

## VACUNA CONTRA LA GARRAPATA DEL GANADO BOVINO

### REIVINDICACIONES

- 1- Vacuna contra la garrapata del ganado bovino caracterizada por contener dos proteínas denominadas Bm05 y Bm86uy, caracterizadas por tener las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 respectivamente, originarias de la garrapata del ganado bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; un adyuvante oleoso o metálico, en un vehículo fisiológicamente aceptable
- 2- Vacuna contra la garrapata del ganado bovino, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque las proteínas son obtenidas por purificación a partir de tejidos de garrapatas, sintetizadas químicamente o producidas en otros organismos a través de técnicas de ADN recombinante
- 3- Vacuna contra la garrapata del ganado bovino, de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque las proteínas están presentes en una concentración de 0,01 a 5,0 mg / ml.

### RESUMEN

"Vacuna contra la garrapata del ganado bovino que contienen dos proteínas o péptidos derivados", que se caracteriza por dos antígenos de garrapatas aisladas de *Rhipicephalus microplus*. Estos antígenos, las proteínas Bm05 y Bm86uy están aisladas de tejidos de garrapatas y se caracteriza porque comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, las cuales no tienen ninguna función biológica conocida. El uso como inmunógenos de estas proteínas obtenidos por purificación

a partir de tejidos de garrapatas, sintetizados químicamente o producidos en otros organismos por medio de técnicas de ADN, son capaces de generar una respuesta inmunológica de protección en el ganado bovino y pueden utilizarse como antígenos en vacunas para prevenir la infestación contra la garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus microplus*, solo o en combinación con otros antígenos.

#### **VACUNA CONTRA LA GARRAPATA DEL GANADO BOVINO**

[001] Se refiere a la presente invención, la identificación y caracterización de dos antígenos de la garrapata del ganado bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Los antígenos aislados, denominados Bm05 y Bm86uy, caracterizado porque comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, no tienen ninguna función biológica conocida. El uso de este antígeno como inmunógeno en el ganado es capaz de inducir una respuesta inmune de tal manera que los antígenos se pueden usar como una vacuna para prevenir la infestación, solo o en combinación con otros antígenos que ya se han descrito o que se describirán.

[002] En la actualidad, Brasil es uno de los mayores productores de carne en el mundo, tiene un rebaño de ganado de 200 millones de cabeza, produciendo aproximadamente 8,5 millones de toneladas de carne y de leche 23 mil millones por año. La garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus microplus* es

uno de los ectoparásitos más importantes de los rebaños de ganado del estado de Rio Grande Do Sul, causando diversos daños en el cuero debido a la reacción inflamatoria en el sitio de fijación de la garrapata así como la caída de la producción de leche y carne, la cual es la principal fuente de proteína consumida en país.

[003] El control inmunológico ha surgido como una tecnología adicional en el control de este parásito. Sin embargo, el éxito de esta estrategia depende de la identificación de genes y caracterización funcional de las moléculas de señal fisiológica. Ensayos de inmunización con diferentes antígenos de parásitos proporcionan evidencia de que el control de estos ectoparásitos se puede lograr mediante la vacunación. También es necesario, además de la identificación de proteínas capaces de inducir una respuesta inmune protectora, el conocimiento de los mecanismos de respuesta inmune del huésped.

[004] La viabilidad del uso de la vacuna contra la garrapata se ha reforzado por la observación de que los anticuerpos funcionales presentes en la sangre del ganado vacunado, se encuentran también en la hemolinfa de las garrapatas alimentadas de éste ganado. Sin embargo, los antígenos de investigación con potencial protector es un reto importante para el desarrollo de una vacuna siendo estudiada por varios grupos de investigación. La eficacia de las vacunas comerciales que usan Bm86, una proteína del intestino de la garrapata del ganado bovino *R. microplus* identificado por un grupo de

