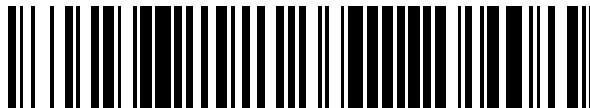


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 407**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2008 E 08793829 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2183597**

54 Título: **Proteínas de Streptococcus inmunogénicas**

30 Prioridad:

06.08.2007 EP 07113844

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.12.2013

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
(100.0%)
BINGER STRASSE 173
55216 INGELHEIM AM RHEIN, DE**

72 Inventor/es:

SMITH, HILDA ELIZABETH

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 432 407 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de *Streptococcus* inmunogénicas.

La invención se refiere al campo de la medicina. Más concretamente, la invención se refiere a proteínas de *Streptococcus* inmunogénicas y a sus partes, derivados y análogos inmunogénicos.

5 El género *Streptococcus* está formado por una amplia variedad de bacterias Gram-positivas patógenas y comensales que viven en una amplia gama de hospedantes, incluyendo seres humanos, caballos, cerdos y vacas. Dentro del hospedante, los estreptococos a menudo colonizan las superficies mucosas del tracto respiratorio superior. Sin embargo, en ciertas circunstancias, los estreptococos también pueden provocar enfermedades que varían de subagudas a agudas o incluso crónicas.

10 Hasta la fecha, muchas vacunas comerciales contra *Streptococcus* se basan en bacterinas de células completas. En general, dichas bacterinas producen una significativa protección frente a la exposición a serotipos homólogos, pero no protegen frente a la exposición a serotipos heterólogos. La vacunación con *Streptococcus* de células completas a menudo produce una respuesta inmunológica que se dirige contra la misma cepa de *Streptococcus*, pero que no se dirige (suficientemente) contra otras cepas de *Streptococcus*, ni mucho menos contra otros serotipos de
15 *Streptococcus*. Como resultado, muchas vacunas proporcionan insuficiente protección frente a cepas y/o serotipos heterólogos, porque la vacunación contra una cepa de *Streptococcus* en general no es eficaz para contrarrestar la infección por otra cepa de *Streptococcus*. Además, la vacunación contra un serotipo de *Streptococcus* en general no es eficaz para contrarrestar la infección por otro serotipo de *Streptococcus*. Por tanto, se desean composiciones inmunogénicas capaces de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas de *Streptococcus*,
20 preferiblemente contra dos serotipos de *Streptococcus*.

El documento WO 00/37105, y Zhang *et al.*, Infection and Immunity, 74 (2006), 4200-4213, describen métodos para identificar proteínas de *Streptococcus* capaces de provocar respuestas inmunológicas. Groschup *et al.*, Epidemiol. Infect., 107 (1991), 297-310, describen antígenos de *S. uberis*. Almeida *et al.*, Vet. Microbiology, 115 (2006), 183-191, y el documento WO 2004/048515, describen la identificación de la molécula de adhesión de *Streptococcus*
25 *uberis* (SUAM).

Un objeto de la presente descripción es proporcionar proteínas *Streptococcus*, y sus partes inmunogénicas, derivados y/o análogos, y moléculas de ácidos nucleicos que los codifican, que son capaces de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas de *Streptococcus uberis*.

30 La invención proporciona un método para identificar una proteína de *Streptococcus uberis* que es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas de *Streptococcus uberis*, comprendiendo dicho método:

a) identificar al menos parte de una proteína segregada, una proteína asociada a la superficie y/o una proteína con al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína listada en la figura 4;

b) seleccionar al menos una proteína identificada en la etapa a) que se conserva a través de al menos dos cepas de *Streptococcus uberis*; y

35 c) ensayar si al menos una proteína seleccionada en la etapa b) o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de esta, es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una primera cepa de *Streptococcus uberis*, y un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una segunda cepa de *Streptococcus uberis*.

40 Según la presente invención, se identifica al menos una proteína de *Streptococcus uberis* que es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas de *Streptococcus uberis*. Dicha proteína es adecuada para inmunizar a un individuo y/o un animal no humano porque es capaz de provocar una respuesta inmunológica amplia. Por tanto, la presente invención obvia la necesidad de proporcionar una vacuna para cada una de las cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*. Por tanto, el uso de una proteína inmunogénica de *Streptococcus uberis* de la invención ahorra tiempo y dinero. De modo más importante, una proteína inmunogénica de *Streptococcus uberis* de
45 la invención es capaz, en principio, de provocar una respuesta inmunológica contra una cepa de *Streptococcus uberis* que aún no sea conocida, o contra la que aún no existe una vacuna específica disponible (por ejemplo, una cepa que haya evolucionado recientemente en la naturaleza). Preferiblemente, una proteína de *Streptococcus uberis* de la invención es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos serotipos de *Streptococcus uberis*. Una realización preferida de la invención, por tanto, proporciona un método para identificar una proteína de
50 *Streptococcus uberis* que es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos serotipos de *Streptococcus uberis*, comprendiendo dicho método:

a) identificar al menos parte de una proteína segregada, una proteína asociada a la superficie y/o una proteína que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína listada en la figura 4;

55 b) seleccionar al menos una proteína identificada en la etapa a) que se conserva a través de al menos dos cepas de *Streptococcus uberis*; y

c) ensayar si al menos una proteína seleccionada en la etapa b) o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de esta, es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por un primer serotipo de *Streptococcus uberis*, y un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por un segundo serotipo de *Streptococcus uberis*.

5 En la presente se define una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas de *Streptococcus uberis* y/o serotipos de *Streptococcus uberis* como una respuesta inmunológica humoral y/o celular dirigida contra *Streptococcus uberis* de al menos dos cepas y/o serotipos diferentes. Dicha respuesta inmunológica se provoca, por ejemplo, en un animal no humano. También es posible provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis* en un individuo humano para prevenir y/o contrarrestar una enfermedad relacionada con *Streptococcus uberis*. Una respuesta inmunológica humoral conduce a la producción de anticuerpos, mientras que una respuesta inmunológica celular potencia predominantemente la formación de células inmunológicas reactivas, tales como células T asesinas. En general, ambas partes de la respuesta inmunológica son provocadas por la administración de una proteína inmunogénica o una parte inmunogénica de esta. Una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas/serotipos de *Streptococcus uberis* comprende preferiblemente la producción de anticuerpos. Dicha respuesta inmunológica es preferiblemente capaz de disminuir, al menos en parte, el número de organismos de *Streptococcus uberis* en un individuo humano y/o un animal no humano. Además, dicha respuesta inmunológica preferiblemente es capaz de contrarrestar, al menos en parte, un trastorno provocado por *Streptococcus uberis*.

20 Una cepa de *Streptococcus uberis* puede identificarse mediante sus características morfológicas, bioquímicas y serológicas, tal como se conoce en la técnica. Un serotipo de *Streptococcus uberis* es un grupo de *Streptococcus uberis* cuya clasificación se basa en la presencia de polisacáridos antigénicos específicos. La clasificación de los serotipos de *Streptococcus uberis* también es muy conocida en la técnica.

25 Un método de la invención comprende identificar al menos parte de una proteína segregada, una proteína asociada a la superficie y/o una proteína que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína listada en la figura 4. Dicha proteína se identifica de diversos modos. En una realización de la invención se emplea una estrategia genómica. Se identifica un gen que codifica una proteína segregada y/o una proteína asociada a la superficie, por ejemplo, buscando un motivo de dicha proteína segregada y/o proteína asociada a la superficie. Dicho motivo comprende preferiblemente un sitio de unión a lípidos, un sitio de ruptura de peptidasas señal y/o un sitio de unión de sortasa. Por supuesto, es posible buscar otros motivos conocidos en la técnica. Por tanto, una realización de la invención proporciona un método de la invención, en el que dicha proteína segregada y/o proteína asociada a la superficie se identifica identificando, en al menos parte de la secuencia genómica de *Streptococcus uberis*, un gen que comprende un motivo de una proteína segregada y/o asociada a la superficie.

35 Además, o como alternativa, un gen que codifica una proteína segregada y/o una proteína asociada a la superficie se identifica mediante uno o más métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una vez se conozca un gen de *Streptococcus uberis* que codifique una proteína segregada y/o una proteína asociada a la superficie, es posible seleccionar otra secuencia genómica de *Streptococcus uberis* para la presencia de un gen con un alto porcentaje de identidad de secuencia.

40 En una realización, dicho método de selección comprende un método en el que dicha otra secuencia genómica de *Streptococcus uberis* se selecciona por su capacidad para hibridarse a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína segregada y/o asociada a la superficie de *Streptococcus uberis*. Por tanto, la invención proporciona un método según la invención, en el que dicha proteína que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína listada en la figura 4 se identifica identificando, en al menos parte de la secuencia genómica de *Streptococcus uberis*, un gen que es capaz de hibridarse con cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos listadas en la figura 4 a 65 °C en un tampón que tiene fosfato de sodio 0,5 M, EDTA 1 mM, y dodecilsulfato de sodio al 7% a un pH de 7,2, en el que la molécula de ácido nucleico permanece hibridada después de lavar dos veces con un tampón que contiene fosfato de sodio 40 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM y dodecilsulfato de sodio al 5% durante 30 minutos a 65 °C, y de lavar dos veces con un tampón que contiene fosfato de sodio 40 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM y dodecilsulfato de sodio al 1% durante 30 minutos a 65 °C.

50 La técnica además proporciona diversos métodos para determinar si una proteína de *Streptococcus uberis* tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína listada en la figura 4. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una proteína de *Streptococcus uberis* se compara con la secuencia de aminoácidos de una proteína listada en la figura 4. También es posible aplicar una estrategia genómica. Un gen que codifica una proteína de *Streptococcus uberis* que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína listada en la figura 4 se identifica, por ejemplo, seleccionando una secuencia genómica de *Streptococcus uberis* para detectar una secuencia de nucleótidos que tenga al menos 80% de identidad de secuencia con un gen bacteriano que codifica una proteína listada en la figura 4. Por tanto, una realización de la invención proporciona un método de la invención, en el que una proteína que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína listada en la figura 4 se identifica identificando, en al menos parte de la secuencia genómica de *Streptococcus uberis*, un gen que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con un ácido nucleico listado en la figura 4. Sin embargo, en la técnica se conocen muchos métodos alternativos para determinar si una proteína de *Streptococcus uberis* tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína listada en la figura 4.

Tras haber identificado al menos un gen de *Streptococcus uberis* que codifique una proteína segregada, una proteína asociada a la superficie y/o una proteína que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína listada en la figura 4, preferiblemente se determina si al menos uno de dichos genes se conserva a través de al menos dos cepas de *Streptococcus uberis*. Un gen de una primera cepa de *Streptococcus uberis* se conserva a través de al menos dos cepas de *Streptococcus uberis* si un genoma de una segunda cepa de *Streptococcus uberis* comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente 60% de identidad de secuencia con dicho gen de dicha primera cepa de *Streptococcus uberis*. Preferiblemente, dicha secuencia de ácido nucleico tiene al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia con dicho gen. La expresión "identidad de secuencia" se refiere al porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de aminoácidos. Dos secuencias de ácidos nucleicos tienen al menos 60% de identidad de secuencia entre sí cuando dichas secuencias muestran al menos 60% de coincidencia de secuencia después de alinear las dos secuencias y de introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Los métodos y los programas informáticos para el alineamiento son muy conocidos en la técnica. Un programa informático que puede utilizarse o adaptarse para el objetivo de determinar si una secuencia candidata se ajusta a esta definición es "Align 2", desarrollado por Genentech, Inc., que se presentó con la documentación del usuario en the United States Copyright Office, Washington, D.C. 20559, el 10 de diciembre, 1991.

Según una realización de la invención, si un gen de la invención se conserva a través de al menos dos cepas de *Streptococcus uberis*, la proteína codificada por dicho gen es una buena candidata para evaluar si dicha proteína, o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de esta, es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra más de una cepa de *Streptococcus uberis*.

Preferiblemente, se determina si dicho gen se conserva a través de al menos dos serotipos de *Streptococcus uberis*, para identificar una buena proteína candidata (codificada por dicho gen) que se ensaya para su capacidad de provocar una respuesta inmunológica contra más de un serotipo de *Streptococcus uberis*. Por tanto, se prefiere un método de la invención que también comprende seleccionar un gen que se conserva a través de al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*. Tras haber identificado un gen conservado a través de al menos dos cepas/serotipos de *Streptococcus uberis*, preferiblemente se obtiene una proteína codificada por dicho gen. Además, o como alternativa, se obtiene una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de dicha proteína. La técnica proporciona diversos métodos para obtener una proteína codificada por un gen, o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de esta. Dicho gen, por ejemplo, se expresa mediante un sistema de expresión adecuado. Los ejemplos no limitantes de sistemas de expresión comprenden células hospedantes eucariotas, tales como células hospedantes procariontas y de levaduras, tales como *Escherichia coli*. Preferiblemente, un gen que codifica una proteína segregada, una proteína asociada a la superficie y/o una proteína que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína listada en la figura 4, conservándose dicho gen a través de al menos dos cepas de *Streptococcus uberis*, se expresa en un sistema de expresión procarionta. Se prefiere un sistema de expresión procarionta porque una proteína de *Streptococcus uberis* (procarionta), en principio, se expresa mejor en un sistema de expresión procarionta. Además, un sistema de expresión procarionta en general es más fácil de componer y utilizar.

Un método de la invención comprende determinar si al menos una proteína, o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de esta, es capaz de unirse específicamente con un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una primera cepa de *Streptococcus uberis*, y un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una segunda cepa de *Streptococcus uberis*. Preferiblemente, se determina si al menos una proteína, o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de esta, es capaz de unirse específicamente con un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por un primer serotipo de *Streptococcus uberis*, y un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por un segundo serotipo de *Streptococcus uberis*. Se conocen muchos métodos en la técnica para realizar dicho ensayo. Preferiblemente, se emplea suero de al menos dos animales infectados por al menos dos cepas diferentes de *Streptococcus uberis*. Como alternativa, se emplea el suero de un solo animal, estando dicho animal infectado por al menos dos cepas diferentes de *Streptococcus uberis*. Según una realización, un animal no humano está infectado por al menos una primera cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*, y un segundo animal no humano está infectado por al menos una segunda cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*. Dichas cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis* se administran, por ejemplo, por vía intravenosa a dicho animal. Después, según una realización, se recoge el suero de dichos animales que comprende anticuerpos y/o células inmunológicas específicas para *Streptococcus uberis*. Dicho suero opcionalmente se procesa antes del uso. Por ejemplo, los anticuerpos y/o las células inmunológicas son al menos en parte concentradas y/o aisladas. Una proteína y/o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de esta preferiblemente se aísla y/o se produce de modo recombinante, y después se incuba con dicho suero (o con anticuerpos y/o células inmunológicas (parcialmente) aislados) derivado de dichos animales. Es posible administrar suero, anticuerpos y/o células inmunológicas derivados de un primer animal, junto con suero, anticuerpos y/o células inmunológicas derivados de un segundo animal. Como alternativa, se administra en primer lugar suero, anticuerpos y/o células inmunológicas derivados de un primer animal, tras lo cual se añade suero, anticuerpos y/o células inmunológicas derivados de un segundo animal. En otra realización, se administra suero, anticuerpos y/o células inmunológicas de un primer animal a un lote separado que comprende al menos una proteína y/o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo, y se administra suero, anticuerpos y/o células inmunológicas de un segundo animal a otro lote que comprende al menos una proteína y/o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo. Después de una

incubación, dicho suero, anticuerpos y/o células inmunológicas se lavan, y se visualizan los anticuerpos y/o las células inmunológicas unidos, utilizando cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos unidos se incuban, por ejemplo, con un segundo anticuerpo capaz de unirse específicamente a dichos anticuerpos unidos, conjugándose dicho segundo anticuerpo con peroxidasa de rábano. Después de lavar el segundo anticuerpo no unido, se administra peróxido de hidrógeno. La degradación del peróxido de hidrógeno por la peroxidasa de rábano se acopla a la oxidación de un compuesto cromogénico, de modo que la reacción se hace visible. Si una proteína y/o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de esta parece que está unida específicamente a un anticuerpo y/o una célula inmunológica suscitada por una primera cepa de *Streptococcus uberis*, y a un anticuerpo y/o una célula inmunológica suscitada por una segunda cepa de *Streptococcus uberis*, esto indica que dicha proteína, parte inmunogénica, derivado y/o análogo es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas de *Streptococcus uberis*. En una realización preferida, se emplea un anticuerpo y/o una célula inmunológica derivada de un suero convaleciente de un animal que ha sido infectado con un *Streptococcus uberis*. Un suero convaleciente se deriva de un animal que ha contrarrestado con eficacia esta infección. Por tanto, un suero convaleciente de un animal que ha sido infectado con *Streptococcus uberis* comprende anticuerpos y/o células inmunológicas que son capaces de proteger a dicho animal frente a una exposición con la misma cepa de *Streptococcus uberis*. Por tanto, se prefiere la incubación con un medio convaleciente para determinar si una proteína y/o parte inmunogénica, derivado y/o análogo según la invención es capaz de provocar una respuesta inmunológica protectora. Así, una realización de la invención proporciona un método para identificar una proteína de *Streptococcus uberis* que es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas de *Streptococcus uberis*, comprendiendo dicho método:

- obtener proteínas de *Streptococcus uberis* aisladas y/o recombinantes;
- incubar dichas proteínas con un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una primera cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*, y con un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una segunda cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*, y
- ensayar si una proteína es capaz de unirse a un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una primera cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*, y un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una segunda cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*.

