



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 122016029840-0 B1



(22) Data do Depósito: 20/09/2005

(45) Data de Concessão: 13/10/2021

(54) Título: COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, MÉTODO DE FABRICAR UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, E, USO DA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA

(51) Int.Cl.: A61K 39/085; A61K 39/116; A61P 31/04; C07K 16/12.

(30) Prioridade Unionista: 15/02/2005 GB 0503143.0; 22/09/2004 GB 0421081.1; 22/09/2004 GB 0421082.9; 22/09/2004 GB 0421078.7; 22/09/2004 GB 0421079.5.

(73) Titular(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A..

(72) Inventor(es): CINDY CASTADO; NICOLAS PIERRE FERNAND LECRENIER; CECILE ANNE NEYT; JAN POOLMAN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2005010184 de 20/09/2005

(87) Publicação PCT: WO 2006/032472 de 30/03/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 19/12/2016

(62) Pedido Original do Dividido: PI0515516-9 - 20/09/2005

(57) Resumo: O presente pedido refere-se a composições imunogênicas compreendendo uma mistura de antígenos estafilocócicos que combinam antígeno tendo diferentes funções, por exemplo, combinações incluindo uma proteína estafilocócica de ligação de componente extracelular, e uma proteína transportadora estafilocócica ou uma proteína estafilocócica de ligação de componente extracelular e um regulador estafilocócico de virulência ou toxina ou uma proteína transportadora estafilocócica e um regulador estafilocócico de virulência ou toxina. Vacinas, métodos de tratamento, usos e processos para fabricar a vacina estafilocócica são também descritos.

“COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, MÉTODO DE FABRICAR UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, E, USO DA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA”

“Dividido do PI0515516-9, depositado em 20/09/2005”

Campo Técnico

[001] A presente invenção refere-se ao campo das composições estafilocócicas imunogênicas e vacinas, sua fabricação e o uso destas composições em medicina. Mais particularmente, refere-se a composições de vacina compreendendo a combinação de antígenos para o tratamento ou prevenção de infecção estafilocócica. Métodos de usar estas vacinas em medicina e métodos para sua preparação são também providos.

Fundamentos

[002] O número de infecções adquiridas na comunidade como adquiridas nos hospitais tem aumentado nos anos recentes com o uso aumentado de dispositivos intravasculares. As infecções adquiridas em hospitais (nossocomiais) são a causa principal de morbidez e mortalidade, mais particularmente nos Estados Unidos, onde afeta mais de 2 milhões de pacientes anualmente. Após vários estudos, cerca de 6 por cento dos pacientes americanos irão adquirir uma infecção durante sua estadia no hospital. A carga econômica nos Estados Unidos foi estimada como sendo maior que \$ 4,5 bilhões de dólares em 1992 (Emori e Gaynes, 1993, Clin. Microbiol. Rev. 6; 428). As mais freqüentes infecções são infecções do trato urinário (UTI- 33% das infecções), seguido por pneumonia (15,5%), infecções no sítio cirúrgico (14,8%) e infecções primárias da corrente sanguínea (13%) Emori e Gaynes, 1993, Clin. Microbiol. Rev. 6; 428).

[003] *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulase-negativos (principalmente *Staphylococcus epidermidis*), *enterococcus* spp, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* são os patógenos nosocomiais principais. Apesar de estes patógenos causarem quase o mesmo número de infecções, a severidade dos distúrbios que podem produzir combinados com a frequência de isolados resistentes a antibióticos equilibra esta faixa para *S. aureus* e *S. epidermidis* como sendo os patógenos nosocomiais mais significantes.

[004] *Staphylococcus aureus* é a causa mais comum de infecções nosocomiais com uma significativa morbidez e mortalidade (Romero-Vivas et al 1995, Infect. Dis. 21; 1417). Ele é a causa se alguns casos de osteomielite, endocardite, artrite séptica, pneumonia, abscessos e síndrome de choque tóxico.

[005] *S. epidermidis* é um comensal de pele normal que é também um importante patógeno oportunístico responsável por infecções de dispositivos médicos implantados e infecções em sítios de cirurgia. Os dispositivos médicos infectados por *S. epidermidis* incluem marca-passos cardíacos, *shunts* de fluido cerebrospinal, catéteres de diálise peritoneal ambulatoria contínua, dispositivos ortopédicos e válvulas protéticas do coração.

[006] As infecções por *S. aureus* e *S. epidermidis* são tratadas com antibióticos com penicilina sendo a droga de escolha enquanto vancomicina é usada para isolados resistentes a meticilina. A porcentagem de cepas estafilocócicas demonstrando resistência de espectro amplo para os antibióticos tem se tornado cada vez mais prevalente desde os anos 80 (Panlilo et al 1992, Infect.Control. Hosp. Epidemiol. 13; 582), colocando uma ameaça para uma terapia antimicrobiana eficaz. Além disso, a emergência recente de cepas de *S. aureus* resistente a vancomicina tem ocasionado o medo de que as cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina irão surgir e se difundir para as quais não se encontra uma terapia eficaz disponível.

[007] Uma abordagem alternativa de usar anticorpos contra antígenos estafilocócicos em imunoterapia passiva tem sido investigada. A terapia envolvendo a administração de antisoros policlonais está sob desenvolvimento (WO 00/15238, WO 00/12132) assim como tratamento com um anticorpo monoclonal contra ácido lipoteicóico (WO 98/57994).

[008] Uma abordagem alternativa deve ser o uso de vacinação ativa para gerar uma resposta imune contra estafilococos. Vários candidatos para inclusão como componentes de vacina foram identificados. Estes incluem proteína de ligação de Fibronectina (US5840846), análogo de MHC II (US5648240), proteína de ligação de fibrinogênio (US6008341), GehD (US 2002/0169288), proteína de ligação de colágeno (US6288214), SdrF, SdrG e SdrH (WO 00/12689), exotoxinas mutantes SEA e SEB (WO 00/02523) e proteína de ligação de vitronectina 52kDa (WO 01/60852).

[009] O genoma de *S. aureus* foi seqüenciado e muitas seqüências de codificação foram identificadas (EP786519, WO 02/094868). O mesmo é verdadeiro para *S. epidermidis* (WO 01/34809). Como um refinamento desta abordagem, outros identificaram proteínas que são reconhecidas por soros hiperimune de pacientes que tinham sofrido infecção estafilocócica (WO01/98499, WO 02/059148).

[0010] A primeira geração de vacinas marcadas contra *S. aureus* ou contra as exoproteínas que ela produz tem alcançado sucesso limitado (Lee 1996 Trends Microbiol. 4; 162). Permanece a necessidade de desenvolvimento de vacinas eficaz contra infecções estafilocócicas.

[0011] Assim, a presente invenção provê uma composição imunogênica compreendendo pelo menos duas proteínas diferentes ou fragmentos imunogênicos das mesmas, selecionadas dentre pelo menos dois grupos de proteínas ou fragmentos imunogênicos selecionadas dentre os seguintes grupos:

[0012] Grupo a) pelo menos uma proteína de ligação de componente

extracelular estafilocócico de ou fragmento imunogênico da mesma selecionadas dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, proteína de ligação SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipase GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig e MAP;

[0013] Grupo b) pelo menos uma proteína transportadora estafilocócica ou fragmento imunogênico da mesma selecionada dentre o grupo consistindo de transportador ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, Site e transportador de Ni ABC;

[0014] Grupo c) pelo menos um regulador estafilocócico de virulência, toxina ou fragmento imunogênico do mesmo selecionado dentre o grupo consistindo de alfa toxina (HIIa), mutante H35R de alfa toxina, proteína de ativação de RNA III (RAP).

Descrição da figuras

[0015] Figura 1 - Seqüências de polipeptídeos de proteínas preferidas. Tabela 1 provê informação sobre qual proteína é representada por cada SEQ ID.

[0016] Figura 2 - seqüências de nucleotídeos codificando proteínas preferidas. Tabela 1 provê informação sobre qual proteína é codificada por cada SEQ ID.

[0017] Figura 3 - Purificação de alfa toxina sob condições nativas. Painel A mostra SDS-PAGE colorido com coomassie de amostras preparadas durante purificação de alfa toxina. Trilha 1 - marcadores de peso molecular, trilha 2 - fração solúvel contendo alfa toxina super- expressa, trilha 3 - fluxo através de coluna Ni-NTA, trilha 4 - frações eluídas com 10% tampão B, trilha 5 - frações eluídas com 20% tampão B, trilha 6 - frações eluídas com 30% tampão B, trilha 7 - frações eluídas com 50% tampão B,

trilha 8 - frações eluídas com 75% tampão B, trilha 9 e 10 frações eluídas com 100% tampão B, trilha 11 bactérias a T=O antes de indução, trilha 12 - bactérias a T=4 horas após indução, trilha 13 - lisado de células, trilha 14 - fração solúvel, trilha 15 - infração solúvel. Paineis A e B mostram SDS-PAGE colorido com Coomassie de 10, 5, 2 e 1 µl de alfa toxina purificada.

[0018] Figura 4 - Purificação de condições sub-desnaturantes de SdrC. Paineis A e B mostram SDS-PAGE colorido com Coomassie de amostras preparado durante purificação de alfa toxina. Trilha M - marcadores de peso molecular, trilha de partida – sobrenadante formado a partir da fração insolúvel contendo SdrC super-expresso, trilha FT1 - fluxo através da coluna de Ni-NTA, trilha C - frações eluídas com tampão C de lavagem, trilha D - frações eluídas com tampão D, trilha E - frações eluídas com tampão E.

[0019] Paineis C e D mostram SDS-PAGE colorido com Coomassie de 1, 2, 5 e 10 µl do SdrC purificado.

[0020] Figura 5 - Resultados ELISA para antisoros contra proteínas estafilocócicas em placas revestidas com proteínas purificadas.

[0021] Concentrado (*pool*) de camundongo pré – Resultado usando soros concentrados extraídos de camundongos pre-inoculação. Concentrado camundongos pós III - resultado usando soros de camundongo concentrados extraídos pós- imunização. Concentrado de coelho pré - Resultado usando soros concentrados extraídos de coelhos pre-inoculação. Concentrado de coelho Pos III - Resultado usando soros concentrados de coelho extraídos pós- imunização. Controle negativo B1c.

[0022] Figura 6 - Resultados ELISA para antisoros de camundongo criados contra proteínas estafilocócicas em placas revestidas com estafilococos mortos.

[0023] Paineis A e B usam placas revestidas com células totais mortas sorotipo 5 de *S. aureus*. Paineis C e D usam placas revestidas com células totais mortas sorotipo 8 de *S. aureus*. Paineis E e F usam placas revestidas com células

totais mortas de *S. epidermis*.

[0024] A linha marcada com sinais quadrados mostra o resultado ELISA usando antisoros de camundongos imunizados três vezes com proteínas estafilocócicas indicadas. A linha marcada com sinais de diamante mostra o resultado ELISA para soros de camundongo pré-imune.

[0025] Figura 7 - Resultados ELISA para antisoros de coelho criados contra proteínas estafilocócicas em placas revestidas com estafilococos mortos.

[0026] Painel A usa placas revestidas com células totais mortas sorotipo 5 de *S. aureus*. Painel B usa placas revestidas com células totais mortas sorotipo 8 de *S. aureus*. Painel C usa placas revestidas com células totais mortas de *S. epidermis*.

[0027] A linha marcada com sinais quadrados mostra o resultado ELISA usando antisoros de coelhos imunizados três vezes com proteínas estafilocócicas indicadas (exceto para HarA onde somente uma imunização foi dada). A linha marcada com sinais de diamante mostra o resultado ELISA para soros de coelho pré-ímmunes.

Descrição Detalhada

[0028] A presente invenção descreve combinações particulares de antígenos estafilocócicos que quando combinados, levam à produção de uma composição imunogênica que é eficaz para tratar ou prevenir infecção estafilocócica. Composições imunogênicas da invenção de modo apropriado incorporam antígenos que estão envolvidos em diferentes funções estafilocócicas. Estas composições imunogênicas marcam a resposta imune para aspectos diferentes da função estafilocócica e são assim capazes de induzir uma resposta imune particularmente eficaz.

[0029] As infecções estafilocócicas progridem através de vários estágios s diferentes. Por exemplo, ciclo de vida de estafilococos envolve a colonização comensal, iniciação de infecção pode acesso aos tecidos

adjuntivos ou à corrente sanguínea, multiplicação aneróbica no sangue, interjogo entre determinantes de virulência de *S. aureus* e dos mecanismos de defesa do hospedeiro e indução de complicações incluindo endocardite, formação de abscesso metastático e síndrome de sepsia. Moléculas diferentes na superfície da bactéria estarão envolvidas em diferentes etapas do ciclo de infecção. Ao visar a resposta imune contra uma quantidade eficaz de uma combinação de antígenos particulares envolvidos em diferentes processos de infecção estafilocócica, uma composição imunogênica estafilocócica ou vacina com aumentada eficácia pode ser obtida.

[0030] Em particular, combinações de determinados antígenos de diferentes classes, alguns dos quais estão envolvidos em adesão às células hospedeiras, alguns dos quais estão envolvidos em aquisição de ferro ou outras funções de transportador, sendo alguns toxinas ou reguladores de virulência e antígenos imunodominantes, podem elicitar uma resposta imune que protege contra estágios múltiplos de infecção.

[0031] A eficácia da resposta imune pode ser medida ou em testes de modelo animal como descrito nos exemplos e/ou usando um teste opsonofagocítico como descrito nos exemplos.

[0032] Uma vantagem adicional da invenção é que a combinação de antígenos da invenção de diferentes famílias de proteínas em uma composição imunogênica irá permitir proteção contra uma faixa mais ampla de cepas. A invenção refere-se a composições imunogênicas compreendendo uma pluralidade de proteínas selecionadas dentre pelo menos duas diferentes categorias de proteína, tendo diferentes funções dentro de estafilococos. Exemplos destas categorias de proteínas são proteínas de ligação extracelulares, proteínas transportadoras como proteínas de aquisição de Fe, toxinas ou reguladores de virulência e outras proteínas imunodominantes. As combinações de vacina da invenção são eficazes contra cepas estafilocócicas homólogas (cepas das quais os antígenos são derivados) e preferivelmente

também contra cepas estafilocócicas heterólogas.

[0033] Uma composição imunogênica da invenção compreende um número de proteínas igual ou maior do que 2, 3, 4, 5 ou 6 selecionadas dentre 2 ou 3 dos seguintes grupos:

- grupo a) - pelo menos uma proteína de ligação de componente extracelular estafilocócico ou fragmento imunogênico da mesma selecionada dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, proteína de ligação SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipase GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig e MAP;

- grupo b) - pelo menos uma proteína transportadora estafilocócica ou fragmento imunogênico da mesma selecionada dentre o grupo consistindo de transportador ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC e transportador de Ni ABC;

- grupo c) - pelo menos um regulador estafilocócico de virulência, toxina ou fragmento imunogênico do mesmo selecionado dentre o grupo consistindo de alfa toxina (HIIa), mutante H35R de alfa toxina, proteína de ativação de RNA III (RAP).

[0034] Por exemplo, uma primeira proteína é selecionada dentre grupo a), b) ou c) e uma segunda proteína é selecionada dentre um grupo selecionado dentre grupos a), b) e c) que não inclui a segunda proteína.

[0035] Em uma forma de realização preferida, a composição imunogênica da invenção contém pelo menos uma proteína selecionada dentre o grupo a) e uma proteína adicional selecionada dentre o grupo b) e/ou grupo c).

[0036] Em uma outra forma de realização, a composição imunogênica da invenção contém pelo menos um antígeno selecionado dentre grupo b) e

uma proteína adicional selecionada dentre o grupo c) e/ou grupo a).

[0037] Em uma outra forma de realização, a composição imunogênica da invenção contém pelo menos um antígeno selecionado dentre grupo c) e uma proteína adicional selecionada dentre o grupo a) e/ou grupo b).

[0038] Composição imunogênica da invenção de modo apropriado contém proteínas de *S. aureus*, e/ou *S. epidermidis*.

Proteínas

[0039] Composições imunogênicas da invenção compreendem uma proteína isolada que compreende uma seqüência de aminoácidos que tem pelo menos 85% identidade, preferivelmente pelo menos 90% identidade, mais preferivelmente pelo menos 95% identidade, o mais preferivelmente pelo menos 97-99% ou identidade exata, como para qualquer seqüência da figura 1.

[0040] Onde a proteína é especificamente mencionada aqui, ela é preferivelmente uma referência a uma proteína nativa ou recombinante, comprimento completo ou opcionalmente uma proteína madura em que qualquer seqüência de sinal foi removida. A proteína pode ser isolada diretamente da cepa estafilocócica ou produzida por técnicas de DNA recombinante. Fragmentos imunogênicos da proteína podem ser incorporados na composição imunogênica da invenção. Estes são fragmentos compreendendo pelo menos 10 aminoácidos, preferivelmente 20 aminoácidos, mais preferivelmente 30 aminoácidos, mais preferivelmente 40 aminoácidos ou 50 aminoácidos, o mais preferivelmente 100 aminoácidos, tomados contiguamente da seqüência de aminoácidos da proteína. Além disso, estes fragmentos imunogênicos são imunologicamente reativos com anticorpos gerados contra as proteínas estafilocócicas ou com anticorpos gerados por infecção de um hospedeiro mamífero com estafilococos. Fragmentos imunogênicos também incluem fragmentos que quando administrados em uma dose eficaz, (ou sozinhos ou como um hapteno ligado

a um veículo), elicitam uma resposta imune protetora contra infecção estafilocócica, mais preferivelmente é protetor contra infecção por *S. aureus* e/ou *S. epidermidis*. Este fragmento imunogênico pode incluir, por exemplo, a proteína faltando uma sequência líder N-terminal, e/ou um domínio transmembrana e/ou domínio de âncora C-terminal. Em um aspecto preferido, o fragmento imunogênico de acordo com a invenção compreende substancialmente todo o domínio extracelular de uma proteína que tem pelo menos 85% identidade, preferivelmente pelo menos 90% identidade, mais preferivelmente pelo menos 95% identidade, o mais preferivelmente pelo menos 97-99% identidade, para uma sequência selecionada dentre Figura 1 sobre o comprimento completo da sequência do fragmento.

[0041] Também incluídas nas composições imunogênicas da invenção estão as proteínas de fusão compostas de proteínas estafilocócicas, ou fragmentos imunogênicos de proteínas estafilocócicas. Estas proteínas de fusão podem ser tornadas recombinantemente e podem compreender uma porção de pelo menos 2, 3, 4, 5 ou 6 proteínas estafilocócicas. Alternativamente, a proteína de fusão pode compreender porções múltiplas de pelo menos 2, 3, 4 ou 5 proteínas estafilocócicas. Estas podem combinar diferentes proteínas estafilocócicas ou fragmentos imunogênicos das mesmas na mesma proteína. Alternativamente, a invenção também inclui proteínas de fusão individuais de proteínas estafilocócicas ou fragmentos imunogênicos das mesmas, como uma proteína de fusão com sequências heterólogas como um provedor de epítomos de células T ou etiquetas de purificação, por exemplo: β -galactosidase, glutathione-S-transferase, proteínas fluorescentes verdes (GFP), etiquetas de epítomos como FLAG, etiqueta myc, poli histidina, ou proteínas de superfície viral como hemaglutinina de vírus de influenza, ou proteínas bacterianas como toxóide de tétano, toxóide de difteria, CRM197.

Tabela 1

[0042] A seguinte tabela especifica os números de SEQ ID de

preferidas seqüências de proteína e seqüências de DNA que são encontradas na Figura 1 e Figura 2 respectivamente. SA indica uma seqüência de *S. aureus* e SE indica a seqüência de *S. epidermidis*.

Nome	Seqüência da proteína	Seqüência de DNA
Transportador de ABC imunodominante		
SA	SEQ ID 1	SEQ ID 34
SE	SEQ ID 2	SEQ ID 35
Receptor de laminina		
SA	SEQ ID 3	SEQ ID 36
SE	SEQ ID 4	SEQ ID 37
Antígeno secretório A SsaA		
SA 1	SEQ ID 5	SEQ ID 38
SA 2	SEQ ID 6	SEQ ID 39
SE	SEQ ID 7	SEQ ID 40
SitC		
SA	SEQ ID 8	SEQ ID 41
SE	SEQ ID 9	SEQ ID 42
IsaA / PisA (IssA)		
SA	SEQ ID 10	SEQ ID 43
SE	SEQ ID 11	SEQ ID 44
EbhA / B		
SA EbhA	SEQ ID 12	SEQ ID 45
SA EbhB	SEQ ID 13	SEQ ID 46
SE EbhA	SEQ ID 14	SEQ ID 47
SE EbhB	SEQ ID 15	SEQ ID 48
Acumulação- pro Aap assoc.		
SA	SEQ ID 16	SEQ ID 49
SE	SEQ ID 17	SEQ ID 50
Proteína de ativação de RNA III RAP		
SA	SEQ ID 18	SEQ ID 51
SE	SEQ ID 19	SEQ ID 52
FIG / SdrG		
SA	SEQ ID 20	SEQ ID 53
SE	SEQ ID 21	SEQ ID 54
Proteína de ligação de elastina EbpS		
SA	SEQ ID 22	SEQ ID 55
SE	SEQ ID 23	SEQ ID 56
Proteína extracelular EFB SA	SEQ ID 24	SEQ ID 57
alfa toxina SA	SEQ ID 25	SEQ ID 58
SBI SA	SEQ ID 26	SEQ ID 59
IsdA SA	SEQ ID 27	SEQ ID 60
IsdB SA	SEQ ID 28	SEQ ID 61
SdrC SA	SEQ ID 29	SEQ ID 62
ClfA SA	SEQ ID 30	SEQ ID 63
FnbA SA	SEQ ID 31	SEQ ID 64
ClfB SA	SEQ ID 32	SEQ ID 65
Coagulase SA	SEQ ID 33	SEQ ID 66
FnbB SA	SEQ ID 67	SEQ ID 71
MAP SA	SEQ ID 68	SEQ ID 72
SdrC SA	SEQ ID 69	SEQ ID 73
SdrG SA	SEQ ID 70	SEQ ID 74

Proteínas De Ligação De Componente Extracelular

[0043] Proteínas de ligação de componente extracelular são proteínas que ligam aos componentes extracelulares hospedeiros. O termo inclui, mas não é limitado a adesinas.

[0044] Exemplos de proteínas de ligação de componente extracelular incluem receptor de laminina (Naidu et al J. Med. Microbiol. 1992, 36; 177), proteína de ligação de SitC/MntC/saliva (US5801234, Wiltshire e Foster Infec. Immun. 2001, 69; 5198), EbhA (Williams et al Infect. Immun. 2002, 70; 6805), EbhB, proteína de ligação de elastina (EbpS) (Park et al 1999, J. Biol. Chem. 274; 2845), EFB (FIB) (Wastfelt e Flock 1995, J. Clin. Microbiol. 33; 2347), SBI (Zhang et al FEMS Immun. Med. Microbiol. 2000, 28; 211), autolisina (Rupp et al 2001, J. Infect. Dis. 183; 1038), CifA (US6008341, McDevitt et al Mol. Microbiol. 1994, 11; 237), SdrC, SdrG (McCrea et al Microbiology 2000, 146; 1535), SdrH (McCrea et al Microbiology 2000, 146; 1535), Lipase GehD (US2002/0169288), SasA, FnbA (Flock et al Mol Microbiol. 1994, 12; 599, US6054572), FnbB (WO 97/14799, Booth et al 2001 Infec. Immun. 69; 345), proteína de ligação de colágeno Cna (Visai et al 2000, J. Biol. Chem. 275; 39837), CifB (WO 99/27109), FbpA (Phonimdaeng et al 1988 J. Gen Microbiol.134; 75), Npase (Flock 2001 J. Bacteriol. 183; 3999), IsaA/PisA (Lonenz et al FEMS Immun. Med. Microbiol. 2000, 29; 145), SsaA (Lang et al FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2000, 29; 213), EPB (Hussain e Hermann symposium on Staph Denmark 14-17th 2000), SSP-1 (Veenstra et al 1996, J. Bacteriol. 178; 537), SSP-2 (Veenstra et al 1996, J. Bacteriol. 178; 537), proteína de ligação de heparina 17 kDa HBP (Fallgren et al 2001, J. Med. Microbiol. 50; 547), proteína de ligação de Vitronectina (Li et al 2001, Curr. Microbiol. 42; 361), proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig (WO 97/48727) e MAP (US5648240)

Proteína de ligação SitC/MntC/saliva

[0045] Esta é uma proteína transportadora de ABC que é um homólogo de adesina PsaA em *S. pneumoniae*. Ela é uma lipoproteína 32kDa altamente imunogênica que é distribuída através da parede das células bacterianas (Cockayne et al Infect. Immun. 1998 66; 3767). Ela é expressa em *S. aureus* e *S. epidermidis* como uma lipoproteína 32kDa e um homólogo 40 kDa está presente em *S. hominis*. Em *S. epidermidis*, ela é um componente de um operon regulado por ferro. Ela mostra homologia considerável para ambas as adesinas incluindo FimA de *Streptococcus parasanguis*, e com lipoproteínas de uma família de transportadores de ABC com funções de transporte de ferro metal putativas ou provadas. Assim SitC é incluído como uma proteína de ligação extracelular e como um transportador de íon metal.

[0046] A proteína de ligação de saliva descrita em US5.801,234 é também uma forma de SitC e pode ser incluída em uma composição imunogênica da invenção.

CifA e CifB

[0047] Ambas as proteínas tem atividade de ligação de fibrinogênio e provocam *S. aureus* a forma grupos na presença de plasma. Elas contêm um motivo LPXTG comum às proteínas associadas com a parede.

[0048] CifA é descrito em US6008341 e CifB é descrito em WO 99/27109.

Coagulase (FbpA)

[0049] Esta é uma proteína de ligação de fibrinogênio que leva *S. aureus* a forma grupos na presença de plasma. Ela é descrita em referência relacionada com Coagulase: Phonimdaeng et al (J. Gen. Microbio. 1988, 134:75-83), Phonimdaeng et al. (MoI Microbiol 1990; 4:393- 404), Cheung et al. (Infect Immun 1995; 63:1914-1920) e Shopsin et al. (J. Clin. Microbiol. 2000; 38:3453-3456).

[0050] Os preferidos fragmentos para inclusão na composição

imunogênica da invenção incluem a proteína madura da qual o peptídeo de sinal foi removido (aminoácidos 27 para o C-término).

[0051] Coagulase tem três domínios distintos. Aminoácidos 59-297 que é uma região de espira enrolada, aminoácidos 326-505 que é uma região rica em prolina e glicina e o domínio C-terminal do aminoácido 506 a 645 que tem uma conformação de folha beta. Cada um destes domínios é um fragmento preferido da invenção.

SdrG- Fbe - EfB/FIG

[0052] Fbe é uma proteína de ligação de fibrinogênio que é encontrada em muitos isolados de *S. epidermidis* e tem um peso molecular deduzido de 119 kDa (Nilsson et al 1998. Infect, Immun. 66; 2666). Sua sequência é relacionada com a de fator de formação de grupos de *S. aureus* (ClfA). Anticorpos contra Fbe podem bloquear a ligação de *S. epidermidis* para as placas revestidas com fibrinogênio e para catéteres (Pei e Flock 2001, J. Infect. Dis. 184; 52). Esta proteína é também descrita como SdrG em WO 00/12689. SdrG é encontrado em estafilococos negativos para coagulase e é uma proteína associada com parede celular contendo uma sequência de LPXTG.

[0053] SdrG contém um peptídeo de sinal (aminoácidos 1-51), a região contendo sítios de ligação de fibrinogênio e sítios de ligação de colágeno (aminoácidos 51-825), dois domínios CnaB (aminoácidos 627-698 e 738-809), uma região de repetição de SD (aminoácidos 825-1000) e um domínio de âncora (aminoácidos 1009-1056).

[0054] Fbe tem uma de sequência de sinal putativa com um sítio de clivagem entre aminoácidos 51 e 52. Assim um fragmento preferido de Fbe contém a forma madura de Fbe se estendendo de aminoácido 52 para o C-término (aminoácido 1,092).

[0055] O domínio def Fbe do aminoácido 52 para o aminoácido 825 é responsável pela ligação de fibrinogênio. Assim um fragmento preferido de

Fbe consiste de ou contém aminoácidos 52- 825.

[0056] A região entre aminoácido 373 e 516 do Fbe mostra a maior conservação entre Fbe e ClfA. Fragmento preferido assim irá conter aminoácidos 373-516 de Fbe.

[0057] Aminoácidos 825 - 1041 de Fbe contém uma região altamente competitiva composta de resíduos de serina e ácido aspártico repetidos em tandem.

[0058] Os preferidos fragmentos de SdrG incluem polipeptídeos em que o peptídeo de sinal e/ou as repetições de SD e o domínio de âncora foram removidos. Estes incluem polipeptídeos compreendendo ou consistindo de aminoácidos 50-825, aminoácidos 50-633, aminoácidos 50-597 (SEQ ID NO 2 de WO 03/76470), aminoácidos 273-597 (SEQ ID NO 4 de WO 03/76470), aminoácidos 273-577 (SEQ ID NO 6 de WO 03/76470) aminoácidos 1-549, aminoácidos 219-549, aminoácidos 225-549, aminoácidos 219-528, aminoácidos 225-528 de SEQ ID NO:70.

[0059] Preferivelmente, um polipeptídeo SdrG tendo a seqüência pelo menos 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% homóloga à seqüência de SEQ ID 70, 20 ou 21 é incorporada na composição imunogênica da invenção.

[0060] As composições da invenção opcionalmente compreendem um fragmento dos polipeptídeos SdrG descritos acima.

[0061] Preferidos fragmentos tem o peptídeo de sinal e/ou o domínio de repetição de SD e/ou o domínio de âncora deletado. Por exemplo seqüências correspondentes aos aminoácidos 1-713, 1-549, 225-549, 225-529, 24-717, 1-707, 1-690, 1-680, 1-670, 1-660, 1-650, 1-640, 1-630, 1-620, 1-610, 1-600, 34-707, 44-697, 36-689 de SEQ ID 76 ou seqüências tendo 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% identidade para SEQ ID 70 ou 20 ou 21.

[0062] Fragmento preferido com peptídeo de sinal deletado tem um resíduo de metionina no N- término do fragmento para assegurar uma

translação correta.

[0063] Um fragmento mais preferido tem o seguinte seqüência:-

```
MEENSVQDVKDSNTDDELSDSNDQSSDEEKNDVINNNQSINTDDNNQIIKKEETNNYDGEKRSEDRTESTTN
VDENEATFLQKTPQDNTHLTEEEVKESSSVESSNSSIDTAQOPSHTTINREESVOTSDNVEDSHVSDFANSKI
KESNTESGKEENTIEQPNKVKEDSTTSQPSGYTNIDEKISNQDE
LLNLPINEYENKARPLSTTSAQPSIKRVTVNQLAAEQGSNVNHLIKVTDQSITEGYDDSEGVKAHDAENLIY
DVTFEVDDKVKSGDTMTVDIDKNTVPSDLTDSFTIPKIKDNSGEIIATGTYDNKNKQITYTFTDYVDKYENIK
AHLKLTSYIDKSKVPNNNTKLDVEYKTALSSVNKTITVEYQRPENRTANLQSMFTNIDTKNHTVEQTIYINP
LRYSAKETNVNISGNGDEGST
IIDDSTIIKVYKVGDNQNLPSNRIYDYSEYEDVTNDDYAQLGNNDVNINFGNIDSPYIIKVISKYDPNKDD
YTTIQQTVMQTTINEYTGFEFRTASYDNNTIAFSTSSGQGGDLPEPKTYKIGDYVWEDVDKDGIIQNTNDNEKP
LSNVLVTLTYPDGTSKSVRTDEDGKYQFDGLKNGLTYSKITFETPEGYTPTLKHSGTNPALDSEGNVWVVTING
QDDMTIDSGFYQTPKYS LGNY
VWYDTNKGDIQGDDDEKGISGVKVTCLKDENGNIISTTTTDENGKYQFDNLNSGNYIVHFDKPSGMTQTTTDSGD
DDEQDADGEEVHVTTITDHHDFSIDNGYYDDE
```

EbhA e EbhB

[0064] EbhA e EbhB são proteínas que são expressadas em tanto *S. aureus* como *S. epidermidis* (Clarke e Foster Infect. Immun. 2002, 70; 6680, Williams et al Infect. Immun. 2002, 20; 6805) e que ligam a fibronectina. Porque fibronectina é importante componente de matriz extracelular, EbhA e EbhB tem uma função importante na aderência de estafilococos na matriz extracelular do hospedeiro.

[0065] As proteínas Ebh são grandes, tendo um peso molecular de 1,1 megadaltons. É vantajoso usar um fragmento da proteína Ebh em vez da seqüência completa devido à facilidade de produção e formulação. A região central da proteína contém repetições imperfeitas que contém sítios de ligação de fibronectina. Fragmentos contendo um ou mais dos domínios de repetição descritos abaixo são fragmentos preferidos para incorporação na composição imunogênica da invenção.

[0066] As proteínas Ebh contém unidades de repetição imperfeitas de 127 aminoácidos em comprimento que são caracterizadas por conterem a seqüência de consenso:

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

Preferivelmente

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

Mais preferivelmente

.....I/V..A...I/V..AK.ALN/DG..NL..AK..A. {6}
 L..LN.AQK..L..QI/V..A..V.. V. {6} A..LN/D.AM..L...
 I/V.D/E...TK.S.NY/F.N/DAD..K..AY/F..AV..A..I/V.N/D.....

onde ‘. ‘ significa qualquer aminoácido de “. {10}’ significa quaisquer 10 aminoácidos e I/V indica escolhas alternativas de aminoácido.

[0067] Por referência à sequência descrita em Kuroda et al (2001) Lancet 357; 1225-1240, e Tabela 2, as seqüências de repetição dentro das proteínas Ebh são prontamente deduzidas.

[0068] Preferidos fragmentos a serem incluídos na composição imunogênica da invenção incluem polipeptídeos contendo dentre um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais do que 10 das 127 unidades de repetição de aminoácidos. Estes fragmentos podem consistir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou more repetidos das 127 regiões de repetição de aminoácidos ou pode consistir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais repetições dentro dos resíduos de aminoácidos adicionais presentes em uma ou ambas as extremidades do fragmento. Um outro fragmento preferido é o polipeptídeo H2 de cerca de 44kDa se estendendo nas três repetições (aminoácidos 3202-3595) como descrito em Clarke et al, Infection and Immunity 70, 6680- 6687, 2002. Estes fragmentos serão preferivelmente capazes de ligar a fibronectina e/ou elicitar anticorpos que são reativos contra a proteína Ebh completa.

[0069] Os polipeptídeos Ebh são capazes de ligação a fibronectina. Preferidos fragmentos destas seqüências de polipeptídeos retêm a capacidade de ligar a fibronectina. Ligação a fibronectina pode ser avaliada por ELISA como descrito por Clarke et al (Infection and Immunity 70; 6680-6687 2002).

[0070] Ainda outros preferidos fragmentos são os que compreendem uma célula B- ou epítipo auxiliar T, por exemplo os fragmentos/peptídeos descritos em Tabelas 3 e 4.

TABELA 2- Seqüências de repetição na seqüência de comprimento completo

de Ebh.

[0071] A sequência de comprimento completo de Ebh é descrita em Kuroda et al (2001) Lancet 357; 1225- 1240. A seguinte tabela mostra os resíduos de aminoácidos em que as 127 repetições de aminoácidos começam e terminam dentro da sequência de comprimento completo.

	Começo	Fim
1	3204	3330
2	3331	3457
3	3457	3583
4	3583	3709
5	3709	3835
6	3835	3961
7	3961	4087
8	4200	4326
9	4326	4452
10	4452	4578
11	4578	4704
12	4704	4830
13	4830	4956
14	4956	5082
15	5082	5208
16	5208	5334
17	5334	5460
18	5460	5586
19	5585	5711
20	5711	5837
21	5837	5963
22	5963	6089
23	6089	6215
24	6215	6341
25	6341	6467
26	6467	6593
27	6593	6719
28	6719	6845
29	6845	6971
30	6971	7097
31	7097	7223
32	7223	7349
33	7349	7475
34	7475	7601
35	7601	7727
36	7727	7853
37	7852	7978
38	7978	8104
39	8104	8230
40	8230	8356

41	8356	8482
42	8482	8608
43	8604	8730
44	8858	8984

Tabela 3 – Previsão de epítipo de célula B para uma repetição de 127aminoácidos

[0072] A seqüência de comprimento completo é descrita em Kuroda et al (2001) Lancet 357; 1225-1240. uma destas repetições, codificada por aminoácidos 3204-3331 da seqüência de comprimento completo foi escolhida para realizar uma previsão de epítipo:

MDVNTVNQKAASVKSTKDALDGQQNLQRAKTEATNAITHASDLNQAQ
KNALTQ

QVNSAQNVHAVNDIKQTTQSLNTAMTGLKRGVANHNQVVQSDNYVN
ADTNKK

NDYNNAYNHANDIINGNAQHPVI

Começo	Fim	Seqüência de epítipo	Partida	Parada
5	10	TVNQKA	3208	3213
14	19	KSTKDA	3217	3222
21	33	DGQQNLQRAKTEA	3224	3236
42	51	DLNQAQKNAL	3245	3254
66	74	DIKQTTQSL	3269	3277
100	112	ADTNKKNDYNNAY	3303	3315
117	123	DIINGNA	3320	3326

- As colunas de “começo” e “final” apresentam a posição dos epítopos de células B previstos na repetição de 127 aminoácidos

- As colunas “partida” e “parada” apresentam a posição dos epítopos de células B previstos seqüência de comprimento completo Ebh

Tabela 4 Previsão de epítipo de célula T-auxiliar em Ebh:

[0073] A seqüência de comprimento completo é descrita em base de dados TrEMBL, referência de seqüência Q8NWQ6. Uma destas repetições, codificada por aminoácidos 3204-3331 da seqüência de comprimento completo foi escolhida para realizar uma previsão de epítipo:

MDVNTVNQKAASVKSTKDALDGQQNLQRAKTEATNAITHASDLNQ
AQKNALTQ

QVNSAQNVHAVNDIKQTTQSLNTAMTGLKRGVANHNQVVQSDNYV
NADTNKK

NDYNNAYNHANDIINGNAQHPVI

Repetição da posição	Seqüência de epítipo	seqüência de posição
1	MDVNTVNQK	3204
3	VNTVNQKAA	3206
6	VNQKAASVK	3209
26	LQRAKTEAT	3229
37	ITHASDLNQ	3240
43	LNQAQKNAL	3246
51	LTQQVNSAQ	3254
55	VNSAQNVHA	3258
61	VHAVNDIKQ	3264
64	VNDIKQTTQ	3267
67	IKQTTQSLN	3270
74	LNTAMTGLK	3277
78	MTGLKRGVA	3281
81	LKRGVANHN	3284
85	VANHNQVVQ	3288
91	VVQSDNYVN	3294
92	VQSDNYVNA	3295
97	YVNADTNKK	3301
98	VNADTNKKN	3302
108	YNNAYNHAN	3311
112	YNHANDIIN	3315
118	IINGNAQHP	3321
119	INGNAQHPV	3322

[0074] A coluna de “repetição de posição” apresenta a posição dos epítopos de células T previstos na repetição

[0075] A coluna de “seqüência de posição” apresenta a posição dos epítopos de células T previstos na seqüência de comprimento completo de Ebh

[0076] Os fragmentos dos polipeptídeos da invenção podem ser empregados para produzir polipeptídeo de comprimento completo correspondentes por síntese de peptídeo; assim, estes fragmentos podem ser empregados como intermediários para produzir polipeptídeos de comprimento completo da invenção.

[0077] São particularmente preferidas as variantes em que vários 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 ou 1 aminoácidos são substituídos, deletados ou adicionados

em qualquer combinação.

Proteína de ligação de elastina (EbpS)

[0078] EbpS é uma proteína contendo 486 aminoácidos com um peso molecular de 83kDa. Ele é associado com membrana citoplásmica de *S. aureus* e tem três regiões hidrofóbicas que mantêm a proteína na membrana (Downer et al 2002, J. Biol. Chem. 277; 243; Park et al 1996, J. Biol. Chem. 271; 15803).

[0079] Duas regiões entre aminoácidos 1-205 e 343-486 são expostas na superfície na face externa da membrana citoplásmica. O domínio de ligação de ligando de EbpS está localizado entre resíduos 14-34 no N-término (Park et al 1999, J. Biol. Chem. 274; 2845).

[0080] Um fragmento preferido a ser incorporado na composição imunogênica da invenção deve ser fragmento exposto na superfície contendo a região de ligação de elastina (aminoácidos 1-205). Alguns preferidos fragmentos não contém o laço exposto completo mas devem conter a região de ligação de elastina (aminoácidos 14-34). Um alternativo fragmento que deve ser usado consiste de aminoácidos formando o segundo laço exposto na superfície (aminoácidos 343-486). Alternativos fragmentos contendo até 1, 2, 5, 10, 20, 50 aminoácidos menores em uma ou ambas as extremidades são também possíveis.

Receptores de laminina

[0081] O receptor de laminina de *S. aureus* desempenha um papel importante na patogenicidade. Um aspecto característico de infecção é a invasão na corrente sanguínea que permite a formação de um abscesso metastático difundido. A invasão na corrente sanguínea requer a capacidade de extravasar através da membrana de base vascular. Isto é obtido através da ligação a laminina através do receptor de laminina (Lopes et al Science 1985, 229; 275).

[0082] Os receptores de laminina são expostos na superfície e estão

presentes em muitas cepas de estafilococos incluindo *S. aureus* e *S. epidermidis*.

SBI

[0083] Sbi é uma proteína tendo uma região de ligação de IgG e um domínio de ligação de apolipoproteína H e ela é expressada na maior parte das cepas de *S. aureus* (Zhang et al 1998, Microbiology 144; 985).

[0084] O N-término da sequência de Sbi tem uma sequência de sinal típica com um sítio de clivagem após o aminoácido 29. Assim um fragmento preferido de Sbi a ser incorporado em uma composição imunogênica da invenção começa no resíduo de aminoácido 30, 31, 32 ou 33 e continua para o C-término de Sbi, por exemplo de SEQ ID NO: 26.

[0085] O domínio de ligação de IgG de Sbi foi identificado como uma região para o N-término da proteína a partir dos aminoácidos 41-92. Este domínio é homólogo para os domínios de ligação de IgG de proteína A.

[0086] O domínio de ligação de IgG mínimo de Sbi contém a seguintes sequência:-

QTTQNNYVTDQQKAFYQVLHLKGITTEEQRNQYIKTLREHPERAQEVFSES LK
 * * * * * * * * * *

* - denota aminoácidos que são similares entre os domínios de ligação de IgG

[0087] Fragmento preferido de Sbi a ser incluído na composição imunogênica da invenção contém um domínio de ligação de IgG. Este fragmento contém a sequência de consenso para um domínio de ligação de IgG como designado por * como mostrado na sequência acima. Preferivelmente o fragmento contém ou consiste da sequência completa mostrada acima. Mais preferivelmente, o fragmento contém ou consiste de aminoácidos 30-92, 33-92, 30-94, 33-94, 30-146, 33- 146, 30-150, 33-150, 30-160, 33-160, 33-170, 33-180, 33-190, 33-200, 33-205 ou 33-210 de Sbi, por exemplo de SEQ ID NO:26.

[0088] Fragmento preferido pode conter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 das substituições de aminoácidos das seqüências indicadas.

[0089] Preferidos fragmentos podem conter repetições múltiplas (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10) do domínio de ligação de IgG.

EFB - FIB

[0090] Fib é uma proteína de ligação de fibrinogênio 19kDa que é secretada no meio extracelular por *S. aureus*. Ele é produzido por todos os isolados de *S. aureus* testados (Wastfelt e Flock 1995, J. Clin. Microbiol. 33; 2347).

[0091] *S. aureus* agrupa na presença de fibrinogênio e liga a superfícies revestidas com fibrinogênio. Esta capacidade facilita a colonização estafilocócica de catéteres e células endoteliais. Fib contém uma seqüência de sinal no N-término da proteína com um sítio de clivagem putativa em cerca de aminoácido 30. Assim um fragmento preferido a ser introduzido na composição imunogênica da invenção deve conter a seqüência da proteína madura (de cerca de aminoácido 30 para o C-término da proteína).

IsaA/PisA

[0092] IsaA é uma proteína 29kDa, também conhecido como PisA, foi demonstrado como sendo uma proteína estafilocócica imunodominante durante sepsia em pacientes hospitalizados (Lorenz et al 2000, FEMS Immunol. Med. Microb. 29; 145).

[0093] Os primeiros 29 aminoácidos da seqüência de IsaA são pensados como sendo uma seqüência de sinal. Assim um fragmento preferido de IsaA a ser incluído em uma composição imunogênica da invenção deve conter resíduos de aminoácido 30 em diante, até o final da seqüência codificada.

Proteína de ligação de fibronectina

[0094] Proteína de ligação de Fibronectina A (FnbA) é descrita em US5320951 e Schennings et al (1993, Microb. Pathog. 15; 227). Proteína de

ligação de Fibronectina A contém vários domínios que estão envolvidos em ligação a fibronectina (WO 94/18327). Estes são chamados D1, D2, D3 e D4. Preferidos fragmentos de proteína de ligação de Fibronectina A ou B compreendem ou consistem de D1, D2, D3, D4, D1-D2, D2-D3, D3-D4, D1-D3, D2-D4 ou D1-D4 (como descrito em WO 94/18327).

[0095] Proteína de ligação de Fibronectina contém uma sequência de sinal de 36 aminoácidos. Por exemplo:

VKNNLRYGIRKHKLGAA SVFLGTMIWGMGQDKEAA

[0096] Opcionalmente, a proteína madura omitindo esta sequência de sinal é incluída na composição imunogênica da invenção.

Proteínas transportadoras

[0097] A parede celular de bactérias Gram positivas atua como uma barreira evitando a difusão livre de metabólitos na bactéria. Uma família de proteínas orchestra a passagem de nutrientes essenciais na bactéria e são assim essenciais para a viabilidade da bactéria. O termo proteína transportadora cobre as proteínas envolvidas na etapa inicial de ligação para metabólitos como ferro assim como os envolvidos em realmente transporte de metabólitos na bactéria. O ferro molecular é um co-fator essencial para o crescimento bacteriano. Os siderofóros são secretados que ligam o ferro livre e então são capturados por receptores de superfície bacteriana que liberam ferro para transporte através da membrana citoplásmica. A aquisição de ferro é crítica para o estabelecimento de infecções humanas de modo que a geração de uma resposta imune contra esta classe de proteínas leva a uma perda da viabilidade estafilocócica.

[0098] Os exemplos de proteínas transportadoras incluem transportador ABC imunodominante (Burnie et al 2000 Infect. Immun. 68; 3200), IsdA (Mazmanian et al 2002 PNAS 99; 2293), IsdB (Mazmanian et al 2002 PNAS 99; 2293), Mg²⁺ transportador, SitC (Wiltshire e Foster 2001 Infect. Immun. 69; 5198) e transportador de Ni ABC.

Transportador de ABC imunodominante

[0099] O transportador de ABC imunodominante é uma proteína bem conservada que pode ser capaz de gerar uma resposta imune que é contra-protetora contra cepas diferentes estafilocócicas (Mei et al 1997, MoI. Microbiol. 26; 399). Anticorpos contra esta proteína foram encontrados em pacientes com septicemia (Burnie et al 2000, Infect. Immun. 68; 3200).

[00100] Os preferidos fragmentos de transportador de ABC imunodominante irão incluir os peptídeos DRHFLN, GNYD, RRYPF, KTLK, GVTTSLS, VDWLR, RGFL, mais preferivelmente KIKVYVGNYDFWYQS, TVIVVSHDRHFLYNNV e/ou TETFLRGFLGRMLFS porque estas seqüências contém epítomos que são reconhecidos pelo sistema imune humano.

IsdA-IsdB

[00101] Os genes *isd* (determinante de superfície regulado por ferro) de *S. aureus* codificam proteínas responsáveis pela ligação de hemoglobina e passagem de heme ferro no citoplasma, onde atua como um nutriente essencial. IsdA e IsdB estão localizados na parede celular de estafilococos. IsdA parece estar exposto sobre a superfície de bactéria porque ele é susceptível à digestão de proteinase K. IsdB foi parcialmente digerido sugerindo que ele é parcialmente exposto sobre a superfície da bactéria (Mazmanian et al 2003 Science 299; 906).

[00102] IsdA e IsdB são ambas proteínas 29kDa que ligam heme. Sua expressão é regulada pela disponibilidade de ferro via o repressor Fur. Uma expressão será elevada durante a infecção em um hospedeiro onde a concentração de ferro será baixa.

[00103] Eles são também conhecidos como FrpA e FrpB (Morrissey et al 2002, Infect. Immun. 70; 2399). FrpA e FrpB são proteínas de superfície principal com uma carga elevada. Eles foram demonstrados como provendo uma contribuição principal pela adesão a plástico. Em uma forma de

realização, a composição imunogênica da invenção compreende um fragmento de IsdA e/ou IsdB que é descrito em WO 01/98499 ou WO 03/11899.

Toxinas e reguladores de virulência

[00104] Membros desta família de proteínas incluem toxina como alfa toxina, hemolisina, enterotoxina B e TSST-1 assim como proteínas que regulam a produção de toxinas como RAP.

Alfa toxina (HIIa)

[00105] Alfa toxina é um determinante de virulência importante produzido pela maioria das cepas de S.aureus. Ela é uma toxina formadora de poros com atividade hemolítica. Os anticorpos contra alfa toxina foram mostrados como neutralizando os efeitos prejudiciais e letais de alfa toxina em modelos de animais (Adlam et al 1977 Infect. Immun. 17; 250). Plaquetas humanas, células endoteliais e células mononucleares são susceptíveis aos efeitos de alfa-toxina.

[00106] A alta toxicidade de alfa toxina requer que ela deve ser destoxificada antes de ser usada como um imunogene. Isto pode ser obtido por tratamento químico, por exemplo por tratamento com formaldeído, glutaraldeído, ou outros reagentes de reticulação, ou por conjugação química da mesma a polissacarídeos bacterianos como descrito abaixo.

[00107] Um outro modo de remover a toxicidade é introduzir mutações de pontos que removem a toxicidade enquanto retendo a antigenicidade da toxina. A introdução de uma mutação por pontos em aminoácido 35 de alfa toxina onde um resíduo de histidina é substituído com um resíduo leucina resulta na remoção de toxicidade enquanto retendo a imunogenicidade (Menzies e Kernodle 1996; Infect. Immun. 64; 1839). Histidina 35 para ser crítica para a apropriada oligomerização requerida para a formação de poros e mutação deste resíduo leva a perda de toxicidade.

[00108] Quando incorporada em composições imunogênicas da

invenção, alfa toxina é preferivelmente destoxificada por mutação de His 35, o mais preferivelmente por substituição de His 35 com Leu ou Arg. Em uma alternativa forma de realização, alfa toxina é destoxificada por conjugação em outros componentes da composição imunogênica, preferivelmente polissacarídeos capsulares, o mais preferivelmente para polissacarídeo tipo V de *S. aureus* tipo V e/ou polissacarídeo tipo VIII de *S. aureus* e/ou PNAG.

Proteína de ativação de RNA III (RAP)

[00109] RAP não é sozinho uma toxina, mas é um regulador da expressão de fatores de virulência. RAP é produzido e secretado por estafilococos. Ele ativa o sistema regulador de agr de outros estafilococos e ativa a expressão e subsequente liberação de fatores de virulência como hemolisina, enterotoxina B e TSST-1.

[00110] Uma resposta imune gerada contra RAP não deve matar a bactérias, mas deve interferir com sua patogenicidade. Isto tem a vantagem de prover uma pressão menos seletiva para novas cepas resistentes emergir.

[00111] Seria uma segunda vantagem produzir uma resposta imune que iria ser instrumental para reduzir a morbidez da infecção.

[00112] É particularmente vantajoso combinar RAP com outros antígenos em uma vacina, particularmente onde o adicional antígeno deve fornecer uma resposta imune que é capaz de matar a bactéria.

Outras proteínas

Proteína associada com acúmulo (Aap)

[00113] Aap é uma proteína 140 kDa que é essencial para o acúmulo de cepas de *S. epidermidis* sobre superfícies (Hussain et al Infect. Immun. 1997, 65; 519). Cepas expressando esta proteína produziram quantidade significativamente grandes de biofilme Aap parece estar envolvido em formação de biofilme. Os anticorpos contra Aap são capazes de inibir a formação de biofilme e inibir o acúmulo de *S. epidermidis*.

[00114] Um fragmento preferido de Aap é um domínio conservado

compreendendo ou consistindo de aminoácidos 550-1069.

Antígeno secretório estafilocócico SsaA

[00115] SsaA é uma proteína fortemente imunogênica de 30 kDa encontrada em tanto *S. aureus* como *S. epidermidis* (Lang et al 2000 FEMS Immunol. Med. Microbiol. 29; 213). Sua expressão durante a endocardite sugeriu um papel de virulência específico para a patogênese da doença infecciosa.

[00116] SsaA contém uma sequência de líder N-terminal e um sítio de clivagem de peptidase de sinal. O peptídeo líder é seguido por uma região hidrofílica de aproximadamente 100 aminoácidos de resíduo 30 para resíduo 130.

[00117] Um fragmento preferido de SsaA a ser incorporado na composição imunogênica da invenção é feito da proteína madura (aminoácidos 27 a C-término ou aminoácidos 30 ao C-término).

[00118] Outros fragmentos preferidos contêm a área hidrofílica de SsaA do aminoácido 30 ao aminoácido 130.

Combinações preferidas

[00119] Uma combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende receptor de laminina e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00120] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende SitC e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00121] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição

imunogênica da invenção compreende EbhA e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00122] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende EbhB e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00123] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende EbpS e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00124] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende EFB(FIB) e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00125] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende SBI e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00126] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende autolisina e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00127] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende CifA e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, Site, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00128] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende SdrC e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, Site, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00129] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende SdrG e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, Site, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R e RAP.

[00130] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende SdrH e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00131] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende Lipase GehD e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00132] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende SasA e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni

ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00133] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende FnbA e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00134] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende FnbB e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00135] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende Cna e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, Site, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00136] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende CifB e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, Site, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00137] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende FbpA e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, Site, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00138] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende Npase e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC

imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, Site, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00139] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende IsaA/PisA e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00140] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende SsaA e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00141] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende EPB e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00142] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende SSP-1 e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00143] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende SSP-2 e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00144] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende HPB e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos

selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00145] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende vitronectina proteína de ligação de e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00146] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende proteína de ligação de fibrinogênio e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00147] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende coagulase e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00148] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende Fig e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00149] Uma outra combinação preferida de proteínas na composição imunogênica da invenção compreende MAP e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni

ABC, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00150] Uma outra combinação preferida de proteína na composição imunogênica da invenção compreende transportador de ABC imunodominante e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, proteína de ligação SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipase GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig, MAP, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00151] Uma outra combinação preferida de proteína na composição imunogênica da invenção compreende IsdA e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, proteína de ligação SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina(EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipase GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig, MAP, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00152] Uma outra combinação preferida de proteína na composição imunogênica da invenção compreende IsdB e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, proteína de ligação SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina(EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipase GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig, MAP, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00153] Uma outra combinação preferida de proteína na composição imunogênica da invenção compreende SitC e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, proteína de ligação SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina(EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipase GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig, MAP, alfa toxina, alfa toxina mutante H35L OU H35R, RAP, Aap e SsaA.

[00154] Uma outra combinação preferida de proteína na composição imunogênica da invenção compreende alfa toxina e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, proteína de ligação SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina(EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipase GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP- 2, HBP, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig, MAP, transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, Aap e SsaA.

[00155] Uma outra combinação preferida de proteína na composição imunogênica da invenção compreende alfa toxina H35L ou H35R variante 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, proteína de ligação SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina(EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipase GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig, MAP, transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, Aap e SsaA.

[00156] Uma outra combinação preferida de proteína na composição imunogênica da invenção compreende RAP e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, proteína de ligação SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina(EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipase GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig, MAP, transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, Aap e SsaA.

[00157] Uma outra combinação preferida de proteína na composição imunogênica da invenção compreende Aap e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, proteína de ligação SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina(EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipase GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig, MAP, transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, RAP, alfa toxina e alfa toxina H35L OU H35R.

[00158] Uma outra combinação preferida de proteína na composição imunogênica da invenção compreende SsaA e 1, 2, 3, 4 ou 5 outros antígenos selecionados dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, proteína de ligação SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina(EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipase GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig, MAP, transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni

ABC, RAP, alfa toxina e alfa toxina H35L OU H35R.

[00159] Os inventores demonstraram que alguns antígenos produzem juma resposta imune particularmente eficaz dentro do contexto da mistura de antígenos. Assim, um a forma de realização da invenção é uma composição imunogênica compreendendo IsaA e uma proteína transportadora estafilocócica, ou IsaA e um regulador estafilocócico de virulência ou toxina, ou compreendendo Sbi e uma proteína transportadora estafilocócica, ou Sbi e um regulador estafilocócico de virulência ou toxina, ou compreendendo SdrC e uma proteína transportadora estafilocócicas, ou SdrC e um regulador estafilocócico de virulência ou toxina, ou IsaA e Sbi, ou IsaA e SdrC, ou IsaA e autolisina, ou IsaA e Ebh, ou Sbi e SdrC, ou Sbi e autolisina, ou Sbi e Ebh, ou SdrC e autolisina, ou SdrC e Ebh, ou autolisina- glucosaminidase e Ebh. Para cada uma destas combinações, as proteínas podem ser de comprimento completo ou fragmentos, tendo seqüências pelo menos 85%, 90%, 95%, 98% ou 100% idênticas às das seqüências da figura 1. Nas combinações acima e abaixo, as proteínas especificadas podem estar opcionalmente presentes na composição imunogênica da invenção como um fragmento ou proteína de fusão como descrito acima.

[00160] As composições imunogênicas preferidas da invenção não incluem as seqüências de proteína descritas em WO02/094868.

Combinações de três proteínas

[00161] Uma composição imunogênica preferida da invenção contém três componentes de proteínas em uma combinação de alfa-toxina, uma proteína de ligação de componente extracelular (preferivelmente uma adesina) e uma proteína transportadora (preferivelmente uma proteína de ligação de ferro).

[00162] Em tal combinação, a alfa toxina pode ser quimicamente destoxificada ou geneticamente destoxificada por introdução de mutação(ões) de pontos, preferivelmente a mutação por pontos His35Leu. A alfa toxina está

presente como uma proteína livre ou alternativamente é conjugada a um polissacarídeo ou componente LTA da imunogênica composição.

[00163] As combinações preferidas incluem:

[00164] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdA e um componente extracelular de proteína de ligação selecionado dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, proteína de ligação SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina(EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipase GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, isaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig e MAP.

[00165] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdB e um componente extracelular de proteína de ligação selecionado dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, proteína de ligação SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina(EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipase GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig e MAP.

[00166] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdA e uma adesina selecionada dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina(EbpS), EFB (FIB), ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, autolisina, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase, SSP-1, SSP-2, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig e MAP.

[00167] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdB e uma adesina selecionada dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina(EbpS), EFB (FIB), autolisina, ClfA, SdrC, SdrG, SdrH, FnbA, FnbB, Cna, ClfB, FbpA, Npase,

SSP-1, SSP-2, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig e MAP.

[00168] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdA e receptor de laminina.

[00169] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdA e EbhA.

[00170] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdA e EbhB.

[00171] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdA e EbpS.

[00172] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdA e EFB (FIB).

[00173] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdA e SdrG.

[00174] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdA e ClfA.

[00175] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdA e ClfB.

[00176] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdA e FnbA.

[00177] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdA e coagulase.

[00178] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdA e Fig.

[00179] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdA e SdrH.

[00180] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina, IsdA e

[00181] Uma composição imunogênica compreendendo alfa toxina,

IsdA e MAP.

- [00182] Uma composição imunogênica compreendendo IsaA e Sbi.
- [00183] Uma composição imunogênica compreendendo IsaA e IsdB.
- [00184] Uma composição imunogênica compreendendo IsaA e IsdA.
- [00185] Uma composição imunogênica compreendendo IsaA e SdrC.
- [00186] Uma composição imunogênica compreendendo IsaA e Ebh ou fragmento dos mesmos como descrito acima.
- [00187] Uma composição imunogênica compreendendo Sbi e SdrC.
- [00188] Uma composição imunogênica compreendendo Sbi e Ebh ou fragmento dos mesmos como descrito acima.
- [00189] Uma composição imunogênica da invenção compreendendo IsaA, Sbi ou SdrC.

Seleção de antígenos expressa em diferentes linhagens clonais

- [00190] A análise da ocorrência de fatores de virulência com relação à estrutura da população de *Staphylococcus aureus* mostrou uma presença variável de genes de virulência em populações naturais de *S. aureus*.
- [00191] Dentre os isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, pelo menos cinco linhagens clonais como mostrada como altamente prevalentes (Booth et al., 2001 Infect Immun. 69(1):345-52). Alfa- hemolisina (hla), - proteína de ligação de fibronectina A (fnbA) e fator de formação de grupos A {elf A) foram demonstrado como estando presentes na maior parte dos isolados, apesar de sua identidade de linhagem, sugerindo um papel importantes nestas proteínas na sobrevivência de *S. aureus* (Booth et al., 2001 Infect Immun. 69(1):345-52). Além disso, de acordo com Peacock et al. 2002, as distribuições de fnbA, elf A, coagulase, spa, map, pvl (leucocidina de Panton-Valentine), hlg (gama-toxina), alfa-toxina e ica pareceram não estar relacionados com a estrutura clonagem subjacente sugerindo uma transferência horizontal considerável destes genes.
- [00192] Em contrário, outros genes de virulência como proteína de

ligação de Fibronectina B (fnbB), beta- hemolisina (hly), proteína de ligação de colágeno (cna), TSST- 1 (tst) e gene de resistência a meticilina (mecA) são fortemente associados com linhagens específicas (Booth et al., 2001 *Infect Immun.* 69(1):345-52). Similarmente, Peacock et al. 2002 (*Infect Immun.* 70(9):4987-96) mostraram que as distribuições das enterotoxinas, tst, as exfolatinas (eta e etb), beta- e delta-toxinas, os genes sdr (sdrD, sdrE e bbb), cna, ebpS e efb dentro da população estão todos altamente significativamente relacionados com os complexos clonais derivados de MLST.

[00193] Os dados de MLST não fornecem evidência de que cepas responsáveis por doença nosocomial representam uma subpopulação distinta de cepas causando doença adquirida na comunidade ou cepas recuperadas de veículos assintomáticos (Feil et al., 2003 *J Bacteriol.* 185(11):3307-16).

[00194] As composições imunogênicas preferidas da invenção são eficazes contra estafilococos de diferentes linhagens clonais. Em uma forma de realização, isto é obtido incluindo 1, 2, 3, 4, preferivelmente pelo menos 1 proteína que é expressa na maior parte dos isolados de estafilococos. Exemplos destas proteínas incluem alfa-hemolisina (hly), -proteína de ligação de fibronectina A (fnhA) e fator de formação de grupos A (clfA), coagulase, spa, map, pvl (leucocidina Pantón-Valentine), hlg (gama-toxina) e ica. Os requerentes também identificaram transportador de ABC imunodominante, RAP, autolisina (Rupp et al 2001, *J. Infect. Dis.* 183; 1038), receptores de laminina, SitC, IsaA/PisA, SPOIIIIE (), SsaA, EbpS, SasF (Roche et al 2003, *Microbiology* 149; 643), EFB(FIB), SBI, ClfB, IsdA, IsdB, FnbB, Npase, EBP, proteína de ligação sialo de osso II, IsaB/PisB (Lorenz et al *FEMS Immuno. Med. Microb.* 2000, 29; 145), SasH (Roche et al 2003, *Microbiology* 149; 643), MRPI, SasD (Roche et al 2003, *Microbiology* 149; 643), SasH (Roche et al 2003, *Microbiology* 149; 643), precursor de aureolisina (AUR)/Sepp1 e autolisina nova.

[00195] Em uma alternativa forma de realização, 2 ou mais proteínas

que são expressas em diferentes conjuntos de cepas clonais são incluídas na composição imunogênica da invenção. Preferivelmente a combinação de antígenos irá permitir uma resposta imune a ser gerada que é eficaz contra cepas clonais múltiplas, o mais preferivelmente contra todas as cepas clonais. Preferidas combinações incluem FnbB e beta-hemolisina, FnbB e Cna, FnbB e TSST-1, FnbB e mecA, FnbB e SdrD, FnbB e SdrF, FnbB e EbpS, FnbB e Efb, beta- hemolisina e Cna, beta-hemolisina e TSST-1, beta-hemolisina e mecA, beta- hemolisina e SdrD, beta-hemolisina e SdrF, beta-hemolisina e EbpS, beta- hemolisina e Efb, Cna e TSST-1, Cna e mecA, Cna e SdrD, Cna e SdrF, Cna e EbpS, Cna e Efb, TSST-1 e mecA, TSST-1 e SdrD, TSST-1 e SdrF, TSST-1 e EbpS, TssT-1 e Efb, MecA e SdrD, MecA e SdrF, MecA e EbpS, MecA e Efb, SdrD e SdrF, SdrD e EbpS, SdeD e Efb, SdrF e EbpS, SdrF e Efb, e, EbpS e Efb.

[00196] As preferidas combinações descritas acima podem ser combinadas com componentes adicionais descritos abaixo.

Seleção de antígenos expressados durante fases de crescimento diferentes

[00197] Os estafilococos passam através de uma fase de crescimento exponencial durante a qual um conjunto particular de proteínas será expresso. Estes incluem muitas das proteínas de ligação de componente extracelular e proteínas transportadoras. Após um período de crescimento exponencial, os estafilococos reverterem para uma fase pós- exponencial durante a qual o crescimento é menor e a expressão de proteína é modulada. Muitas das proteínas expressas durante a fase de crescimento exponencial são reguladas de modo negativo, enquanto as outras proteínas, como enzimas e a maior parte das toxinas, incluindo alfa toxina, são expressas em níveis maiores.

[00198] As preferidas composições imunogênicas da invenção compreendem uma proteína expressada em níveis maiores durante fase de crescimento e uma proteína expressada em níveis maiores durante a fase pós-exponencial.

[00199] “Níveis maiores” se referem ao nível de expressão sendo maior em uma fase em comparação com outra fase.

[00200] Em uma forma de realização preferida, a composição imunogênica da invenção compreende alfa toxina e uma proteína de ligação de componente extracelular (preferivelmente FnbA, FnbB, CifA e CifB) ou uma transportador proteína.

[00201] Mais preferivelmente, ela compreende alfa toxina ou Cna ou Lipase GehD e uma proteína selecionada dentre o grupo consistindo de receptor de laminina, proteína de ligação SitC/MntC/saliva, proteína de ligação de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, autolisina, CifA1 SdrC, SdrG, SdrH, SasA, FnbA, FnbB, CifB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig e MAP, transportador ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, Aap e SsaA.

[00202] Nas combinações descritas acima, a alfa toxina pode ser geneticamente ou quimicamente destoxificada, como descrito acima, e pode ser não conjugada ou conjugada ao polissacarídeo como descrito abaixo.

Polissacarídeos

[00203] As composições imunogênicas da invenção preferivelmente compreendem polissacarídeos capsulares incluindo um ou mais dentre PIA (também conhecidos como PNAG) e/ou polissacarídeo capsular de *S. aureus* Tipo V e/ou polissacarídeo capsular de *S. epidermidis* tipo VIII e/ou tipo I, e/ou tipo II e/ou tipo III.

PIA (PNAG)

[00204] Agora é evidente que as várias formas de polissacarídeos de superfície estafilocócica identificados como PS/A, PIA e SAA são a mesma entidade química - PNAG (Maira-Litran et al Vaccine 22; 872-879 (2004)). Assim o termo PIA ou PNAG engloba todos estes polissacarídeos ou oligossacarídeos derivados dos mesmos.