investigación de Australia varía entre 51% y 91%, dependiendo de las características de la población de garrapatas y el estado nutricional del ganado. Se ha sugerido que la variación observada en la eficacia de las vacunas comerciales entre diferentes regiones del mundo se debe a la secuencia de las variaciones entre las diferentes cepas de Bm86 de *R. microplus*. El análisis génico en Argentina de Bm86 de poblaciones de garrapatas mostraron alto polimorfismo y se determinó que en éstas poblaciones Bm86 es una proteína soluble en lugar de una proteína de membrana como fue descrito en garrapatas de Australia y Cuba, haciendo que estas garrapatas de Argentina sean resistentes al efecto de la vacunación. Para superar esta resistencia, una nueva vacuna recombinante fue producida sobre la base de gen Bm95 (homóloga a la Bm86) pero como proteína soluble. Esta vacuna fue eficaz para proteger de las infestaciones por garrapata del ganado, tanto en Argentina como en Cuba. Posteriormente, a partir del análisis Bm86 y evaluación in silico algunas propiedades de la proteína tales como potenciales péptidos hidrófobos e hidrófilos sintéticos se han desarrollado derivados de esta glicoproteína. Estos péptidos, usados como antígenos de la vacuna en el ganado mostraron una eficacia entre 81% y 35%.

[005] Debido a que las formulaciones utilizando el Bm86 como antígeno de la vacuna no siempre confiere niveles de protección apropiado para el control de *R. microplus*, varios grupos de investigación han estado tratando de identificar nuevos

antígenos candidatos para el control de esta especie y otras especies de garrapata . En consecuencia, se han descrito otras proteínas con potencial de vacuna que estimulan el sistema inmune del huésped para intervenir en las diversas etapas del ciclo de vida de la garrapata. Varios grupos han podido aislar y caracterizar proteínas de garrapatas presentes en diferentes vías metabólicas que, cuando se utilizan como inmunógenos de vacunas inducen protección contra la infestación por *R. microplus*. Análisis de las poblaciones de garrapatas de Uruguay y Brasil mostraron la presencia de polimorfismos en el gen Bm86, incluso en las zonas del gen que se consideraban importantes para el desarrollo de la protección inmunológica en los animales. Con el fin de evitar la baja eficacia de las vacunas basadas en Bm86, nuestro grupo de investigación aisló la región del gen Bm86 de garrapatas nativas de Uruguay llamado Bm86uy y a partir de este material génico se produjo la proteína recombinante correspondiente al gen presente en estos aislamientos.

[006] Una proteína sin función biológica conocida, Hq05 se describe en la garrapata *Haemaphysalis qinghaiensis*. Esta proteína fue capaz de inducir una respuesta inmune protectora en conejos contra la infestación por las garrapatas *H.qinghaiensis*. Cuando se compara con la secuencia de aminoácidos Hq05 se relaciona con un aislado secuencia de *Boophilus annulatus* (Ba05) con quien tiene un alto grado de similitud. Un análisis posterior mostró la presencia de

proteínas similares en *Hyalomma dromedarii* sp y *Rhipicephalus* sp con un peso molecular similar a la obtenida en *B. annulatus*, sugiriendo que el gen Ba05 se conserva entre especies. La proteína recombinante (rHq05) de la garrapata *Haemaphysalis qinghaiensis* se utilizó para inmunizar ovejas. La vacunación de las ovejas con rHq05 llevó a una protección inmunológica contra la infestación contra *H. qinghaiensis*, lo que resultó en una reducción del 40% del número de huevos producidos por las garrapatas en comparación con el grupo control. Estos resultados mostraron que rHq05 podría ser un buen candidato para ser incluido en una vacuna contra las garrapatas. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha detectado la presencia de una proteína homóloga (Bm05) en garrapatas *R. microplus*. La proteína recombinante Bm05 se expresó en gran escala, purificada y caracterizada. La proteína Bm05 tiene un alto grado de conservación con otras proteínas similares como Hq05, que hace que sea un candidato interesante para el desarrollo de una vacuna contra varias especies de garrapatas. La proteína Bm05 en asociación con Bm86uy fue utilizada para realizar ensayos de vacunación en el ganado bovino.

[007] Sin embargo, incluso con todas estas declaraciones de que la inmunización puede ser un método eficaz para el control de garrapatas, las vacunas contra las garrapatas se deben emplear en un contexto de control integrado, es decir, en combinación con acaricidas, ya que los métodos de vacunación disponibles en la actualidad no confieren protección o inmunidad total.