Las proteínas de *Streptococcus uberis* se obtienen de diversas formas. Preferiblemente, las proteínas segregadas, las proteínas asociadas a la superficie y/o las proteínas que tienen al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína listada en la figura 4 se aíslan a partir de un cultivo de *Streptococcus uberis*. En una realización, las proteínas asociadas a la superficie se separan de *Streptococcus uberis* empleando, por ejemplo, una lisozima.

En una realización, las proteínas de *Streptococcus uberis* se producen de modo recombinante utilizando al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una de dichas proteínas. Tal como se explicó anteriormente, se emplea preferiblemente un gen que codifica una proteína segregada, una proteína asociada a la superficie y/o una proteína que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína listada en la figura 4. Más preferiblemente, dicho gen se conserva a través de al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*. Como alternativa, o además, se genera una proteína, o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de esta, de *Streptococcus uberis* utilizando otro método conocido en la técnica. Por ejemplo, se genera una proteína o un péptido de *Streptococcus uberis* utilizando una técnica de síntesis habitual, tal como la síntesis en fase sólida. Como otro ejemplo, una proteína de *Streptococcus uberis* se aísla a partir de un *Streptococcus uberis*, o se prepara de modo recombinante, tras lo cual se modifica para producir una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo.

En una realización preferida, las proteínas de *Streptococcus uberis* se separan sobre un gel de poliacrilamida y después se incuban con un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una primera cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*, y un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una segunda cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*. Preferiblemente, se emplea un gel de poliacrilamida bidimensional.

En una realización preferida, se identifica una proteína de *Streptococcus uberis* que es capaz de suscitar anticuerpos inductores de la opsonofagocitosis. La opsonofagocitosis es un proceso natural, en el que un microorganismo es opsonizado por opsoninas, tras lo cual dicho microorganismo es fagocitado por una célula fagocítica y muere. Muchos microorganismos deben ser opsonizados por opsoninas para potenciar su fagocitosis. La opsonización es un proceso que hace que el microorganismo sea más susceptible a la captación por un fagocito. En dicho proceso, proteínas y/o anticuerpos opsonizantes se unen a dicho microorganismo, facilitando con ello la captación de dicho microorganismo por dicho fagocito.

Por tanto, se prefiere una proteína de *Streptococcus uberis*, o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de esta, capaz de suscitar anticuerpos inductores de la opsonofagocitosis, porque la administración de dicha proteína y/o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de esta a un animal provoca la presencia de anticuerpos inductores de la opsonofagocitosis en dicho animal que son capaces de fagocitar a *Streptococcus uberis*.

Una proteína de *Streptococcus uberis*, o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de esta, es capaz de

provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*. Para provocar una respuesta inmunológica aún más amplia, se prefiere identificar al menos dos proteínas de *Streptococcus uberis* diferentes y/o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de al menos una de dichas proteínas. Más preferiblemente, se identifican al menos tres proteínas de *Streptococcus uberis* diferentes y/o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de al menos una de dichas proteínas, etc. Cuanto mayor sea el número de proteínas y/o partes inmunogénicas, derivados y/o análogos de *Streptococcus uberis* diferentes identificados de la presente invención, más amplia será la respuesta inmunológica provocada.

En otra realización preferida, se identifica al menos una proteína de *Streptococcus uberis* y/o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo según la invención, que es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos tres cepas de *Streptococcus uberis*. Dicha proteína y/o parte inmunogénica, derivado y/o análogo es particularmente adecuado para provocar una respuesta inmunológica amplia en un individuo humano y/o un animal no humano. Más preferiblemente, se identifica al menos una proteína de *Streptococcus uberis* y/o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo según la invención, que es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos tres serotipos de *Streptococcus uberis*.

Una parte inmunogénica de una proteína se define como una parte de una proteína que es capaz de provocar una respuesta inmunológica en un individuo humano y/o un animal no humano. Preferiblemente, dicha parte inmunogénica es capaz de provocar el mismo tipo de respuesta inmunológica, aunque no necesariamente en la misma cantidad, que dicha proteína. Una parte inmunogénica de una proteína preferiblemente comprende uno o más epitopos de dicha proteína. Un epitopo de una proteína se define como una parte de dicha proteína, con una longitud de al menos aproximadamente 5 aminoácidos, que es capaz de suscitar un anticuerpo y/o una célula inmunológica específicos capaces de unirse específicamente a dicho epitopo. Existen dos tipos diferentes de epitopos: los epitopos lineales y los epitopos conformacionales. Un epitopo lineal comprende un tramo de aminoácidos consecutivos. Un epitopo conformacional está formado por varios tramos de aminoácidos consecutivos que están plegados en posición y que juntos forman un epitopo en una proteína plegada correctamente. Una parte inmunogénica es capaz de comprender uno, o ambos, de dichos tipos de de epitopos.

Una parte inmunogénica de una proteína comprende al menos 5 restos aminoácidos. Preferiblemente, dicha parte inmunogénica comprende al menos 10, más preferiblemente al menos 15, más preferiblemente al menos 25 y lo más preferiblemente al menos 30 aminoácidos consecutivos. Dicha parte inmunogénica preferiblemente comprende como máximo aproximadamente 500 restos aminoácidos, más preferiblemente como máximo aproximadamente 250 aminoácidos, dependiendo del tipo de proteína a partir de la cual se deriva dicha parte inmunogénica.

Una derivado de una proteína se define como una molécula que tiene el mismo tipo de propiedades inmunogénicas, aunque no necesariamente en la misma cantidad. Los expertos en la técnica son capaces de alterar una proteína de modo que las propiedades inmunogénicas de dicha molécula sean fundamentalmente del mismo tipo, aunque no necesariamente en la misma cantidad, comparada con dicha proteína. Un derivado de una proteína se proporciona, por ejemplo, mutando al menos un resto aminoácido de dicha proteína y/o sustituyendo un resto aminoácido por otro resto aminoácido. Preferiblemente, se realizan sustituciones de aminoácidos conservativas, como por ejemplo, la sustitución de un aminoácido que comprende una cadena lateral ácida por otro aminoácido que comprende una cadena lateral ácida, la sustitución de un aminoácido voluminoso por otro aminoácido voluminoso, la sustitución de un aminoácido que comprende una cadena lateral básica por otro aminoácido que comprende una cadena lateral básica, etc.

Los expertos en la técnica son capaces de generar compuestos análogos de una proteína. Esto se realiza, por ejemplo, seleccionando un banco de péptidos o mediante programas de cambio de péptidos. Un análogo tiene fundamentalmente el mismo tipo de propiedades inmunogénicas, aunque no necesariamente en la misma cantidad, que dicha proteína. Un análogo de una proteína comprende, por ejemplo, una proteína de fusión y/o una proteína quimérica.

Para ser capaz de producir una respuesta inmunológica, una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo se proporcionan preferiblemente con las características adecuadas para permitir la producción de anticuerpos y/o células inmunológicas. Dichas características, que son muy conocidas en la técnica, por ejemplo incluyen secuencias flanqueantes adecuadas y/o sitios de ruptura proteolítica adecuados. Como alternativa, o además, una proteína, una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo se proporcionan preferiblemente con un portador inmunogénico.

Tras haber administrado una proteína o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo a un individuo humano o animal no humano, habitualmente se encuentra en riesgo de degradación provocada por una serie de fuerzas distintas tales como, por ejemplo, proteólisis, desplegamiento, valores extremos de pH, detergentes y altas concentraciones salinas. Para prolongar la vida de una proteína, o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo, su resistencia a la degradación preferiblemente se potencia, por ejemplo, sintetizando un péptido con una carboxamida C-terminal y/o acetilando el extremo N-terminal de un péptido para mantener las características de carga nativas. En una realización, la resistencia a la degradación se potencia aún más mutando una proteína o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo, de modo que un proceso de desplegamiento local, que hace que dicha proteína o parte inmunogénica, derivado y/o análogo sea susceptible a la autólisis, sea en parte inhibido. Las

estrategias de mutación estabilizante son conocidas y se describen, por ejemplo, en Matthews (1991), Alber (1991), Vriend y Eijnsink (1993), y Fersht y Serrano (1993).

5 Una proteína segregada se define como una proteína que se produce en la naturaleza en una célula y/o un organismo, y al menos en parte es segregada de dicha célula y/u organismo hacia su entorno. Así, si se cultiva *Streptococcus uberis*, una proteína segregada está al menos en parte presente en al menos parte del medio de cultivo, al menos en algún momento. No es necesario que una proteína segregada sea producida y/o segregada continuamente. Una proteína segregada, por ejemplo, puede ser producida y/o segregada solo durante una fase concreta del ciclo de vida bacteriano. Además, no es necesario que la producción y la secreción de una proteína segregada sean al mismo tiempo. Por ejemplo, algunas proteínas segregadas primero se acumulan en el interior de una célula y son segregadas en un momento posterior.

Una proteína asociada a la superficie se define como una proteína que en la naturaleza forma parte de la superficie de una célula, o que está unida a la superficie de una célula. Cuando dicha proteína asociada a la superficie está unida a la superficie de una célula, aquella se une de modo directo o indirecto. La unión indirecta implica, por ejemplo, la presencia de al menos un conector.

15 La expresión "proteína aislada" se refiere a una proteína que está al menos en parte aislada de su entorno natural y/o a una proteína que está exenta de al menos parte de una secuencia con la que normalmente está asociada en la naturaleza.

20 La expresión "proteína recombinante" se refiere a una proteína que es producida por un sistema de expresión aislado y/o artificial, preferiblemente empleando una secuencia de ácido nucleico que codifique dicha proteína. Dicha secuencia de ácido nucleico preferiblemente está unida operablemente al menos a una secuencia reguladora tal como, por ejemplo, un promotor, un potenciador y/o un terminador. Preferiblemente, dicha secuencia reguladora es inducible, de modo que es posible controlar el grado de expresión de dicha proteína. En una realización, dicha secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico exógena. Una secuencia de ácido nucleico exógena es una secuencia de ácido nucleico que se presenta en un sitio en el genoma del organismo en el que dicha secuencia de ácido nucleico no está presente en la naturaleza.

25 Después de que se haya identificado una proteína de *Streptococcus uberis* capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*, mediante un método de la invención, esta preferiblemente se produce. La proteína producida es adecuada, por ejemplo, para generar una composición inmunogénica y/o para provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis* en un animal. Tal como se indicó anteriormente, en la técnica se conocen diversos métodos para producir proteínas tales como, por ejemplo, la producción recombinante.

30 Una proteína de *Streptococcus uberis* y/o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo es particularmente adecuada para preparar una composición inmunogénica. Dicha composición inmunogénica es capaz de producir una amplia respuesta inmunológica humoral y/o celular contra al menos dos cepas de *Streptococcus uberis*. Preferiblemente, se emplea una proteína de *Streptococcus uberis* y/o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo capaz de producir una respuesta inmunológica humoral y/o celular contra al menos dos serotipos de *Streptococcus uberis* para preparar una composición inmunogénica, de modo que se logra una amplia respuesta inmunológica contra al menos dos serotipos de *Streptococcus uberis*. Para proporcionar una protección aún más amplia, preferiblemente se emplean al menos dos o más proteínas y/o partes inmunogénicas, derivados y/o análogos de la invención para la preparación de una composición inmunogénica. En una realización, se emplea una combinación de al menos una proteína y al menos una parte inmunogénica, derivado y/o análogo para la preparación de una composición inmunogénica.

35 Además de una protección más amplia, el uso de al menos dos proteínas y/o partes inmunogénicas, derivados y/o análogos de la invención disminuye la posibilidad de que se desarrollen mutantes de escape de organismos de *Streptococcus uberis*. Los mutantes de escape de organismos bacterianos en general se desarrollan bajo estrés ambiental, por ejemplo, en presencia de un antibiótico y/o en presencia de anticuerpos contra un epítipo de dicho organismo. Mediante la variación natural en la población de un organismo, algunos organismos escapan del efecto inhibidor de dicho estrés ambiental, tal como la presencia de dicho antibióticos y/o anticuerpos, y son capaces de multiplicarse. La posibilidad de que se desarrolle un mutante de escape para varios epítipos diferentes a la vez es menor que la posibilidad de que se desarrolle un mutante de escape para un único epítipo.

40 Por tanto, una composición inmunogénica preferiblemente comprende al menos dos proteínas aisladas y/o recombinantes y/o al menos una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de estas, que pueden obtenerse mediante un método de la invención. Para evitar con más eficacia la formación de mutantes de escape, una proteína preferiblemente comprende una proteína esencial. Esta es una proteína que es importante (preferiblemente, esencial) para el metabolismo, la supervivencia y/o la multiplicación de *Streptococcus uberis*. Así, un posible mutante de escape con una proteína esencial alterada es menos viable (o no viable).

Las tablas 5 y 6 comprenden una lista de proteínas de *Streptococcus uberis* preferidas que se identifican mediante un método de la invención. Estas proteínas, o al menos una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de estas, son

5 adecuadas para la preparación de una composición inmunogénica. Para proporcionar una protección aún más amplia, dicha composición inmunogénica preferiblemente comprende al menos dos proteínas, tal como se muestra en la tabla 5 y/o tabla 6, y/o partes inmunogénicas, derivados y/o análogos de estas. Lo más preferiblemente, dicha composición inmunogénica comprende al menos tres proteínas, tal como se muestra en la tabla 5 y/o tabla 6, y/o partes inmunogénicas, derivados y/o análogos de estas.

10 En una realización preferida, dichas al menos una, al menos dos o al menos tres proteínas, según se muestran en la tabla 5 y/o tabla 6, se seleccionan del grupo que consiste en P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, P105, proteína de exclusión de la superficie, factor de activación (ropA), y nucleósido difosfato quinasa. Estas proteínas son reconocidas por anticuerpos presentes en sueros de animales infectados por *S. uberis*, lo cual indica que estas proteínas son expresadas *in vivo* y son inmunogénicas en vacas, o presentan reactividad cruzada entre al menos dos cepas de *S. uberis*, tal como se muestra en la tabla 5. La numeración de las anteriores proteínas, caracterizadas por ejemplo en la tabla 5, se refiere a las proteínas mostradas, por ejemplo, en las tablas 1, 2 y 3, que muestran ejemplos no limitantes de proteínas de la superficie de *S. uberis* comunes. Además, la figura 4 muestra ejemplos no limitantes de secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de estos factores de virulencia/proteínas de la superficie putativas seleccionadas de *S. uberis*.

15 Las proteínas que están muy conservadas, son expresadas *in vivo* y son muy inmunogénicas, tales como las proteínas que son reconocidas por sueros convalecientes de vacas infectadas por diferentes cepas, tal como se muestra en el ejemplo 11, son especialmente útiles en una composición inmunogénica descrita por la invención. En una realización aún más preferida de esta, la selección de las proteínas de la tabla 5 y/o 6 comprende una proteína seleccionada del grupo que consiste en P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, y P105. Lo más preferiblemente, la selección de las proteínas de la tabla 5 y/o 6 comprende una proteína seleccionada del grupo que consiste en P15, P16, P54, P28, P63, y P105. Tal como se muestra en el ejemplo 11, esta última selección fue reconocida por todos los sueros convalecientes utilizados, lo cual indica que estos antígenos son expresados por todas las cepas de *S. uberis* que provocan la respectiva infección, que estos antígenos son expresados durante la infección en el hospedante, y que estos antígenos son muy inmunogénicos.