[00205] PIA é uma adesina intercelular de polissacarídeo e é composta de um polímero de β -(1 $\rightarrow$ 6)- glucosamina ligada substituída com componentes N-acetila e O-succinila; Este polissacarídeo está presente em ambos *S. aureus* e *S. epidermidis* e pode ser isolado de ambas as fontes (Joyce et al 2003, Carbohydrate Research 338; 903; Maira-Litran et al 2002, Infect. Immun. 70; 4433). Por exemplo, PNAG pode ser isolado de *S. aureus* cepa MN8m (WO 04/43407).

[00206] PIA isolado de *S. epidermidis* é um constituinte integral de biofilme. Ele é responsável por mediar a adesão célula-célula e provavelmente também funciona para proteger a colônia de crescimento da resposta imune do hospedeiro.

[00207] O polissacarídeo previamente conhecido como poli-N-succinil- β -(1 $\rightarrow$ 6)-glucosamina (PNSG) foi recentemente mostrado como não tendo a estrutura esperada porque a identificação de N- succinilação estava incorreta (Maira-Litran et al 2002, Infect. Immun. 70; 4433). Assim o polissacarídeo anteriormente conhecido como PNSG e agora verificado como sendo PNSG é também englobado pelo termo PIA.

[00208] PIA (ou PNAG) pode ser de tamanhos diferentes variando de acima de 400 kDa a entre 75 e 400 kDa a entre 10 e 75kDa para oligossacarídeos compostos de até to 30 unidades de repetição (de β -(1 $\rightarrow$ 6)-glucosamina ligada substituída com constituintes N-acetil e O-succinil). Qualquer tamanho de polissacarídeo ou oligossacarídeo de PIA pode ser usado em uma composição imunogênica da invenção, no entanto um tamanho de acima de 40 kDa é preferido. O tamanho pode ser obtido por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo por microfluidização, irradiação ultrassônica ou por clivagem química (WO 03/53462, EP497524, EP497525).

[00209] As faixas de tamanho preferidas de PIA (PNAG) são 40-400 kDa, 40-300 kDa, 50-350 kDa, 60-300 kDa, 50-250 kDa e 60-200 kDa.

[00210] PIA (PNAG) pode ter diferentes graus de acetilação devido à

substituição dos grupos amino por acetato. O PIA produzido *in vitro* é quase completamente substituído em grupos amino (95- 100%). Alternativamente, um PIA desacetilado (PNAG) pode ser usado tendo menos do que 60%, preferivelmente menos do que 50%, 40%, 30%, 20%, 10% acetilação. Uso de um PIA desacetilado (PNAG) é preferido por epítomos não acetilados de PNAG são eficazes em mediar a morte opsônica de bactérias Gram positivas, preferivelmente *S. aureus* e/ou *S. epidermidis*. O mais preferivelmente, PIA (PNAG) tem um tamanho entre 40 kDa e 300 kDa e é desacetilado de modo que menos do que 60%, 50%, 40%, 30% ou 20% de grupos amino são acetilados.

[00211] O termo PNAG desacetilado (dPNAG) refere-se a polissacarídeo ou oligossacarídeo PNAG em que menos do que 60%, 50%, 40%, 30%, 20% ou 10% dos grupos amino são acetilados.

[00212] Em uma forma de realização, PNAG é um desacetilado para formar dPNAG quimicamente tratando o polissacarídeo nativo. Por exemplo, o PNAG nativo é tratado com uma solução básica de modo que o pH se eleva a acima de 10. Por exemplo, o PNAG é tratado com 0,1 -5M, 0,2-4M, 0,3-3M, 0,5-2M, 0,75-1,5 M ou 1 M NaOH, KOH ou NH₄OH. Tratamento é por pelo menos 10 ou 30 minutos, ou 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 ou 20 horas a temperatura de 20-100, 25-80, 30-60 ou 30-50 ou 35-45 °C. dPNAG pode ser preparado como descrito em WO 04/43405.

[00213] O polissacarídeo (s) incluído (s) na composição imunogênica da invenção é (são) preferivelmente conjugado (a) a uma proteína carreadora como descrito abaixo ou alternativamente não conjugado.

Polissacarídeos Tipo 5 e Tipo 8 de *S. aureus*

[00214] A maior parte das cepas de *S. aureus* que causam infecção no homem contém polissacarídeos ou de Tipo 5 ou Tipo 8. Aproximadamente 60% de cepas humanas são de Tipo 8 e aproximadamente 30% são Tipo 5. As estruturas de antígenos de polissacarídeo capsular de Tipo 5 e Tipo 8 são

descritas em Moreau et al Carbohydrate Res. 201; 285 (1990) e Fournier et al Infect. Immun. 45; 87 (1984). Ambas tem um FucNAcp em sua unidade de repetição, assim como ManNAcA que pode ser usado para introduzir um grupo sulfidril. As estruturas foram registradas como:

Tipo 5

$\rightarrow 4)-\beta\text{-D-ManNAcA(3OAc)}-(1 \rightarrow 4)-\alpha\text{-L-FucNAc}(1 \rightarrow 3)-\beta\text{-D-FucNAc}-(1 \rightarrow$

Tipo 8

$\rightarrow 3)-\beta\text{-D-ManNAcA(4OAc)}-(1 \rightarrow 3)-\alpha\text{-L-FucNAc}(1 \rightarrow 3)-\beta\text{-D-FucNAc}-(1 \rightarrow$

Recentemente (Jones Carbohydrate Research 340, 1097-1106 (2005)) por espectroscopia de RMN revisou em estruturas para:

Tipo 5

$\rightarrow 4)-\beta\text{-D-ManNAcA}-(1 \rightarrow 4)-\alpha\text{-L-FucNAc(3OAc)}-(1 \rightarrow 3)-\beta\text{-D-FucNAc}-(1 \rightarrow$

Tipo 8

$\rightarrow 3)-\beta\text{-D-ManNAcA(4OAc)}-(1 \rightarrow 3)-\alpha\text{-L-FucNAc}(1 \rightarrow 3)-\alpha\text{-D-FucNAc} (1 \rightarrow$

[00215] Polissacarídeos podem ser extraídos da cepa apropriada de *S. aureus* usando método bem conhecido do versado, por exemplo como descrito em US6294177. Por exemplo, ATCC 12902 é uma cepa de *S. aureus* tipo 5 e ATCC 12605 é uma cepa de *S. aureus* tipo 8.

[00216] Polissacarídeos são de tamanho nativo ou alternativamente podem ser dimensionados, por exemplo por microfluidização, irradiação ultrassônica ou por tratamento químico. A invenção também cobre oligossacarídeos derivados de polissacarídeos tipo 5 e 8 de *S. aureus*. Os polissacarídeos tipo 5 e 8 incluídos na composição imunogênica da invenção são preferivelmente conjugados a uma proteína carreadora como descrito abaixo ou são alternativamente não conjugados.

[00217] As composições imunogênicas da invenção alternativamente contêm polissacarídeo ou de tipo 5 ou tipo 8.

Antígeno 336 de *S. aureus*

[00218] Em uma forma de realização, a composição imunogênica da invenção compreende o antígeno 336 de *S. aureus* descrito em US6294177.

[00219] O antígeno 336 compreende hexosamina β -ligada, não contém grupos O-acetila e especificamente liga a anticorpos para *S. aureus* Tipo 336 depositado sob ATCC 55804.

[00220] Em uma forma de realização, o antígeno 336 é um polissacarídeo que é de tamanho nativo ou alternativamente pode ser dimensionado, por exemplo por microfluidização, irradiação ultrassônica ou por tratamento químico. A invenção também cobre oligossacarídeos derivados do antígeno 336.

[00221] O antígeno 336, quando incluído na composição imunogênica da invenção é preferivelmente conjugado a uma proteína carreadora como descrito abaixo ou são alternativamente não conjugados.

Polissacarídeos Tipo I, II e III de *S. epidermidis*

[00222] Cepas ATCC-31432, SE-360 e SE-10 de *S. epidermidis* são característica de três tipos diferentes capsulares, I, II e III respectivamente (Ichiman e Yoshida 1981, J. Appl. Bacterid. 51; 229). Polissacarídeos Capsulares extraídos de cada sorotipo de *S. epidermidis* constituem os polissacarídeos de tipo I, II e III. Polissacarídeos podem ser extraídos por vários métodos incluindo os métodos descritos em US4197290 ou como descrito em Ichiman et al 1991, J. Appl. Bacterid. 71; 176.

[00223] Em uma forma de realização da invenção, a composição imunogênica compreende polissacarídeos tipo I e/ou II e/ou III ou oligossacarídeos de *S. epidermidis*.

[00224] Polissacarídeos são de tamanho nativo ou alternativamente podem ser dimensionados, por exemplo por microfluidização, irradiação

ultrassônica ou clivagem química. A invenção também cobre oligossacarídeos extraídos de cepas de *S. epidermidis*.

[00225] Estes polissacarídeos são não conjugados ou são preferivelmente conjugados como descrito abaixo.

Conjugação de polissacarídeos

[00226] Dentre os problemas associados com o uso de polissacarídeos em vacinação, é o fato de que os polissacarídeos são, per se, imunogenes fracos. As estratégias, que foram projetadas para superar esta falta de imunogenicidade, incluem a ligação do polissacarídeo a veículos de proteína grandes, que provêm ajuda de célula T suplementar. Prefere-se que os polissacarídeos usados na invenção sejam ligados a um veículo de proteína que provê uma ajuda de célula T suplementar. Os exemplos destes veículos, que podem ser conjugados a imunogenes de polissacarídeos incluem os toxóides de difteria e tétano (DT, DT crm197 e TT respectivamente), hemociana de lapa (KLH), e o derivado purificado de proteína de Tuberculina (PPD), exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), proteína D de *Haemophilus influenzae*, pneumolisina ou fragmentos de qualquer um dos acima. Os fragmentos apropriados para uso incluem os fragmentos englobando os epítomos de auxiliar T. Particularmente, o fragmento de proteína D irá preferivelmente conter o N-terminal 1/3 de proteína. A proteína D é uma proteína de ligação a IgD de *Haemophilus influenzae* (EP 0 594 610 BI) e é um imunogene potencial.

[00227] Além disso, as proteínas estafilocócicas podem ser usadas como proteína carreadora nos conjugados de polissacarídeo da invenção. As proteínas estafilocócicas descritas abaixo podem ser usadas como proteína carreadora; por exemplo, receptor de laminina, proteína de ligação SitC/MntC/saliva, EbhA, EbhB, proteína de ligação de elastina (EbpS), EFB (FIB), SBI, CIfA, SdrC, SdrG, SdrH, Lipase GehD, SasA, FnbA, FnbB, Cna, CIfB, FbpA, Npase, IsaA/PisA, SsaA, EPB, SSP-1, SSP-2, HBP, proteína de

ligação de vitronectina, proteína de ligação de fibrinogênio, coagulase, Fig, MAP, transportador de ABC imunodominante, IsdA, IsdB, Mg²⁺ transportador, SitC, transportador de Ni ABC, alfa toxina (HIIa)₁ mutante H35R de alfa toxina, proteína de ativação de RNA III (RAP), ou fragmentos dos mesmos.

[00228] Uma nova proteína carreadora que seria particularmente vantajosa de usar no contexto das vacinas estafilocócicas é alfa toxóide estafilocócico; A forma nativa pode ser conjugada a um polissacarídeo porque o processo de conjugação reduz a toxicidade. Preferivelmente uma alfa toxina geneticamente destoxificada, como as variantes His35Leu ou His 35 Arg são usadas como veículos porque a toxicidade residual é menor. Alternativamente, a alfa toxina é quimicamente destoxificada por tratamento com um reagente de reticulação, formaldeído ou glutaraldeído. Uma alfa toxina geneticamente destoxificada é opcionalmente quimicamente destoxificada, preferivelmente por tratamento com um reagente de reticulação, formaldeído ou glutaraldeído para ainda reduzir a toxicidade.

[00229] Os polissacarídeos pode ser ligados à(s) proteína(s) carreadora(s) por qualquer método conhecido (por exemplo, por Likhite, patente US4,372,945 por Armor et al., patente US4,474,757, e Jennings et al., patente US4,356,170). Preferivelmente, a química de conjugação CDAP é realizada (ver WO95/08348).

[00230] Em CDAP, o reagente de cianilação tetrafluoroborato de 1-ciano-dimetilaminopirídio (CDAP) é preferivelmente usado para a síntese de conjugados polissacarídeo-proteína. A reação de cianilação pode ser realizada sob condições relativamente suaves, que evita a hidrólise dos polissacarídeos sensíveis alcalinos. Esta síntese permite a copulação direta a uma proteína carreadora.

[00231] O polissacarídeo é solubilizado em água ou solução salina. CDAP é dissolvido em acetonitrila e adicionado imediatamente à solução de

polissacarídeo. O CDAP reage com grupos hidroxila do polissacarídeo para formar um éster de cianado. Após a etapa de ativação, a proteína carreadora é adicionada. Os grupos Amino de lisina reagem com o polissacarídeo ativado para formar uma ligação covalente de isouréia. Após a reação de copulação, um excesso grande de glicina é então adicionado para extinguir grupos funcionais residuais ativados. O produto é então passado através de uma coluna de permeação de gel para remover a proteína carreadora não reagida e reagentes residuais.

[00232] Conjugação preferivelmente envolve produzir uma ligação direta entre a proteína carreadora e polissacarídeo. Opcionalmente um espaçador (como di-hidreto adípico (ADH)) pode ser introduzido entre a proteína carreadora e o polissacarídeo.

Proteção contra *S. aureus* e *S. epidermidis*

[00233] Em uma forma de realização preferida da invenção, a composição imunogênica provê uma resposta imune eficaz contra mais do que uma cepa de estafilococos, preferivelmente contra cepas de ambos *S. aureus* e *S. epidermidis*. Mais preferivelmente, uma resposta imune protetora é gerada contra sorotipos tipo 5 e 8 de *S. aureus*. Mais preferivelmente, uma resposta imune protetora é gerada contra cepas múltiplas de *S. epidermidis*, por exemplo de cepas de pelo menos dois dos sorotipos I, II e III de *S. epidermidis*.

[00234] Um uso da composição imunogênica da invenção é prevenir as infecções nosocomiais por inoculação antes do tratamento hospitalar. Neste estágio, é difícil prever com precisão a quais cepas estafilocócicas o paciente estará exposto. Assim, é vantajoso inocular com a vacina que é capaz de gerar uma resposta imune eficaz contra várias cepas de estafilococos.

[00235] Uma resposta imune eficaz é definida como uma resposta imune que dá uma significativa proteção em um modelo de desafio de camundongo ou teste de opsonofagocitose como descrito nos exemplos.

Significante proteção em um modelo de desafio de camundongo, por exemplo o do exemplo 5, é definido como um aumento em LD50 em comparação com camundongos inoculados com veículo de pelo menos 10%, 20%, 50%, 100% ou 200%. Significante proteção em um modelo de desafio de rato do algodão, por exemplo o do exemplo 8, é definido como uma diminuição no LogCFU/focinho médio observado de pelo menos 10%, 20%, 50%, 70% ou 90%. A presença de anticorpos opsonisantes é conhecida como correlacionada com proteção, assim significativa proteção é indicada por uma diminuição na contagem bacteriana de pelo menos 10%, 20%, 50%, 70% ou 90% em um teste de opsonofagocitose, por exemplo o do exemplo 7.

[00236] Vários das proteínas incluindo transportador de ABC imunodominante, proteína de ativação de RNA III, Receptores de laminina, SitC, IsaA/PisA, SsaA, EbhA/EbhB, EbpS e Aap são bem conservadas entre *S. aureus* e *S. epidermidis* e exemplo 8 mostra que IsaA, ClfA, IsdB, SdrG, HarA, FnbpA e Sbi podem gerar uma resposta imune reativa –cruzada (por exemplo reativo cruzado entre pelo menos uma cepa de *S. aureus* e pelo menos uma cepa de *S. epidermidis*). PIA é também bem conservado entre *S. aureus* e *S. epidermidis* e é capaz de induzir uma resposta imune protetora cruzada.

[00237] Assim, em uma forma de realização preferida, a composição imunogênica da invenção irá compreender duas, três ou quatro das proteínas acima, preferivelmente ainda compreendendo PIA (PNAG).

Vacinas de Polinucleotídeos

[00238] Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se ao uso dos polinucleotídeos da figura 2 no tratamento, prevenção ou diagnose de infecção estafilocócica. Estes polinucleotídeos incluem polinucleotídeos isolados, compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo que tem pelo menos 70% identidade, preferivelmente pelo menos 80% identidade, mais preferivelmente pelo menos 90% identidade,

ainda mais preferivelmente pelo menos 95% identidade, para a sequência de aminoácidos da figura 1, sobre o comprimento completo da sequência. Neste aspecto, os polipeptídeos que tem pelo menos 97% identidade são altamente preferidos, enquanto os com pelo menos 98-99% identidade são mais altamente preferidos, e os com pelo menos 99% de identidade são os mais altamente preferidos.

[00239] Outros polinucleotídeos que encontram utilidade na presente invenção incluem polinucleotídeos isolados compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos 70% identidade, preferivelmente pelo menos 80% identidade, mais preferivelmente pelo menos 90% identidade, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% identidade, para uma sequência de nucleotídeos codificando uma proteína da invenção sobre toda a região de codificação. Neste aspecto, polinucleotídeos que tem pelo menos 97% identidade são altamente preferidos, enquanto os com pelo menos 98-99% identidade são mais altamente preferidos, e os com pelo menos 99% identidade são os mais altamente preferidos.

[00240] Outros polinucleotídeos incluem polinucleotídeos isolados compreendendo uma sequência de nucleotídeos que tem pelo menos 70% identidade, preferivelmente pelo menos 80% identidade, mais preferivelmente pelo menos 90% identidade, ainda mais preferivelmente pelo menos 95% identidade, para as sequências da figura 1. Neste aspecto, polinucleotídeos que tem pelo menos 97% identidade são altamente preferidos, enquanto os com pelo menos 98-99% identidade são mais altamente preferidos, e os com pelo menos 99% identidade são os mais altamente preferidos. Referido polinucleotídeo pode ser inserido em um plasmídeo apropriado ou vetor de microrganismo recombinante e usado para imunização (ver por exemplo Wolff et. al., Science 247:1465-1468 (1990); Corr et. al., J. Exp. Med. 184:1555-1560 (1996); Doe et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8578-8583 (1996)).

[00241] A presente invenção também provê um ácido nucleico codificando as proteínas acima mencionadas da presente invenção e seu uso em medicina. Em uma forma de realização preferida, os polinucleotídeos isolados de acordo com a invenção podem ser de filamento único (codificação ou anti-sentido) ou de filamento duplo, e podem ser moléculas de DNA (genômico, cDNA ou sintético) ou de RNA. As seqüências de codificação ou não codificação adicionais podem, mas não precisam, estar presentes dentro de um polinucleotídeo da presente invenção. Em outras formas de realização relacionadas, a presente invenção provê variantes de polinucleotídeos tendo identidade substancial para as seqüências como descritas aqui na figura 2; as compreendendo pelo menos 70% identidade de seqüência, preferivelmente pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95 %, 96%, 97%, 98%, ou 99% ou mais, identidade de seqüência comparada a uma seqüência de polinucleotídeos desta invenção usando os métodos descritos aqui, (por exemplo, análise BLAST usando parâmetros padrões). Em uma relacionada forma de realização, o polinucleotídeo isolado da invenção irá compreender uma seqüência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo que tem pelo menos 90%, preferivelmente 95% e acima, de identidade para a seqüência de aminoácidos da figura 1, sobre o comprimento completo da seqüência da figura 1; ou uma seqüência de nucleotídeos complementar ao referido polinucleotídeo isolado.

[00242] A invenção também contempla o uso de polinucleotídeos que são complementares a todos os polinucleotídeos acima descritos.

[00243] A invenção também provê o uso de um fragmento de um polinucleotídeo da invenção que quando administrado a um indivíduo tem as mesmas propriedades imunogênicas como um polinucleotídeo da figura 1.

[00244] A invenção também provê o uso de um polinucleotídeo codificando um fragmento imunológico de uma proteína da figura 1 como acima definido. Também são contemplados o uso destes fragmentos que tem

um nível de atividade imunogênica de pelo menos cerca de 50%, preferivelmente pelo menos cerca de 70% e mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% do nível de atividade imunogênica de uma sequência de polipeptídeos codificada por uma sequência de polinucleotídeos especificada em Figura 2.

[00245] Os fragmentos de polipeptídeos para uso de acordo com a invenção preferivelmente compreendem pelo menos cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 50, ou 100 aminoácidos contíguos, ou mais, incluindo todos os comprimentos intermediários, de uma composição de polipeptídeo especificada aqui, como especificado acima.

[00246] Os polinucleotídeos para uso na invenção podem ser obtidos, usando técnicas de clonagem e triagem padrões, de uma biblioteca de cDNA derivada de mRNA em células de tecido de tumor ou pré-neoplásico humano (pulmão, por exemplo), (por exemplo Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a Ed., Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, N.Y. (1989)). Polinucleotídeos da invenção também podem ser obtidos de fontes naturais como bibliotecas de DNA genômico ou podem ser sintetizados usando técnicas bem conhecidas e comercialmente disponíveis.

[00247] Existem vários métodos disponíveis e bem conhecidos dos versados na técnica para obter cDNAs de comprimento completo, ou para estender cDNAs curtos, por exemplo os baseados no método de Amplificação Rápida de extremidades de cDNA (RACE) (ver, por exemplo, Frohman et al., PNAS USA 85, 8998-9002, 1988). Recentes modificações da técnica, exemplificada por tecnologia Marathon™ (Clontech Laboratories Inc.) por exemplo, tem amplificado significativamente a busca por cDNAs mais longos. Na tecnologia Marathon™, cDNAs foram preparados a partir de mRNA extraído de um tecido escolhido e uma sequência de 'adaptador' ligada em cada extremidade. A amplificação de ácido nucleico (PCR) é então realizada para amplificar a extremidade 5' "faltante" do cDNA usando uma combinação

de iniciadores de oligonucleotídeos específicos para genes e específicos para adaptador. A reação de PCR é então repetida usando iniciadores 'abrigados' isto, é iniciadores projetados para anelar dentro do produto amplificado, (tipicamente um iniciador específico para adaptador que anela outro 3' na sequência de adaptador e um iniciador específico para gene que anela outro 5' na sequência de gene conhecida). Os produtos desta reação são então analisados por sequenciamento de DNA e um cDNA de comprimento completo construído por ou união do produto diretamente ao cDNA existente para dar uma sequência completa ou realizando um PCR de comprimento completo separado, usando a nova informação de sequência para o projeto de um iniciador 5'.

[00248] Vetores compreendendo este DNA, hospedeiros transformados assim e as próprias proteínas híbridas ou truncadas, expressados como descritos abaixo formam, todos, parte da invenção.

[00249] O sistema de expressão também pode ser um microorganismo vivo recombinante, como um vírus ou bactéria. O gene de interesse pode ser inserido no genoma de um vírus recombinante vivo ou bactéria. A inoculação e infecção *in vivo* com este vetor vivo irá levar a uma expressão *in vivo* do antígeno e indução das respostas imunes.

[00250] Assim, em algumas formas de realização, polinucleotídeos codificando polipeptídeos imunogênicos para uso de acordo com a presente invenção são introduzidos em células de hospedeiro mamífero apropriadas, para expressão usando qualquer número de sistemas com base viral conhecidos. Em uma forma de realização ilustrativa, os retrovírus provêm uma plataforma conveniente e eficaz para os sistemas de liberação de genes. Uma sequência de nucleotídeos selecionada codificando um polipeptídeo para uso na presente invenção pode ser inserida em um vetor e embalada em partículas retrovirais usando técnicas bem conhecidas na técnica. O vírus recombinante pode ser então isolado e liberado para um indivíduo. Vários

sistemas retrovirais ilustrativos foram descritos (por exemplo, patente US No. 5,219,740; Miller e Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; e Boris-Lawrie e Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

[00251] Além disso, vários sistemas com base em adenovírus ilustrativos foram também descritos. Diferente dos retrovírus que integram no genoma hospedeiro, os adenovírus persistem extracromossomicamente, assim minimizando os riscos associados com mutagenese insercional (Haj-Ahmad e Graham (1986) *J. Virol.* 57:267-274; Bett et al. (1993) *J. Virol.* 67:5911-5921; Mittereder et al. (1994) *Human Gene Therapy* 5:717-729; Seth et al. (1994) *J. Virol.* 68:933-940; Barr et al. (1994) *Gene Therapy* 1:51-58; Berkner, K. L. (1988) *BioTechniques* 6:616-629; e Rich et al. (1993) *Human Gene Therapy* 4:461-476).

[00252] Os vários sistemas de vetor de vírus adeno-associados (AAV) também foram desenvolvidos para a liberação de polinucleotídeos. Os vetores AAV podem ser prontamente construídos usando técnicas bem conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, patente US Nos. 5.173.414 e 5.139.941; Publicação Internacional Nos. WO 92/01070 e WO 93/03769; Lebkowski et al. (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996; Vincent et al. (1990) *Vaccines* 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol, and Immunol.* 158:97-129; Kotin, R. M. (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Shelling e Smith (1994) *Gene Therapy* 1:165-169; e Zhou et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179:1867-1875.

[00253] Os vetores virais adicionais utilizáveis para a liberação de moléculas de ácido nucleico codificando polipeptídeos para uso na presente invenção por transferência de genes incluem os derivados de família pox de vírus, como vírus de vacínia e poxvírus aviário. A título de exemplo, os

recombinantes de vírus de vacínia expressando as moléculas de interesse podem ser construídos como a seguir. O DNA codificando um polipeptídeo é primeiro inserido em um vetor apropriado de modo a ficar adjacente a um promotor de vacínia e flanquear as seqüências de DNA de vacínia, como a seqüência codificando timidina cinase (TK). Este vetor é então usado para transfectar células que são simultaneamente infectadas com vacínia. A recombinação homóloga serve para inserir o promotor de vacínia mais o gene codificando o polipeptídeo de interesse no genoma viral. O recombinante Tk.sup.(-) resultante pode ser selecionado por cultivo de células na presença de 5-bromodeoxiuridina e recolhendo placas virais resistentes ao mesmo.

[00254] Um sistema de infecção / transfecção baseado em vacínia pode ser usado de modo conveniente para prover uma expressão indutível, transiente, ou co-expressão de um ou mais polipeptídeos descritos aqui em células hospedeiras de um organismo. Neste sistema particular, as células são primeiro infectadas *in vitro* com um recombinante de vírus de vacínia que codifica RNA polimerase de bacteriófago T7. Esta polimerase demonstra especificidade extraordinária em que somente transcreve gabaritos contendo promotores T7. Após infecção, as células são transfectadas com o polinucleotídeo ou polinucleotídeos de interesse, dirigidos por um promotor T7. A polimerase expressada no citoplasma do recombinante de vírus de vacínia transcreve o DNA transfectado no RNA que é então traduzido em polipeptídeo pelo maquinário translacional do hospedeiro. O método provê uma produção citoplásmica transiente, de alto nível de quantidades grandes de RNA e seus produtos de tradução. Ver, por exemplo, Elroy-Stein e Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:6743-6747; Fuerst et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:8122-8126.

[00255] Alternativamente, avipoxvírus, como os vírus fowlpox e canarypox, também podem ser usados para liberar as seqüências de codificação de interesse. Os vírus avipox recombinantes, expressando

imunógenos de patógenos de mamíferos, são bem conhecidos como conferindo imunidade protetora quando administrados a espécies não aviárias. O uso de um vetor Avipox é particularmente desejável em espécies humanas e outras de mamíferos, porque os membros do gênero Avipox podem somente se replicar produtivamente em espécies aviárias susceptíveis e, assim, não são infectivos em células de mamíferos. Os métodos para produzir Avipoxvírus recombinantes são bem conhecidos na técnica e empregam recombinação genética, como descrito acima com relação à produção de vírus de vacína. Ver, por exemplo, WO 91/12882; WO 89/03429; e WO 92/03545.

[00256] Qualquer um dentre vários vetores de alfavírus também podem ser usados para a liberação de composições de polinucleotídeos para uso na presente invenção, como os vetores descritos em patentes US os. 5.843.723; 6.015.686; 6.008.035 e 6.015.694. Alguns vetores baseados em encefalite eqüina da Venezuela (VEE) também podem ser usados, ilustrativos exemplos podendo ser encontrados em patentes US Nos. 5.505.947 e 5.643.576.

[00257] Além disso, vetores de conjugados moleculares, como os vetores quiméricos de adenovírus descritos em Michael et al. J. Biol. Chem. (1993) 268:6866-6869 e Wagner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:6099-6103, também podem ser usados para a liberação de genes sob a invenção.

[00258] A informação ilustrativa adicional para estes e outros sistemas de liberação com base viral podem ser encontrados por exemplo, em Fisher-Hoch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321, 1989; Flexner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86-103, 1989; Flexner et al., Vaccine 8:17-21, 1990; patentes US 4.603.112, 4.769.330, e 5.017.487; WO 89/01973; patente USNo. 4.777,127; GB 2.200.651; EP 0,345.242; WO 91/02805; Berkner, Biotechniques 6:616-627, 1988; Rosenfeld et al., Science 252:431-434, 1991; KoII et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219, 1994; Kass-Eisler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11498-11502, 1993; Guzman et al.,

Circulation 88: 2838-2848, 1993; e Guzman et al., Cir. Res. 73:1202-1207, 1993.

[00259] Os microorganismos vivos recombinantes descritos acima podem ser virulentos, ou atenuados em vários modos a fim de obter vacinas vivas. Estas vacinas também formam parte da invenção.

[00260] Em algumas formas de realização, um polinucleotídeo pode ser integrado no genoma de uma célula de marcação. Esta integração pode ser no local específico e orientação via recombinação homóloga (substituição de genes) ou pode ser integrada em local aleatório, não específico (aumento do gene). Em ainda outras formas de realização, o polinucleotídeo pode ser estavelmente mantido na célula como um segmento episomal separado de DNA. Estes segmentos de polinucleotídeo s ou “epissomas” codificam seqüências suficientes para permitir manutenção e replicação independentes de ou em sincronização com o ciclo de célula hospedeira. O modo em que a construção de expressão é liberada para uma célula e onde na célula o polinucleotídeo permanece é dependente do tipo de construção de expressão empregada.

[00261] Em outra forma de realização da invenção, um polinucleotídeo é administrado/liberado como DNA “nu”, por exemplo como descrito em Ulmer et al., Science 259:1745-1749, 1993 e revisto por Cohen, Science 259:1691-1692, 1993. A absorção do DNA nu pode ser aumentada por revestimento do DNA em contas biodegradáveis, que são transportadas de modo eficiente nas células.

[00262] Em ainda outra forma de realização, uma composição da presente invenção pode ser liberada via uma abordagem de bombardeio de partículas, muitas das quais foram descritas. Em um exemplo ilustrativo, a aceleração de partículas acionada por gás pode ser obtida com dispositivos como os fabricados por Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK) e Powderject Vacinas Inc. (Madison, WI)₁ dos quais alguns exemplos são

descritos em patentes US Nos. 5.846.796; 6.010,478; 5.865.796; 5.584.807; e Patente EP No. 0500 799. Esta abordagem oferece uma abordagem de liberação sem agulha em que uma formulação de pó seco de partículas microscópicas, como partículas de polinucleotídeos ou polipeptídeos, são aceleradas em alta velocidade dentro de um jato de gás hélio gerado por um dispositivo manual, propelindo as partículas em um tecido alvo de interesse.

[00263] Em uma forma de realização, outros dispositivos e métodos que podem ser utilizáveis para injeção sem agulha acionada por gás de composições da presente invenção incluem os providos por Bioject, Inc. (Portland, OR), dos quais alguns exemplos são descritos em patentes US Nos. 4.790.824; 5.064.413; 5.312.335; 5.383.851; 5.399.163; 5.520.639 e 5.993.412.

Vacinas

[00264] Em uma forma de realização preferida, a composição imunogênica da invenção é misturada com um excipiente farmacêuticamente aceitável, mais preferivelmente com um adjuvante para formar a vacina.

[00265] As vacinas da presente invenção são preferivelmente feitas com adjuvantes. Os adjuvantes apropriados incluem um sal de alumínio como gel hidróxido de alumínio (alúmen) ou fosfato de alumínio, mas também podem ser um sal de cálcio, magnésio, ferro ou zinco, ou podem ser uma suspensão insolúvel de tirosina acilada, ou açúcares acilados, polissacarídeos cationicamente ou anionicamente derivatizados ou polifosfazenos.

[00266] Prefere-se que o adjuvante seja selecionado para ser um indutor preferencial de tipo TH1 ou TH2 de resposta. Os níveis elevados de citocinas de tipo Th1 tendem a favorecer a indução de respostas imunes mediadas por células para um dado antígeno, enquanto níveis elevados de citocinas de tipo Th2 tendem a favorecer a indução de respostas imunes humorais para o antígeno.

[00267] É importante lembrar que a distinção de resposta imune de tipo

Th1 e Th2 não é absoluta. Na verdade, um indivíduo irá suportar uma resposta imune que é descrita como sendo predominantemente Th1 ou predominantemente Th2. No entanto, é com frequência conveniente considerar as famílias de citocinas em termos como descritas em clones de células T CD4 +ve de murinos por Mosmann e Coffman (Mosmann, T.R. e Coffman, R.L (1989) TH1 e TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 7, p145-173). Tradicionalmente as respostas tipo Th1 são associadas com a produção de citocinas IL-2 e INF- γ por linfócitos T. Outras citocinas com frequência diretamente associadas com a indução de resposta imune tipo Th1 não são produzidas por células T, como IL-12. Em contraste, as respostas de tipo Th2 são associadas com a secreção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Os sistemas adjuvantes apropriados que promovem uma resposta predominantemente Th1 incluem: monofosforil lipídeo A ou um derivado do mesmo, particularmente 3-de-O-acilado lipídeo monofosforila A (3D-MPL) (para sua preparação ver GB 2220211 A); e a combinação de lipídeo monofosforila A, preferivelmente 3-de-O-acilado lipídeo monofosforila A, (3D-MPL) (para sua preparação ver GB 2220211 A), e uma combinação de lipídeo monofosforila A, preferivelmente 3-de-O-acilado lipídeo monofosforila A, junto com ou um sal de alumínio (por exemplo fosfato de alumínio ou hidróxido de alumínio) ou uma emulsão óleo-em-água. Em tais combinações, o antígeno e 3D-MPL estão contidos nas mesmas estruturas particuladas, permitindo por uma liberação mais eficaz de sinais antigênicos e imunoestimulatórios. Os estudos tem demonstrado que 3D-MPL é capaz de ainda melhorar a imunogenicidade de um antígeno adsorvido em alumínio [Thoelen et al Vaccine (1998) 16:708-14; EP 689454-B1].

[00268] Um sistema melhorado envolve a combinação de lipídeo monofosforila A e um derivado de saponina, particularmente a combinação de QS21 e 3D-MPL como descrito em WO 94/00153, ou uma composição

menos reatogênica onde o QS21 é extinto com colesterol como descrito em WO 96/33739. Uma formulação de adjuvante particularmente potente envolvendo QS21, 3D-MPL e tocoferol em uma emulsão óleo em água é descrita em WO 95/17210, e é uma formulação preferida. Preferivelmente a vacina adicionalmente compreende uma saponina, mais preferivelmente QS21. A formulação também pode compreender uma emulsão óleo em água e tocoferol (WO 95/17210). A presente invenção também provê um método para produzir uma formulação de vacina compreendendo misturar uma proteína da presente invenção junto com um excipiente farmacologicamente aceitável, como 3D-MPL. CpG não metilado contendo oligonucleotídeos (WO 96/02555) é também um indutor preferencial de uma resposta de TH1 e apropriado para uso na presente invenção.

[00269] As composições preferidas da invenção são as formando uma estrutura de lipossoma. Composição onde a fração de esterol / saponina imunologicamente ativa forma uma estrutura ISCOM também forma um aspecto da invenção.

[00270] A relação de QS21: esterol irá tipicamente ser da ordem de 1: 100 a 1: 1 peso a peso. Preferivelmente o esterol em excesso está presente, a relação de QS21: esterol sendo de pelo menos 1: 2 p/p. Tipicamente, para administração humana, QS21 e esterol estarão presentes na vacina na faixa de cerca de 1 µg a cerca de 100 µg, preferivelmente cerca de 10 µg a cerca de 50 µg por dose.

[00271] Os lipossomas preferivelmente contém um lipídeo neutro, por exemplo fosfatidilcolina, que é preferivelmente não cristalina em temperatura ambiente, por exemplo fosfatidilcolina de gema de ovo, dioleoil fosfatidilcolina ou dilauril fosfatidilcolina. Os lipossomas também podem conter um lipídeo carregado que aumenta a estabilidade da estrutura lipossoma- QS21 para lipossomas compostos de lipídeos saturados. Nestes casos, a quantidade de lipídeo carregado é preferivelmente 1-20% p/p, o mais

preferivelmente 5-10%. A relação de esterois para fosfolípido é 1-50% (mol/mol), o mais preferivelmente 20-25%.

[00272] Preferivelmente, as composições da invenção contêm MPL (3-deacilado mono-fosforil lipídeo A, também conhecido como 3D-MPL). 3D-MPL é conhecido de GB 2 220 211 (Ribi) como uma mistura de 3 tipos de De-O-acilado lipídeo monofosforila A com 4, 5 ou 6 cadeias acetiladas e fabricado por Ribi Immunochem, Montana. Uma forma preferida é descrita no pedido de patente internacional 92/116556.

[00273] As composições apropriadas da invenção são as em que os lipossomas são inicialmente preparados sem MPL, e MPL é então adicionado, preferivelmente como partículas de 100 nm. O MPL assim não está contido dentro da membrana da vesícula (conhecido como fora de MPL). As composições onde o MPL está contido dentro da membrana da vesícula (conhecidas como MPL) também formam um aspecto da invenção. O antígeno pode estar contido dentro da membrana da vesícula ou contido fora da membrana da vesícula. Preferivelmente, os antígenos solúveis estão fora e antígenos hidrofóbicos e lipídicos estão ou contidos dentro ou fora da membrana.

[00274] As preparações de vacina da presente invenção podem ser usadas para proteger ou tratar um mamífero susceptível à infecção, por meio de administração de uma vacina através de via sistêmica ou mucosal. Estas administrações podem incluir injeção através das vias intramuscular, intraperitoneal, intradérmica ou subcutânea, ou através de administração mucosal aos tratos oral/ alimentar, respiratório, genitourinário. A administração intranasal de vacinas para o tratamento de pneumonia ou otite média é preferida (como o transporte nasofaríngeo de pneumococos pode ser evitado de modo mais efetivo, assim a atenuação da infecção em seu estado prematuro). Apesar da vacina da invenção poder ser administrada como uma dose única, os seus componentes podem ser também co-administrados juntos

ao mesmo tempo ou em tempos diferentes (por exemplo polissacarídeos pneumocócicos podem ser administrados em separado, ao mesmo tempo ou 1-2 semanas após a administração de qualquer componente de proteína bacteriana da vacina para uma coordenação ótima das respostas imunes com relação um ao outro). Para co-administração, o adjuvante Th1 opcional pode estar presente em qualquer uma ou todas as administrações diferentes, no entanto, prefere-se se estiver presente em combinação com o componente de proteína bacteriana da vacina. Além de uma via única de administração, 2 vias diferentes de administração podem ser usadas. Por exemplo, os polissacarídeos podem ser administrados IM (ou ID) e proteínas bacterianas podem ser administradas IN (ou ID). Além disso, as vacinas da invenção podem ser administradas IM para doses de iniciação e IN para doses de reforço.

[00275] A quantidade de antígeno conjugado em cada dose de vacina é selecionada como uma quantidade que induz uma resposta imunoprotetora sem efeitos laterais adversos, significantes, em vacinas típicas. Esta quantidade irá variar dependendo de qual imunogene específico é empregado e como ele é apresentado. Geralmente, espera-se que cada dose irá compreender 0,1 -100 µg de polissacarídeo, preferivelmente 0,1 -50 µg para conjugados de polissacarídeo, preferivelmente 0,1 -10 µg, mais preferivelmente 1-10 µg, de que 1 a 5 µg é uma faixa mais preferível.

[00276] O teor dos antígenos de proteína na vacina estarão tipicamente na faixa de 1-100µg, preferivelmente 5-50µg, o mais tipicamente na faixa de 5 - 25µg. Após uma vacinação inicial, os indivíduos podem receber uma ou várias imunizações de reforço espaçadas de modo apropriado.

[00277] A preparação de vacina é geralmente descrita em Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). Encapsulação dentro de lipossomas é descrita por Fullerton, Patente US 4.235.877.

[00278] As vacinas da presente invenção pode ser armazenadas em solução ou liofilizadas. Preferivelmente a solução é liofilizada na presença de um açúcar como sacarose, trealose ou lactose. É ainda mais preferível que elas sejam liofilizadas e reconstituídas extemporaneamente antes do uso. A liofilização pode resultar em uma composição mais estável (vacina) e pode possivelmente levar a maiores títulos de anticorpos na presença de 3D-MPL e na ausência de um adjuvante à base de alumínio.

Anticorpos e imunização passiva

[00279] Outro aspecto da invenção é um método de preparar uma globulina imune para uso na prevenção ou tratamento de infecção estafilocócica compreendendo as etapas de imunizar um recipiente com vacina da invenção e isolar a globulina imune do recipiente. Uma globulina imune preparada por este método é um outro aspecto da invenção. A composição farmacêutica compreendendo a globulina imune da invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável é um outro aspecto da invenção que pode ser usado na fabricação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de doenças estafilocócicas. Um método para tratamento ou prevenção de infecção estafilocócica compreendendo uma etapa de administrar a um paciente uma quantidade eficaz da preparação farmacêutica da invenção é um outro aspecto da invenção.

[00280] Os inóculos para a produção de anticorpos policlonais são tipicamente preparados por dispersão da composição antigênica em um diluente fisiologicamente tolerável como solução salina ou outros adjuvantes apropriados para uso humano para formar uma composição aquosa. Uma quantidade imunoestimulatória de inóculo é administrada a um mamífero e o mamífero inoculado é então mantido durante um tempo suficiente para a composição antigênica induzir anticorpos protetores.

[00281] Os anticorpos podem ser isolados na extensão desejada por técnicas bem conhecidas como cromatografia de afinidade (Harlow e Lane,

Antibodies; a laboratory manual 1988).

[00282] Os anticorpos podem incluir preparações de antisoro de vários dos animais comumente usados, porção cabras, primatas, burros, suínos, cavalos, porquinhos da índia, ratos ou homens. Os animais são sangrados e o soro recuperado.

[00283] Uma globulina imune produzida de acordo com a presente invenção pode incluir anticorpos completos, fragmentos de anticorpos ou sub-fragmentos. Os anticorpos podem ser imunoglobulinas completas de qualquer classe, por exemplo IgG, IgM, IgA₁ IgD ou IgE, anticorpos quiméricos, ou anticorpos híbridos com especificidade dual para dois ou mais antígenos da invenção. Eles também podem ser fragmentos por exemplo F(ab')₂, Fab', Fab, Fv e outros incluindo fragmentos híbridos. Uma globulina imune também inclui proteínas naturais, sintéticas ou geneticamente engenheiradas que podem atuar como um anticorpo por ligação a antígenos específicos para formar um complexo.

[00284] A vacina da presente invenção pode ser administrada a um recipiente que então atua como uma fonte de globulina imune, produzida em resposta ao desafio da vacina específica. Um indivíduo assim tratado irá doar plasma da qual a globulina super-imune pode ser obtida via uma metodologia de fracionamento de plasma convencional. A globulina hiperimune deve ser administrada a outro indivíduo a fim de conferir resistência contra ou tratar a infecção estafilocócica. As globulinas hiperimunes da invenção são particularmente úteis para tratamento ou prevenção de doenças estafilocócicas em criancinhas, indivíduos imuno- comprometidos ou onde o tratamento é requerido e não se tem tempo para o indivíduo produzir anticorpos em resposta à vacinação.

[00285] Um aspecto adicional da invenção é uma composição farmacêutica compreendendo dois ou mais anticorpos monoclonais (ou fragmentos dos mesmos; preferivelmente humanos ou humanizados) reativos

contra pelo menos dois constituintes da composição imunogênica da invenção, que podem ser usados para tratar ou evitar infecção por bactérias Gram positivas, preferivelmente estafilococos, mais preferivelmente *S. aureus* ou *S. epidermidis*. Estas composições farmacêuticas compreendem anticorpos monoclonais que podem ser imunoglobulinas completas de qualquer classe, por exemplo IgG, IgM, IgA, IgD ou IgE, anticorpos quiméricos ou anticorpos híbridos com especificidade para dois ou mais antígenos da invenção. Eles também podem ser fragmentos por exemplo F(ab')₂, Fab', Fab, Fv e outros incluindo fragmentos híbridos.

[00286] Métodos de fabricar anticorpos monoclonais são bem conhecidos na técnica e podem incluir a fusão de esplenócitos com células de mieloma (Kohler e Milstein 1975 Nature 256; 495; Antibodies - a laboratory manual Harlow e Lane 1988). Alternativamente, fragmentos Fv monoclonais podem ser obtidos por triagem de uma biblioteca de exibição de fagos apropriada (Vaughan TJ et al 1998 Nature Biotechnology 16; 535). Anticorpo monoclonais podem ser humanizados ou humanizados em parte por métodos bem conhecidos.

Métodos

[00287] A invenção também engloba método de fabricar as composições imunogênicas e vacinas da invenção.

[00288] Um processo preferido da invenção, é um método para fabricar uma vacina compreendendo as etapas de misturar antígenos para fazer a composição imunogênica da invenção e adicionar um excipiente farmacêuticamente aceitável.

Métodos de tratamento

[00289] A invenção também engloba métodos de tratamento ou infecção estafilocócica, particularmente infecções nosocomiais adquiridas em hospital.

[00290] Esta composição imunogênica ou vacina da invenção é

particularmente vantajosa de usar em casos de cirurgia eletiva. Estes pacientes irão saber a data de cirurgia antes e podem ser inoculados antes. Porque não se sabe se o paciente será exposto a infecção por *S. aureus* ou *S. epidermidis*, prefere-se inocular com uma vacina da invenção que protege contra ambos, como acima mencionado. Preferivelmente, adultos acima de 16 esperando uma cirurgia eletiva são tratados com as composições imunogênicas e vacinas da invenção.

[00291] Também é vantajoso inocular os trabalhadores na área de saúde com a vacina da invenção.

[00292] As preparações de vacina da presente invenção podem ser usadas para proteger ou tratar um mamífero susceptível a infecção, por meio de administração de referida vacina através de uma via sistêmica ou mucosal. Estas administrações podem incluir injeção através das vias intramuscular, intraperitoneal, intradérmica ou subcutânea, ou via administração mucosal para os tratos oral/alimentar, respiratório, genitourinário.

[00293] A quantidade de antígeno em cada dose de vacina dose é selecionada como uma quantidade que induz uma resposta imunoprotetora sem efeitos laterais adversos significantes, de vacinas típicas. Esta quantidade irá variar dependendo do imunogene específica empregado e como ele é apresentado. O teor de proteína da vacina estará tipicamente na faixa de 1 - 100µg, preferivelmente 5-50µg, o mais tipicamente na faixa de 10 - 25µg. Geralmente, espera-se que cada dose irá compreender 0,1 -100 µg de polissacarídeo onde presente, preferivelmente 0,1 -50 µg, preferivelmente 0,1 -10 µg, das quais a faixa mais preferível é de 1 a 5 µg. Uma quantidade ótima para uma vacina particular pode ser verificada por estudos padrões envolvendo a observação de respostas imunes apropriadas em indivíduos. Após uma vacinação inicial, os indivíduos podem receber uma ou várias imunizações de reforço espaçadas de modo adequado.

[00294] Apesar das vacinas da presente invenção poderem ser

administradas por qualquer via, a administração das vacinas descritas na pele (ID) forma uma forma de realização da presente invenção. A pele humana compreende uma cutícula “calosa” externa, chamada o estrato córneo, que está acima da epiderme. Embaixo desta epiderme, está uma camada chamada a derme, que por sua vez sobrepõe o tecido subcutâneo. Os pesquisadores tem demonstrado que a injeção de uma vacina dentro da pele, e particularmente na derme, estimula uma resposta imune, que pode também estar associada com várias vantagens adicionais. A vacinação intradérmica com as vacinas aqui descritas forma um aspecto preferido da presente invenção.

[00295] A técnica convencional de injeção intradérmica, o “procedimento mantoux” compreende as etapas de limpar a pele, e então esticar com uma mão, e com o chanfro de uma agulha de calibre estreito (calibre 26-31) voltada para cima, a agulha é inserida em um ângulo de entre 10-15 °. Uma vez que o chanfro da agulha é inserido, o tambor da agulha é abaixado e ainda avançado enquanto provendo uma pressão leve para o elevar sob a pele. O líquido é então injetado muito lentamente assim formando uma bolha ou inchaço sobre a superfície da pele, seguido por retirada lenta da agulha.

[00296] Mais recentemente, dispositivos que são especificamente projetados para administrar agentes líquidos dentro ou através da pele foram descritos, por exemplo os dispositivos descritos em WO 99/34850 e EP 1092444, também os dispositivos de injeção com jato descritos, por exemplo em WO 01/13977; US 5.480,381, US 5.599.302, US 5.334.144, US 5.993.412, US 5.649.912, US 5.569.189, US 5.704.911, US 5.383.851, US 5.893.397, US 5.466.220, US 5.339.163, US 5.312.335, US 5.503.627, US 5.064.413, US 5.520, 639, US 4,596.556, US 4.790.824, US 4.941.880, US 4.940,460, WO 97/37705 e WO 97/13537. Métodos alternativos de administração intradérmica das preparações de vacina podem incluir seringas convencionais e agulhas, ou dispositivos projetados para liberação balística de

vacinas sólidas (WO 99/27961), ou curativos transdérmicos (WO 97/48440; WO 98/28037); ou aplicados à superfície da pele (liberação transdérmica ou subcutânea WO 98/20734; WO 98/28037).

[00297] Quando as vacinas da presente invenção devem ser administradas à pele, ou mais especificamente na derme, a vacina é de um volume de líquido baixo, particularmente um volume de entre cerca de 0,05 ml e 0,2 ml.

[00298] O teor de antígenos na pele ou vacinas intradérmicas da presente invenção pode ser similar a doses convencionais, como encontrado em vacinas intramusculares (ver acima). No entanto, é um aspecto das vacinas intradérmicas ou na pele que as formulações podem ser “de dose baixa”. Conseqüentemente, os antígenos de proteína em vacinas de “dose baixa” estão preferivelmente presentes em tão pouco como 0,1 a 10 µg, preferivelmente 0,1 a 5 µg por dose; e os antígenos de polissacarídeo (preferivelmente conjugados) podem estar presentes na faixa de 0,01-1 µg, e preferivelmente entre 0,01 a 0,5 µg de polissacarídeo por dose.

[00299] Como usado aqui, o termo “liberação intradérmica” significa a liberação da vacina na região da derme da pele. No entanto, a vacina não estará necessariamente localizada exclusivamente na derme. A derme é a camada na pele localizada entre cerca de 1,0 e cerca de 2,0 mm da superfície na pele humana, mas se tem uma certa quantidade de variação entre os indivíduos e em diferentes partes do corpo. Geralmente, pode-se expor para alcançar a pele ao passar 1,5 mm abaixo da superfície da pele. A derme está localizada entre o estrato córneo e a epiderme na superfície e na camada subcutânea abaixo. Dependendo do modo de liberação, a vacina pode por fim estar localizada sozinha ou primariamente dentro da derme, ou pode por fim ser distribuída dentro da epiderme e na derme.

[00300] Uma forma de realização preferida da invenção é um método de prevenir ou tratar infecção estafilocócica ou doença compreendendo a

etapa de administrar a composição imunogênica ou vacina da invenção a um paciente em necessidade da mesma.

[00301] Em uma forma de realização preferida, o paciente está esperando uma cirurgia eletiva.

[00302] Uma outra forma de realização preferida da invenção é um uso da composição imunogênica da invenção na fabricação de uma vacina para o tratamento ou prevenção de infecção estafilocócica ou doença, preferivelmente infecção estafilocócica após cirurgia.

[00303] O termo “infecção estafilocócica” engloba a infecção causada por *S. aureus* e/ou *S. epidermidis* e outras cepas estafilocócicas capazes de causar infecção em um hospedeiro mamífero, preferivelmente humano.

[00304] Os termos “compreendendo”, “compreender” e “compreende” aqui se destinam de acordo com os inventores a serem opcionalmente substituíveis pelos termos “consistindo de”, “consistir de” e “consiste de”, respectivamente, em cada caso.

[00305] Todas as referências ou pedidos de patente aqui citados no relatório de patente são incorporados por referência aqui.

[00306] A fim de que a invenção seja mais bem entendida, os seguintes exemplos são especificados. Estes exemplos são para fins de ilustração apenas, e não devem ser construídos como limitando o escopo da invenção de qualquer modo.

Exemplos

Exemplo 1 Construção de Plasmídeo para Expressar Proteínas Recombinantes

A: Clonagem.

[00307] Os sítios de restrição apropriados engenheirados em oligonucleotídeos específicos para o gene estafilocócico permitiu a clonagem direcional do produto PCR no plasmídeo de expressão de *E. coli* pET24d ou pQE-30 de modo que uma proteína pode ser expressada como uma proteína de fusão contendo uma etiqueta de cromatografia de afinidade (His)₆ N- ou

C-término.

[00308] Os iniciadores usados foram:

[00309] Alfa toxina - 5'-

CGCGGATCCGCAGATTCTGATATTAATATTAAC-3' e 5'

CCCAAGCTTTTAATTTGTCATTTCTTCTTTTTC-3'

[00310] EbpS - 5'-

CGCGGATCCGCTGGGTCTAATAATTTTAAAGATG-3' e

5'CCCAAGCTTTTATGGAATAACGATTTGTTG-3'

[00311] CifA - 5'-

CGCGGATCCAGTGAAAATAGTGTTACGCAATC-3' e

5'CCCAAGCTTTTACTCTGGAATTGGTTCAATTTC-3'

[00312] FnbpA - 5'-

CGCGGATCCACACAAACAACGCAACTAACG-3' e

5'CCCAAGCTTTTATGCTTTGTGATTCTTTTCAAAC3'

[00313] Sbi - 5'-CGCGGATCCAACACGCAACAACTTC-3' e

5'GGAAGTGCAGTTATTTCCAGAATGATAATAATTAC-3'

[00314] SdrC - 5'-CGCGGATCCGCAGAACATACGAATGGAG-3' e

5'CCCAAGCTTTTATGTTTCTTCTTCGTAGTAGC-3'

[00315] SdrG - 5'-CGCGGATCCGAGGAGAATTCAGTACAAG-3' e

5'CCCAAGCTTTTATTCGTCATCATAGTATCCG-3'

[00316] Ebh - 5'-AAAAGTACTCACCACCACCACCACC-3' e

5'AAAAGTACTCACTTGATTCATCGCTTCAG-3'

[00317] Aaa - 5'-

GCGCGCCATGGCACAAGCTTCTACACAACATAC-3' e

5'GCGCGCTCGAGATGGATGAATGCATAGCTAGA-3'

[00318] IsaA - 5'-

GCATCCATGGCACCATCACCATCACCACGAAGTAAACGTTGATCA
AGC-3' e

5'-AGCACTCGAGTTAGAATCCCCAAGCACCTAAACC-

3'

[00319] HarA - 5'-GCACCCATGGCAGAAAATACAAATACTTC-3'
e 5'TTTTCTCGAGCATTTTAGATTGACTAAGTTG-3'

[00320] Autolisina glucosaminidase - 5'-
CAAGTCCCATGGCTGAGACGACACAAGATCAAC-3' e
5'-CAGTCTCGAGTTTTACAGCTGTTTTTGGTTG-3'

[00321] Autolisina amidase - 5'-
AGCTCATATGGCTTATACTGTTACTAAACC-3' e
5'GCGCCTCGAGTTTATATTGTGGGATGTTCG-3'

[00322] IsdA - 5'-
CAAGTCCCATGGCAACAGAAGCTACGAACGCAAC-3' e
5'ACCAGTCTCGAGTAATTCTTTAGCTTTAGAGCTTG-3'

[00323] IsdB - 5'-
TATTCTCGAGGCTTTGAGTGTGTCCATCATTTG-3' e 5'-
GAAGCCATGGCAGCAGCTGAAGAAACAGGTGG-3'

[00324] MRPII - 5'-
GATTACACCATGGTTAAACCTCAAGCGAAA-3' e
5'AGGTGTCTCGAGTGCGATTGTAGCTTCATT-3'

[00325] Os produtos PCR foram primeiro introduzidos no vetor de clonagem pGEM-T (Novagen) usando células bacterianas Top10, de acordo com as instruções do fabricante. Esta construção intermediária foi feita para facilitar outra clonagem em um vetor de expressão. Os transformantes contendo o inserto de DNA foram selecionados por análise de enzima de restrição. Após digestão, uma alíquota de ~ 20 µl da reação foi analisada por eletroforese de gel agarose (0,8 % agarose em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE)). Fragmentos de DNA foram visualizados por iluminação com UV após eletroforese de gel e coloração com brometo de etídeo. Um padrão de DNA de peso molecular (patamar de 1 Kb, Life Technologies) foi submetido a eletroforese em paralelo com amostras de teste e foi usado para estimar o

tamanho dos fragmentos de DNA. Plasmídeo purificado de transformantes selecionados para cada clonagem foi então sequencialmente digerido para completar com enzimas de restrição apropriadas como recomendado pelo fabricante (Life Technologies). O fragmento de DNA digerido foi então purificado usando colunas de fuso com base em sílica gel antes da ligação com pET24d ou plasmídeo pQE-30. Clonagem de Ebh (fragmento H2), AaA, IsdA, IsdB, HarA, Atl-amidase, Atl-glucosamina, MRP, IsaA foi realizado usando o plasmídeo pET24d e clonagem de CifA, SdrC, SdrE, FnbpA, SdrG/Fbe, alfa toxina e Sbi foi realizada usando plasmídeo pQE-30.

B: Produção de vetor de expressão.

[00326] Para preparar o plasmídeo de expressão pET24d ou pQE-30 para ligação, ele foi similarmente digerido até completar com enzimas de restrição apropriadas. Um excesso molar de aproximadamente 5 vezes dos fragmentos digeridos para o vetor preparado foi usado para programar a reação de ligação. Uma reação de ligação padrão de ~20 µl (~16°C, ~16 horas), usando métodos bem conhecidos na técnica, foi realizado usando T4 DNA ligase (-2,0 unidades / reação, Life Technologies). Uma alíquota de ligação (~5 µl) foi usada para transformar células eletro-competentes M15(pREP4) ou BT21::DE3 de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Após um período de -2-3 horas a 37°C em -1,0 ml de caldo LB, células transformadas foram colocadas em placas de LB agar contendo ampicilina (100 µg/ml) e/ou canamicina (30µg/ml). Antibióticos foram incluídos na seleção. Placas foram incubadas overnight a 37°C durante -16 horas. As colônias individuais ApR/KanR foram tomadas com palitos de dentes estéreis e usadas para inocular como "curativo" placas LB ApR/KanR novas assim como uma cultura de caldo de ~1,0 ml LB Ap/ Kan. Ambas as placas e a cultura de caldo foram incubadas durante a noite a 37°C em um incubador padrão (placas) ou um banho d'água agitado. A análise PCR com base em célula total foi empregada para verificar que os transformantes

continham o inserto de DNA. Aqui, o caldo de cultura LB Ap/Kan de -1,0 ml noturno foi transferido para um tubo de polipropileno de 1,5 ml e as células coletadas por centrifugação em uma microcentrífuga Beckmann (~3 min., temperatura ambiente, ~12,000 X g). A pelota de célula foi colocada em suspensão em ~200µl de água estéril e uma alíquota de ~10µl usada para programar uma reação PCR de volume final de ~50µl contendo ambos os iniciadores de amplificação dianteiro e reverso. A etapa inicial de denaturação a 95°C foi aumentada a 3 minutos para assegurar ruptura térmica das células bacterianas e liberação de plasmídeo DNA. Um ciclador térmico ABI Modelo 9700 e um perfil de amplificação térmica de três etapas, e 32 ciclos, isto é., 95 °C 45s; 55-58°C, 45 s, 72°C, 1 min., foram usados para amplificar o fragmento BASB203 das amostras de transformantes lisados. Após a amplificação térmica, uma alíquota de ~20µl da reação foi analisada por eletroforese de gel agarose (0,8 % agarose em um tampão Tris-acetato-EDTA (TAE)). Os fragmentos de DNA foram visualizados por iluminação UV após eletroforese do gel e coloração com brometo de etídeo. Um padrão de tamanho molecular de DNA (1 Kb patamar, Life Technologies) foi submetido a eletroforese em paralelo com amostras de teste e foi usado para estimar o tamanho de produtos PCR. Transformantes que produziram o produto PCR de tamanho esperado foram identificados como cepas contendo uma construção de expressão de proteína. O plasmídeo de expressão contendo cepas foi então analisado para a expressão indutível de proteína recombinante.

C: Análise de expressão de transformantes positivos para PCR-.

[00327] Uma alíquota da cultura de semente noturna (-1,0 ml) foi inoculada em um frasco erlenmeyer de 125 ml contendo -25 ml de caldo LB Ap/Kan e foi cultivada a 37 °C com agitação (-250 rpm) até a turvação de a cultura alcançar O.D.600 de -0,5, isto é, fase meio-log (geralmente cerca de 1,5 - 2,0 horas). Neste tempo, aproximadamente metade da cultura (-12.5 ml) foi transferida para um segundo frasco de 125 ml e expressão de proteína

recombinante induzida pela adição de IPTG (carga de 1,0 M preparada em água estéril, Sigma) a uma concentração final de 1,0 mM. Incubação tanto das culturas induzidas por IPTG como não induzidas continuou por mais ~4 horas a 37 °C com agitação. Amostras (~1,0 ml) de culturas induzidas como culturas não induzidas foram removidas após o período de indução e as células coletadas por centrifugação em uma microcentrífuga a temperatura ambiente durante ~3 minutos. Pelota de células individual foi colocada em suspensão em ~50µl de água estéril, então misturada com volume igual de tampão de amostra 2X Laemelli SDS-PAGE contendo 2-mercaptoetanol, e colocados em água em ebulição durante ~3 min para desnaturar a proteína. Volumes iguais (~15µl) de lisados de células tanto induzido por IPTG bruto como não induzido foram carregados em duplicata a 12% Tris/ gel glicina poliacrilamida (mini-géis com 1 mm de espessura, Novex). As amostras de lisado induzido e não induzido foram submetidas a eletroforese junto com marcadores de peso molecular pré- coloridos(SeeBlue, Novex) sob condições convencionais usando tampão padrão de ciclo SDS/Tris/glicina (BioRad). Após a eletroforese, um gel foi colorido com azul commassie brilliant R250 (BioRad) e então descolorido para visualizar novas proteínas indutíveis por IPTG. O segundo gel foi electroblotted sobre uma membrana PVDF (tamanho de poro de 0,45 microns, Novex) durante ~2 h a 4 °C usando um aparelho BioRad Mini-Protean II blotting e tampão de transferência de metanol de Towbin (20 %). O bloqueio da membrana e incubações de anticorpo foram realizados de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Um anticorpo monoclonal anti-RGS (His)₃, seguido por um segundo anticorpo anti – camundongo de coelho conjugado a HRP (QiaGen), foram usados para confirmar a expressão e identidade da proteína recombinante. Visualização do padrão reativo do anticorpo anti-His foi obtida usando ou um substrato insolúvel em ABT ou usando Hyperfilm com sistema de quimioiluminescência Amersham ECL.

Exemplo 2: Produção de Proteína Recombinante

Cepa bacteriana

[00328] Uma cepa de expressão recombinante de E. coli M15(pREP4) contendo um plasmídeo (pQE30) ou BL21::DE3 contendo plasmídeo pET24d codificando proteínas estafilocócicas foi usada para produzir massa celular para a purificação de proteína recombinante.

Meios

[00329] O meio de fermentação usado para a produção de proteína recombinante consistia de caldo 2X YT (Difco) contendo 100µg/ml Ap e/ou 30 µg/ml Km. Antiespumante foi adicionado ao meio para o fermentador a 0,25 ml/L (Antifoam 204, Sigma). Para induzir a expressão de proteína recombinante, IPTG (Isopropil β-D-Tiogalactopiranosídeo) foi adicionado ao fermentador (1 mM, final).

Produção de proteínas recombinantes

Sob condições nativas

[00330] IPTG foi adicionado na concentração final de 1mM e a cultura foi cultivada durante 4 h adicionais. A cultura foi então centrifugada a 6,000 rpm durante 10 minutos e a pelota foi recolocada em suspensão em tampão fosfato (50 mM K₂HPO₄, KH₂PO₄ pH 7) incluindo um coquetel inibidor de protease. Esta amostra foi submetida a lise de pressão French usando uma pressão de 1500 bars (2 ciclos). Após centrifugação durante 30 minutos a 15,000 rpm, o sobrenadante foi reservado para outra purificação e NaCl foi adicionado a 0,5M. A amostra foi então carregada em uma resina de Ni-NTA (XK 16 coluna Pharmacia, resina Ni-NTA Qiagen) condicionada em 50 mM K₂HPO₄, KH₂PO₄ pH 7. Após carregar a amostra, a coluna foi lavada com Tampão A (0,2M NaH₂PO₄ pH 7, 0,3M NaCl, 10% glicerol). Para eluir a proteína ligada, o gradiente de etapa foi usado onde diferentes proporções de tampão B (0,2M NaH₂PO₄ pH 7, 0,3M NaCl, 10% glicerol e 200 mM imidazol) foram adicionados a tampão A. A proporção de tampão B foi

gradualmente aumentada de 10% a 100%. Após purificação, a fração eluída contendo a proteína foi reunida, concentrada e dialisada contra 0,002M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7, 0,1 5M NaCl.

[00331] Este método foi usado para purificar ClfA, SdrG, IsdA, IsaB, HarA, Atl-glucosamine e alfa toxina.

Sob condições desnaturantes

[00332] IPTG foi adicionado a uma concentração final de 1mM e a cultura foi cultivada durante 4 horas adicionais. A cultura foi então centrifugada a 6,000 rpm durante 10 minutos e a pelota foi recolocada em suspensão em tampão fosfato (50 mM K_2HPO_4 , KH_2PO_4 pH 7) incluindo um coquetel de inibidor de protease. Esta amostra foi submetida lise sob pressão French usando pressão de 1500 bars (2 ciclos). Após centrifugação durante 30 minutos a 15,000 rpm, a pelota foi lavada com tampão fosfato incluindo 1 M uréia. A amostra foi centrifugada durante 30 min a 15000rpm e a pelota foi recolocada em suspensão em 8M uréia, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,5M NaCl, 0,01 M Tris-Hcl pH 8 e mantida durante a noite a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada durante 20 minutos a 15000 rpm e o sobrenadante foi coletado para outra purificação. A amostra foi então carregada em uma resina Ni-NTA (coluna XK 16 Pharmacia, resina Ni-NTA, Qiagen) condicionada em 8M uréia, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,5M NaCl, 0,01 M Tris-Hcl pH 8. Após passagem do fluxo transpassante, a coluna foi lavada sucessivamente com tampão A (8M Uréia, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,5M NaCl, 0,01 M Tris, pH 8,0), tampão C (8M Uréia, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,5M NaCl, 0,01 M Tris, pH 6,3), tampão D (8M Uréia, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,5M NaCl, 0,01 M Tris, pH 5,9) e tampão E (8M Uréia, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,5M NaCl, 0,01 M Tris, pH 4,5). A proteína recombinante foi eluída da coluna durante lavagens com tampão D e E. A proteína recombinante desnaturada pode ser solubilizada em uma solução isenta de uréia. Para este fim, a proteína desnaturada contida em 8M uréia foi sucessivamente dialisada contra 4M

uréia, 0,1 M Na₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,1, 2M uréia, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,1, 0,5M arginina e 0,002M KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 7,1, 0,1 5M NaCl, 0,5M arginina.

[00333] Este método foi usado para purificar Ebh (fragmento H2), AaA, SdrC, FnbpA, Sbi, Atl-amidase e IsaA.