[008] La clonación de las regiones codificantes de la Bm05 y Bm86uy se llevaron a cabo utilizando las técnicas de RT-PCR. Para la clonación de ambos genes, se utilizaron *primers* basados en regiones conocidas de genes de otros organismos y también de *R. microplus* presentes en las bases de datos públicos. Se utilizò la técnica de PCR para amplificar las secuencias de codificación de la proteína a partir de cDNA de los tejidos de *R. microplus* a partir de productos de PCR que correspondían a fragmentos de 513 pb y 1950 pb, en referencia a las secuencias de codificación del ADNc de Bm05 Bm86uy, respectivamente. Los fragmentos génicos de Bm86uy y Bm05 se clonaron en el plasmido pGEM-T, y posteriormente se transformaron *E. coli* (cepa *DH5*). Los plásmidos recombinantes fueron extraídos por la técnica miniprep y posteriormente se determinaron las secuencias de ácidos nucleicos de los genes Bm05 y Bm86uy. Las secuencias de aminoácidos predictas de Bm05 y Bm86Uy de *R. microplus* fueron verificadas por análisis comparativos con las secuencias obtenidas del GenBank. La clonación de las regiones codificantes del Bm05 y Bm86uy en plásmidos para la expresión de las proteínas recombinantes se realizaron utilizando técnicas de PCR. Para la clonación, primers específicos para los genes se utilizaron en la reacción de PCR para amplificar las secuencias de codificación insertadas en los plásmidos pGEM-T. Los productos obtenidos por PCR correspondía a fragmentos de 531 y 1968 bp, referentes a las secuencias codificadoras del cDNA de Bm05 y Bm86uy respectivamente y la

adición al final de 18 nucleòtidos codificantes de 6 aminoácidos de histidina.

Los fragmentos se clonaron en vectores de PET y las bacteria *E. coli* (cepa DH5) se transformaron con los plásmidos resultantes. Los plásmidos recombinantes se extrajeron por la técnica miniprep y se determinò las secuencias de ácidos nucleicos de las mismas. Las secuencias de aminoácidos predichas de Bm05 y Bm86uy *R. microplus* se corroboraron mediante la verificación cruzada con secuencias que se obtuvieron del GenBank.

[009] Las bacterias *E. coli* cepa TOP10 fueron transformadas con las construcciones resultantes (pET-Bm05 y pET-Bm86uy) por el método de electroporación. A partir de las colonias bacterianas transformadas, una colonia de cada plásmido se inoculó en 1,5 ml de LB que contiene ampicilina y se cultivó durante 16 horas a 37 ° C con agitación constante. Los plásmidos recombinantes fueron extraídos por miniprep y las secuencias de ácidos nucleicos fueron determinadas por secuenciación.

[0010] La bacteria *E. coli* cepa BL21 (DE3) y BL21 (DE3) RIL se transformaron por electroporación para la inserción del plásmido recombinante pET-Bm05 y pET-Bm86uy, respectivamente. Las bacterias transformadas se cultivaron en placas que contenían agar LB y ampicilina y se incubaron durante 18 horas a 37 ° C. Una colonia aislada de cada transformante se inoculó en 25 ml de medio SOB que contenía ampicilina (100 ug.mL<sup>-1</sup>) y cultivadas 18 horas a 37 ° C con agitación de 180 rpm. Después del cultivo, las células se recogieron por centrifugación a



5000 g durante 5 minutos a 4 ° C y se resuspendieron en medio fresco sin antibióticos y se utilizaron para inocular 500 ml de medio SOB. Estos cultivos se incubaron a 37 ° C con agitación de 180 rpm hasta que alcanzaron la densidad óptica de 0,6 a una longitud de onda de 600 nm. Para la inducción de la expresión de proteínas, se añadió isopropil- $\beta$ -D-galactósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM y el cultivo se incubó durante 4 horas a 37 ° C. Las células cultivadas se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos a 4 ° C y el pellet se resuspendió en 20 ml de 20 tampón fosfato de sodio mM, pH 7,4 que contiene 1 mg / ml de lisozima, y se incubaron durante una hora a 37 ° C. Las células se congelaron y descongelaron tres veces. La muestra se descongeló en el último ciclo y se centrifugó (12.000 x g durante 20 min) para recoger el sobrenadante. El sedimento se lavó con tampón de fosfato 20 mM, imidazol 30 mM y 0,5 M NaCl, pH 7,4 y se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. El tampón de lavado se repitió y se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 12.000 g durante 30 minutos a 4 ° C. El sobrenadante se filtró con filtros de porosidad 0,45  $\mu$ m y se separó por métodos cromatográficos en columna de una resina con metal inmovilizado (níquel) previamente lavada con agua destilada y se equilibró con tampón de fosfato 20 mM, imidazol 30 mM y NaCl 0,5 M, pH 7,4. Después de la aplicación de la muestra, las proteínas bacterianas unidas se lavaron con tampón de 15 ml de 20 mM de fosfato, imidazol 30 mM y 0,5 M NaCl, pH 7,4. Las proteínas

recombinantes se eluyeron con tampón de elución (fosfato 20 mM, pH 7,4, 0,5 M NaCl, imidazol 200 mM) para obtener la proteína recombinante purificada Bm05 y Bm86uy.