20 Otro ejemplo es una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus* que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que codifica al menos una proteína que puede obtenerse mediante un método de la invención, o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de dicha proteína. Tras la administración de dicha composición inmunogénica a un animal, dicha molécula de ácido nucleico es expresada por la maquinaria del animal, dando como resultado la expresión de al menos una proteína y/o parte inmunogénica, derivado y/o análogo según la invención. La producción y, opcionalmente, la excreción extracelular de dicha proteína y/o parte inmunogénica, derivado y/o análogo da como resultado una respuesta inmunológica.

25 En una realización, una proteína y/o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de esta se produce de modo recombinante. La invención describe un método para producir una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus*, comprendiendo dicho método proporcionar una célula u otro sistema de expresión con al menos un vector recombinante, comprendiendo dicho al menos un vector una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína que puede obtenerse mediante un método de la invención y/o al menos una proteína seleccionada de la tabla 5 y/o 6 y/o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de dicha proteína. Los sistemas de expresión adecuados son conocidos en la técnica. En una realización, se expresa al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la invención o una parte inmunogénica de esta. En otra realización, se emplea al menos una molécula de ácido nucleico que codifica al menos dos proteínas y/o partes inmunogénicas. También es posible utilizar al menos dos moléculas de ácidos nucleicos, codificando cada molécula de ácido nucleico una o más proteínas y/o partes inmunogénicas según la invención, etc. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica (al menos) una proteína, y una molécula de ácido nucleico que codifica (al menos) una parte inmunogénica, son adecuadas. Por tanto, también son posibles variaciones en el número de moléculas de ácidos nucleicos y en el número de proteínas y/o partes inmunogénicas codificadas por dichas moléculas de ácidos nucleicos.

30 Una secuencia de ácido nucleico se inserta, por ejemplo, en el genoma de una célula mediante recombinación homóloga. También es posible insertar una secuencia de ácido nucleico al azar, por ejemplo, mediante electroporación. Como alternativa, o además, dicha secuencia de ácido nucleico se coloca en un vector tal como, por ejemplo, un vector plasmídico o un vector de fago, siendo dicho vector estable en un sistema de expresión seleccionado, tal como un microorganismo y/o una célula. Dicha secuencia de ácido nucleico preferiblemente se transcribe y se traduce bajo el control de una secuencia reguladora tal como, por ejemplo, un promotor, un potenciador y/o un terminador. Preferiblemente, dicho promotor, potenciador y/o terminador resulta adecuado para su uso en el sistema de expresión seleccionado. Más preferiblemente, dicha secuencia reguladora es inducible para permite la expresión controlada. Los promotores y los terminadores adecuados para diversos microorganismos se describen en Biseibutsugaku Kisokozu (Basic Microbiology), vol. 8, Genetic Technology, Kyoritsu Shuppan (1990)). Por ejemplo, los vectores plasmídicos adecuados para *Escherichia*, de modo más específico para *Escherichia coli*, son los plásmidos de la serie pBRy pUC, y los promotores adecuados comprenden, por ejemplo, el promotor *lac* (β -galactosidasa), el operón *trp* (operón de triptófano) y el promotor *tac* (promotor híbrido *lac-trp*) y los promotores

derivados del fago λ PL o PR. Los terminadores preferidos comprenden *trpA* o el terminador ribosómico *rrnB* derivado de fago. Los vectores plasmídicos adecuados para la producción recombinante en *Streptococcus* comprenden, por ejemplo, pHV1301 (FEMS Microbiol. Lett., 26, 239 (1985)) y pGK1 (Appl. Environ. Microbiol., 50, 94 (1985)).

- 5 En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico de la invención se emplea para provocar una respuesta inmunológica contra *Streptococcus uberis*. Esto se realiza preferiblemente con un portador recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica al menos una proteína que puede obtenerse mediante un método de la invención y/o se selecciona de la tabla 5 y/6 y/o una parte inmunogénica, de dicha al menos una proteína, o una molécula de ácido nucleico recombinantes de la invención. En una realización particularmente preferida, dicho portador recombinante comprende un ácido nucleico que codifica al menos dos proteínas seleccionadas de la tabla 5 y/o 6. En una realización, se permite que dicho portador recombinante produzca al menos una proteína de la invención, tras lo cual se emplea una combinación de dicha al menos una proteína recombinante y el propio portador para provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*. Puede utilizarse un portador recombinante muerto. Sin embargo, una realización preferida proporciona un portador recombinante vivo. En una realización, dicho portador vivo es un portador atenuado. Un portador vivo es preferiblemente capaz de infectar a un individuo humano y/o un animal no humano, tras lo cual se provoca una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*.

Un portador recombinante preferiblemente comprende una especie de *Streptococcus*. De esta modo, se provoca una respuesta inmunológica dirigida contra *Streptococcus* por la proteína o proteína y/o la parte o partes inmunogénicas, el derivado o derivados y/o el análogo o análogos codificados por dicho portador, y por dicho portador recombinante en sí mismo. A menudo, los productos de la expresión de genes capsulares de *Streptococcus* son muy inmunogénicos y específicos de serotipo. Por tanto, la presencia de los productos de la expresión de genes capsulares dificulta la inducción de una respuesta inmunológica dirigida contra diversas cepas y/o serotipos diferentes de *Streptococcus uberis*. Por tanto, en una realización, si un portador recombinante de la invención comprende un *Streptococcus*, dicho *Streptococcus* carece de al menos parte de un producto de la expresión de un gen capsular. En una realización, dicho *Streptococcus* es un estreptococo no capsular.

Tal como se describió anteriormente, la inmunización con al menos dos proteínas y/o partes inmunogénicas, derivados y/o análogos derivados de al menos dos cepas y/o serotipos diferentes de *Streptococcus uberis* proporciona una amplia protección y disminuye la probabilidad de que se formen mutantes de escape. Un portador recombinante preferido comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína y/o una parte inmunogénica de esta derivada de una primera cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*, y una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína y/o una parte inmunogénica de esta derivada de una segunda cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*. Dicho portador recombinante preferiblemente comprende un vehículo recombinante vivo.

Un portador recombinante se produce, por ejemplo, en una célula hospedante adecuada.

Un portador recombinante de la invención es adecuado para la producción de una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*.

Después de la administración de una composición inmunogénica a un individuo humano y/o a un animal no humano, se provoca una respuesta inmunológica contra *Streptococcus uberis*. Dicha respuesta inmunológica es preferiblemente capaz de, al menos en parte, contrarrestar una enfermedad relacionada con *Streptococcus uberis*.

Una composición inmunogénica también es adecuada para la producción de una vacuna. Dicha vacuna es preferiblemente capaz de, al menos en parte, proporcionar protección frente a una enfermedad relacionadas con *Streptococcus uberis*. Preferiblemente, dicha vacuna es capaz de proporcionar protección contra una infección de *Streptococcus uberis*.

Una proteína, una parte inmunogénica, un derivado, un análogo y/o un portador recombinante de la invención se administra preferiblemente a un individuo humano y/o un animal no humano junto con un portador adecuado. Dicho portador preferiblemente facilita la aceptación por parte de dicho individuo humano y/o animal de dicha proteína, parte inmunogénica, derivado, análogo y/o portador recombinante de la invención, y preferiblemente aumenta el efecto inmunogénico. Un portador adecuado, por ejemplo, comprende un adyuvante adecuado capaz de aumentar el efecto inmunizante de una composición inmunogénica de la invención. Los expertos en la técnica conocen muchos adyuvantes adecuados, con base de aceite y con base acuosa. En una realización, dicha composición adyuvante comprende Diluvac Forte y/o Specol. En otra realización, dicho portador adecuado comprende una disolución, tal como disolución salina, por ejemplo para diluir las proteínas o las partes inmunogénicas, los derivados y/o los análogos de estas. Por tanto, la presente memoria descriptiva también describe una composición inmunogénica que comprende al menos una proteína, una parte inmunogénica, un derivado, un análogo y/o un portador recombinante de la invención, y un portador adecuado.

Una composición inmunogénica es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra *Streptococcus uberis* en un individuo humano y/o un animal no humano y, con ello, disminuir y/o controlar el número de organismos de

Streptococcus uberis en dicho individuo y/o animal.

Una composición inmunogénica es preferiblemente capaz de, al menos en parte, contrarrestar y/o prevenir una enfermedad relacionada con *Streptococcus uberis*. Cuando una enfermedad relacionada con *Streptococcus uberis* ya está presente, una composición inmunogénica preferiblemente es capaz de, al menos en parte, contrarrestar dicha enfermedad.

Otro ejemplo es un método para medir la inmunidad de un individuo humano y/o un animal no humano contra *Streptococcus uberis*, comprendiendo dicho método determinar en al menos una muestra procedente de dicho individuo humano y/o animal la presencia de anticuerpos y/o células inmunológicas dirigidos contra una proteína que puede obtenerse mediante un método de la invención y/o seleccionada de la tabla 5 y/o 6, o una parte inmunogénica de esta. También se describe un kit de diagnóstico que comprende al menos una proteína que puede obtenerse mediante un método de la invención y/o seleccionada de la tabla 5 y/o 6, o una parte inmunogénica de esta, y un medio para detectar la unión de anticuerpos y/o la unión de células inmunológicas a dicha proteína, o una parte inmunogénica de esta. En una realización particularmente preferida, dicho kit de diagnóstico comprende al menos dos proteínas seleccionadas de la tabla 5 y/o 6.

Descripción detallada

Un método según la invención, en una realización preferida, se aplica para identificar una proteína de *Streptococcus uberis* que es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*. Dicha proteína de *Streptococcus uberis* se emplea preferiblemente para la preparación de una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*.

Streptococcus uberis se asocia con la mastitis bovina. La mastitis bovina es una infección en la glándula mamaria de una vaca, habitualmente provocada por bacterias. La respuesta inflamatoria tras la infección produce una disminución en el rendimiento y la calidad de la leche, y provoca importantes pérdidas económicas anuales en la industria lechera. Se calcula que el daño económico en los Países Bajos es de aproximadamente 100 euros por vaca anuales.

Entre las especies bacterianas que se asocian más habitualmente con la mastitis se encuentran diversas especies del género *Streptococcus*, que incluyen *Streptococcus uberis* (no tipificable), *Streptococcus agalactiae* (grupo B de Lancefield), *Streptococcus dysgalactiae* (grupo C de Lancefield), *Streptococcus zooepidemicus*, y los estreptococos de los grupos D, G, L y N de Lancefield. Algunas de estas especies son contagiosas (por ejemplo, *S. agalactiae*), mientras que otras se consideran patógenos ambientales (por ejemplo, *S. dysgalactiae* y *S. uberis*).

La mastitis que se produce a partir de una infección por *S. uberis* habitualmente es subclínica, y se caracteriza por una leche aparentemente normal con un aumento en los recuentos de células somáticas debido al influjo de leucocitos.

La mastitis varía en gravedad según los efectos clínicos provocados por la infección. Una forma suave de mastitis puede provocar un pequeño aumento en la temperatura corporal y/o un aumento en la temperatura de la ubre. En los casos más graves, la mastitis por *S. uberis* también puede tomar la forma de un trastorno clínico agudo, con signos obvios de enfermedad, tales como coágulos o decoloración de la leche, e hinchamiento o dureza de la glándula mamaria. Algunos casos de la enfermedad clínica pueden ser graves y puede estar presente pirexia. Para un informe acerca de las manifestaciones clínicas de la mastitis por *S. uberis*, véase Bramley (1991), y Schalm *et al.* (1971). Los métodos de control antibacterianos convencionales, tales como la inmersión de la teta y la terapia con antibióticos, son eficaces para el control de muchos tipos de mastitis contagiosas, pero los organismos ambientales que generalmente se encuentra en todos los establos lecheros a menudo son resistentes a estas medidas. Por tanto, estas medidas no influyen en la incidencia de la mastitis provocada por patógenos ambientales, tales como *Streptococcus uberis* y *Escherichia coli*, que en la actualidad son responsables de más del 95% de los casos de mastitis. De estas dos especies, *S. uberis* es el patógeno ambiental más importante, tal como se muestra en los estudios ejecutados en el Reino Unido (Hillerton *et al.*, 1993), en Nueva Zelanda (McDougall, 1998), en EEUU (Hogan *et al.*, 1989), y en los Países Bajos (Animal Health Service, 2000). También hay pruebas de que *S. uberis*, después de que la infección se haya establecido a partir del ambiente, puede extenderse directamente desde una vaca infectada a un animal susceptible (Neave *et al.*, 1969; Oliver *et al.*, 1999; Zadoks *et al.*, 2001). Existen varias cepas de *S. uberis* que se diferencian en virulencia y antigenicidad.

El fracaso de los métodos actuales que se dirigen al control de la mastitis por *S. uberis* han conducido a la búsqueda de medidas de control alternativas, tales como vacunas más eficaces. Se han desarrollado varios tipos de vacunas hasta la fecha y se han ensayado en vacas.

La inmunización repetida de ganado de producción láctea con bacterias completas muertas ha dado como resultado la reducción del número de bacterias presentes en la leche tras la exposición experimental a la misma cepa (Leigh, 1999; Leigh, 2000). Sin embargo, la vacuna muerta no evita la infección ni la respuesta inflamatoria en la glándula mamaria, y no tiene efecto sobre la incidencia de la mastitis por *S. uberis* en el campo (Leigh, 1999). Por tanto, se

concluye que la inmunización con bacterias muertas no es una solución al problema de la mastitis por *S. uberis*. La inmunización con *S. uberis* vivo induce una protección parcial contra la exposición experimental a la misma cepa (o una cepa homóloga) (Finch *et al.*, 1997). Se logra protección en ausencia de actividad opsonizante y sin un gran flujo de neutrófilos. Sin embargo, la vacuna no parece proteger frente a otras cepas de *S. uberis*. El éxito relativamente bajo de estas estrategias de vacunas de células completas indica que es difícil proteger a un animal frente a *S. uberis* empleando vacunas de bacterias completas convencionales.

En fechas más recientes, se ha producido una vacuna de subunidades, basada en una proteína de *S. uberis* (Fontaine *et al.*, 2002). La publicación de dicha vacuna de subunidades no ha conducido, hasta la fecha, a un seguimiento, lo cual ha conducido a la conclusión de que las probabilidades de encontrar una única proteína que proteja a un animal frente a varios tipos de *S. uberis* son pequeñas, y las vacunas de subunidades de este tipo en general no son la respuesta al problema del control de la mastitis por *S. uberis*.

En resumen, la mastitis provocada por *S. uberis* no se evita ni se cura con eficacia mediante la vacunación con bacterias muertas, vivas o completas, o mediante una vacuna de subunidades que comprenda una proteína.

A pesar de los anteriores resultados desalentadores de la vacunación contra la mastitis por *S. uberis*, los inventores indican en la presente que la mastitis provocada por una diversidad de cepas de *S. uberis* puede prevenirse y/o disminuirse con éxito utilizando una composición antigénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra *S. uberis*.

La presente invención proporciona un método para identificar una proteína de *Streptococcus uberis* que es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas y/o tipos de *Streptococcus uberis*, comprendiendo dicho método:

a) identificar al menos parte de una proteína segregada, una proteína asociada a la superficie y/o una proteína con al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína listada en la figura 4;

b) seleccionar al menos una proteína identificada en la etapa a) que se conserva a través de al menos dos cepas y/o tipos de *Streptococcus uberis*; y

c) ensayar si al menos una proteína seleccionada en la etapa b) o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de esta, es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una primera cepa y/o tipo de *Streptococcus uberis*, y un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una segunda cepa y/o tipo de *Streptococcus uberis*.

Además, la presente invención indica que una combinación de al menos dos proteínas de la superficie de *S. uberis* aisladas o recombinantes, o una parte inmunogénica de estas, en una composición antigénica potencia considerablemente la respuesta inmunológica contra cepas de *S. uberis*. Mientras que las vacunas de células bacterianas completas, que comprenden muchas proteínas inmunogénicas bacterianas, no provocan una amplia protección contra diversas cepas de *S. uberis*, dos o más proteínas, o una parte inmunogénica de estas, en una composición inmunogénica de la invención tienen el efecto deseado de potenciar la respuesta inmunológica contra *S. uberis*. Los inventores indican en la presente invención que la selección de al menos dos proteínas inmunogénicas, o de una parte inmunogénica de estas, de un organismo de *S. uberis*, y preferiblemente de al menos dos cepas o tipos de organismos de *S. uberis*, y la combinación de dichas al menos dos proteínas inmunogénicas, o de una parte inmunogénica de estas, en una composición inmunogénica potencia la inmunidad frente a diferentes cepas de *S. uberis*, porque la respuesta inmunológica se dirige contra una gama más amplia de organismos de *S. uberis* diferentes.