[00334] As proteínas purificadas foram analisadas por SDS-PAGE. Os resultados para uma proteína purificada sob condições nativas (alfa toxina) e uma proteína purificada sob condições desnaturantes (SdrC) são mostrados nas figuras 3 e 4.

Exemplo 3 Preparação de Polissacarídeos

[00335] PIA (PNAG) é preparado como descrito em Joyce et al 2003, Carbohydrate Research 338; 903-922.

[00336] Polissacarídeos Tipo 5 e tipo 8 são extraídos de *S.aureus* como descrito em Infection and Immunity 58(7); 2367.

Ativação e química de copulação:

[00337] O polissacarídeo nativo é dissolvido em NaCl 2M ou em água. A concentração ótima de polissacarídeo é avaliada para todos os sorotipos e está entre 2mg/ml e 5mg/ml.

[00338] A partir de uma solução de carga de 100 mg/ml em acetonitrila, CDAP (relação CDAP/PS:0,75 mg/mg PS) é adicionado à solução de polissacarídeo. 1,5 minutos depois, 0,2M trietilamina é adicionada para obter o pH de ativação específico (pH 8,5-10,0). A ativação do polissacarídeo é realizada nestes pH durante 2 minutos a 25°C. A proteína carreadora é adicionada ao polissacarídeo ativado em uma quantidade suficiente para dar uma relação molar 1/1 e a reação de copulação é realizada neste pH específico durante 1 hora.

[00339] Então, a reação é extinta com glicina durante 30 minutos a 25°C e durante a noite a 4°C.

[00340] Os conjugados são purificados por filtração em gel usando

uma coluna de filtração com gel Sephacryl 500HR equilibrada com 0,2M NaCl.

[00341] Os teores de carboidratos e proteína das frações eluídas são determinados. Os conjugados são reunidos e filtrados de modo estéril em uma membrana esterilizando de 0,22 μ m. As relações de PS/Proteína nas preparações conjugadas são determinadas.

Caracterização:

[00342] Cada conjugado é caracterizado por teor de proteína e polissacarídeo.

[00343] O teor de polissacarídeo é medido por teste de Resorcinol do teor de proteína pelo teste de Lowry. A relação final PS/PD (p/p) é determinada pela relação de concentrações.

Teor de DIWAP Residual (ng/ μ g PS):

[00344] A ativação do polissacarídeo com CDAP introduz um grupo cianato no polissacarídeo e DMAP (4-dimetilamino-piridin) é liberado. O teor residual de DMAP é determinado por um teste específico desejado e validado em GSK.

Teor de polissacarídeo livre (%):

[00345] O teor de polissacarídeo livre em conjugados mantidos a 4°C ou armazenados 7 dias a 37°C é determinado no sobrenadante obtido após incubação com anticorpos α -veículos e sulfato de amônio saturado seguido por uma centrifugação.

[00346] Um ELISA α -PS/ α -PS é usado para a quantificação de polissacarídeo livre no sobrenadante. A ausência de conjugado é também controlada por um ELISA α -veículo/ α -PS.

Exemplo 4 Formulação

Composições Adjuvantes

[00347] Proteína, ou individualmente ou junta, a partir dos exemplos acima pode ser formulada com combinação de polissacarídeos estafilocócicos

como adjuvante, a formulação por compreender uma mistura de 3 de -O-acilado lipídeo monofosforila A (3D-MPL) e hidróxido de alumínio, ou de 3 de -O-acilado lipídeo monofosforila A (3D-MPL) e fosfato de alumínio, ou 3D-MPL e/ou QS21 opcionalmente em uma emulsão óleo/água, e opcionalmente formulado com colesterol, ou sal de alumínio sozinho, preferivelmente fosfato de alumínio.

[00348] **3D-MPL:** é uma forma quimicamente destoxificada de lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram- negativas *Salmonella minnesota*.

[00349] Experimentos realizados em GSK Biologicals mostraram que 3D-MPL combinado com vários veículos melhora muito tanto o tipo humoral como o TH1 tipo de imunidade celular.

[00350] **QS21:** é uma saponina purificada a partir do extrato bruto de casca de árvore Quillaja Saponaria Molina, que tem uma atividade de adjuvante forte, ela ativa tanto a linfoproliferação específica para antígeno como CTLs para vários antígenos.

[00351] Vacina contendo um antígeno da invenção contendo 3D-MPL e alúmen pode ser preparada em um modo análogo ao descrito em WO93/19780 ou 92/16231. Experimentos realizados a GSK Biologicals demonstraram um efeito sinérgico claro de combinações de 3D-MPL e QS21 na indução de respostas imunes tanto humorais como de tipo TH1. Vacinas contendo um antígeno, tais antígenos são descritos em US 5750110.

[00352] Uma emulsão óleo/água pode ser composta de 2 óleos (um tocoferol e esqualeno), e de PBS contendo Tween 80 como emulsificador. A emulsão compreendida 5% esqualeno, 5% tocoferol, 0,4% Tween 80 e tinha um tamanho médio de partícula de 180 nm e conhecido como SB62 (ver WO 95/17210).

[00353] Experimentos realizados em GSK Biologicals provaram que a adição desta emulsão O/W a MPL/QS21 ainda aumenta suas propriedades imunoestimulantes.

Preparação de emulsão SB62 (concentrado de duas vezes)

[00354] Tween 80 é dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para dar uma solução a 2% em PBS. Para prover 100 ml de emulsão concentrada em duas vezes, 5g de DL alfa tocoferol e 5ml de esqualenos são submetidos a vórtice para misturar completamente. 90 ml de solução PBS/Tween são adicionados e misturados completamente. A emulsão resultante é então passada através de uma seringa e finalmente microfluidizada usando uma máquina M110S microfluidics. As gotículas de óleo resultantes tem um tamanho de aproximadamente 180 nm.

Exemplo 5

Experimentos com animais.

[00355] Camundongos fêmeas CD-1 8 a 10 semanas de idade são obtidos de Charles River Laboratories, Kingston, Mass. Para estudos de letalidade, cinco grupos de 9 a 11 camundongos CD-1 são desafiados intraperitonealmente (i.p.) com diluições em série de *S. aureus* cultivado em placas CSA. Os tamanhos inoculares na faixa de $\sim 10^{10}$ a 10^8 CFU/camundongo. Mortalidade é avaliada em uma base diária durante 3 dias. As doses letais de 50% (LD_{50} S) são estimadas usando um modelo probit das relações de resposta a dose. A hipótese de nulo de LD_{50} s comuns foi testada pelo teste de relação de possibilidade. A bacteremia subletal é iniciada por grupos de desafio de 8 a 20 camundongos pela via intravenosa (i.v.) $\sim 2 \times 10^6$ CFU/camundongo ou pela via i.p. com $\sim 2 \times 10^7$ CFU/ camundongo. Após inocular, grupos separados de animais são sangrados do rabo em tempos especificados, e os níveis de bacteremia são estimados por contagens de placas quantitativas realizadas em duplicata em placas de agar triptic soja com 5% de sangue de ovelha (Becton Dickinson Microbiology Systems). A significância estatística é determinada com a modificação de Welch do teste *t* de Student.

Exemplo 6

Metodologia geral para a determinação de respostas de anticorpos em vários mamíferos

[00356] Os soros foram testados para anticorpos IgG para os polissacarídeos estafilocócicos por um ELISA. Brevemente, os polissacarídeos capsulares purificados de ATCC. (Rockville, Md, 20852) são revestidos a 25 µg/ml solução salina tamponada com fosfato (PBS) em placas de microtítulo de ligação elevada (Nunc Maxisorp) durante a noite a 4 C. As placas são bloqueadas com soro de bezerro fetal a 10%(FCS), 1 hora a 37 C. As amostras de soro são pre-incubadas com 20 µg/ml polissacarídeo de parede celular (Statens Serum Institute, Copenhagen) e 10% FCS a temperatura ambiente durante 30 minutos para neutralizar anticorpos para este antígeno. As amostras são então diluídas duas vezes na microplaca em 10% FCS em PBS, e equilibradas a temperatura ambiente durante 1 hora com agitação. Após lavar, as microplacas são equilibradas com anticorpo monoclonal IgG Fc anti-humano rotulado com peroxidase (HP6043-HRP, Stratech Scientific Ltd) diluídas 1:4000 em 10% FCS em PBS durante 1 hora a temperatura ambiente com agitação. ELISA é realizado para medir IgG de rato usando IgG anti-Rato de cabra AffiniPure conjugado a peroxidase de Jackson ImmunoLaboratories Inc. - (H+L) (código 112-035-003) a 1:5000. As curvas de titulação são referidas para soros padrões para cada sorotipo usando comparação de log logístico por SoftMax Pro. As concentrações de polissacarídeos usadas para revestir a placa ELISA são de 10-20 µg/ml. A cor é revelada usando 4 mg OPD (Sigma) por 10 ml pH 4,5 0,1M tampão citrato com 14 µl H₂O₂ durante 15 min no escuro a temperatura ambiente. A reação é parada com 50 µl HCl, e a densidade óptica é lida a 490 nm com relação a 650 nm. As concentrações de IgG são determinadas por referência de pontos de titulação para a curva de calibre modulada usando uma equação log logística de 4 parâmetros calculada por SoftMax Pro software.

[00357] O ELISA para medir IgG de rato e murinos para os

polissacarídeos estafilocócicos é similar com as seguintes exceções. IgG anti-camundongo de cabra affiniPure conjugado a peroxidase de Jackson ImmunoLaboratories Inc. - (H+L) e IgG Anti-rato de cabra AffiniPure (H+L) foram empregados para detectar IgG ligado.

[00358] HP6043-HRP reage igualmente com IgG purificado humano e de Rhesus, e assim este reagente é usado para anti-soro de Rhesus.

[00359] ELISA de proteína é realizado similarmente ao ELISA de polissacarídeo com as seguintes modificações. A proteína é revestida durante a noite a 2,0 µg/ml em PBS. As amostras de soro são diluídas em PBS contendo 10% soro de bezerro fetal e 0,1% álcool polivinílico. O anticorpo humano ligado é detectado usando anticorpo purificado por afinidade de cabra conjugado a Peroxidase de Sigma para IgG Fc humano - (referencia A-2290).

Exemplo 7

Teste de opsonofagocitose

[00360] A morte opsonofagocitósica *in vitro* de *S. aureus* por leucócitos polimorfonucleares humanos (PMNs) é realizada como descrito em Xu et al 1992 Infect. Immun. 60; 1358. PMNs Humanos são preparados a partir de sangue heparinizado por sedimentação em 3% dextrano T- 250. A mistura de reação opsônica (1 ml) contém ~ 106 PMNs em meio RPMI 1640 suplementado com 10% soro de bezerro fetal inativado com calor, ~ 108 CFU de S-aureus, e 0,1 ml de soro de teste ou preparação de IgG. O soro de coelho hiperimunizado é usado como um controle positivo, e 0,1 ml de soro de coelho não imune foi usado como uma fonte completa para as amostras de IgG. As misturas de reação são incubadas a 37°C, e amostras bacterianas são transferidas a 0, 60, e 120 min em água e subsequentemente diluídas, espalhadas em placas de agar tryptic soy, e incubadas a 37°C para contagem bacteriana após incubação durante a noite.

Exemplo 8

Imunogenicidade de proteínas estafilocócicas em camundongos e coelhos

[00361] Animais foram imunizados com proteínas purificadas

estafilocócicas a fim de gerar soro hiper-imune. Os camundongos foram imunizados três vezes (dias 0, 14 e 28) com 10 µg de cada proteína com adjuvante em Specol. Coelhos foram imunizados três vezes (dias 0, 21 e 42) com 20 µg de cada proteína com adjuvante em Specol. Os soros imunes foram coletados e avaliados em ELISA de células completas anti – proteína e anti- mortas.

ELISA Anti-Proteína:

[00362] A proteína purificada foi revestida a 1 µg/ml em solução salina tamponada com fosfato (PBS) em placas de microtitulação de ligação elevada (Nunc Maxisorp) durante a noite a 4° C. As placas foram bloqueadas com PBS-BSA 1 %, durante 30 min a temperatura ambiente com agitação. As amostras de teste foram então diluídas 1/1000 e incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora com agitação. Após lavar, anticorpo de murinos ou coelho ligado foi detectado usando IgG Anti-Camundongo de cabra affiniPure conjugado a peroxidase de Jackson ImmunoLaboratories Inc. (H+L) (ref: 115-035-003) ou IgG anti-coelho de cabra AffiniPure (H+L) (ref: 11-035-003) diluídos 1:5000 em PBS-tween 0,05%. Os anticorpos de detecção foram incubados durante 30 min. a temperatura ambiente com agitação. A cor foi revelada usando 4 mg OPD (Sigma) + 5 µl H₂O₂ por 10 ml pH 4,5 0,1 M tampão citrato durante 15 minutos no escuro em temperatura ambiente. A reação foi parada com 50 µl HCl, e a densidade óptica foi lida com 490 nm relativo a 650 nm.

[00363] O O. D. para uma diluição 1/1000 de Post III foi comparado ao O.D. obtido com a mesma diluição de soro pré-imune.

[00364] Resultados gerados com soros de camundongos e coelhos foram apresentados na figura 5. Uma boa soro-conversão contra cada antígeno foi observada. A avaliação de soros dirigidos contra SB1 foi prejudicada devido à atividade de ligação de Ig desta proteína.

ELISA de células completas anti-mortas

[00365] Células completas mortas (inativadas com formaldeído ou calor) de *S. aureus* tipo 5 e 8 ou *S. epidermidis* cepa Hay foram revestidas a

20 µg/ml em solução salina tamponada com fosfato (PBS) em placas de microtitulação de ligação elevada (Nunc Maxisorp) durante a noite a 4° C com evaporação. As placas foram bloqueadas com PBS-BSA 1% 30 min a temperatura ambiente com agitação. Proteína A foi neutralizada por adição de 10µg/ml de anti-Proteína A de galinha purificada por afinidade (ICL ref: CPA-65A-2) diluída em PBS-tween 0,05% seguido por incubação durante 1 hora a temperatura ambiente. As amostras de teste foram então diluídas duas vezes na microplaca em PBS-0,05% de uma diluição de partida a 1/10 e incubadas 1 hora em temperatura ambiente com agitação. Após lavar, anticorpo de coelho ou murinos ligado foi detectado usando IgG Anti-Camundongo de cabra affiniPure conjugado a peroxidase de Jackson ImmunoLaboratories Inc. - (H+L) (ref: 115-035-003) ou IgG anti-coelho de cabra AffiniPure (H+L) (ref: 11-035-003) diluídos 1:5000 em PBS-tween 0,05%. Estes anticorpos de detecção foram incubados durante 30 min. a temperatura ambiente com agitação. A cor foi revelada usando 4 mg OPD (Sigma) + 5 µl H₂O₂ por 10 ml pH 4,5 0,1 M tampão citrato durante 15 minutos no escuro, em temperatura ambiente. A reação foi parada com 50 µl HCl, e a densidade óptica foi lida a 490 nm relativa a 650 nm.

[00366] Deve-se notar que os níveis de expressão de proteínas em estafilococos irá variar dependendo das condições de cultura. Assim, um resultado negativo pode refletir a escolha de condições de cultura incorretas em vez de uma falta de imunogenicidade.

[00367] Os resultados usando soros de camundongos são mostrados na Tabela 5 e alguns dos gráficos são mostrados na figura 6. Um reconhecimento fraco de cepa de *S. aureus* 5 é observado com soros dirigidos contra SdrC, FnbpA, Ebh, Sbi e IsaA. O reconhecimento de cepa 8 de *S. aureus* é somente observado com o soro dirigido contra Sbi. O reconhecimento fraco de Hay de *S. Epidermidis* é observado com soros dirigidos contra AtI amidase, MRP, IsdA, IsaA, Ebh, Aaa e Sbi.

[00368] Uma seleção de resultados gerados usando soros de coelho são mostrados na figura 7 e resumidos na Tabela 6. Um reconhecimento muito bom das três cepas foi observado com IsaA e IsdB. Um reconhecimento fraco das três cepas foi observado com HarA apesar dos animais apenas receberem uma injeção em vez de três injeções usadas para as outras proteínas.

Tabela 5

Nome proteína	Reagir em SA5	Reagir em SA8	Reagir em SE Hay
IsaA	(+)	(+)	(+)
ClfA	-	(+)	(+)
Atl amidase	-	-	++
SdrG	-	-	-
Glucosamidase	-	-	-
IsdA	-	-	++
Alfa toxina	-	-	-
SrdC	++	(+)	-
Ebh	+	-	+
AaA	-	-	++
MRP	-	-	++
Sbi	++	++	+++
FnbpA	+	+	(+)

Tabela 6

Nome proteína	Reagir em SA5	Reagir em SA8	Reagir em SE Hay
IsaA	+++	+++	+++
ClfA	+	++	++
Atl amidase	-	++	+
IsdB	+++	+++	+++
SdrG	+	+	+
Glucosamidase	-	-	-
HarA (1 injeção)	+	+	+
IsdA	-	-	-
alfa toxina	-	-	+
SrdC	-	-	-
Ebh	-	+	-
AaA	-	-	-
MRP	-	-	++
Sbi	-	+++	-
FnbpA	-	++	++

Exemplo 8

Eficácia de combinações de proteínas estafilocócicas em um modelo de colonização nasal

[00369] Quinze grupos de três ratos de algodão foram inoculados com

combinações de oito antígenos estafilocócicos e cinco ratos de algodão que atuaram como controles foram tratados sem antígeno. Estes 16 grupos são como a seguir:

Grupo 1 - Atl-glucosamina, Atl-amidase, AAA₁ alfa toxina, SdrC, SdrG, Ebh, Sbi

Grupo 2 - Atl-glucosamina, Atl-amidase, IsdA, IsdB, ClfA, SdrC, Ebh, FnbpA

Grupo 3 - Atl-glucosamina, Atl-amidase, HarA, IsdA, MRP, IsdB, AAA, alfa toxina

Grupo 4 - Atl-glucosamina, HarA, IsdA, AAA, ClfA, IsaA, Ebh, Sbi

Grupo 5 - HarA, MRP, AAA, alfa toxina, ClfA, SdrC, Ebh, FnbpA

Grupo 6 - IsdA, IsdB, AAA, alfa toxina, ClfA, SdrG, Sbi, FnbpA

Grupo 7 - Atl-aminidase, IsdA, MRP, AAA, IsaA, SdrG, Ebh, FnbpA

Grupo 8 - Controle

Grupo 9 - Atl-glucosamina, IsdA, MRP, alfa toxina, IsaA, SdrC, Sbi, FnbpA

Grupo 10 - Atl-glucosamina, MRP, isdB, AAA, ClfA, IsaA, ScIrC₁ SdrG

Grupo 11- Atl-amindase, MRP, IsdB, alfa toxina, ClfA, IsaA, Ebh, Sbi

Grupo 12 - Atl-glucosamina, HarA, IsdB, alfa toxina, IsaA, SdrG, Ebh, FnbpA

Grupo 13 - Atl-amidase, HarA, IsdB, AAA, IsaA, SdrC, Sbi, FnbpA

Grupo 14 - Atl-glucosamina, Atl-amidase, HarA, MRP, ClfA, SdrG, Sbi, FnbpA

Grupo 15 - Atl-amidase, HarA, IsdA, alfa toxina, ClfA, IsaA, SdfC, SdrG

Grupo 16 - HarA, IsdA, MRP, IsdB, SdrC, SdrG, Ebh, Sbi

[00370] Cada mistura de antígenos continha 3 µg de cada antígeno misturado com um adjuvante feito de lipossomas contendo MPL e QS21. Os ratos do algodão foram inoculados três vezes em dias 1, 14 e 28 da experiência. Duas semanas após inoculação, a eficácia das imunizações foram avaliadas usando um teste de colonização nasal como descrito em Kokai-Kun et al (2003) Antimicrob.Agents.Chemother. 47; 1589-1597.

[00371] A análise de regressão linear múltipla clássica foi realizada nos dados usando software "Design Expert 6". A presença de um antígeno foi codificada como +1 e a ausência de um antígeno por -1. Usando a equação do modelo, foi possível determinar que antígenos fossem os antígenos chave que produziram uma grande diminuição no número de colônias por focinho.

Resultados

[00372] Os resultados do teste de colonização nasal são mostrados na Tabela 7. O grupo de controle tinha um logCFU/focinho médio de 3,51335 e uma diminuição na colonização nasal pode ser vista para todos os grupos de ratos do algodão inoculados com as proteínas estafilocócicas. Os grupos 4, 9 e 13 mostraram a maior diminuição em colonização nasal com uma diminuição de acima de 2 logs em CFU/focinho. Os grupos 12 e 16 também deram bons resultados, mostrando uma diminuição de cerca de 2 logs em CFU/ focinho.

Tabela 7

Grupo	Meio Observado LogCFU/nariz	LogCFU/nariz preditivo
1	1,77527	2,03560
2	2,90435	2,52684
3	1,96556	2,23033
4	1,27748	1,21872
5	1,67304	1,93128
6	2,79745	2,98193
7	2,21481	2,30705
8	3,51355	3,47317
9	1,22480	1,44080
10	2,03085	1,93204
11	2,02522	1,81581
12	1,53402	1,70996
13	1,36063	1,49100

14	2,31201	1,73909
15	2,22979	1,98223
16	1,58109	1,44004

[00373] A contribuição de antígenos específicos dentro da mistura de antígeno foi calculada usando análise de regressão múltipla de dados de colonização nasal. O modelo final contém os sete melhores antígenos. Os resultados para estes antígenos são mostrados na tabela 8. Dentro do contexto da presente mistura, a inclusão de HarA deu a maior diminuição em colonização nasal, seguido por IsaA, Sbi, SdrC, autolisina-glucosamina, MRP e Ebh.

Tabela 8 – Efeitos em diferença de log CFU/focinho e relação de CFU/focinho para os sete melhores antígenos no modelo e valores p-correspondentes

Antígeno	prob >F	Efeito estimado	Relação de redução	Efeito cumulativo	Relação cumulativa
HarA	0,033	-0,596	3,9	-0,596	3,9
IsaA	0,046	-0,558	3,6	-1,154	14,3
Sbi	0,077	-0,491	3,1	-1,645	44,2
SdrC	0,22	-0,337	2,2	-1,982	96,0
Atl-glucos	0,238	-0,324	2,1	-2,306	202,2
MRP	0,239	-0,323	2,1	-2,629	425,3
Ebh	0,297	-0,286	1,9	-2,914	821,0

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de compreender

CifA estafilocócica isolada da SEQ ID No: 30, ou um fragmento imunogênico de CifA compreendendo pelo menos 100 aminoácidos contíguos da SEQ ID NO: 30; e

SitC estafilocócica isolada da SEQ ID NO: 8 ou 9, ou um fragmento imunogênico de SitC compreendendo pelo menos 100 aminoácidos contíguos da SEQ ID NO: 8 ou 9.

2. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de compreender pelo menos uma proteína ou fragmento imunogênico de *S. aureus*.

3. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de compreender pelo menos uma proteína ou fragmento imunogênico de *S. epidermidis*.

4. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de ainda compreender um polissacarídeo ou oligossacarídeo PIA.

5. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das 1 a 4, caracterizada pelo fato de ainda compreender polissacarídeo ou oligossacarídeo capsular tipo V e/ou VIII de *S. aureus*.

6. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de ainda compreender polissacarídeo ou oligossacarídeo capsular tipo I, e/ou tipo II e/ou tipo III de *S. epidermidis*.

7. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que uma resposta imune eficaz é gerada contra tanto *S. aureus* como *S. epidermidis*.

8. Composição imunogênica de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de compreender ainda um excipiente farmacêuticamente aceitável.

9. Método de fabricar uma composição imunogênica, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de misturar antígenos para fazer a composição imunogênica como definida nas reivindicações 1 a 7 e adicionar um excipiente farmacêuticamente aceitável.

10. Uso da composição imunogênica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de uma composição imunogênica para tratamento ou prevenção de infecção estafilocócica.

FIGURA 1.1

FIGURA 1

SEQ ID NO: 1 – sequência de polipeptídeos

MLQVTDVSLRFGDRKLFEDVNIKFTEGNCYGLIGANGAGKSTFLKILSGELDSQTGHVSLGKNERLAVLKQDHYAYEDER
 VLDVVIKGHERLYEVMKEKDEIYMKPDFSDEEDGIRAAELEGEFAEMNGWNAEADAANLLSGLGIDPTLHDKKMAELENNO
 KIKVLLAQSLFGEPPDVLILLDEPTNGLDIPAIWLEDFLINFNTVIVVSHDRHFLNNVCTHIADLDGFKIKVYVGNVDFW
 YQSSQLAQKMAQEONKKKEEKMKELODFIARFSANASKSKQATSRKKQLEKIELDDIQPSSRRYPVKFTPEREIGNDLL
 IVQNLSKTIDGEKVLNDVNSFTMNPNDKAILIGDSEIAKTTLKILAGEMEPEDEGSFKWGVTTLSYFPKDNSEFFEGVNM
 NLVDWLRQYAPEDQETETFLRGFLGRMLFSGEEVKKKASVLSGGEKVRMLSKMMLSSANVLLDEPTNHLDESITAVN
 DGLKSFKGSIIFTSYDDEFINTIANRVIDLNKQGGVSKEIPYEEYLQEIGVLK

SEQ ID NO: 2 – sequência de polipeptídeos

MLQVTDVSLRFGDRKLFEDVNIKFTEGNCYGLIGANGAGKSTFLKILSGEIDSQTGHVSLGKDERLAVLKQDHFAYEDER
 VLDVVIKGHERLYQVMKEKDEIYMKPDFSDEEDGIRAAELEGEFAEMNGWNAEADAANLLSGLGIEPDLHDKNMSSELENNO
 KVKVLLAQSLFGEPPDVLILLDEPTNGLDIPAIWLEDFLINFNTVIVVSHDRHFLNNVCTHIADLDGFKIKLYVGNVDFW
 YQSSQLAQKMAQEONKKKEEKMKELODFIARFSANASKSKQATSRKKQLEKIELDDIQPSSRRYPVKFTPEREIGNDLL
 TVENLSKTIDGEKVLNDVNSFTMNPNDKAILVGDSEIAKTTLKILAGEMEPEDEGTFKWGVTTLSYFPKDNSEFFDGVDN
 NLVEWLRQYAPEDQETETFLRGFLGRMLFSGEEVKKKASVLSGGEKVRMLSKMMLSSANVLLDEPTNHLDESITAVN
 DGLKSFKGSIIFTSYDDEFINTIANRVIDLNQAGALSKEVPYEEYLQEIGVLQNN

SEQ ID NO: 3- sequência de polipeptídeos

MPITDVIYAREVLDSRGNTVEVEVLTESGAFGRALVPSGASTGEHEAVELRDGDKSRYLGKGVTKAVENVNEIIAPEII
 EGEFSVLDQVSDIKMMIALDGTTPNKGKLGANAILGVSIIVARAADLLGQPLYKYLGGFNGKQLPVPMMNIVNGGSHSDA
 PIAFQEFMILPVGATTFKESLRWGTEIFHNLSILSKRGLETAVGDEGGFAPKFEGTEDAVETIIQAEAAAGYKPGEEVF
 LGFDCASSEFYENGVDYDYSKFEGEHGAKRTAAEQVDYLEQLVDKYPITIEDGMDENDWDGWKQLTERIGDRVQLVGDDL
 FVTNTEILAKGIENGIGNSILIKVNQIGTLTETFDIAEMAQKAGYTAVVSHRSGETEDTTIADIAVATNAGQIKTGSLSR
 TDRIAKYNQLLRIEDELFT
 AKYDGIKSFYNLDK

SEQ ID NO: 4: sequência de polipeptídeos

MPITDVIYAREVLDSRGNTVEVEVLTESGAFGRALVPSGASTGEHEAVELRDGDKSRYLGKGVTKAVENVNEMIAPEIV
 EGEFSVLDQVSDIKMMIQLDGTHNKGKLGANAILGVSIIVARAADLLGQPLYKYLGGFNGKQLPVPMMNIVNGGSHSDA
 PIAFQEFMILPVGAESEFKESLRWGAEIFHNLSILSERGLETAVGDEGGFAPRFEGTEDAVETIIKAIEKAGYKPGEDVF
 LGFDCASSEFYENGVDYDTKFEGEHGAKRSAAEQVDYLEELIGKYPITIEDGMDENDWEGWKQLTDRIGDKVQLVGDDL
 FVTNTEILSKGIEQIGNSILIKVNQIGTLTETFDIAEMAQKAGYTAVVSHRSGETEDTTIADIAVATNAGQIKTGSLSR
 TDRIAKYNQLLRIEDELFTAKFEGIKSFYNLDK

SEQ ID NO: 5: sequência de polipeptídeos

MKKIVTATITATAGLATIAFAGHDAQAAEQNNNGYNSNDAQSYSTYTIDAQGNHYHTWTGNWNPSQLTQNNNTYYNNYNT
 YSYNNASYNNNYNSYQYNNYTNNSTATNNYYTGSGASYSTTSNNVHVTTTAAPSSNGRSISNGYASGSNLYTSGQCT
 YYVFDVRVGGKIGSTWGNASNWNAAAASSGYTVNNTPKVGAIMQTTQGYGHVAYVEGVNSNGSVRSEMNYGHGAGVVT
 RTISANQAGSYNFIH

SEQ ID NO: 6: sequência de polipeptídeos

MKKIATATITATAGFATIAIASGNQAHASEQDNYGYNPNPDPTSYSTYTIDAQGNHYHTWKGNWHPSQLNQDNGYSSYYY
 NGYNNYNNYNNYNSYNNYSRYNNYSNNNQSYNNYNNYSYNTNSYRTGGLGASYSTSSNNVQVTTTMAPSSNGRSISSGYT
 SGRNLYTSGQCTYYVFDVRVGGKIGSTWGNASNWNAAAARAGYTVNNTPKAGAIMQTTQGAYGHVAYVBSVNSNGSVRVS
 MNYGYGPGVVTSTRTISASQAAGYNFIH

SEQ ID NO: 7; sequência de polipeptídeos

MKKIATATITATAGIATFAFAHDAQAAEQNDGYNPNPDPSYSYTYTIDAEGNYHTWKGNWSPDRVNTSYNNYNNYNNY
 YGYNNYSYNNYNNYNNYNNYQSNNTQSQRTTQPTGGLGASYSTSSNNVHVTTTAPSSNGVSLSNARSASGNLYTSGQ
 CTTYVFDVRVGGKIGSTWGNANNWANAARAGYTVNNSPAKGAILOTSQGAYGHVAYVEGVNSNGSIRVSEMNYGHGAGV

TSRTISASQAASNYIH

FIGURA 1.2**SEQ ID NO: 8: sequência de polipeptídeos**

MKKLVPLLLALLLLVAACGTGGKQSSDKSNGKLVVTTNSILYDMAKNVGGDNVDIHSIVPVGQDPHEYEVPKPKDIKKT
 DADVILYNGLNLETGNGWFEKALEQAGKSLKDKKVIKVSVDVKPIYLNAGEEGNKDKQDPHAWLSLDNGIKYVKTIIQQTFI
 DNDKKHKADYEKQGNKYIAQLEKLNDSKDKFNDIPKEQRAMITSEGAFKYFSKOYGITPGYIWEINTEKQGTPEQMROA
 IEFVKKHKLKHLVETSVDKKAMESLSEETKKDIFGEVYTDISIGKEGKDGSDYYKMMKSNLETVHGSMK

SEQ ID NO: 9: sequência de polipeptídeos

MKKILALAI AFLII LAACGNHNSNEHHSHEGKLVVTTNSILYDMVKRVGGNKVDVHSIVPVGQDPHEYEVPKPKDIKALT
 DADVIFYNGLNLETGNGWFEKALDQAGKSTKDKNVIAASNNVKPIYLNAGEEGNKKNQDPHAWLSLENGIKYVKTIIQKSLE
 HHDKKDKSTYEKQGNAYISKLEELNKDSKNKFDIPKNQRAMITSEGAFKYFAQQFDVKPGYIWEINTEKQGTPEQMROA
 IKFVKDNHLKHLVETSVDKKAMQSLSEETKKDIYGEVYTDISIGKEGKDGSDYYKMMKSNIDTIHGSMK

SEQ ID NO: 10: sequência de polipeptídeos

MKKTIMASSLAVALGVTGYAAGTGHQAHAEEVNVDQAHLDLAHNHQDQLNAAPIKDGAYDIHFVKDGFQYNFTSNGTTW
 SWSYEAANGQTAGFSNVAGADYTTSYNQGSVDQSVSYNAQSSNSNVEAVSAPTYHNYSTSTTSSSVRLSNGNTAGATGSS
 AAQIMAQRTGVSASTWAAIIARESNGQVNAYNPSGASGLFQTMPGWGPTNTVDQQINAAYKAYKAQQLGAWGF

SEQ ID NO: 11: sequência de polipeptídeos

MKKTIVIASTLAVSLGIAGYGLSGHEAHASETTNVDKAHLVDLAQHNPPEELNAKPVQAGAYDIHFVDNGYQYNFTSNGSEW
 SWSYAVAGSDADYTESSSNQEVSAANTQSSNTNVQAVSAPTSSESRSYSTSTTSYSAPSHNYSSSSSVRLSNGNTAGSVG
 SYAAQMAARTGVSASTWEHIIARESNGQLHARNASGAAGLFQTMPGWGSTGSVNDQINAAYKAYKAQQLSAWGM

SEQ ID NO: 12: sequência de polipeptídeos

MNYRDKIQKFSIRKYTVGTFSTVIATLVFLGFNTSQAHAETNPASVVKQKQSSNNEQTENRESQVQNSQNSQNSQSL
 ATHENEQPMNSQANLVNQKVAQSSSTTNDQEPASQNVNTKKDSATAATTQPDKEESKHQNESQSANKNGNDNRAAHVENH
 EANVVTASDSSDNGNVQHDRNELQAFDANYHDYRFDRENADSGTFNYVKGIFDKINTLLGSNDP INNKDLQLAYKELE
 QAVALIRTMPQRQTSRRSNRIQTRSVESSRAEPRSVSDYQANANSYYVENANDGSGYPVGTYNASSKGAPYNLPTTPW
 NTLKASDSKEIALMTAKQTDGQYQWVIFKNKGHAPHQNMIFWFALPADQVPVGRDFTVTVNSDGTNVQWSHGAGAGANKP
 LQQMWBYGVNDPDRSHDFKIRNRSGQVIYSWPTVHVYSLEDLSRASDYFSEAGATPATKAFGRQNFYINGQKPAESPGV
 PKVYTFIGQGDASYTISFKTQGPVTNKLYYAAGGRALEYNQLFMYSQLYVESTQDHHQRLNGLRQVNVNRTYRIGTTKRVE
 VSQGNVQTKKVLSTNLNIDDFVDDPLSYVKTSPNKVLGFPYPTNANTNAFRPGGVQELNEYQLSOLFDTQKLQEAARTRN
 PIRLMIGFDYPDGYGNSETLVVNLTVLPEIQHNIKFKNDDTQNI AEKPFQKQAGHPVFYVYAGNQGNASVNLGGSVTS
 IQPLRINLTSNENFTDKDQWITGIPRTLHIENSTNRTNNARERNIELVGNLLPGDYFGTIRFGRKEQLFEIRVKPHTPTI
 TTAEQLRGALQKVPVNIISGIPDPSALVYLVAPTNQTNTNGGSEADQIPSGYTIILATGTPDGVHNTITIRPQDYVVFIP
 PVGKQIRAVVYVYKVVANMSNAVTILPDDIPPTINPNVGINAKYRGDEVNFTMGVSDRHSIGKNTTITTLPSGWTSLN
 TKSDNKGSLAITGRVSMNQAFNSDITFKVSATDNVNNTTNSQSKHVS IHVGKISEDAHPVLGNTKEKVVVNPTAVSN
 DEKQSIITAFMNKNQNIIRGYLASTDPVTVDNNGNVTLHYRDSSTTLDATNMVTEYEPVVKSEYQTANAATATVTLAKGQ
 SFNIGDIKQYFTLSNGQAIPNGTFTNITSRTIPTAQEVSQMNAGTQLYHIVASNAHYKDTEDFYISLKIVDVVKQPEGDQ
 RYVRTSTYDLTTDEISKVKQAFINANRDVITLAEGDISVTNTPNGANVSTITVNINKGRLTKSFASNLAMNMLRWVNF
 QDYTVTWTNAKIANRPTDGGLSWSDDEKSLIYRYDATLGTQITNTDILTMLKATTVPGLRNNITGNEKAQAEAGGRPNY
 RTTGYSQSNATTDGQRQFTLNGQVIQILDI INPSNGYGGQPVNTSNTRANHSNSTVNVNNEPAANGAGFTIDHVVKSNS
 THNASDAVYKAQLYLTPYGPQYVEHLNQNTGNTTDAINIYFVPSDLVNPTISVGNYTNHQVFSGETFTNTITANDNFGV
 QSVTVPNSTQITGTVDNNHQHVSATAPNVTSATSKTINLLATDTSNGTATTSFNVTVKPLRDKYRVGTSSTAANPVRIAN
 ISNNATVSQADQTTIINSLTFTSNAPNRNYATASANEITSKTVSNVSRGTNNANVTVTVTHQDGTSTVTVPVKHVPEI
 VAHSHYTVQGDFFPAGNGSSAADYFKLSNGSAIPDATITWVSGQAPNKDNTRIGEDITVTAHILIDGETTPTTKTATYKV
 VRTVPKHVFETARGVLYPGVSDMYDAKQYVVKPVNNSWSTNAQHMNFQFVGTYPGNKDVVGI STRLIRVTVYDNRTEDLTI
 LSKVKPDPPRIDANSVTYKAGLTNQEIKNMNLNNSVVKLFKADNTPLNVTNI THSGSFSSVTVSDALPNGGIKAKSSI
 SMNNVTYTTTQDEHGQVTVTRNESVDSNDSASVTVPQLQATTEGAVFIKGGDGFDFGHVERFIQNP PHGATVAWHDSPD
 TWKNTVGNTHKTAVVTLPSGQGTNRNVEVPVKVYPVANAKAPSRDVKGQNLTHGTNAIDYITFDPTNTNGITAAWANRQ
 PNNQQAGVQHLNVDTVYPGISAAKRVPTVNVYQFEFPQTTTITVGGTLASGTOASGYAHMQNASGLPTDGFYTKWNRD
 TTGTNDANWAAMNKPNTAQVNAKYDVIYNGHTFATSLPAKFVVKDVQPAKPTVTETAAGAITIAPGANQTVNTHAGNVT
 TYADKLVIKRNQNVVTTFTTRNNTSPWVKEASADNVGTIGVGTNNGITVAAGTFNPADTIQVATQGSGETISDEQRSDDF
 TVVAPQPNQATTIKIWQNGHIDITPNNP SGHLINPTQAMDIAYTEKVGNGAEHSKTINVVRGQNNQWTIANKPDYVTLDAQ
 TGKVTFNANTIKPNSSITITPKAGTGHVSNSNPSTLTAPAHTVNTTEIVKDYGSNVTAAEINNAVQVANKRTATIKNGT
 AMPTNLAGGSTTTIPVTVTYNDGSTEEVQESIFTKADKRELITAKNHLDDPVSTEGKKPGTITQYNNAMHNAQQQINTAK
 TEAQQVINNERATPQQVSDALTKVRAAQTKIDQAKALLQNKEDNSQLVTSKNNLQSSVNQVPSTAGMTQQSIDNNAKKR
 EAETEITAAQRVIDNGDATAQQISDEKHRVDNAL TALNQAKHDLTADTHALEQAVQQLNRTGTTTGKKPASITAYNNSIR

FIGURA 1.3

ALQSDLTSAKNSANAI IQKPI RTVQEVQSALT NVNRVNERLTQAINQLVPLADNSALRTAKTKLDEEINKSVTTDGMTQS
 SIQAYENAKRAGQTETTTNAQNVINNGDATDQQTAAEKTKEEYNSLKQAIAGLTPDLAPLQTAKTQLOQNDIDQPTSTTG
 MTSASVAAFNDKLSAARTKIQEIDRVLASHPDVATIRQNVTAANAAKTALDQARNGLTVDKAPLENAKNOLQHSIDTQTS
 TTGMTQDSINAYNAKLTAARNKVQQINQVLGASPTVDQINTNTSAANQAKSDDLHARQALTPDKAPLQNAKTQLEQSTNQ
 PTDTTGMTTASLNAYNQKLQAARQKLTEINQVLGNPTVQNIINDKVAEANQAKDQNLRTARQGLTLDRQPALTTLHGASNL
 NQAQQNNFTQQINAAQNHAALETIKSNITALTNTAMTKLDSVADNNTIKSGQNYTDATPANKQAYDNAVNAAGVIGETT
 NPTMDVNTVQKAASVKSTKDALDQQNLQRAKTEATNAITHASDLNQAQKNALTOQVNSAQNVQAVNDIKQTTQSLNTA
 MTGLKRGVANHNQVQSDNYVNADTNKKNDYNNAYNHANDIINGNAQHPVITPSDVNNALSNVTSKEHALNGEAKLNAAK
 QEANTALGHLNNLNNVQRONLQSQINGAHQIDAVNTIKQATNLNSAMGNLRQAVADKQVKTEDYADADTAKQONAYS
 AVSSAETIINQNTANPTMSVDDVNRATSAVTTNKNALNGDEKLVQSKTDAARAIDALPHLNNAQKADVKSINAASNIAGV
 NTVKQQGTDLNTAMGNLQGAINDEQTTLNSQNYQDATPSKKTAYTNVAVQAADILNKSNGQNKTKDQVTEAMNQVNSAKN
 NLDGTRLLDQAKQTAQQLNNMTHLTAAQKTNLTNQINSGTTVAGVHTVQSNANTLDQAMNTLRQSIANNDAKASEDYV
 DANNDKQTAYNNAAAAETIINANSNPEMNPSTITQKAEQVNSSKTALNGDENLATAKQNAKTYLNTLTSITDAQKNNLI
 SQISSATRVSGVDTVKQNAQHLDQAMANLQNGINNESQVKSSEKYRDADTNKQOEYDNAITAAKAILNKSTGPNATAQNAV
 EAALQRVNTAKDALNGDAKLIAAQNAKQHLGLTLTHITTAQRNDLTNQIS

SEQ ID NO: 13: sequência de polipeptídeos

MGNLQTAINDKSGTLASQNFLLDADEQKRNAVYQAIISAAETILNKQTGPNATAKTAVEQALNNVNSAKHALNGTQNLNNAKQ
 AAITAINGASDLNKKQKDALKAQANGAQRVSNANDVQRNATELNTAMGQLQHAIDAKTNTLASSKYVNADSTKQNAVTTK
 VTNAEHIISGTPTVVTTTPSEVTAAANQVNSAKQELNGDERLRVAKQNANTAIIDALTQNLTPQAKLKEQVQGANRLEDVQ
 SVQTNQGSLLNNAMKGLRDSIANETTVKASQNYTDASPNNQSTYNSAVSNAGIINQTNPTMDTSAITQATTQVNNAKNG
 LGAENLRNAQNTAKQNLTLNLTSHLTNNQKSAISSQIDRAGHVSEVTAAKNAATELNAQMGNLQAIHQNQNTVKKQGVNFTD
 ADKAKRDAYTNAVSRATILNKQGTANTSKQDVEAAIQNVTSKALNGDQNVNTAKNAKALNNLTSINNAQKRDLT
 KIDQATTVAGVEAVSNTGTQNLNTAMANLQNGINDKANTLASENYHDADSDKKTAYTQAVTNAENILNKNSGSNLDKAAVE
 NALSQVTAAGALNGNHNLEQAKSNANTTINGLQHLTTAQKDKLQKQVQQAQNVAGVDTVKSSANTLNGAMGTLRNSIQD
 NTATKNGQNYLDATERNKTNYNNAVDSANGVINATSNPNMDANALNQIATQVTSTKNALDGTENLTQAKQTATNAIDGAT
 NLNKAQKDALKAQVTSAGRVANVTSIQQTANELNTAMGQLQHGIDDENATKQTKYRDAREQSKKTAYDQAVAAAKAILNK
 QTGSNSDKAAVDRALQQVTSSTKDALNGDAKLAEAKAAARQNLGLTNLHITNAQRTALEGQINQATTVDGVNTVKTNANTLD
 GAMNSLQGAINDKDATLRNQNLYLDADESKRNAYTQAVTAAEGILNKQTTGGNTSKADVDNALNAVTRAKAALNGAENLRNA
 KTSATNTINGLPNLTLQKQDNLKHQVEQAQNVVGVNGVKDKGNTLNTAMGALRTSIQNDNTTKTSQNYLDASDSNKNYN
 TAVNNANGVINATNPNMDANALINDMANQVNTTAAALNGAQNLAQAKTNATNTINNAQDLNKKQKDALKTQVNNAAQVSD
 ANNVTQATLNGAMTALKAADKERTKASGNVYNADQEKQAYDSKVTNAENIINGTPNATLTVNDVNSAASQVNAAK
 TALNGDNNLRVAKEHANNTIDGLAQLNNVQKAKLKEQVQSATTLDGVTQVKNSSQTLNTAMKGLRDSIANEATIKAGQNY
 TDASPNNRNEYDSAVTAAKAIINQTSNPTMEPNTITQATSQVTTKEHALNGAQNLAQAKTAKNNLNNLTSINNAQKDAL
 TRNIDGATTVAGVNETAKATELNNAMHSLQNGINDETQTKQTKYLDAPESKKSAYDQAVNAAKAILTKASQNVDKAA
 VEQALQNVNSTKTALNGDAKLNEAKAAKQTLGLTLTHINNAQRNALDNEITQATNVEGVNTVKAQAQQLDGAMGQLETSI
 RDKDTTLQSQNYQDADDAKRTAYSQAVNAAATILNKTAGGNTPKADVERAMQAVTQANTALNGIQNLERAKQAANTAITN
 ASDLNTKQKEALKQVTSAGRVSAANGVEHTATELNTAMTALKRAIDKADTKASGNVYNADANKRQAYDEKVTAAEHIV
 SGTPTPTLTPSDVTNAATQVTNAKTQLNGNHNLEVAQKNANTAIIDGLTSLNGPQKAKLKEQVQGAATTLPNVQTVRDNAQT
 LNTAMKGLRDSIANEATIKAGQNYTDASQNKQNDYNNAVTAAKAIIGQTTSPSMIAQEQINQAKDQVTAKQQAALNGQENLR
 TAQTNKQHLNGLSDLTNAQKDAKQRIEGATHVNEVTQANNADALNTAMTNLNGIQDQNTIKQGVNFTDADEAKRNA
 YTNAVTAQAEQILNKAQGPNTAKDGVETALQNVQRAKNEELNGNQNANAKTTAKNALNNLTSINNAQKALKSQIEGATT
 AGVNVQVSTMASELNTAMSNLQNGINDEAATKAAQKYTEADRDQKTAYNDVTAAKTLDDKTAGSNDNKVAVEQALQVNT
 AKTALNGDARLNEAKNTAKQQLATMSHLTNAQKANLTEQIERGTTVAGVQGIQANAGTLNQAMNQLRQSIASKDATKSSE
 DYQDANADLQNAVYNDVNTAEGIIISATNPEMNPDTINQKASQVNSAKSALNGDEKLAADVKTAKSDIGRLTDLNNAQRT
 AANAQVQAPNLAQVTAANKATSLNTAMGNLKHALLAEKDNTKRSVNYTDADQPKQQAQYDQAVTQAEAITNANGSNANET
 QVQAALNQLNQAQKNDLNGDNKVAQAKETAKRALASYNNLNAQSTAATSQIDNATTVADVTAQNTANELNTAMGQLQNG
 INDQNTVKKQGVNFTDADQGGKDAYTNAVNTAAGIILDKANGQNMTKAQVEAALNQVTTAKNALNGDANVRQAKSDAKANLG
 TLTHLNNAAQKQDLTSQIEGATTVNGVNSVKTAKQDLGDGAMQRLSAIANKDQTKASENYIDADPTKKTAFDNTAQESY
 LNKDHGTNKDKQAVEQAIQSVTSTENALNGDANLQCAKTEATQAIIDNLTQNLTPQKTALKQVNAQQRVSGVTDLKNASAT
 SLNNAMDQLKQAIQGDHDTIVAGGNYTNASPDQKQAYTDAYNAAKNIVNGSPNVTNAADVTAATQVRVNAETSINLGDITNL
 ATAKQQAQDALRQMTLSDAQKQSIQITQIDSATQVTVGVQSVKDNATNLNDAMNQLRNSIANKDEVKASQPYVDADTDKQ
 AYNTAVTSAENIINATSQPTLDPASAVTQAANQVNTNKTALNGAQNLANKKQETTANINRLSHLNNAAQKQDLNTQVTNAPN
 ISTVNVQVKTAEQLDQAMERLINGIQDKDQVKQSVNFTDADPEKQTAAYNNAVTAAENIINQANGTNANQSQVEAALSTVT
 TTKQALNGDRKVTDAKNNANQTLSTLDNLNNAQKGAVTGNINQAHTVAEVTQAIQTAQELNTAMGNLKNLSLNDKDTTLGS
 QNFADADPEKKNAYNEAVRNAENILNKSTGTNVPKQVEAAMNQVNTTAAALNGTQNLLEKAKQHANTAIDGLSHLTNAQK
 EALKQLVQQSTTVAAEQGNEQKANNVDAAMDKLRSIADNATTQKQNYTDASPNKKDAYNNAVTTAQGIIDQTTNPSLD
 PTVINQAAGQVSTSKNALNGNENLEAAKQQAQTSLSGLDNLNNAQKQAVTNQINGAHTVDEANQIKQNAQNLNTAMGNLK
 QAIADKDATKATVNTDADQAKQQAQYNTAVTNAENIISKANGGNATQTEVEQAIQVQVNAAKQALNGNANVQHAKEDEATL
 INNSNDLNAQKDALKQVQVQVNTTAVGVNVKQTAQELNNAMTQLKQGIADKEQTKADGNFVNADSDKQNAVYNAQVAKAE
 ALISGTPDVVVTTPSEITAAALNKVTQAKNDLNGNTNLATAKQNVQHAIDQLPNLNAQQRDEYSKQITQATLVPNVNAIQQA

FIGURA 1.4

ATTLNDA MTQ LKQGIANKAQIKGSENYHDADTDKQTAYDNAVTKAELLKQTTPNTMDPNTIQQALTKVNDTNQALNGNQ
 KLADAKQDAKTTLTGLDHLNDAQKQALTTQVEQAPDIATVNNVKNQNAQNLNNAMTNLNNALQDKTETLNSINFTDADQAK
 KDDYTNAVSHAEGILSKANGSNASQTEVEQAMQRVNEAKQALNGNDNVQRAKDAKQVITNANDLNQAQKDALKQOVDA
 QTVANVNTIKQTAQDLNQAMTQ LKQGIADKQDTKANGNFVNADTDKQNAYNNAVAAEQIISGTPNANVDPQOVAQALQ
 VNQAQKDLNGNHNLQVAKDNANTAIQDLPLNLPQKTALQDVSHAELVTGVNAIKQADALNNAMGTLKQIQANSQVP
 QSVDFQTADQDKQAYNNAANQAQQIANGTPTPVLPADPTVTKAVTTMNAQKDALNGDEKLAQAKQDALANLDTLRDLNQ
 QRDALRNQINQAALATVEQTKQNAQNVNTAMGNLQKGIANKD TVKASENYHDADVDKQTAYTNAVSAEQIINQTTNPT
 LNPDDITRALTQVTDKNSLNGEAKLATEKQNAKDAVSGMTHLNDQKQALKGQIDQSPFIATVNVQVKQTATSLDQAMDQ
 LSQAINDKQILADGNLYLNADPDQKQNAKQAVAKAEALLNKQSGTNEVQAQVESITNEVNAAKQALNGNDNLNAKQQA
 QQLANLTHLNDQKQSFESQITQAPLVTDVTTINQKAQTLDHAMELLRNSVADNQDTLASEDYHDATAQRQNDYANKAVTA
 ANNIINQTTSPMTNPDVNGATTQVNNTKVALDGDENLAAKQQAANNRLDQLDHLNNAQKQQLQSQITQSSDIAAVNGHK
 QTAESLNTAMGNLINAIAHDQAVEQRGNFINADTDKQTAYNTAVNEAAAMINKQTGQANQTEVEQAITKVQTTLOALNG
 DHNLQVAKTNATQAIQVLTSLNDPQKTALQDVTAATLVTAHVHIEQNANTLNQAMHGLRQSIQDNAATKANSKYINEDQ
 PEQONYDQAVQAANNIINEQTATLDNNAINQVAATVNTTAAALHGDVQLQNDKDHAKQTVSQAHLNNAQKHMEDTLIDS
 ETTRTAVKQDLTEVQALDQMDALQQSIAKDATRASSAYVNAEPNKKQAYDEAVQNAESI IAGLNNPTINKGNVSSATQ
 AVISSKNALDGVRLAQDKQTAGNSLNLHLDQLTPAQQAALENQINNATTCQKVAEIIAQQAALNEAMKALKESI KQDPQT
 BASSKFINEDQAQKDAYTQAVQHAKDLINKTTDPTLAKSIIDQATQAVTDAKNNLHGDQKLAQDKQRATETLNNLSNLNT
 PQRALENQINNAATRGVAQKLTEAQAALNQAMEALRNSIQDQQTESGSKFINEDKPKQDAYQAAVQNAKDLINQGTGNP
 TLDKAQVEQLTHAFKQAKDNLHGDQKLADDKQHAVTDLNQLNGLNPNPQRALESQINNAATRGVAQKLAEAKALDQAMQ
 ALRNSIQDQQTESGSKFINEDKPKQDAYQAAVQNAKDLINQGTGNPDLKQSQVEQLTQAVTTAKDNLHGDQKLARDQQA
 VTTVNALPLNLAHQQTLDINAAPTRTEVAQHVTATELDHAMETLKNKVDQVNTDKAQPNYTEASTDKKEAVDQALQ
 AAQSIIDPTNGSNANKDAVEQALTKLQEKVNLNGNERVAEAKTQAKQIDQLTHLNDQIATAKQNIQDQATKLQPIAEL
 VDQATQLNQSMQDQLQAVNEHANVEQITDYTQADSDKQKAYKQAIADAENVLQONANKQVQDQALQNLNAKQALNGDER
 VALAKTNGKHDIDQLNALNNAQDQGFGRIDQSNLDNLQIQIVDEAKALNRAMDQLSQEITGNEGRTKGSTNYVNADTQV
 KQVYDEAVDKAKQALDKSSGQNLTAEQVIKLNDAVTAAKKALNGEERLNNRKAELQRLDQLTHLNNAAQRQLAIQQTINNA
 ETLNKASRAINRATKLDNAMGAVQYIDEQHLGVISSSTNYINADDNLKANYDNAIAAAHELDKVQGNIAKAEAEQLKQ
 NIIDAQNALNGDQNLNAKDKANAFVNSLNLNGNQDQDLAKHAIQNNADTVSDVTDIVNNQIDLNDAMETLKLHLDNEIPN
 ABQTVNYQNAADDNAKTNFDDAKRLANTLLNSDNTNVNDINGAIAQVNDIAHNLNGDQRLQDAKDKAIQSINQALANKLKE
 IEASNATDQDKLIAKNKAEELANSIINNINKATSNQAVSQVQTAGNHAIEQVHANEIPKAKIDANKDQVQALIDEID
 RNPNTLTKQKQALKDRINQIILQGGHNDINNALTKEEIEQAKAQLAALQDIKDLVKAKEDAKQDVQVQALIDEIDQNP
 NLTDKEKQALKDRINQIILQGGHNGINNAMTKEEIEQAKAQLAALQDIKDLVKAKEDAKNAIKALANAKRDQINSNPDLTPEQ
 DKEKQALKDRINQIILQGGHNDINNAMTKEEIEQAKAQLAALQDIKDLVKAKEDAKNAIKALANAKRDQINSNPDLTPEQ
 KAKALKEIDEAEKRALQNVENAQTIDQLNRGLNLGLDDIRNTHVVEVDEQPAVNEIFEATPEQILVNGELIVHRDDIITE
 QDILAHINLIDQLSAEVIDTPSTATISDSLTAKVEVTLTLDGSKVIVNVVVKVVEKELSVVQQAIESIENAAQKQKIDEIN
 NSVTLTLEQKEAAIAEVNKLKQQAIDHVNAPDVHSVEEIQQEQEYIEQFNPEQFTIEQAKSNAIKSIEDAIQHMIDEI
 KARTDLTDKEKQEAIAKLNQLKEQAIQAIQRAQSISEITEQLEQFKAQMKAANPTAKELAKRKQEAISRIKDFSNEKINS
 IRNSEIGTADEKQAAMNQINEIVLETIRDINNAHTLQVEAALNNGIARISAVQIVISDRAKQSSSTGNESNSHLTIGY
 TANHFNSSSTIGHKKLDEDDIDPLHMRHFSNNFGNVIKNAIGVVGISGLLASFWFFIAKRRRKEDEEELEIRDNNDK
 SIKETLDDTKHLPLFAKRRRKEDEEDVTVEEKDSLNGESLDKVKHTPFFLPKRRRKEDEEDVEVTNENTDEKVLKONE
 HSPLLFAKRRKDEEDVETTTSESKEDEVDPLLLAKKKQKQDNQSKDKKSASKNTSKKVAAKKKKKSKKNKK

SEQ ID NO: 14: sequência de polipeptídeos

MNNRDKLQKFSIRKYAIGTFSTVIATLVFMGINTNHASADELNQNKLIKQLNQTDDEDSNTHSQEIENNQNQSSGQTES
 LRSSTSQNQANARLSDQFKDTNETSQQLPTNVSDDSINQSHSEANMNEPLKVDNSTMQAHSKIVSDSDGNASENKHKL
 TENVLAESRASKNDEKENLQEKDKSQVHPPLDKNALQAFDASYHNYRMIDRDRADATEYQVKVSTFDYVNDLLGNQ
 NIPSEQLVSAYQQLKALELARTLPQOSTTEKGRRRSTRSVVENRSSRSDYLDARTEYVYSKDDDDSGFPPTFFHASNR
 RWPYNLPRSRNILRASDVQGNAYITTKRLKQDGYQWDLFNSNHKGHEMYWFLPSDQPTPTGPVFTTIINRDGSSTSTG
 GVGFGSGAPLPQFWRSGAINSSVANDFKHGSATNYAFYDGVNNSDFARGGELYFDREGATQTNKYVGDNFALLNSEK
 PDQIRGLDTIYSFKSGSDVSYRISFKTQCAPTARLYYAAGARSGEYKQATNYNQLYVEPYKNYRNRVQSNVQVKNRTLHL
 KRTIRQFDPQLRTTDPVILDSGSGSIDSVDPLSYVKNVTGTVLGTIYPSYLPYNQERWQGANAMNAYQIEELFSQENL
 QNAARSGRPIQFLVGFVDVESHNPETLLPVNLVYKPELKHTEIELYHDNEKQDRKEFSVSK

SEQ ID NO: 15: sequência de polipeptídeos

MSGTLHNTVGSGILPYQQEIRIKLTSNEPIKDESEWSITGYNTLTQNAVGRNTNATEKNLALVGHIDPGNYFITVFKFGD
 KVEQFEIRSKPTPPRIITTANELRGNNPKPEIRVTDIPNDTTAKIKLVMGGTGDGHDPEINPYTPPENYTVVABAYHDN
 DPSKNGVLTFRSSDYLDKDLPLSGELKAIYYNQYVQSNFSKSVFPSSDTPPTINEPAGLVHKYRYGDHVEITLPTVTDNT
 GSGSLRDVNVNLPQGWTKTFTINPNNTTEGTLKLIGNIPSNEAYNTTYHFNITATDNGSNTTNPAKTFILNVGKLADDLN
 PVGLSRDQLQLVTDPSLSNSEREVEVKRKISEANANIRSYLLQNNPILAGVNGDVTFYRYRDSVDVIDAENVITYEPERK
 SIFSENGNTNKKBAVITARGQNYTIGPNLRKYFSLNSGSDLPNRDFTSISAIGSLPSSSEISRLNVGNYNRYRNAKNAY
 HKTQQELNLKLKIVEVNAPTGNRRVYRVSTYNLTNDEINKIKQAFKAANSGLNLNDNDITVSNFDRNRVSSVTVTIRKG

FIGURA 1.5

DLIKEFSSNLNNMFLRWVNIRDDYTISWTSSKIQRNTDGGLEWSPDHKSLIYKYDATLGRQINTNDVLTLLQATAKNS
 NLRSNINSNEKQLAERGSNGYSKSIIRDDGEKSYLLNSNPIQVLDLVEPDNGYGGROVSHSNVIYNEKNSSIVNGQVPEA
 NGASAFNIDKVVKANAAANGIMGVYKAQLYLAPYSPKGYIEKLQNLSTNNVINVFVPSDKVNPSITVGNVDHHTVY
 SGETFKNTINVNDNYGLNTVASTSDSAITMTRNNELVGQAPNVTNSINKIVKVKATDKSGNESIVSFTVNIKPLNEKYR
 ITTSSSNQTPVRIISNIQNNANLSIEDQNRVKSSLSMTKILGTRNVVNESNNDVRSQVVSQVNRSGNNATVNVTTTFSGDT
 TNTITVPVKHVLLEVVPTRTTVRGQQFPTGKGTSPNDFSLRTGGPVDARIVWVNNQGPDIINSNQIGRDLTLHAEIFFD
 GETTPIRKDTTYKLSQSIKQIYETTINGRFNSSGDAYPGNFVQAVNQYWEHMDFRWAQSGSTPSSRNAGSFCTKTVTVY
 YQNGQTIENVNVLFKVKPNKVIDSNSVISKQNLNGQQLVNRVQNAQVTLYQSNQGTVPNTNTTIDSNGIATVTIQGTL
 PTGNITAKTSMTNNTVTKQNSSGSIASNTTEDISVFSSENSDQNVVTAGMQAKNDGIKIKGTNYNFNDFNSFISNIPAH
 TLTWNEEPNSWKNNIGTTTKTVTVTLPNHQGTTRTVDIPITITYPTVTAKNPVRDQKGRNLNGTGDVYNYIIFENNNRLGGT
 ASWKDNRPQDKNIAGVQNLIALVNPPISTPLEVPVKVWVYNFDFPTQPIYKIQVGDTPFKGTWAGYKHLNENGEGLPIDG
 WKFYWNQOSTGTTSQWQSLAYTRTPFVKGTGYDVVNPNSNWGVWQTSQSASFIVTNAKPNQPTITQSKTGDVTVTPGAVR
 NILISGTNDYIQASADKIVINKNGNKLTTFVKNNDRWTVETGSPDINGIGPTNNGTAISLSRLAVRPGDSIEAIAIEGS
 GETISTSATSEIYIVKAPQPEQVATHTYDNGTDFILPDNSRNSLNPTEVEINYTEKLNQNETQKSFTITKNNNGKWTIN
 NKNPNYVEFNQDNGKVFSANTIKPNSQITITPKAGQGNTEENTPVTIQAQAHTLTINEIVKEQGGQNVNTDDINNAVQVP
 NKNRVAIKQGNALPTNLAGGSTSHIPVVIYYS DGSSSEETETVRTKVNKTELINARRRLDEEISKENKTPSSIRNFDQAM
 NRAQSQINTAKSDADQVIGTEFATPQOVNSALSQVAAQNKINEAKALLQNKADNSQLVRAKEQLQSSIQPAASTDGMTQ
 DSTRNYYNNKQAAEQAIQHANSVINNGDATSQINDAKNTVEQAQRDYVEAKSNLRADKSQLQSAIDTLNRDVLTDNKKP
 ASVRRYNEAISNIRKELDTAKADASSTLRNTNPSVEQVADALNKINTVQPKVNQAIALLQPKENNSSELVQAKKRLQDAVN
 DIPOTQGMTQQTINNYNDKQREARALTSARVIDNGDATTQETITSEKSKVEQAMQALTNKSNLRADKBNELQATYANKLI
 ENVSTNGKKPASIRQYETAKARIQONQINDAKNEAERILGNDNPQVSQVTQALNKIKAIQPKLTEAINMLQNKENNTLVN
 AKNRLNAVNDTDPHGMTOETINNYNAKKREAQNEIQKANMIINNGDATAQDISSEKSKVEQVLQALQNAKNDLRADKR
 ELQATYANKLIQNVNTNGKKPSSIQNYKSARRNIENQYNTAKNEAHNVLENTNPTVNAVEDALRKINAIQPEVTKAINILO
 DKEDNSELVRAKEKLDQAINSQPSLNGMTQESINNYTTKRREAQNIASSADTIINNGDASIEQITENKIRVEEATNALNE
 AKQHLTADTTSLKTEVRKLSRRGDTNNKKPSSVSAYNNTIHSLSQSEITQTENRANTIINKPIRSVEEVNNALHEVNQNLQ
 RLTDITINLLQPLANKESLKEARNRLESKINETVQTDGMTQOSVENYKQAKIKAQNESSIAQTLINNGDASDQEVSTIEK
 LNKLSELNINSINHLTVNKEPLETAKNQLQANIDQKPSDGMTQOSVQSYERKLEAKDKINSINNVLANNPDVNAIRTN
 KVETEQINNELTQAKQGLTVDKQPLINAKTALQSSLNQPSTGMTTEATIQNYNAKROKAEQVIQNAKNIENNAQPSVQ
 VSDEKSKVEQALSELNNAKSALRADKQELQQAYNQLIQPTDLNNKKPASITAYNQRYQFSENELNSTKTNTDRILKEQNP
 SVADVNNALNKVREVQOKLNEARALLQNKEDNSALVRAKEQLQQAQVDPSTEGMTQQTDDYNSKQQAQAEISKAQV
 IDNGDATTQISNAKTINVERALEALNNAKTGLRADKEELQAYNQLTQONIDTSGKTPASIRKYNEAKSRIQTQIDSANE
 ANSILTNDNPQVSQVTAALNKIKAVQPELDKAIAMLNKENNNALVQAKQQLQIVNEVDPTQGMTTDTANNYKSKKREA
 EDEIQKAQOIINNGDATEQOITNETNRVNQAINAINKAKNDLRADKSQLENAYNQLIQNVDTNGKKPASIQOYQAARQAI
 ETQYNNAKSEAHQILENSNPVNEVAQALQKVEAVQLKVNDIAHILQNKENNSALVTAKNQLQSSVNDQPLTTGMTQDSI
 NNYEAKRNEAQSAINRAEAVINNGDATAKQISDEKSKVEQALAHNLDAKQOLTADTTTELQTAQQNLNRGDTNNKKPRSI
 NAYNKAIQSLETTQITSADNANAVIQKPIRTVQEVNNALQOVNQLNQQLTEAINQLQPLSNNDALKAARLNLENKINQTV
 QTDGMTQOSIEAYQNAKRVQNESNTALALINNGDADEQOITETEDRVNQQTNTLTQAINGLTVNKEPLETAKTALQNNI
 DQVPSTDGMTQOSVANYNQKLQIAKNEINTINNVLANNPDVNAIKTNKAEAEISNDLTQAKNNLQVDTQPLEKIKRQLQ
 DEIDQGTNTDGMTQDSVDNYNDSLSAAIEKGVKNKLLKRNPTVEQVKESVANAAQVQIDQLQARTSLVPDKTQLQEA
 RLENSINQOTDGTQDSLNNDKLAKARQNLKISKVLGGQPTVAEIRQNTDEANAHKQALDARSQTLTLNREPYIN
 HINNESHLLNNAQKDNFKAQVNSAPNHTLETIKNKADTLNQSMTALSESADYENQKQENYLDASNNKRQDYDNVNA
 KGILNQTSPTMSADVIDQKAEDVKRTKTALDGNQRLEVAQQAALNHLNTLNDLNDARQRTLTDTINHSPNINSVNQAKE
 KANTVNTAMTQLKQTIANYDDELHDGNYINADKDKDAYNNAVNNAKQLINQSDANQAQLDPAEINKVTQRVNTTKNDLN
 GNDKLABAKRDANTTIDGLTYLNEAQRNKAENVGKASTKTNITSQLDYQNLNIAQALRNSVNDVNNVANSNYINED
 NGPKBAYNQAVTHAQTLINAQSNPEMSRDVNVQKTQAVNTAHQNLHGQKLEQAQSSANTEIGNLPNLNTQKAKEKELV
 NSKQTRTEVQEQQLNQAASLDSSMGTLSLVAKQPTVQKTSVYINEDQPEQSAYNDISITMGQTIINKTADPVLDTKTLVDNA
 ISNISTKENALHGEQKLTAKTEAINALNTLADLNTQKEAIAKTAINTAHTRTDVTAEQSKANQINSAMHTLRQNISDNE
 SVTNESNYINAEPEKQHAFTALNNAKEIVNEQQATLDANSINQAKAAILTTKNALDGEELRRRAKENADQEIINTLNQLT
 DAQRNSEKGLVNSSQTRTEVASQLAKAKELNKVMEQLNHLINGKNQMINSSKFINEDANQQQAYSNAIASAEALKNKSQ
 PELDKVTIEQAINNINSAINNLNGEAKLTAKEDAVASINNLGSLTNEQKTENQAVNGAQTRDQVANKLRDAEALDQSM
 QTLRLDLVNNQNAIHSTSNYFNEDSTQKNYDNDNGSTYITGQHNPELNKSTIDQTSIRINTAKNDLHGVEKLQDKGT
 ANQEIGQLGYLNDPQKSGEESLVNGSNTRSEVEEHLNEAKSLNNAMKQLRDKVAEKTNVKQSSDYINDSTEHQRYDQAL
 QEAENIINEIGNPTLNKSEIEQKLQQLTDAQNALQGSLLLEAKNNAITGINKLTALNDAQRQKAIENVQAQQTIPAVNQ
 QLTLDREINTAMQALRDQVGGQNNVHQQSNYFNEDEQPKHNYDNSVQAGQTIIDKLQDPIMNKNEIEQAQINQINTTQTAL
 SGENKLHDDQESTNRQIEGLSSLNTAQINAEKDLVNQAKTRTDVAQKLAAAKEINSAMSNLRDGIQNKEDIKRSSAYINA
 DPTKVTAQYDQALQNAENIINATPNVELNKATIEQALSRVQQAQQLDGVQQLANAKQATQTVNGLNSLNDGQKRELNL
 INSANTRTKVQEELNKATELNHAMEALRNSVQNVQDVQKQSSNYVNEDEQPEQHNYDNVNEAQATINNNAQPVLDKLAIER
 LTQTVNTTKDALHGAQKLTDQQAQAEETGIRGLTSLNEPQKNAEVAKVTAATTRDEVRNIRQEATTLDTAMLGLRKSIDK
 NDTKNSSKYINEDHDQQAQYDNVNAQVVIDETQATLSSTINQLANAVTQAKSNLHGDTKLQHDKDSAKQTLAQQLNL
 NSAQKHMEDSLIDNESTRTOVQHDLTAEQALDGLMGALKESIKDYTNIVSNGNYINAEPSKKQAYDAAVQNAQNIINGTN
 QPTINKGNVTATQTVKNTKDALDGDHRLBBAKNNANQTIIRNLSNLNNAQKDAEKNLVNSASTLEQVQQLQTAQQLDNA