[0011] Las secuencias deducidas de la Bm05 y Bm86uy contiene 171 a 674 aminoácidos y masa molecular predicha de 19,1 kDa y 70 kDa, respectivamente.

[0012] Para probar la capacidad de Bm05 y Bm86uy de inducir una respuesta inmune protectora, bovinos de 6 meses se inocularon por vía intramuscular 3 veces con intervalos de 10 días entre cada inoculación. Los inóculos se prepararon con 200 ug de la proteína recombinante Bm05 y 100 ug de la proteína recombinante Bm86uy mezcladas en adyuvante Montanide 888 y Marcol 52. Después de 15 días de la última inoculación, los 3 bóvinos que fueron usados como controles negativos (inoculadas con adyuvante + buffer fosfato salino fisiológico (PBS)) y 3 bovinos vacunados con la preparación arriba mencionada con las proteínas Bm86uy y la proteína Bm05 fueron infectados con 6000 larvas de la garrapata del ganado bovino *R. microplus*. Los animales se mantuvieron en boxes individuales y las garrapatas que completaron el ciclo biológico en el huésped se recogieron, se contaron y se pesaron. Muestras diarias de al menos 5 g de hembras repletas obtenidos para cada animal bovino, se incubaron a 28°C con un 85% de humedad relativa para realizar la puesta de huevos. Después de 20 días de postura, la masa de huevos se pesó y se los comparò con los huevos de la postura inicial con el objetivo de obtener el % y número de huevos que

se transformaron en larvas. Además al final del período de incubación, las larvas se separaron y se pesaron.

[0013] La eficacia de antígenos Bm05 y Bm86uy en la inducción de una respuesta inmune protectora en el ganado bovino se calculó utilizando la fórmula:

[0014] Eficacia (%) =  $100 [1 - (CRT \times CRO \times CRF)]$  donde: CRT: corresponde al coeficiente de reducción de hembras grávidas o teleòginas ; CRO: corresponde al coeficiente de reducción de la ovipostura o postura de huevos de las hembras grávidas; CRF: es el coeficiente de reducción de la fertilidad de los huevos o de los huevos que se transformaron en nuevas larvas.

[0015] El coeficiente de reducción en el número de hembra grávidas o teleògenas (CRT) se calcula como la relación entre el número promedio de hembras repletas que completaron el ciclo en los terneros vacunados y el número promedio de hembras repletas que completaron el ciclo en terneros no vacunados (controles). El coeficiente de reducción de la oviposición (CRO) se calcula como proporción de peso medio de los huevos generados durante la colocación 5 gramos de hembras repletas que completaron el ciclo en los terneros vacunados y el peso medio de los huevos producidos durante la postura de 5 gramos de hembras repletas que completaron el ciclo de los bovinos vacunados. El coeficiente de reducción de la fertilidad (CRF) de los huevos se calcula como la relación entre la suma promedio del peso de las larvas derivado de los huevos de las garrapatas hembras (teleògenas) en el ganado vacunado y el

promedio de la suma del peso de las larvas derivado de los huevos de las hembras teleògenas del ganado sin vacunar.

[0016] El número de hembras repletas que completaron el ciclo en cada bovino identificadas como **Garrapatas (N)**, el índice de capacidad de desarrollo de las hembras repletas, tomado como una muestra, que completa el ciclo en cada sector de la carne (5,0 gramos de hembras repletas) representadas como **Garrapatas (P)** y el índice de fertilidad de los huevos de las hembras repletas tomadas como muestra de que ha completado el ciclo en el ganado identificada por dos parámetros postura en gramos (**Postura g**) y eclosión de huevos (**Eclosion de Huevos-g**)

[0017] La Tabla I: Resultados de la vacunación del ganado desafiado con garrapatas.