Para provocar una respuesta inmunológica en un sujeto o un animal, preferiblemente se presenta una parte inmunogénica de una proteína a dicho sujeto o animal. En esta invención, la expresión "sitio inmunogénico" se emplea de modo intercambiable con la expresión "parte inmunogénica". Una "parte o sitio inmunogénico" significa una parte de una proteína que es capaz de provocar una respuesta inmunológica en un sujeto. Preferiblemente, dicha parte inmunogénica de una proteína comprende uno o más epitopos y, así, provoca una respuesta inmunológica. Una parte inmunogénica comprende al menos 5 aminoácidos, preferiblemente al menos 10-15, y lo más preferiblemente 25 o más aminoácidos consecutivos. Un epitopo conformacional en general está formado por varios tramos de aminoácidos consecutivos que están plegados en posición y que, juntos, forman un epitopo cuando la proteína toma su estructura tridimensional. La presente invención también describe el uso de epitopos conformacionales como partes inmunogénicas.

Un derivado de una proteína se define como una proteína, que tiene el mismo tipo de propiedades inmunogénicas, pero no necesariamente en la misma cantidad. Los expertos en la técnica son capaces de alterar una proteína, de modo que las propiedades inmunogénicas de dicha molécula son fundamentalmente del mismo tipo, pero no necesariamente están en la misma cantidad. Puede proporcionarse un derivado de una proteína de muchas formas, por ejemplo, mediante la sustitución de aminoácidos conservativa, por ejemplo, mediante la sustitución de un aminoácido en una proteína por otro aminoácido. En el cartografiado de sustitución convencional, se realizan preferiblemente cambios conservativos como, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido que comprende una

cadena lateral ácida por otro aminoácido que comprende una cadena lateral ácida, aminoácidos voluminosos por aminoácidos voluminosos, aminoácidos que comprenden una cadena lateral básica por aminoácidos que comprenden una cadena lateral básica, aminoácidos que comprenden una cadena lateral polar sin carga por aminoácidos que comprenden una cadena lateral polar sin carga, y aminoácidos que comprenden una cadena lateral no polar por aminoácidos que comprenden una cadena lateral no polar. Los expertos en la técnica son capaces de generar compuestos análogos de una proteína. Esto se hace, por ejemplo, a través de la selección de un banco de péptidos o mediante programas de cambio de péptidos. Para su uso como un inmunógeno, un péptido se sintetiza con las características apropiadas para asegurar una alta probabilidad de éxito en la producción de anticuerpos. Esto incluye un grupo carboxilo libre C-terminal si el péptido es la secuencia C-terminal real de la proteína nativa, y un grupo amino N-terminal libre si el péptido es la secuencia N-terminal real de la proteína nativa. Este análogo tiene fundamentalmente el mismo tipo, pero no necesariamente en la misma cantidad, de propiedades inmunogénicas que dicha proteína.

Una proteína o un péptido se somete a una degradación mediante una serie de fuerzas diferentes tales como, por ejemplo, proteólisis, desplegamiento, valores extremos de pH, detergentes y altas concentraciones salinas. Para prolongar la vida de una proteína o un péptido recombinante, dicha proteína o péptido se prepara para que sea más estable para aguantar la degradación, por ejemplo, sintetizando dicho péptido con una carboxamida C-terminal y/o acetilando el extremo N-terminal para mantener las características de carga nativas. Esto se realiza mediante mutaciones utilizando una estrategia de mutación estabilizante para inhibir los procesos de desplegamiento locales que, en general, hacen que la proteína sea susceptible a la autólisis. Dicha estrategia de mutación estabilizante se basa en principios generalmente aceptados de estructura y estabilidad de las proteínas tal como se describe, por ejemplo, en Matthews (1991), Alber (1991), Vriend y Eijsink (1993), y Fersht y Serrano (1993).

En una realización, una composición inmunogénica comprende una composición que comprende al menos dos proteínas de la superficie aisladas o recombinantes, o un derivado o un análogo y/o partes inmunogénicas de estas, en la que la administración de la composición a un sujeto o a un animal, preferiblemente una vaca, da como resultado el desarrollo de una respuesta inmunológica humoral y/o celular a dichas proteínas de la superficie o sus partes inmunogénicas.

Una respuesta inmunogénica comprende el desarrollo de una respuesta inmunológica humoral y/o celular dirigida contra dicha proteína o sus partes inmunogénicas en un sujeto o un animal, preferiblemente una vaca. Una respuesta inmunológica humoral conduce a la producción de anticuerpos en un sujeto o un animal, mientras que una respuesta inmunológica celular potencia, de modo dominante, la formación de células inmunológicas reactivas. En general, ambas partes de la respuesta inmunológica son provocadas por la administración de una proteína inmunogénica o una parte de esta. Una respuesta inmunológica preferida contra *S. uberis* es la producción de anticuerpos. Preferiblemente, dicha respuesta inmunológica evita y/o disminuye la mastitis y/o disminuye el número de organismos de *S. uberis* en la ubre. La presente invención describe métodos para seleccionar y producir proteínas y epitopos para provocar dicha respuesta de anticuerpos. Otra respuesta inmunológica preferida contra *S. uberis* es la respuesta inmunológica celular. La presente invención también describe métodos para seleccionar epitopos de células T de proteínas de la superficie, y para producir epitopos de células T que provocan una reactividad potenciada de las células T, por ejemplo, acoplado múltiples epitopos de células T preseleccionados en forma de collar de cuentas como se describe, por ejemplo, en Van der Burg *et al.* (documento WO 97/41440).

En un ejemplo de la invención, dicha composición inmunogénica es capaz de disminuir la duración y/o la gravedad de la infección y/o aumentar la resistencia del animal a una infección por *S. uberis*.

La presente invención indica que se prefiere una respuesta inmunológica dirigida contra la parte exterior de *S. uberis*. Por tanto, la presente invención describe una composición inmunogénica, o una parte inmunogénica de esta, que es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra antígenos que están localizados preferiblemente en la superficie celular, o cerca de esta, de *S. uberis*. Una proteína de la superficie comprende proteínas que, en la naturaleza, están preferiblemente cerca de la superficie, o sobre esta, de una bacteria de *S. uberis* y/o proteínas que, en la naturaleza, son preferiblemente producidas y/o excretadas de modo extracelular por una bacteria de *S. uberis*. Dichas proteínas de la superficie preferiblemente presentan proteínas homólogas en otras cepas de *S. uberis*. Por tanto, la respuesta inmunológica provocada con las proteínas inmunogénicas, o partes de estas, derivadas de una cepa de *S. uberis* también es eficaz contra otras cepas de *S. uberis*. Así, la presente invención describe una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra *S. uberis*, comprendiendo dicha composición al menos dos proteínas de la superficie aisladas y/o recombinantes derivadas de *Streptococcus uberis* y/o una parte inmunogénica de cualquiera o de ambas proteínas.

La expresión "proteína recombinante" se refiere a una proteína producida mediante técnicas de ADN recombinante, es decir, producida por una célula transformada con una construcción de ácido nucleico que codifica la proteína deseada. Dicha construcción de ácido nucleico, por ejemplo, es una construcción de ADN recombinante con una secuencia reguladora, tal como una secuencia de promotor y/o terminador y/o una secuencia potenciadora, que controla la secuencia de expresión.

La expresión "proteína aislada" se refiere a una proteína discreta y separada del organismo completo, con el que la molécula se encuentra en la naturaleza y/o una proteína exenta, totalmente o en parte, de sustancias que

normalmente están asociadas con ella en la naturaleza. Dicha composición inmunogénica comprende al menos dos proteínas, o una parte inmunogénica de estas, derivadas del mismo organismo de *S. uberis*, o comprende al menos una proteína, o una parte inmunogénica de esta, de un tipo de *S. uberis* y al menos una proteína, o una parte inmunogénica de esta, de otro tipo de *S. uberis*. La invención también describe la combinación de al menos 3 o 4 o más proteínas, o una parte inmunogénica de estas, de las cuales una o dos o más se derivan de otros tipos de *S. uberis*.

Preferiblemente, la composición inmunogénica, o una parte inmunogénica de esta, comprende proteínas de al menos dos organismos de *S. uberis* diferentes, porque la amplia respuesta inmunológica resultante es de protección cruzada, es decir, se dirige contra diferentes tipos de *S. uberis*. Además, el uso de proteínas inmunogénicas, o una parte inmunogénica de estas, de al menos dos tipos de *S. uberis* disminuye la probabilidad de que se desarrollen mutantes de escape de organismos de *S. uberis*. Los mutantes de escape de los organismos bacterianos en general se desarrollan bajo un estrés ambiental, por ejemplo, en presencia de un antibiótico o en presencia de anticuerpos contra un epitopo de dicho organismo. Mediante variaciones naturales tales como, por ejemplo, provocadas por una baja frecuencia de mutación en un organismo, algunos organismos de dicha población son más inhibidos en su replicación por dichos anticuerpos que otros, que escapan del efecto inhibitorio de la presencia de dichos anticuerpos y siguen multiplicándose, obteniendo con ello un papel predominante en la nueva población. La posibilidad de que se desarrolle un mutante de escape para varios epitopos diferentes al mismo tiempo es más pequeña que la posibilidad de que se desarrolle un mutante de escape para un solo epitopo. Una composición inmunogénica y/o una parte inmunogénica de esta preferiblemente provocan una respuesta inmunológica contra al menos dos proteínas que preferiblemente provoca una protección amplia contra la infección y disminuye las señales clínicas de la mastitis.

Las proteínas que son importantes para el metabolismo, la supervivencia o la multiplicación de un organismo bacteriano se conocen en general como proteínas esenciales de un organismo. La secuencia y la función de dichas proteínas esenciales en general están bastante conservadas entre diferentes tipos de *S. uberis*. En un ejemplo preferido de la invención, dichas proteínas inmunogénicas son proteínas esenciales de un *S. uberis*. De esta manera, la respuesta inmunológica se dirige contra una proteína esencial, o una parte inmunogénica de esta, formando así una defensa contra un organismo de *S. uberis* homólogo, pero también una defensa de reactividad cruzada contra diferentes tipos de *S. uberis*, porque dicha proteína conservada o proteína esencial también está presente sobre la superficie de otros tipos de *S. uberis*. Por tanto, el uso de una proteína de la superficie esencial de un organismo de *S. uberis* como proteína inmunogénica aumenta la eficacia protectora de la respuesta inmunológica contra la infección por diferentes tipos de organismos de *S. uberis* y disminuye la posibilidad de que dichos organismos escapen de la respuesta inmunológica.

Los antígenos capsulares de *S. uberis* son, en general, buenos epitopos inmunogénicos, porque los antígenos capsulares pueden ser detectados con facilidad por sueros convalecientes de vacas (que han sufrido una mastitis por *S. uberis*). Dichas propiedades inmunogénicas son capaces de potenciar la respuesta inmunológica contra epitopos inmunogénicos de *S. uberis* relacionados. Por tanto, en otra realización, la composición inmunogénica comprende al menos un antígeno capsular, además de las proteínas inmunogénicas, porque dicho antígeno capsular aumenta la respuesta inmunológica contra dicha composición inmunogénica.

La presente solicitud de patente describe, en la tabla 5 y la tabla 6, proteínas de la superficie aisladas o recombinantes preferidas derivadas de *S. uberis* y seleccionadas por su capacidad para provocar una respuesta inmunológica contra diferentes cepas de *S. uberis*.

En un ejemplo preferido, se realiza una selección de las proteínas de la tabla 5 y/o tabla 6, y se realiza una combinación de dos o más proteínas, como por ejemplo, la proteína n.º 63 y/o una parte inmunogénica de esta de la cepa O140J de *S. uberis*, junto con la proteína n.º 15 o 22 y/o ambas y/o una parte inmunogénica de estas de la cepa 41-241 de *S. uberis*. Dicha selección proporciona proteínas, o sus partes inmunogénicas, procedentes de dos cepas diferentes de *S. uberis*, proporcionando con ello una amplia protección contra varias cepas de *S. uberis*.

En una realización preferida, la selección de las proteínas de la tabla 5 y/o tabla 6 comprende una proteína seleccionada del grupo que consiste en P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, y P105. Como se indicó anteriormente, estas proteínas son reconocidas por anticuerpos presentes en sueros de animales infectados por *S. uberis*, lo cual indica que estas proteínas se expresan *in vivo* y son inmunogénicas en vacas, o presentan reactividad cruzada entre al menos dos cepas de *S. uberis*, según se muestra en la tabla 5.

Las proteínas identificadas en el ejemplo 11 son especialmente útiles para provocar una respuesta inmunológica. En una realización aún más preferida de estas, la selección de las proteínas de la tabla 5 y/o tabla 6 comprende una proteína seleccionada del grupo que consiste en P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, y P105. Lo más preferiblemente, la selección de las proteínas de la tabla 5 y/o tabla 6 comprende una proteína seleccionada del grupo que consiste en P15, P16, P54, P28, P63, y P105. Como se indicó anteriormente, esta última selección de proteínas es expresada por todas las cepas de *S. uberis* que provocan la respectiva infección del ejemplo 11, son expresadas durante la infección en el hospedante y son muy inmunogénicas. La numeración de las anteriores proteínas, caracterizadas por ejemplo en la tabla 5, se refiere a las proteínas mostradas, por ejemplo, en las tablas

1, 2 y 3, que muestran ejemplos no limitantes de proteínas de la superficie comunes de *S. uberis*. Además, la figura 4 muestra ejemplos no limitantes de secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de estos factores de virulencia/proteínas de la superficie putativas seleccionadas de *S. uberis*.

A menudo se encuentra un número bajo de bacterias en la leche o sobre la ubre o en la ubre bajo condiciones de campo, y no es necesario que sean perjudiciales para un animal. Una mastitis puede desarrollarse cuando el número de bacterias, por ejemplo, organismos de *S. uberis*, aumenta en la leche o en la ubre. Una respuesta inmunológica, provocada por las proteínas, o por partes inmunogénicas de estas, según la invención es preferiblemente eficaz para inhibir, al menos en parte, el crecimiento bacteriano de organismos de *Streptococcus uberis* en una ubre. La disminución del número de organismos de *S. uberis* en el ambiente directo también ayuda a prevenir la mastitis. La presente invención describe el modo de prevenir y/o disminuir la mastitis por *S. uberis* mediante la inmunización de vacas, manteniendo bajo, con ello, el número de organismos de *S. uberis*. Dicho nivel bajo de organismos de *S. uberis* se mantiene aún más bajo aplicando un régimen higiénico durante el ordeño, por ejemplo, limpiando la ubre, las tetas y todos los aparatos que se ponen en contacto con la ubre y/o las tetas.

Las proteínas de la superficie aisladas y/o recombinantes derivadas de *S. uberis* son producidas, en una realización, por un sistema de producción que emplea una célula procariota o una célula eucariota. Los ejemplos de células con sistemas de hospedante/vector bien desarrollados para la producción de proteínas recombinantes son, por ejemplo, para las bacterias *Escherichia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*; y para las levaduras *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Yarrowia*, *Trichosporon*, *Rhodospidium*, *Hansenula*, *Pichia* y *Candida*; y para los hongos *Neurospora*, *Aspergillus*, *Cephalosporium* y *Trichoderma*.