FIGURA 1.6

MGELRQSI AKKDQVKADSKYLNEDPQIKQNYDDAVQVRVETIINETQNPPELLKANIDQATQSVQNAEQALHGAELKNQDKQ
 TSSTELDGLTDLTDAQREKLREQINTSNSRDDIKQKIEQAKALNDAMKLLKEQVAQKDGVBHANSYTNEDSAQKDAYNNA
 LKQAEIINNSSNPNLNAQDITNALNNIKQAQDNHGAQKLQDDKNTTNOAIGNLNHLNQPQKDALIQAINGATSRDQVA
 EKLKEABALDEAMKQLEDQVNQDDQISNSSPFINEDSDKQKTYNDKIQAAKEIINQTSNPTLDKQKIADTLQNIKDAVNN
 LHGDQKLAQSKQDANNQNLHLDLLEEQKNHFKPLINNADTRDEVNKQLEIAKQNLGDMSTLHKVINDKDQIQHLSNYIN
 ADNDKKQNYDNAIKEAEDLIHNHPDTLDHKAQDLNKKIDQAHNELNGESRFKQALDNALNDIDSLNSLNVPPQRQTVKDN
 INHVTTLTSLAQELQKAKELNDAMKMRDSIMNQEQRKNSNYTNEDLAQQNAYNHAVDKINNIIGEDNATMDPQIIKQA
 TQDINTAINGLNGDQKLQDAKTDAKQITNTPTGLTEPQKQALENIINQOTSRANVAKQLSHAKFLNGKMEELKVAVAKAS
 LVRQNSNYINEDVSEKEAYEQAIKAGQEIINSENNPTISSTDINRTIQEINDAEQNLHGDNKLKRAQEIKNETIQNLGDL
 NSAQITKLIQDIGRTTTTPAVTQKLEEKAINQAMQQLKQSIADKDATLNSSNYLNEDSEKKLAYDNVSAEQQLINQLN
 DPTMDISNIQAITQKVIQAKDSLHGANKLAQNAQADSNIINQSTNLNDKQKQALNDLINHAQTKQQVABIIAQANKLNNE
 MGTLLKTLVEEQSNVHQQSKYINEDPQVQNIYNDISIQKGREILNGTTDDVLNNNKIADAIQNIHLTKNDLHGDQKLQKAQQ
 DATNELNYLTNLNNSQRQSEHDEINSAPSRTEVSNDLNHAKALNEAMRQLENEVALENSVKKLSDFINEDEAAQNEYSNA
 LQKAKDIINGVPSSTLDKATIEDALLELQNARESLHGEQKLQEAQNQAVAEIDNLQALNPGQVLAEKTLVNQASTKPEVQ
 BALQKAKELNEAMKALKTEINKKEQIKADSRVYNADSGLQANYNSALNYGSQIIATTQPPELNKDVINRATQTIKTAENN
 LMGQSKLAEAKSDGNQSI EHLQGLTQSQDKQHDLINQAQTKQVDDIVNNSKQLDNSMNQLQQIVNNDNTVKQNSDFIN
 EDSSQQDAYNHAIQAAKDLITAHPTIMDKNQIDQAIENIKQALNDLHGSNKLSSEDKKEASEQLQNLNSLTNGQKDTILNH
 IFSAPTRSQVGEKIASAKQLNNTMKALRDSIADNNEILOSSKYFNEDSEQQNAYNQAVNKAANIINDOPTPVMANDEIQS
 VLNEVQKTKDNLHGDQKLANDKTDAQATLNALNYLQAQRGNLETKVQNSNSRPEVQVQVLANQLNDAMKLLDQAL
 DAIKQTSNYINEDTSQQVNFDEYTDGRKNI VAEQTNPNMSPNTINTIADKITEAKNDLHGVQKLKQAQQSINTINQMTG
 LNOAQKEQLNQEIQQTQTRSEVHQVINKAQAALNDSMTLRQSI TDEHEVKQTSNYINETVGNQTAYNNAVDRVKQIIINQ
 SNPTMNPLEVERATSNVKISKDALHGERELNDKNKSKTFAVNHLNLDNLQAQKEALTHEIEQATIVSQVNNIYNKAKALNN
 DMKKLKDIVAQQDNVRQSNYINEDSTPQNMNDTINHAQSIIDQVANPTMSHDEIENAINNIKHAINALDGEHKLQQA
 ENANLLINSLNDLNAPQRDAINRLVNEAQTREKVAEQQLQSAQALNDAMKHLRNSIQNQSSVRQESKYINASDAKKEQYNH
 AVREVENIINEQHPTLDKEI IKQLTDGVNQAANDLNGVELLDADKQNAHQSIPTLMHLNQAQQNALNEKINNAVTRTEVA
 AIIQAKLLDHAMENLEESIKDKEQVQSSNYINEDSDVQETYNDAVDHVTEILNQTVNPTLSIEDIEHAINEVNQAKQ
 LRKQKLYQTDLADKELSKLDDLSQQSSSISNQIYTAKTREVAQAI EKAKSLNHAMKALNKVYKNADKVLDSRFIN
 EDQPEKKAYQAINHVDSI IHRQTNPEMDPTVINSI THELETAQNHLHGDQKLAAHQDAANVINGLIHLNVAQREVMIN
 TNTNATTREKVAKNLDNAQALDKAMETLQQVVAHKNNILNDSKYLNEDSKYQQQYDRVIADAEQLLNQTTNPTLEPYKVD
 IVKDNVLANEKILFGAEKLSYDKSNANDEIKHMYLNNAQKQSIKDMISHAALRTEVKQLLQQAAILDEAMKSLEDKTQV
 VITDITLTPNYTEASEDKKEKVDQTVSHAQAIIDKINGSNVSLDQVRQALEQLTQASENLDDGQDQREKAVHANQTIQDQ
 HLNSLQQQTAKESVKNATKLEEIATVSNNAAQALNKVMGKLEQFINHADSVENSNDNYRQADDDKI IAYDEALEHGQDIQKT
 NATQNETKQALQQLIYAETSLNGFERLNHARPRALEYIKSLEKINNAQKSALEDKVTQSHDLLELEHIVNEGTLNDIMG
 ELANAIVMNYAPTKASINYINADNLRKDNFTQAINNARDALNKTQGGNLDFNAIDTFFKDDIFKTKDALNGIERLTAASK
 AEKLIDSLKFINKAQFTHANDEIMNTNSIAQLSRIVNQAFDLNDAMKSLRDELNNQAFFVQASSNYINSDLDLQKQFDHA
 LSNARKVLAKENGKNLDEKQIQGLKQVIEDTKDALNGIQRLSKAKAKAIQYVQSLSYINDAQRHIAENNIHNSDDLSSLA
 NTLKASDLNDAMKDLRDTIESNSTSVPNVSVNYINADKNLQIEFDEALQASATSSKTSNPATIEEVLGLSQAIYDTKN
 ALNGEQRRLATEKSKDLKLIKGLKDLNKAQLEDVTNKVNSANTLTELSQLTQSTLELNDKMKLLRDLKTLVNPVKASLNY
 RNADYNLKRQFNKALKEAGVNLKNSGTNVNINDIQHLLTQIDNAKDQNLGERRLKEHQKSEVFI IKELDILNNAQKAA
 IINQIRASKDIKIINQIVDNAIELNDAMQGLKEHVAQLTATTKDNIEYLNADBDHLQDYDIAINLANNVLDKENGTKNDA
 NIIIGMIQNMDDARALLNGIERLKDAQTKAHNDIKDTLKRQLDEIEHANATSNSKAQAKQMVNEEARKALSNINDATSND
 LVNQAKDEGQSAIEHIADELPAKALDANQMIDQKVEDINHLISQNPNLNNEKNKLSIQINKLVNGIKNEIQQAINKQQ
 IENATTKLDEVIETTKLIIAKAEAKQMIKELSQKKRDAINNNTDLTPSQKALADIDKTEKDALQHIENSNSIDDIINN
 NKEHAFNTLAHII IWDTDQQLVPELPELSLQNALVTSEVVHRDETISLESIIIGAMTLTDELKVNIVSLPNTDKVADHL
 TAKVKVILADGSYVTNVNVPVKVVEKELQIAKKDAIKTIDVLVKQIKIDIDSNNELTSTQREDAKAEIERLKKQAIKQVNH
 SKSIDIETVKTDFEEDIDQFDPKRFPLNKAKKHIIITDVNTQIQNGFKEIETIKGLTSNEKTQFDKQLTALQKEFLEKVE
 HAHNLVLELNLQQEFNNRYKHILNQAHLGEGKHIAEHKLGYYVVKNTQQILNNQSASYFIKQWALDRIKQIQLETMNSIR
 GAHTVQDVHKALLQIEQILKVNVSIIINQSFNDSLHNFNYLHSKFDARLREKDVANHIVQTTETFEVLKGTGVEPGKINK
 ETQQPKLHKNDNDSLFLKHLVDNFGKTVGVITLTGLLSSFWLVLAARRKKEEEEKQSIKNHKKDIRLSDDKIDPIVITKR
 KIDKEEQIQNDKHSIPVAKHKSKEKQLSEEDIHSIPVVKRKQNSDNKDTKQKKVTSKKKKTPQSTKKVVKTKKRSK

SEQ ID NO: 16: sequência de polipeptídeos

MRDKKGPVNKRVDFLSNKLNKYSIRKFTVGTASILIGSLMYLGTQQEAAEAENNIENPTTLKDNVQSKEVKIEEVTNKDT
 APQGVAKSEVTSNKDTIEHEASVKAEDISKKEDTPKEVANVAEVQPKSSVTHNAEAPKVRKARSVDEGSFDITRDSKNV
 VESTPITIQGKEHFEGYGSVDIQKNPTDLGVSEVTRFVNGNESNGLIGALQLKNKIDFSKDFNFKVRVANNHQSNTTGAD
 GWGFLFSKGNAAEYLTNGGILGDKGLVNSGGFKIDTGYIYTSSMDKTEKQAGQGYRGYGAFFVKNDSGNSQMVGENIDKS
 KTNFLNYADNSTNTSDGKFHGRQRLNDVILTYVASTGKMRAEYAGKTWETSITDLGLSKNQAYNFLITSSQRWGLNQGINA
 NGWMRTDLKGSEFTTPEAPKTTIELEKKVEEIPFKKERKFNPDLPAGTEKVTREGQKGEKTIITPTLKNPLTGEIISKG
 ESKBEITKDPINELTEYGPETIAPGHRDEFDPKLPTEGEKEEVPKPGIKNPETGDDVVRPPVDSVTKYGPVKGDSIVEKEE
 IPFEKERKFNPDLPAGTEKVTREGQKGEKTIITPTLKNPLTGEIISKGESKBEITKDPINELTEYGPETIAPGHRDEFDP
 KLPTGEKEEVPKPGIKNPETGDDVVRPPVDSVTKYGPVKGDSIVEKEEIPFKKERKFNPDLPAGTEKVTREGQKGEKTIIT

FIGURA 1.7

TPTLKNPLTGEIISKGESKEEITKDPINELTEYGPETITPGRHDEFDPKLPTEKEEVPKGPKGIKNPETGDVVRPPVDSV
 TKYGEVKGDSIVEKEEIPFEKERKFNPD LAPGTEKVTREKQKGEKTIITPTLKNPLTGEIISKGESKEEITKDPVNELTE
 FGGEKIPQGHKDI FDPNLPTDQTEKVPKGPKGIKNPDTGKVIIEPVDVVIKHGPKTGT PETKTVEIPFETKREFNPKLQPG
 EERVKQEGQPGSKTITPTITVNPLTGEKVGEGQPTTEEITKQPVDKIVEFGGEKPKDPKGPENPEKPSRPTHSPGPVNPNN
 PGLSKDRAKPNGPVHSMKNDKVKKSKIAKESVANQEKKRAELPKTGLESTQKGLIFSSIIGIAGLMLLARRRKN

SEQ ID NO: 17: sequência de polipeptídeos

MGKRRQGPINKKVDFLPNKLNKYSIRKFTVGTASILLGSTLIFGSSSHEAKAAEEKQVDPITQANQNDSSERSLENTNQ
 TVNNEAPQMSSTLQAEESNAEAPNVPTIKANSNDNTQTQFSEAPTRNDLARKEDI PAVSKNEELQSSQPNNTDSKIEPTT
 SEPVLNLYSSPFMSLLSMPADSSSNNTKNTIDIPPTTVKGRDNYDFYGRVDIQSNPTDLNATNLTRYNYGQPPGTTTAGA
 VQFKNQVSFDKDFDNIRVANNRQSNNTGADGWGFMFSKKDGDGFLKNGGILREKGTTPSAAGFRIDTGYNNNDPLDKIQK
 QAGQGYRGYGTFFVKNDSSQNTSKVGSSTPSTDFLNYADNTTNDLDGKFHGGKLN NVNLKYNASNQTTATYAGKTWTATL
 SELGLSPTDSYNFLVTSSQYGNNGSGTYADGVMRADLDGATLTYPKAVDGDPIITSTKEIPFNKKREFDPNLAPGTEKVV
 QKGEFGIETTTTPTVYNPNTGEKVGEGTPTTKITKQPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQTTQPGKPGVKNPDT
 GEVVTTPVDDVTKYGPVDGDPITSTEEIPFDKKREFNPDLPKGEERVKQKGEFGTKITITPTTKNPLTGEKVGEGEPTK
 ITKQPVDEITEYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTKYGPVDGDPITSTEEIPFDK
 KREFDPNLAPGTEKVVQKGEFGTKITITPTTKNPLTGEKVGEGEPTKITEKQPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKG
 SQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTKYGPVDGDPITSTEEIPFDKKREFNPDLPKGEERVKQKGEFGTKITITPTTK
 NPLTGEKVGEGEPTKITEKQPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTKYGP
 VDGPITSTEEIPFDKKREFDPNLAPGTEKVVQKGEFGTKITITPTTKNPLTGEKVGEGEPTKITEKQPVDEIVHYGGEE
 IKPGHKDEFDPNAPKGSQTTQPGKPGVKNPDTGEVVTTPVDDVTKYGPVDGDPITSTEEIPFDKKREFDPNLAPGTEKVV
 QKGEFGTKITITPTTKNPLTGEKVGEGEPTKITEKQPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPVDSKTEVPKPGVKNPDT
 GEVVTTPVDDVTKYGPVGNPITSTEEIPFDKKRVFNPDLPKGEERVKQKGEFGTKITITPILVNPITGEKVGEGKSTEK
 VTKQPVDEIVHYGPTKAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPG
 TPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPG
 ANEGTLVGSLLAIVGSLFIFGRRKKGNEK

SEQ ID NO: 18: sequência de polipeptídeos

MKKLYTSYGTYGFLHQIKINNPTHQLFQFSASDTSVIFEETDGETVLKSPSIYEVIKEIGEFSEHHFYCAIFIPSTEDHA
 YQLEKKLISVDDNFRNFGGFKSYRLLRPAGKTTYKIYFGFADRHAIEDFKQSDAFNDHFSKDALSHYFGSSGQHSSYFER
 LYPPIKE

SEQ ID NO: 19 sequência de polipeptídeos

MYLYTSYGTYQFLNQIKLNHQERSLFQFSTNDSSIILEESEGKSILKHPSAYQVIDSTGEFNEHHFYSAIFVPTSEDHRO
 QLEKKLLLVDVPLRNFGGFKSYRLLRPAGKTTYKIYFGFANRTAYEDFKASDIFNENFSKDALSQYFGASGQHSSYFERY
 LYPIDED

SEQ ID NO: 20: sequência de polipeptídeos

MINRDNKKAITKKGMISNRLNKFSIRKYTVGTASILVGTTLIFGLGNQEAKEAENTSTENAKQDDATTS DNKEVVSETEN
 NSTTENDSTNPIKKETNTDSQPEAKEESTTSSTQQQNNVTATTETKPNIEKENVKPSTDKTATEDTSVILEEKKAPNY
 TNNDVTTKPTSTSEIQTKPTTPQESTNIENSQPPQTPSKVDNQVTDATNPKEPVNVSKEELKNNPEKLKELVRNDNNTDRS
 TKPVATAPTSVAPKRLNAKMRFAVAQPAAVASNNVNDLITVTKQTIKVGDKDNVAAAHDGKDI EYDTEFTIDNKVKKGD
 TMTINYDNVIPSDDLTDKNDPIDITDPSGEVIAKGTFDKATKQITYTFTDYVDKYEDIKARLTLYSYIDKQAVPNETSLN
 LTFATAGKETSQNVSDYQDPMVHGDSNIQSI FTKL DENKQTEIQQIYVNPLKKTATNTKVDIAGSQVDDYGNIKLNGS
 TIIDQNTIEIKVYKVNPNQQLPQSNRIYDFSQYEDVTSQFDNKKSFNNVATLDFGDINSAYI IKVVS KYTPTSDGELDIA
 QGTSMRTTDKYGYNYAGYSNFI VTSNDTGGGDGTVKPEEKLYKIGDYVWEDVDKDGVOGQTSKEKPMANVLVLTLYPDG
 TTKSVRTDANGHYEFGGLKDGETYTVKFETPAGYLP TKVNGTTDGEKDSNGSSI TVKINGKDDMSLDTGFYKEPKYNLGD
 YVWEDTNKDGIQDANEPGIKDVKVTLDSTGKVI GTTTT DASGKYKFTDLNNGNYTVEFETPAGYTPTVKNTTAEDKDSN
 GLTTTGVIKADANMTLDSGFYKTPKYS LGDYVWYDSNKGDKQDSTEGIKIDVKVTLNNEKGEVIGTTKTDENGKYRFDNL
 DSGKYKVI FEKPAGLTQTVTNTTEDDKDADGGEVDVTITDHDDFILDNGYFEEDTSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
 DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
 DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
 DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
 GGLFAALGSLLLFGRKKQNG

SEQ ID NO: 21: sequência de polipeptídeos

MINKNNLLTKKKPIANKSNKYAIRKFTVGTASIVIGATLLFGLGHNEAKAEENSVQDVKDSNTDDELSDSNDQSSDEEK
 NDVINNNQSINTDDNNQIIKKEETNNYDGEIKRSEDRTESTTNVDENEATFLQKTPQDNTHLTEEEVKESSSVESSNSSI
 DTAQQPSHTTINREESVQTSNDVSDSHVSDFANSKIKESNTESGKEENTLEQPNKVKEDSTTSQPSGYTNIDEKISNQDE
 LLNLPINEYENKARPLSTTSAQPSIKRVTVNQLAAEQGSNVNHLIKVTDQSI TEGYDDSEGVIKAHAENLIYDVTFEVD

FIGURA 1.9

HFNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKAEKGLAPYKKAKTLERQVYELNKIQDKLPEKLAEYKKKLEDTKKALDEQVKSAITFQNVQPTNEKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKYVMETTNDDYWKDFMVEGQRVRTISKDAKNTRTILFPYVEGKTLYDAIVKVHVKTIDYDGGYHVRIVDKBAFTKANTDKSNKKEQODNSAKKEATPATPSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGBKDTPATKPTKGEVSSSTTPTKVVSTTQNVAKPTTASSKTTKDVVQTSAGSSEAKDSAPLQKANIKNNTDGHTRQSONNKNTQENKAKSLPQTGEESNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLP

SEQ ID NO: 29: seqüência de polipeptídeos

MNNKKTATNRKGMIPNRLNKF\$IRKYSVGTASILVGTTLIFGLSGHEAKAAEHTNGELNQ\$SKNETTAPSENKTTEKVDSR
QLKDNTQTATADQPKVMTSDSATVKETSSNMQSPONATASQSTTQTSNVTTNDK\$SSTTYSNETDKSNLTQAKNVSTTPKT
TTIKQ\$RALNRMAVNTVAAPQ\$QGTINVNDKVHFTNIDIAIDKGHVNKTTGNTEFWAT\$SDVLKLKANYTIDDSVKEGDTFFF
KYGQYFRP\$G\$SVRLPSQ\$TQONLYNAQGNIIAKGIIYDSKNTNTT\$YTFTNYVDQYTNVSG\$SFBQVAF\$AKRENATTDKTA\$YKMEV
TLGNDTYSKDVIP\$DYG\$NKGQQLISSNTYIN\$NEDLSRNM\$TYVYNQPKKTYK\$TFVNTLTGYKFN\$PDAKNFKIYE\$VTDQN
QFVDS\$TTPDTSKLKDV\$TGQFDV\$IY\$NDNKATATVDLLNGQSSDKQYIIQ\$VAFPN\$SD\$NDNGKIDY\$TLETQNGK\$SSWSN\$
YSNVNG\$SSTANGDQ\$KYNLGDYVWEDTNKDGKQDAN\$EKGIVYVILKDSNGKELDR\$TTDENGKYQ\$TGL\$SNGTYSVEF
STPAGY\$TPTTANAGTDDAV\$DSDGLTTTGVIK\$DADNMTLDSG\$FYKTPK\$YSLGDYVWYDSN\$KDGKQD\$STEKGIKGVK\$VTLQN
EKGEVIGTT\$TETDENGKYRFDNLD\$SGKYKVI\$FEKPAGLTQTGTNTTEDDKDADGGEVDVITIDHDDFTLDNGY\$YEEETS\$D\$
DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD\$
DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD\$
DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD\$
DSDSDSDSDSDSDSDSDAGKHTPTKPM\$STVKDQHK\$TAKALPETGSENNNSNNGTLFGLGLFAALG\$SLLLFGRRKKONK

SEQ ID NO: 30: sequência de polipeptídeos

[illegible]

SEQ ID NO: 31: sequência de polipeptídeos

MKNLRYGIRKHKLGAASVFLGTMIVVGMGDKEAAASEQKTTTVEENGNSATDNKTSETQTTATNVNHIETQSYNATV
TEQPSNATQVTTTEEAPKAVQAPQTAQPANVETVKEEEKPQVKETTQPDNSGNQRQVDLTPKKVTQNGQTETQVEVAQPR
TASESKPRVTRSADVAEAEASDVSEVKGTDVTSKVTVESGSI EAPQGNKVEPHAGQRVVLKYKLFADGLKRGDYFDFT
LSNNVNTYGVSTARKVPEIKNGSVVMATGEILGNGNIRYFTTNEIEHKVEVTANLEINLFDIPKTVQSNGEQKITSKLN
EETEKTI PVVYNPGVSNSTNVNGSIETFNKESNKFTHIAYIKPMNGNQSNTVSVTGTLTEGSLNAGGQPTVKVYEYLGK
KDEL PQSVYANTS DTNKF KDVT KEMNGKLSVQDNGSYSLNLDKLDKTVVIHYTGEYLGQSDQVNFRTELYGYPERAYKSY
YVYGGYRLTWDNGLVLVLSNKADGNGKNGQIIQDNDPEYKEDTAKGTMSCQYDAKQIIETEENQDNTPLDIDYHTAIDGEG
GYVDGYIETIETIETDSSAIDIDYHTAVDSEVGHVGGYTESSEESNPIDFEESTHENS KHHADVVEYEEDTNPGGGQVTTES
NLVEDEESTKGI VTAGVSDHTTIEDTKEYTTESNLIELVDELPEEHGQAQGP IEEITENNNHHISHSGLGTENGHGNYGV
IEEIEENSHVDI KSELGVEGGQNSGNQSFEEDEEDKPKYEQGGNI VDI DFDVSPQIHGQNKGDQSFEEDETEKDKPKYEH
GGNIIDIDFDSVPQIHGFNKHNEIEEDTNKDKPNYQFGGHNSVD FEEDTL PKVSGQNEGQQTIEEDTTPTPTPTPEVPS
EPETPMPPTPEVPSEPETPTPTPTPEVPSEPETPTPTPTPEVPSEPETPTPTPEVPSEPETPTPTPEVPAEPGKVPVPAK
EPPKPKSPKVEQGVVTPVIEINEKVKAVAPT KKAQSKKSEL PETGGEESTNKGMLFGGLFSLGLALLRRNKKNNKA

SEQ ID NO: 32: sequência de polipeptídeos

MKKRIDYLSNKQNKYSIRRFVTGTTSVIVGATILFGIGNHQAQASEQSNDTQTSSKNNASADSEKNMIETPQLNTTAND
TSDISANTNSANVDSTTKPMSTQTSNTTTTTEPASTNETPTOPTAIKNQATAAKMQDQTPVQEANSQVDNKTTNDANSIATN
SELKNSQTLDLDPQSSPQTISNAQGTSKPSPVRTRAVRSLAVAEPVVNAADAKGTNVNDKVITASNFLEKTTFDPNQSGNTF
MAANFTVTDKVKSGDYFTAKLPLDSLGTNGDVDYSNSNNTMPIADIKSTNGDVVAKATYDILTCTYTFVFTQTVVNKENIN
GQFSLPLFTDRAPKPSGYTDANINIADFMFNKKITYNYSSPIAGIDKPNGANISSQIGVDTASGQTYKYQTVFVNPQK
RVLGNTWVVIKGYQDKIEESSGKVSATDTKLRIFEVNDTSKLSDSYYADPNDSNLKEVTDQFKNRIYYEHPNVASIKFGD
ITKTYVVLVEGHYDNTGKNLKTQVIOENVDPVNRDYSIFGWNNENVVRYGGGSADGDSAVNPKDPTPGPPVPDPEPSPDP
EPEPTPDPEPSPDPEPEPSPDPDPDSDDSDSGSDSDSGSDSDESDDSDSDSDSDSDSDSESDDSDSDSDSDSDSDS
DSDSDSEDSDSDSDSDSDSDSDSESDDSDSEDSESDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD

FIGURA 2.1

FIGURA 2

SEQ ID NO:34 sequência de polinucleotídeos

ATGTTACAAGTAAC TGATGTGAGTTTACGTTTGGGAGATCGTAAACTATTTGAAGATGTAAATATTAAATTTACAGAAGG
 TAATTGTTATGGATTAATTGGTGCGAATGGTGCGAGGTAAATCAACATTCTTAAAAATATTATCTGGTGAATTAGATTCTC
 AAACAGGACATGTTTCATTAGGTAAAAATGAACGTCTAGCTGTTTAAAAACAGGACCACTATGCTTATGAAGATGAACGC
 GTGCTTGATGTTGTAATTAAAGGTCACGAACGCTTTTATGAGGTTATGAAAGAAAAAGATGAAATCTATATGAAGCCAGA
 TTTCAAGTATGAAGATGGTATCCGTGCTGCTGAACCTTGAAGGTGAATTTGCAGAAATGAATGGTTGGAATGCTGAAGCTG
 ATGCTGCTAACCTTTTATCTGGTTTAGGTATCGATCCAACCTTTACACGATAAAAAAATGGCTGAATTAGAAAACAACCAA
 AAAATTAAAGTATTATTAGCGCAAAGTTTATTCGGTGAACAGACGTACTATTACTGGATGAGCCTACTAACGGTCTCGA
 TATTCCAGCAATCAGTTGGTTAGAAGATTTCTTAATTAACCTTTGATAATACTGTTATCGTAGTATCGCATGACCGTCATT
 TCTTAAATAATGTATGTACTCATATCGCTGATTTAGACTTCGGTAAAAATTAAAGTTTATGTTGGTAACATGATTTTTGG
 TATCAATCTAGTCAGTTAGCTCAAAAAGATGGCTCAAGAACAACCAAGAAAAAGAAGAAAAAATGAAAGAGTTACAGGA
 CTTTATTGCACGTTTCTCAGCTAACGCTTCTAAATCTAAACAAGCAACAAGTCGTAAAAACAACCTTGAGAAAAATTGAAT
 TAGATGATATTCAACCATCATCAAGAAGATATCCTTTGTTAAATTCACGCCTGAGCGTGAGATTGGTAACGACTTATTA
 ATCGTTCAAAATCTTTCTAAAACAATTGACGGCGAAAAAGTATTAGATAATGTATCATTCACAATGAATCCAAATGATAA
 AGCGATTTTAAATGGAGATAGTGAAATTGCAAAAACAACATTACTTAAAAATATTAGCTGGCGAAATGGAACAGACGAAG
 GTTCATTTAAATGGGGTGTACTACATCATTAAAGTTACTTCCCTAAAGATAACTCAGAGTTCTTTGAGGGTGTAATATG
 AATCTCGTTGATTGGTTAAGACAATATGCTCCTGAAGATGAACAAACAGAAACATTTTACGTGGTTTCTTAGGTCGTAT
 GTTATTTAGTGGTGAAGAAGTTAAGAAAAAGCTAGTGTGCTTTCAGGTGGAGAAAAAGTACGTTGTATGCTAAGTAAAA
 TGATGTTATCAAGTGCAGATGTACTTTTACTTGACGAACCTACTAACCACTTAGACTTAGAAAGTATTACTGCTGTCAAT
 GATGGTCTTAAATCATTTAAAGGTTCTATCATCTTTACTTCTTATGACTTCGAATTTATCAACACGATTGCAAAACCGTGT
 TATCGATTTAAATAAACAAGGCGGCGTTTCAAAGAAATTCATATGAAGAATACTTGCAAGAAATCGGCGTTTAAAAAT
 AA

SEQ ID NO:35 sequência de polinucleotídeos

ATGTTACAAGTAAC TGATGTAAGTTTACGTTTGGTGATCGTAAACTATTTGAAGATGTAAATATAAAATTTACAGAGGG
 TAATTGTTATGGATTAATTGGTGCAAATGGTGCTGGGAAATCTACATTCTTGAAGATTTTATCAGGCGAAATTGATTAC
 AGACTGGTCATGTATCTTAGGTAAAGATGAGCGTTTGGCTGTGTTAAAAACAAGATCATTGCTTATGAAGATGAACGT
 GTTTTAGATGTTGTGATTAAAGGACATGAACGTTTGTATCAAGTGATGAAAGAGAAAGATGAAATTTATATGAAACCTGA
 TTTCAAGCATGAGGACGGTATTTCGCGCTGCAGAACTTGAAGGAGAATTTGCAGAAATGAACGGTTGGAATGCTGAAGCTG
 ATGCTGCTAACTTATTATCAGGATTAGGCATAGAACCTGACTTACATGATAAAAAATATGCTGAACCTTGAAATAATCAA
 AAAGTTAAGGTATTGTTAGCTCAAAGTTTATTTGGTGATCCTGACGTTCTTTTACTAGATGAGCCTACCAATGGTTTGA
 TATACCAGCAATAAGTTGGTTAGAAGACTTTTTAATTAATTTTGAATACTGTCTATTGTCGTTTCGCATGACCGTCACT
 TCTTAAATAATGTTTGTACTCATATTGCTGATTTAGACTTTGGCAAAATTAAACTTTTATGTTGGTAACATGATTTTTGG
 TATCAATCAAGTCAATTAGCACAAAAAATGGCACAAAGAACAAAAATAAGAAAAAAGAAGAAAAATGAAAGAGTTACAGGA
 TTTTATCGCAGCTTCTCAGCAAATGCTTCTAAATCTAAACAGGCAACAAGTCGTAAAGAAACAATTAGAAAAAATTGAAT
 TAGATGATATCCAGCCATCATCTCGTAGATACCCTTACGTGAAATTTACTCCTGAACGTGAAATTTGGAATGATTTACTT
 ACAGTAGAAAAATCTTTCTAAAAACAATTGACGGCGAAAAAGTACTAGACAATGTTTCATTCACTATGAATCCTAATGATAA
 AGCTATTTTAGTTGGTGATAGCGAAATTTGCTAAAAACAACATTGTTTAAAAATTTAGCTGGAGAAATGGAACAGATGAAG
 GTACATTTAAATGGGGTGTAAACGACATCTTTAAGTTACTTCCCTAAAGATAACTCTGAGTTCTTTGATGTTGTCGATATG
 AATTTAGTTGAATGGTTACGTCAATACGCTCCAGAAGATGAACAAACTGAAACATTTTACGTGGTTTCTTAGGTCGCATG
 GTTATTTAGTGGTGAGGAAGTTAAGAAAAAGCAAGCGTGCTTTTCAAGGTGGAGAAAAAGTACGTTGCATGTTAAGTAAAA
 TGATGTTATCAAGTGCTAACGTACTTTTACTTGATGAGCCAACAACCACTTTAGATTTGGAAAGTATCACTGCTGTAAAT
 GACGGATTAAATCATTTAAAGGTTCTATCATCTTCACTTCTTATGATTTTGAATTTATTAATACAATCGCAATCGAGT
 GATTGACTTGAATCAAGCTGGTGCCCTTTCTAAAGAAGTACCTTATGAGGAATACTTACAAGAAATTTGGTGTATTACAAA
 ATAATTAA

SEQ ID NO:36 sequência de polinucleotídeos

ATGCCAATTATTACAGATGTTTACGCTCGCGAAGTCTTAGACTCTCGTGGTAACCCAACTGTTGAAGTAGAAGTATTAAC
 TGAAAGTTGGCGCATTTTGGTTCGTCATTAGTACCATCAGGTGCTTCAACTGGTGAAACACGAAGCTGTTGAATTACGTGATG
 GAGACAAATCACGTTTATTAGGTAAAGGTGTTACTAAAGCAGTTGAAAACGTTAATGAAATCATCGCACCAGAAATTTATT
 GAAGGTGAATTTTCAAGTATTAGATCAAGTATCTATTGATAAAATGATGATCGCATTAGACGGTACTCCAAACAAAGGTAA
 ATTAGGTGCAATGCTATTTTAGGTGTATCTATCGCAGTAGCAGCTGCAGCAGCTGACTTATTAGGTCAACCACTTTACA
 AATATTTAGGTGGATTAAATGGTAAGCAGTTACCAGTACCAATGATGAACATCGTTAATGGTGGTTCTCACTCAGATGCT
 CCAATTGCATTTCAAGAATTATGATTTTACCTGTAGGTGCTACAACGTTCAAAGAATCATTACGTTGGGGTACTGGGAAT
 TTTCCACAACTTAAATCAATTTTAAAGCAACGTGGTTTGAAGAACTGCAGTAGGTGACGAAGGTGGTTTCGCTCCTAAAT
 TTGAAGGTACTGAAGATGCTGTTGAAACAATTATCCAAGCAATCGAAGCAGCTGGTTACAAACAGGTGAAGAAGTATTC

FIGURA 2.2

TTAGGATTTGACTGTGCATCATCAGAATTCATGAAAATGGTGATATGACTACAGTAAGTTCGAAGGCGAACACGGGTGC
 AAAACGTACAGCTGCAGAACAGTTGACTACTTAGAACAAATAGTAGACAAATATCCTATCATTACAATTGAAGACGGTA
 TGGACGAAAACGACTGGGATGGTTGGAAACAACCTACAGAACGTATCGGTGACCGTGACAAATTAGTAGGTGACGATTTA
 TTCGTAACAAACACTGAAATTTTAGCAAAAGGTATTGAAAACGGAATTGGTAACCTCAATCTTAATTAAAGTTAACCAAAT
 CGGTACATTAACTGAAACATTTGATGCAATCGAAATGGCTCAAAAAGCTGGTTACACAGCAGTAGTTTCTCACCGTTTCAG
 GTGAAACAGAGATACAACAATTGCTGATATTGCTGTTGCTACAAACGCTGGTCAAATTTAAACTGGTTTCATTATCACGT
 ACTGACCGTATTGCTAAATACAATCAATTATTACGTATCGAAGATGAATTATTTGAAACTGCTAAATATGACGGTATCAA
 ATCATTCTATAACTTAGATAAATAA

SEQ ID NO:37 sequência de polinucleotídeos

ATGCCAATTATTACAGATGTTTACGCTCGCGAAGTCTTAGACTCACGTGGTAACCCAACAGTTGAAGTTGAAGTATTAAC
 TGAAAGCGGTGCTTTCCGACGTGCATTAGTACCTTCTGGTGCTTCTACTGGTGAACATGAAGCAGTTGAATTACGTGATG
 GAGATAAATCACGTTATTTAGGTAAAGGTGTGACTAAAGCGGTAGAAAATGTTAACGAATGATCGCACCAGAAATCGTT
 GAAGGTGAATTTTCAGTTTTAGATCAAGTATCTATTGATAAAATGATGATTCAATTAGACGGTACACACAACAAAGGTAA
 ATTAGGTGCAAAATGCCATTTTAGGTGTTTTCTATTGCCGTAGCTCGTGACGTGCTGACTTATTAGGTCAACCATTATATA
 AATATTTAGGTGGATTTAATGGTAAACAATTGCCAGTACCTATGATGAATATTGTTAATGGTGGTTCTCACTCAGATGCA
 CCAATTGCTTTCCAAGAGTTCATGATTTTACCTGTAGGTGCTGAGTCATTCAAAGAATCATTACGTTGGGGTGCAGAAAT
 CTTCCATAACCTTAAATCAATCTTAAGTGAACGTGGTTTAGAAACTGCAGTAGGTGATGAAGGTGGTTTTCGCTCCTAGAT
 TTGAAGGCACTGAAGACGCTGTAGAACTATTATTAAAGCTATCGAAAAAGCAGGATACAAACCAGGTGAAGATGTATTC
 TTAGGATTTGACTGTGCTTCTTCTGAATTTCTATGAAAATGGTGTATTATGATTACACTAAATTCGAAGGTGAACACGGTGC
 TAAACGTAGTGCAGCAGAGCAAGTTGACTACTTAGAAGAATTAATTGGTAAATATCCAATCATCACTATTGAAGATGGTA
 TGGATGAAAACGATTGGGAAGGTTGGAAACAATTAAGTATCGTATCGGTGATAAAGTTCAATTAGTTGGTGTGATTTTA
 TTCGTAACCTAACACTGAAATTTTATCTAAAGGTATCGAACAAGGTATTGGTAACTCAATCTTAATCAAAGTAAACCAAAT
 CGGTACATTAACTGAAACATTCGATGCTATTGAAATGGCTCAAAAAGCTGGATATACTGCGGTGTGATCTCACCGTTCTG
 GTGAAACTGAAGATACTACAATTGCTGATATCGCAGTTGCTACAAATGCAGGCCAAATTTAAACAGGTTTCATTATCTAGA
 ACTGACCGTATTGCTAAATACAATCAATTATTACGTATTGAAGATGAATTATACGAAACAGCTAAATTTGAAGGAATTAA
 ATCTTTCTACAATTTAGATAAATAA

SEQ ID NO:38 sequência de polinucleotídeos

ATGAAAAAATCGTTACAGCTACAATCGCTACAGCAGGACTTGCCACTATCGCATTTGCAGGACATGATGCACAAGCCGC
 AGAACAAAATAACAATGGATATAATTCTAATGACGCTCAATCATACAGCTATACGTATACAATTGATGCACAAGGTAATT
 ATCATTACACTTGGACAGGAAATTTGGAATCCAAGTCAATTAACGCAAAACAACACATACTACTACAACAACACTACAATACT
 TATAGTTATAACAATGCATCTTACAATAACTACTATAATCATTATCAATACAATAACTATACAACAATAGCCAAAC
 AGCAACAAATAACTATTATACTGGTGGTTCCAGGTGCAAGTTATAGCACAACAAGTAATAATGTTTCATGTGACTACAACCTG
 CAGCCCATCTTCAAATGGTTCGTTCAATTTCTAATGGTTATGCATCAGGAAGTAACCTTATATACTTCAGGACAATGTACT
 TATTATGATTTTGTATCGTGTGTTGGTGGGAAAATTTGGTTCAACATGGGGTAACGCAAGTAATTGGGCTAACGCAGCTGCATC
 ATCTGGCTATACAGTGAACAATACACCAAAAGTTGGTGTCTATCATGCAACAACACAAGGCTATTACGGTCATGTTGCTT
 ACGTTGAAGGCGTTAACAGCAACGGTTCTGTTCGTGTTTCAGAAATGAATATGGACATGGTGTGTTGTTGTTACGTCT
 CGTACAATTTTCAGCAAAACCAAGCAGGTTTCATATAATTTTCATTCTATTA

SEQ ID NO:39 sequência de polinucleotídeos

ATGAAGAAAATCGCTACAGCTACTATCGCAACTGCAGGATTGCTACAATCGCAATTGCATCAGGAAATCAAGCTCATGC
 TTCTGAGCAAGATAACTACGGTTATAATCCAAACGACCCCAACATCATATAGCTATACTTACACTATTGATGCACAAGGTA
 ACTACCATTACACATGGAAAGGTAAGTGGCATCCAAGTCAATTAACCAAGATAATGGCTACTACAGCTATTACTACTAC
 AATGGCTACAATAACTACAACAATTACAACAATGGTTATAGCTACAATAATTACAGCCGTTACAACAACACTACTCAAATAA
 TAATCAATCATATAACTACAATAACTATAATAGTTACAACACAAACAGCTACCGTACTGGTGGTTTAGGTGCAAGCTACA
 GCACTTCAAGCAACAATGTTCAAGTAACATACTATGGCTCCATCATCAATGGCCGTTCAATCTCAAGTGGTTATACT
 TCAGGACGTAACCTTATACACTTCTGGTCAATGTACATACTACGTATTTGATCGTGTAGGTGGTAAAATCGGTTCAACTTG
 GGGCAATGCAAGTAACCTGGGCTAACGCAGCTGCAAGAGCTGGTTACACAGTGAACAATACACCAAAAGCTGGTGAATTA
 TGCAAAACAACTCAAGGTGCATACGGTTCACGTTGCATACGTTGAAAGTGTAAACAGCAATGGTTTCAGTAAGAGTTTCAGAA
 ATGAACATATGGTTATGGCCAGGTGTTGTAACCTTCACGTACAATCTCAGCTAGCCAAGCTGCTGGTTATACTTCATTCA
 CTAA

SEQ ID NO:40 sequência de polinucleotídeos

ATGAAAAAATCGCTACAGCTACAATTCGAAGTGCAGGAATCGCTACTTTTCGCATTTGCACACCATGACGCACAAGCAGC
 AGAACAAAATAATGATGGGTACAATCCAAACGACCCCTTATTATATAGCTACACTTACACAATCGATGCTGAAGGTAACT
 ACCACTACACTTGGAAAGGTAAGTGGAGTCCAGATCGTGAAATACTTCATATAACTATAATAATTATAATAACTACAAC
 TACTATGGTTACAATAACTATAGCAACTACAATAACTACAGTAATTACAACAATTACAACAACACTATCAATCAAACAACAC
 GCAATCACAAGAACAACCTCAACCGACTGGTGGTTTAGGCGCAAGCTATTCAACATCAAGTAGTAATGTTTCACGTTACAA

FIGURA 2.3

CAACTTCTGCGCCATCATCAAACGGTGTATCTTTATCAAACGCTCGCTCAGCATCTGGTAACTTATACACTTCAGGTCAA
TGTACATATTATGTATTTGACAGAGTAGGTGGCAAATCGGTTCAACGTGGGGTAACGCAAACAACCTGGGCAAACGCTGC
AGCACGTTCTGGTTACACAGTAAACAATTGCGCTGCTAAAGGTGCAATCTTACAAACGTCAAGGTGCATACGGACACG
TAGCATACGTTGAAGGTGTAAACAGCAATGGTTCAATCAGAGTTTCAGAAATGAACTACGGTCACGGTGCAGGTGTTGTC
ACTTCACGTACAATCTCTGCGAGCCAAGCTGCTTCATATAACTATATTCACTAA

SEQ ID NO:41 sequência de polinucleotídeos

ATGAAAAAATTAGTACCTTTATTATTAGCCTTATTACTTCTAGTTGCTGCATGTGGTACTGGTGGTAAACAAAGCAGTGA
TAAGTCAAATGGCAAATTAAGTAGTAACGACGAATTCATTTTATATGATATGGCTAAAAATGTTGGTGGAGACAACG
TCGATATTATAGTATTGTACCTGTTGGTCAAGATCCTCATGAATATGAAGTTAAACCTAAAGATATTAAGTTAACT
GACGCTGACGTTATTTTATACAACGGATTAAATTTAGAGACTGGTAACGGTTGGTTTGAAGAAAGCCTTAGAACAGGCTGG
TAAATCATTAAAGATAAAAAAGTTATCGCAGTATCAAAGATGTTAAACCTATCTATTTAAACGGTGAAGAAGGCAACA
AAGATAAACCAAGATCCACACGCATGGTTAAGTTTAGATAATGGTATTAAATACGTAAAAACAATTCACAAACATTTATC
GATAACGACAAAAACATAAAGCAGATTATGAAAAAGCAAGGTAAACAAATACATTGCTCAATTGGAAAAATTAATAATGA
CAGTAAAGACAAATTTAATGACATTCCAAAAGAACACGTGCCATGATTACAAGTGAAGGTGCCCTTCAAGTACTTCTCAA
AACAAACGTTATTACACCAGGTTATATTTGGGAAATTAACACTGAAAAACAAGGTACACCTGAACAAATGAGACAAGCT
ATTGAGTTTGTAAAAAGCACAAATTAACACACTTATTAGTAGAAACAAGTGTGATAAGAAAGCAATGGAAAGTTTATC
TGAAGAAACGAAGAAAGATATCTTTGGTGAAGTGTACACAGATTCAATCGGTAAAGAAGGCACTAAAGGTGACTCTTACT
ACAAAATGATGAAATCAAATATTGAACTGTACACGGAAGCATGAAATAA

SEQ ID NO:42 sequência de polinucleotídeos

GTGAAAAAATTCTCGCTTTAGCAATAGCATTTTAAATATCCTTGCCGCATGTGGGAATCACAGTAACCATGAACATCA
CTCACATGAAGGAAAAATTAAGTTGTAACCTACAACTCTATTCTCTATGACATGGTTAAACGTGTGGTGGAAATAAGG
TCGATGTTTATAGCATCGTTCCAGTAGGACAAGACCCACATGAATATGAGGTTAAACCTAAAGATATTAAGCATTAACA
GATGCTGACGTTGTATTTTATAACGGTTTAAACCTAGAACTGGAAATGGTTGGTTTGAAGAAAGCACTTGACCAAGCAGG
AAAAACAACAAAGATCCACATGCATGGTTAAGTTTAGAGAATGGAATTAATACGTAAAAACAATACAAAAATCACTAGAA
AAAACAACCAAGATCCACATGCATGGTTAAGTTTAGAGAATGGAATTAATACGTAAAAACAATACAAAAATCACTAGAA
CATCATGATAAAAAAGATAAGTCTACATATGAAAAACAAGGGAATGCATATATATCAAAATTAGAAGAACTTAATAAAGA
TAGTAAAAATAAATTTGATGACATACCCAAAAATCAACGTGCCATGATGACAAGTGAAGGTGCATTTAAATATTTTGCTC
AACAAATTCGATGTTAAACAGGTTATATTTGGGAGATAAACACAGAAAAACAAGGTACACCTGGTCAAATGAAACAAGCC
ATTAAATTTGTTAAAGATAATCATTTTAAACATTTATTAGTCGAAACAAGCGTAGATAAAAAAGCTATGCAAAGTTTATC
AGAAGAACTAAGAAAGATATTTATGGTGAAGTATTTACCGACTCTATAGGTAAGGAAGGTACTAAAGGTGACTCATACT
ATAAAATGATGAAATCTAATATTGATACAATACATGGTAGTATGAAATAA

SEQ ID NO:43 sequência de polinucleotídeos

ATGAAAAAGACAAATATGGCATCATCATTAGCAGTGGCATTAGGTGTAACAGGTTACGCAGCAGGTACAGGACATCAAGC
ACACGCTGCTGAAGTAAACGTTGATCAAGCACACTTAGTTGACTTAGCGCATAATCACCAAGATCAATTAAATGCAGCTC
CAATCAAAGATGGTGATATGACATCCACTTTGTAAGAGATGGTTTCCAATATAACTTTACTTCAAATGGTACTACATGG
TCATGGAGCTATGAAGCAGCTAATGGTCAAACCTGCTGGTTTCTCAAACGTTGCAGGTGCAGACTACACTACTTCATACAA
CCAAGGTTTCAGATGTACAATCAGTAAGCTACAATGCACAATCAAGTAACCTCAAACGTTGAAGCTGTTTCAGCTCCAACCT
ACCATAACTACAGCACTTCAACTACTTCAAGTTTCAGTGAGATTAAAGCAATGGTAATACTGCAGGTGCTACTGGTTTCATCA
GCAGCTCAAATCATGGCTCAACGTACTGGTGTTCAGCTTCTACATGGGCTGCAATCATCGCTCGTGAATCAAATGGTCA
AGTAAATGCTTACAACCCATCAGGTGCTTCAGGTTTATTCCAACTATGCCAGGTGGGGTCCGACAAACACTGTTTGACC
AACAAATCAACGCAGCTGTTAAAGCATACAAAGCACAAGGTTTAGGTGCTTGGGGATTCTAA

SEQ ID NO:44 sequência de polinucleotídeos

ATGAAAAAACAGTTATCGCTTCTACATTAGCAGTATCTTTAGGAATTGCAGGTTACGGTTTATCAGGACATGAAGCACA
CGCTTCAGAACTACAAACGTTGATAAAGCACACTTAGTAGATTTAGCACAACATAATCCTGAAGAATTAAATGCTAAAC
CAGTTCAAAGCTGGTGTACGATATTCATTTCTGATGACAATGGATACCAATACAACTTCACTTCAAATGGTTCTGAATGG
TCATGGAGCTACGCTGTAGCTGGTTCAGATGCTGATTACACAGAATCATCATCAAACCAAGAAGTAAGTGCAAAATACACA
ATCTAGTAACACAAATGTACAAGCTGTTTCAGCTCCAACCTTCTCAGAAAGTCGTAGCTACAGCACATCAACTACTTTCAT
ACTCAGCACCAAGCCATAACTACAGCTCTCACAGTAGTTTCAGTAAGATTATCAAATGGTAATACTGCTGGTTCTGTAGGT
TCATATGCTGCTGCTCAAATGGCTGCACGTACTGGTGTATCTGCTTCAACATGGGAACACATCATTTGCTAGAGAATCAAA
TGGTCAATTACATGCACGTAATGCTTCAGGTGCTGCTGGATTATTCCAAACCTATGCCAGGTGGGGTCCAACTGCTTCAG
TAAATGATCAAATCAATGCCGCTTATAAAGCATATAAAGCACAAGGTTTATCTGCTTGGGGTATGTAA

SEQ ID NO:45 sequência de polinucleotídeos

GTGAATTATCGTGATAAAATTCAAAAGTTTAGTATTGTAATATACAGTTGGTACATTTTCAACTGTCTATTGCGACATT
GGTATTTTTTAGGATTCAATACATCACAAGCACATGCTGCTGAAACAAATCAACCAGCAAGCGTGGTTAAACAGAAACAAC

FIGURA 2.4

AAAGTAATAATGAACAGACTGAGAATCGAGAATCTCAAGTACAAAATTCTCAAAATTCACAAAATAGTCAATCATTATCC
 GCTACTCATGAAAATGAGCAACCAATAATAGTCAAGCTAATTTAGTAAATCAAAAAGTAGCGCAATCATCTACTACTAA
 TGATGAACAACACAGCATCTCAAAATGTAAATACAAAGAAAGATTGGGCAACGGCTGCGACAACACAACAGATAAAGAAG
 AAAGTAAGCATAAACAACGAAAGTCAATCTGCTAATAAAAATGGAAACGACAATAGAGCGGCTCATGTAGAAAATCAT
 GAAGCAAATGTAGTAACAGCTTCAGATTTCATCTGATAATGGTAACGTACAACATGACCGAAATGAATTACAAGCATTTTT
 TGATGCAAAATTCATGATTATCGCTTTATTTGACCGTGAAAATGCAGATTCTGGCACATTTTAACTATGTAAAAGGCATTT
 TTGACAAGATTAATACTTTATTAGGCAGTAATGATCCAATTAACAATAAAGACTTGCAACTTGCATACAAAAGAATTGGAA
 CAAGCTGTTGCTTTAATTTCGTACAATGCCCTCAACGTCAACAACTAGCCGTCGATCAACAGAAATTCAAACCGCTTCTGT
 TGAGTCTAGAGCTGCAGAGCCTAGATCAGTATCAGACTATCAAAATGCAAAATTCATCATATTATGTTGAAAATGCTAATG
 ATGGTTTCAGGATATCCTGTAGGTACATATATCAATGCTTCTAGTAAAGGGGCGCCATATAATTTACCAACTACACCATGG
 AATACATTGAAGGCCTCTGACTCAAAGGAAATGCTCTTATGACAGCGAAACAAACTGGAGATGGCTACCAATGGGTTAT
 TAAGTTTAATAAAGGACATGCTCCACATCAAAATATGATTTTCTGGTTTGCATTACCAGCAGACCAAGTGCCAGTAGGAA
 GAACTGACTTTGTAACAGTTAATTCAGATGGAACAAATGTACAATGGAGTCATGGAGCAGGAGCAGGTGCAATAAACC
 CTTCAACAAATGTGGGAATATGGAGTAAATGATCCTGATCGTTCACATGACTTTAAAATAAGAAATAGAAGTGGCCAAGT
 AATATATAGCTGGCCAACCTGTCCATGTTTATCTTTAGAAGATTTATCTAGAGCGAGTGATTATTTTAGTGAAGCTGGAG
 CGACACCTGCTACTAAAGCATTGTTGGTAGACAAAATTTTGAATATATTAATGGTCAAAAACCTGCTGAATCACCGGGTGT
 CCTAAAGTTTATACTTTTCATCGGTCAAGGTGATGCAAGTTATACAATTTTCATTTAAAACACAAGGTCCAACCTGTTAATAA
 ATTGATTATGTCAGCAGGTGGGCGTGCTTTAGAGTACAATCAATTATTTATGTACAGTCAACTATACGTGCAATCAACGC
 AAGACCATCAACAACGTCTTAATGGTTTAAAGACAAGTGTTAATCGTACATATCGCATAGGTACAATTAACGTGTAGAA
 GTGAGTCAAGGAAATGTACAAACGAAAAGGTATTAGAAAGTACAAACCTAAATATAGATGATTTTGTGTGATGCTCTTT
 AAGTTATGTTAAGACGCCGAGTAATAAAGTGTTAGGTTTTTACCCTAATGCAAACTAATGCAAACTAAGCCTTTTAGACCGGGG
 GCGTTCAAGAATTAATGAATATCAATTAAGTCAATTATTTACTGATCAAAAATTTACAAGAAGCAGCAAGAAGTAGAAAC
 CCAATAAGATTAATGATTGGTTTCGACTATCCTGATGGTTATGGTAATAGTGAACCTTTAGTCTCTGTTAACTTAACGGT
 ATTACCTGAAATCCAACATAATATTAAATCTTTAAAAATGACGATACTCAAAATATTGCTGAAAAACCATTTTCAAAAC
 AAGCTGGGCATCCAGTTTTCTATGTATATGCAGGTAACCAAGGGAATGCTTCCGTGAATTTAGGTGGTAGCGTAACATCT
 ATTCAACCATTACGTATTAATTTAACAAGTAATGAGAATTTTACAGATAAAGATTGGCAAATTCAGGTATTCGCGGTAC
 ATTACACATTGAAAACCTCGACAAATAGAACTAATAATGCTAGAGAACTGAACATTGAACTTGTGGTAATTTATTACCAG
 GGGATTACTTTGGTACGATACGTTTTTGGACGTAAAGAACAAATATTGAAATTCGTGTTAAACCACATACACCAACAAAT
 ACAACGACAGCTGAGCAATTAAGAGGTACAGCATTACAAAAGTGCCTGTTAATATTTCGGGAATACCGTGGATCCATC
 GGCATTGGTTTATTTAGTTGCACCAACAAATCAAACTACGAATGGTGGTAGTGAGGCAGATCAAAATACCATCTGGTTATA
 CGATACTTGGCAGTGGTACACCTGATGGGTGCATAATACAATTACTATACGACCGCAAGATTATGTTGTATTTCATACCA
 CCTGTAGGTAAACAAATTAGAGCAGTAGTTTATTATAATAAAGTAGTTGCATCTAATATGAGTAATGCTGTTACTATTTT
 GCCAGATGACATTCCACCAACAATCAATAATCCTGTTGGAATAAATGCCAAATACTATCGAGGCGACGAAGTCAACTTTA
 CAATGGGAGTCTCTGATAGACATTCTGGTATAAAAAATACAACCTATTACTACTTTGCCAAGTGGTTGGACATCAAAATTTA
 ACTAAATCCGACAACAAAAACGGCTCATTAGCTATTACAGGTAGAGTCTCTATGAATCAGGCATTTAACAGTGATATTAC
 ATTTAAAGTATCAGCGACAGACAATGTCAATAATACGACAAATGATAGTCAATCTAAACATGTGTCAATTTCATGTAGGTA
 AAATTAGTGAAGATGCTCATCCGATTGTTATAGGAATACTGAGAAAGTTGTAGTAGTCAATCCGACTGCTGTATCTAAT
 GATGAAAAGCAAAGCATAATTACTGCCTTTATGAATAAAAAACCAAAATATAAGAGGATATTTAGCATCAAGTATCCAGT
 AACTGTGATAATAATGGTAACGTACATTACATTACCGTGATGGCTCATCAACAACGCTTGATGCTACAAATGTGATGA
 CATACGAACCAAGTTGTGAAATCTGAATATCAAACTGCCAATGCTGCTAAAACAGCAACGGTAACGATTGCTAAAGGACAA
 TCATTTAATATTGGTGATATTAAACAATATTTTACTTTAAGTAATGGACAAGCTATTCCAAATGGCACATTTACAAATAT
 TACATCTGATAGAACTATTCCAACCTGCACAAGAAGTTAGTCAAATGAATGCAGGTACGCAGTTATATCATATAGTTGCTT
 CAAATGCATATCATAAAGACACTGAAGATTTCTATATTAGTTTTAAAATCGTTGATGTGAAACAACCTGAAGGCGATCAA
 CGTGTCTATCGTACGTCAACATATGATTTAACCACTGATGAAATCTCAAAAGTAAAAACAAGCTTTTATTAAATGCAAAATAG
 AGATGTAATTACGCTTGCCGAAGGTGATATTTCAAGTTACAAATACACCTAATGGTGCTAATGTAAGTACTATTACAGTAA
 ATATTAATAAAGGTGATTAACGAAATCATTCGCGTCAACCTAGCTAATATGAATTTCTTGCCTTGGGTTAATTTCCCA
 CAAGATTATACAGTGACATGGACGAATGCAAAAATGCAAAACAGACCAACAGATGGTGGTTTATCATGTGCTCCGATGACCA
 TAAATCTTTAATTTATCGTTATGATGCTACATTAGGCACACAAATTAACAATGAATGATATTTTAAACGATGTAAAAGCGA
 CTACTACAGTGCCTGGATTGCGTAATAATATTACTGGTAATGAAAAAGCACAAGCAGAAGCAGGTGGAAGACCAACTAT
 AGAACAACCTGGTTATTACAATCAATGCGACAACCTGATGGTCAACGTCAATTTACGTTGAATGGTCAAGTGATTCAAT
 ATTAGACATCATCAACCTTCAACCGTTATGGTGGGCAACCTGTTACAAATTCAAATACTCGTGCAAAACCATAGTAACT
 CAACTGTTGTTAACGTAAACGAACCGGCAGCTAATGGTGCTGGCGCATTTACAATTGACCAGCTTGTAAGAAAGTAATCT
 ACACATAATGCAAGTGATGCAGTTTATAAAGCGCAGTTATACTTAACGCCATATGGTCCAAAACAATATGTTGAACATTT
 AAATCAAAATACAGGAAATACTACTGACGCTATTAAACATTTATTTTGTACCAAGTGACTTAGTGAATCCAACAATTTTCA
 TAGGTAATTACACTAATCATCAAGTGTTCTCAGGTGAAACATTTACAAATACGATTACAGCGAATGATAACTTTGGTGTG
 CAATCGGTAACGTACCAAAATACATCACAATACAGGTACTGTTGATAATAACCATCAACATGTTCTGCAACGGCACC
 AAATGTGACATCAGCAACTAGTAAGACAATCAATTTTATGCAACTGATACAAAGTGGTAATACAGTTTCAACTTCAATCA
 ATGTAACAGTGAAACCTTTGCGTGATAAATATCGAGTTGGTACTTTCATCAACGGCTGCTAATCTGTTAGAAATGGCAAT
 ATTTGCAATAATGCGACAGTATCACAAGCTGATCAACGACAATTTATTAATTCGTTAACGTTTACAAGTAATGCACCAAA
 TAGAACTATGCAACAGCAAGCGCAAATGAAATCACTAGTAAACAGTTAGTAATGTGAGTCTGAGGAAATAATGCCA
 ATGTCACAGTAACGTGTTACTCATCAAGATGGAACAACATCAACAGTACTGTACCTGTAAAGCATGTCTCCAGAAATC