<b>GRUPO</b>	<b>CARRAPATAS (N)</b>	<b>CARRAPATAS (g)</b>	<b>POSTURA (g)</b>	<b>ECLOSION DE HUEVOS (%)</b>
<b>Control</b>				
box 5	1938	541,44	20,055	86
box 6	1988	562,04	21,275	75
box 7	1751	540,345	17,065	73
Total	5677	1643,82	58,395	234
Média	1892	548	19,46	78
±DP	125	12,22	2,16	0,07
<b>Vacunado</b>				
box 8	254	53,278	14,021	2
box 9	736	199,754	18,498	49
box 10	356	96,795	14,84	45

Total	1346	349,827	47,359	96
Média	449	116	15,8	32
±DP	254	75,22	2,38	0,15
Diferencia (%)	76,26.	78,83.	18,80.	58,97.

---

a) Diferencia (%) =  $100 \times (1 - (\text{valor medio del valor de grupo vacunado} / \text{media del grupo de control}))$ .

b) Relación entre el peso de las hembras y el peso del huevo.

c) Relación entre el peso de las larvas y el peso del huevo.

SEM = Desviación Estándar.

[0018] La capacidad de los anticuerpos desarrollados por la vacunación con Bm86uy y Bm05 redujeron el número de garrapatas y la capacidad de reproducción de las garrapatas mostrando claramente la capacidad de estas dos proteínas recombinantes para ser usadas como antígenos potenciales para el desarrollo de vacunas contra la garrapata del ganado bovinos.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Nombre del solicitante: Universidad de la República (UDELAR).

<120> Título de la invención: Vacuna contra la garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que contiene dos proteínas o péptidos derivados.

<160> Número de secuencias constantes solicitud: dos (2)

<210> SEQ ID NO: 01

<211> Tamaño: 177 aminoácidos

<212> Tipo: Proteína

<223> Fuente original de la molécula: varios tejidos de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

<400> SEQ ID NO: 01

001 Met Val Ala Phe Lys Ala Ala Leu Ile Leu Cys Val Leu 013  
014 Val Leu Pro Ala Tyr Ala Gln Thr Ala Gly Ala Glu Pro 026  
027 Pro Arg Pro Glu Ile Asn Trp Gly Lys Cys Pro Gln Leu 039  
040 Gln Pro Ser Lys Glu Glu Arg Gln Gln Lys Ala Leu Val 052  
053 Ile Asp Thr Cys Leu Glu Lys Val Pro Leu Pro Asp Val 065  
066 Glu His Ala Asn Glu Thr Val Ile Gln Gln His Arg Glu 078  
079 Asp Val Thr Thr Cys Ala Leu His Ser Glu Gly Trp Phe 091  
092 Asn Lys Asn Gly Gln Tyr Arg Phe Asp Arg Ala Arg Thr 104  
105 Glu Ile Leu Asn Lys Lys Leu Ala Ala Asp Val Glu Pro 117  
118 Lys Val Leu Ala Lys His Asp Glu Cys Lys Lys Glu Ala 130

131 Glu Glu Lys Phe Ala His Gln Phe Val Ala Gln Val Gln 143  
144 Leu Tyr Gln Ala Cys Met Asp Tyr His Ile Ser Gln Ile 156  
157 Cys Gly Ile Gln Ile Gln Gly Gly Ala Gly Ala Pro Ala 169  
170 His Gly His His His His His His

<210> SEQ ID NO: 02

<211> Tamaño: 656 aminoácidos

<212> Tipo: Proteína

<223> Fuente original de la molécula: garrapatas *Rhipicephalus*  
(*Boophilus*) *microplus* intestino.

<400> SEQ ID NO: 02

001 Met Arg Gly Ile Ala Leu Phe Val Ala Ala Val Ser Leu 013  
014 Ile Val Glu Cys Thr Ala Glu Ser Ser Ile Cys Ser Asp 026  
027 Phe Gly Asn Glu Phe Cys Arg Asn Ala Glu Cys Glu Val 039  
040 Val Pro Gly Ala Glu Asp Asp Phe Val Cys Lys Cys Pro 052  
053 Arg Asp Asn Met Tyr Phe Asn Ala Ala Glu Lys Gln Cys 065  
066 Glu Tyr Lys Asp Thr Cys Lys Thr Arg Glu Cys Ser Tyr 078  
079 Gly Arg Cys Val Glu Ser Asn Pro Ser Lys Gly Ser Cys 091  
092 Val Cys Glu Ala Ser Asp Asp Leu Thr Leu Gln Cys Lys 104  
105 Ile Lys Asn Asp Tyr Ala Thr Asp Cys Arg Asn Ser Gly 117  
118 Gly Thr Ala Lys Leu Arg Lys Asp Gly Val Ile Gly Ala 130  
131 Thr Cys Asp Cys Gly Glu Trp Gly Ala Met Asn Lys Thr 143  
144 Thr Arg Asn Cys Val Pro Thr Thr Cys Leu Arg Pro Asp 156  
157 Leu Thr Cys Lys Asp Leu Cys Val Lys Asn Leu Leu Gln 169  
170 Arg Asp Ser Arg Cys Cys Gln Gly Trp Asn Ser Arg Asn 182  
183 Cys Ser Ala Ala Pro Pro Ala Asp Pro Tyr Cys Ser Pro 195