Para la producción de una proteína recombinante de interés, el gen que codifica dicha proteína, o una parte de esta, se integra en el genoma, por ejemplo, mediante recombinación homóloga o de modo aleatorio, o dicho gen se coloca en un vector plasmídico o en un vector de fago, que se mantiene y se expresa de modo estable en el microorganismo o la célula seleccionados. Para la expresión de la construcción de ADN seleccionada en el microorganismo o la célula, el gen se transcribe y se traduce bajo el control de un promotor y un terminador. Preferiblemente, dicho promotor y terminador son adecuados para el microorganismo seleccionado. Los promotores y los terminadores adecuados para diversos microorganismos se describen en Biseibutsugaku Kisokoza (Basic Microbiology), vol. 8, Genetic Technology, Kyoritsu Shuppan (1990), y los preferidos para levaduras en "Adv. Biochem. Eng., 43, 75-102 (1990)" y en "Yeast, 8, 423-488 (1992)". Por ejemplo, los vectores plasmídicos adecuados para *Escherichia*, más específicamente para *Escherichia coli*, son los plásmidos de la serie pBR y pUC, y los promotores adecuados comprenden el promotor *lac* (β -galactosidasa), el operón *trp* (operón de triptófano) y el promotor *tac* (promotor híbrido *lac-trp*) y los promotores derivados del fago λ PL o PR. Los terminadores preferidos comprenden *trpA* o el terminador ribosómico *rrnB* derivado de fago. Los vectores plasmídicos adecuados para la producción recombinante en *Streptococcus* comprenden, por ejemplo, pHV1301 (FEMS Microbiol. Lett., 26, 239 (1985)) y pGK1 (Appl. Environ. Microbiol., 50, 94 (1985)). Los vectores plasmídicos adecuados para la producción recombinante en *Lactobacillus* comprenden, por ejemplo, los descritos para *Streptococcus*, como por ejemplo pAM β 1 (J. Bacteriol., 137, 614 (1979)). Los vectores plasmídicos adecuados para la producción recombinante en *Saccharomyces*, preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*, comprenden por ejemplo los vectores de la serie YRp, YEp, YCp y YIp. Un vector de integración (documento EP 5327456) construido aplicando la recombinación homóloga del ADN ribosómico con múltiples copias en el cromosoma resulta adecuado para la inserción de múltiples copias y para el control de genes estables. Los vectores plasmídicos adecuados para la producción recombinante en *Kluyveromyces*, preferiblemente *Kluyveromyces lactis*, comprenden por ejemplo la serie del plásmido 2 μ m derivada de *Saccharomyces cerevisiae*, plásmidos de la serie pKD1 (J. Bacteriol., 145, 382-390 (1981)), y el plásmido derivado de pGK11 implicado en la actividad asesina, el plásmido de la serie KARS con el gen de replicación autónoma de *Kluyveromyces* y un vector de integración (documento EP 537456). Los vectores plasmídicos adecuados para la producción recombinante en *Pichia* comprenden, por ejemplo, el sistema de hospedante-vector desarrollado en *Pichia pastoris* utilizando un gen que está implicado en la replicación autónoma en *Pichia* (Mol. Cell. Biol., 5, 3376 (1985)). Los vectores plasmídicos adecuados para la producción recombinante en *Candida* comprenden, por ejemplo, el sistema de hospedante-vector desarrollado en *Candida maltosa*, *Candida albicans* y *Candida tropicalis* (Agri. Biol. Chem., 51, 51, 1587 (1987)). Los vectores plasmídicos adecuados para la producción recombinante en *Aspergillus* comprenden, por ejemplo, un vector construido mediante la integración del gen en el plásmido o cromosoma y el promotor para la proteasa o amilasa extracelular (Trends in Biotechnology, 7, 283-287 (1989)). Los vectores plasmídicos adecuados para la producción recombinante en *Trichoderma* comprenden, por ejemplo, el sistema de hospedante-vector desarrollado en *Trichoderma reesei*, y el promotor para la celulasa extracelular, que es adecuado para la construcción del vector (Biotechnology, 7, 596-603 (1989)).

Preferiblemente, dicho sistema de producción se proporciona con una construcción de ácido nucleico, preferiblemente una construcción de ADN, que codifica una proteína de la tabla 5 y/o la tabla 6, o una parte inmunogénica de esta.

En otra realización, dicho sistema de producción se proporciona con una construcción de ADN que codifica dos o tres o cuatro o incluso más proteínas de la tabla 5 y/o la tabla 6, o una parte inmunogénica de estas.

En otra realización, dicho sistema de producción se proporciona con al menos dos construcciones de ADN, que codifican cada una al menos una proteína de la tabla 5 y/o la tabla 6, o una parte inmunogénica de esta.

5 En otra realización preferida, dicha proteína de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste en P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, y P105. Aún más preferiblemente, dicha proteína de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste en P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, y P105. Lo más preferiblemente, dicha proteína de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste en P15, P16, P54, P28, P63, y P105.

10 En una realización más preferida, dicha construcción de ácido nucleico codifica una proteína de fusión, que comprende epitopos inmunogénicos derivados de más de una proteína de *S. uberis*. Más preferiblemente, dicha proteína de fusión comprende epitopos derivados de proteínas derivadas de más de una cepa de *S. uberis*.

15 En otra realización, dicha construcción de ácido nucleico codifica epitopos que han sido modificados para potenciar la respuesta inmunológica humoral y/o celular. Por tanto, la presente solicitud describe un método para producir una composición inmunogénica que comprende al menos dos proteínas de *S. uberis* capaces de provocar una respuesta inmunológica contra *Streptococcus uberis*, comprendiendo dicho método proporcionar una célula con un vector recombinante, comprendiendo dicho vector un ácido nucleico que codifica al menos dos proteínas listadas en la tabla 5 y/o la tabla 6 y/o una parte inmunogénica, un análogo o un derivado de cualquiera o de ambas de dichas proteínas. Para la producción recombinante de una proteína a partir de un ácido nucleico, dicho ácido nucleico preferiblemente se coloca bajo el control de una secuencia reguladora inducible capaz de potenciar la expresión de dicha proteína, preferiblemente dando como resultado un mayor rendimiento de la proteína. Preferiblemente, la acumulación de dicha proteína recombinante, o una parte inmunogénica de esta, es citoplásmica, por ejemplo, en los casos en que la proteína recombinante producida se recolecta de las células, o la proteína se excreta, por ejemplo, cuando la proteína producida se recolecta del fluido de cultivo. Por tanto, la construcción recombinante que codifica dicha proteína inmunogénica se proporciona con las secuencias reguladoras correctas y/o un promotor unido funcionalmente para la acumulación intracelular o extracelular.

20 Por tanto, la presente invención describe una molécula recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos dos proteínas listadas en la tabla 5 y/o la tabla 6 y/o una parte inmunogénica, un análogo o un derivado de cualquiera o de ambas de dichas proteínas bajo el control de un promotor unido funcionalmente.

25 En una realización preferida, dicha proteína de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste en P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, y P105. Aún más preferiblemente, dicha proteína de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste en P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, y P105. Aún más preferiblemente, dicha proteína de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste en P15, P16, P54, P28, P63, y P105.

30 La solicitud también describe un portador recombinante vivo que comprende una secuencia de ácido nucleico o una molécula de ADN de la invención. En una realización preferida, el portador es una primera cepa de *S. uberis*, y el ácido nucleico recombinante codifica epitopos inmunogénicos de otra cepa de *S. uberis*. Por tanto, la presente invención describe un portador recombinante vivo que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una o más proteínas listadas en la tabla 5 y/o la tabla 6 y/o una parte inmunogénica, un análogo o un derivado de cualquiera o de ambas de dichas proteínas bajo el control de un promotor unido funcionalmente. Por supuesto, dicho portador recombinante vivo también es inmunogénico cuando muere. Por tanto, la presente invención también describe un portador recombinante muerto.

35 La solicitud describe también una célula hospedante aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una o más proteínas listadas en la tabla 5 y/o la tabla 6 y/o una parte inmunogénica, un análogo o un derivado de cualquiera o de ambas de dichas proteínas bajo el control de un promotor unido funcionalmente. Una célula hospedante aislada comprende, por ejemplo, una célula bacteriana tal como, por ejemplo, *Escherichia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus suis*, *Lactobacillus*, o una levadura tal como, por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Yarrowia*, *Trichosporon*, *Rhodospiridium*, *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*, o un hongo tal como, por ejemplo, *Neurospora*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, y/o *Trichoderma*. Con la célula hospedante aislada mencionada anteriormente que comprende una molécula recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una o más proteínas listadas en la tabla 5 y/o la tabla 6 y/o una parte inmunogénica, un análogo o un derivado de cualquiera o de ambas de dichas proteínas bajo el control de un promotor unido funcionalmente, la presente invención describe, a los expertos en la técnica, cómo producir una molécula proteica recombinante. Debido a la variación entre diferentes cepas de *S. uberis*, las proteínas y los péptidos procedentes de diversas cepas pueden mostrar una ligera variación en la secuencia de aminoácidos y seguir teniendo la misma función. Por tanto, una molécula proteica derivada de una cepa de *S. uberis* tiene identidad de secuencia con una molécula proteica idéntica desde el punto de vista funcional de otra cepa de *S. uberis*. La "identidad de secuencia" se refiere al porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos después de alinear las dos secuencias y de introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Los métodos y los programas informáticos para el alineamiento son muy conocidos en la

técnica. Un programa informático que puede utilizarse o adaptarse para el objetivo de determinar si una secuencia candidata se ajusta a esta definición es "Align 2", desarrollado por Genentech, Inc., que se presentó con la documentación del usuario en the United States Copyright Office, Washington, D.C. 20559, el 10 de diciembre, 1991. Dos secuencias de aminoácidos tienen un alto grado de "identidad de secuencia" entre sí cuando las secuencias muestran al menos aproximadamente 80%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia de las moléculas después del alineamiento. Por tanto, la presente solicitud describe una molécula proteica aislada y/o recombinante que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína codificada por un ácido nucleico según la invención. En un ejemplo preferido, la invención describe una molécula proteica aislada y/o recombinante que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con una molécula proteica codificada por un ácido nucleico según la invención.

Para inducir o provocar una respuesta inmunológica en un animal contra una proteína o una parte inmunogénica de la invención, a dicho animal se le proporciona una proteína y/o una parte inmunogénica que comprende al menos un sitio inmunogénico. Una parte o sitio inmunogénico de una proteína está formado por uno o más epitopos y, así, es capaz de provocar una respuesta inmunológica. Un sitio inmunogénico preferiblemente comprende al menos 5 aminoácidos, más preferiblemente al menos 10-15, y lo más preferiblemente 25 o más aminoácidos consecutivos. La invención, en otro ejemplo preferido, describe una proteína, o una parte inmunogénica de esta, que comprende al menos un tramo de 25 aminoácidos consecutivos de una molécula proteica codificada por un ácido nucleico según la invención. Preferiblemente, dicho tramo de al menos 25 aminoácidos consecutivos comprende un sitio inmunogénico. Una molécula de ácido nucleico recombinante en una realización preferida codifica al menos una proteína o una proteína de fusión que codifica al menos dos proteínas, o partes inmunogénicas de estas. En una realización preferida, dicha proteína de fusión comprende partes inmunogénicas de al menos dos cepas de *S. uberis*. Por tanto, la invención describe un ácido nucleico que codifica una molécula proteica.

La expresión de dicho ácido nucleico en una célula hospedante proporciona una proteína inmunogénica de la invención. Dicha proteína inmunogénica se incorpora preferiblemente en una composición inmunogénica.

Dicha proteína recombinante de la invención es producida por una célula hospedante. Como célula hospedante se emplean para la producción especies bacterianas tales como, por ejemplo, *E. coli* y/o células de levaduras, de hongos o eucariotas.

Una composición inmunogénica que incorpora una proteína aislada y/o recombinante y/o una célula que exponga dicha proteína es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra *Streptococcus uberis* cuando se administra a un animal, preferiblemente una vaca. Preferiblemente, dicha célula que comprende un ácido nucleico de la invención bajo una secuencia reguladora adecuada expresa dicha proteína sobre la superficie. Dicha célula se denomina una célula portadora. Dicha célula portadora preferiblemente se incorpora en la composición inmunogénica. Preferiblemente, dicha célula que porta dicha proteína inmunogénica es un portador recombinante vivo, pero en otra realización, dicha célula portadora es capaz de provocar una respuesta inmunológica cuando la célula se mata, por ejemplo, mediante un tratamiento con formaldehído. Debido a que una causa de mastitis en las vacas es el *Streptococcus uberis*, en un ejemplo preferido, dicho portador recombinante vivo o muerto es una especie de *Streptococcus*. En un ejemplo, dicha célula hospedante es una especie de *Streptococcus*. La molécula proteica, entonces, se presenta preferiblemente en el contexto de otras proteínas estreptocócicas, que potencian una respuesta inmunológica. Además, la inmunogenicidad puede potenciarse mediante la sobreexpresión de las proteínas recombinantes sobre la superficie de la célula hospedante, preferiblemente una célula estreptocócica. Además, el uso de diferentes cepas de células hospedantes estreptocócicas potencia la inmunogenicidad de las proteínas inmunogénicas o de partes de estas. Existen varias especies de estreptococos que también son adecuadas como célula hospedante, por ejemplo, *S. suis* o *S. agalactiae* o *S. dysgalactiae*.

Debido a las diferencias entre diversas especies de *Streptococcus*, y debido a que algunas proteínas, que se producen en la naturaleza sobre *Streptococcus uberis*, son capaces de ayudar a provocar una respuesta inmunológica contra *Streptococcus uberis*, en una realización preferida se emplea *Streptococcus uberis* atenuado como portador recombinante vivo en una composición inmunogénica. Preferiblemente, dicho organismo de *S. uberis* expresa proteínas de otra cepa de *S. uberis*, describiendo con ello una vacuna diferenciadora, porque el suero de un animal vacunado con dicha vacuna es discernible del suero de un animal infectado con una infección de campo, mediante la detección de anticuerpos contra proteínas de ambas cepas. En otra realización, dicho organismo de *S. uberis* es sustituido como célula hospedante o como portador vivo o muerto por un *S. suis*, o una especie de *Staphylococcus* o un *E. coli*, vivos o muertos.

La administración de una proteína inmunogénica, o de una parte de esta, o la administración de un ácido nucleico que codifica dicha proteína de la invención, provoca una respuesta inmunológica. Dicho ácido nucleico, cuando se administra a una vaca, se expresa en las células de dicha vaca y es reconocido por el sistema inmunológico de dicha vaca. Con ello, el ácido nucleico actúa como composición inmunogénica como, por ejemplo, una vacuna de ADN contra la mastitis.

Debido a que la composición inmunogénica provoca una respuesta inmunológica en un animal, preferiblemente una vaca, la proteína reduce las enfermedades relacionadas con la mastitis y mejora la salud de dichas vacas, haciendo con ello que las vacas sean mucho más resistentes a otras infecciones (secundarias).

Preferiblemente, la composición inmunogénica se emplea para fabricar un medicamento contra la mastitis por *Streptococcus uberis* que reduce la enfermedad específica como resultado de una mastitis provocada por *Streptococcus uberis*.

5 Una composición inmunogénica también se emplea para producir o formular una vacuna contra la mastitis. Una vacuna, en general, evita que animales o seres humanos contraigan una enfermedad. Preferiblemente, la composición inmunogénica es capaz de prevenir la mastitis.

10 En otra realización, la composición inmunogénica se emplea preferiblemente para disminuir y/o controlar el número de organismos de *S. uberis* en la leche y/o en la ubre de la vaca. El proceso de ordeño en una granja de producción láctea comprende un peligro potencial de transferir organismos de *S. uberis* desde una vaca enferma a otra vaca. Por tanto, la disminución del número de organismos de *S. uberis* es lo más adecuado para evitar la dispersión de la infección desde la teta de una ubre a otra teta de la ubre y/o de un animal a otro animal.

15 Para la administración de una composición inmunogénica a un sujeto, la mezcla de las proteínas, o las partes inmunogénicas de estas, o las células hospedantes con un portador adecuado facilita la aceptación por un sujeto de la composición inmunogénica y aumenta el efecto inmunogénico de la composición. Un portador adecuado comprende, por ejemplo, un adyuvante adecuado para aumentar el efecto inmunizante de dicha composición inmunogénica. Los expertos en la técnica conocen muchos adyuvantes adecuados, con una base de aceite o con una base acuosa, por ejemplo, el adyuvante Diluvacforte® o el adyuvante Specol®. En una realización, dicho portador adecuado comprende, por ejemplo, una disolución como, por ejemplo, disolución salina para diluir bacterias o proteínas, o partes inmunogénicas de estas.

20 En un animal, preferiblemente una vaca, que se inmuniza con una composición inmunogénica descrita por la invención, se producen anticuerpos que se dirigen contra *S. uberis*. La presencia y el nivel de dichos anticuerpos son indicativos de la inmunidad después de la inmunización con una composición inmunogénica o una vacuna. Dichos anticuerpos preferiblemente no se dirigen contra epitopos que están presente en cepas de *S. uberis* de tipo salvaje en el campo. Para discernir entre un animal vacunado y un animal que tiene una infección del tipo de campo, la inmunidad de dicho animal vacunado, en una realización, preferiblemente se mide midiendo los anticuerpos dirigidos contra dicha composición inmunogénica. El antisuero de dicha vaca vacunada también se ensaya para la presencia de anticuerpos contra antígenos de *S. uberis*, que no están presentes en la composición inmunogénica. La detección de anticuerpos contra un antígeno de *S. uberis* que no está presente en la composición inmunogénica o vacuna es una indicación de una infección de tipo salvaje. Por tanto, la presente invención describe un método para medir la inmunidad de un animal contra *S. uberis*, comprendiendo dicho método determinar, en al menos una muestra procedente de dicho animal, la presencia de anticuerpos dirigidos contra una proteína seleccionada de la tabla 5 y/o la tabla 6, o una parte inmunogénica de esta. En una realización preferida, dicha proteína seleccionada de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste en P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, y P105. Aún más preferiblemente, dicha proteína seleccionada de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste en P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, y P105. Lo más preferiblemente, dicha proteína seleccionada de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste en P15, P16, P54, P28, P63, y P105.