FIGURA 2.5

GTTGCACATTGCGCATTACACTGTACAAAGGCCAAGACTTCCAGCAGGTAATGGTTCTAGTGCAGCAGATTACTTTAAGTT
 ATCTAATGGTAGTGCCATTCCAGATGCAACGATTACATGGGTAAGTGGACAAGCGCCAAATAAAGATAATACACGTATTG
 GTGAAGATATAACAGTAACTGCACATATCTTAATTGATGGCGAAACAACGCCGATTACGAAAACAGCAACATATAAAGTA
 GTAAGAAGTGTACCGAAACATGTCTTTGAAACAGCCAGAGGTGTTTTATACCCAGGTGTTTCAGATATGTATGATGCGAA
 ACAATATGTTAAGCCAGTAAATAATTCTTGGTGCACAAATGCGCAACATATGAATTTTCAATTTGTTGGAACATATGGTC
 CTAACAAAGATGTTGTAGGTATATCAACGCGTCTTATTAGAGTGACCTATGATAAATAGACAAACTGAAGATTTAACTATT
 TTATCTAAAGTTAAACCTGACCCACCAAGAATTGACGCAAACTCTGTGTACATATAAAGCAGGTCTTACAAACCAAGAAAT
 TAAAGTTAATAACGTATTAAATAACTCGTCAGTAAATTTATTTAAAGCAGATAAATACACCATTAATGTCAAAATATTA
 CTCATGGTAGTGGTTTTAGTTTCGGTTGTGACAGTAAGTGACGCGTTACCAAATGGCGGAATTAAAGCAAAATCTTCAATT
 TCAATGAACAATGTGACGTATACGACGCAAGACGAAGCAAGTGGTTCAGTTGTTTACAGTAACAGAAATGAATCTGTTGATTC
 AAATGATAGTGCTTCTGTTACAGTAACACCACAATTACAAGCAACTACTGAAGGCGCTGTATTTATTAAAGGTGGCGACG
 GTTTTGATTTTCGGTCATGTAGAACGATTTATTCAAATCCGCCACATGGGGCAACGGTCGCATGGCATGATAGTCCAGAT
 ACATGGAAGAATACAGTCCGCAACACACATAAACTGCGGTTGTAAACATTACCTAGTGGTCAAGGTACGCGTAATGTTGA
 AGTTCAGTCAAAGTTTATCCAGTTGCTAATGCTAAGGCGCCATCACGTGATGTGAAAGGTCAAATTTGACACATGGTA
 CAAACGCTATTGATTACATTACATTTGATCCAAATACTAATACGAATGGTATTACAGCAGCATGGGCAAATAGACAACAA
 CCAAATAACCAGCAAGCAGGCGTTCAACATTTAAATGTGATGTACATATCCAGGTATTTTCAGCTGCTAAACGAGTTCC
 TGTAAGTGTGAACGTATATCAATTTGAATTTCCCTCAAACCTACTTATACAACAACAGTTGGTGGCACTTTAGCAAGTGGTA
 CGCAAGCATCAGGATATGCACATATGCAAAACGCTTCAGTTTACCAACAGATGGATTACGTATAAATGGAATCGTGAT
 ACTACGGGTACAAACGATGCAAACTGGGCAGCAATGAATTAACCAAACTGTCACAAAGTGGTAAATGCAAAATATGATGT
 CATCTATAATGGACATACATTTGCAACATCTTTACAGCGAAATTTGTAGTAAAGATGTTCAACAGCGAAACCAACTG
 TCACTGAAACAGCGCAGGAGCGATTACAATTGCACCTGGTGCGAACCACAGTCAATACTCATGCTGGTAAATGTTACG
 ACATATGCTGACAAATAGTTATTAAACGTAATGGAATGTTGTAACGACATTTACACGTCGTAATAATACGAGCCCATG
 GGTGAAAGAAGCATCAGCAGATAATGTAACAGGTATTGTTGGAACATAATGTTATTTACTGTGGCAGCAGGTACTTTCA
 ATCCTGCTGATACAATTTCAAGTTGTTGCAACACAAGGTAGTGGCGAAACAATCAGTGACGAGCAACGTAGTGATGATTTTC
 ACAGTTGTGCGACCACAACCGAACCAGCGACTACGAAAAATTTGGCAAAATGGTTCATATTGATATCACGCCTAATAATCC
 ATCAGGACATTTAATTAATCCAACACAAGCAATGGATATTGCTTACACTGAAAAAGTGGGTAATGGTGCAGAACATAGTA
 AGACAATTAATGTTGTTTCGTGGTCAAAATAATCAATGGACAATTCGGAATAAGCCTGACTATGTAACGTTAGATGCACAA
 ACTGGTAAAGTACGTTCAATGCCAATACTATAAACCAAAATTCATCAATCACAATTAATCCGAAAGCAGGTACAGTTG
 CTCAGTAAGTAGTAATCCAAGTACATTAAGTGCACCGGCAGCTCATACTGTCAACACAACCTGAAATTTGTGAAAGATTATG
 GTTCAAATGTAACAGCAGCTGAAATTAACAATGCAGTTCAAGTTGCTAATAAACGTAAGTGCACACGATTAAAAATGGCACA
 GCAATGCCTACTAATTTAGCTGGTGGTAGCACAACGACGATTCCTGTGACAGTAACCTACAATGATGGTAGTACTGAAGA
 AGTACAAGAGTCCATTTTCAAAAAGCGGATAAACGTAAGTTAATCACAGCTAAAAATCATTAGATGATCCAGTAAGCA
 CTGAAGGTAAAAAGCCAGGTACAATTACGAGTACAATAATGCAATGCATAATGCGCAACAACAAATCAATACCGCGAAA
 ACAGAAGCACAACAAGTGATTAATAATGAGCGTGCAACACCACAACAAGTTTCTGACGCACTAACTAAAGTTTCGTGCAGC
 ACAAACTAAGATTGATCAAGCTAAAGCATTACTTCAAAATAAAGAAGATAATAGCCAATTAGTAACGTCTAAAAATAACT
 TACAAAGTTCTGTGAACCAAGTACCATCAACTGCTGGTATGACGCAACAAAGTATTGATAACTATAATGCGAAGAAGCGT
 GAAGCAGAAACTGAAATAACTGCAGCTCAACGTGTTATGACAATGGCGATGCAACTGCACAACAATTTTCAGATGAAAA
 ACATCGTGTGATAACGCATTAAACAGCATTAAACCAAGCGAACAACATGATTTAACTGCAGATACACATGCCCTTAGAGCAAG
 CAGTGCAACAATTTGAATCGCACAGGTACAACGACTGGTAAAGAAGCCGCAAGTATTACTGCTTACAATAATTCGATTTCGT
 GCACTTCAAAGTGACTTAACAAGTGCTAAAAATAGCGCTAATGCTATCATTCAGAAGCCAATAAGAACAGTGCAAGAGGT
 ACAATCTGCGTTAACAATGTAATCGTGCAATGAGCGATTAAACGCAAGCAATTAATCAATTAGTACCTTTAGCTGATA
 ATAGTGCTTTAAGAACTGCTAAGACGAAACTTGATGAAGAAATCAATAAATCAGTAACCTACTGATGGTATGACACAATCA
 TCAATCCAAGCATATGAAAATGCTAAACGTGCAGGTCAACAGAAACAACAAATGCACAAAATGTTATTAACAATGGTGA
 CGCGACAGACCAACAAATTTGCCGAGAAAAAACAAGTAGAAGAAAAATATAATAGCTTAAAAACAAGCAATTTGCTGGAT
 TAACACCAGACTTGGCACCATTACAAACTGCAAAACTCAGTTGCAAAATGATATTGATCAGCCAACGAGTACGACTGGT
 ATGACAAGCGCATCTGTTGCTGCATTTAATGACAAACTTCAGCAGCTAGAATAAATTCAGAAATTTGATCGCGTACT
 AGCATCTCATCCAGATGTAGCAACGATTTCGTCAAAACGTGACAGCAGCGAATGCTGCTAAAAACAGCACTTGATCAAGCGC
 GCAATGGCTTAACAGTGCATAAAGCACCTTTAGAAAAATGCGAAAAATCAACTACAACATAGTATTGATACGCAACAGT
 ACAACTGGTATGACACAAGACTCTATAAATGCATACAATGCGAAGTTAAACAGCTGCACGTAATAAGGTTCAACAAATCAA
 TCAAGTATTAGCAGGTTACCTACTGTAGATCAAATTAATACAAATACGTCTGCAGCAATCAAGCGAAATCTGATTTAG
 ATCATGCAGCTCAAGCGTTAACACCAGATAAAGCGCCGCTTCAAAATGCGAAAAACGCAATTAGAACAAGCATTAAATCAA
 CCAACAGATACAACAGGTATGACAACCGCTTCGTTAAATGCATACAACCAAAAAATTAACAGCAGCAGCTCAAAAGTTAAC
 TGAAATTAATCAAGTGTTGAATGGCAACCCAACTGTCCAAAATATCAATGATAAAGTGGCAGAGGCAACCAAGCTAAGG
 ATCAATTAATACAGCAGCTCAAGGTTTAACATTAGATAGACAGCCAGCGTTAAACAACATTACATGGTGCATCTAACTTA
 AACCAAGCACAACAAATAATTTACGCAACAATTAATGCTGCTCAAAATCATGCTGCGCTTGAACAATTAAGTCTAA
 CATTACGGCTTTAAATACTGCGATGACGAAATTAAGACAGTGTGCGGATAATAACAATTAATCAGGTCAAAAT
 AACTGACGCAACACCAGCTAATAAACAAGCCTATGATAATGTCAGTTAATGCGGCTAAAGGTGTCATTGGAGAAACGACT
 AATCCAACGATGGATGTTAAACACAGTGAACCAAAAAGCAGCATCTGTTAAATCGACGAAAGATGCTTTAGATGGTCAACA
 AAATTTACAACGTGCGAAAAACAGAAGCAACAATGCGATTACGATGCAAGTGATTTAAACCAAGCACAACAAAGATGCAT
 TAACACAACAAGTGAATAGTGACAAAACGTGCAAGCAGTAAATGATATTAAACAACGACTCAAAGCTTAAATACTGCT
 ATGACAGGTTTAAACGTGGCGTTGCTAATCATAACCAAGTCTGACAAAGTGATAATTATGTCAACGAGATACATAATA

FIGURA 2.6

GAAATAATGATTACAACAATGCATACAACCATGCGAATGCATTATTAAATGGTAATGCACAACATCCAGTTTATAACACCAA
GTGATGTTAAACAATGCTTTATCAAATGTGCACAGTAAAGAACATGCATTGAATGGTGAAGCTTAAGTGTCCGAA
CAAGAAGCGAATACTGCATTAGGTCATTTAAACAATTTAAATAATGTACAACGTCAAAACCTTACAATCGCAAATTAATGG
TGCGCATCAAATTGATGCAGTTAATACAATTAAGCAAAATGCAACAACTTGAATAGTGAATGGGTAACCTTAAGACAAG
CTGTTGCAGATAAAGATCAAGTGAAACGTACAGAAGATTATGCGGATGCAGATACAGCTAAACAAAATGCATATAACAGT
GCAGTTTCAAGTGCTGAAACAATTATTAATCAAACAGCTAATCCGACAATGTCTGTTGATGATGTTAATCGTGCAACTTC
AGCTGTTACTACTAATAAAAAATGCATTAAATGGTGATGAAAAATTAGTACAATCTAAAACAGATGCTGCAAGAGCAATTG
ATGCATTACCACATTTAAATAATGCACAAAAAGCAGATGTTAAATCTAAAATTAATGCTGCATCAAATATTGCTGGTGTA
AATACCGTTTAAACAAACAGGTACAGATTTAAATACAGCGATGGGTAACCTTGCAAGGGTGCAATCAATGATGAACAAACGAC
GCTTAATAGTCAAAATTATCAAGATGCGACACCTAGTAGAAGAAACAGCATACACAAATGCGGTGCAAGCTGCGAAAGATA
TTTTAAATAAAATCAAATGGTCAAATAAAAAAGAAAGATCAAGTTACTGAAGCGATGAATCAAGTGAATTCGGCTAAAAAT
AACTTAGATGGTACGCGTTTTATTAGATCAAGCGAAGCAAAACAGCGAAACAGCAGTTAAATAATAGACGCATTTAACAA
TGCACAAAAAACGAATTTAACAAATCAAATTAATAGTGGTACTACTGTTGCTGGTGTTTCATACGTTTCAATCAAAATGCCA
ACACATTAGATCAAGCGATGAATACGTTAAGACAAAGTATTGCTAACAAATGATGCGACTAAAGCAAGTGAAGATTACGTA
GATGCTTAATAATGATAAGCAAAACAGCATATAACAACGCGGTAGCTGCTGCTGAAACGATTATTAATGCGAATAGTAATCC
AGAAATGAATCCAAGTACGATTACACAAAAAGCAGAGCAAGTGAATAGTTCTAAAACGGCACTTAACGGTGATGAAAAC
TAGCTACGGCAAAAACAAAATGCGAAAAACGTACTTAAACACATTAACGAGTATTACAGATGCTCAAAGAACAATTTGATT
AGTCAAAATTAGTAGTGCACAAAGAGTGAGTGGTGTGATACTGTAAAACAAAATGCACAACATTTAGATCAAGCTATGGC
TAACTTACAAAATGGTATTAAACAAGCAATCTCAAGTGAAATCATCTGAGAAATATCGTGATGCTGATACAAATAAACCA
AAGAGTATGATAATGCTATTACTGCGAGCAAGGATTTTAAATAAATCGACAGGTCCTAAACGCGCAAAATGCAAGTT
GAAGCAGCATTGCAACGTGTTAATACTGCGAAAAGATGCATTGAATGGTGAATGCAAAAATTAATGCGAGCTCAAAACGCGC
GAAACAACATTTAGGTACTTTAACGCATATCACTACAGCACAAACGCAATGATTTAACAAAATCAAATTTCA

SEO ID NO:46 sequência de polinucleotídeos

ATGGGTAACCTTACAACACGGCTATATCAACAGTAAAGTCAGGAACATTAGCGAGCCAAAACCTTCTTGGATGCTGTATGAGCAAAA
ACGTAATGCTTACAATCAAGCTATATCAGCTGCCGAAACCATTTTAAATAAAACAACTGGAGCGAATACAGCGAAACAG
CGGTTGAACAAGCACTTAATAATGTTAATAGTGCAGAAACATGCATTAAATGGTACGCAAAACCTTAAATAATGCGAAACAA
GCAGCGATTACAGCAATTAATGGCGCATCTGATTTAAATCAAAAAACAAAAGATGCATTAAAAGCACAAGCTAATGGTGC
TCAACGCGTATCTAATGCAAAATGATGTACAACGTAATGCGACTGAAGTGAACACGGCAATGGGTCAATTACAACATGCCA
TCGCAGATAAGACGAATACGTTAGCAAGCAGTAAATATGTCAACGCCGATAGCACTAAACAAAATGCTTACACAACCTAAA
GTTACCAATGCTGAACATATTATTAGCGGTACGCCAACGGTTGTTACAACACCTTCAGAAGTAACAGCTGCAGCTAATCA
AGTAAACAGCGCGAAACATAAGAAATTAATGGTGACGAAAGATTACGTGTTGCAAAACAAAACGCCAATACTGCTATTGATG
CATTAAACGCAATTAAATACTCTCAAAAAGCTAAATTAAGAAACAAGTGGGACAGCAATAGATTAGAAGACAGCTACAA
TCTGTTCAAACAAAATGGACAATCATTGAACAATGCAATGAAAGGCTTAAGAGATAGTATTGCTAACGAAACAACAGCTCAA
AGCAAGTCAAACCTATACAGACGCAAGTCCGAATAACCAATCAACATATAATAGCGCTGTGTCAAATGCGAAAGGTATCA
TTAATCAAACCTAACAATCCAACCTATGGATACTAGTGCATTACCCAAGCTACAACACAAGTGAATAATGCTAAAAATGGT
TTAAACGGTGCTGAAAACTTAAGAAATGCACAAAACACTGCTAAGCAAACTTAAATACGTTATCACACTTAACAAATAA
CCAAAATCTGCAATCTCATCAAAATTGATCGTGCAGGTGATGTGAGTGAGGTAAACAGCTGCTAAAAATGCAGCAACTG
AGTTAAACGCGCAAATGGGCAACTTGGAAACAAGCTATCCATGATCAAAACACAGTTAAACAAGGTGTTAACTTCACTGAT
GCAGATAAAGCTAAACGCTGATGCTTATACAAATGCGGTAAAGCAGAGCAGAAACAATTTCTGAATAAAACGCAAGGTGCAAA
TACGTCTAAACCAAGATGTTGAAGCGGCTATTCAAATGTTACAAGTGTCAAAATGCATTGAATGGTGATCAAAACGTTA
CAAATGCGAAGAATGCAGCTAAAAATGCATTAAATAACTTAACGTCAATTATAATGCACAAAAACGTCGATCTAACACT
AAAATTGATCAAGCAACAACAGTAGCTGGTGTGAAGCGGTATCTAATACAGGTACACAATTGAATACAGCGATGGCTAA
CTTGCAAAATGGTATTAAATGATAAAGCGAATACTTTAGCGAGCGAAAACCTATCATGATGCTGATTAGATAAGAAAACTG
CTTATACTCAAGCCGTTACGAACGCAGAAAAATATTTTAAATAAAAAATAGTGGATCAAATTTAGATAAAGCTGCCGTTGAA
AACGCGTTGTGCACAAGTGACAAATGCGAAAGGTGCCCTAAATGGTAACCATAAATTTAGAGCAAGCTAAATCAAATGCAAA
CACTACTATAAAACGGCCTTCAACATTTAACAACAGCACAAAAAGATAAATTTGAAACAACAAGTGCAACAAGCACAAAATG
TTGCAGGTGATAGATACTGTTAAATCAAGTGCCCAACATTAATGGTGCATATGGGTACGTTAAGAAATAGCATACAAGAT
AACACAGCTACGAAAAAATGGCCAAAACCTATCTTGATGCTACAGAAGCTAACAAAAACAACTATAACAATGCTGTTGATAG
TGCTAATGGTGTCTTAATGCAACAAGCAATCCAAATATGGATGCTAATGCAATTAACCAATCGCTACACAGGTGACAT
CAACGAAAAATGCATTAGATGGTACACATAATTTAACGCAAGCGAAACAAACAGCAACAAATGCCATCGATGGTGTCTACT
AACTTAAATAAAGCGCAAAAAGATGCGTTAAAAGCACAAAGTTACAAGTGCGCAAGCTGTTGCAAATGTAACAAGGTATCCA
ACAACTGCAAAATGAACCTTAATACAGCTATGGGTCAATTACAACATGGTATTGATGATGAAAAATGCAACAAAAACAACTC
AAAAATATCGTGACGCTGAACAAAGTAAGAAAACCTGCTTATGATCAAGCTGTAGCTGCTGCGAAAGCAATTTTAAATAAA
CAACAGGTTCCAATTCAGATAAAGCAGCAGTTGACCGTGCATTACAACAAGTAACAAGTACGAAAGATGCATTGAATGG
GGATGCTAAACTGGCAGAAGCGAAAGCGGCAGCTAGACAAAACCTTAGGTACTTTAAACCATATTACGAAATGCACAACGTA
CTCGGTTAGAAGGTCAAATCAATCAAGCGACGACTGTTGATGGCGTTAATACTGTAAAAACAAATGCCAATACATTAGAC
GCGCGTATTGAATAGCTTACAGGTCGAATCAATGATAAAGATGGCAGATTTAAGAAATCAAATTTATCTTGATGCAGATGA
ATCAAAAACGAAATGCATATACGCAAGCTGTGCACAGCGGTGAAGGCATTTAAATAAACAACAGGTGGTGAACCATCTA
AAGCAGACGTTGATAATGCATTAAATGCAGTTACAAGAGCGAAAGCGGCTTTAAATGGTGCTGAAAACTTAAGAAATGCG
AAAACCTTCAGCAACAATACGATTAAATGGTTTACCTAACTTAACACAATTACAAAAAGACAACCTTGAAGCATCAAGTTGA

FIGURA 2.7

ACAAGCGCAAAATGTTAGTTGGTGTAAATGGTGTAAAGATAAAGGTAATACATTAATACTGCCATGGGTGCATTACGTA
 CAAGTATCCAAAATGATAATACGACGAAAAACAAGTCAAAATTATCTTGATGCATCTGTAGTACCAAAAAATAATTACAAT
 ACTGCTGTAAATAATGCAAAATGGTGTATTATTAATGCAACGAACAATCCAAATATGGATGCTAATGCGATTAAATGACATGGC
 AAATCAAGTCAATACAACAAAAGCAGCGTTAAATGGTGCACAAAACCTTAGCTCAAGCTAAAACAAATGCGACGAACACAA
 TTAACAACGCGCAAGACTTAAACCAAAAAACAAAAGATGCATTAAAAACACAAGTTAACAATGCACAACGTGTATCTGAT
 GCAAATAACGTTCAACATACAGCTACTGAATTGAACGGTGCATGACAGCACTTAAAGCAGCTATTGCGGATAAAGAAAG
 AACAAAAGCAAGCGGTAATTTATGTCAATGCTGATCAAGAAAAACGTCAAGCGTATGATTCAAAAGTGACTAACGCTGAAA
 ATATCATTAATGGTACACCAAAATGCGACATTAACAGTCAATGACGTAAATAGTGCAGGATCACAAGTCAATGCGGCTAAA
 ACAGCATTAATGGTGTGATAACAACTTACGTGTAGCGAAAGAGCATGCTAACAATACAATTGACGGCTTAGCACAATTGAA
 TAATGTACAAAAAGCAAAATTAAGAAGACAAGTTCAAAGTGAACATACATTAGATGGTGTCAAAGCTGTTAAAAATAGTT
 CTCAAACGTTGAATACAGCGATGAAAAGGCTTAAGAGATAGTATTGCGAATGAAGCAACGATTAAAGCAGGTCAAAACTAC
 ACTGACGCAAGTCCAAATAATCGTAACGAGTACGACAGCGCAGTTACTGACGCAAAAGCAATCATTAATCAAACATCGAA
 CCCAACGATGGAACCAATACTATTACGCAAGCAACATCACAAGTGACAATAAAGAACATGCATTAAATGGTGCAGCAAA
 ACTTAGCTCAAGCTAAGACAACAGCGAAAAACAACCTTGAATAACTTAACATCAATTAAACAATGCACAAAAAGATGCGTTA
 ACGCGTAACATTGATGGTGCACCTACAGTAGCTGGTGTAAATCAAGAACTGCAAAAGCAACAGAAATTAATAACGCAAT
 GCACAGTTTACAAAATGGTATCAATGATGAGACACAAACAAAACAACTCAGAAATACCTAGATGCTGAGCCAAGTAAGA
 AATCAGCTTATGATCAAGCAGTAAATGCAGCAAAAGCAATTTTAAACAAAAGCTAGTGGTCAAAATGTAGACAAAGCAGCA
 GTTGAACAACGATTACAAAATGTGAACAGTACGAAGACGGCGTTGAACGGTGATGCGAAATTAATGAAGCTAAAGCTGC
 TCGGAAACAACGTTAGGTACATTAAACACATTAATAATGCACAACGTAATGCGTTAGATAATGAAATTACACAAGCAA
 CAAATGTTGAAGGTGTTAATACAGTTAAAGCCAAAGCGCAACAATTAGATGGTGTCTATGGGTCAATTGAAACATCAATT
 CGTGATAAAGACACGAGCTTACAAAAGTCAAAATTTAAGATGCTGATGATGCTAAACGAACGGCTTATTTCTCAAGCAGT
 AAATGCAGCAGCAACTATTTTAAATAAAACAGCTGGAGGAAATACACCTAAAGCAGATGTGAAAGAGCAATGCAAGCTG
 TTACACAAGCCAATACTGCATTAAACGGTATTCAAACCTTAGAACGTGCGAAACAGGCTGCGAACACAGCGATTACAAAT
 GCTTCGGACTTAAATACAAAACAAAAGAAGCATTTGAAGCACAAGTAACAAGTGACAGGACGCGTATCTGCAGCAAAATGG
 TGTGAAACATACTGCGACTGAATTTAAATACTGCGATGACAGCTTTAAACGTTGCCATTGCTGATAAAGCTGACACAAAAG
 CTAGTGGTAATTATGTCAATGCTGATGCGAATAAACGCCAAGCATATGATGAAAAAGTGACAGCTGCAGAACATATCGTT
 AGTGGTACACCAACACCAACGTTAACACCATCAGATGTTACAAATGCAGCAACGCAAGTAACGAATGCGAAGACGCGATT
 AAACGGTAATCATAATTTAGAAGTAGCGAAACAAAATGCTAACACGCAATTGATGGTGTAACTTCTTTAAATGGTCCGC
 AAAAAAGCAAACTTAAAGAACAAAGTGGGTCAAGCGACGCTGTTGCCAAATGTTTCAAACTGTTCTGATGATAAGCAAAACA
 TTAACACTGCAATGAAAGGTCTACGAGATAGCATTGCGAATGAAGCAACGATTAAAGCAGGTCAAAACTACACAGATGC
 AAGTCAAAACAAACAAAATGACTACAACAATGCAGTCACTGCAGCAAAAGCAATCATTTGGTCAAAACACTAGTCCATCAA
 TGATTGCGCAAGAAATTAATCAAGCGAAAGACCAAGTGACAGCTAAACAACAAGCGTTAAACGGTCAAGAAAACCTTAAGA
 ACTGCGCAAAACAAATGCGAAGCAACATTTGAATGGCTTAAGTGAATTAATGCACAAAAAGATGCAGCGAAACGCCA
 AATCGAAGGTGCAACGCATGTTAATGAAGTAACACAAGCGCAAAATAATGCGGACGCATTAAATACAGCTATGACGAACCT
 TGAAAAATGGTATTCAAGATCAAAATACGATTAAAGCAAGGTGTTAACTTCACTGATGCAGATGAAGCGAAACGTAATGCA
 TATACAAATGCAGTGACGCAAGCTGAACAAATTTTAAATAAAGCACAAAGTCCAAATACTGCAAAAGACGGTGTGCAAAAC
 TGGCTTACAAAATGTACACGCTGCTAAAAACGAATTGAACGGTAATCAAAATGTTGCGAACGCTAAGACAACCTGCGAAAA
 ATGCATTGAATAACCTTACATCAATTAATAATGCAAAAAAGCAGCATTTGAATTCACAAATGAAAGGTGCGCAACAGTT
 GCAGGTGTAAATCAAGTGTCTACAATGGCATCTGAATTTAAATACTGCAATGAGCAACTTACAACGTGGTATTAAATGACGA
 AGCAGCTACAAAAGCAGCTCAGAAATATACTGAAGCAGATAGAGATAAAACAACTGCATACAATGATGCTGTAAACAGCAG
 CTAAAACGTTATTAGATAAAACAGCTGGTTCAAATGACAATAAAGTAGCCGTTGAACAAGCATTACAACGTGTGAATACT
 GCTAAAACAGCATTAAATGGTGACGCGGATTAATGAAGCGAAGAACACAGCTAAACAACAATTAGCGACAATGTCCACA
 TTTAACTAATGCTCAAAAAGCAAACTTAACAGAACAAATTGAACGTGGTACAACTGTTGCTGGTGTTCAGGCATCCAAG
 CAAATGCTGGTACTTTAAATCAAGCAATGAATCAATTAAGACAAAGTATTGCTTCTAAAGATGCGACTAAATCAAGCGAA
 GATTATCAAGACGCGAATGCAGATTTACAAAATGCATACAATGATGCGGTAACATAATGCTGAAGGTATTATTAGTGCAAC
 GAATAACCCCTGAAATGAATCCTGATACAATTAACCAAAAAGCAGCGCAAGTGAACAGTGCGAAGTCTGCATTGAACGGTG
 ATGAAAAATTAGCAGCAGTAAACAACTGCGAAATCAGATATCGGTCGTTTGACAGACTTGAACAATGCACAACGAACT
 GCGGCAAAATGCTGAAGTGGATCAAGCACCAAACTTTGACAGCTGTACAGCGGCTAAAAATAAGCAACATCGTTAAACAC
 AGCGATGGGTAAATTTGAACATGCACCTTGCTGAAAAGGATAATACGAAACGTAAGTGTCAATTACACAGATGCGGATCAAC
 CAAAACAACAAGCGTATGATACTGCAGTTACACAAGCAGAAGCAATTACTAATGCAAAATGGCAGTAACGCGAATGAAACA
 CAAGTTCAAGCAGCGCTTAACCAATTGAATCAAGCTAAAAACGACTTGAATGGTGTGATAATAAAGTTGCTCAAGCGAAAGA
 AACAGCAAAACGTGCATTAGCTTCATATAGTAACCTGAATAACGCGCAATCAACTGCAGCAACTAGTCAAATTGACAATG
 CAACGACAGTAGCAGACGTAACCTGCTGCACAAAATACTGCTAATGAATTAATAACAGCAATGGGTCAACTTCAAATGGT
 ATTAATGACCAAAACACTGTTAAACAACAAGTGAACCTTTACAGATGCTGACCAAGGTAAGAAAGATGCTTACACAAATGC
 TGTACGAATGCTCAAGGTATTTTAGATAAAGCAACGGTCAAATATGACAAAAGCACAAGTTGAAGCTGCATTAAATC
 AAGTAACGACTCTAAGAATGCTTTAAACGGTGAATGCAATGTAAGACAAGCAAAATCAGATGCGAAAGCAAACTTAGGT
 ACATTAACACACTTAAATAATGCACAAAAACAAGATTAAACATCACAATAAGGTTGAAGGTGCAACAACAGTCAACGGTGTAAA
 TAGTGTAAAACGAAAGCACAAAGACTTAGATGGTGAATGCAACGATTAGAGTCAGCAATCGCAAAATGAAAGTCAACATA
 AAGCGAGCGAAAACCTACATTGACGCAGATCCAACCTAAGAAAACAGCATTGATAATGCCATCACACAAGCTGAATCTTAC
 TTAATAAAGATCATGGTACGAATAAAGATAAGCAAGCTGTTGAACAAGCAATTCAAAGTGTAAAGCTTACTGAAAAATGC
 TTTGAACGGTGACGCGAACTTACAATGCGCTAAACCTGAAGCTACACAAGCTATCGATAACTTGACACAATTGAATACAC

FIGURA 2.8

CGCAAAAAACAGCATTGAAACAACAAGTGAATGCTGCACAAACGCGTATCAGGTGTAAGTCTGATCTGAAAAATAGTGCTACAT
TCACTTAATAATGCGATGGATCAATTAAAAACAAGCAATTGGTGATCATGACACAATTGTAGCTGGTGGTAATTACACTAA
CGCAAGTCCTGATAACAAGGTGCTTACACTGATGCATATAATGCTGCGAAGAATATCGTAAATGGTTACCTAATGTGA
TTACAAATGCAGCAGATGTTACTGCGGCAACACAACGTGTCAATAATGCTGAAACAAGTTTAAATGGTGATACAAACTTA
GCAACTGCGAAGCAACAAGCTAAAGATGCATTACGTCAAATGACACATTTATCTGATGCACAAAAACAAGTATTACTGG
TCAAATTGATAGCGCGACACAAGTAACTGGTGTACAAAGTGTGAAAGACAATGCAACAAATCTTGACAATGCAATGAATC
AACTTCGAAATAGTATTGCGAATAAAGATGAAGTAAAGCGAGTCAACCATATGTTGATGCAGATACAGATAAAACAAAAT
GCATACAATACAGCAGTTACAAGTGCTGAAAATATCATTAAATGCAACGAGTCAGCCAACACTTGTATCCATCTGCAGTAAC
ACAAGCAGCTAATCAAGTGAACACTAACAAAATGCGCTTAATGGTGGCGAAAACCTTAGCAAATAAAAAGCAAGAAACAA
CTGCTAACATCAACCGATTAAAGTCAATTAAACAATGCTCAAAAGCAAGATTTAAATACACAAGTGACAAATGCACCAAAT
ATTAGCACAGTAAATCAAGTGAAGTAAAGCTGAACAATTAGATCAAGCAATGGAACGTTTAAATCAACGGAATCCAAGA
CAAAGATCAAGTGAACAAAGTGTTAACTTTACAGATGCAGATCCAGAAAAACAACAGCATAACAATGCGGTAACTG
CTGCTGAAAATATTATTAAATCAAGCAAATGGTACAAATGCGAACCAATCACAAGTTGAAGCAGCACTTTCACTGTAAACA
ACTACTAAACAAGCGTTGAATGGTGATAGAAAAGTAACAGATGCTAAAAACAATGCAAAACCAACATTATCTACGTTAGA
TAACTTAAACAATGCACAAAAAGGTGCTGTTACTGGAAACATCAATCAAGCGCACACTGTAGCTGAAGTAACGCAAGCCA
TTCAAACCGCTCAGGAACCTGAATACAGCGATGGGTAACTTGAAAAATAGCTTGAATGATAAAGACACTACACTTGGCAGT
CAAACTTTGCAGATGCAGATCCAGAGAAGAAAAATGCATACAATGAAGCGGTTCTGTAATGCTGAAAATATTTTAAATAA
ATCTACAGCTACGAAGTGCCCTAAAGATCAAGTTGAAGCAGCTATGAATCAAGTGAATACATAAAAGCAGCGCTTAATG
GTACTCAAAACCTTGAAAAAGCGAAACAACAGCAATACAGCAATTTGACGGTTTAAAGCCATTTAAACAAATGTCACAAAA
GAGGCATTAAAAACAATTGGTACAACTCGACTACTGTTGCGAAGCACAAGGTAATGAACAAAAAGCAAAACAATGTTGA
TGCAGCAATGGACAAATTACGTCAAAGTATTGCAGATAATGCGACAACAAAAACAAAATTATACTGATGCAAGTC
CGAATAAAAAGGATGCGTACAATAATGCTGTCACACTGCACAAGGTATTATTGATCAAACTACAAACCTTCATTAGAT
CCGACTGTTATCAATCAAGCTGCTGGACAAGTAAGCAGCTCTAAAAATGCTTTAAATGGTAATGAAAACCTTAGAGGCAGC
GAAGCAACAAGCAACGCAATCTTTAGGTTCAATTAGACAACCTTAAATAATGCGCAAAAAACAAGCTGTTACTAATCAAATTA
ATGGCGCGCATACTGTTGATGAAGCAAATCAAATTAAGCAAAATGCGCAAACTTAAATACTGCGATGGGTAACTTGAAA
CAAGCGATAGCTGATAAAGATGCTACGAAAGCAACAGTTAACTTCACTGATGCAGATCAAGCAAAACAACAAGCATATAA
CACTGCAGTTACAAATGCTGAAAATATCATTTCAAAGCTAATGGTGGTAAATGCAACACAAATGAAGTTGAACAAGCAA
TCCAACAAGTAAATGCAGCAAAACAAGCATTAATGTTAATGCAACGTTCAACATGCAAAAGACGAAGCAACAGCAATTA
ATTAATAACTCTAATGATCTTAAACCAAGCACAGAAAGATGCATTAAACAACAAGTACAAAATGCAACTACTGTAGCTGG
TGTAACAATGTTAAACAACCGCGCAAGAGTTAAACAATGCGATGACACAATTAACCAAGGCATTGCAGATAAAGAAC
AAACAAAAGCTGATGGTAACTTTGTCAATGCAGATTCTGACAAGCAAAATGCATATAATCAAGCAGTAGCGAAAGCTGAA
GCATTAAATTAGTGGTACGCTGATGTTGTGCTTACACCTAGCGAAATTAAGTGCAGCGTTAAATAAAGTTACGCAAGCTAA
AAATGATTTAAATGGTAATACAAACTTAGCAACGGCGAAACAATGTTCAACATGCTATTGATCAATTGCCAACTTAA
ACCAAGCGCAACGTGATGAATACAGCAAAACAATCAGCAAGCAACACTTGTACCAACGTCAATGCTATTCAACAAGCG
GCAACAACGCTTAATGACGCGATGACACAATTGAAACAAGGTATTGCGAATAAAGCACAAATTAAGGTAGCGAGAATA
TCAGGATGCTGATACTGACAAGCAACAGCATATGATAATGCAGTAACAAAAGCAGAAGAATTGTTAAACAACAACA
ATCCAACAATGGATCCAAATACAATTCAACAAGCATTAACTAAAGTGAATGACACAATCAAGCACTTAACGGTAACTCAA
AAATTAGCTGATGCCAAACAAGATGCTAAGACAACACTTGGTACACTAGATCATTTAAATGATGCTCAAAAACAAGCGCT
AACAACCTCAAGTTGAACAAGCACCAGATATTGCAACAGTTAATAATGTTAAGCAAAATGCTCAAAATCTGAATAATGCTA
TGACTAACTTAAACAATGCATTACAAGATAAAACTGAGACATTAAATAGCATTAACTTTACTGATGCAGATCAAGCTAAG
AAAGATGATTATACTAATGCGGTTTCACATGCAGAAGGTATTTTATCTAAAGCAAATGGCAGCAATGCAAGTCAAACCTGA
AGTGGAACAAGCGATGCAACGTGTGAACGAAGCGAAACAAGCATTGAATGCTAATGACAATGTACAACGTGCAAAAGATG
CAGCGAAACAAGTAATTACAAATGCAAAATGATTTAAATCAAGCGCAAAAAGATGCATTAAACAACAAGTCGATGCTGCG
CAAACCTGTTGCAATGTAAACACGATTAAGCAAAACAGCACAAAGATTTAAATCAAGCAATGACACAATTTGAAACAAGGTAT
TGCAGATAAAGACCAAACTAAAGCAAATGGTAACTTTGTCAATGCTGATACTGATAAGCAAAATGCATATAACAATGCGG
TAGCGCATGCTGAACAAATCATTAGTGGTACACCAATGCAACGTTGGATCCACAACAAGTGGCTCAAGCGTTACAACAA
GTGAATCAAGCTAAGGGTGATTTAAACGGTAACCAACAACCTTACAAGTTGCTAAAGACAATGCAAAATACAGCCATTGATCA
GTTACCAAACTTAAATCAACCACAAAAACAGCATTAAAGACCAAGTGTGCGATGCAGAACTTGTACAGGTGTTAATG
CTATTAAGCAAAATGCTGATGCGTTAAATAATGCAATGGGTACGTTGAAACAACAATTAAGCGAATAGTCAAGTACCA
CAATCAGTTGACTTTACACAAGCGGATCAAGACAACAACAAGCTTTATAACAATGCAGCTAACCAAGCGCAACAAATCGC
AAATGGCACACCAACACCTGTATTGGCGCCTGATACAGTAACAAAAGCAGTTACAACCTATGAATCAAGCGAAAGATGCAT
TAAACGGTGATGAAAAATTAGCGCAAGCGAAACAAGATGCTTTAGCAAACTTTGATACGTTACGTGACTTAAATCAACCA
CAACGTGATGCATTACGAAACCAAAATCAATCAAGCACAAAGCTTTAGCTACAGTTGAACAACTTAAACAAAATGCACAAAA
TGTGAATACAGCAATGGGTAACTTGAAACAAGGTATTGCAATAAAGATACTGTGAAAGCAAGTGAGAACTACCACGATG
CTGATGTGTAAGCAACAGCATATACAAATGCAGTGTCTCAAGCGGAAGGTATTATCAATCAACGACAAATCCAACG
CTTAACCCAGATGACATTACTCGTGCAATTAACTCAAGTGAATGCTGCTAAAAATAGCTTAAACGGTGAAGCTAAATTAGC
CACTGAAAAGCAAAATGCTAAAGATGCCGTAAAGTGAATGACGCAATTTAAACGATGCTCAAAAACAAGCATTAAAAAGGTC
AAATCGATCAATCGCCTGAAATTGCTACAGTGAACCAAGTTAAACAACAAGCAACGAGCCTAGATCAAGCAATGGATCAA
TTATCACAAGCTATTAAATGATAAAGATCAAATATTAGCGGACGGTAATTACTTAAATGCAGATCCTGACAAACAATAATGC
GTATAAACAGGCAGTAGCAAAAGCTGAAGCATTATTGAATAAACAAGTGGTACTAATGAAGTACAAGCACAAAGTTGAAA
GCATCACTAATGAAGTGAACGAGCGAAACAAGCATTAAATGGTAATGACAATTTGGCAAATGCAAAACAACAAGCAAAA

FIGURA 2.9

CAACAATTGGCGAAGCTTAACACACTTAAATGATGCACAAAAACAATCATTTGAAAGTCAAATTACACAAGCGCCACTTGT
TACAGATGTCACCTACGATTAAATCAAAAAGCACAAACGTTAGATCATGCGATGGAATTATTAAGAAATAGTGTGCGGATA
ATCAAACGACATTAGCGTCTGAAGATTATCATGATGCAACTGCGCAAAGACAAAATGACTATAACAAAGCTGTAACAGCT
GCTAATAATATCATTAATCAAACTACATCGCCTACGATGAATCCAGATGATGTTAATGGTGCACGACACAAGTGAATAA
TACGAAAGTTGCATTAGATGGTGTATGAAAACCTTGCAGCAGCTAAACAACAAGCAAACAACAGACTTGATCAATTAGATC
ATTTGAATAATGCGCAAAAGCAACAGTTACAATCACAAATTACGCAATCATCTGATATTGCTGCAGTTAATGGTCACAAA
CAAACAGCAGAATCTTTAAATACTGCGATGGGTAACCTTAATTAATGCGATTGTCAGATCATCAAGCCGTTGAACAACGTTG
TAACCTTCATCAATGCTGATACTGATAAAACAACTGCTTATAATACAGCGGTAAATGAAGCAGCAGCAATGATTAACAAAC
AAACTGGTCAAAAATGCGAACCAAAACAGAAGTAGAACCAAGCTATTACTAAAGTTCAAACAACACTTCAAGCGTTAAATGGA
GATCATAATTTACAAGTTGCTAAAAACAAATGCGACGCAAGCAATTGATGTTTAAACAAGCTTAAATGATCCTCAAAAAAC
AGCATTAAAAGACCAAGTTACAGCTGCAACTTTAGTAAGTGCAGTTTCATCAAAATTGAACAAAATGCGAATACGCTTAAACC
AAGCAATGCATGGTTTAAAGACAGAGCATTCAAGATAACGCGAGCAACTAAAGCAAATAGCAAATATATCAACGAAGATCAA
CCAGAGCAACAAAACCTATGATCAAGCTGTTCAAGCCGCAATAATATATCAATGAACAAAACCTGCAACATTAGATAATAA
TGCGATTAAATCAAGTAGCGCAACTGTGAATACAACGAAAGCAGCATTACATGGTGTATGTGAATTAACAAAATGATAAAG
ATCATGCTAAACAAACCGTTAGCCAATTAGCACATCTAAACAAATGCACAAAAACATATGGAAGATACGTTAATTGATAGT
GAAACAACCTAGAACAGCAGTTAAGCAAGATTTGACTGAAGTACAAGCATTAGATCAACTTATGGATGCATTACAAACAAAG
TATTGCTGACAAAGATGCAACACGTCGAGCAGTGCATATGTCAATGCAGAACCGAATAAAAAACAAGCCTATGATGAAG
CAGTTCAAAATGCTGAGTCTATCATTGTCAGGATTAAATAATCCAATCATCAATAAAGGTAATGTATCAAGTGCAGCTCAA
GCAGTAAATATCATCTAAAAATGCATTAGATGGTGTGTAACGATTAGCTCAAGATAAGCAAACACTGCTGGAAATTTCTCTAA
TCATTTAGATCAATTAACACCAGCTCAACAACAAGCGCTAGAAAAATCAAATTAATAATGCAACAACTTGTGATAAAGTGG
CTGAAATCATTCGACAAGCGCAAGCATTAAATGAAGCGATGAAAGCATTAAAGAAAGTATTAAGGATCAACCACAAAACCT
GAAGCAAGTAGTAAATTTATTAACGAGGATCAAGCGCAAAAAGATGCATATACGCAAGCAGTACAACACGCGAAAGATTT
GATTAACAAAACAACTGATCCTACATTAGCTAAATCAATCATTTGATCAAGCGACACAGGCAGTACTGATGCTAAAAACA
ATTTACATGGTGTATCAAAAACTAGCTCAAGATAAGCAACGTCGAACAGAAACGTTAAATAACTTGTCTAACTTGAATACA
CCACAACGTCAGCACTTGAAAAATCAAATCAATAATGCAGCAACTCGTGGTGAAGTAGCACAAAAATTAACCTGAAGCACA
AGCACTTAACCAAGCAATGGAAGCTTTACGTAATAGCATTCAAGATCAACAACAACAGAATCTGGTAGCAAGTTTATTA
ATGAAGATAAACCCGCAAAAAGATGCTTACCAAGCAGCAGTTCAAATGCAAAAAGATTTAATTAACCAACAGGTAATCCA
ACGCTTGATAAAGCACAAAGTTGAACAATTGACACATGCTTTTAAACAAGCTAAAGATAACCTACACGCTGATCAAAAACT
TGCAGACGATAAAACAACATGCGGTTACTGATTTAAATCAATTAATGGTTTGAATAATCCGCAACGCTCAAGCACTTGA
GCCAAATAAACCAACGCAAGCAACTCGTGGCGAAGTAGCGCAAAAATTAGCTGAAGCAAAAGCGCTTGATCAAGCAATGCAA
GCATTACGAAATAGTATTCAAGATCAACAACAACGGAAGCGGGTAGCAAGTTTATCAATGAAGATAAACCGCAAAAAGA
TGCTTACCAAGCAGCAGTTCAAATGCAAAAGATTTAATTAACCAACAGGTAATCCAACACTCGACAAATCACAAGTAG
AACAAATTAACACAAGCAGTAACAACCTGCAAAAGATTAATCTACATGGTGTATCAAAAACTTGCTCGTGTATCAACAACAAGCA
GTAACAACCTGTAATGCAATGTCACAACTTAAATCATGCACAACAACAACATTAACCTGATGCTATAAATGCAGCGCCTAC
AAGAACAGAGGTTGCACAACATGTTCAAACCTGCTACTGAACTTGATCACGCGATGGAACATTGAAAAATAAAGTTGATC
AAGTGAATACAGATAAGGCTCAACCAAAATTACCTGAAGCGTCAACTGATAAAAAAGAAGCAGTAGATCAAGCGTTACAA
GCTGCACAAAAGCATTACAGATCCAATTAATGGTTCAAATGCGAATAAAGACGCTGTAGAACAAGCATTAACTAAGCTTCA
AGAAAAAGTGAATGAGTTAAATGGTAATGAGAGAGTCGCTGAAGCTAAAAACAAGCGAAACAACTATTGACCAATTA
CACATTTAAATGCTGATCAAAATTGCAACTGCTAAACAAAATATTGATCAAGCGACGAACTTCAACCAATCGCTGAATTA
GTAGATCAAGCAACGCAATTGAACCAATCAATGGATCAATTACAACAAGCAGTTAATGAACATGCTAACGTTGAGCAAAAC
TATAGATTACACACAAGCAGATTACAGATAAGCAAAAGGCTTATAAACAAGCGATTGCTGTATGCTGAAAATGTATTGAAAC
AAAATGCGAATAAGCAACAAGTGGATCAAGCACTTCAAATATTTTAAATGCAAAACAAGCATTAAATGGTGTATGAACGT
GTAGCACTTGCTAAAAACAAATGGTAAACATGACATCGACCAATTGAATGCATTAAACAATGCTTCAACAAGATGGATTAA
AGGTCGCATCGATCAATCAAACGATTTAAATCAAATCCAACAATTTGTAGATGAGGCTAAGGCACTTAATCGTGCAATGG
ATCAATTTGCACAAGAAATCACTGGCAATGAAGGACGCACGAAAGGTAGCACGAACCTATGTCAATGCAGATACACAAGTC
AAACAAGTATATGATGAAGCGGTTGATAAAGCGAAACAAGCACTTGATAAATCGTCTGGGCAAACTTAACCTGCAGAACA
AGTTATCAAATTAATGATGCAGTCACTGCAGCTAAGAAAAGCATTAAATGGTGAAGAAAGACTTAATAATCGTAAAGCTG
AAGCATTACAAAGATTGGATCAATTAACACATCTAAACAATGCTCAAAGACAATTAGCAATCCAACAATTAATAATGCT
GAAACGCTAAATAAAGCATCTCGAGCAATTAATAGAGCAACTAAATTAGATAATGCAATGGGTGCAGTACAACAATATAT
TGACGAACAGCACCTTGGTGTATCAGCAGCACAATTAATCAATGCAGATGACAATTTGAAAGCAAATTAATGATAATG
CAATTGCGAATGCAGCACATGAGTTAGATAAAGTGCAAGGTAATGCAATTGCAAAAGCTGAAGCAGAGCAATTGAAACAA
AATATTATCGATGCTCAAAATGCATTAAATGGAGACCAAAACCTTGCAATGCCAAAGATAAAGCAAATGCGTTTGTAA
TTCGTTAAATGGATTAAATCAACAGCAACAAGATCTTGACATAAAGCAATTAACAATGCCGATACTGTATCAGATGTAA
CAGATATTGTTAATAATCAAATTGACTTAAATGATGCAATGGAAACATTGAAACATTTAGTTGACAATGAAATTCCAAAT
GCAGAGCAAACTGTCAATTACCAAAACGCTGACGATAATGCTAAACAACTTCGATGATGCCAAACGCTAGCAAAATAC
ATTCGCTAAATAGTGATAACACAAATGTGAATGATATCAATGGCGCAATCCAAGCAGTCAATGATGCAATCCATAATCTTA
ATGGTGATCAACGACTACAAGATGCTAAAGACAAGGCAATTAATCAATTAATCAAGCTTTAGCTAATAAGCTAAAGAA
ATCGAAGCTTCAAATGCGACGGATCAAGACAAGCTTATTGCGAAAAATAAAGCAGAAGAATTGGCAACAGCATCATCAA
CAACATTAATAAAGCAACAAGTAATCAGGCTGTATCTCAAGTTCAAACAGCAGGCAACCACGCGATTGAACAAGTGCATG
CTAATGAAATACCAAAAGCAAAATTTGATGCCAATAAAGACGTTGATAAGCAAGTTCAAGCATTAAATTGACGAAATTTGAT
CGAATCCAAATCTAACAGATAAGGAAAAACAAGCACTTAAAGATCGTATTAAATCAATACTTCAACAAGGTCTAACGA

FIGURA 2.10

CATTAACAATGCGCTGACTAAAGAAGAAATTGAACAAGCTAAAGCACAACCTTGCGCAAGCATTACAAGACATCAAAGATT
 TAGTGAAAGCTAAAGAAGATGCGAAACAAGATGTTGATAACAAGTTCAAGCATTAAATTGACGAAATCGATCAAAATCCA
 AATCTAACAGATAAGGAAAAACAAGCACTTAAAGATCGTATTAAATCAAATACTTCAACAAGGTCAACGCGCATTAAACAA
 TGCGATGACTAAAGAAGAAATTGAACAAGCCAAAGCACAACCTTGACAAGCATTAAAAGAAATTAAAGATTTAGTGAAAG
 CTAAAGAAAATGCGAAACAAGATGTTGATAACAAGTTCAAGCATTAAATTGACGAAATCGATCAAAATCCAAATCTAACA
 GATAAGGAAAAACAAGCGCTTAAAGATCGAATCAATCAAATACTGCAACAAGGTCAACGACATTAAACAATGCGATGAC
 TAAAGAAGAAATTGAACAAGCCAAAGCACAACCTTGACAAGCATTACAAGACATCAAAGATTTAGTGAAAGCTAAAGAAG
 ATGCGAAAAATGCAATAAAAGCCTTAGCTAATGCGAAGCGTGATCAAATCAATTCAAATCCAGATTTAAACACCTGAGCAA
 AAAGCAAAAGCGCTCAAAGAAATTGACGAAGCTGAAAAACGAGCACTACAAAACGTTGAGAATGCTCAAACCTATAGATCA
 ATTAATCGAGGATTAAACTTAGGTTAGATGACATTAGAAAATACACATGTATGGGAGGTTGATGAACAACCTGCTGTAA
 ATGAAATTTTTGAAGCAACACCTGAGCAAAATCCTAGTTAATGGTGAACCTCATTGTACATCGTGATGACATCATTACAGAA
 CAAGATATTCTTGACACATAAACTTAATTGATCAGCTTTGAGCAGAAGTTATTGATACACCATCAACTGCAACGATTTC
 TGATAGCTTAACAGCAAAAGTTGAAGTTACATTGCTTGATGGATCAAAAGTGATTGTTAATGTTCTGTAAAAGTTGTAG
 AAAAGAATTGTCAGTAGTCAAACAACAGGCAATTGAATCAATCGAAAATGCGGCACAACAAAAGATTGATGAAATCAAT
 AATAGTGTGACATTAACACTGGAACAAAAAGAAGCTGCAATTGCGAGAAGTTAATAAGCTTAAACAACAAGCAATTGATCA
 TGTTAACAATGCACCTGATGTTCAATTCAGTTGAAGAAATTCACAACAAGAACAAGCGTATATTGAACAAATTAATCCAG
 AACAAATTTACGATTGAACAAGCAAAATCAAATGCAATTAATCGATTGAAGATGCAATTCACATATGATTGATGAAATC
 AAAGCTCGTACTGATCTAACAGATAAAGAGAAGCAAGAAGCTATTGCTAAGTTAAATCAATTAAAAGAACAAGCAATTC
 AGCGATTCAACGTGCGCAAGCATCAGTGAAATAACTGAGCAATTGGAACAATTTAAAGCTCAAATGAAAGCAGCTAATC
 CAACAGCAAAAGAACTAGCTAAACGCAAGCAAGAAGCTATTAGTAGAATTAAGACTTTTCAAATGAAAAATAAATAGT
 ATTCGAAATAGTGAAATTGGCACAGCTGATGAAAAACAAGCAGCAATGAATCAAATTAACGAAATTTGCTTGAACAAT
 TAGAGATATTAATAATGCGCATACATTACAGCAAGTTGAGGCTGCATTGAACAATGGTATTGCTCGAATTTGAGCAGTAC
 AAATTGTAATATCTGATCGTGCTAAACAATCGTCAAGTACTGGAATGAATCTAATAGCCATTTAACAATTTGGTTATGGA
 ACTGCAATCATCCATTTAACAGTTGCACTATTGGACATAAAAAGAACTTGATGAAGATGATGACATTGATCCACTTCA
 TATGCGTCACTTTAGTAATAATTTGCGTAATGTTATTAACGCTATTGGTGTGGTGGGTATCTCTGGCTTACTAGCTA
 GTTCTGTTCTTCAATTGCCAAACGTCGTGCTAAAGAAGATGAAGAGGAAGAATTAGAAATAAGAGATAATAATAAGAT
 TCAATAAAAGAGACTTTAGACGATACAAAACATTTACCCTTTTATTGCGAAACGTCGAGAAAAAGAAGATGAAGAAGA
 TGTTACTGTTGAAGAAAAAGATTGCTAAATAATGGCGAGTCACTCGATAAAGTTAAACATACGCCGTTCTTCTTACCAA
 AACGTCGTGTAAGAAGATGAAGAAGATGTGGAAGTTACAAATGAAAAACACAGATGAAAAAGTGTGAAAGATAACGAA
 CATTCACTCTTATTGCAAAACGACGCAAGATAAAGAGGAAGATGTTGAAACAACAACCTAGTATTGAATCTAAAGA
 TGAGGACGTTCTTTATTATTGGCTAAAAAGAAAAATCAAAAAGATAACCAATCCAAAGACAAAAAGTCAGCATCAAAAA
 ATACTTCTAAAAAGGTAGCAGCTAAAAAGAAGAAAAAGAAATCTAAGAAAAATAAAAA

SEQ ID NO:47 sequência de polinucleotídeos

TTGAATAATCGTGATAAATTAACAAAATTTAGTATTGCAAAATACGCAATTGGAACATTTTCTACTGTGATTGCAACACT
 TGTGTTTCATGGGTATCAATACAAACCATGCAAGTGCCGACGAGTTGAATCAAAATCAAAGTTAATTAACAATTAATC
 AACAGATGATGATGATTGCAATACGCATAGTCAAGAAATCGAAAATAACAAACAAAATTTCTAGTGGGCAGACTGAATCA
 TTACGTTCACTCACTAGTCAAAATCAAGCAATGCACGACTGTGCGATCAATTCAAAGACACTAATGAAACATCGCAACA
 ATTACTCAAAATGTTTCGGATGATAGTATCAATCAATCGCATAGTGAAGCAATATGAATAACGAACCATTGAAAGTTG
 ATAATAGTACTATGCAAGCACATAGTAAATAGTAAGCGATAGCGATGGGAATGCTTCTGAAAATAAACATCATAAACTA
 ACAGAAAAATGTACTTGCAAGAAAGCCGAGCAAGTAAAAATGACAAAGAGAAAGAGAAATCTACAAGAGAAAGATAAATCGCA
 GCAAGTACATCCACCATTAGATAAAAAATGCATTACAAGCTTTTTTTGACGATCAATGACTTACTAGGTAATAATCA
 AATATTCCTTCAGAACAGCTTTGTTTCGGCATATCAACAATTAGAGAAAGCATTAGAAGTTGACGCTACGTTACCACAACA
 ATCTACTACAGAAAAACGTGGTAGAAGAAGTACGAGAAGTGTGTTGAGAATCGTTCACTCAAGAAGCGATTACTTAGATG
 CTAGAAGTGAATATTATGTTTCAAAGACGATGATGATTCTGGTTTCCCTCCTGGTACTTTCTTCCATGCTTCAAATAGA
 AGATGGCCTTATAATTTACCAAGATCTAGGAACATCTTACGTGCTTCTGATGTACAAGGTAATGCTTATATCACTACAAA
 ACGACTTAAAGATGGATATCAATGGGATATTTTATTTAATAGTAATCATAAAGGCATGAATATATGTACTATTGGTTTG
 GACTTCCAAGTGATCAAAACCAACTGGTCCAGTAACCTCAATTTGGAGATCAGCAGGTGCTATTAATCTAGCGTAGCGAATGA
 GGCGTTGGATTTGGATCAGGTGCACCACTACCTCAATTTGGAGATCAGCAGGTGCTATTAATCTAGCGTAGCGAATGA
 TTTTAAACATGGCTCCGCTACAAATTTATGCAATTTATGATGGTGTAAATTTTCTGACTTTGCTAGAGGGGGAGAAT
 TATACTTCGACAGAGAAGGCGCTACACAACTAATAAATATTATGGCGATGAAAACTTCGATGCTAAATAGTGAGAAA
 CCAGATCAAAATAAGAGGATTAGATACAATATATAGTTTTAAAGGTAGTGGTGATGTAAGTTATCGTATTTTAAAC
 TCAAGGAGCTCCAACCTGCAAGATTGTATTATGCTGCTGGCGCGCTTCTGGTGAATATAACAAGCAACGAACTATAACC
 AACTCTATGTGCAACCTTATAAGAAATATCGAAATCGAGTACAGTCAAATGTCCAAGTTAAAAATCGTACACTTCATTTA
 AAAAGAACAATCAGACAATTCGATCCTACATTACAGAGAACTACTGATGTTTCTATTTTGGATAGTGACGGTTCCGGAAG
 TATTGATTGCGTATACGACCCATTAAGTTATGTAAGAATGTGACTGGTACAGTCCCTAGGTATTTATCCATCTTATCTTC
 CTTATAATCAGGAAAGATGGCAGGGAGCTAATGCAATGAATGCCATCAAAATGGAAGAACTTTTTTACAGAAAAATCTT
 CAAAATGCAACGCTTCAGGCCGTCCAATTCATTTCTTGTAGGTTTTGATGTTGAAGATAGCCATCATAACCCCTGAAAC
 TCTTTTACCAGTAAATTTATATGTAAACCTGAGTTAAACATACAATTGAGTTATATCACGATAATGAAAAACAAGATA
 GAAAGGAATTTTCAGTATCGAAA

FIGURA 2.11

SEQ ID NO:48 sequência de polinucleotídeos

ATGAGTGGAAACGCTTCATAACACTGTAGGATCAGGAATATTACCTTATCAACAAGAGATACGTATCAAACCTTACTAGTAA
 TGAACCAATTAAGATAGTGAATGGTCTATTACAGGATATCCTAACACGCTTACATTACAAAACGCTGTGGGTAGAACA
 ATAATGCTACTGAAAAAACTTAGCTCTTGTGGTCATATTGATCCAGGAAATTATTTTCATCACTGTTAAGTTTGGTGAT
 AAAGTAGAACAATTTGAAATTAGATCAAAACCAACTCCACCAAGAATCATTACAACGCTAATGAATTACGTGGAAATCC
 TAACCATAAGCCTGAAATAAGAGTAACAGATATACCAATGATACTACTGCTAAAATCAAACCTTGTGATGGGCGGAACCG
 ATGGCGATCATGATCCAGAAATAAATCCATATACTGTCCCTGAAAACCTACACAGTAGTTGCAGAAGCATACCATGATAAT
 GATCCAAGTAAAAATGGGGTCTTAACATTCCGTTTCATCAGACTACCTTAAAGATCTACCATTAAAGCGGTGAATTAAAGGC
 AATTGTTTATTACAATCAATATGTACAATCAAACCTTTAGTAAAAGCGTTCGGTTTGTAGCGATACAACACCACCTACAA
 TTAATGAACCGGCAGGACTAGTTTATAAGTATTACAGGGGAGATCATGTAGAAATTACTCTTCCAGTCACTGATAATACT
 GGCGGTTTCAAGTTTAAAGAGATGTAAACGTCATTTTACCTCAAGGTTGGACAAAAACCTTTACAATCAATCCTAATAATA
 TACTGAGGGTACGCTTAAGTTAATTGGTAATATACCTAGTAATGAAGCATATAATACGACATATCATTTCAATATTACTG
 CAACCGATAAATCTGGAAATACAACAAATCCAGCTAAAACCTTTATTTTAAATGTTGGTAAGTTGGCTGATGATTTAAAT
 CCAGTCGGATTATCTAGAGATCAACTACAATTAGTGACAGACCTTCTTCAATTATCTAATTCCGAACGAGAAGAGGTAAA
 AAGAAAAATAAGTGAAGCAAATGCTAATATAAGATCATATTTATTACAAAATAACCCAATACTCGCTGGAGTAAACGGCG
 ATGTTACATTTTATTATAGAGATGGTTCTGTAGATGTTATTGATGCTGAAAATGTAATCACATATGAGCCCGAAAGAAAA
 TCCATTTTCAGTGAAAATGGTAATACAAATAAAAAAGAAGCAGTAATCACTATTGCTAGAGGACAAAACCTATACCATTGG
 TCCAAACCTTAAGAAAATATTTCTCATTAAGTAATGGTTTCGGATTTACCTAATAGAGATTTACCTCTATATCAGCTATTG
 GATCTTTACCTTCATCGAGTGAAATTAGTTCGACTCAATGTTGGAAATTATACTATAGAGTTAATGCTAAAAATGCTTAT
 CATAAGACTCAACAAGAACTTAATTTAAACCTTAAATAGTAGAGGTTAATGCACCTACTGGTAATAATCGTGTATATAG
 AGTTAGTACTTATAATTTAACTAATGATGAAATCAATAAAATCAAACAAGCATTAAAGCAGCTAATCTGGACTTAATT
 TAAACGATAACGATATCACTGTTTTCGAATACTTTGACCATAGAAAATGTTAGTAGTTGACAGTAACATATACGTAAGGGC
 GATTTGATAAAAAGAGTTTTTCATCAAATCTCAATAATATGAATTTCTTACGTTGGGTTAATATAAGGGATGATTATACCAT
 TTCGTGGACTTCTAGTAAGATTCAAGGTAGAAAATACAGATGGTGGATTAGAATGGTCACCAGATCATAAATCACTTATTT
 ATAAATATGATGCAACATTAGGTAGACAAATAAATACTAATGACGTGTTAACTTTACTTCAAGCAACAGCTAAAACTCA
 AATTTACGTTCAAATATCAATAGTAATGAAAACAGTTAGCAGAACGAGGGTCTAATGGGTATTCTAAATCTATAATTAG
 AGATGATGGCGAGAAATCTTATTTACTTAACTCAAATCCTATTCAAGTATTAGACTTAGTAGAACAGATAATGGTTACG
 GTGGACGTCAAGTCAGTCATTCTAACGTTTATATATAATGAAAAAAATCTTCTATCGTAAATGGTCAAGTTCAGAAAGCT
 AATGGGGCATCCGCTTTTAAATATTGATAAAGTTGTTAAAGCTAATGCGGCAATAATGGTATTATGGGTGTTATCTATAA
 GGCACAATTATACTTAGCACCATACAGTCCAAAAGGTTACATTGAAAAATTAGGCCAAAATTTAAGCAATACCAATAACG
 TGATTAATGTTTATTTTGTGCTTCTGTATAAGTAATCCTAGTATAACTGTAGGTAATTACGACCATCATACGGTATAT
 TCTGTTGAAACATTTAAAAATACTATCAATGTAAATGATAATTATGGATTAAATACAGTAGCTTCTACAAGTGATAGTGC
 AATTACTATGACCAGAAACAACAACGAGTTAGTAGGTGAGGCTCCTAATGTTACTAATAGCATAAATAAAATTTGTAAG
 TTAAAGCCACAGATAAAAGTGGAAATGAAAGTATTGTTTCTTTACAGTAAATATAAAACCATTAAACGAGAAATATAGA
 ATAACAACCTTCATCAAGTAATCAAACACCAGTGAGAATTAGTAATATTCAAACAATGCTAACCTTTCAATTGAAGATCA
 AAATAGAGTAAATCTTCACTCAGCATGACTAAAATTTTAGGTACAAGAAATTTATGTCATGAGTCAAATAATGACGTTT
 GTAGTCAAGTTGTAAGTAAAGTAAATAGAAGTGGGAACAATGCTACAGTTAATGTTACAACCTACATTTTCTGATGGTACA
 ACTAATACAATAACCGTTCCAGTTAAACATGTGTTATTAGAAGTTGTACCTACTACTAGAACAACAGTAAGAGGACAACA
 ATTTCCAACCGGCAAAGGAACCTCCCAATGATTTCTTTAGTTTAAAGACGGGAGGTCCAGTTGATGCGAGAATGTTT
 GGGTTAATAATCAGGGACCGGATATAAATAGTAATCAAATTTGGTAGAGATTAAACATTACAGCTGAAATATTCTTTGAT
 GGTGAAACAACACCAATTAGAAAAGATACTACTTACAAACTTAGTCAATCTATTCCAAAGCAAATATATGAAACAACAT
 CAATGGTTCGATTTAATTCAATCAGGTGATGCATATCCAGGAAATTTTGTTCAGCAGTAAATCAATATTGGCCAGAACATA
 TGGACTTCAGATGGGCCCCAAGGATCAGGCACACCAAGTTCTCGTAATGCAGGTTCAATTACTAAAACAGTTACGGTAGTT
 TATCAAAACCGGCCAAACTGAAAACGTTAATGTACTATTCAAAGTCAAACCAAATAAACCTGTTATTGATAGTAATAGTGT
 GATTTCAAAGGACAATTAAATGGTCAACAAATTTTAGTTGCAATGTTCCACAAAATGCACAAGTCACTCTATATCAAT
 CAAATGGAACTGTTATTCTAATACAAATACAACCTATAGATTCTAATGGTATAGCTACTGTAACAATTCAGGCACTCTA
 CCAACCGGAAATATTACTGCTAAAACCTCAATGACAAATAATGTAACGTACACTAAAACAAAATAGTAGTGGAATTGCTTC
 AAATACAACCTGAAGATATAAGTGTTTTTTCAGAAAACAGTGATCAAGTAAATGTTACCGCTGGCATGCAAGCTAAAAATG
 ATGGTATTAAAAATAATTAAAGGTACAACTATAATTTTAATGACTTCAATAGTTTTCATAAGTAATATACCAGCCCATTCT
 ACTCTTACATAGGAACGAGGAGCCTAATAGTTGGAAAAACAACATCGGTACTACAACAAAACCTTTACAGTTACTCTACC
 TAATCATCAAGGTACGAGAATGTAGATATTTCAATAACAATCTATCCAACAGTTACAGCTAAGAATCCAGTAAGAGATC
 AAAAAAGGACGAAACTTAACCAATGGTACTGACGTTTATAATTATATTATTTTGAATAATAAACCGTCTTGGAGGAACA
 GCTTCTTGGAAAGACAATCGTCAACCTGATAAAAAATAGCCGGTGTACAAAATTTAATTGCACTTGTTAATTATCCTGG
 CATATCTACACCATTAGAAGTTCTGTAAAGTGTGGGTATATAATTTTGATTTCACTCAACCTATCTACAAAATTCAG
 TAGGAGATACATTCCCTAAAGGAACATGGGCAGGCTATTACAAACATCTTGAAAATGGAGAGGGATTACCAATAGATGGT
 TGGAAATTTTATTGGAACAGCAAAGTACAGGAACCTAGTGATCAATGGCAATCATTAGCATATACTAGAACCTCCTTT
 TGTTAAACCTGGTACTTATGATGTCGTTAATCCTAGCAACTGGGGTGTGTTGGCAACATCACAAATCAGCTAAATTTATAG
 TTACAAATGCTAAACCTAATCAACCAACCATAACTCAGTCTAAAACCTGGTGTATTAACAGTAACACCTGGTGTGCGT
 AATATACTAATAAGTGGGACAAATGATTATATCCAAGCATCTGCAGATAAGATTGTTATTAATAAAAAATGGAATAAAT
 AACTACATTTGTTAAAAATAATGATGGTTCGTTGGACTGTTGAACTGGGTACCTGACATAAATGGTATCGGACCAACAA