196 Gly Ser Pro Lys Gly Pro Asp Gly Gln Cys Lys Asn Ala 208  
209 Cys Lys Met Lys Glu Ala Gly Phe Val Cys Glu His Gly 221  
222 Cys Arg Ser Thr Ala Lys Ala Tyr Glu Cys Thr Cys Pro 234  
235 Arg Gly Phe Thr Val Ala Glu Asp Gly Ile Thr Cys Lys 247  
248 Ser Ile Pro Tyr Pro Gly Gly Cys Thr Val Glu Gln Lys 260  
261 Gln Thr Cys Arg Pro Thr Glu Asn Cys Arg Val His Ala 273  
274 Gly Lys Val Leu Cys Glu Cys Pro Trp Asn Gln His Leu 286  
287 Val Gly Asp Lys Cys Ile Gly Asp Cys Val Glu Asn Lys 299  
300 Cys His Glu Glu Phe Thr Asp Cys Gly Val Tyr Met Asn 312  
313 Arg Gln Ser Cys Phe Cys Pro Trp Lys Ser Arg Lys Pro 325  
326 Gly Pro Asn Val Asn Ile Asn Ala Cys Leu Leu Asn Glu 338  
339 Tyr Tyr Tyr Met Val Ser Phe Thr Pro Asn Ile Ser Leu 351  
352 His Ser Asp His Cys Asp Trp Tyr Glu Asp Arg Val Leu 364  
365 Glu Ala Ile Arg Thr Ser Ile Gly Lys Glu Val Phe Lys 377  
378 Val Glu Ile Leu Asn Cys Thr Gln Asn Ile Lys Ala Arg 390  
391 Leu Ile Ala Glu Lys Pro Leu Ser Lys His Val Leu Arg 403  
404 Lys Leu Gln Ala Cys Glu His Pro Ile Gly Glu Trp Cys 416  
417 Met Met Tyr Pro Lys Leu Leu Ile Lys Lys Asn Ser Ala 429  
430 Thr Glu Ile Glu Glu Glu Asn Leu Cys Asp Ser Leu Leu 442  
443 Lys Asn Gln Glu Ala Ala Tyr Lys Gly Gln Asn Lys Cys 455  
456 Val Lys Val Asp Asn Leu Phe Trp Phe Gln Cys Ala Asp 468  
469 Gly Tyr Thr Thr Thr Tyr Glu Met Thr Arg Gly Arg Leu 481  
482 Arg Arg Ser Val Cys Lys Ala Gly Val Ser Cys Asn Glu 494  
495 Asn Glu Gln Ser Glu Cys Ala Asn Lys Gly Gln Ile Cys 507  
508 Val Tyr Glu Asn Gly Lys Ala Asn Cys Gln Cys Pro Pro 520  
521 Asp Thr Lys Pro Gly Glu Ile Gly Cys Ile Glu Arg Thr 533  
534 Thr Cys Asn Pro Lys Glu Ile Gln Glu Cys Gln Asp Lys 546  
547 Lys Leu Glu Cys Val Tyr Lys Asn His Lys Ala Glu Cys 559  
560 Lys Cys Pro Asp Asp His Glu Cys Ser Arg Glu Pro Ala 572  
573 Lys Asp Ser Cys Ser Glu Glu Asp Asn Gly Lys Cys Gln 585  
586 Ser Ser Gly Gln Arg Cys Val Met Glu Asn Gly Asn Ala 598  
599 Val Cys Lys Glu Lys Ser Asp Ala Thr Thr Ala Ser Thr 611



612 Thr Thr Thr Lys Ala Lys Asp Lys Asp Pro Asp Pro Gly 624  
625 Lys Ser Ser Ala Ala Ala Val Ser Ala Thr Gly Leu Leu 637  
638 Leu Leu Arg Ala Ala Thr Ser Val Thr Ala Ala Ser Leu 650  
651 His His His His His His