40 Para la detección de anticuerpos que se unen a la composición inmunogénica descrita por la invención, un kit de diagnóstico que comprenda al menos una de las proteínas de la tabla 5 y/o la tabla 6, o una parte inmunogénica de estas, es adecuado. La unión de un anticuerpo a dicha proteína, o a una parte inmunogénica de esta, se detecta mediante, por ejemplo, detección de anticuerpos inmunofluorescentes o detección de anticuerpos acoplados a enzimas o mediante cualquier otro medio de detección de anticuerpos unidos a dicha proteína, o a una parte inmunogénica de esta.

45 En una realización preferida, dicha al menos una de las proteínas de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste en P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, y P105. Aún más preferiblemente, dicha al menos una de las proteínas de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste en P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, y P105. Lo más preferiblemente, dicha al menos una de las proteínas de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste en P15, P16, P54, P28, P63, y P105.

50 Por tanto, la presente invención describe un kit de diagnóstico que comprende al menos una proteína seleccionada de la tabla 5 y/o la tabla 6, o una parte inmunogénica de esta, y un medio para detectar un anticuerpo que se une a dicha proteína, o a dicha parte inmunogénica de esta. Este kit de diagnóstico es, por ejemplo, un ensayo ELISA o cualquier otro ensayo adecuado para seleccionar sueros. Preferiblemente, dicho kit de ensayo es adecuado para seleccionar un gran número de sueros.

55 En otra realización, se emplea un ácido nucleico para la detección de animales infectados por cepas de *S. uberis* de tipo salvaje en una población de animales vacunados con una composición inmunogénica o una vacuna. Esta detección se logra, por ejemplo, utilizando una PCR.

La presente solicitud de patente indica que las proteínas inmunogénicas adecuadas son moléculas proteicas y/o proteínas accesibles para los anticuerpos en la superficie bacteriana y comunes a una serie de cepas de *S. uberis*. Como ejemplo, se identificaron proteínas de la superficie a partir de secuencias del genoma de las cepas 41-241 y

O140J mediante la selección de genes que contienen una o más secuencias que se encuentran habitualmente en las proteínas de la superficie de bacterias gram-positivas como, por ejemplo, un motivo de sortasa LPXTG necesario para anclar la proteína a la pared celular, o un motivo de unión de lípidos necesario para lipoproteínas, o una secuencia señal o una región transmembrana que predice una localización en la superficie de la proteína codificada.

- 5 La presente solicitud describe la presencia de proteínas seleccionadas en cepas de *S. uberis*, según se estudia sondando el ADN cromosómico de una serie de cepas de *S. uberis* con productos de la PCR obtenidos a partir de los genes seleccionados como se ha mencionado anteriormente.

La invención se explica más a fondo en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que solo sirven para aclarar la invención. Pueden realizarse muchas realizaciones alternativas, que están dentro del alcance de la presente invención.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Análisis FACS de cepas de *S. uberis* intactas. Se incubaron las cepas 41-241 (A) y O140J (B) de *S. uberis* con suero inmunológico de ratón (barras oscuras) o con el correspondiente suero preinmunológico (barras claras). Los anticuerpos unidos se detectaron utilizando anticuerpos secundarios conjugados con FITC. Los datos se expresan como la mediana de la fluorescencia asociada con las células bacterianas. Se consideró que una fluorescencia ≥ 10 (2 x fondo) era positiva. Los números de los sueros utilizados se refieren a los números del gen/proteína según se indica en las tablas 1 a 4.

Figura 2. Patrones del proteoma bidimensionales teñidos con azul brillante de Coomassie. Se sondaron lisados de las cepas 41-241 (A) y O140J (B) de *S. uberis* en crecimiento exponencial con suero bovino obtenido de vacas después de una infección experimental con la cepa O140J. Se identificaron las proteínas encerradas en un círculo como proteínas inmunogénicas. Las propiedades de las proteínas identificadas se analizaron mediante una digestión triptica dentro del gel. La espectrometría de masas MALDI-TOF se muestra en la tabla 6.

Figura 3. Infección de vacas con la cepa O140J o la cepa 41-241 de *S. uberis*.

3A. Las vacas 6716 y 6717 fueron infectadas a través del conducto de la leche con la cepa O140J de *S. uberis*. Las vacas 6720 y 6721 fueron infectadas a través del conducto de la leche con la cepa 41-241 de *S. uberis*. Nótese que la vaca 6720 se infecta con 5000 cfu de *S. uberis*, y la vaca 6721 se infecta con 500 cfu de *S. uberis*. SSC significa recuentos de células somáticas en la leche. BO significa investigación bacteriana y se presenta como el número de organismos como unidades formadoras de colonias (cfu) aisladas a partir de la leche. RV significa cuarto anterior derecho. LA significa cuarto posterior izquierdo.

3B. Señales clínicas y resultados bacterianos y citológicos de las vacas 6718 y 6719 después de una infección con la cepa O140J de *S. uberis*.

3C. Señales clínicas y resultados bacterianos y citológicos de las vacas 6722 y 6723 después de una infección con la cepa 41-241 de *S. uberis*.

Figura 4. Secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos de las proteínas de *S. uberis* de la tabla 5.

Ejemplos

Ejemplo 1: Selección de antígenos de la superficie comunes

Análisis de la secuencia de ADN. Se ha determinado la secuencia de ADN de la cepa 41-241 de *S. uberis* con una cobertura 2x. Los datos de secuenciación se reunieron para obtener 572 secuencias contiguas que contienen 1815 ORF. La cepa O140J de *S.uberis* (Hill, 1988) se secuenció en el centro Sanger. También se reunieron los datos de la secuencia disponibles en el sitio de Sanger en abril de 2002 para obtener 61 cóntigos que contienen 1938 OFR.

Selección de antígenos de la superficie comunes. Los antígenos de vacunas satisfactorios son proteínas que son accesibles a los anticuerpos en la superficie bacteriana y son comunes a una serie de cepas de *S. uberis*. Las proteínas de la superficie se identificaron a partir de secuencias del genoma de las cepas 41-241 y O140J seleccionando los genes que contienen una o más secuencias que forman un motivo de firma (véase M&M) que se encuentran habitualmente en proteínas de la superficie de bacterias gram-positivas. Entre todos los ORF analizados, 17 ORF contenían un motivo de sortasa LPXTG (tabla 1) necesario para anclar la proteína a la pared celular. Cuatro (P12, P23, P24 y P25) de estas 17 proteínas se encuentran exclusivamente en la cepa 41-241.

Treinta y un ORF contenían un motivo de unión de lípidos necesario para lipoproteínas (tabla 2).

50 Se encontraron todas estas proteínas en la cepa O140J, así como en la cepa 41-241. Además, se seleccionaron 87 ORF que contenían una secuencia señal o una región transmembrana que predice una localización en la superficie de la superficie codificada (tabla 3).

Se encontraron estas proteínas en la cepa O140J, así como en la cepa 41-241.

Ejemplo 2: Distribución de los genes seleccionados entre diversos aislados clínicos y subclínicos de *S. uberis*

5 Para estudiar la presencia de los genes seleccionados entre diversas cepas de *S. uberis*, se realizaron experimentos de hibridación de manchas en los que el ADN cromosómico de un número considerable de cepas de *S. uberis* clínicas se sondaron con productos de la PCR obtenidos a partir de 99 de los genes seleccionados. Los datos (tabla 4) demuestran que la mayoría de los genes seleccionados se hibridan con la mayoría de las cepas de *S. uberis*, lo cual sugiere que la mayoría de los genes seleccionados están presentes de modo común entre las diversas cepas de *S. uberis*. Por contraste, 4 de los 99 genes ensayados solo se hibridan con un número limitado de cepas. Todos estos genes están presentes en la cepa 41-241 y codifican proteínas que tienen un motivo de sortasa LPXTG necesario para anclar la proteína a la pared celular.

Ejemplo 3: Inmunogenicidad de proteínas de la superficie seleccionadas

15 Para evaluar el papel de las proteínas como candidatos de vacunas, se clonaron las proteínas codificadas por los 115 genes seleccionados y se expresaron en *E. coli* con marcadores de polihistidina. Los productos de 106 de estos genes se clonaron con éxito y se expresaron en *E. coli*. Después se ensayaron los sueros obtenidos de vacas infectadas por *S. uberis* y de conejos inmunizados con células de *S. uberis* sonicadas o muertas con formaldehído para la presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra las proteínas expresadas mediante un análisis de la transferencia Western. Los resultados (tabla 5) muestran que 19 de las proteínas expresadas fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero de animales infectados por *S. uberis*, lo cual indica que estas proteínas se expresan *in vivo* y son inmunogénicas en vacas. Además, 30 de las proteínas expresadas fueron reconocidas por anticuerpos presentes en el suero de conejos inmunizados con células de *S. uberis* sonicadas o muertas con formaldehído. Doce de las proteínas expresadas fueron reconocidas por los sueros obtenidos de vacas infectadas por *S. uberis*, así como por los sueros de conejos inmunizados con células de *S. uberis* sonicadas o muertas con formaldehído. Estos datos indican que la mayoría de las proteínas son antigénicas.

25 La tabla 5 también muestra que algunas proteínas fueron reconocidas por antisueros inducidos después de una infección experimental con ambas cepas 41-241 y O140J. Sin embargo, otras proteínas reaccionaron de modo positivo exclusivamente con los sueros obtenidos después de una infección con la cepa O140J o con los sueros obtenidos después de una infección con la cepa 41-241. Esto probablemente indica que existen diferencias entre las dos cepas en la expresión de proteínas *in vivo* o en la accesibilidad de las proteínas para el sistema inmunológico.

Ejemplo 4: Purificación de las proteínas seleccionadas

30 Para evaluar más a fondo el papel de las proteínas como candidatos a vacunas, se purificaron las 36 proteínas reconocidas por los sueros procedentes de vacas infectadas y/o por los sueros procedentes de conejos inmunizados. Además, se purificaron 4 proteínas que contenían un motivo de sortasa pero que no reaccionaron con ambos sueros. Treinta y una de las 40 proteínas recombinantes seleccionadas fueron sobreexpresadas con éxito en forma soluble y pudieron purificarse bajo condiciones nativas, mientras que 5 proteínas fueron expresadas como cuerpos de inclusión insolubles. Estas proteínas fueron purificadas utilizando condiciones desnaturalizantes y las proteínas se volvieron a plegar después de la purificación. Cuatro proteínas no pudieron ser purificadas en cantidades suficientes para la inmunización. Las 36 proteínas purificadas se utilizaron después para inmunizar ratones. Tal como muestran las transferencias Western, ninguna de las proteínas fue reactiva con el suero obtenido de los ratones antes de la inmunización. Sin embargo, por contraste, las proteínas tienen una fuerte reacción con los sueros inmunológicos obtenidos de los ratones (tabla 5), lo cual indica que las proteínas son muy inmunogénicas en ratones. La especificidad de los anticuerpos inducidos fue confirmada mediante una inmunotransferencia contra lisados (o sobrenadantes de protoplastos) de células de *S. uberis*. Los resultados demuestran que la mayoría de los anticuerpos inducidos reaccionan específicamente con una proteína de *S. uberis* con la masa molecular esperada, lo cual indica claramente que estas proteínas representan antígenos (de la superficie) que son capaces de inducir una respuesta inmunológica en ratones.

Ejemplo 5: Características funcionales de los anticuerpos inducidos

50 Los inventores utilizaron los sueros de los ratones en un análisis FACS para estudiar la unión de los anticuerpos a células de *S. uberis* encapsuladas completas (cultivadas en Todd-Hewitt). Tal como se muestra en la figura 1, ninguno de los sueros obtenidos de los ratones antes de la inmunización fue capaz de unirse a células de *S. uberis* completas. Sin embargo, por contraste, ocho de los sueros inmunológicos (sueros inducidos contra las proteínas P11, P15, P17, P20, P25, P26, P27, P63) se unían con fuerza a las células bacterianas completas, mientras que dos de los sueros (dirigidos contra las proteínas P17, P18) mostraron una unión débil a las células bacterianas completas. Esto indica claramente que las proteínas reconocidas por estos sueros fueron expresadas bajo las condiciones utilizadas para cultivar las células bacterianas de *S. uberis*, y que son accesibles para la unión a los anticuerpos. Además, la figura 1 demuestra claramente que la expresión y/o accesibilidad en la superficie de las proteínas difiere entre las dos cepas utilizadas. La expresión y/o la accesibilidad en la superficie se conservó en tres de las proteínas (P17, P18 y P20). Por contraste, P11 y P63 fueron exclusivamente detectadas empleando la cepa

O140J, mientras que P15, P18, P25 y P26 fueron exclusivamente detectadas empleando la cepa 41-241. P27 estaba expuesta en la superficie en ambas cepas 41-241 y O140J, pero solo fue débilmente reconocida por el antisuero sobre la cepa 41-241.

5 Tomados conjuntamente, estos datos demuestran claramente que 10 de los antígenos seleccionados son expresados sobre la superficie de las bacterias cultivadas *in vitro* y que están disponibles para la unión del anticuerpo sobre células encapsuladas intactas. Tres de estas proteínas estaban conservadas en las dos cepas utilizadas.

Ejemplo 6: Estrategia del proteoma serológico

10 Como estrategia alternativa para la identificación de candidatos a vacunas de *S. uberis*, se aplicó un análisis del proteoma serológico.

15 Se separaron proteínas de cepas de *S. uberis* cultivadas en caldo de cultivo TH mediante una electroforesis en gel bidimensional y se sondaron con anticuerpos presentes en sueros de animales infectados con *S. uberis*. Se identificó una serie de proteínas de *S. uberis* muy inmunogénicas (los datos no se muestran). Se hicieron corresponder con éxito tres manchas a las proteínas presentes sobre un gel bidimensional teñido con azul brillante de Coomassie (figura 2). A partir de estas proteínas, se analizaron los productos de la digestión trípica mediante Q-TOF, y las huellas de péptido-masa resultantes se compararon con las huellas de péptido-masa generadas *in silico* de todas las proteínas predichas a partir del análisis de la secuencia del genoma de las cepas 41-241 y O140J. Además, se emplearon dos péptidos tríplicos importantes seleccionados de cada huella para una MS en tándem. La secuencia de aminoácidos resultante de los péptidos después se comparó con las secuencias predichas a partir de las secuencias del genoma de *S. uberis*. Se hicieron corresponder con éxito las tres proteínas utilizando este procedimiento. Las propiedades de las proteínas identificadas se listan en la tabla 6. Uno de estos candidatos a vacuna también se identificó utilizando la estrategia genómica (P63). Esto subraya la importancia de esta proteína como candidata a vacuna.

Ejemplo 7: ELISA de sobrenadantes de cultivo con sueros inmunológicos de ratones

25 P93 y P105 fueron reconocidos con gran intensidad en los sobrenadantes de los cultivos de ambas cepas, lo cual indica que estas proteínas son segregadas por las bacterias.

Ejemplo 8: Análisis FACS empleando células de *S. uberis* cultivadas en suero para imitar las condiciones *in vivo*

30 Se siguió el procedimiento del ejemplo 5 para ensayar la unión de anticuerpos a células de *S. uberis* que se cultivaron en un medio que imita a la leche.

Ejemplo 9: Conservación de antígenos entre diversas cepas de *S. uberis*

Se estudia la conservación de la expresión de las proteínas seleccionadas y la accesibilidad a anticuerpos entre diversos aislados de *S. uberis* mediante análisis FACS. Estos estudios permiten la selección de candidatos a vacunas dirigidos a diversas cepas de *S. uberis*.