FIGURA 2.12

ATAACGGAACCTGCTATATCTTTAAGTCGATTAGCAGTTAGACCTGGGGATTCAATAGAAAGCAATAGCGACTGAAGGTTCC
 GGAGAACTATAAGTACTTCAGCAACTAGTGAAATTTATATTTGTCAAAAGCTCCACAACCTGAACAAGTAGCAACTCATAC
 TTATGATAATGGAACATTTCGATATATTACCTGACAATTCACGTAATTTCTTTAAATCCAACCTGAACGTTGTCGAAATTAATT
 ACACCTGAAAAATTTAAATGGCAATGAAACACAAAAATCATTCACTATTACTAAAAATAACAACGGCAATGGACGATAAAAT
 AATAAACCAAATTTATGTCGAGTTCAATCAGGATAATGGTAAAGTTGTATTTTCGGCCAATACAATTTAAACCTAATTTCTCA
 AATTACAATAACTCCTAAAGCAGGTGAGGGTAACACTGAAAACACAAATCCTACTGTAATTCAGCACCTGCGCAACATA
 CTTTAAACAATCAATGAAATTTGTTAAAGAACAGGGTCAAAATGTGACTAATGATGATATTAATAATGCGGTTCAAGTGCCA
 AATAAAAAATAGAGTTGCGATTAAACAAGGAAACGCTCTTCCAACAAATTTAGCTGGTGGTAGTACATCACATATTCCAGT
 AGTTATTTTATTACAGTGATGGAAGTTCTGAAGAAGCTACTGAGACTGTTAGAACTAAAGTTAATAAAAAACCGAATTAATCA
 ATGCTCGTCGTCGACTAGATGAAGAAATTAGTAAAGAGAACAAAACACCATTCAAGTATCAGAACTTTGATCAAGCTATG
 AATCGTGCTCAATCACAAATTAATACAGCTAAAGTGTGCTGACCAAGTTATAGGCACAGAAATTTGCAACACCTCAACA
 AGTAAATTCAGCTTTATCTAAAGTTCAAGCGGCACAAAATAAAATAAATGAAGCTAAAGCATTATTACAAAAACAGGCTG
 ATAATAGTCAACTTGTGAGAGCAAAAGAACAATTAACAACAATCGATTCAACCAGCCGCTTCAACTGATGGTATGACTCAA
 GATAGCACAAGGAACCTACAACAATAAACGCCAAGCAGCTGAACAAGCAATACAACATGCAAAATAGCGTTATAAAATAATGG
 AGATGCAACATCCCAACAAATTAATGATGCTAAAAACACAGTTGAACAGGCACAGAGAGATTATGTTGAAGCTAAAAGCA
 ACTTACGTGCTGATAAGTCACAGTTACAAAGCGCTTATGATACGTTAAATAGAGATGTTTTAACAAATGATAAAAAGCCA
 GCATCTGTAAGACGCTATAATGAAGCCATTTCAAAATATTAGAAAAGAATTAGATACAGCTAAAGCGGATGCAAGTAGTAC
 TTTGCGAAACCAATCCTTCCGTTGAACAAGTTAGAGACGCTTTAAATAAAATAAATACTGTTCAACCTAAAGTGAATC
 AAGCAATTCGCTTTACTTCAACCAAAAGAAAATAATTCAAGACTTGTACAAGCTAAAAACCGTTTACAAGACGCTGTAAAT
 GACATACCTCAAAACACAAGGTATGACACAACAACAATTAATAATTATAATGACAAACAACGTTGAAGCTGAAAGAGCACT
 TACATCTGCACAAAGAGTGATTGATAATGGGGATGCTACAACCTCAAGAAATTACTTCTGAAAAATCTAAAGTAGAGCAAG
 CAATGCAAGCTTTAACTAATGCTAAAAGTAATCTGAGAGCTGATAAGAATGAGTTACAGACTGCATATAACAAATTAATT
 GAGAACGTATCTACCAATGGTAAAAAACCGCGAGTATACGTCAATACGAAACAGCCAAAGCCAGAATACAAATCAAAT
 TAATGATGCTAAAAATGAAGCGGAGCGAATTTTAGGTAATGATAATCCACAAGTATCACAAGTAATCAAGCATTGAACA
 AAATCAAAGCTATTCAACCAAAATTAACAGAAGCTATCAACATGCTTCAAAACAAAGAAAATAATACAGAATTAGTCAAT
 GCTAAAAACAGACTTGAAATGCAGTAAATGATACAGATCCAACACACGGTATGACTCAAGAAAACAAATTAATAATTACAA
 CGCTAAAAAGCGAGAAGCTCAAAATGAAATACAAAAAGCGAACATGATTATTAATAATGGAGATGCTACTGCTCAAGATA
 TTTCTTCTGAAAAATCTAAAGTAGAGCAAGTATTACAAGCATTACAAAATGCTAAGAATGACTTAAGAGCTGATAAAAGA
 GAATTACAGACTGCATACAATAAATCTTATACAAAATGTTAATAACCAATGGTAAATAAACCCTAGTATTCAAAACTATA
 GTCTGCAAGACGAAATATCGAAAACCAATATAATACCGCTAAAAATGAAGCACATAATGTTCTTGAAAAATACAAACCTTA
 CTGTAAATGCAGTAGAAGATGCTTTACGTAAGATAAATGCAATTAACCAGAGGTTACAAAAGCTATTAATATACTTCAA
 GATAAAGAAGATAATAGCGAAGCTTGTAGAGCAAAAGAAAATTAGATCAAGCGATTAAATAGTCAACCATCACTAAATGG
 TATGACTCAAGAATCTATTAATAATTACACAACAAACGTTAGAGAAGCACAAAATATAGCAAGTTCTGCTGACACTATTA
 TTAATAATGGGGATGCATCTATTGAACAAATAACAGAAAATAAAATTCGAGTTGAAGAGGCAACTAATGCACTTAACGAA
 GCAAAACAAACATTTAACGGCAGATACAACCTCTTTAAAAACTGAAGTACGGAAATTAAGTAGGAGAGGCGACACAAACAA
 CAAAAGCCTAGCAGTGTTAGTGCTTATAACAATACTATTCAATTCGCTACAATCTGAAATTAACAGACTGAAAATAGAG
 CAAATACCTATCATCAATAAGCCTATTGCTTCTGTTGAAGAAGTAAATATGCATTGCATGAAGTAAACCAATTGAACCAA
 CGCTTAACAGATACAATTAACCTTATTACAACCTTTAGCGAATAAAGAAGCTTAAAGAAGCTCGTAATCGACTTGAAG
 TAAAAATTAATGAAACCGTTCAAACAGACGGTATGACTCAACAATCTGTTGAGAATTATAAGCAAGCTAAAATAAAGCTC
 AAAATGAATCTAGTATTGCACAACTCTTATTAAATAATGGTGTATGCATCTGATCAAGAAAGTTTCTACAGAAATAGAAAA
 TTAAATCAAAGCTGTCTGAATTAACAAATCAATCAATCACTTAACAGTTAATAAAGAACCTTTAGAACTGCCAAAAA
 TCAGTTACAAGCAAAATATTGACCAAAACCTAGCACTGATGGTATGACGCAACAATCTGTACAAAGCTATGAACGTAAAC
 TACAAGAAGCCAAAGATAAAATAAATCAATTAATAATGTCTTAGCTAACCAATCCAGATGTTAATGCTATCAGAACAAAC
 AAAGTTGAGACGGAACAAATCAATTAATGAATTAACACAGGGCAACCAAGGCTTACTGTTGATAAACAACCAATTGATTAA
 TGCAAAAACTGCTTTGCAACAAAGTCTAGATAATCAACCAAGTACTACTGGTATGACTGAAGCAACAATTCAAAATTATA
 ACGTAAACGTCAAAAGCAGAGCAAGTTATACAAAATGCAATAAAATTAATGAAAACGCTCAACCTAGTGTACAACAA
 GTGTCTGATGAGAAATCTAAGGTAGAGCAAGCACTCACTGATTAACCAACGCAAAATCAGCGCTTAGAGCTGATAAACA
 AGAATTACAGCAAGCATATAATCAGTTGATTCAACCAACGGATTAAATAATAAAGAACCAAGCTTCTATCACTGCGGTACA
 ATCAAAGATATCAACAATTTAGTAACGAATTGAACAGCACTAAAACAAATACAGATCGCATTTTAAAGAGCAAAATCCA
 AGTGTAGCTGATGTCAACAATGCACTAAATAAAGTAAGAGAAGTACAACAAAAATTAACGAAGCCAGAGCACTTTTACA
 AAATAAAGAAGATAATAGTCACTAGTTTCGAGCCAAAGAACAACTTCAACAGGCAGTTGACCAAGTCCCTTCAACAGAAG
 GTATGACGCAACAACTAAAGATGATTACAATTAACAAACAAGCTGCTCAACAAGAAATATCAAAGCACAACAAGTT
 ATCGATAATGGCGATGCGACTACACAACAAATTTCTAACGCCAAAACAAATGTTGAACGCGCTTTAGAAGCATTAAATAA
 TGCAAAAACTGGTTTAAAGAGCAGATAAAGAGGAACCTTCAAAATGCATATAATCAATTAACCTCAAAATATTGATACGAGCG
 GTAAAACGCGCTGCAAGTATCAGGAAATACAATGAAGCTAAGTCACGTATTCAAACTCAAAATGATTCAAGCTAAAAATGAA
 GCAACAGTATTTTAAACAAATGACAATCCTCAAGTATCACAAGTGACTGCTGCGTTAAACAAAATAAAGCTGTTCAACC
 TGAATTAGATAAATAGCGATAGCAATGCTTAAAAATAAAGAGAATAAATGCAATTGTTTCAAGCGAAACAACAACTTCAAC
 AAATTGTTAATGAAGTAGATCCAACACAAGGCATGACAACAGATGCTGCTAATAAATACTAATAAATCAAAACAAATAG
 GAAGATGAAATACAAAAAGCTCAACAAATCATTAACAATGGCGATGCCACTGAGCAACAATACTTCAACGAACAAATAG
 AGTAAATCAAGCGATTAAATGCAATAAACAAGCCAAAACGATTTACGTGCTGATAAGTCTCAATTGGAAAAATGCTTATA
 ACCAATTAATACAAATGTTGATACAAATGGTAAAAACCTGCTAGTATTCAACAATACCAAGCTGCTCGACAAGCTATT

FIGURA 2.13

GAGACGCAATACAATAACGCTAAATCAGAAGCACATCAAATTCCTGAAAATAGTAACCCCTTCAGTTAATGAAGTAGCACA
 AGCATTACAAAAAGTTGAAGCTGTACAACTTAAAGTTAATGACGCGATTTCATATACTTCAAAATAAAGAGAATAATAGTG
 CACTTGTGCAGCTAAAAATCACTTCAGCAATCAGTTAATGATCAACCATTAAACAACAGGTATGACTCAAGATTCCTATT
 AATAACTATGAAGCTAAGAGAAATGAGGCTCAAAGTGCTATCAGAAATGCAGAAGCTGTTCATCAACAATGGCGATGCAAC
 TGCAAAACAAATTTTCAGACGAGAAATCTAAAGTTGAACAAGCACTAGCACATTTGAATGATGCTAAACAGCAATTAACCTG
 CAGATACTACTGAATTACAAACAGCAGTTCAACAATTAACAGAGAGGCGATACAAATAATAAAAAGCCAAAGAAGTATC
 AATGCATATAATAAAGCAATTCATCATTAGAACACAAATTACTTCTGCTAAAGATAATGCCAACGCTGTGATACAAAA
 ACCTATACGTACTGTTCAAGAGGTAAATAATGTCATTAAAGCTGCAAGATTAAATTTAGAAAAATAAAATTAATCAAACTGTA
 ATCAACTTCAACCGCTATCAATAATGATGCTATTAAGCTGCAAGATTAAATTTAGAAAAATAAAATTAATCAAACTGTA
 CAACTGATGGTATGACACAACAATCTATAGAGGCTTATCAAAACGCTAAACGCGTAGCCCAAAATGAATCTAACACTGTC
 TTTAGCATTAATTAATAACGGCGATGCCGATGAACAACAAATTACAACTGAAACAGACCGAGTCAATCAGCAAACTACAA
 ACTTAACTCAAGCAATTAACGGGTAAACAGTTAATAAAGAACCATTAGAAACCGCTAAACAGCGTTACAAAATAACATC
 GACCAGGTACCTAGTACAGATGGTATGACTCAGCAATCTGTTGCAAAATTATAATCAAAAACCTACAAATAGCTAAAAACGA
 AATTAACACAATTAATAACGTTTGTAGCGAACATCCAGATGTTAATGCAATCAAAACGAATAAAGCAGAAGCGGAACGAA
 TCAGTAACGATTTAACACAAGCTAAGAATAACTTACAAGTTGATACTCAACCTTTAGAAAAATAAAGACAACTTCAA
 GATGAAATTTGATCAAGGTACTAACACAGATGGAATGACTCAAGATTCAGTGGATAATTACAATGATAGCTTAAGTGCAGC
 AATTATAGAAAAAGGCAAGTAAATAAATTACTTAAACGTTAATCCGACAGTAGAACAGTTAAAGAGAGCGTTGCTAATG
 CACAACAAGTCATACAAGATTACAAAAATGCTCGAATTCCTGTTCCAGACAAAACCTCAACTTCAAGAAGCTAAAAAT
 AGATTAGAAAACAGTATTAAACCAACAAACAGATACGACGCGATGACTCAAGATTCGCTTAAACAATTATAATGATAAAAT
 AGCAAAAGCTAGACAAAACCTTGAAAAATATCTAAAGTTTGTAGTGGTCAACCTACTGTAGCTGAAATTAGACAAAAATA
 CAGATGAAGCAATGCACATAAACAAGCATTAGACACTGCACGTTCTCAACTTACATTAAATAGAGAGCCATATATCAAT
 CATATTAATAATGAAAGTCATTTAAATAACGCGCAAAAAGATAATTTTAAAGCTCAAGTTAACTCAGCACCTAATCATAA
 TACTTTAGAAACGATTAAAAATAAGGCTGATCTTTAAATCAATCTATGACAGCATTAAAGTAAAGTATTGCAGATTACG
 AAAATCAAAAACAACAGAAAAATTATTTAGATGCATCTAACATAAAGCTCAAGACTATGCAATGCAGTCAATGCGGCT
 AAAGGTATTTTAAACCAACTCAAAGTCCGACAATGAGTGCTGATGTGATTGATCAAAAAGCTGAAGATGTTAAACGTAC
 GAAAACCTGCGTTAGATGGAAATCAAAGATTAGAAGTTGCTAAACAACAAGCACTTAATCATTTAAATACCTTAAATGATT
 TAAACGATGCTCAGCGACAAACTTTAACTGATCTATATAAATCACTCTCCAAACATCAATTCAGTGAATCAAGCTAAAGAA
 AAAGCTAATACTGTTAACACAGCAATGACTCAACTGAAACAAACTATTGCTAACTATGACGATGAATTGCAATGACGCGCAA
 TTACATTAATGCAGATAAAGACAAAAAGATGCTTATAATAACGCTGTTAAACAATGCTAAACAAGCTGATTAATCAATCTG
 ATGCTAATCAAGCACAACTTGATCCAGCTGAAATTAATAAGTTACACAAAGAGTCAATACGACTAAAAATGATCTAAAT
 GGTAATGACAAATTTGCTGAAGCTAAAGAGATGCTAATACAACCATTGATGGTTTAACTTATCTAAATGAAGCTCAACG
 TAACAAAGCTAAAGAAAAATGTAGGCAAGCTTCTACAAAAACAATATTACGAGTCAGTTACAAGATTACAATCAATTGA
 ATATTGCTATGCAAGCATTACGTAACAGTGTGAACGACGTTAAACAATGTTAAAGCAAATAGCAATTAATAAATGAAGAT
 AATGGTCCAAAAGAGCTTACAATCAAGCCGTTACTCATGCTCAAAACATTGATAAATGCACAATCTAACCTGAAATGAG
 CCGTGACGTAGTAAATCAAAAAACACAAGCAGTAAATACTGCCCATCAGAATTTACATGGACAACAAAAGTTAGAACAAG
 CACAAAGTAGTGCTAATACAGAAATCGGTAACCTTACCAAACCTTAACATACTCAAAAAGCTAAAGAAAAGGAACCTGGTA
 AATAGTAAACAACCTCGTACGGAAGTACAAGAACAACCTTAAACAAGCTAAGTCACTAGATAGTTCTATGGGCACGTTAAA
 ATCATTAGTTGCTAAACAACCTACAGTACAAAAACAAGTGTATATTAACGAAGATCAACCTGAGCAATCTGCCTACA
 ATGATTCCATTACAATGGGACAAACTATAATTAATAAACAAGCTGATCCAGTACTTGATAAACTTTAGTTGATAACGCA
 ATCAGTAACTTTCAACTAAAGAGAATGCACTGCTGTTGAACAAAAATTAACAAGCTGCTAAACCGGAAGCAATTAATGC
 ACTTAATACATTAGCTGATTTAAACACACCTCAGAAAGAGGCTATTAAACAGCTATTAACTGCTCATACAAGAAGCTG
 ATGTAAGTGCAGAGCAAAGTAAGGCTAATCAATAAATAGTGCAATGCACACGTTGAGACAAAACATTTCTGACAACGAA
 TCAGTAACAAACGAAAGTAATTATATTAACGCTGAACCCGAAAAACAACATGCCTTTACTGAGGCTCTAAATAATGCTAA
 AGAAATAGTTAATGAACAACAAGCCACTCTTGATGCCAATTCAATTAACCAAAAAGCACAAGCGATTCTTACTACTAAAA
 ATGCTTTAGATGGTGAAGAACAATTACGTCGTGCTAAAGAAAATCCGATCAAGAAATCAATACGTTAAATCAATTGACT
 GATGCGCAAAGAAATAGTGAAAAAGGTTTGTCAACAGTTCTCAAACCTAGAACAGAAGTTGCTTCTCAATTGACAAAGC
 TAAAGAACTAAATAAGGTGATGGAACAACCTGAATCACCTTATCAATGGTAAAAACCAATGATAAATAGCAGTAAATTTA
 TCAATGAAGATGCCAACCAACAACAAGCATATTCAATGCGATTGCAAGTGCAGAAGCGCTTAAAAACAAATCACAAAAC
 CCTGAATTAGATAAAGTAACAATTGAACAAGCAATTAATAATATTAATCTGCAATTAACAATCTAAACGGTGAAGCTAA
 ACTGACTAAAGCTAAAGAAGATGCTGTTGCTTCAATAAACAACCTAAGCGGATTAAACAACGAGCAAAAAACAAAAGAAA
 ATCAAGCCGTTAATGGCGCTCAAACCTAGAGACCAAGTTGCTAATAAATACGTTGCTGTAAGCATTAGATCAATCAATG
 CAAACATTACGTGACTTAGTTAACAATCAAAATGCAATACATTCAACAAGTAATTTATTTAACGAGGATTCAACTCAAAA
 GAATACTTATGATAATGCAATTGATAATGGCTCGACATATATACTGGTCAACACAATCCAGAATTAATAAATCTACTA
 TTGATCAAACGATTAGCCGAATTAACACAGCTAAAAATGATTTACATGGTGTAGAAAAGTTACAAAGAGATAAGGGAAC
 GCTAATCAAAGAAATGGACAATTAGGTTATTTAAATGACCTCAAAAATCTGGTGAGGAATCCTTAGTCAACGGTTCAAA
 TACACGTTCTGAAGTAGAAGAGCATCTTAATGAAGCTAAATCAATAAATAATGCAATGAACAAATTAAGAGATAAAGTAG
 CTGAAAAGACTAATGTCAAACAAGTAGCGATTACATTAATGATTCAACTGAACATCAACGTGGGTATGATCAAGCACTT
 CAAGAAGCAGAAAAATATTATTAATGAATCGGTAATCCAACATTAAATAAATCGGAAATTAACAACAAGTTACAACAAT
 GACTGACGCTCAAATGCGTTACAAGGTTACATCTATTAGAAGAAGCTAAAAATAATGCGATTACTGGAATCAATAAAC
 TTACAGCATTAAATGATGCACAACGCTAAAAAGCAATTGAAATGTTCAAGCACAGCAGACAATCCAGCAGTTAATCAA
 CAATTAACCTTTGGATAGAGAAATAAATACTGCAATGCAAGCTTTACGAGATAAAGTAGGCCAACAAAATAACGTTACCA

FIGURA 2.14

ACAAAGTAATTATTTCAATGAAGATGAACAACCAAAACATAACTATGATAATTCTGTACAAGCCGGTCAAACCTATTATTG
 ATAAACTTCAAGATCCAATCATGAACAAAAATGAAATTGAGCAGGCTATTAATCAAATCAATACGACTCAAACAGCGTTA
 AGTGGAGAAAAATAAATTACACACTGACCAAGAAAGCACAAATAGACAAATAGAAGGTTTATCTAGTTTGAACACAGCTCA
 AATCAACGCCGAAAAAGATTAGTCAATCAAGCTAAAACAAGACAGATGTTGCTCAAAGTTAGCTGCAGCTAAAGAAA
 TAAATTCTGCTATGAGTAATTTAAGAGATGGCATTCAAATAAAGAGGACATCAAACGTAGCAGTGCATATATCAACGCA
 GATCCGACTAAAGTTACAGCTTACGATCAAGCACTACAGAACGCAGAAAATATCATCAATGCCACACCAAACGTAGAGCT
 TAATAAAGCTACAATTGAACAAGCGCTATCACGCGTTCAACAAGCACAAACAGATCTTGATGGTGTTCACAATTAGCTA
 ATGCTAAACAACAAGCTACACAACTGTCAATGGGTTAAATAGCTTAAATGACGGTCAAAGCGTGAATTAAATCTATTA
 ATTAATTGAGCTAATACCCGTACAAAAGTACAAGAAGATTAAACAAGCAACTGAATTGAACCATGCGATGGAAGCTTT
 AAGAAACAGTGTTCAAAACGTTGATCAAGTAAAACAAGTAGCAATTATGTCAATGAAGATCAACCTGAACAGCACAATT
 ATGATAATGCTGTCAATGAAGCTCAAGCTACAATCAACAACAATGCTCAACCTGTCTAGACAAATAGCTATAGAACGT
 TTAACCTCAAACCTGTTAACTACACTACAAAAGATGCATTACATGGTGTCTCAAAAACCTGACACAAGACCAACAGCTGCTGAAAC
 TGGAATACGTGGTTTAAACGAGTCTCAATGAACCTCAGAAAAATGCTGAAGTAGCTAAAGTAACTGCAGCAACAACAGCTG
 ATGAAGTGAGAAAATATTCGTCAAGAAGCAACAACATTAGATACTGCAATGCTTGGTTTACGTAAAAGCATTAAAGATAAA
 AACGATACATAAAATAGTAGTAAATATATTAATGAGGATCATGACCAACAACAAGCTTATGACAATGCTGTAAATAATGC
 TCAACAAGTTATCGATGAAAACCTCAAGCAACGTTAAGCTCAGATACAATCAATCAATTGGCAAATGCCGTAACTCAAGCTA
 AATCTAATCTTCATGGAGATACTAAACTACAACACGATAAAGATAGTGCTAAACAAACGATTGCTCAATTACAGAAATTG
 AATTCAAGCTCAAAAACATATGGAAGATTCTTTAATTGATAATGAATCTACACGTACGCAAGTCCAACAGGATTTAACAGA
 AGCTCAAGCTTTAGATGGTTTAAATGGGTGCCTTAAAGAAAGTATTAAAGATTATACTAATATTGTTTCAAACGGTAATT
 ACATCAATGCGGAACCATCTAAGAAACAAGCATATGATGCGAGCTGTACAAAATGCTCAAAATATAATAAATGGAACGAAT
 CAACCAACAATTAAATAAAGGTAATGTCACTACAGCAACACAAAACCGTGAAAAATACTAAAGATGCCCTTAGACCGTGATCA
 TAGATTAGAGGAAGCTAAAAATAATGCCAATCAAACAATCAGAAATCTATCTAATTTGAACAATGCCCAAAAAGATGCAG
 AGAAAAATCTAGTTAATAGCGCATCAACATTAGAACAAGTTCAACAAAACCTTACAAACCGCTCAACAATTAGATAATGCT
 ATGGGTGAGTTACGACAAAAGTATTGCTAAAAAAGATCAAGTGAAAGCAGATAGTAAATATCTAAATGAAGATCTCTAAAT
 TAAGCAAACTATGATGATGCAGTTCAACGTGTTGAACTATTATTAAACGAAACTCAAACCCCTGAATTACTTAAAGCAA
 ACATTGACCAAGCAACTCAATCCGTTCAAATGCGAACAAGCTTTACATGGTGTGAAAAATTAAATCAAGACAAAACAA
 ACGTCTTCGACAGAAGCTAGATGGATTAAACAGATTAAACAGATGCACAACGTGAAAAACTCAGAGAACAATAAACAACCTC
 TAATAGTAGAGATGATATTAAGCAAAAAATTGAGCAAGCAAAAAGCAATAATGACGCAATGAAAAACTTAAAGAACAAG
 TTGCGCAAAAAGATGGTGTTCATGCTAACAGTGATTATACAAAAGCAATAATGAGATTCTGCACAAAAGATGCGTATAATAATGCA
 CTTAAACAAGCGGAAGACATTATTAATAACAGCTCAAATCTTAACCTTAAATGCACAGACATTCTAATGCTTTAAATAA
 TATTAAACAAGCACAAGATAACCTTCATGGAGCTCAAAAATTACAGCAAGACAAAATACAACCTAATCAAGCCATTGGTA
 ACTTAAATCATCTTAATCAACCTCAAAGATGCGCTTATACAAGCTATTAAATGGAGCTACATCTAGGGACCAAGTTGCA
 GAAAACTTAAAGAGGCCGAAGCGCTTGATGAAGCTATGAAACAACCTGAAGATCAAGTGAATCAAGATGATCAAATTTTC
 AAATAGCAGCCCATTCATAAATGAAGACTCAGACAAAACAAAAAATCTATAATGATAAAATCCAAGCTGCAAAAGAAATAA
 TTAATCAAACATCTAATCCAACCTTAGATAAAACAAAAAATGCTGATACACTTCAAATATTTAAAGATGCAGTGAATAAT
 TTACATGGTGCATCAAAAATTAGCTCAATCTAAACAAGATGCTAATAATCAATTAAATCATTTAGATGACTTAACCGAAGA
 ACAAAAAACCAATTTTAAACCGTTAATTAAATGCTGATCTCGAGATGAGGTAAATAAACAACCTAGAGATTGCTAAAC
 AATTAAATGGTGATATGAGTACACTTCATAAAGTCATAAATGATAAAGATCAAATTCACATTTAAGCAATTACATTAAAT
 GCTGATAATGATAAAAAACAAAATTATGATAATGCTATTAAAGAAGCTGAGGATTTAATTCATAATCATCCAGATACATT
 AGATCATAAAGCATTACAAGATTTTATTAACAAGATAGACCAAGCGCATAACGAATTTAAATGGAGAATCCAGATTTAAAC
 AGGCTTTAGACAATGCTTTAAACGACATAGATAGCTTAAACAGTCTCAATGTTCCACAACGCCAAACTGTTAAGGATAAC
 ATCAACCATGTGACAACCTCTAGAAAAGTTTAGCTCAAGAATTGCAGAAAGCAAAAGAGCTTAATGATGCTATGAAAGCAAT
 GAGAGATAGCATTATGAATCAAGAGCAAATTCGTAAAAATAGCAATTATACCTAATGAAGACTTAGCTCAACAAAATGCCT
 ATAATCATGCAGTAGATAAAATAAATAACATTATTGGTGAAGACAATGCGACGATGGATCCTCAAATAATCAAACAAGCA
 ACTCAAGATATAAATACAGCTATAAATGGATTAAATGGAGATCAAAAACCTTCAAGATGCAAAAGACAGATGCTAAACAACA
 AATTACTAACTTTACTGGTTTAACTGAACCACAAAAACAAGCATTGGAACATCATTAACCAACAACAAGCAGAGCAA
 ATGTTGCTAAACAGTTAAGTCATGCTAAATCTTAAATGGAATAATGGAAGAATTAAAGTTGCAGTAGCCAAAGCGTCA
 TTAGTAAGACAAAATAGTAACCTATATTAATGAAGATGTCTCTGAAAAAGAAGCATATGAACAAGCTATCGCAAAAGGTC
 GGAATAATTAATTCAGAAAATAATCCAACAATAAGTAGTACTGATATCAATCGTACCATTCAAGAAATTAATGATGCTG
 AACAAAATCTTCATGGTGATAATAAATTAAGACAAGCACAGGAAATTGCAAGAATGAAATACAAAATCTAGACGGATTA
 AATTCAGCTCAAATAACAATAATTAATCCAAGATATAGGCAGAACAAACCTAAACCTGCAGTAACCTCAGAACTAGAAGA
 AGCAAAAGCAATAAACCAGCTATGCAACAACCTTAAACAAGTATAGCCGATAAGGATGCTACTCTAAATTTCTAGTAACCT
 ATCTCAATGAAGATTCTGAGAAAAAGTTAGCGTACGATAATGCTGTAAAGCCAAAGCTGAACAACCTCATAAATCAACTTAAC
 GACCCAACCTATGGATATAAGTAATATTCAAGCTATTACTCAAAGGTCATTCAAGCAAAAGATTCAATTGCACGGTGCAGAA
 TAACTTGCACAAAATCAAGCAGATTCAAATTTAATAATAAATCAATCAACAATTTAAATGATAAACAAGCAAGCAT
 TAAATGACTTAATTAATCATGCTCAAACTAAACAGCAGTGGCAGAAATTAATGCAAGCTAATAAGTTAAATAACGAA
 ATGGGCACACTAAAAACACTCGTAGAAGAACAGTCAAACGTTATCAACAAGTAAATATATTAATGAAGATCCGCAAGT
 TCAAAATATTTATAATGACTCCATTCAAAAAGGTCGAGAAATTAATTAACCGCACTACAGATGATGTTTTAAACAACATA
 AAATAGCAGATGCCATTCAAACATTCAATTTAACTAAAAACGATTTACATGGTGATCAAAAATTACAAAAGCACAACAA
 GATGCAACCAATGAATTAACTATTTAAACAATCTAAACAATTTCTCAAAGACAAAGCGAGCATGATGAGATTAACCTCTGC
 TCCTTCAAGAAGTGAAGTTTCTAATGATTTAAATCATGCTAAAGCACTTAATGAAGCTATGCGTCAACTTGAGAAATGAAG

FIGURA 2.15

TTGCTCTTGAAAACAGTGTGTTAAAAAATTAAGCGACTTTATCAATGAAGATGAAGCGGCACAAAATGAATATAGTAATGCA
 CTTCAAAAAGCTAAAGACATTATCAACGGCGTTCCAAGTAGCACTTTAGATAAAAGCTACAATTGAAGATGCTTTATTAGA
 ATTGCAAAATGCTAGAGAAAGTTTACATGGTGAGCAAAAACCTTCAAGAGGCTAAAAATCAAGCTGTTGCTGAAAATTGATA
 ATTTACAAGCATTAAATCCTGGACAGGTTCTTGCTGAAAAAACATTAGTTAAACCAAGCATCAACCAAAACCAGAAGTTCAA
 GAAGCCTTACAAAAGCAAAAGAACTTAATGAAGCTATGAAAGCACTGAAAACCTGAAATAAAATAAAAAAGAACAAATCAA
 GGCTGATAGTAGATATGTAAATGCTGACAGTGGTCTTCAAGCAAATTTACAATTTCTGCGTTAAATTTATGGTTCTCAAATTA
 TTGCAACTACCCAACCACCAGAGCTTAATAAAGATGTAATAAATAGAGCAACTCAAACGATTAAAACCTGCTGAAAAATAAT
 TTAAATGGGCAATCTAAATTAGCAGAGGCTAAGTCAGACGGAAATCAAAGCATCGAACATTTGCAAGGATTAACACAATC
 ACAAAAAGATAAAACAACATGATTTAATTAATCAAGCTCAAACCTAAACAACAGGATAGATATCGTAAATAACTCTAAAC
 AATTAGATAACTCTATGAATCAACTACAACAATAATGTTTAAACAATGACAATACAGTAAACAAAAATAGTGATTTCAATTAAT
 GAAGATTCAGCCAACAGGATGCTTATAATCATGCAATTCAGCGACGCAAAAAGATTTGATAAAGTCTCATCCAACTATCAT
 GGATAAAAATCAAATAGATCAAGCTATTGAAAATATCAAACAAGCACTTAATGATTTACACGGTAGTAATAAATCACTCAG
 AAGATAAAAAAGAGCTTCAGAACAACTACAAAACCTTAATAGCTTGACGAACGGGCAAAAAGATACGATTTTAAATCAT
 ATTTTCAGTGCACCAACAAGAGCCAAGTAGGAGAAAAAATGCAAGTGCTAAACAATTAATAATACAATGAAAGCACT
 TAGAGATTTCTATTGCTGATAATAATGAAATTTTACAAAGTAGTAAGTACTTCAATGAAGATTCTGAACAACAAAAATGCTT
 ATAATCAAGCCGTAAATAAAGCTAAAAATATAATTAATGATCAACCAACACCAGTAATGGCAAATGATGAGATTCAAAGT
 GTCTTAAATGAAGTTAAACAAACTAAAGATAATTTACATGGTGATCAAAAACCTTGCTAACGACAAGACAGATGCTCAAGC
 AACATTAATGCGTTAAATTTACTTAAATCAAGCGCAAGAGGTAATCTTGAAACTAAAGTTCAAACCTCTAATTTCTAGAC
 CAGAAGTACAAAAAGTAGTTCAATTTAGCAAAATCAACTTAATGATGCGATGAAAAAATTAGATGATGCTTTAACTGGTAAT
 GACGCAATAAAACAAACGAGTAATTATATTAATGAAGATACTTCTCAACAAGTTAACTTTGATGATACAGATAGAGG
 TAAAAACATAGTTGCTGAACAAACAAATCCAATATGTCTCCAACATAATTAACACTATTGCTGATAAAATTAAGTAAAG
 CTAAAAACGATTTACATGGCGTACAAAAACTAAACAAGCTCAACAACAGTCCATCAATACTATTAAATCAAATGACTGGT
 CTAAACCAAGCTCAAAAAGAACAAATTAATCAAGAAATTCACAAACTCAAACCCGTTCTGAAGTACATCAAGTAATTA
 TAAAGCACAGCTTTAAATGATTCAATGAATACCTTTACGTCAAAGTATTACTGATGAACATGAAGTTAAACAAACAAGTA
 ACTACATCAATGAAACTGTTGGTAATCAAACCTGCATATAACAATGCCGTTGATCGTGTAACAAATAATCAATCAAACA
 TCTAATCCAATATGAATCCTTTAGAGGTGGAACGTGCAACATCAAATGTAAAAATTTCTAAAGATGCACTTCATGGTGA
 ACGTGAATTTGAATGACAATAAAAAATCAAAAACCTTTGCAAGTCAATCACTTAGATAACCTCAATCAAGCTCAAAAAGAAG
 CATTAACCTCATGAAATTTGAACAAGCAACTATAGTTTCAACAAGTAAATATCTATAACAAGCGAAAGCTTTAAATAAT
 GATATGAAAAAACTTAAAGATATCGTTGCTCAACAAGATAATGTGAGACAATCAACAATTTATATAAACGAGGATGATAC
 ACCTCAAAATATGTACAACGATACAATTAATCATGCACAATCAATCATTGATCAAGTAGCAACCCCTACGATGTCTCATG
 ACGAAATAGAGAATGCAATCAATAACATAAAGCATGCCATCAATGCACTCGATGGAGAACATAAAATTACAACAAGCAAAA
 GAAATGCAAACTTATTGATTAATAGTTTAAACGATTTAAATGCACCACAAAGAGATGCCATAAATAGATTGGTTAATGA
 AGCTCAACAAGAGAAAAAGTAGCTGAACAACCTTCAAAGTGCTCAAGCTTTAAATGACGCTATGAAGCATTAAAGAAACA
 GCATTCAAAATCAATCATCCGTAAGACAAGAGAGCAAAATATATTAATGCAAGTGATGCTAAAAAAGAGCAATATAATCAC
 GCAGTTAGAGAAGTCGAAAATATTATCAATGAACAACATCCAACATTGGATAAAGAAATAATTAAGCAACTAACGGATGG
 TGTAAATCAAGCGAATAATGACTTAAATGGCGTTGAATTATTAGATGCTGATAAGCAAAACGCACATCAATCGATACCTA
 CATTGATGCACCTTAAATCAAGCACAAACAAACGCATTAAATGAAAAAATTAATAACGCAGTTACCAGAACTGAAGTTGCG
 GCTATTATTGGCCAAGCAAACTACTCGATCATGCTATGGAGAATTTAGAAGAAAGTATCAAGATGATGATGATGATGATGAT
 ACAGTCAAGTAACATATTAATGAAGATTCTGATGTTCAAGAAACATACGATAACGCCGTTGATCATGTGACGAAATAC
 TTAATCAAACAGTAAATCCAACCTTTATCTATTGAAGATATAGAGCATGCTATCAACGAAGTTAATCAAGCGAAAAACAA
 CTCAGAGGTAAACAAAAAATTTATCAAACCTATCGATTTAGCTGATAAAGAAATTAAGTAAATTTGATGATTTAACATCACA
 ACAAGCAGTTCAATATCTAATCAAATATATACTGCTAAAACGAGAACAGAAGTTGCCAAGCAATTGAAAAAGCAAAAT
 CATTAAATCATGCAATGAAAGCACTTAAACAAAGTATATAAAAAATGCAGATAAAGTGTTAGATAGTAGTCGATTCAATTAAC
 GAAGATCAACCTGAAAAAAGGCGTATCAACAAGCTATAAATCATGTTGATTCAATCATTCATAGACAAACAAATCCTGA
 AATGGATCCAACAGTAATCAATAGCATAACTCATGAACCTCGAAACAGCTCAAATAACTTACATGGTGATCAGAACTTG
 CTCATGCACAACAAGATGCCGCTAATGTAAATTAATGGTCTAATTCATCTTAATGTTGCTCAACGTGAGGTAATGATAAAT
 ACGAATACAATGCTACAACACGCGGAAAGCTTGAAGAAGCTTGAATAATGCTCAAGCTCTTGATAAAGCTATGGAAC
 ACTACAACAAGTAGTTGCTCATAAAAATAATATATTGAACGATAGTAAATATTAAATGAAGTCAAAATCAACAAAC
 AATACGATCGAGTTATTGCTGATGCCGAACAACCTACTTAATCAGACAACAAATCCAACATTAGAACCTTATAAAGTCGAT
 ATTGTTAAGGATAATGTCCTAGCTAACGAAAAAATACTATTTGGCGCAGAAAAACTATCATATGACAAATCAAATGCAAA
 TGATGAAATTAACATATGAATTATCTTAATAATGCACAAAGCAATCTATAAAGATATGATTTCTCACGCAGCATTA
 GAACTGAAGTTAAACAACCTTCTGCAACAAGCTAAAATCCTTGATGAAGCCATGAAATCACTTGAAGATAAACTCAAGTA
 GTGATTACAGATACTACTTTGCTTAATTACACTGAAGCTTCAGAGGATAAAAAGGAAAAAGTAGACCAAACTGTATCACA
 TGCTCAAGCGATTATTGATAAAATAAATGGCTCAAATGTAAGTTTAGATCAAGTACGACAAGCACTAGAACAAATTAACCTC
 AAGCATCAGAAAAACCTCGATGGTGATCAGCGAGTTGAAGAAGCTTAAAGTTTCATGCTAATCAAACAATTGATCAATTAACA
 CATCTTAATTCATTACAACAACAACCTGCGAAAGAAAGTGTAAAAACGCAACAAACCTAGAAGAAATCGCTACTGTTAG
 TAACAATGCTCAGGCATTAAACAAGTAATGGGTAAATTAGAACCAATTCATTAATCATGCTGATTCTGTTGAAAAATAGT
 ATAATTATAGACAAGCCGACGACGACAAAAATCATCGCTTATGATGAAGCACTTGAACATGGACAAGATATACAAAAAAGT
 AACGCAACCCAAATGAAACAAAAACAAGCGTTACAACAATTAATATATGCAGAAACATCGTTAAATGGTTGAAAAAGATT
 AAATCATGCTAGACCACGAGCTTTAGAATATATCAAATCACTAGAAAAAATAACAATGCTCAAAAGTCTGCTTTAGAGG
 ATAAAGTAACGCAATCGCATGATTTATTAGAATTAGAACATATTGTCAACGAGGGCACAAACCTCAATGACATTATGGGT

FIGURA 2.16

GAATTAGCTAACGCAATCGTTAATAACTATGCTCCAACCAAAGCAAGTATAAATTATATTAACGCCGATAACCTACGCAA
 AGATAACTTTACTCAAGCTATCAACAATGCACGTGATGCACTCAACAAAACCTCAAGGTGAGAACTTAGATTTCATGCAA
 TTGATACATTTAAAGATGATATATTTAAAACCTAAAGATGCACTTAACGGTATTGAACGTTTAAACAGCTGCAAAATCAAAA
 GCAGAAAACTAATTGATAGTTTAAAATTTATTAATAAAGCTCAATTCACACATGCAAATGATGAAATTATGAATACTAA
 TTCTATTGCACAATTGTCTAGAATCGTGAATCAAGCATTGATTTAAATGATGCAATGAAATCTTTAAGAGATGAACTTA
 ATAATCAAGCTTTTCTGTGCTCAAGCAAGCTCAAAATATATAAATTCAGATGAAGATTTAAACAACAATTTGACCATGCT
 TTAAGTAATGCTCGAAAAGTTCTTGCAAAAGAAAATGGTAAAAATTTAGATGAAAAACAATTCAGGGACTCAAAACAAGT
 GATTGAGGATACTAAAGATGCTTTAAATGGTATCCAACGTTTATCAAAAGCTAAAGCTAAAGCAATTTCAATACGTACAAT
 CTTTATCTTTATATCAATGATGACAGCGTCATATTGCTGAAAAATAATATTCACAACTCTGATGATTTATCATCTTTAGCA
 AATACATTATCTAAAGCTAGTGATTTAGATAATGCAATGAAAAGACTTACGAGATACTATAGAAAGTAATTCAACTTCTGT
 TCCAAATAGTGTGAATTATATTAATGCTGATAAGAATTTACAAATTTGAATTTGATGAGGCGCTACAACAAGCAAGTGCAA
 CAAGTTCTAAAACCTTCAGAAAATCCAGCAACGATTGAAGAAGTATTAGGTCTTAGTCAAGCCATTTACGATACAAAAAT
 GCATTAAATGGTGAACAACGACTTGCAACTGAGAAGAGCAAAGATCTAAAATTAATAAAGGATTTAAAGATTTAAATAA
 AGCACAACCTTGAAGATGTCAACAACAAGGTAAATTCAGCAAACTACTTTAACAGAGTTATCTCAGCTCACTCAATCAACGT
 TAGAATTAACGATAAAAATGAAATTTATTGAGAGATAAGCTTAAAACTTTAGTAAATCCTGTTAAAGCAAGTTTAAATTTAT
 AGAAACGCTGATTATAATTTAAAACGTCAATTTAACAAAGCTTTAAAAGAAGCTAAAGGCGTATTAAATAAAAATAGCGG
 TACAAATGTCAATATCAATGACATTCAACATCTTTTAAACAAATAGATAATGCTAAAGACCAATTTAAATCGTGAACGAC
 GTCTAAAAGAACATCAACAATAATCTGAAGTATTTATTATTAAAGAATTAGATATACTTAATAATGCTCAAAAAGCTGCA
 ATAATTAATCAGATTAGAGCGTCTAAAGACATTTAAATAATTAATCAAAATCGTTGATAATGCAATAGAATTTAAATGATGC
 TATGCAAGGTTTAAAGAACATGTAGCTCAATTAACAGCAACTACAAAAGACAACATTGAATATTTAAATGCTGATGAAG
 ACCATAAATTACAATATGATTACGCTATCAACTTAGCGAATAATGTTCTTGACAAAGAAAACGGTACAAATAAAGACGCT
 AATATCATAATTGGAATGATTCAAAACATGGATGATGCTAGAGCACTTCTAAATGGAATTGAAAGACTTAAAGATGCTCA
 AACAAAAGCACATAATGACATTAAAGATACGCTCAAACGTCAACTTGATGAAATTGAACACGCTAATGCAACATCAAAAT
 CTAAAGCTCAAGCTAAACAAATGGTAAATGAGGAAGCTAGAAAAGCGCTTCTAATATTAATGACGCAACATCAAAATGAT
 TTAGTTAATCAAGCAAAAGATGAAGGGCAATCTGCAATTGAACACATACATGCAGATGAATTTACCTAAAGCAAACTAGA
 TGCTAATCAAAATGATTGACCAAAAAGTTGAAGATATAAATCACTTAATTAGTCAAAATCCAACTTATCAAAATGAAGAAA
 AAAATAAATAATATCTCAAAATTAATAAGTTAGTAAATGGAATTAAGAATTGAAATTAACAAGCTATAAACCAACACAA
 ATAGAAAATGCTACAACAAAACCTAGATGAAGTCATTGAACTACTAAAAAATTAATTATCGCCAAAGCAGAAGCTAAACA
 AATGATAAAAGAGTTATCACAAAAAGAAACGAGATGCAATAAATAACAACACTGATTTAACACCTTCTCAAAAGGCACATG
 CTTTAGCAGATATTGATAAAACAGAAAAGATGCACCTCAACATATCGAAAATTTCTAATTTCAATTGATGATATCAATAAC
 AATAAAGAGCATGCATTTAATACTTTAGCTCATATCATTATTTGGGTAATGATCAGCAACCATTTAGTTTTTGAACCTACC
 TGAATTGAGCCTTCAAAATGCTCTAGTAACAAGTGAGGTGGTTGTTTCACAGAGATGAAACTATTTTATTAGATCTATAA
 TTGGAGCTATGACTTTAACTGATGAACCTAAAGTCAATATTGTTTCATTACCGAACACTGATAAAGTAGCTGATCACCTA
 ACCGCTAAAGTTAAGGTTATTTTAGCTGATGGCTCATATGTCACCTGTAATGTTCCAGTCAAAGTTGTAGAAAAAGAATT
 ACAATAGCTAAAAAGGATGCTATAAAAAACAATTTGATGTTCTGGTAAAAACAAAAATCAAAGATATAGATTTCTAATAACG
 AATTAACGCTACTCAACGTGAAGATGCAAAAGCTGAAATTTGAAAGATTGAAAAAGCAAGCCATCGATAAAGTGAATCAT
 TCAAAATCGATTAAAGATATTGAAACAGTAAACGAACTGATTTTGAAGAAATAGATCAGTTTGATCTTAAACGCTTTTAC
 GCTAAATAAAGCTAAAAAGGATATCATTTACTGATGTTAATACTCAAAATCCAAAATGGTTTCAAAGAAATTGAAACAATAA
 AAGGTTTAACTTCTAATGAAAAAATCAGTTTGATAAACAATTAACCTGCACTACAAAAGAATTTTTAGAAAAAGTCGAG
 CATGCTCATAATTTAGTAGAATTAATCAATTACAACAAGAGTTTAAATAAGATATAAACATATTTTAAACCAAGCACA
 TTTACTAGGTGAAAAACATATAGCAGAACATAAATTAGGATATGTTGTAGTAAACAAAACCTCAGCAAACTAAATAATC
 AATCTGCTTCTTACTTTTATAAAACAATGGGCACTTGATAGAATTAACAAATTCAACTAGAAACGATGAATTCATTCGT
 GGTGCGCATACCGTACAAGATGTACACAAAGCATTATTACAAGGTATAGAGCAAACTTTGAAAGTAAATGTAAGTATTAT
 AAATCAATCTTTCAACGATTCCTTGCACTAATTTAATCTTCAATCAAAATTTGATGCTAGATTAGAGAAAAAGGATG
 TTGCAAAACCATATCGTACAACTGAAACATTCAAAGAGTTTCTAAAAGGAACGGGTGTTGAAACAGGTAAATCAACAAA
 GAAACACAGCAACCAAACTTCTAAGAAATGATAATGATAGCTTATCAAACTTTAGTTGATAATTTGCGCAAACTGT
 AGGTGTTATTACATTAACCTGGTTTACTTTCTAGTTTCTGGTTAGTTTTGGCTAAAAAGACGTAAAAAGAAGAAGAA
 AACAAATCGATAAAAAATCATCACAAAGATATTGCTCTTTAGATACTGATAAAATAGATCCAATTGTAATAACTAAGCGT
 AAAATAGATAAAGAAGAACAATTTCAAACGATGACAAACATTCATTCAGTTGCTAAACATAAGAAATCTAAAGAAAA
 GCAATTGAGTGAAGAGGATATTCAATCCCCGTCGTTAAGCGTAAACAAAACAGTGATAACAAAGATACAAAACAGA
 AGAAAGTTACTTCTAAAAGAAGAAAACCGCTCAGTCAACTAAAAAGTTGTAAAAACCAAAAGCGTTCTAAAAAG

SEQ ID NO:49 sequência de polinucleotídeos

ATGAGAGATAAGAAAGGACCGGTAAATAAAGAGTAGATTTTCTATCAAAATAAATTGAATAAATATTCAATAAGAAAATTT
 TACAGTTGGAACAGCATCTATTTTAAATGGCTCACTAATGTATTTGGGAACTCAACAAGAAGCAGAAGCAGCTGAAAACA
 ATATTGAGAATCCAACCTACATTTAAAGATAATGTCCAATCAAAAGAAGTGAAGATTGAAGAAGTAACAAACAAAGACACT
 GCACCACAAGGTGTAGAAGCTAAATCTGAAGTAACCTCAAAACAAGACACAATCGAACATGAGCATCAGTAAAAGCTGA
 AGATATATCAAAAAGGAGGATACACCAAAAGAAGTAGCTAATGTTGCTGAAGTTGAGCGGAAATCGTCAGTCACTCATA
 ACGCAGAGGCACCTAAGGTTAGAAAAGCTCGTTCTGTTGATGAAGGCTCTTTGATATTACAAGAGATTCTAAAAATGTA
 GTTGAATCTACCCCAATTACAATTCAGGTAAAGAACATTTTGAAGGTTACGGAAGTGTGATATACAAAAAACCCAAC
 AGATTTAGGGGTATCAGAGGTAACCAGGTTAATGTTGGTAATGAAAGTAATGGTTTGATAGGAGCTTTACAATTAATAA

FIGURA 2.17

ATAAAAATAGATTTTGTAGTAAGGATTTCAATTTTAAAGTTAGAGTGGCAAATAACCATCAATCAAATACCACAGGTGCTGAT
GGTTGGGGGTTCTTATTTAGTAAAGGAAATGCAGAAGAATATTTAACTAATGGTGGAAATCCTTGGGGATAAAGGTCTGCT
AAATTCAGGCGGATTTTAAATTTGATACTGGATACATTTATACAAGTTCCATGGACAAAACCTGAAAAGCAAGCTGGACAAG
GTTATAGAGGATACGGAGCTTTTGTGAAAAATGACAGTTCTGGTAATTCACAAATGGTTGGAGAAAAATATTGATAAATCA
AAAACTAATTTTAACTATGCGGACAATTCAACTAATACATCAGATGGAAAGTTTCATGGGCAACGTTTAAATGATGT
CATCTTAACCTTATGTTGCTTCACTGGTAAAATGAGAGCAGAATATGCTGGTAAAACCTTGGGAGACTTCAATAACAGATT
TAGGTTTATCTAAAAATCAGGCATATAATTTCTTAATTACATCTAGTCAAAGATGGGGCCTTAATCAAGGGATAAATGCA
AATGGCTGGATGAGAACTGACTTGAAAGGTTTCAGAGTTTACTTTTACACCAGAAGCGCCAAAAACAATAACAGAATTAGA
AAAAAAGTTGAAGAGATTCCATTCAAGAAAAGAACGTAAATTTAATCCGGATTTAGCACCAGGGACAGAAAAAGTAACAA
GAGAAGGACAAAAAGGTGAGAAGACAATAACAACACCAACACTAAAAATCCATTAACTGGAGAAATTATTAGTAAAGGT
GAATCGAAAGAAGAGATCACAAAAGATCCGATTAATGAATTAACAGAATACGGACCAGAAACGATAGCACCAGGTTCATCG
AGACGAATTTGATCCGAAGTTACCAACAGGAGAGAAAAGAAGAAGTTCCAGGTAAACCAGGAATTAAGAATCCAGAAACAG
GAGACGTAGTTAGACCACCGGTGATAGTGAACAAAATATGGACCTGTAAAAGGAGACTCGATTGTAGAAAAAGAAGAA
ATTCCATTTCGAGAAAGAACGTAAATTTAATCCTGATTTAGCACCAGGAACAGAAAAAGTAAACAAGAGAAGGACAAAAAGG
TGAGAAGACAATAACGACACCAACACTAAAAATCCATTAACTGGAGAAATTATTAGTAAAGGTGAATCGAAAGAAGAGA
TCACAAAAGATCCGATTAATGAATTAACAGAATACGGACCTGAAACAATAGCGCCAGGTTCATCGAGACGAATTTGATCCG
AAGTTACCAACAGGAGAGAGAAGAAGAGTTCCAGGTAAACCAGGAATTAAGAATCCAGAAACAGGAGATGTAGTTAGACCACCGGTGATAGACC
GCCGGTCCGATAGCGTAACAAAATATGGACCTGTAAAAGGAGACTCGATTGTAGAAAAAGAAGAAATTCCATTCAAGAAAG
AACGTAAATTTAATCCTGATTTAGCACCAGGGACAGAAAAAGTAACAAGAGAAGGACAAAAAGGTGAGAAGACAATAACG
ACGCCAACACTAAAAATCCATTAACTGGAGAAATTATTAGTAAAGGTGAATCGAAAGAAGAAATCACAAAAGATCCGAT
TAATGAATTAACAGAATACGGACCAGAAACGATAACACCAGGTTCATCGAGACGAATTTGATCCGAAGTTACCAACAGGAG
AGAAAGAGGAAGTTCCAGGTAAACCAGGAATTAAGAATCCAGAAACAGGAGATGTAGTTAGACCACCGGTGATAGCGTA
ACAAAATATGGACCTGTAAAAGGAGACTCGATTGTAGAAAAAGAAGAAATTCATTTCGAGAAAGAACGTAAATTTAATCC
TGATTTAGCACCAGGGACAGAAAAAGTAAACAAGAGAAGGACAAAAAGGTGAGAAGACAATAACGACGCCAACACTAAAA
ATCCATTAACTGGAGAAATTATTAGTAAAGGTGAATCGAAAGAAGAAATCACAAAAGATCCAGTTAATGAATTAACAGAA
TTGGTGGCGAGAAAATACCGCAAGGTCTAAAGATATCTTTGATCGAAAACCTTACCAACAGATCAAAACGCAAAAAGTACC
AGGTAAACCAGGAATCAAGAATCCAGACACAGGAAAAGTGATCGAAGAGCCAGTGGATGATGTGATTAAACACGGACCAA
AAACGGGTACACCAGAAAACAAAACAGTAGAGATACCGTTTGAACAAAACGTGAGTTTAATCCAAAATTACAACCTGGT
GAAGAGCGAGTGAAACAAGAAGGACAACCAGGAAGTAAGACAATCACAAACCAATCACAGTGAACCCATTAAACAGGTGA
AAAAGTTGGCGAGGGTCAACCAACAGAAGAGATCACAAAACAACAGTAGATAAGATTGTAGAGTTCCGGTGGAGAGAAAC
CAAAAGATCCAAAAGGACCTGAAAACCCAGAGAAGCCGAGCAGACCAACTCATCCAAGTGGCCAGTAAATCCTAACAAT
CCAGGATTATCGAAAAGACAGAGCAAAACCAATGGCCAGTTTCATTCAATGGATAAAAATGATAAAGTTAAAAAATCTAA
AATTGCTAAAGAATCAGTAGCTAATCAAGAGAAAAACGAGCAGAATTACCAAAAACAGGTTTAGAAAGCACGCAAAAAG
GTTTGATCTTTAGTAGTATAATTGGAATTGCTGGATTAATGTTATTGGCTCGTAGAAGAAAGAAATTA

SEQ ID NO:50 sequência de polinucleotídeos

ATGGGCAAACGTAGACAAGGTCCTATTAAATAAAAAAGTGGATTTTTTACCTAACAAATTAACAAGTATTCTATAAGAAA
ATTCACCTGTTGGTACGGCCTCAATATTACTTGGTTTCGACACTTATTTTGGAGTAGTAGCCATGAAGCGAAAGCTGCAG
AAGAAAAACAAGTTGATCCCAATTACACAAGCTAATCAAAATGATAGTAGTGAAAGATCACTTGAAAACACAAATCAACCT
ACTGTAAACAATGAAGCACCAAGATGCTCTTCTACATTGCAAGCAGAAGAAGGAAGCAATGCAGAAGCACCGAATGTTCC
AACTATCAAAGCTAATTCAGATAATGATACACAAACACAATTTTCAGAAGCCCTACAAGAAATGACCTAGCTAGAAAAG
AAGATATCCCTGCTGTTTCTAAAAACGAGGAATTACAATCATCACAAACCAACACTGACAGTAAAAATAGAACCTACAAC
TCAGAACCTGTGAATTTAAATTATAGTTCTCCGTTTATGTCTTATTAAGCATGCCTGCTGATAGTTTCATCCAATAACAC
TAAAAATACAAATAGATATACCGCCAACCTACGGTTAAAGGTAGAGATAATTACGATTTTACGGTAGAGTAGATATCCAAA
GTAATCCTACAGATTTAAATGCGACAAATTTAACGAGATATAATTATGGACAGCCACCTGGTACAACAACAGCTGGTGCA
GTTCAATTTAAAAATCAAGTTAGTTTGTATAAAGATTTCGACTTTAACATTAGAGTAGCAAAACATCGTCAAAGTAATAC
AACTGGTGCAGATGGTTGGGGCTTTATGTTTCAGCAAGAAAGATGGGGATGATTTCCATAAAAAACGGTGGTATCTTACGTG
AAAAAGGTACACCTAGTGCAGCTGGTTTCAGAATTGATACAGGATATTATAAATACGATCCATTAGATAAAAATACAGAA
CAAGCTGGTCAAGGCTATAGAGGGTATGGGACATTTGTTAAAAATGACTCCCAAGGTAATACCTTCTAAAGTAGGATCAGG
TACTCCATCAACAGATTTTCTTAACCTACGCAGATAATACTACTAATGATTTAGATGGTAAATTCATGGTCAAAAAATTAA
ATAATGTTAATTTGAAATATAATGCTTCAAATCAAACCTTTACAGCTACTTATGCTGGTAAAACCTGGACGGCTACGTTA
TCTGAATTAGGATTGAGTCCAACCTGATAGTTACAATTTTTTAGTTACATCAAGTCAATATGGAAATGGTAATAGTGGTAC
ATACGCAGATGGCCTTATGAGAGCTGATTTAGATGGTGCAACATTGACATATACTCCTAAAGCAGTCGATGGAGACCCAA
TTACATCAACTAAGGAAATACCATTTAATAAAAAACCGCAATTTGATCCAACTTAGCGCCAGGTACAGAAAAAGTCGTT
CAAAAAGGTGAACCAGGAATTGAAACAACAACAACCAACCTTATGTCAATCCTAATACTGGAGAAAAAGTAGGTGAAGG
CACACCTACAACAAGATCACTAAACAACAGTGGATGAAATCGTTTCATTATGGTGGCGAAGAAATCAAGCCAGGACATA
AAGATGAATTTGATCCAAATGCACCGAAAGGTAGTCAACAACGCAACCAAGGTAAAGCCAGGAGTTAAAAATCCTGATACA
GGCGAAGTAGTCACACCACAGTGGATGATGTGACAAAAATATGGTCCAGTTGATGGAGATCCGATTGATCAACGGAAGA
AATTCCATTTCGACAAGAAACGTGAATTCATCTGATTTTAAACCAGGTGAAGAGCGTGTAAACAAAAAGGTGAACCAG
GAACAAAAACAATTACAACACCAACAACCTAAGAACCCATTAAACAGGGGAAAAAGTTGGCGAAGGTGAACCAACAGAAAA
ATAACAAAAACAACAGTAGATGAATTCACAGAATATGGTGGCGAAGAAATCAAGCCAGGCCATAAGGATGAATTTGATCC

FIGURA 2.18

GAACGCACCCGAAAGGTAGCCAAGAGGACGTTCCAGGTAAACCAGGAGTTAAAAATCCTGATACAGGCGAAGTAGTCACAC
 CACCAGTGGATGATGTGACAAAATATGGTCCAGTTGATGGAGATCCGATTACGTCAACGGAAGAAATTCGGTTTGATAAA
 AAACGCGAATTTGATCCAAACTTAGCGCCAGGTACAGAGAAAGTCGTTCAAAAAGGTGAACCAGGAACAAAAACAATTAC
 AACACCAACAACTAAGAACCCATTAAACAGGAGAAAAAGTTGGCGAAGGTGAACCAACAGAAAAATAACAAAAACAACAG
 TGGATGAAATCGTTTCATTATGGTGGCGAAGAAATCAAGCCAGGCCATAAGGATGAATTTGATCCAAATGCACCGAAAGGTAGCCAAAGAAGACGTTT
 AGCCAAGAGGACGTTCCAGGTAAGCCAGGAGTTAAAAATCCTGATACAGGCGAAGTAGTCACACCACCAGTGGATGATGT
 GACAAAATATGGTCCAGTTGATGGAGATCCGATTACGTCAACGGAAGAAATTCATTTCGACAAGAAACGTGAATTTCAATC
 CTGATTTTAAACCAGGTGAAGAGCGTGTAAACAAAAAGGTGAACCAGGAACAAAAACAATTACAACACCAACAACCTAAG
 AACCATTAAACAGGGGAAAAAGTTGGCGAAGGTGAACCAACAGAAAAATAACAAAAACAACCGTGGATGAAATCGTTTCA
 TTATGGTGGCGAAGAAATCAAGCCAGGCCATAAGGATGAATTTGATCCAAATGCACCGAAAGGTAGCCAAAGAAGACGTTT
 CAGGTAAACCAGGAGTTAAAAACCTGATACAGGCGAAGTAGTTACTCCACCAGTGGATGATGTGACAAAATATGGTCCA
 GTTATGATGGAGATCCGATTACGTCAACGGAAGAAATTCGGTTTGATAAAAAACGCGAATTTGATCCAAACTTAGCGCCAGG
 TACAGAGAAAGTCGTTCAAAAAGGTGAACCAGGAACAAAAACAATTACAACACCAACAACCTAAGAACCCATTAAACAGGAG
 AAAAAGTTGGCGAAGGTGAACCAACAGAAAAATAACAAAAACAACCGTGGATGAGATCGTTTCATTATGGTGGCGAAGAA
 ATCAAGCCAGGCCATAAGGATGAATTTGATCCGAACGCACCGAAAGGTAGTCAAACAACGCAACCGAGGTAAAGCCAGGAGT
 TAAAAATCCTGATACAGGCGAAGTAGTCACACCACCAGTGGATGATGTGACAAAATATGGTCCAGTTGATGGAGATCCGA
 TTACGTCAACCGAAGAAATTCGGTTTGATAAAAAACGCGAATTTGATCCAAACTTAGCGCCAGGTACAGAGAAAGTCGTT
 CAAAAAGGTGAACCAAGGAACAAAAACAATTACAACGCCAACCAACTAAGAACCCATTAAACAGGAGAAAAAGTTGGCGAAGG
 TGAACCAACAGAAAAATAACAAAAACAACCGTGGATGAGATTTGTTTATTATGGTGGTGAACAAATACCACAAGGTCATA
 AAGATGAATTTGATCCAAATGCACCTGTAGATAGTAAAACTGAAGTTCCAGGTAAACCAGGAGTTAAAAATCCTGATACA
 GGTGAAGTTGTTACCCACCAGTGGATGATGTGACAAAATATGGTCCGAAAGTTGGTAATCCAATCACATCAACGGAAGA
 GATTTCCATTTGATAAGAAACGTGTATTTAATCCTGATTTAAACCAGGTGAAGAGCGCGTTAAACAAAAAGGTGAACCAG
 GAACAAAAACAATTACAACACCAATATTAGTTAATCCTATTACAGGAGAAAAAGTTGGCGAAGGTAAATCAACAGAAAA
 GTCATAAAACAACCTGTTGACGAAATTTGTTGAGTATGGTCCAACAAAAGCAGAACCAGGTAAACCAGCGGAACCAGGTAA
 ACCAGCGGAACCAGGTAAACCAGCGGAACCAGGTAAACCAGCGGAACCAGGTACGCCAGCAGAACCAGGTAAACCAGCGG
 AACCAGGTAAACCAGCGGAACCAGGTAAACCAGCGGAACCAGGTAAACCAGCGGAACCAGGTAAACCAGCGGAACCAGGT
 ACGCCAGCAGAACCAGGTAAACCAGCGGAACCAGGTAAACCAGCGGAACCAGGTAAACCAGCGGAACCAGGTAAACCAGCGG
 AGAACAGGTAAACCAGCGGAACCAGGTACGCCAGCAGAACCAGGTAAACCAGCGGAACCAGGTACGCCAACACATACAG
 GTGCACCAGAACAAACCAATAGATCAATGCATTCAACAGATAATAAAAAATCAATTACCTGATACAGGTGAAAATCGTCAA
 GCTAATGAGGGAACCTTAGTCGATCTCTATTAGCAATTGTTCGATCATTGTTTCATATTTGGTCTGCTGTAAGGTAAGTAA
 TGAAAAATAA

SEQ ID NO:51 sequência de polinucleotídeos

ATGAAGAACTATATACATCTTATGGCACTTATGGATTTTACATCAAATAAAAAATCAATAACCCGACCCATCAACTATT
 CCAATTTTCAGCATCAGATACCTCAGTTATTTTGAAGAACTGATGGTGAGACTGTTTAAATCACCTTCAATATATG
 AAGTTATTAAAGAAATTTGGTGAATTCAGTGAACATCATTTCTATTGTGCAATCTTCATTTCCTTCAACAGAAGATCATGCA
 TATCAACTTGAAAGAACTGATTAGTGTAGACGATAATTTAGAAACCTTTGGTGGCTTTAAAGCTATCGTTTGTAAAG
 ACCTGCTAAAGGTACAACATATAAAATTTATTTTCGATTTGCTGATCGACATGCATACGAAGACTTTAAGCAATCTGATG
 CCTTAATGACCAATTTTCAAAAGACGCATTAAAGTCATTACTTTGGTTCAAGCGGACAACATTCAAGTTATTTTGAAGA
 TATCTATACCCAATAAAGAATAG

SEQ ID NO:52 sequência de polinucleotídeos

ATGTATTTATATACATCTTATGGGACTTACCAATTTTAAATCAAATTAACTTAATCATCAAGAACGTAGTTTATTTCA
 ATTTTCCACTAATGATTCCTCAATAATCTTAGAAGAGTCTGAGGGAATCAATCTTAAACATCCTAGTGCATATCAAG
 TGATTGATAGCACAGGTGAATTTAACGAACATCATTTTATAGTGCTATTTTGTCCCTACATCTGAAGATCATCGTCAA
 CAGCTAGAGAAAAATTTACTCGTAGACGTACCTTTAAGAAATTTTGGTGGTTTTAAAGCTATCGTTTATTTAAACC
 CACTGAGGGGTCTACCTACAAAATTTACTTTGGTTTTGCAAATCGAACAGCATATGAAGATTTCAAAGCTTCTGATATAT
 TTAATGAAACCTTTTCAAAAGATGCATTGAGCCAATACTTTGGTGCTAGTGGTCAACATTCCTAGCTACTTTGAAAGATAT
 TTATATCCAATAGAAGATCATTAA

SEQ ID NO:53 sequência de polinucleotídeos

ATGATTAACAGGGATAATAAAAAAGGCAATAACAAAAAAGGTATGATTTCAAATCGCTTAAACAAATTTTCGATTAGAAA
 GTATACTGTAGGAACGTCATCGATTTTAGTAGGTACGACATTGATTTTGGTCTAGGGAACCAAGAAGCTAAAGCTGCTG
 AAAACACTAGTACAGAAAAATGCGAAACAAGATGATGCAACGACTAGTGATAATAAAGAAGTAGTGTGCGAAACCTGAAAAAT
 AATTGACACAACAGAAATGATTCAACAAATCCAATTAAAGAAAGAAACAAATACTGATTACAAACCAGAAAGCTAAAGAAAG
 ATCAACTCAACAGTACTCAACAACAGCAAAATAACGTTACAGCTACAACCTGAAACTAAGCCTCAAAACATTGAAAAAG
 AAAATGTTAAACCTTCAACTGATAAAAACTGCGACAGAGAATACATCTGTTATTTAGAAGAGAAGAAAGCACCAATATAT
 ACAATAACGATGTAACTACAAAACCATCTACAAGTGAAATTCAAACAAAAACCACTACACCTCAAGAAATCTACAAATAT
 TGAAATTCACAACCGCAACCAACGCCTTCAAAAGTAGACAATCAAGTTACAGATGCAACTAATCCAAAAGAACCCAGTAA
 ATGTGTCAAAGAAGAACTTAAAAATAATCCTGAGAAATTAAGAAATTAGTTAGAAATGATAACAATACAGATCGTTTCA

