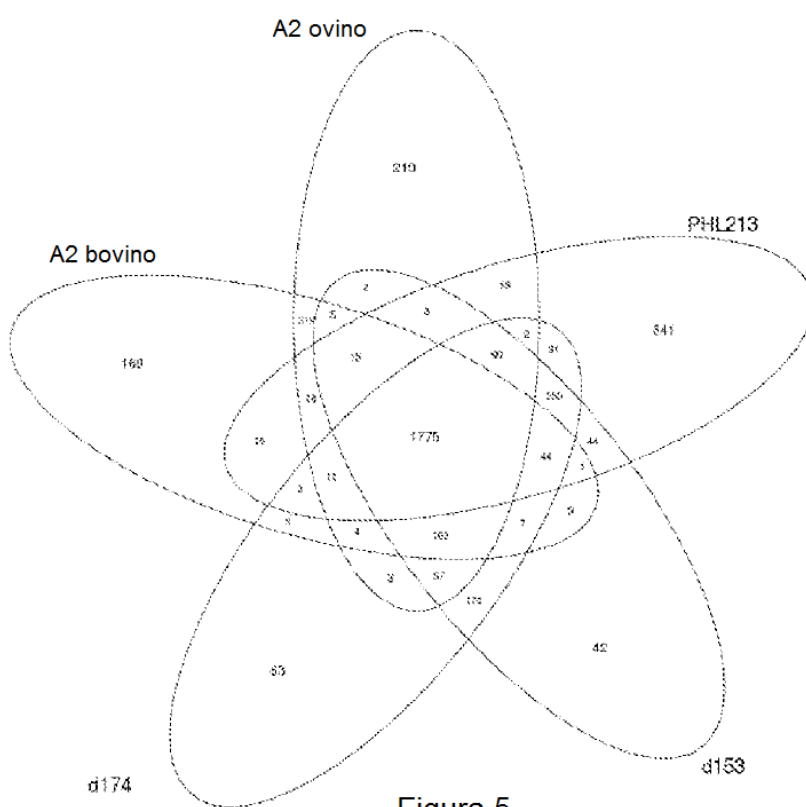


Figura 5