35 Ejemplo 10: Vacunación y exposición en ganado vacuno

Infeción experimental de animales no vacunados. Se determinó la virulencia de las cepas O140J y 41-241 de *S. uberis* después de una infección experimental. Una ubre se divide en cuatro partes, denominadas en general cuartos. Cada cuarto comprende células secretoras de leche, conductos de la leche, una cisterna de la leche y una teta. En este experimento, cada cuarto se infecta de modo individual en la cisterna de la leche a través del conducto de la leche en la teta. Seis de ocho cuartos inoculados con la cepa O140J se infectaron con éxito (figura 3, tabla 7). Se aislaron cultivos puros de la cepa O140J de *S. uberis* a partir de la leche obtenida de estos cuartos y se detectaron niveles mayores de recuentos de células somáticas (SCC). En dos cuartos (de dos vacas diferentes; las vacas 6717 y 6719; figuras 3A y 3B) no pudo detectarse infección después de la exposición. Ambos cuartos siguen siendo bacteriológicamente negativos durante el desarrollo del experimento. En uno de los dos cuartos se observó un ligero aumento en SCC. Por contraste, en los ocho cuartos expuestos a la cepa 41-241 se estableció una infección (figuras 3A y 3C, tabla 7). Cuatro de estos cuartos (vacas 6721 y 6723) fueron inoculados con una dosis de 5×10^2 cfu de la cepa 41-241, mientras que los otros cuatro cuartos fueron inoculados con una dosis de 5×10^3 cfe (vacas 6720 y 6722). Se observaron efectos más graves después de la inoculación con la dosis mayor: la temperatura corporal de las vacas aumentó de modo más significativo y se observaron señales clínicas de enfermedad más graves (coágulos en la leche y consistencia firme de la ubre) (tabla 7, figuras 3A y 3C). Sin embargo, también se indujeron señales de mastitis utilizando la cepa 41-241 con una dosis de inoculación de 5×10^2 cfu. Previamente se habían observado datos similares para la cepa O140J (Hill, 1988).

Comparado con la cepa 41-241, las señales clínicas de mastitis obtenidas con la cepa O140J (dosis de inoculación de 5×10^2 cfu y estudiado durante 16 días) parecen más graves (figuras 3B y 3C). Tres de cuatro cuartos se infectaron con éxito con la cepa O140J y los tres mostraron señales clínicas de mastitis durante al menos 16 días

después de la infección. Dos de estos cuartos permanecieron bacteriológicamente positivos durante 16 días después de la infección (figura 3B), y en un cuarto se detectó un nivel mayor de SCC durante 35 días (los datos no se muestran). Los cuatro cuartos infectados con la cepa 41-241 mostraron señales clínicas de mastitis durante 10-13 días después de la inoculación, pero fueron negativos a las señales clínicas desde el día 13 en adelante (figura 3C).
 5 Dos de estos cuartos (vaca 6723) siguieron siendo bacteriológicamente positivos durante el desarrollo del experimento (16 días), lo cual indica la persistencia de *S. uberis* en la glándula mamaria (figura 3C).

El estudio histológico del material de ubre recogido 3-5 días después de la infección en general se corresponde con las observaciones clínicas. Ambas vacas infectadas con la cepa 41-241 y una vaca infectada con la cepa O140J mostraron una mastitis de moderada a grave a través de toda la glándula, con acumulación intraalveolar multifocal de granulocitos polimorfonucleares, alteración focal de la capa epitelial en los alveolos e infiltración intersticial moderada de células mononucleares (los datos no se muestran). La segunda vaca infectada con la cepa O140J presentaba una mastitis catarral multifocal suave.

Tomados conjuntamente, estos datos demuestran que ambas cepas O140J y 41-241 son patógenas en las vacas.

Inmunización de vacas lecheras. Se generaron anticuerpos policlonales contra proteínas de *S. uberis* en vacas. Las vacas se inmunizaron mediante diversos calendarios de inmunización, utilizando una inoculación subcutánea y/o intramuscular y/o intramamaria.

La composición inmunogénica se formuló con un disolvente, como por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato, y un adyuvante, por ejemplo, adyuvante de agua en aceite o adyuvante sin aceite.

Después de la inmunización se recogió una muestra de sangre y se ensayó el suero para detectar anticuerpos contra *S. uberis*.

Infección experimental de animales vacunados. Se expusieron a una infección con 500 cfu de la cepa O140J de *S. uberis* a vacas vacunadas y no vacunadas. Cada cuarto de ubre se infectó de modo individual a través del conducto de la leche en la teta.

Después de la exposición, las vacas vacunadas con una composición inmunogénica de la invención muestran menos señales clínicas de mastitis, menos alteraciones en la leche, menores niveles de SCC, un periodo más corto de mastitis clínica, menos fiebre. Las puntuaciones clínicas y las pruebas histológicas de las ubres demuestran claramente que la inmunización según la presente invención es eficaz contra la mastitis provocada por *S. uberis*.

Ejemplo 11: Reactividad de los antígenos con suero convaleciente

Se ensayó la capacidad de una serie de proteínas seleccionadas (P15, P16, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P68, P75, P93 y P105) para inducir anticuerpos convalecientes mediante un análisis de la transferencia Western utilizando sueros de campo obtenidos de 14 vacas que se habían recuperado de una infección reciente por *S. uberis*. Seis de los 12 antígenos seleccionados (P15, P16, P54, P28, P63, P105) fueron reconocidos por los 14 sueros convalecientes utilizados. Estos datos indican que estos antígenos son expresados por todas las cepas de *S. uberis* que provocaron las respectivas infecciones, que estos antígenos se expresan durante la infección en el hospedante, y que estos antígenos son muy inmunogénicos. Cinco de los antígenos (P68, P27, P20, P93 y P22) fueron reconocidos por 8, 9, 10, 11 o 12 de los sueros convalecientes, respectivamente. Con uno de los antígenos no pudo detectarse reacción con ninguno de los sueros convalecientes (P75).

Ejemplo 12: Conservación de los antígenos entre diversas cepas de *S. uberis*. Para indicar la idoneidad de los antígenos para conferir protección frente a diversas cepas de *S. uberis*, se determinó la conservación y la expresión de los 12 antígenos seleccionados (P15, P16, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P68, P75, P93 y P105) entre una colección de cepas de campo recientemente aisladas (35 cepas). La expresión de los antígenos se demostró mediante el ensayo de selección de transferencias Western blots con sueros inmunológicos de ratón frente a los antígenos purificados. Cinco de los 12 antígenos (P15, P16, P28, P75 y P105) fueron expresados en >97% de las cepas ensayadas; dos de los antígenos (P27, P63) fueron expresados en 94% de las cepas, y cuatro de los antígenos (P20, P22, P54, P93) fueron expresados en 81-92% de las cepas. Estos datos demuestran claramente que la expresión de la mayoría de los antígenos está muy conservada entre las diversas cepas de *S. uberis*.

Materiales y métodos

Cepas de bacterianas y condiciones de cultivo

Se aisló una cepa 41-241 de *S. uberis* en 1998 de una granja de producción láctea holandesa comercial en la que se observó un brote de mastitis por *S. uberis* (Hill, 1988). La cepa 41-241 mostró una huella RAPD de tipo B que se encuentra predominantemente en el rebaño concreto durante el brote (Zadoks *et al.*, 2003). La cepa se aisló de una vaca infectada con *S. uberis* durante al menos dos meses. La aparición de la infección fue subclínica y fue seguida de múltiples recrudescimientos clínicos.

Las cepas O140J y EF20 de *S. uberis* fueron una amable donación del doctor J. Leigh, Institute for Animal Health,

Compton, Reino Unido. Otras cepas de *S. uberis* y *S. parauberis*, aisladas a partir de casos clínicos de mastitis en diversas granjas de producción láctea holandesas fueron una amable donación del doctor D. Mevius, CIDC, Lelystad, Países Bajos; de la doctora O. Sampimon, Animal Health Service, Deventer, Países Bajos; o de Dierenartsen Praktijk, Diessen, Países Bajos. Todas las demás especies estreptocócicas procedieron de la colección del laboratorio de ASG, Lelystad, Países Bajos. Las cepas estreptocócicas se cultivaron en caldo de cultivo Todd-Hewitt (código CM189, Oxoid), y se cultivaron sobre una base de agar-sangre Columbia (código CM331, Oxoid) que contenía sangre de caballo al 6% (en v/v) y aesculina al 0,1% (en p/v), a menos que se indique lo contrario. Las cepas de *E. coli* se cultivaron en caldo de cultivo Luria (18) y se cultivaron sobre caldo de cultivo Luria que contenía agar al 1,5% (en p/v). Si fue necesario, se añadieron 50 µg/ml de kanamicina.

5 **Preparación del suero.** La leche bruta se obtuvo de una granja de producción láctea sin infecciones por *S. uberis* en su historia (Waiboerhoeve, Lelystad, Países Bajos). La leche se centrifugó durante 30 minutos a 12.800 x g y se eliminó la grasa. Después se añadieron 40 µl/ml de renina (Lactoferm, Brouwland, Bélgica) y la leche se incubó durante 2 hr a 37 °C con mezclado frecuente. La leche coagulada se retiró mediante tamizado, y el sobrenadante remanente se centrifugó durante 30 minutos a 12.800 x g. El sobrenadante aclarado se esterilizó mediante filtración sobre un filtro Sartobran P de 0,2 µm (Sartonus, Goettingen, Alemania).

10 **Muestras de leche y sueros.** Las muestras de leche y los sueros se obtuvieron de casos de mastitis por *S. uberis* clínicos de diversas granjas de producción láctea holandesas (doctora O. Sampimon, Animal Health Service, Deventer, Países Bajos). Ninguno de los animales habían sido tratados con antibióticos antes de que las muestras se recogiesen.

15 Además, se recogió leche y suero de vacas en diversos momentos después de una infección experimental con las cepas O140J y 41-241 de *S. uberis*.

20 **Antisuero de conejo.** Se generaron en conejos anticuerpos policlonales dirigidos contra células de *S. uberis* enteras matadas con formaldehído, así como contra células de *S. uberis* sonicadas. Los conejos se inmunizaron por vía subcutánea utilizando 2-4 x 10⁹ células muertas en adyuvante de agua en aceite. Las inoculaciones se repitieron dos, tres y cuatro semanas después. Después de 6 semanas, los conejos se sacrificaron y se recogió el suero.

25 Para preparar los antígenos, las cepas de *S. uberis* se cultivaron durante 16 h en caldo de cultivo Todd-Hewitt. Los cultivos se diluyeron 10 veces en 1 litro de caldo de cultivo Todd-Hewitt precalentado y las células se hicieron crecer hasta que la densidad óptica (600 nm) alcanzó 0,5. Los cultivos se centrifugaron durante 15 min a 10.000 x g, y los sedimentos se disolvieron en 100 ml de PBS (NaCl 136,89 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 2,79 mM, pH 7,2). Después, la densidad óptica (600 nm) se ajustó a 1,0 con PBS. Para preparar las células fijadas con formaldehído, porciones de 10 ml de estas células se centrifugaron durante 20 min a 10.000 x g y los sedimentos se resuspendieron en 2,5 ml de PBS. A esta suspensión se le añadieron 250 µl de formaldehído al 3% y se mantuvo durante 16 h a temperatura ambiente. La suspensión se comprobó para determinar la ausencia de bacterias vivas mediante cultivo en placas de agar Columbia. Para eliminar el formaldehído, las células se lavaron dos veces con PBS. Para preparar las células sonicadas, porciones de 10 ml de las células se centrifugaron durante 20 min a 10.000 x g, y los sedimentos se resuspendieron en 250 µl de PBS. Las células se sonicaron durante 15 min utilizando un sonificador de punta a 100% de salida, 50% de ciclo de trabajo. Después de la sonicación, las células se diluyeron 10 veces en PBS. Ambos antígenos se mezclaron 1:1 con Specol para producir emulsiones de agua en aceite.

30 **Secuenciación del genoma.** El ADN genómico se aisló de la cepa 41-241 de *S. uberis* tal como se describe en Sambrook *et al.* (1989). El ADN se sometió a cizallamiento y se empleó para crear un banco de plásmidos. Se secuenciaron clones aleatorios utilizando la química de tinte-terminador y se analizaron con un analizador de ADN ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Los datos de secuenciación se recopilaron para obtener 572 secuencias contiguas. Se identificó un conjunto inicial de marcos de lectura abiertos (ORF) con los programas informáticos GLIMMER y GENEMARK. Se predijeron las hélicas transmembrana y las localizaciones subcelulares en los genes con un programa informático denominado TMHMM, disponible en www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM. Para buscar en cada ORF para determinar la presencia de péptidos señal se empleó el programa informático SignalP (Nielsen *et al.*, 1999). Se realizaron predicciones alternativas de péptidos señal utilizando el programa informático PSORT disponible en <http://psort.nibb.ac.jp>, y un programa denominado GCG-SPScan, disponible en <http://www.biology.wustl.edu/gcg/spscan.html>. Se descubrieron las lipoproteínas utilizando el programa informático GCG-Findpatterns con las siguientes expresiones:

35 PS00013: ~{D,E,R,K}6(L,I,V,M,F,W,S,T,A,G)2(L,I,V,M,F,Y,S,T,A,G,C,Q)(A,G,S)C; g-lpp: <(M,V)X{0,13}(R,K)~{D,E,R,K,Q}{6,20}(L,I,V,M,F,E,S,T,A,G)(L,V,I,A,M)(I,V,M,S,T,A,F,G)(A,G)C; y g-lpp_rvh: (M,V,L)X{0,13}(R,K)~{D,E,R,K,Q}{6,20}(L,I,V,M,F,E,S,T,A,G)(L,V,I,A,M)(I,V,M,S,T,A,F,G)(A,G)C. Se identificaron las proteínas con dominios de anclaje a la pared celular utilizando InterPro registro IPR001899. Se empleó el programa informático BLAST para buscar las secuencias de proteínas con identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos deducidas.

40 **Transferencia de puntos, transferencia Southern e hibridación.** El ADN cromosómico se aisló como se describe

en Sambrook *et al.* (1989). Para la transferencia de puntos, se estableció una mancha de 1 µg de ADN cromosómico sobre membranas Genescreen Plus. Las membranas se incubaron en NaOH 0,4 M-NaCl 1 M a temperatura ambiente durante 10 min para desnaturalizar el ADN, y durante 10 min en NaCl 0,6 M, citrato de sodio 0,06 M (pH 7,0) para la neutralización. Para la transferencia Southern, los fragmentos de ADN se separaron sobre geles de agarosa al 0,8% y se transfirieron a membranas Gene-Screen Plus (NEN), según se describe en Sambrook *et al.* (1989). Las sondas de ADN se marcaron con $[(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{dCTP}$ (3000 Ci mmol⁻¹, Amersham) utilizando un kit de marcaje de cebado aleatorio (Boehringer). El ADN sobre las transferencias se hibridó a 65 °C en un tampón que tenía fosfato de sodio 0,5 M, EDTA 1 mM, y dodecilsulfato de sodio al 7% a un pH de 7,2, con las sondas de ADN apropiadas según recomienda el suministrador de las membranas Gene Screen Plus. Después de la hibridación, las membranas se lavaron dos veces con una disolución de fosfato de sodio 40 mM, pH 7,2, EDTA 1 mM, SDS al 5% durante 30 min a 65 °C, y dos veces con una disolución de fosfato de sodio 40 mM, pH 7,2, EDTA 1 mM, SDS al 1% durante 30 min a 65 °C. Se detectaron señales sobre un Phosphor-Imager (Storm, Molecular Dynamics).

Clonación y expresión de proteínas seleccionadas. Los ORF seleccionados se amplificaron mediante PCR con cebadores oligonucleotídicos específicos para la clonación en pET200/D-TOPO (Invitrogen). Las proteínas se clonaron sin secuencias señal putativas ni regiones transmembrana predichas. Las construcciones se transformaron en *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen) para la expresión de las proteínas recombinantes.

Para la reacción de PCR (25 µl) se empleó la ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen) según describe el suministrador. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador Perkin Elmer 9700, y el programa consistió en una incubación durante 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 15 seg a 94 °C, 30 seg a 57 °C, y 2 min a 68 °C, y 5 min a 68 °C.

Inmunodetección de los antígenos expresados. Las proteínas se separaron mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS utilizando el sistema de micéculas XCell SureLock (Invitrogen). Las proteínas en el gel se visualizaron utilizando tinción de SYPRO-Orange (Molecular Probes, Sunnyvale, Calif.), según las recomendaciones del fabricante. Se detectaron señales en un Phosphor-Imager (Storm, Molecular Dynamics).