FIGURA 2.19

ACTAAACCAGTTGCTACAGCTCCAACAAGTGTGACCCAAAACGATTAAATGCGAAAATGCGTTTTGTCAGTTGCACAACC
 AGCAGCAGTTGCTTCAAATAATGTAAATGACTTAATTACAGTTACGAAACAGACGATCAAAGTTGGCGATGGTAAAGATA
 ATGTGGCAGCAGCGCATGACGGTAAAGATATTGAATATGATACAGAGTTTACAATTGACAATAAAGTCAAAAAAGGCGAT
 ACAATGACGATTAATTATGATAAGAAATGTAATTCCTTCGGATTAAACAGATAAAAAATGATCCTATCGATATTACTGATCC
 ATCAGGAGAGGTCATTGCCAAAGGAACATTTGATAAAGCGACTAAGCAAAATCACATATACATTTACAGATTATGTAGATA
 AATATGAAGATATAAAAGCACGTTTAACTTTATACTCATATATTGATAAGCAAGCAGTACCTAATGAAACTAGTTTGAAT
 TTAACGTTTGCAACAGCAGGTAAAGAACTAGCCAAAACGTTTTCTGTTGATTATCAAGACCCAATGGTTCATGGTGATTC
 AAACATTCATCTATCTTTACAAAGTTAGATGAAAACAAAACAACTATTGAACAACAAATTTATGTTAATCCTTTGAAAA
 AAACAGCAACTAACACTAAAGTTGATATAGCTGGTAGTCAAGTAGATGATTATGGAAATATTAAACTAGGAAATGGTAGT
 ACCATTATTGACCAAAATACAGAAATAAAAGTTTATAAAGTTAACCTAATCAACAATTGCCTCAAAGTAATAGAATCTA
 TGATTTTAGTCAATACGAAGATGTAACAAGTCAATTTGATAATAAAAAATCATTAGTAATAATGTAGCAACATTGGATT
 TTGGTGATATTAATTACAGCTATATTATCAAAGTTGTTAGTAAATATACACCTACATCAGATGGCGAACTAGATATTGCT
 CAAGGTACTAGTATGAGAACAACCTGATAAATATGGTTATTATAATTATGCAGGATATTCAAACTTCATCGTAACTTCTAA
 TGACACTGGCGGTGGCGACGGTACTGTTAAACCTGAAGAAAAGTTATACAAAATTGGTGACTATGTATGGGAAGACGTTG
 ATAAAGACGGTGTCCAAGGTACAGATTCGAAAGAAAAGCCAATGGCAAACGTTTATAGTTACATTAACCTACCCGGACGGT
 ACTACAAAATCAGTAAGAACAGATGCTAACGGTCATTATGAATTCGGTGGTTTGAAAGACGGAGAACTTATACAGTTAA
 ATTCGAAACGCCAGCTGGATATCTTCCAACAAAAGTAAATGGAACAACCTGATGGTGAAAAAGACTCAAATGGTAGTTCTA
 TAACTGTTAAATTAATGGTAAAGATGATATGTCCTTTAGACACTGGTTTTTATAAAGAACCTAAATATAATCTTGGTGAC
 TATGTATGGGAAGATACAAATAAAGATGGTATCCAAGATGCTAATGAACCTGGTATCAAAGATGTTAAGGTTACATTA
 AGATAGTACTGGAAAAGTTATTGGTACAACCTACTACTGATGCCTCGGGTAAATATAAATTTACAGATTTAGATAATGGTA
 ACTATACAGTAGAATTTGAAACACCAGCAGGTTACACGCCAACGGTTAAAAATACTACAGCTGAAGATAAAGATTCTAAT
 GGTTTAACAACAACAGGTGTCATTAAAGATGCAGATAATATGACATTAGACAGTGGTTTCTATAAAACACCAAAATACAG
 TTTAGGTGATTATGTTTGGTACGACAGTAATAAAGACGGTAAACAAGATTCAACTGAAAAAGGTATCAAAGATGTTAAAG
 TTACTTTATTAATGAAAAAGGCGAAGTAATTGGAACAACATAAAACAGATGAAAATGGTAAATATCGTTTTCGATAATTTA
 GATAGCGGTAAATACAAAGTTATTTTTGAAAAGCCTGCTGGCTTAACACAAACAGTTACAAAACAACTGAAGATGATAA
 AGATGCCGATGGTGGCGAAGTTGACGTAACAAATACGGATCATGATTTTCATCTTGATAACCGGATACTTCGAAGAAG
 ATACATCAGACAGTGATTGACACTCAGACTGATGATTTCAGACTCAGACAGCGACTCAGATTTCAGACAGTGATTTCAGACTCA
 GATAGCGATTTCAGATTTCAGACAGCGACTCAGACTCAGATAGCGACTCAGACTCAGACAGCGACTCAGACTCAGATAGCGA
 CTCAGATTTCGGACAGCGATTTCAGACTCAGATAGCGACTCAGATTTCAGACAGCGATTTCAGACTCAGATAGCGACTCAGATT
 CAGACAGTGACTCAGACTCAGATAGCGACTCAGACTCAGACAGTGACTCAGACTCAGACAGCGATTTCAGATTTCAGATAGC
 GACTCAGATTTCGGACAGTGATTTCAGACTCAGATAGCGACTCAGATTTCAGACAGCGACTCAGACTCAGATAGCGACTCAGA
 CTCAGACAGTGATTTCAGACTCAGATAGCGATTTCGGACTTCGGATGCAGGAAAACATACACCTGTTAAACCAATGAGTACTA
 CTAAGACCATCACAAATAAAGCAAAAGCATTACCAGAAAACAGGTAGTGAAAATAACGGCTCAAATAACGCAACGTTATTT
 GGTGGATTATTTGTCAGCATTAGGTTTATTATTGTTATTTCGGTCGTCGCAAAAAACAAAACAAATAA

SEQ ID NO:54 sequência de polinucleotídeos

ATGATTAATAAAAAAATAATTTACTAATAAAAAAGAAACCTATAGCAAATAAATCCAATAAATATGCAATTAGAAAAATT
 CACAGTAGGTACAGCGTCTATTGTAATAGGTGCAACATTATTGTTTGGTTTAGGTCTAATGAGGCCAAAGCCGAGGAGA
 ATTCAAGTACAAGACGTTAAAGATTGCAATACGGATGATGAATTCAGACAGCAATGATCAGTCTAGTGATGAAGAAAAG
 AATGATGTGATCAATAATAATCAGTCAATAAACACCGACGATAATAACCAAATAATTAATAAAGAAAGAAACGAATAACTA
 CGATGGCATAGAAAAACGCTCAGAAGATAGAACAGAGTCAACAACAATGTAGATGAAAACGAAGCAACATTTTACAAA
 AGACCCCTCAAGATAATACTCATCTTACAGAAGAAGAGGTAAAAGAATCCTCATCAGTCGAATCCTCAAATTCATCAATT
 GATACTGCCCCAACCACTCTCACACAACAATAAATAGAGAAGAATCTGTTCAAACAAGTGATAATGTAGAAGATTACACA
 CGTATCAGATTTTGCTAACTCTAAAATAAAGAGAGTAACACTGAATCTGGTAAAGAAGAGAAATCTATAGAGCAACCTA
 ATAAAGTAAAGAAGATTCAACAACAAGTCAGCCGCTCTGGCTATACAAATATAGATGAAAAAATTTCAAATCAAGATGAG
 TTATTAATTTTACCAATAAATGAATATGAAAATAAGGCTAGACCATTATCTACAACATCTGCCCCAACCATCGATTAAACG
 TGTAACCGTAAATCAATTAGCGGCGGAACAAGGTTGGAATGTTAATCATTTAATTAAGTTACTGATCAAAGTATTACTG
 AAGGATATGATGATAGTGAAGGTGTTATTAAAGCACATGATGCTGAAAACCTTAATCTATGATGTAACCTTTTGAAGTAGAT
 GATAAGGTGAAATCTGGTGATACGATGACAGTGGATATAGATAAGAATAACAGTTCATCAGATTTAACCGATAGCTTTAC
 AATACCAAAAAATAAAGATAAATCTGGAGAAATCATCGCTACAGGTACTTATGATAACAAAAATAAACAAATCACCTATA
 CTTTTACAGATTATGTAGATAAGTATGAAAATATTAAAGCACACCTTAAATTAACGTATACATTGATAAATCAAAGGTT
 CCAAATAATAATACCAAGTTAGATGTAGAATATAAAACGGCCCTTTTCATCAGTAAATAAAACAATTACGGTTGAATATCA
 AAGACCTAACGAAAATCGGACTGCTAACCTTCAAAGTATGTTTACAAACATAGATACGAAAATCATACAGTTGAGCAAAA
 CGATTTATATTAACCTCTCTCGTTATTTCAGCCAAGGAACAAATGTAAATATTTTCAGGGAATGGTGATGAAGGTTCAACA
 ATTATAGACGATAGCACAAATAATTAAAGTTTATAAGGTTGGAGATAATCAAAATTTACCAGATAGTAACAGAATTTATGA
 TTACAGTGAATATGAAGATGTCACAAATGATGATTATGCCCAATTAGGAAATAATAATGATGTGAATATTAATTTTGGTA
 ATATAGATTACCATATATATTAAAGTTATTAGTAAATATGACCTAATAAGGATGATTACACGACTATACAGCAAACT
 GTGACAATGCAGACGACTATAAATGAGTATCTGGTGAGTTTGAACAGCATCCTATGATAATACAAATTTGCTTTCTCTAC
 AAGTTCAAGTCAAGGACAAGGTGACTTGCCCTCTGAAAAAAGCTTATAAAATCGGAGATTACGTATGGGAAGATGTAGATA
 AAGATGGTATTCAAAATACAAATGATAATGAAAAACCGCTTAGTAATGTATTGGTAACCTTTGACGTATCTGATGGAAC
 TCAAATCAGTCAGAACAGATGAAGATGGGAATATCAATTTGATGGATTGAAAAACGGATTGACTTATAAAATTACATT

FIGURA 2.20

CGAAACACCTGAAGGATATACGCCGACGCTTAAACATTTCAGGAACAAATCCTGCACTAGACTCAGAAGGTAATTCTGTAT
GGGTAATTAATGGACAAGACGATATGACGATTGATAGTGGATTTTATCAAACACCTAAATACAGCTTAGGGAACATAT
GTATGGTATGACACTAATAAAGATGGTATTCAAGGTGATGATGAAAAAGGAATCTCTGGAGTTAAAGTGACGTTAAAGA
TGAAACCGGAAATATCATTAGTACAACCTACAACCGATGAAAATGGAAAGTATCAATTTGATAATTTAAATAGTGGTAATT
ATATTGTTTCATTTTGATAAACCTTCAGGTATGACTCAAACAACAACAGATTCTGGTGTATGATGACGAACAGGATGCTGAT
GGGGAAGAAGTTTCATGTAACAATTACTGATCATGATGACTTTAGTATAGATAACGGTACTATGATGACGAATCGGATTC
CGATAGTGACTCAGACAGCGACTCAGATTCCGATAGTGATTTCAGACTCCGATAGCGACTCCGATTTCAGACAGCGACTCAG
ATTTCAGACAGCGACTCCGATTCTGATAGCGACTCCGATTTCAGACAGCGACTCAGACTCAGACAGTGATTTCAGATTTCAGAC
AGCGACTCAGATTCCGATAGTGATTTCAGACTCAGACAGCGACTCAGATTCTGATAGTGATTTCAGACTCAGACAGTGATTTC
AGATTTCAGACAGCGACTCAGATTCCGATAGTGATTTCAGACTCAGACAGCGACTCAGATTCCGATAGTGATTTCAGACTCAG
ACAGCGACTCAGATTCTGATAGTGATTTCAGACTCAGACAGTGATTTCAGATTCCGATAGTGATTTCAGACTCCGATAGCGAC
TCAGACTCCGATAGTGACTCAGATTCTGATAGTGATTTCAGACTCAGACAGTGATTTCGATTCCGATAGTGATTTCAGACTC
AGACAGCGACTCAGATTCTGATAGTGATTTCAGACTCAGACAACGACTCAGATTTAGGCAATAGCTTCAGATAAGAGTACAA
AAGATAAATTACCTGATACAGGAGCTAATGAAGATTATGGCTCTAAAGGCACGTTACTTGGAACCTCTGTTTGAGGTTTA
GGAGCGTTATTATTAGGGAACGTCGCAAAAATAGAAAAAATAAAAAATTAA

SEQ ID NO:55 sequência de polinucleotídeos

ATGTCTAATAATTTTAAAGATGACTTTGAAAAAATCGTCAATCGATAGACACAAATTCACATCAAGACCATACGGAAGA
TGTTGAAAAAGACCAATCAGAATTAGAATCAGGATACAATAGAGAATACGGAGCAACAGTTTCCGCCAAGAAATGCCC
AAAGAAGAAAAAGACGCCGTGATTTAGCAACGAATCATAAACAAGTTTCAATGAATCACAAACATCTGAAGACAAT
GTTCAAAATGAGGCTGGCACAATAGATGATCGTCAAGTCAATCATCACACAGTACTGAAAGTCAAGAACCTAGCCATCA
AGACAGTACACCTCAACATGAAGAGGAATATTATAAATAAGAATGCTTTTGCAATGGATAAATCACATCCAGAACCAATCG
AAGACAATGATAAACACGAGACTATTAAAGATGCAGAAAATAACACTGAGCATTCAACAGTTTCTGATAAGAGTATAGCT
GAACAATCTCAGCAACCTAAACCATATTTTGCAACAGGTGCTAACCAAGCAAATACATCAAAAGATAAACATGATGATGT
AACTGTTAAGCAAGACAAAGATGAATCTAAAGATCATATAGTGGTAAAAAAGGCGCAGCAATTGGTGCTGGAACAGCGG
GTGTTGCAAGTGACAGCTGGTGCAATGGGTGTTTCTAAAGCTAAGAAAACATTCAATGACGCTCAAAACAAAAGTAATTCT
GACAAGTCAATAAATCGACTGAGGATAAAGCGTCTCAAGATAAGTCTAAAGATCATCATAATGGCAAAAAAGGTGCAGC
GATCGGTGCTGGAACAGCAGGTTTGGCTGGAGGCGCAGCAAGTAAAGTGCTTCTGCCGCTTCAAAACCATGCCTCTA
ATAATGCAAGCCAAAACCATGATGAACATGACAATCATGACAGAGATAAAGAAGTAAAGAGGTGGCATGGCCAAAGTA
TTGTTACCATTAAATGACAGCTGTACTAATTATCGGTGCTATTAGCGATATTTGGAGGCATGGCATTAAACAATCATAATA
TGGTACAAAAGAAAAATAAAATCGCGAATACAAATAAAAAATAATGCTGATGAAAGTAAAGACAAAGACACATCTAAAGACG
CTTCTAAAGATAAATCAAAATCTACAGACAGTGATAAATCAAAAGAGGATCAAGACAAAGCGACTAAAGATGAATCTGAT
AATGATCAAAACAACGCTAATCAAGCGAACAATCAAGCACAAAATAATCAAAATCAACAACAAGCTAATCAAAATCAACA
ACAGCAACAACAACGCTCAAGGTGGTGGCCAAAGACATACAGTGAATGGTCAAGAAAACCTTATACCGTATCGCAATTCAAT
ACTACGTTTCAGGTTACCGGAAAATGTTGAAAAAATTAGACGTGCCAATGGTTTAAAGTGGTAACAATATTAGAAACGGT
CAACAATCGTTATTCCATAA

SEQ ID NO:56 sequência de polinucleotídeos

GTGATTGAATTAATTAATAATGGAAGGGATGATAGTTGTGTCTAATAATAATTTTAAAGATGATTTCGAAAAAGAAATCGTCA
ATCTATTAAATCCAGACGAACAGCAAAACAGAATTAAAAAGAGATGATAAAACAAATGAAAAATAAAAAAGAGCTGACTCTC
AAACAGTTTATCTAATAACTCAAATCAACAATTTCTCCGAGAAATGCCAACGACGAAAAAGACGTAGAGAGACAGCA
ACTAATCAAAGCAAAACAAGACGACAAACATCAAAAAATAGTGACGCTAAAACCTACAGAAGGTTTCATTAGATGACCG
TTATGACGAAGCAGGTTACAGCAACAACATGATAAATCGCAACAACAATAAAACTGAAAAACAATCACAAGATAATA
GAATGAAAGATGGAAGAGATGCAGCTATTGTAAATGGAACATCTGAGTCACCAGAACATAAATCAAAATCAACACAAAAT
AGACCCGGCCCTAAAGCTCAACAACAAGCGTAAATCAGAAAGTACGCAATCAAAACCGTCAACAAAACAAGATAAAAA
AGCAGCTACAGGTGCTGGAATAGCTGGTGCAGCTGGTGTGCTGGTGCAGCAGAAACATCCAAACGTCATCATAATAAAA
AAGATAACAAGATTCTAAACACTCAAACCATGAGAATGACGAAAAATCTGTTAAAAATGATGACCAAAAGCAATCTAAA
AAAGGCAAAAAGCAGCAGTCCGCTGGCGCAGCTGCAGGAGTTGGTGCAGGCTGGTGTGCGCATCATAATAATCAAAA
TAAACATCATAATGAGGAAAAAATTTCTAATCAAAACAATCAGTACAATGACCAATCAGAAGGTAAGAAAAAAGGTGGTT
TCATGAAAACTTTGTTACCATTATAGCAGCCATTCTTATTCTAGGTGCAATAGCAATATTCGGTGGTATGGCTCTAAAT
AATCACAACGATAGTAAAAAGTGATGACCAAAAAATAGCGAATCAAAGTAAGAAAGACTCAGATAAAAAAGATGGTGCAGC
ATCCGAAGATAACAAAGACAAAAAATCTGATAGTAACAAAGACAAAAAATCTGATTCTGATAAGAACGAGATGATGACT
CTGATAATAGTTCTCAATCCTAACGCTACTTCACTAATAATAACGATAATGTAGCCAAATAAATACTCAAATTATACA
AACCAAAATCAACAAGATAATGCAAAACAAAAATAGCAATAATCAACAGGCAACTCAAGGTCAACAATCACATACAGTATA
CGGTCAAGAAAACCTTATATCGTATCGCCATACAAATATTATGGAGAAGGAAGTCAAGCTAACGTAGATAAAATTAACGTG
CGAATGGATTAAAGCAGTAATAATATTCTAATGGTCAACATTAGTTATTCTCAATAA

SEQ ID NO:57 sequência de polinucleotídeos

ATGAAAAATAAATGATAGCAAAATCTTTATTAAACAATAGCGGCAATTGGTATTACTACAACCTACAATTGCGTCAACAGC
AGATGCGAGCGAAGGATACGGTCCAAGAGAAAAAGAAACAGTGAGTATTAAATCACAATATCGTAGAGTACAATGATGGTA

FIGURA 2.21

CTTTTAAATATCAATCTAGACCAAAATTTAACTCAACACCTAAATATATTAAATTTCAAACATGACTATAATATTTTAGAA
TTTAACGATGGTACATTTCGAATATGGTGCACGTCCACAATTTAATAAACAGCAGCGAAAACCTGATGCAACTATTAAGAA
AGAACAAAATTTGATTCAAGCTCAAAATCTTTGTGAGAGAATTTGAAAAAACACATACTGTGAGTGCACACAGAAAAGCAC
AAAAGGCAGTCAACTTAGTTTCGTTTGAATACAAAGTGAAGAAAATGGTCTTACAAGAGCGAATTGATAATGTATTAAAA
CAAGGATTAGTGAGATAA

SEQ ID NO:58 sequência de polinucleotídeos

ATGAAAACACGTATAGTCAGCTCAGTAACAACAACACTATTGCTAGGTTCCATATTAATGAATCCTGTGCGCTAATGCCGC
AGATTCTGATATTAATATTTAAACCGGTACTACAGATATTGGGAAGCAATACTACAGTAAAAACAGGTGATTTAGTCACTT
ATGATAAAGAAAATGGCATGCACAAAAAAGTATTTTATAGTTTATCGATGATAAAAATCACAATAAAAAACTGCTAGTT
ATTAGAACGAAAGGTACCATTGCTGGTCAATATAGAGTTTATAGCGAAGAAGGTGCTAACAAAAGTGGTTTAGCCTGGCC
TTCAGCCTTTTAAAGGTACAGTTGCAACTACCTGATAATGAAGTAGCTCAAATATCTGATTACTATCCAAGAAAATTCGATTG
ATACAAAAGAGTATATGAGTACTTTAACTTATGGATTCAACGGTAATGTTACTGGTGATGATACAGGAAAAATTTGGCGGC
CTTATTGGTGCAAAATGTTTCGATTGGTCATACACTGAAATATGTTCAACCTGATTTCAAACAATTTTAGAGAGCCCAAC
TGATAAAAAGTAGGCTGGAAAGTGATATTTAACAATATGGTGAATCAAAATTTGGGGACCATATGATAGAGATTCTTGGGA
ACCCGGTATATGGCAATCAACTTTTCATGAAAAC TAGAAATGGTCTATGAAAGCAGCAGAGAACTTCCTTGATCCTAAC
AAAGCAAGTTCTCTATTATCTTCAGGGTTTTCCAGAGACTTCGCTACAGTTATTACTATGGATAGAAAAGCATCCAAACA
ACAAACAAATATAGATGTAATATACGAACGAGTTCGTGATGACTACCAATTGCATTGGACTTCAACAAATTTGGAAAGGTA
CCAATACTAAAGATAAATGGACAGATCGTTCTTCAGAAAGATATAAAATCGATTGGGAAAAAGAAGAAATGCAAAATTAA

SEQ ID NO:59 sequência de polinucleotídeos

ATACACATGAAAAATAAATATATCTCGAAGTTGCTAGTTGGGGCAGCAACAATTACTTTAGCTACAATGATTTCAAATGG
GGAAGCAAAAGCGAGTGAAAAACAGCAACAACCTTCAACTAAGCACCAACAACCTCAAACAACCTACGTAACAGATCAAC
AAAAAGCTTTTATCAAGTATTACATCTAAAGGTATCACAGAAGAACAACGTAAACCAATACATCAAAACATTACGCGAA
CACCAGAACCGTGCAAGAAGTATTCTCTGAATCACTTAAAGACAGCAAGAACCAGACCGAGCTGTTGCACAACAAAA
CGCTTTTACAAATGTTCTTAAAAATGATAACTTAACTGAACAAGAAAAAATAATTACATTGCACAAATTAAGAAAAACC
CTGATAGAAGCCAACAAGTTTGGGTAGAATCAGTACAATCTTCTAAAGCTAAAGAAGCTCAAATATTGAAAATGCGGAT
AAAGCAATTAAAGATTTCGAAGATAACAAGCACCACAGATAAATCAGCAGCATATGAAGCTAACTCAAATTAACCTAA
AGATTTACGCGATAAAAAATAACCGCTTTGTAGAAAAAGTTTCAATTGAAAAGCAATCGTTTCGTATGATGAGCGTGTGA
AATCAGCAATGATGCAATCTCAAATTAATGAAAAGATTCAATTGAAAACAGACGTTTAGCACAACGTGAAGTTAAC
AAAGCACCTATGGATGTAAAAGAGCATTTACAGAAACAATTAGACGCATTAGTAGCTCAAAAAGATGCTGAAAAGAAAGT
GGCGCCAAAAGTTGAGGCTCCTCAAATCAATCACCACAAATTTGAAAACCTAAAGCAGAATCACCAAAAGTTGAAGTCC
CTCAATCTAAATTATTAGGTTACTACCAATCATTAAAAAGATTCAATTAACCTATGTTTACAAGTATTTAACAGATACTTAT
AAAAGCTATAAAGAAAAATATGATACAGCAAAAGTACTACTATAAATACAGTACTATAAATACAAAGGTGCGATTGATCAAA
AGTATTAACAGTACTAGGTAGTGGTTCTAAATCTTACATCCAACCATTGAAAGTTGATGATAAAAACGGCTACTTAGCTA
AATCATATGCACAAGTAAGAACTATGTAAGTGAAGTCAATCAATACTGGTAAAGTATTATATACTTTCTACCAAAACCCA
ACATTAGTAAAAACAGCTATTAAAGCTCAAGAACTGCATCATCAATCAAAAATACATTAAAGTAATTTATTATCATTCTG
GAAATAA

SEQ ID NO:60 sequência de polinucleotídeos

ATGACAAAACATTATTTAAACAGTAAGTATCAATCAGAACAACGTTTCATCAGCTATGAAAAAGATTACAATGGGTACAGC
ATCTATCATTTTAGGTTCCCTTGTATACATAGGCGCAGACAGCCAACAAGTCAATGCGGCAACAGAAGCTACGAACGCAA
CTAATAATCAAAGCACACAAGTTTCTCAAGCAACATCACAACCAATTAATTTCCAAGTGCAAAAAGATGGCTCTTCAGAG
AAGTCACACATGGATGACTATATGCAACACCCCTGGTAAAGTAATTAACAAAATAATAAATATTATTTCCAAACCGTGTT
AAACAATGCATCATTCTGGAAAGAATACAAATTTTACAATGCAACAATCAAGAATTAGCAACAACCTGTTGTTAACGATA
ATAAAAAAGCGGATACTAGAACAATCAATGTTGCAGTTGAACCTGGATATAAGAGCTTAAGTACTAAAGTACATATTGTC
GTGCCACAAATTAATTACAATCATAGATATACTACGCATTTGGAATTTGAAAAAGCAATTCCTACATTAGCTGACGCAGC
AAAACCAACAATGTTAAACCGGTTCAACCAAAACAGCTCAACCTAAAACACCTACTGAGCAAACTAAAACAGTTCAAC
CTAAAGTTGAAAAAGTTAAACCTACTGTAACCTACAACAAGCAAGTTGAAGACAATCACTCTACTAAAGTTGTAAGTACT
GACACAACAAAAGATCAAACCTAAAACACAACTGCTCATACAGTTAAAACAGCACAACCTGCTCAAGAACAATAAAGT
TCAAACACCTGTTAAAGATGTTGCAACAGCGAAATCTGAAAGCAACAATCAAGCTGTAAGTGATAATAAATCACAACAAA
CTAACAAAAGTTACAAAACATAACGAAACGCCTAAACAAGCATCTAAAGCTAAAGAAATACCAAAAACCTGGTTTAACTTCA
GTTGATAACTTTATTAGCACAGTTGCCTTCGCAACACTTGCCCTTTTAGGTTTCATTATCTTTATTACTTTTCAAAGAAA
AGAATCTAAATAA

SEQ ID NO:61 sequência de polinucleotídeos

ATGAACAAACAGCAAAAAGAAATTTAAATCATTTTATTCAATTAGAAAGTCATCACTAGGCGTTGCATCTGTAGCGATTAG
TACACTTTTATTATTAATGTCAAATGGCGAAGCACAAGCAGCAGCTGAAGAAAACAGGTGGTACAAATACAGAAGCACAA
CAAAAACCTGAAGCAGTTGCAAGTCCAACAACAACATCTGAAAAAGCTCCAGAACTAAACCAGTAGCTAATGCTGTCTCA

FIGURA 2.22

GTATCTAATAAAGAAGTTGAGGCCCTACTTCTGAAACAAAAGAAGCTAAAGAAGTTAAAGAAGTTAAAGCCCCTAAGGA
AACAAAAGCAGTTAAACCAGCAGCAAAAGCCACTAACAAATACATATCTTATTTGAATCAGGAACCTTAGAGAAGCGATTA
AAAACCCTGCAATAAAAGATAAAGATCATAGCGCACCAAACTCTCGTCCAATTGATTTTGAATGAAAAAGAAAATGGT
GAGCAACAATTTTATCATTATGCCAGCTCTGTTAAACCTGCTAGAGTTATTTTCACTGATTCAAAACCAGAAATTGAATT
AGGATTACAATCAGGTCAATTTTGGAGAAAATTTGAAGTTTATGAAGGTGACAAAAGTTGCCAATTAAATTAGTATCAT
ACGATACTGTTAAAGATTACGCTTACATTTCGCTTCTCTGTTTCAAATGGAAACAAAAGCCGTAAATTTGTAAGTTCAACT
CACTTCAATAACAAGAAGAAAAATACGATTACACATTAATGGAATTCGCACAACCAATTTATAACAGTGCAGATAAATT
CAAAACTGAAGAAGATTATAAAGCTGAAAAATATTAGCGCCATATAAAAAAGCGAAAACACTAGAAAAGACAAGTTTATG
AATTAATAAAAATTTCAAGATAAACTTCTGAAAAATTAAGGCTGAGTACAAGAAGAAATTAGAGGATACAAAGAAAGCT
TTAGATTGAGCAAGTGAATCAGCTATTACTGAATTCAAAATGTACAACCAACAAATGAAAAATGACTGATTTACAAGA
TACAAAATATGTTGTTTATGAAAGTGTGAGAATAACGAATCTATGATGGATACTTTTGTAAACACCCTATTAAACAG
GTATGCTTAACGGCAAAAAATATATGGTCATGGAAGTACTAATGACGATTACTGGAAGATTTCATGTTTGAAGGTCAA
CGTGTTAGAACTATAAGCAAAGATGCTAAAAATAATACTAGAACAAATTTTCCCATATGTTGAAGGTAAACTCTATA
TGATGCTATCGTTAAAGTTCACGTAAAAACGATTGATTATGATGGACAATACCATGTCAGAATCGTTGATAAAGAAGCAT
TTACAAAAGCCAATACCGATAAATCTAACAAAAAGAACACAAGATAAATCAGCTAAGAAGGAAGCTACTCCAGCTACG
CCTAGCAAAACCAACACCATCACCTGTTGAAAAAGAAATCACAAAAACAAGACAGCCAAAAAGATGACAATAACAATTACC
AAGTGTGAAAAAGAAAATGACGCATCTAGTGAGTCAGGTAAAGACAAAACGCCCTGCTACAAAACCAACTAAAGGTGAAG
TAGAATCAAGTAGTACAACCTCCAACCTAAGGTAGTATCTACGACTCAAAATGTTGCAAAAACCAACAACTGCTTCATCAAAA
ACAACAAAAGATGTTGTTCAAACCTCAGCAGGTTCTAGCGAAGCAAAAGATAGTGCTCCATTACAAAAGCAAACATTAA
AAACACAAATGATGGACACACTCAAAGCCAAAAACAATAAAAAATACACAAGAAAATAAAGCAAAATCATTACCACAACTG
GTGAAGAATCAAATAAAGATATGACATTACCATTAATGGCATTACTAGCTTTAAGTAGCATCGTTGCATTTCGTATTACCT
AGAAAACGTAAAAACTAA

SEQ ID NO: 62: sequência de polinucleotídeos

ATGAATAATAAAAGACAGCAACAAATAGAAAAGGCATGATACCAATCGATTAAACAAATTTTCGATAAGAAAGTATTC
TGTAGTACTGCTTCAATTTTAGTAGGGACAACTTGATTTTGGGTTAAGTGGTCATGAAGCTAAAGCGGCAGAACATA
CGAATGGAGAATTAAATCAATCAAAAAATGAAACGACAGCCCCAAGTGAGAATAAAACAACCTGAAAAAGTTGATAGTCGT
CAACTAAAAGACAATACGCAAACTGCAACTGCAGATCAGCCTAAAGTGCAATGAGTGATAGTGCAACAGTTAAAGAAAC
TAGTAGTAACATGCAATCACCACAAAACGCTACAGCTAGTCAATCTACTACACAACTAGCAATGTAACAAACAAGATATA
AATCATCAACTACATATAGTAATGAACTGATAAAAGTAATTTAACACAAGCAAAAACGTTTCACTACACCTAAAACA
ACGACTATTAAACAAAGAGCTTTAAATCGCATGGCAGTGAATACTGTTGCAGCTCCACAACAAGGAACAAATGTTAATGA
TAAAGTACATTTTACGAACATTGATATTGCGATTGATAAAGGACATGTTAATAAAACAACAGGAAATACTGAATTTTGGG
CAACTTCAAGTGATGTTTTAAAATTTAAAGCGAATTACACAATCGATGATTCTGTTAAAGAGGGCGATACATTTACTTTT
AAATATGGTCAATATTTCCGTCCAGGTTCTGTAAGATTACCTTCACAACTCAAAATTTATATAATGCCCAAGGTAATAT
TATTGCAAAAGGTATTTACGATAGTAAACAATAACAACAGTATACTTTTACGAATTTATGATAGTCAATACACAAATG
TTAGCGGTAGCTTTGAACAAGTCGCAATTTGCGAAACGTGAAAATGCAACAACCTGATAAACTGCTTATAAAATGGAAGTA
ACTTTAGGTAATGATACATATAGTAAAGATGTCATTGTGCGATTATGGTAATCAAAAAGGTCAACAACCTTATTTGAGTAC
AAATTATATTAATAATGAAGATTGTGTCAGTAATATGACTGTTTATGTAATCAACCTAAAAAGACCTATACAAAAGAAA
CATTTGTAACAAATTTAACTGGTTATAAATTTAATCCAGATGCTAAAAACTTCAAAATTTACGAAGTGACAGATCAAAAT
CAATTTGTGGATAGTTTACCCCGATACCTTCAAACTTAAAGATGTTACTGGTCAATTCGATGTTATTTATAGTAATGA
TAATAAGACCGCGACAGTAGATTTATGTAATGGTCAATCTAGTAGTGATAAACAGTACATCATTCAACAAGTTGCTTATC
CAGATAATAGTTCAACAGATAATGGGAAAATTTGATTATACTTTAGAAAACACAAAATGGAAAAAGTAGTTGGTCAAACAGT
TATTTCAATGTGAATGGCTCATCAACTGCAATGGCGACCAAAAGAAATATAATCTAGGTGACTATGTATGGGAAGATAC
AAATAAAGATGGTAAACAAGATGCCAATGAAAAAGGATTAAAGGTGTTTATGTCATTCTTAAAGATAGTAACGGTAAAG
AATTAGATCGTACGACAACAGATGAAAATGGTAAATATCAGTTCACTGGTTTAAAGCAATGGAACCTTATAGTGTAGAGTTT
TCAACACCAGCCGGTTATACACCGACAACCTGCAATGCAGGTACAGATGATGCTGTAGATTCTGATGGACTAACTACAAC
AGGTGTCATTAAAGACGCTGACAACATGACATTAGATAGTGGATTCTACAAAACACCAAAATATAGTTTAGGTGATTATG
TTTGGTACGACAGTAATAAAGATGGTAAACAAGATTGCAATGAAAAAGGAATTAAGGTGTTTAAAGTTACTTTGCAAAAC
GAAAAAGCGGAAGTAATTTGGTACAACCTGAAACAGATGAAAATGGTAAATACCGCTTTGATAATTTAGATAGTGGTAAATA
CAAAGTTATCTTTGAAAAGCCTGCTGGTTTAACTCAAACAGGTACAAATACAACCTGAAGATGATAAAGATGCCGATGGTG
GCCAAGTTGATGTAACAATTACGGATCATGATGATTTACACTTGATAATGGCTACTACGAAGAAGAAACATCAGATAGT
GACTCAGATTCCGGACAGCGATTACAGCTCAGATAGCGACTCAGATTACAGATAGTGACTCAGACTCAGATAGCGACTCAGA
CTCAGATAGCGACTCAGACAGCGACTCAGACTCAGATAGTGATTACAGATTCCGGACAGCGACTCAGATTACAGACAGCGAAT
CAGATTCCGATAGCGACTCAGACTCAGATAGCGACTCAGACAGCGACTCAGATTACAGACAGTGACTCAGACTCAGACAGC
GACTCAGATTACAGACAGCGATTACAGATTCCGGATAGCGACTCAGATTACAGATAGCGATTCCGGACTCAGACAACGACTCAGA
TTCTGACAGCGATTACAGACTCAGATAGCGACTCAGATTACAGACAGCGACTCAGATTACAGACAGCGATTACAGATTACAGATA
GCGATTACAGATTACAGACAGCGACTCAGATTACAGATAGCGACTCAGACTCAGACAGCGATTACAGACTCAGATAGCGACTCA
GACAGCGATTACAGATTCCGATAGCGATTACAGATTACAGATGCAAGTAAACATACTCCGACTAAACCAATGAGTACGGTTAA
AGATCAGCATAAACAGCTAAAGCATTACCAGAAACAGGTAGTGAAAATAATAATTCAAATATGGCACATTATTCCGGTG
GATTATTCCGGCGCATTAGGATCATTATTGTTATTCCGGTCGTCGTAAAAACAAAATAAATAA

FIGURA 2.23

SEQ ID NO: 63: sequência de polinucleotídeos

ATGAATATGAAGAAAAAGAAAAACACGCAATTTCGGAAGAAATCGATTGGCGTGGCTTCAGTGCCTTGTAGGTACGTTAAAT
 CGGTTTTGGACTACTCAGCAGTAAAGAAGCAGATGCAAGTGAAATAGTGTACGCAATCTGTAGAGCGCAAGTAACGAAA
 GCAAAAGTAATGATTCAAGTAGCGTTAGTGCTGCACCTAAAAACAGACGACACAAACGTGAGTGATACTAAAAACATCGTCA
 AACACTAATAATGGCGAAACGAGTGTGGCGCAAAATCCAGCACAAACAGGAAACGACACAATCATCATCAACAAATGCAAC
 TACGGAAGAAACGCCGGTAACGTGTAAGCTACTACTACGACAACGAATCAAGCTAATACACCGGCAACAACCTCAATCAA
 GCAATACAAATGCGGAGGAATTAGTGAATCAAAACAAGTAATGAAACGACTTCTAATGATACTAATACAGTATCATCTGTA
 AATTCACCTCAAAATCTACAAATGCGGAAAAATGTTTCAACAACGCAAGATACTTCAACTGAAGCAACACCTTCAAAACA
 TGAATCAGCTCCACAGAATACAGATGCAAGTAATAAGATGTAGTTAGTCAAGCGGTTAATCCAAGTACGCCTAGAATGA
 GGCATTTAGTTTAGCGGCAGTAGCTGCAGATGCACCGGCAGCTGGCACAGATATTACGAATCAGTTGACAGATGTGAAA
 GTTACTATTGACTCTGGTACGACTGTGTATCCGACCAAGCAGGTTATGTCAAACCTGAATTTATGGTTTTTTCAGTGCCTAA
 TTCTGCTGTTAAAGGTGACACATTCAAAATAACTGTACCTAAAGAATTAACTTAAATGGTGTAACTTCAACTGCCTAAAG
 TGCCACCAATTATGGCTGGAGATCAAGTATTGGCAAATGGTGTAAATCGATAGTGGTAATGTTTATATACATTTACA
 GACTATGTTGATAATAAGAAAAATGTAACAGCTAATATTACTATGCCAGCTTATATTGACCCTGAAAAATGTTACAAAGAC
 AGGTAATGTGACATTGACAACCTGGCATAGGAACCAATACTGCTAGTAAGACAGTATTAATCGACTATGAGAAATATGGAC
 AATTCATAATTTATCAATTAAGGTACGATTGATCAAAATCGATAAAACAAATAATACGTATCGCCAAACAATTTATGTC
 AATCCAAGCGGAGATAACGTTGTGTTACCTGCCTTAACAGGTAATTTAATTCCTAATACAAAGAGTAATGCGTTAATAGA
 TGCAAAAAACACTGATATTAAAGTTTATAGAGTCGATAATGCTAATGATTTATCTGAAAGTTATTATGTGAATCCTAGCG
 ATTTTGAAGATGTAACATAATCAAGTTAGAATTTCAATTTCCAAATGCTAATCAATACAAAGTAGAATTTCTTACGGACGAT
 GACCAATTAACAACACCGTATATTGTAGTTGTTAATGGCCATATTGATCCTGCTAGTACAGGTGATTTAGCACTACGTTTC
 GACATTTTATGGTTATGATTCTAATTTTATATGGAGATCTATGTCTATGGGACAACGAAGTAGCATTTAATAACGGATCAG
 GTTCTGGTGACGGTATCGATAAACAGGTTGTTCTGAACAACCTGATGAGCCTGGTGAAATTGAACCAATTCAGAGGAT
 TCAGATTCTGACCCAGGTTTCAGATTCTGGCAGCGATTCTAATTCAGATAGCGGTTTCAGATTCTGGCAGTGATTCTACATC
 AGATAGTGGTTTCAGATTTCAGCGAGTGATTTCAGATTTCAGCAAGTGATTTCAGACTCAGCGAGTGATTTCAGATTTCAGCAAGTG
 ATTTCAGATTTCAGCAAGTGATTTCAGATTTCAGCAAGTGATTTCAGACTCAGCAAGTGATTTCAGATTTCAGCAAGTGATTTCAGAT
 TCAGCAAGCGATTTCAGATTTCAGCGAGCGATTTCAGATTTCAGCGAGCGATTTCAGATTTCAGCGAGTGATTTCGACTCAGCGAG
 CGATTTCAGACTCAGATAGTGACTCAGATTCCGATAGCGATTTCGACTCAGATAGCGACTCAGATTTCAGACAGCGATTTCG
 ACTCAGACAGCGATTTCGACTCAGACAGTGACTCAGATTCCGATAGCGATTTCGACTCAGACAGTGACTCAGATTTCGCGAT
 AGCGATTTCAGATTTCAGACAGTGATTTCAGACTCAGATAGCGATTTCAGATTTCGACAGTGACTCAGACTCAGACAGCGATTTC
 AGATTCCGATAGCGATTTCAGATTTCGACAGTGACTCAGATTTCGATAGCGATTTCGATAGCGATTTCAGACTCAGACAGCGATTTC
 ATAGCGATTTCAGAATCAGATAGTGACTCAGACTCAGACAGTGATTTCAGATTTCAGATAGTGACTCAGACTCAGACAGCGATTTC
 TCAGAATCAGATAGTGACTCCGATTTCAGACAGCGATTTCAGAATCAGATAGTGACTCCGATTTCAGATAGCGATTTCGCGATTTC
 AGCGAGTGATTTCAGACTCAGGTAGTGACTCCGATTTCATCAAGTGATTTCAGATTTCGATTTCACAGAGTGACACAGGATCAG
 ACAACGACTCAGACAGTGATTTCAAATAGCGATTTCGAGTCAGGTTCTAACAATAATGTAGTTCCGCCTAATTCACCTAAA
 AATGGTACTAATGCTTCTAATAAAAAATGAGGCTAAGATAGTAAAGAACCATTACCAGATACAGGTTCTGAAGATGAAGC
 GAATACGTCATAATTTGGGGATTATTAGCATCATTAGGTTCAATTACTACTTTTCAGAAGAAAAAAGAAAAATAAGATA
 AGAAATAA

SEQ ID NO: 64: sequência de polinucleotídeos

GTGAAAAACAATCTTAGGTACGGCATTAGAAAAACATAAATTTGGGAGCAGCATCAGTATTCTTAGGAACAATGATCGTTGT
 TGGGATGGGACAAGATAAAGAAGCTGCAGCATCAGAACAAAAGACAACCTACAGTAGAAGAAAAATGGGAATTCAGCTACTG
 ATAATAAAAACAAGTGAAACACAAACAACTGCTACTAACGTTAATCATATAGAAGAACTCAATCATATAACGCAACAGTA
 ACAGAACCAACCGTCAAACGCAACACAAAGTAACAACTGAAGAAGCACCACCAAGCAGTACAAGCACCACAACTGCACAACC
 AGCAATGTAGAAACAGTTAAAGAAGAAGAGAAACCTCAAGTTAAGGAACGACACAACTCAAGACAATAGCGGAATC
 AAAGACAAGTAGATTTAACACCTAAAAAGGTTACACAAAATCAAGGGACAGAAACACAAGTTGAAGTGGCACAGCCAAAGA
 ACCGCATCAGAAAGTAAGCCACGTGTGACAAGATCAGCAGATGTAGCGGAAGCTAAGGAAGCTAGTGACGTTTCAGAAGT
 TAAAGGCACAGATGTTACAAGTAAAGTTACAGTAGAAAGTGGTTCTATTGAGGCACCTCAAGGAAATAAAGTAGAGCCAC
 ATGCTGGTCAACGTGTCGTATTGAAATACAAATTGAAATTCGCAGATGGATTAAAAAGAGGAGATTATTTTGATTTTACA
 TTATCAAAATAATGTAAATACTTATGGGGTTTCAACAGCTAGAAAGGTACCAGAGATTAAAAATGGCTCAGTTGTAATGGC
 TACAGGTGAGATCTTAGGGAATGGTAACATAAGATATACATTTACTAACGAAATTGAACACAAGGTAGAGGTAACAGCTA
 ATTTAGAAATCAACTTATTTATGACCCTAAAACTGTACAAAGCAATGGAGAACAAAAGATTACTTCTAAATTAATGGT
 GAAGAAACAGAAAAACAATACCAGTTGTTTATATAATCCAGGTGTTAGCAATAGTTATACAAATGTAAATGGATCAATTGA
 AACATTTAATAAAGAATCTAATAAATTTACACATATAGCTTATATTAAAGCCAATGAATGGAAACAGTCAAACTGTAT
 CAGTAACAGGGACGTTGACTGAAGGTAGTAATTTAGCTGGTGGACAACCTACTGTTAAAGTATATGAATATCTAGGGAAA
 AAAGATGAATTTGCCACAAAGTGTATTGCAAATACATCAGATACTAACAAATTCAAAGATGTAACAAAGGAAATGAATGG
 AAAATTGAGTGTGCAAGACAATGGTAGTTACTCATTGAATTTAGATAAGTTGGATAAAACGTATGTCATTTCATTATACAG
 GTGAATATTTGCAAGGGTCAGATCAGGTTAATTTTAGAAGTGAATTTATGGGTATCCAGAACGAGCATATAAATCTTAC
 TATGTTTATGGGGGATATCGTTTAACTTGGGATAATGGTTTATGTTTATATAGCAATAAAGCTGACGGCAATGGTAAAAA
 TGGACAAATTTATCAAGATAATGATTTTGAATATAAAGAAGATACTGCAAAAGGAACCTATGAGCGGGCAGTACGATGCCA
 AGCAATTTATGAAACAGAAGAAAAATCAAGACAATACACCGCTTGACATTGATTACCACACAGCTATAGATGGTGAGGGT

FIGURA 2.24

GGTTATGTTGATGGGTATATTGAAACAATAGAAGAAACGGATTTCATCAGCTATTGATATCGATTACCATACTGCTGTGGA
TAGTGAAGTGGGTACGTTGGAGGATACACTGAGTCTCTGAGGAATCAAATCCAATTGACTTTGAAGAATCGACACATG
AAAATTCAAACATCACGCTGATGTTGTTGAATATGAAGAGGATACAAATCCAGGTGGTGGCCAAAGTAACAACCTGAGTCT
AACTTAGTTGAATTTGACGAAGAGTCTACAAAAGGTATTGTAAGTGGCGCAGTGAGCGACCATAACAACATTGAAGATAC
GAAAGAAATATACGACTGAAAGTAATCTGATTGAACCTAGTAGATGAACCTGAAAGAACATGGTCAAGCACAAGGACCAA
TCGAGGAAATTAAGTGAACCAATCATCATATTTCTCATTTCTGGTTTAGGAACCTGAAAATGGTCACGGTAATTATGGCGTG
ATTGAAGAAATCGAAGAAATAGCCACGTTGATATTAAGAGTGAATTAGGTTACGAAGGTGGCCAAAATAGCGGTAACCA
GTCATTTCGAGGAAGACACAGAAGAAGACAAACCTAAATATGAACAAGGTGGCAATATCGTAGATATCGATTTTCGACAGTG
TACCTCAAATTCATGGTCAAATAAAGGTGACCAGTCATTGGAAGAAGATACAGAGAAAGACAAGCCTAAATATGAACAT
GGCGGTAATATCATTTGATATCGACTTCGACAGTGTGCCACAAATTCATGGATTCAATAAGCATAATGAATTTATTGAAGA
AGATACAAACAAAGATAAACCTAATTTATCAATTCGGTGGACACAATAGTGTGACTTTGAAGAAGATACACTTCCAAAAG
TAAGCGGCCAAAATGAAGGTCAACAACGATTGAAGAAGATACAACGCCGCCAACGCCACCGACACCAGAAGTACCGAGT
GAGCCGAAAACACCAATGCCACCGACACCAGAAGTACCGAGTGAGCCGGAACACCAACGCCACCAACACCAGAGGTACC
AAGTGAGCCGGAACACCAACACCACCGACTCCGGAAGTACCAAGTGAGCCGGAACACCAACACCACCGACACCAGAAG
TGCCGAGTGAGCCAGAAACACCAACACCAGGAGGTACCGAGTGAACCTGGTAAACAGTACCACCCGCAAAA
GAAGAACCTAAAAAGCCTTCTAAACAGTGGAAACAAAGGTAAAGTAGTAACACCTGTTATTGAAATCAATGAAAAGGTTAA
AGCAGTGGCACCAACTAAAAAGCACAACTCTAAGAAATCTGAACCTGAAACAGGTGGAGAAGAATCAACAAACAAAG
GTATGTTGTTCCGGCGGATTATTACGACTTCTAGGTTTAGCATTATTACGCAGAAATAAAAAAGAAATAACAAAGCATAA

SEQ ID NO: 65: sequência de polinucleotídeos

TTGAAAAAAGAATTGATTATTTGTCGAATAAGCAGAAATAAGTATTTCGATTAGACGTTTTTACAGTAGGTACCACATCAGT
AATAGTAGGGGCACTATACTATTTGGGATAGGCAATCATCAAGCACAAGCTTCAGAACAATCGAACGATACAACGCAAT
CTTCGAAAAATAATGCAAGTGCAGATTCCGAAAAAAACAATATGATAGAAACACCTCAATTAAATACAACGGCTAATGAT
ACATCTGATATTAGTGCAACACAAACAGTGCAGTGTAGATAGCACAACAAAACCAATGTCTACACAAAACGAGCAATAC
CACTACAACAGAGCCAGCTTCAACAATGAAACACCTCAACCGACGGCAATTAAAAATCAAGCAACTGCTGCAAAAATGC
AAGATCAAATGTTCTCAAGAAGCAAATTTCTCAAGTAGATAATAAAACAACGAATGATGCTAATAGCATAGCAACAAAC
AGTGAGCTTAAAAATTCTCAACATTAGATTACCACAATCATCACCACAAACGATTTCCAATGCGCAAGGAAGTAGTAA
ACCAAGTGTTAGAACGAGAGCTGTACGTAGTTTAGCTGTTGCTGAACCGGTAGTAAATGCTGCTGATGCTAAAGGTACAA
ATGTAATGATAAAGTTACGGCAAGTAATTTCAAGTTAGAAAAGACTACATTTGACCCTAATCAAAGTGGTAACACATTT
ATGGCGGCAAAATTTACAGTGACAGATAAAGTGAAATCAGGGGATTATTTTACAGCGAAGTTACCAGATAGTTTAACTGG
TAATGGAGACGTGGATTATTCTAATTCAAATAATACGATGCCAATTGTCAGACATTAAAGTACGAATGGCGGATGTTGTAT
CTAAAGCAACATATGATATCTTGACTAAGACGTATACATTTGTCTTTACAGATTATGTAAATAATAAAGAAATATTAAC
GGACAATTTTCATTACCTTTATTTACAGACCGAGCAAAAGGCACCTAAATCAGGAACATATGATGCGAATATTAATATTGC
GGATGAAATGTTTAATAATAAAATTACTTATAACTATAGTTCCGCAATTGCAGGAATTGATAAACCAAAATGGCGCGAACA
TTTCTTCTCAAATATTGTTGTAGATACAGCTTCAGGTCAAAACACATACAAGCAACAGTATTTGTTAACCCCTAAGCAA
CGAGTTTATAGGTAATACGTGGGTGTATATTAAAGGCTACCAAGATAAAATCGAAGAAAGTAGCGGTAAAGTAAGTGCTAC
AGATACAAAACCTGAGAATTTTGAAGTGAATGATACATCTAAATTATCAGATAGCTACTATGCAGATCCAAATGACTCTA
ACCTTAAAGAAGTAACAGACCAATTTAAAAATAGAATCTATTATGAGCATCCAAATGTAGCTAGTATTAAATTTGGTGAT
ATTACTAAAACATATGTAGTATTAGTAGAAGGGCATTACGACAATACAGGTAAGAACCTTAAAACTCAGGTTATTCAAGA
AAATGTTGATCCTGTACAAATAGAGACTACGATTTTTCGGTTGGAATAATGAGAATGTTGTACGTTATGGTGGTGGAA
GTGCTGATGGTGATTGAGCAGTAATCCGAAAGACCCAACTCCAGGGCCGCGGTGACCCAGAACCAAGTCCAGACCCCA
GAACCAGAACCAACGCCAGATCCAGAACCAGTCCAGACCCAGAACCGGAACCAAGCCAGACCCGGATCCGGATTCCGGA
TTCAGACAGTGAAGTCCAGGCTCAGACAGCGACTCAGGTTCAGATAGCGACTCAGAATCAGATAGCGATTCCGATTCCAGACA
GTGATTCCAGATTCCAGACAGCGACTCAGAATCAGATAGCGATTCCAGAATCAGATAGCGACTCAGATTCCAGATAGCGATTCA
GATTCCAGATAGCGATTCCAGAATCAGATAGCGATTCCGATTCCAGACAGTGAATCAGATTCCAGACAGCGACTCAGAATCAGA
TAGCGACTCAGAATCAGATAGTGAATCAGATTCCAGACAGTGAATCAGATTCCAGACAGTGAATCAGATTCCAGATAGCGATT
CAGACTCAGATAGCGATTCCAGACTCAGACAGCGATTCCAGATTCCAGACAGCGACTCAGAATCAGACAGCGACTCAGACTCA
GATAGCGACTCAGACTCAGACAGCGACTCAGATTCCAGATAGCGATTCCAGACTCAGACAGCGACTCAGACTCAGACAGCGA
CTCAGACTCAGATAGCGATTCCAGACTCAGACAGCGACTCAGATTCCAGATAGCGATTCCGACTCAGACAGCGATTCCAGATT
CAGACAGCGACTCAGACTCCGATAGCGATTCCAGATTCCAGACAGCGACTCAGACTCCGATAGCGATTCCGACTCAGACAGCGATTCCAGATT
GACTCCGATTCAAGAGTTACACCACCAATAATGAACAGAAAGCACCATCAAACTCTAAAGGTGAAGTAAACCAATTCTAA
TAAGGTATCAAAACAACAAAACCTGATGCTTTACAGAAACAGGAGATAAGAGCGAAAAACAAATGCAACTTTATTG
GTGCAATGATGGCATTATTAGGATCATTACTATTGTTTAGAAAACGCAAGCATATAAAGAAAAAGCGTAA

SEQ ID NO: 66: sequência de polinucleotídeos

ATGAAAAAGCAAATAATTTTCGCTAGGCGCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTTACATGGGATAACAAAGCAGATGCGAT
AGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAATCAAGAGTGAATGAGAAAAGTAAAAAGGGAGCTACTGTTTCAGATTATTACTATT
GGAAAATAATTGATAGTTTATAGAGGCACAAATTTACTGGAGCAATAGACTTATTGGAAGATTATAAATATGGAGATCCTATC
TATAAAGAAGCGAAAGATAGATTGATGACAAGAGTATTAGGAGAAGACCAGTATTTATTAAAGAAAAAGATTGATGAATA
TGAGCTTTATAAAAAGTGGTATAAAAGTTCAAATAAGAACACTAATATGCTTACTTTCCATAAATATAATCTTTACAATTT

FIGURA 2.25

TAACAATGAATGAATATAACGATATTTTAACTCTTTGAAAGATGCAGTTTATCAATTTAATAAAGAAGTTAAAGAAATA
 GAGCATAAAAATGTTGACTTGAAGCAGTTTGATAAAGATGGAGAAGACAAGGCAACTAAAGAAGTTTATGACCTTGTTC
 TGAAATTGATACATTAGTTGTAACTTATTATGCTGATAAGGATTATGGGGAGCATGCGAAAGAGTTACGAGCAAACTGG
 ACTTAATCCTTGGAGATACAGACAATCCACATAAAATTACAAATGAGCGTATAAAAAAGAAATGATCGATGACTTAAAT
 TCAATTATAGATGATTTCTTTATGGAGACTAAACAAAATAGACCGAATTCCTATAACAAAATATGATCCAACAAAACACAA
 TTTTAAAGAGAAGAGTGAAAATAAACCTAATTTTGATAAATTAGTTGAAGAAAACAAAAAAGCAGTTAAAGAAGCAGACG
 AATCTTGGAAAAATAAACTGTCAAAAAATACGAGGAAACTGTAACAAAATCTCCTGTTGTAAAAGAAGAGAAGAAAGTT
 GAAGAACCTCAATTACCTAAAGTTGGAAACCAGCAAGAGGTTAAAACTACGGCTGGTAAAGCTGAAGAAACAACACAACC
 AGTGGCACAGCCATTAGTAAAAATTCACAAGAAACAATCTATGGTGAAACTGTAAAAGGTCGAGAATATCCAACGATGG
 AAAATAAAACGTTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCTGATTTTCTAACAATGGAACAAAACAGACCATCTTTAAGCGAT
 AATTATACTCAACCGACGACACCGAACCCCTATTTTGAAGGTCTTGAAGGTAGCTCATCTAACTTGAAATAAAACCACA
 AGGTACTGAATCAACGTTGAAGGTATTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAACAG
 AAGCTTCTCAATATGGTCCGAGACCGCAATTTAACAAAACACCTAAGTATGTGAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATC
 CGTGAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAGTGAAACAAAATGCATACAACGT
 AACGACAAATCAAGATGGCACAGTATCATACGGAGCTCGCCCAACACAAAACAGCCAAGTGAAACAAAACGCATATAACG
 TAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATACGGTGTCTGCCCAACACAAAAAAGCCAAGCAAAAACAAATGCATATAAC
 GTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAAAAGCCAAGCAAAAACAAATGCATATAA
 CGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATACGGAGCTCGCCCGACATACAAGAAGCCAAGCGAAACAAATGCATACA
 ACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAAAAGCCAAGCGAAACAAACGCATAT
 AACGTAACAACACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGGCCTAGAGTAACAAAATAA

SEQ ID NO: 71: sequência de polinucleotídeos

GTGAAAAGCAATCTTAGATACGGCATAAGAAAAACAAATTGGGAGCGGCCTCAGTATTCTTAGGAACAATGATCGTTGT
 TGGAAATGGGACAAGAAAAAGAAGCTGCAGCATCGGAACAAAACAATACTACAGTAGAGGAAAGTGGGAGTTTCACTACTG
 AAAGTAAAGCAAGCGAAACACAAACAATACTACAAATAACGTTAATACAATAGATGAAACACAATCATAACGCGGACATCA
 ACTGAGCAACCATCAAAATCAACTCAAGTAACAACAGAAGAAGCACCAACAACCTGTGCAAGCACCAAAAGTAGAAACCGA
 AATGAAATCACAAGAAGATTTACCATCAGAAAAAGTTGCTGATAAGGAACTACAGGAACTCAAGTTGACATAGCTCAAC
 CAAGTAACGTCTCAGAAATTAACCAAGAATGAAAAGATCAGCTGACGTTACAGCAGTTTCAGAGAAAAGAAGTAGCGGAA
 GAAGCTAAAGCGACAGGTACAGATGTAACAAATAAAGTGGAAAGTTACTGAAAGCTCTTTAGAAGGACATAATAAAGATTC
 GAATATTGTTAATCCGCATAATGCTCAAAGAGTAACCTTTAAATAACAATGGAATTTGGAGAAGGAATTAAGGCAGGAG
 ATTATTTTGATTTTACATTAAAGTGAATGTTGAAACACATGGTATATCAACACTGCGTTAAAGTTCCGGAGATAAAAAAGT
 TCAACAGAAGATAAAAGTTATGGCAAATGGTCAAGTTATAAATGAACGTACAATTCGCTATACATTTACTGATTATATAAA
 TAACAAAAAAGATTTAACTGCTGAATTTAACTTTAAACCTATTTCATTGACCAACAACAGTGACAAAAGCAAGGGAGTCAAA
 AAGTTGAAGTAACACTAGGTCAAAATAAAGTCTCAAAAGAATTTGATATCAAATATTTAGACGGCGTTAAAGATAGAATG
 GGTGTTACTGTTAATGGTTCGTATTGATCTTTGAATAAAGAAGAGGGTAAATTTAGCCATTTTGCATATGTGAAGCCTAA
 CAACCACTCGTTAACTTCTGTACAGTAACCTGGTCAAGTAACATCTGGATATAAACAAGTGCTAATAATCCAACAGTCA
 AAGTATATAAACAACATTGGTTTCAGATGAATTAGCTGAAAGTGTTTATGCAAAGCTTGATGATACCAAGTAAATTTGAAGAT
 GTGACTGAAAAAGTAAATCTATCTTACACAAGTAATGGTGGGTACACATTGAACCTTGGCGATTTAGATAATTCGAAAGA
 CTATGTAATTAATATGAAGGTGAATATGATCAAAATGCTAAGGATCTAAATTTCCGAACACATCTTTCAGGATATCATA
 AATACTACCCATACCTATCTTATTACCCGTATTATCCAGTTCAATTTGGAACAACGGTGTTCATTTTACTCTAAT
 AATGCTAAAGGCGATGGTAAAGATAAACCCTAATGATCCTATTAGAGAGAGTGAACCAATTGATTTAGACATTAAATC
 AGAGCCACCAAGTGAGAGAGCATGAATTGACTGGTACAATCGAAGAAAGTAACGATTCTAAGCCAATTGATTTTGAATATC
 ATACAGCTGTTGAAGGTGCAGAAGGTCTGCAAGAGGTATTATTGAAACTGAAGAAGATTCTATTTCATGTGGATTTTGAA
 GAATCTACACATGAAAATTTCAAAACATCACGCTGATGTTGTTGAATATGAAGAGGATACAAACCCAGGTGGTGGCCAAAGT
 AACAACTGAGTCTAACTTAGTTGAATTTGACGAAGAGTCTACAAAAGGTATTGTAAGTGGCGCAGTGAGCGACCATACAA
 CAGTTGAAGATACGAAAGAATATACAACCTGAAAGTAATCTGATTGAATTAGTGGATGAATTACCTGAAGAACATGGTCAA
 GCACAAGGCGCAATCGAGGAAATTAAGTGAACCAATCATCATATTTCTCATTCTGGTTTAGGAAGTGAATTTGGTACCGG
 TAATTTATGGCGTGATTGATGAAATCGAAGAAATAGCCACGTTGATATTAAGAGTGAATTAGGTTATGAAGGTGGCCAAA
 ATAGCGGTAATCAGTCATTGAGGAAGACACAGAAGAAGATAAACTAAATATGAACAAGGTGGTAATATCGTAGATATC
 GATTTGACAGTGTACCTCAAATTCATGGTCAAAATAATGGTGAACAGTCATTTCGAGGAAGACACAGAAGAAGACAAGCC
 TAAGTATGAACAAGGTGGTAACATCATTTGATATCGACTTCGACAGTGTGCCACAAATTCATGGATTCAATAAGCATAATG
 AAATTTATGAAGAAGATACAAACAAAGATAAACCTAATTTATCAATTTGGTGGACACAACAGTGTGATTGTTTGAAGAAGAT
 ACACCTCCAAAAGTAAGTGGTCAAAATGAAGGTCAACAAACGATTGAAGAAGATACAACGCCGCCAACACCGCCCAACACC
 AGAGGTACCAAGTGAGCCGGAACACCAACACCACCAACACCAGAAGTACCGAGTGAGCCAGGCCGAACCAACGCCACCAA
 AACCAGGAAGTACCAAGTGAGCCGGAACACCAAGTACCACCAACACCAGAGGTACCATCTGAACCTGGTAAACCAGTACCA
 CCTGCTAAAGAAGAACCTAAAAACCTTCTAAACCAAGTGAACAAGGTAAAGGTAGTAACACCTGTTATTGAAATCAATGA
 AAAGGTTAAAGCAGTGGCACCAACTAAACAAAAACAATCTAAGAAATCTGAACCTGAAACAGGTGGAGAAGAATCAA
 CAAACAAGGTATGTTGTTCCGGCGGATTATTGAGCATCTAGGTTTAGTATTATTACGCGAGAAATAAAAGAATAACAA
 GCATAA

FIGURA 2.26

SEQ ID NO: 72: sequência de polinucleotídeos

ATGAAATTTAAGTCATTGATTACAACAACATTAGCATTAGGCGTTATAGCATCAACAGGAGCAAACCTTTAATACTAACGA
 AGCATCTGCCGAGCTAAGCCATTAGATAAATCATCAAGTACATTACACCATGGACATTCTAACATCCAGATTCCATATA
 CAATTACTGTGAACGGTACAAGCCAAAACATTTTATCAAGCTTAACATTTAATAAGAATCAAAATATTAGTTATAAAGAT
 ATAGAGAATAAAGTTAAATCAGTTTTATCTTTAATAGAGGTATTAGTGATATCGATTTAAGACTTTCAAAGCAAGCGGA
 ATATACGGTTCATTTTAAAAATGGAACAAAAGAGTTATCGATTTGAAATCAGGTATCTACACAGCTGACTTAATCAATA
 CAAGTGACATTAAAGCTATCAGTGTAAACGTAGATACATAAAAGCAACCTAAAGATAAAGCTAAAGCAAATGTTCAAGTG
 CCATATACAATCACAGTGAACGGCACAAGCCAAAACATTTTATCAAACCTAACATTTAATAAAAAATCAAAATATTAGTTA
 CAAAGATTTAGAGGGTAAAGTTAAATCAGTTTTAGAATCAAATAGAGGTATTACTGATGTTGATTAAAGACTTTTCAAGC
 AAGCGAAATATACAGTTAATTTTAAAAATGGAACGAAGAAAGTTATCGATTTGAAATCAGGTATTTACACAGCGAATTTA
 ATCAATTCAGTGATATTAAAAAGTATCAATATTAACTTAAATGTTATACGTAGATACAAAAAACATATCGAAAATAAAGCTAAAAGAACTA
 TCAAGTTCCATATTCAATTAATCTAAATGGTATCTACAAACATTTTATCGAATCTTTTCAATTTTCAAATAAACCTTGGGA
 CAAATTACAAAAATTTAACTAGTCAAATAAAATCAGTACTGAAGCATGATAGAGGTATTAGTGAACAAGATTTAAATAT
 GCTAAGAAAGCTTATTACTGTTTATTTTAAAAATGGTGGTAAAAGAATCTTACAGTTAAATTCAAAAATTTACACAGC
 AAACCTTAGTTTATGCGAAAGATGTTAAGAGAATTGAAATTAAGTTTAAACAGGAACCTAAAGCGAAAGCAGACAGATATG
 TACCATACACAATTGCAGTAAATGGCACATCAACACCAATTTTATCAAACCTAAAAATTTTCAATAAACAATTAATTAGT
 TACAAATATTTAAACGACAAAGTGAAATCTGTATTAAAAAGTGAAAGAGGTATCAGTGATCTTGACTTAAATTTGCGAA
 ACAAGCAAAATATACAGTATATTTCAAAAATGGAAGAAACAAGTAGTGAATTTAAATCAGACATCTTTACACCTAATT
 TATTTAGTGCCAAAGATATTAAAAAGATTGATATTGATGTAAACAATACACTAAATCAAAAAAAAATAAATAAATCT
 AATAATGTGAAATTTCCAGTAACAATAAATAAATTTGAAACATATAGTTTCAATGAATTTGTGTTCTATAATGCAAGCAA
 AATTACAATTAATGATTTAAGTATAAACTTAAATCAGCAATGGCAAATGATCAAGGGATAACTAAACATGACATAGGAC
 TTGCTGAACGCGCAGTGTATAAAGTGTATTTTAAAAATGGTTCGTCAAATATGTAGACTTAAAACTGAGTATAAAGAT
 GAAAGAGTATTTAAAGCAACTGACATTAAAAAGGTAGATATTGAACTTAAATCTAA

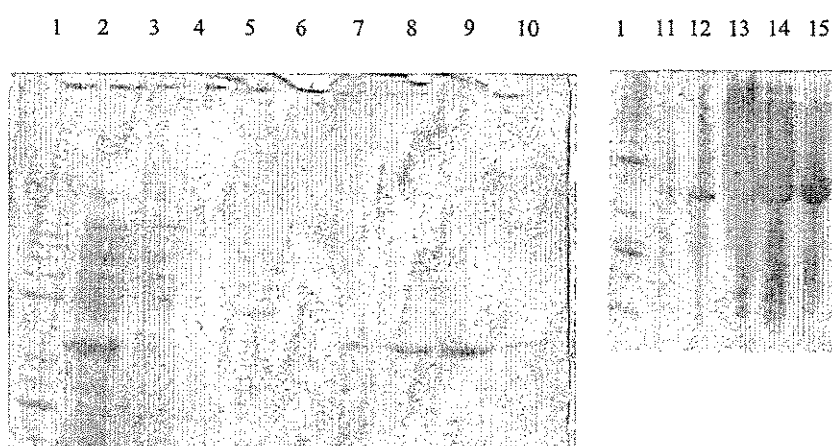
SEQ ID NO: 73: sequência de polinucleotídeos

ATGAATAATAAAAGACAGCAACAAATAGAAAAGGCATGATACCAAATCGATTAAACAAA
 TTTTCGATAAGAAAGTATTCTGTAGGTACTGCTTCAATTTTAGTAGGGACAACATTGATT
 TTTGGGTTAAGTGGTCATGAAGCTAAAGCGGCAGAACATACGAATGGAGAATTAAATCAA
 TCAAAAAATGAAACGACAGCCCCAAGTGAGAAATAAAACAACCTAAAAAAGTTGATAGTCGT
 CAACCTAAAAGACAATACGCAAACCTGCAACTGCAGATCAGCCTAAAGTGACAATGAGTGAT
 AGTGCAACAGTTAAAGAACTAGTAGTAACATGCAATCACCACAAAACGCTACAGCTAAT
 CAATCTACTACAAAACTAGCAATGTAACAACAAATGATAAATCATCAACTACATATAGT
 AATGAACTGATAAAAGTAATTTAACACAAGCAAAAGATGTTTCAACTACACCTAAAACA
 ACGACTATTAAACCAAGAACTTTAAATCGCATGGCAGTGAATACTGTTGCAGCTCCACAA
 CAAGGAACAAATGTTAATGATAAAGTACATTTTCAAATATTGACATTGCGATTGATAAA
 GGACATGTTAATCAGACTACTGGTAAACCTGAATTTTGGGCAACTCAAGTGATGTTTTA
 AAATTTAAAGCAAATTACACAATCGATGATTCTGTTAAAGAGGGCGATACATTTACTTTT
 AAATATGGTCAATATTTCCGTCCAGGATCAGTAAGATTACCTTCACAAACTCAAATTTA
 TATAATGCCCAAGGTAATATTATTGCAAAAGGTATTTATGATAGTACAACAAACACAACA
 ACATATACTTTTACGAACTATGTAGATCAATATACAAATGTTAGAGGTAGCTTTGAACAA
 GTTGCATTTGCGAAACGTAAAAATGCAACAACCTGATAAAACAGCTTATAAAATGGAAGTA
 ACTTTAGGTAATGATACATATAGCGAAGAAATCATTGTGATTATGGTAATAAAAGCA
 CAACCGCTTATTTCAAGTACAACTATATTAAACAATGAAGATTTATCGCGTAATATGACT
 GCATATGTAAATCAACCTAAAAATACATATACTAAACAAACGTTTGTACTAATTTAACT
 GGATATAAATTTAATCCAAATGCAAAAACTTCAAATTTACGAAGTGACAGATCAAAT
 CAATTTGTGGATAGTTTACCCCTGATACTTCAAACCTTAAAGATGTTACTGATCAATTC
 GATGTTATTTATAGTAATGATAATAAAACAGCTACAGTCGATTTAATGAAAGGCCAAACA
 AGCAGCAATAAACAATACATCATTCAACAAGTTGCTTATCCAGATAATAGTTCAACAGAT
 AATGGAAAAATTGATTATACTTTAGACACTGACAAAACCTAAATATAGTTGGTCAAATAGT
 TATTCAAATGTGAATGGCTCATCAACTGCTAATGGCGACCAAAGAAATATAATCTAGGT
 GACTATGTATGGGAAGATACAAATAAAGATGGTAAACAAGATGCCAATGAAAAAGGGATT
 AAAGGTGTTTATGTCTTCTTAAAGATAGTAACGGTAAAGAATTAGATCGTACGACAACA
 GATGAAATTTGGTAAATATCAGTTCACTGGTTTAAAGCAATGGAACCTTATAGTGTAGAGTTT
 TCAACACCAGCCGGTTATACACCGACAACCTGCAATGTAGGTACAGATGATGCTGTAGAT
 TCTGATGGACTAACTACAACAGGTGTCATTAAAGACGCTGACAACATGACATTAGATAGT
 GGATTCTACAAAACACCAAAATATAGTTTAGGTGATTATGTTTGGTACGACAGTAATAAA
 GATGGTAAACAAGATTCGACTGAAAAAGGAATTAAAGGTGTTAAAGTTACTTTGCAAAAC
 GAAAAAGGCCAAGTAATTGGTACAACCTGAAACAGATGAAAAATGGTAAATACCGCTTTGAT
 AATTTAGATAGTGGTAAATACAAAGTTATCTTTGAAAAACCTGCTGGCTTAACTCAAACA
 GGTACAAATACAACCTGAAGATGATAAAGATGCCGATGGTGGCGAAGTTGATGTAACAATT

FIGURA 3

Purificação de alfa-toxina

A



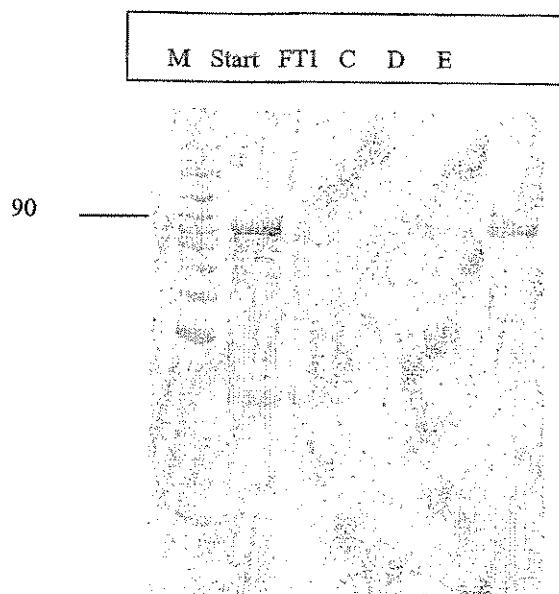
B



FIGURA 4

Purificação de SdrC

A



B

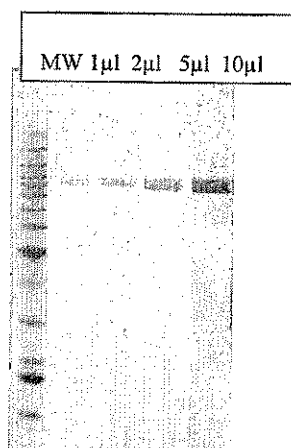


FIGURA 5.1

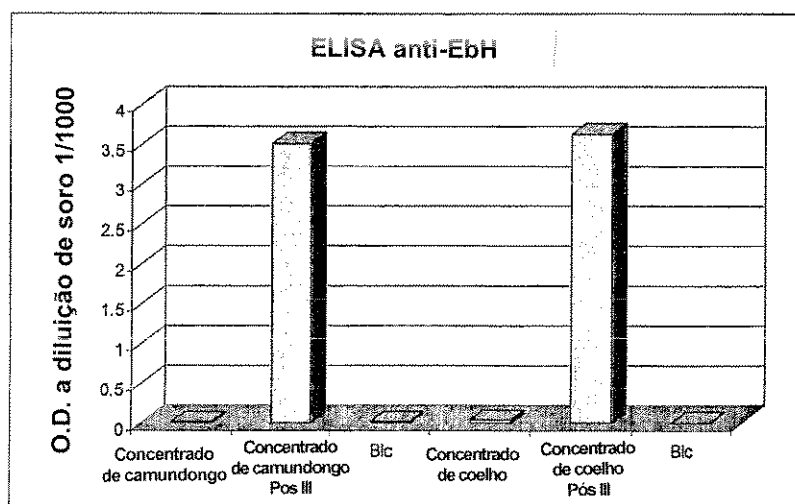
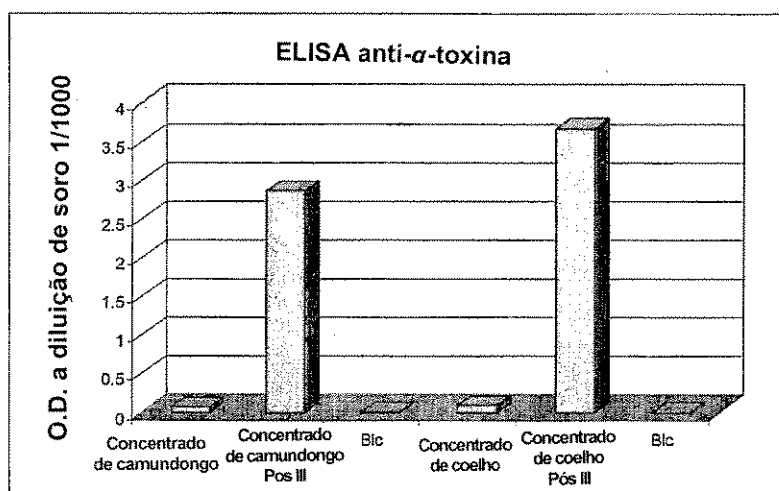
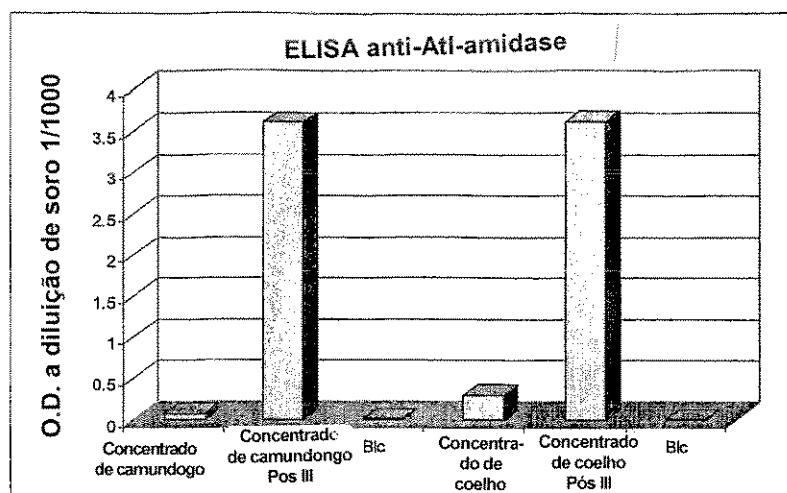


FIGURA 5.2

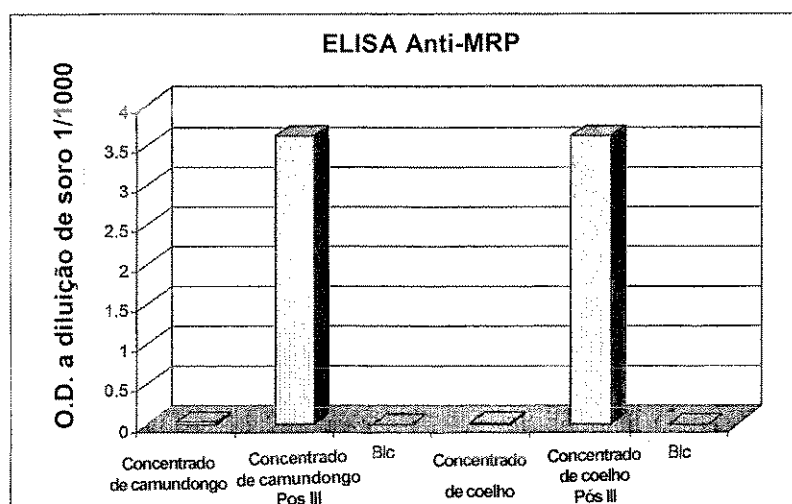
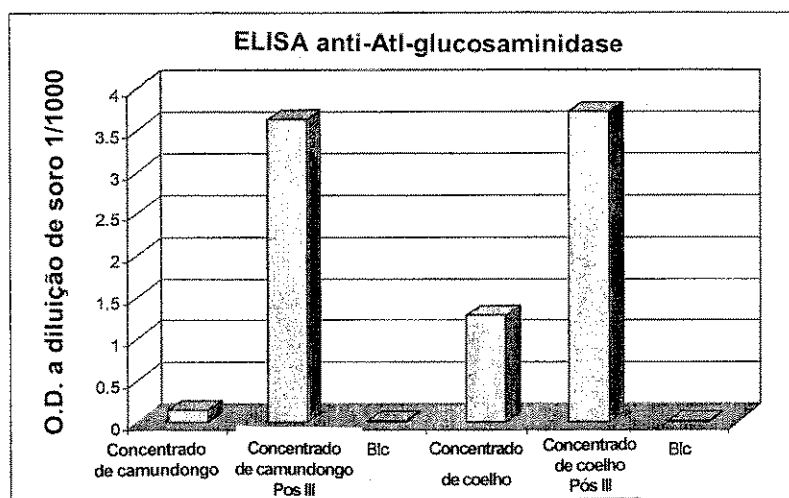
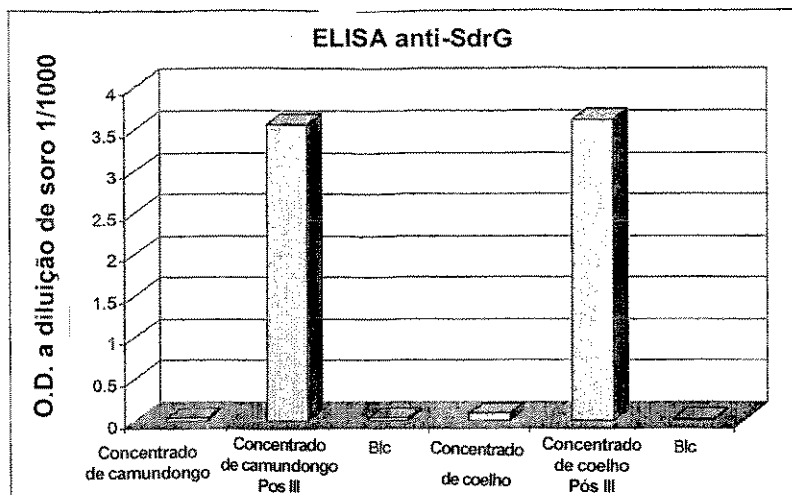


FIGURA 5.3

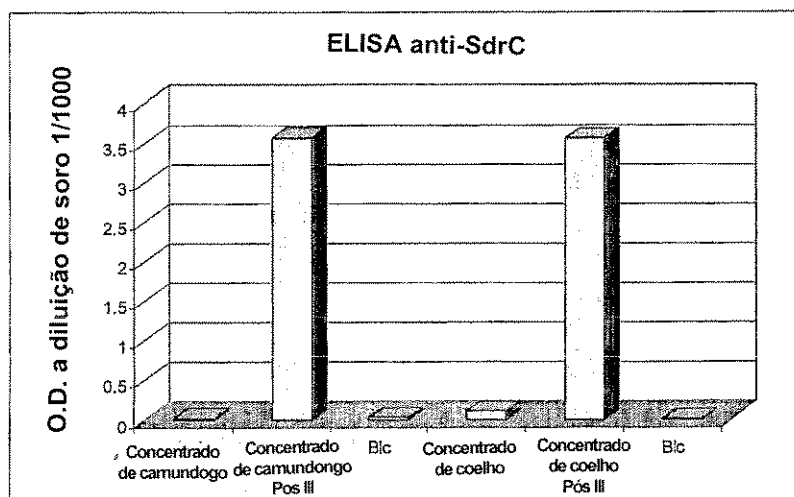
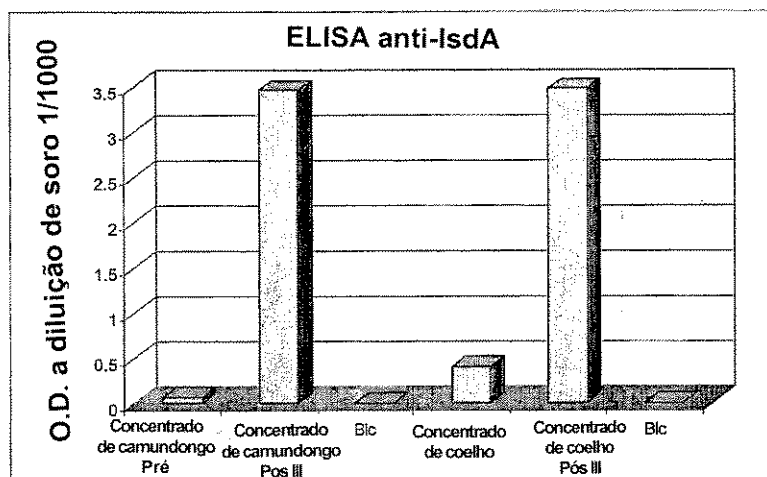
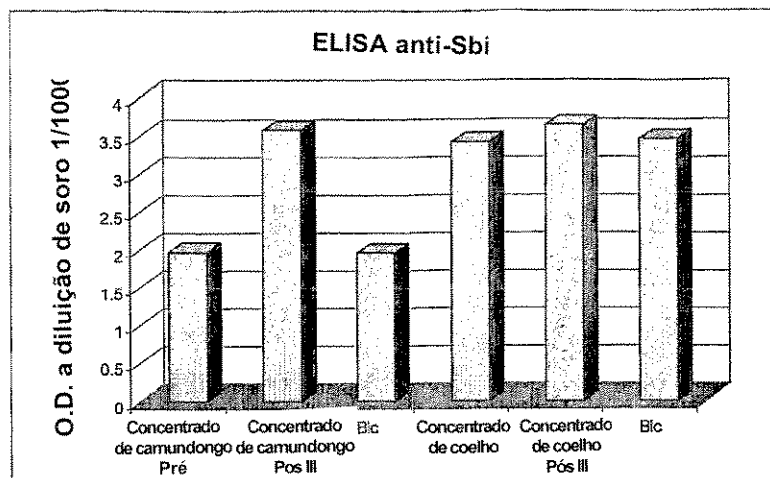


FIGURA 5.4

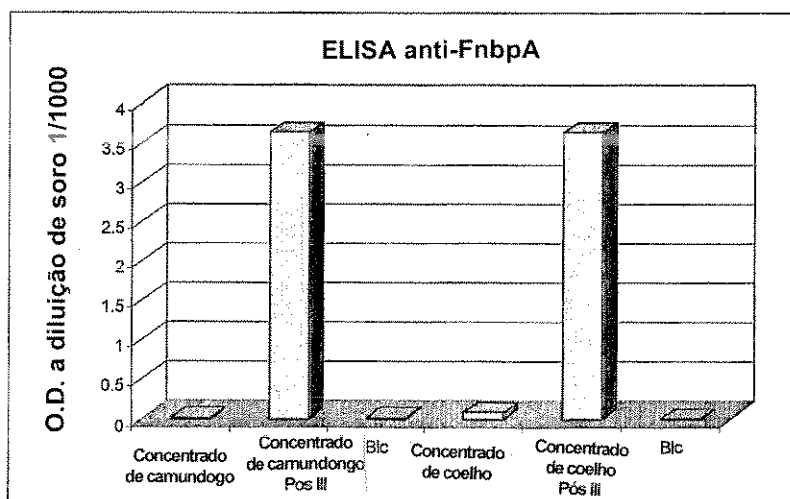
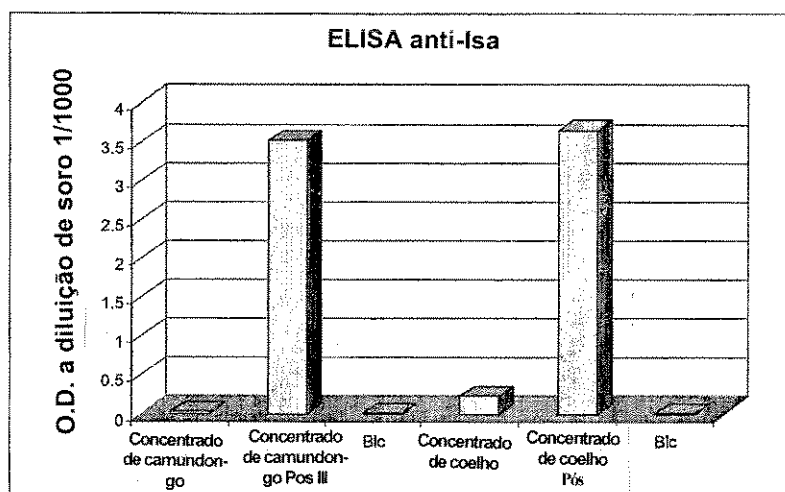
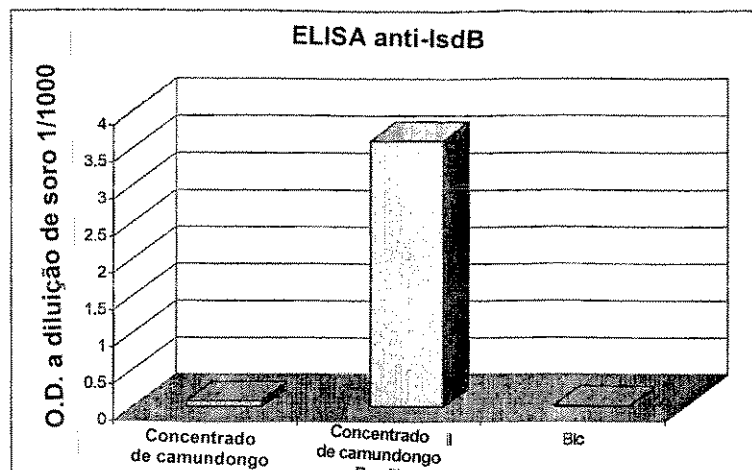


FIGURA 5.5

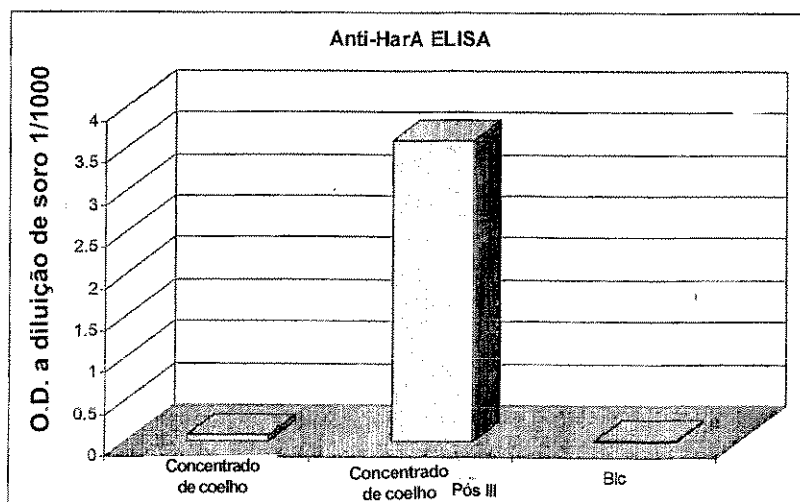
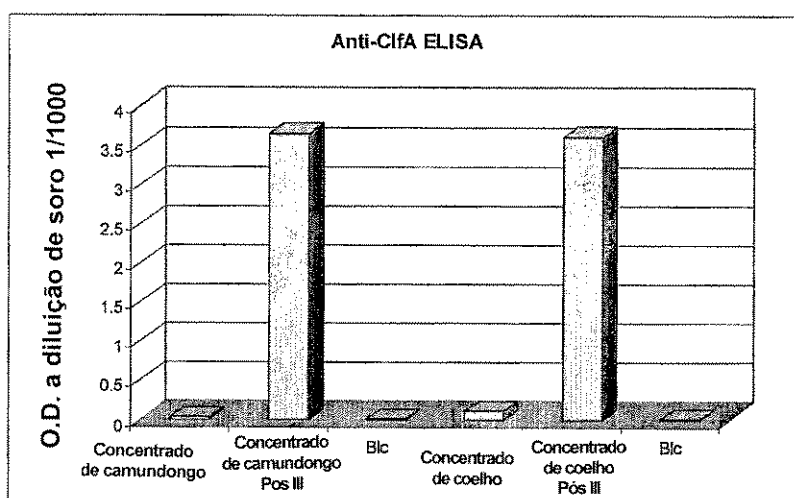
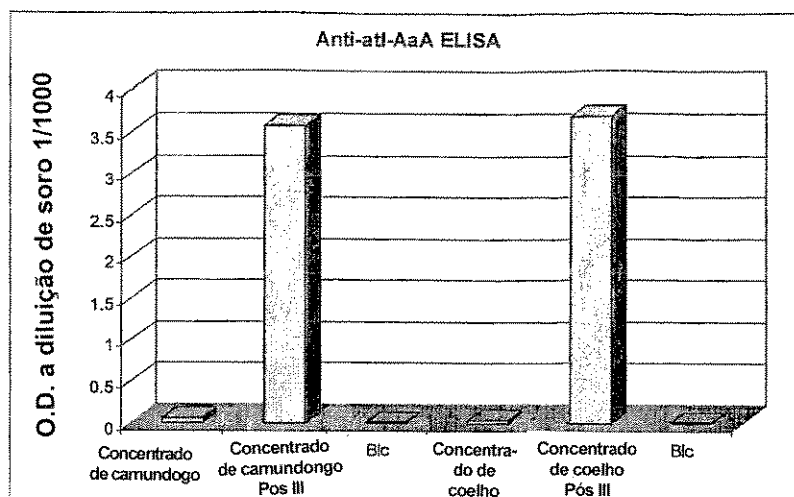


FIGURA 6.1

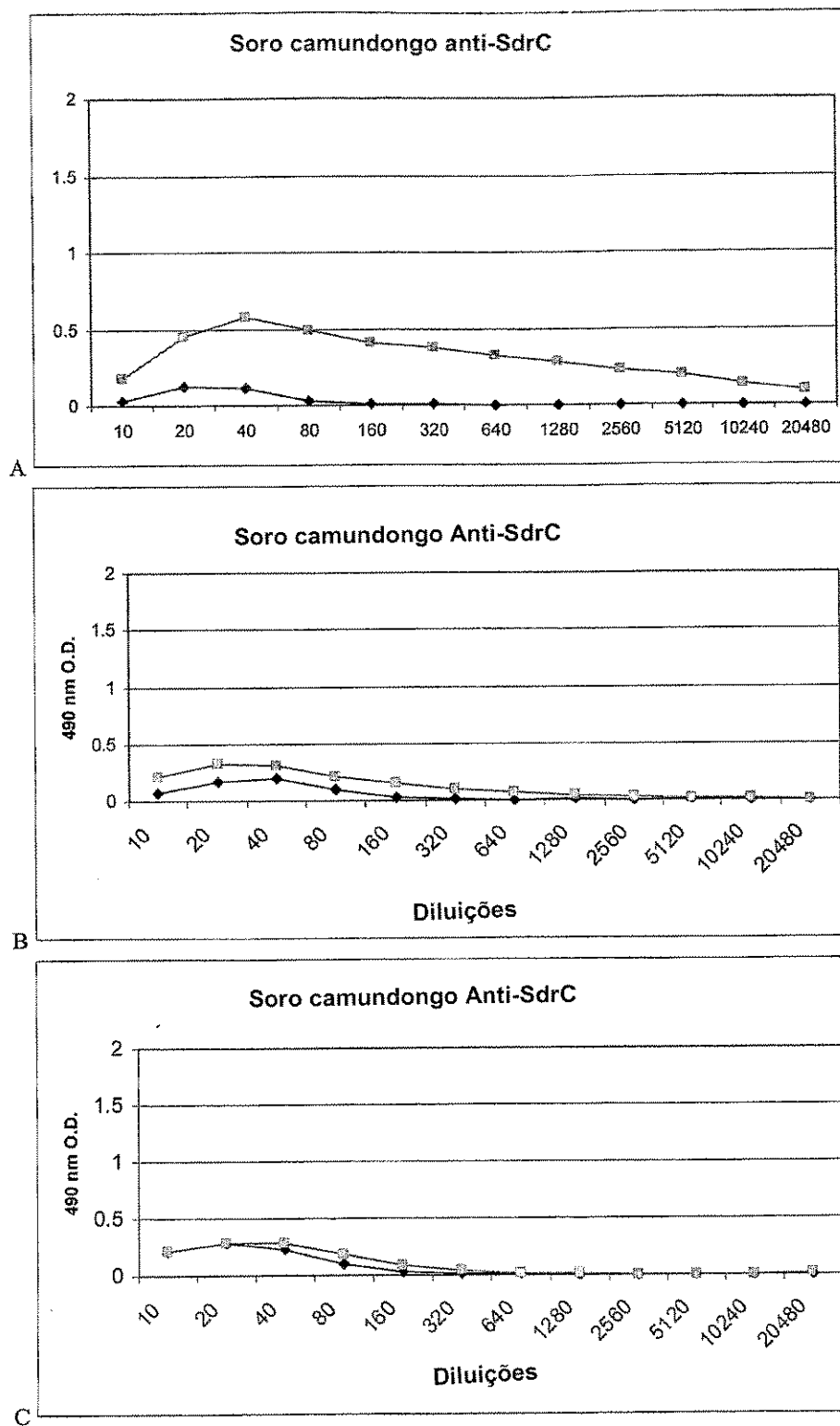


FIGURA 6.2

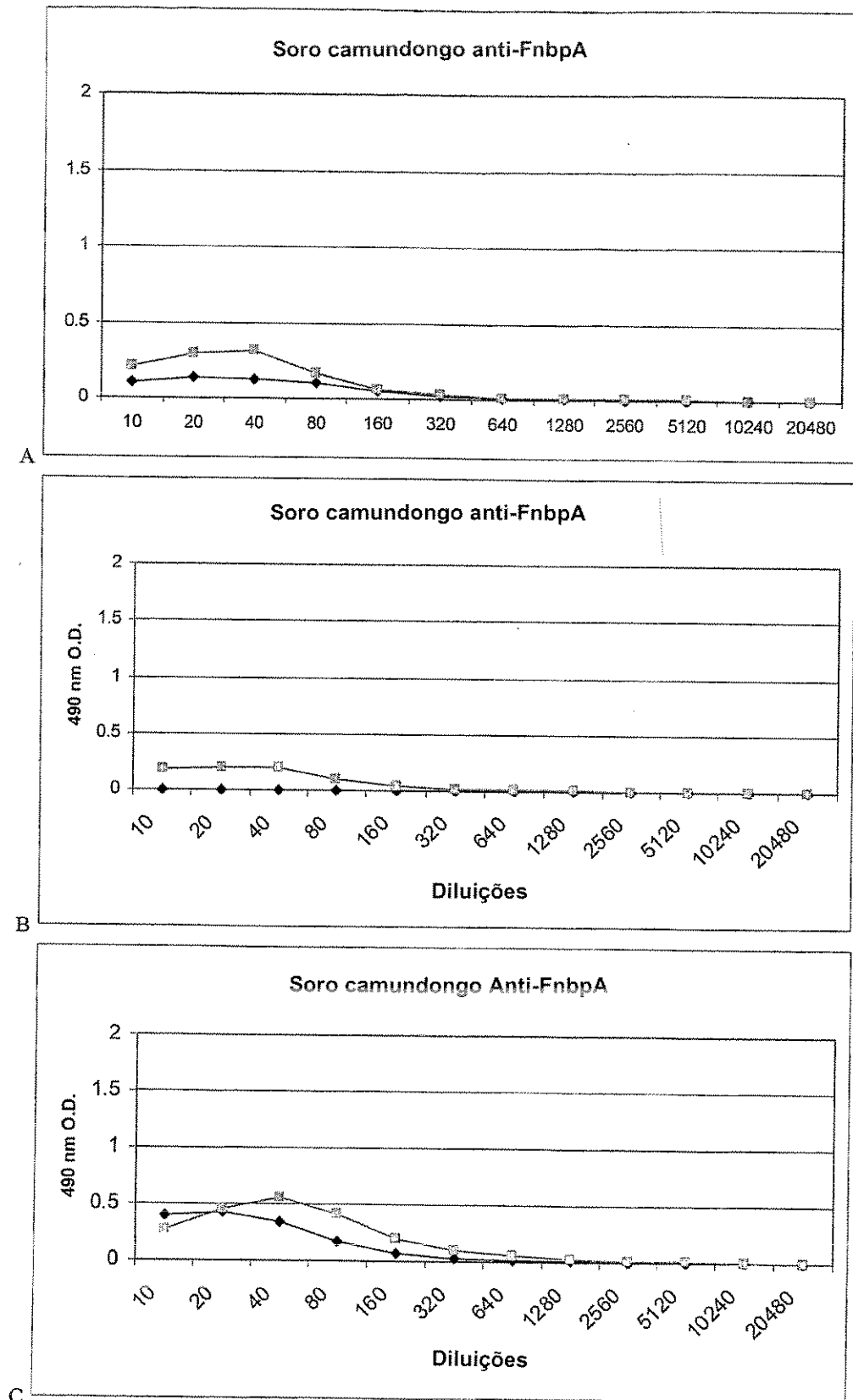


FIGURA 6.3

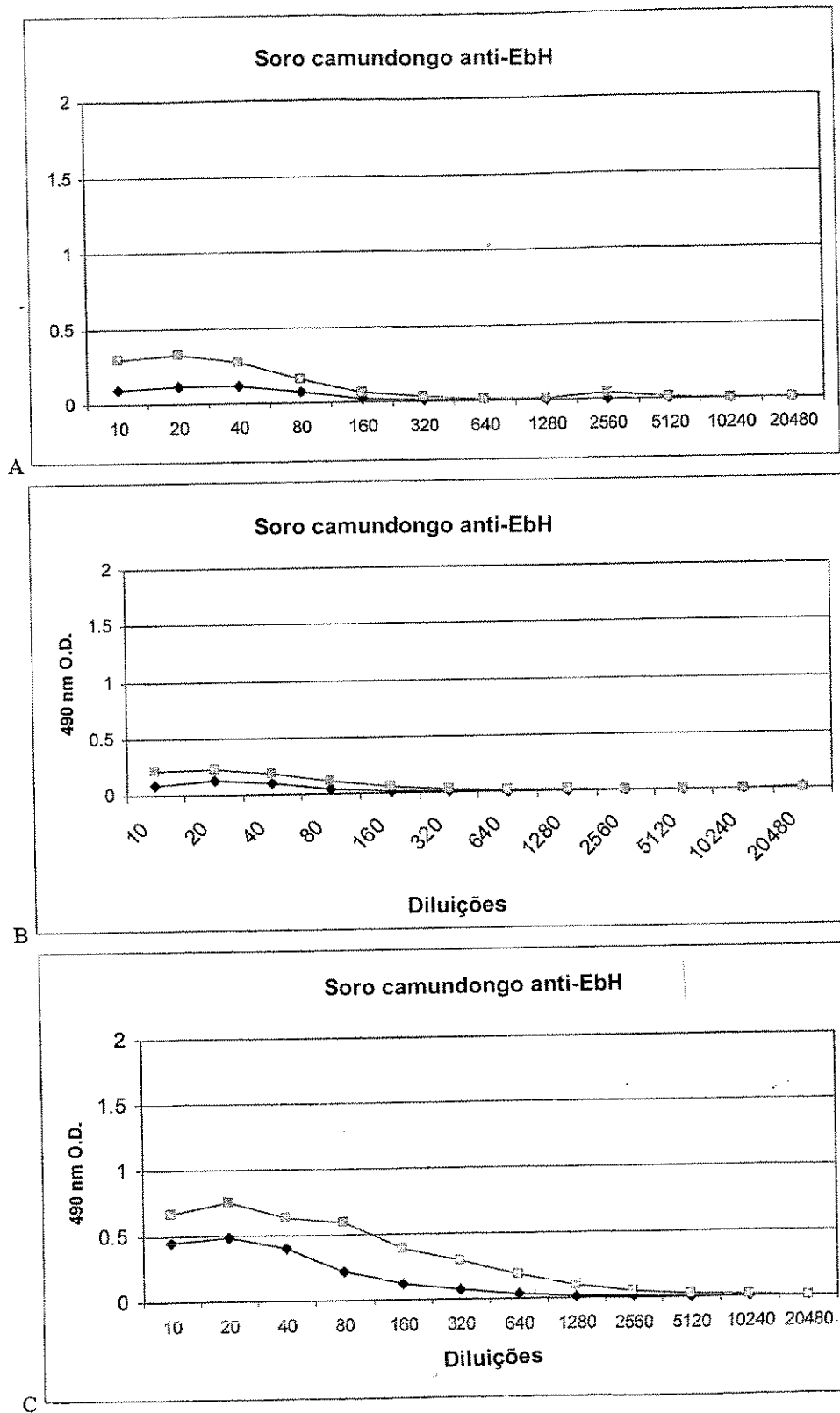


FIGURA 6.4

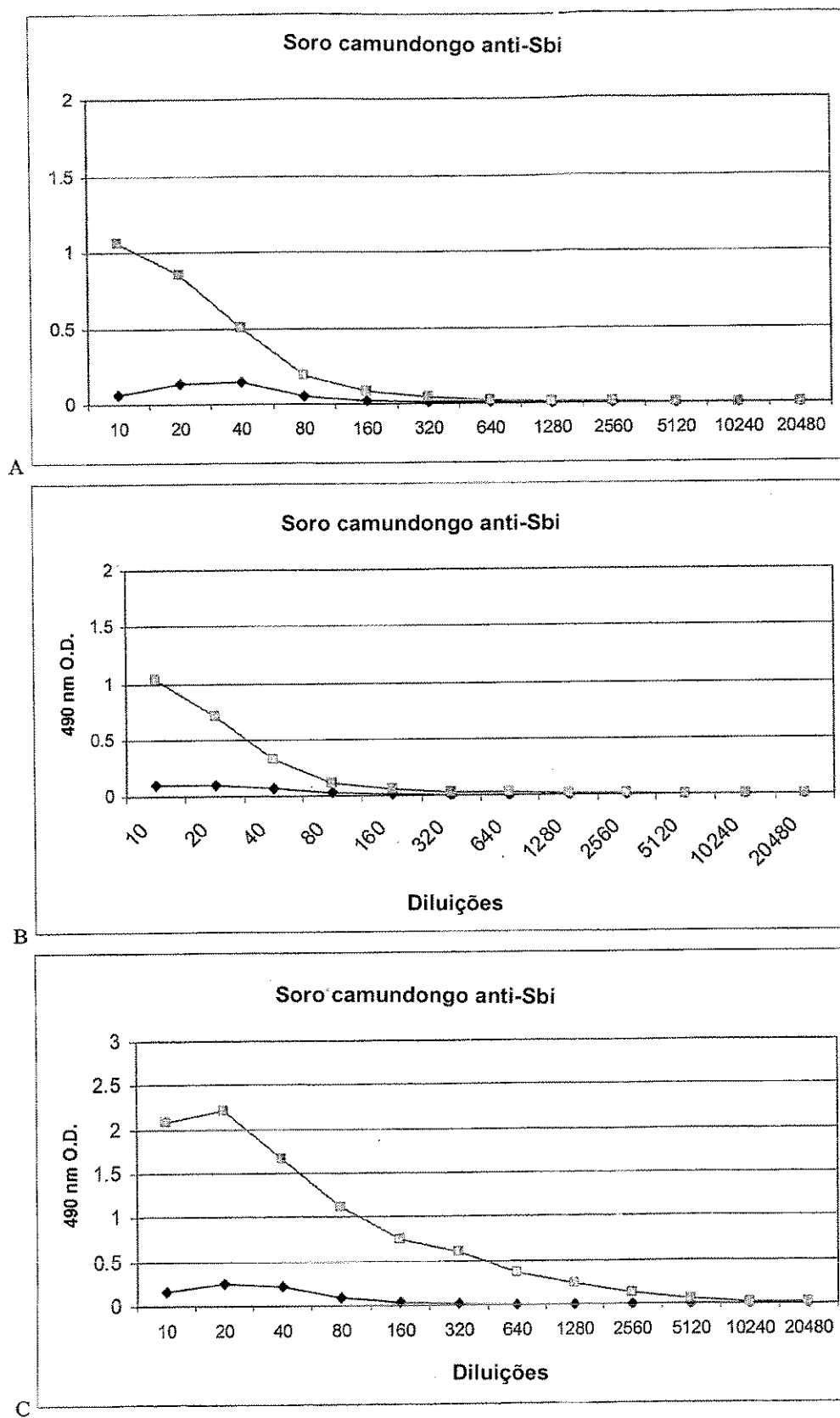


FIGURA 6.5

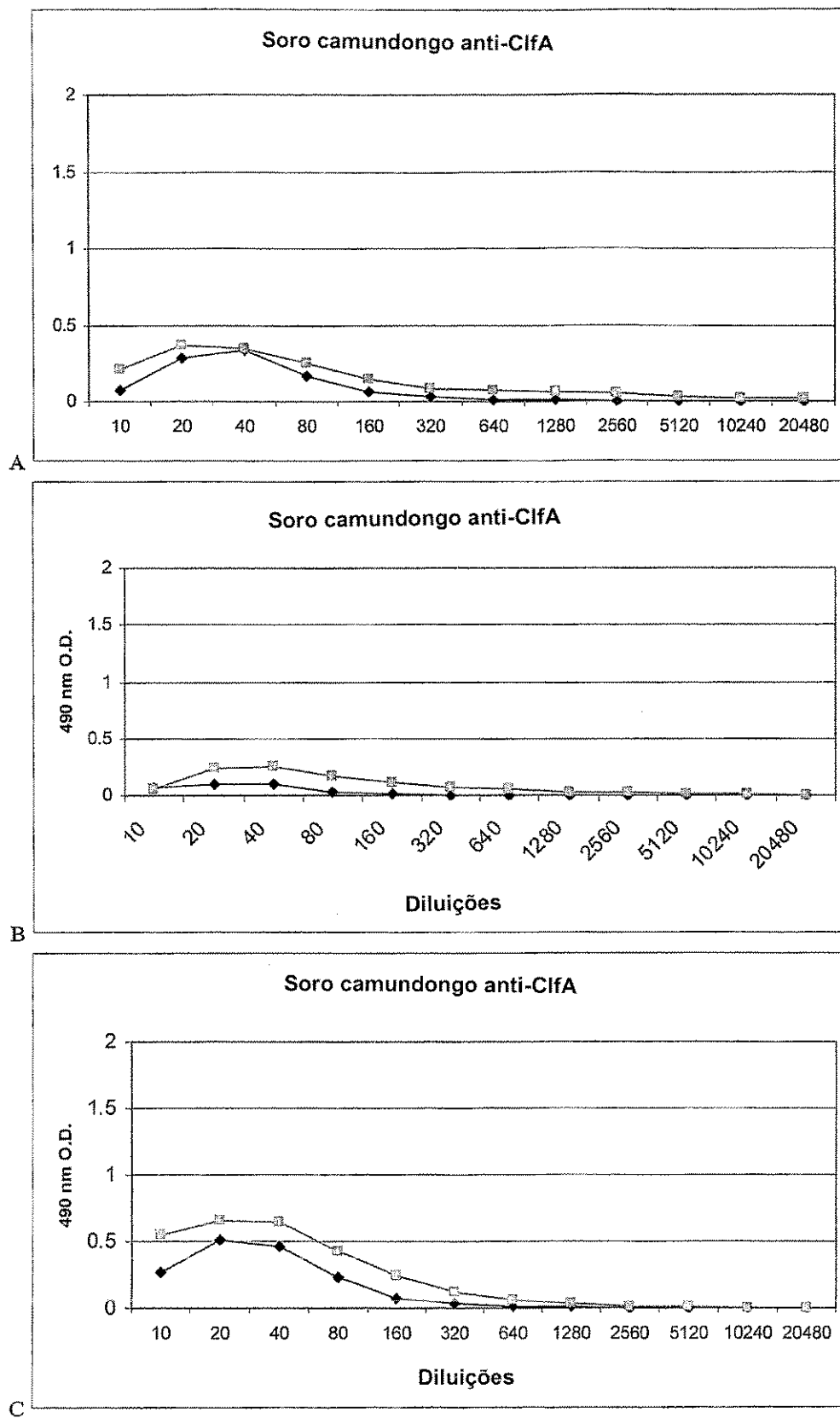


FIGURA 7.1

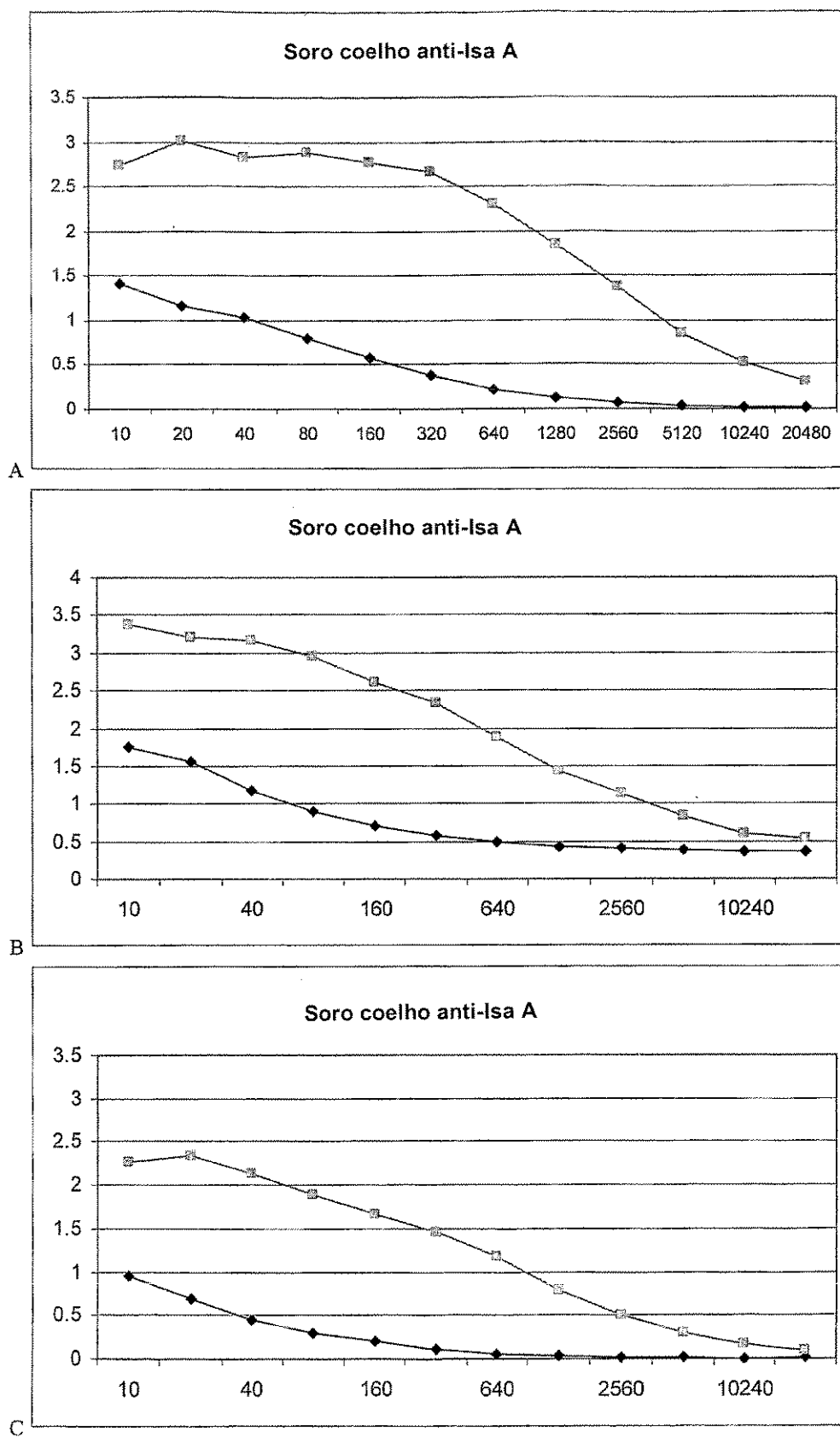


FIGURA 7.2

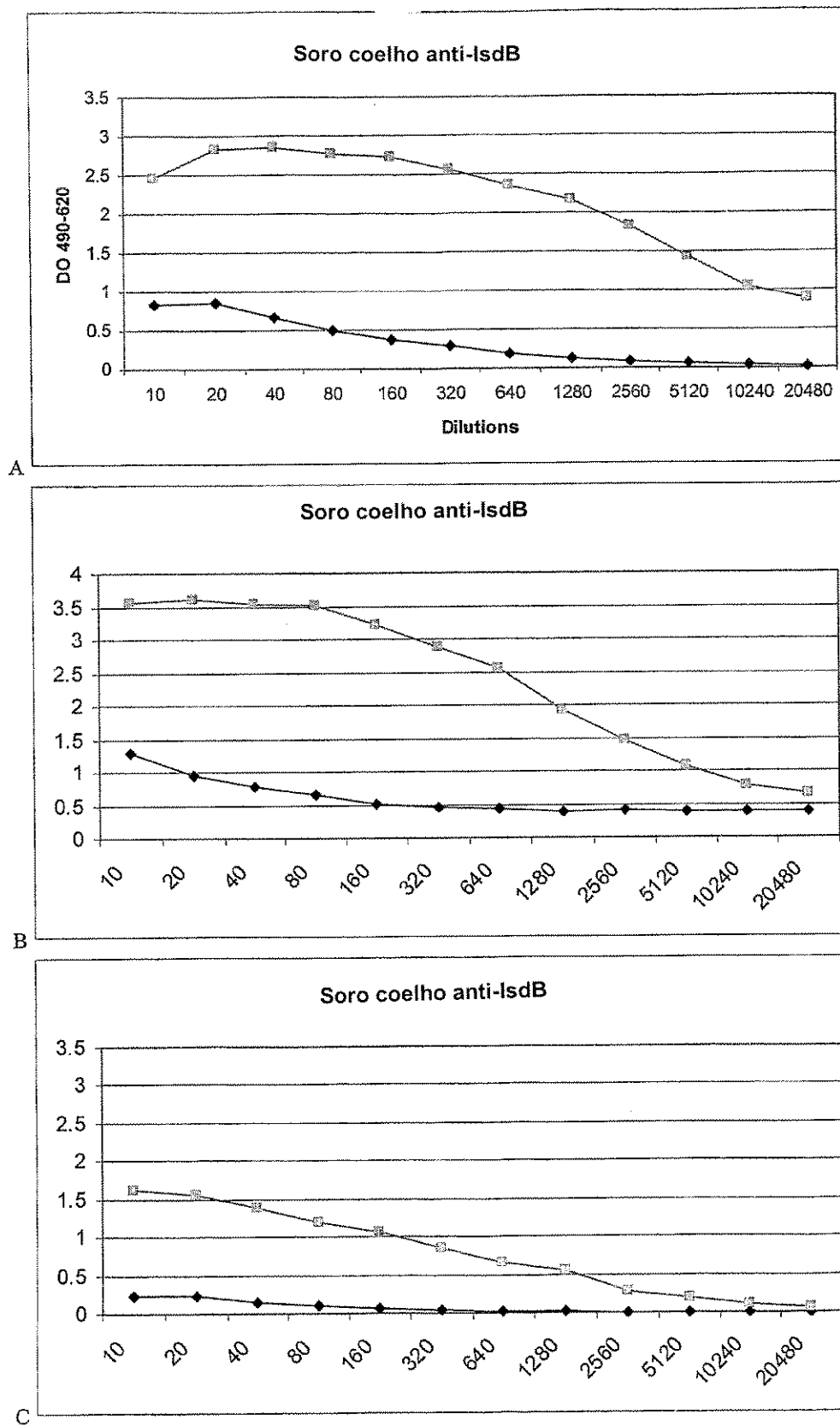


FIGURA 7.3

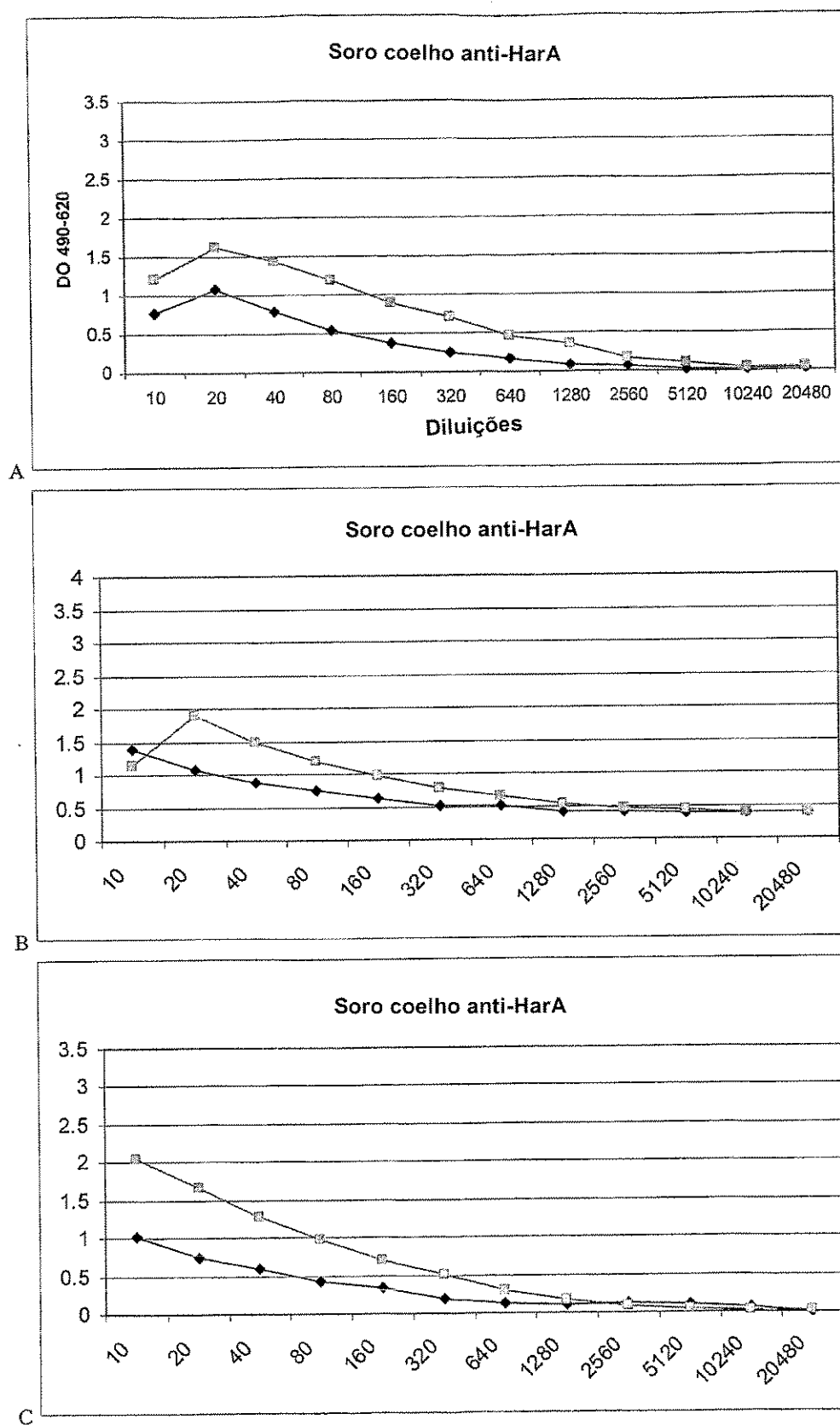


FIGURA 7.4

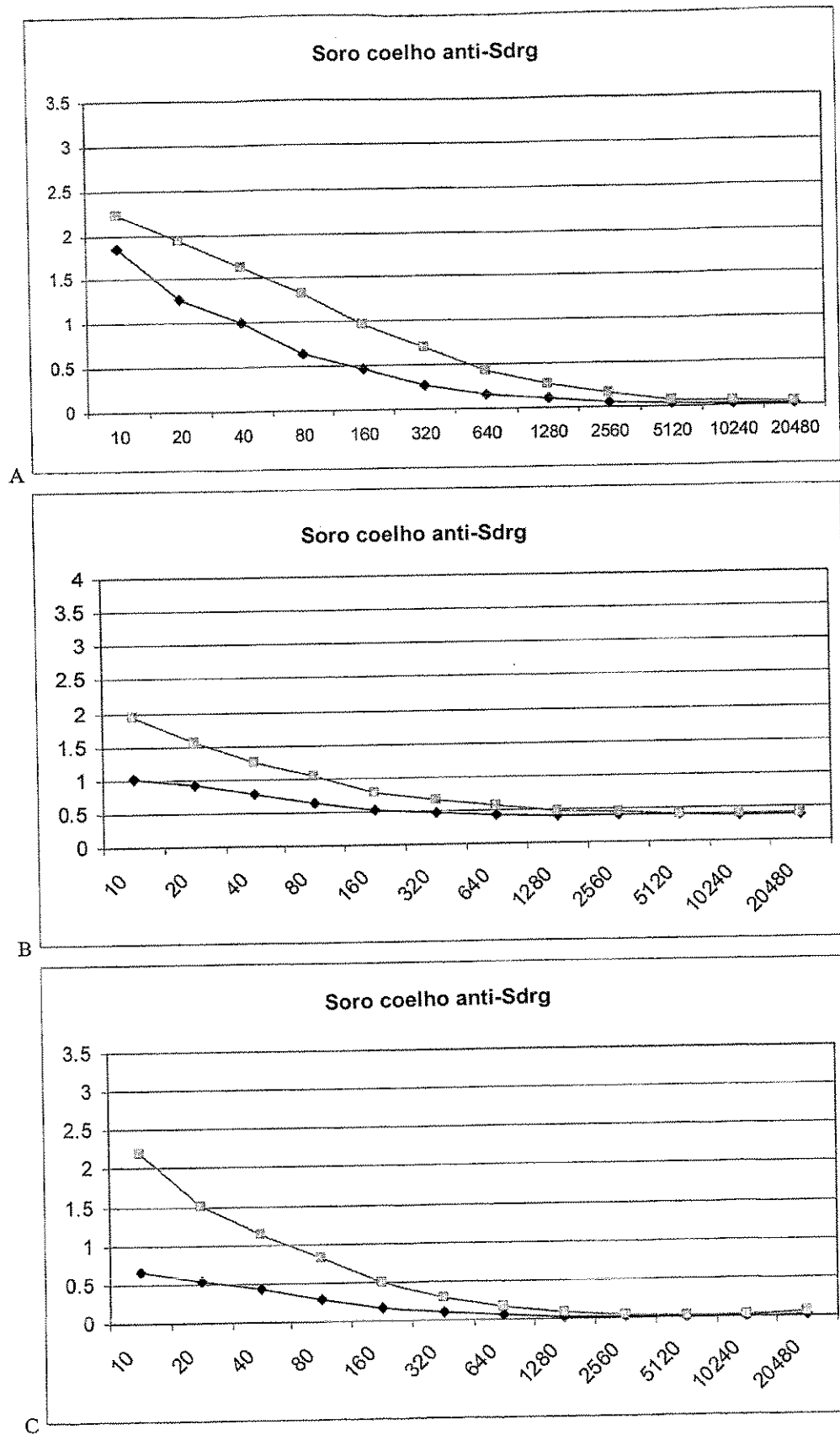


FIGURA 7.5

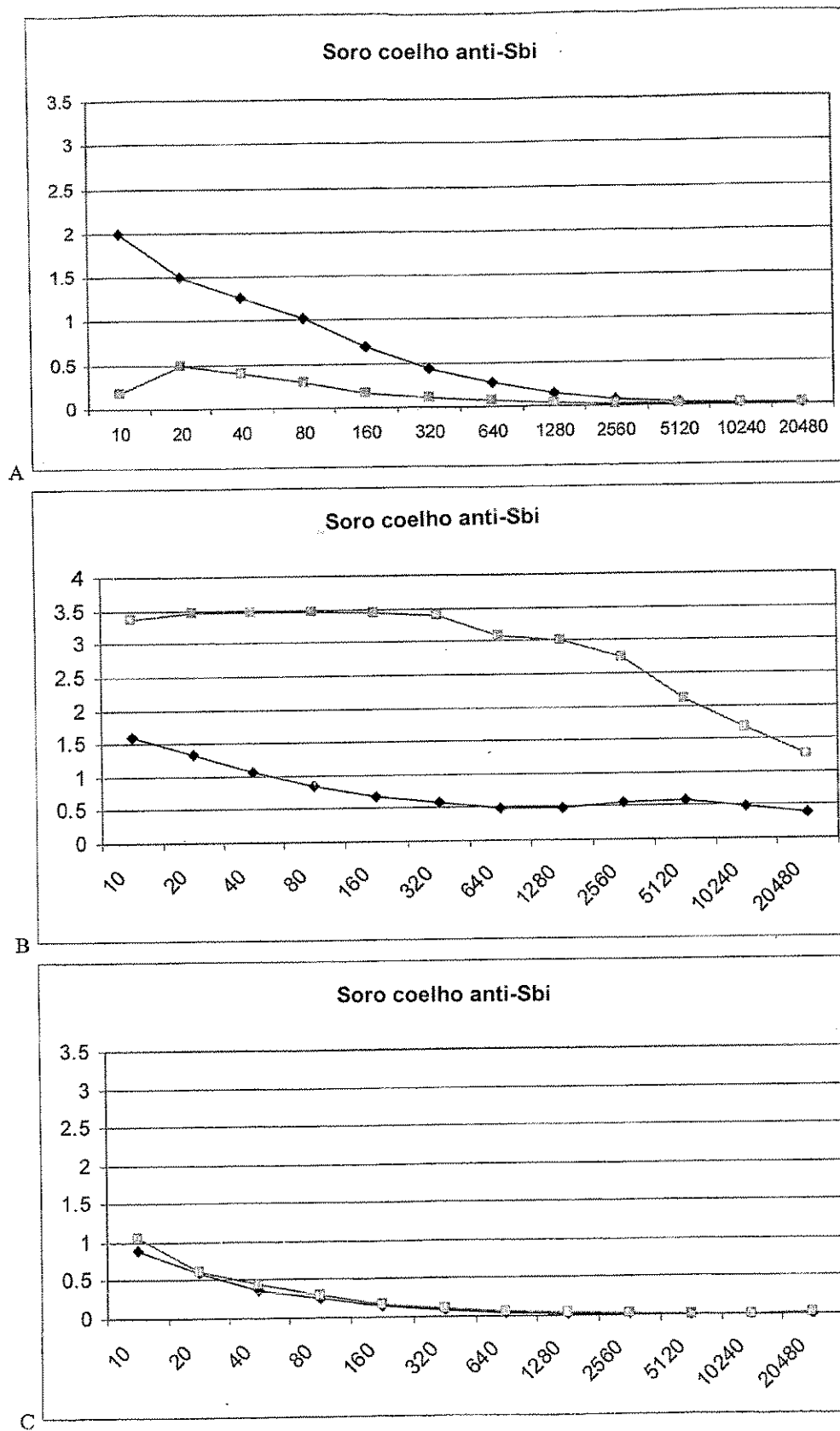


FIGURA 7.6

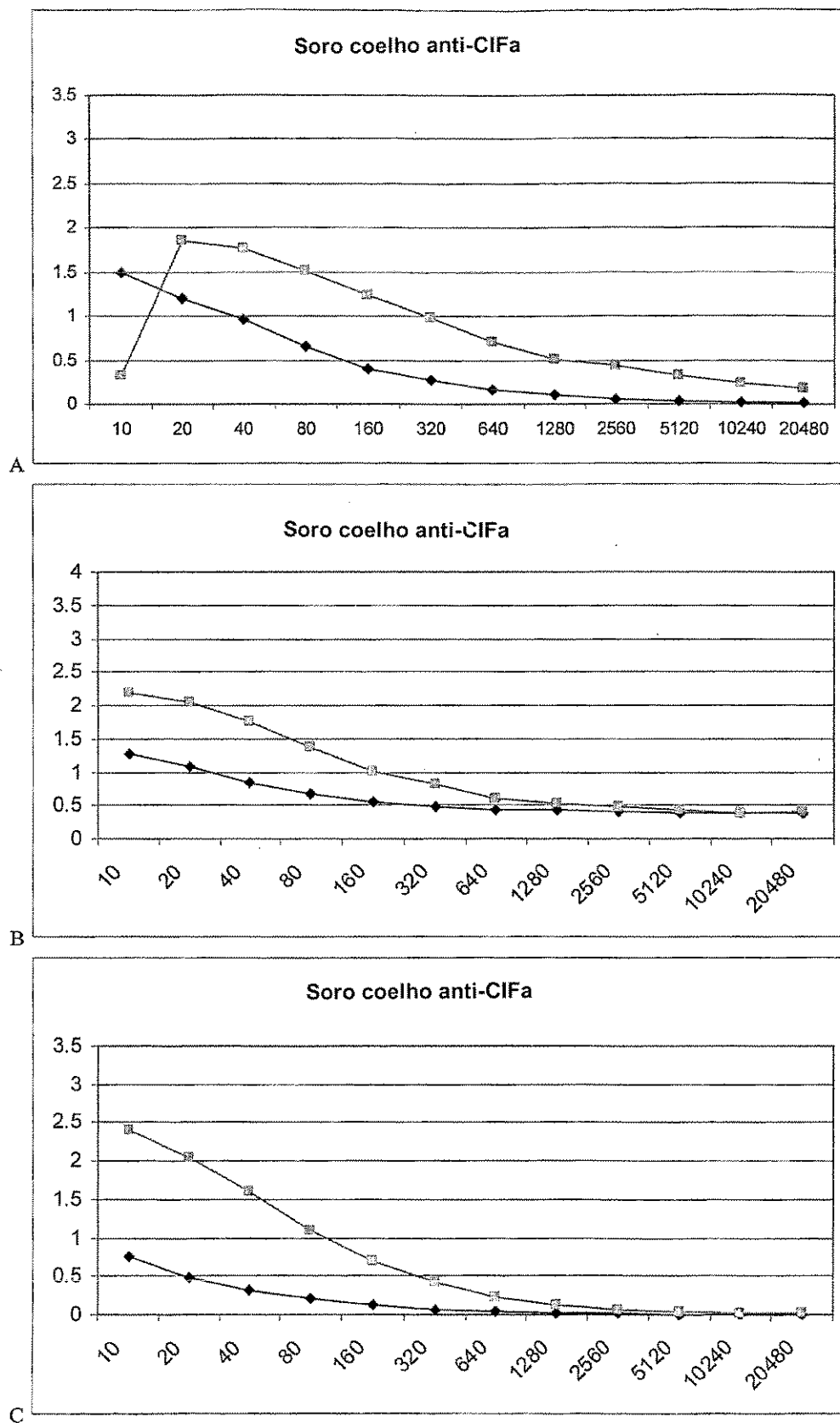


FIGURA 7.7

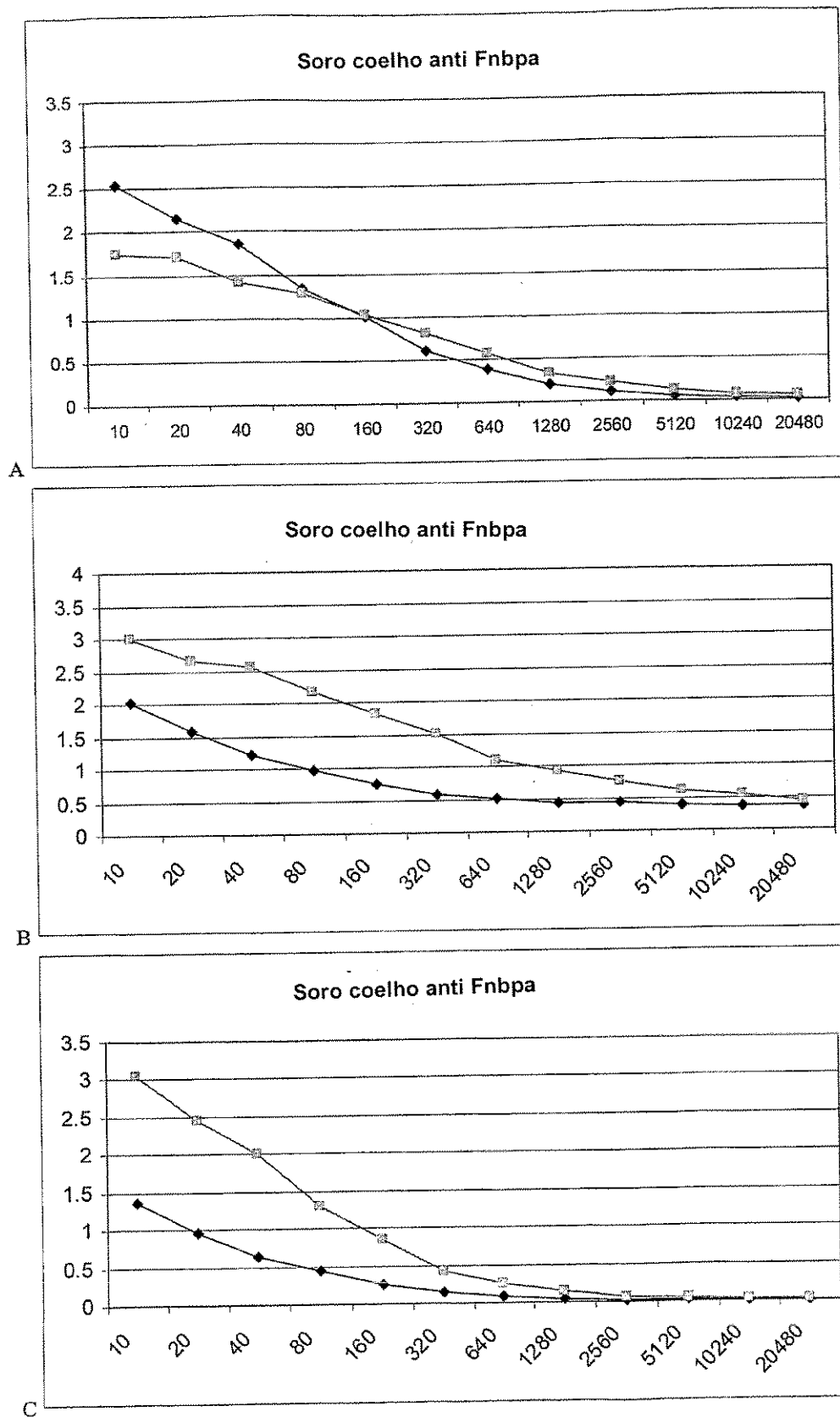


FIGURA 7.8