Las proteínas se trasladaron a una membrana de nitrocelulosa mediante procedimientos convencionales (19). Las membranas se bloquearon en Blotto: disolución salina tamponada con Tris (TBS) (Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM) que contenía leche desnatada al 4%, suero de ternera fetal al 5% y Tween 20 al 0,05% a temperatura ambiente (TA) durante 16 h. Para detectar los antígenos recombinantes, las membranas se incubaron con un anticuerpo monoclonal contra 6 x marcador HIS (Clontech, Palo Alto, CA). Los anticuerpos unidos se detectaron y se visualizaron utilizando un anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina y nitro-azul-tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato, según se describe en Sambrook *et al.* (1989).

Se ensayó la inmunogenicidad de los antígenos expresados utilizando muestras de suero obtenidas de vacas infectadas clínica o subclínicamente con *S. uberis* o utilizando antisuero anti-*S. uberis* de conejo. Los anticuerpos unidos se detectaron con inmunoglobulinas de conejo anti-vaca o de cabra anti-conejo conjugadas con fosfatasa alcalina (Jackson Immunoresearch) y se visualizaron utilizando nitro-azul-tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato, según se describe en Sambrook *et al.* (1989).

Purificación de proteínas. Las proteínas se purificaron por afinidad a partir de sedimentos celulares solubilizados utilizando una cromatografía en columna de ácido Ni-nitrilotriacético (Ni²⁺-NTA), según describe el fabricante (Qiagen). Brevemente, las células se hicieron crecer hasta la fase exponencial, se añadió IPTG 1 mM y se dejó que las células crecieran durante 4 hr más a 37 °C. Después, las células se recolectaron y se lisaron. Los sobrenadantes aclarados se cargaron sobre columnas de agarosa Ni²⁺-NTA. Las columnas se lavaron y la proteína se eluyó. Se emplearon diferentes tampones para la purificación desnaturizante y nativa. Las proteínas purificadas bajo condiciones desnaturizantes se renaturalizaron mediante una diálisis empleando un gradiente lineal de urea 6 M-0 M en NaCl 286,89 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 2,79 mM, pH 7,2. Las proteínas purificadas después se concentraron utilizando filtros Amicon Ultra-4 5000 MWCO (Millipore).

Concentración de proteínas. Se determinó la concentración de proteínas en las muestras después de la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Las proteínas en el gel se visualizaron utilizando tinción de SYPRO-Orange (Molecular Probes, Sunnyvale, Calif.), según las recomendaciones del fabricante. Se detectaron señales en un Phosphor-Imager (Storm, Molecular Dynamics). Se empleó un intervalo de concentraciones de albúmina de suero bovina conocidas como patrón para calcular las cantidades de proteínas presentes en el gel. Se empleó el programa Molecular Dynamics para los cálculos.

Inmunogenicidad de las proteínas purificadas. Ratones OF1 fueron inmunizados por vía subcutánea utilizando 20 µg de proteínas purificadas en adyuvante completo de Freund. Las inoculaciones se repitieron tres semanas después utilizando 20 µg de proteínas purificadas en adyuvante incompleto de Freund. Tres semanas después de la segunda inoculación se sacrificaron los ratones y se recogió el suero.

Análisis FACS. Se cultivaron células de *S. uberis* en caldo de cultivo Todd-Hewitt hasta que la DO₆₀₀ alcanzó 0,5. Las células se recogieron mediante centrifugación, se lavaron una vez con tampón FACS (PBS-13, pH 7,2 [NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 2,8 mM], BSA al 0,5%) y la densidad celular se ajustó a

aproximadamente DO_{600} 1,0 en tampón FACS. Las células (250 μ l) se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en 50 μ l de tampón FACS que contenía antisuero de ratón (en una dilución 1:50). La muestra se incubó durante 45 minutos sobre hielo. Para retirar los anticuerpos no unidos, las células se lavaron dos veces con 250 μ l de tampón FACS. Después, las células se incubaron con 50 μ l de tampón FACS que contenía anticuerpo secundario anti-ratón de conejo marcado con isotiocianato (FITC) (dilución 1:100, DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca) durante 30 minutos sobre hielo. Las células se lavaron dos veces con 250 μ l de tampón FACS, se resuspendieron en 100 μ l de tampón FACS y el anticuerpo unido se detectó con un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS Calibur, Benton Dickinson, Franklin Lakes, EEUU).

ELISA con células completas. Células de *S. uberis* en crecimiento exponencial se recogieron mediante centrifugación, se resuspendieron en tampón de revestimiento, pH 9,6 ($NaHCO_3$ 0,05 M, Na_2CO_3 0,05 M) y la densidad celular se ajustó a DO_{600} 1,0. Placas de 96 pocillos de unión alta se revistieron con 100 μ l de esta suspensión por pocillo durante 16 hr a 4 °C. Los pocillos se lavaron 4 veces con tampón ELISA (Tween-80 al 5%, Na-azida al 0,02%), se añadió suero (diluido 1:20 en PBS-13 que contenía Tween-80 al 0,05%, NaCl al 2% y suero de ternera fetal al 5%) y las placas se incubaron durante 1 hr a 37 °C. Para eliminar los anticuerpos no unidos, los pocillos se lavaron cuatro veces con tampón ELISA. Después, se añadió un anticuerpo secundario (100 μ l de anti-ratón de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (DAKO) diluido 1:250 en PBS-13 que contenía Tween-80 al 0,05%, NaCl al 2% y suero de ternera fetal al 5%) y las placas se incubaron durante 1 hr a 37 °C. Los pocillos de nuevo se lavaron cuatro veces con tampón ELISA y los anticuerpos unidos se detectaron a temperatura ambiente utilizando 100 μ l de tetrametilbenzidina (TMB) (CeDi-Diagnostics, Lelystad, Países Bajos). Las reacciones se detuvieron después de 15 min mediante la adición de 100 μ l de H_2SO_4 0,5 M por pocillo. Se leyó la absorbancia utilizando un lector de ELISA (Thermo Labsystems, Franklin, EEUU) a 450 nm.

Preparación de las muestras para la electroforesis en gel bidimensional. Las cepas de *S. uberis* se cultivaron durante 16 h en 100 ml de caldo de cultivo Todd-Hewitt. Los cultivos se diluyeron 20 veces en 1 litro de caldo de cultivo Todd-Hewitt precalentado y las células se hicieron crecer hasta que la densidad óptica (600 nm) alcanzó 0,5. Los cultivos se centrifugaron durante 20 min a 10.000 x g, y los sedimentos se lavaron una vez con un volumen igual de sacarosa 250 mM/Tris 25 mM, pH 8,0, y una vez con un volumen igual de superQ. Los sedimentos resultantes se disolvieron en 5 ml de superQ. Se sonicaron porciones de 15 ml de estas suspensiones durante 15 min utilizando un sonicador de punta (sonificador Branson 250, intervalo del 50%, amplitud 3). Después, las suspensiones se trataron con ADNasa I y $MgCl_2$ (concentración final de 6,5 μ g/ml y 10 mM, respectivamente) durante 10 min a 37 °C. Se añadieron los inhibidores de proteasas pepstatina A, leupeptina, pefabloc y aprotinina a unas concentraciones finales de 2,5 μ g/ml, 5 μ g/ml, 25 μ g/ml y 1 μ g/ml, respectivamente. Las muestras se centrifugaron durante 30 min a 10.000 x g, los sobrenadantes se recogieron y se centrifugaron durante 30 min más a 100.000 x g. Los sobrenadantes se recogieron y se determinó la concentración de proteínas en las muestras utilizando el ensayo de proteínas RC DC (BioRad) según las instrucciones del fabricante.

Electroforesis en gel bidimensional. Se solubilizaron muestras que contenían 50-100 μ g de proteínas en 450 μ l de tampón de muestras (urea 8 M, CHAPS al 2%, IPG-tampón 3-10 al 0,5%, ditiotreitól 70 mM y trazas de azul de bromofenol). Las proteínas se separaron en la primera dimensión mediante enfoque isoeléctrico utilizando tiras Immobiline 18 cm DryStrips (3-10 NL Amersham Pharmacia Biotech) sobre un IPGphor (Amersham Pharmacia Biotech) después de la rehidratación de las tiras según las instrucciones del fabricante. Inmediatamente después del enfoque, las tiras se equilibraron durante 15 min en tampón de equilibrio (urea 6 M, glicerol al 30%, SDS al 2%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, trazas de azul de bromofenol) que contenía ditiotreitól 10 mg/ml, y durante 15 min en tampón de equilibrio que contenía yodoacetamida 25 mg/ml. Las proteínas se separaron en la segunda dimensión mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS sobre geles Ettan DALT premoldeado al 12,5% (Amersham Pharmacia Biotech) en un sistema Ettan DALT 12 (Amersham Pharmacia Biotech) según las instrucciones del fabricante.

Tinción. Las proteínas en los geles se tiñeron con plata utilizando el kit de tinción de plata PlusOne™ (Amersham Pharmacia Biotech) según las instrucciones del fabricante, o con azul brillante de Coomassie según se describe en Sambrook *et al.* (1989) con unos tiempos de incubación prolongados debido a la capa protectora de plástico de los geles.

Digestión de las proteínas de los geles bidimensionales. Las manchas de las proteínas identificadas sobre geles teñidos con Coomassie se cortaron de forma manual. Los trozos de gel se congelaron en ácido acético al 0,1% a -80 °C hasta su uso. Las proteínas en los geles se digirieron con tripsina, tal como se describe en Li *et al.* (2003).

Espectrometría de masas de las manchas de proteínas digeridas trópticamente de los geles bidimensionales. Se empleó un espectrómetro de masas Micromass Q-TOF para analizar las masas de las manchas de proteínas digeridas trópticamente, tal como se describe en Li *et al.* (2004).

Experimentos de infección experimental

Animales. Se emplearon vacas Holstein-Friesian clínicamente sanas, 2-4 semanas en su primera lactancia, para la infección. Las vacas se ordeñaron dos veces diarias a 7:00 a.m. y 4:00 p.m. Todas las vacas tenían unos recuentos

de células somáticas (SCC) por debajo de $2,0 \times 10^5$ células/ml, eran negativas para patógenos de la mastitis basándose en una evaluación microbiológica repetida de la lecha durante los últimos 14 días antes de la infección, y no tenían historia de mastitis.

- Preparación del inóculo e inoculación.** Se emplearon como inóculos las cepas de *S. uberis* O140J y 41-241. Se trasladaron colonias individuales, cultivadas sobre placas de agar Columbia que contenía sangre de caballo al 6% (en v/v) y aesculina al 0,1% (en p/v), hacia 90 ml de caldo de cultivo Todd-Hewitt (Oxoid) y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Los cultivos cultivados durante la noche se diluyeron de 1 a 10 en el mismo medio, y las bacterias se hicieron crecer hasta una concentración de aproximadamente 3×10^8 cfu/ml (fase de crecimiento logarítmico). Las células después se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron y se diluyeron en PBS.
- 5
- 10 Dos cuartos de cada vaca se inocularon por vía intracisternal con 5×10^2 (de la cepa O140J o de la cepa 41-241) o 5×10^3 (cepa 41-241) cfu por 5 ml de PBS. Los cuartos control fueron inoculados con 5 ml de PBS. Las inyecciones se realizaron justo después del ordeño de la tarde utilizando cánulas para tetas desechables. Antes de la inoculación, las tetas se limpiaron con alcohol. Los inóculos se masajearon hacia arriba para que se introdujesen en las cisternas de las glándulas.
- 15 Un grupo de cuatro vacas se expuso a 5×10^2 cfu de la cepa O140J. Otro grupo de cuatro vacas se expuso a la cepa 41-241. Dos de estas vacas fueron expuestas a 5×10^2 cfu, y las otras dos vacas a 5×10^3 cfu. Las vacas se utilizaron en dos experimentos consecutivos, uno terminó después de 45 a 80 horas, y el segundo después de 16 días.

- Toma de muestras y puntuaciones clínicas.** Se recogieron muestras de leche de forma aséptica de todos los cuartos en cada ordeño. Las muestras se estudiaron bacteriológicamente sobre placas de agar sangre que contenía sangre de caballo al 6% (en v/v) y aesculina al 0,1% (en p/v), y se determinó el SCC utilizando procedimientos convencionales (International Dairy Federation, 1981). Además, las muestras de leche se conservaron a -20 °C hasta el análisis para determinar la respuesta de anticuerpos. En cada ordeño se determinó la temperatura corporal de las vacas y la producción de leche, y las vacas se controlaron para determinar la aparición de señales clínicas de mastitis (consistencia de la ubre y coágulos en la leche). Una vez a la semana se recogieron muestras de sangre para el análisis de las respuestas de anticuerpos en el suero.
- 20
- 25

- Patología.** Para el estudio histológico, se tomaron muestras de tejido de la glándula mamaria de cada cuarto de diferentes sitios de tres secciones transversales horizontales diferentes, a saber, en la base de la glándula, a mitad de camino entre la base y la cisterna, y en la cisterna de la glándula. Las muestras de tejido se fijaron en formaldehído tamponado al 4% y se sumergieron en parafina. Para los estudios histológicos se cortaron secciones de tejido y se tiñeron con tinte de hematoxilina/eosina.
- 30

Referencias bibliográficas

- Alber, T., 1989, Mutational effects on protein stability, *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 765-798.
- Adv. Biochem. Eng.*, 43, 75-102 (1990).
- 35 *Agri. Biol. Chem.*, 51, 51, 1587 (1987).
- Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 94 (1985).
- Biotechnology*, 7, 596-603 (1989).
- Bramley, 1991, Mastitis: physiology or pathology, p. 3-9, en Burvenich, C., G. Vandeputte-van Messom, y A.W. Hill (ed.), *New insights into the pathogenesis of mastitis*, Rijksuniversiteit Gent, Bélgica.
- 40 *Biseibutsugaku Kisokoza (Basic Microbiology)*, 1990, vol. 8, Genetic Technology, Kyoritsu Shuppan De Greeff *et al.* (2002), *Infect. Immun.*, 70: 1319-1325.
- FEMS Microbiol. Lett.*, 26, 239 (1985).
- Fersht, A. R. y L. Serrano, 1993, Principles of protein stability derived from protein engineering experiments, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3, 75-83.
- 45 Finch, J. M., A. Winter, A. W. Walton y J. A. Leigh, 1997, Further studies on the efficacy of a live vaccine against mastitis caused by *Streptococcus uberis*, *Vaccine*, 15: 1138-1143.
- Fontaine, M. C., J. Pérez-Casal, X. M. Song, J. Shelford, P. J. Willson, A. A. Potter, 2002, Immunisation of dairy cattle with recombinant *Streptococcus uberis* GapC or a chimeric CAMP antigen confers protection against heterologous bacterial challenge, *Vaccine*, 20: 2278-2286.
- 50 Grandi, G., 2001, Antimicrobial vaccine design using genomics and proteomics, *Trends in Microbiol.*, 19: 181-188.

- Hill, A. W., 1988, Pathogenicity of two strains of *Streptococcus uberis* infused into lactating and non-lactating bovine mammary glands, Res. Vet. Sci., 45: 400-404.
- Hillerton J. E., M. F. Shearn, R. M. Teverson, S. Langridge, y J. M. Booth, 1993, Effect of pre-milking teat dipping on clinical mastitis on dairy farms in England, J. of Dairy Research, 60: 31-41.
- 5 Hogan, J. S., K. L. Smith, K. H. Hoblet, D. A. Todhunter, P. S. Schoenberger, W. D. Hueston, D. E. Pritchard, G. L. Bowman, L. E. Heider, B. L. Brockett *et al.*, 1989, Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies, J. Dairy Sci., 72: 250-258.
- J. Bacteriol., 137, 614 (1979).
- J. Bacteriol., 145, 382-390 (1981).
- 10 Leigh, J. A., 1999, *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis?, Vet. J., 157: 225-238.
- Leigh, J. A., 2000, Vaccines against bovine mastitis due to *Streptococcus uberis* current status and future prospects, Adv. Exp. Med. Biol., 480: 307-311.
- Li, K. W., M. P. Hornshaw, R. C. van der Schors, R. Watson, S. Tate, B. Casetta, C. R. Jimenez, Y. Gouwenberg, E. D. Gundelfinger, K-H. Smalla, y A. B. Smit, 2004, Proteomics Analysis of Rat Brain Postsynaptic Density, J. Biol. Chem., vol. 279, 987-1002.
- 15 Matthews, B. W., 1991, Mutational analysis of protein stability, Curr. Opin. Struct. Biol., 1, 17-21.
- McDougall, 1998, Efficacy of two antibiotic treatments in curing clinical and sub-clinical mastitis in lactating dairy cows, New Zealand Vet. J., 46, 226-232.
- Mol. Cell. Biol., 5, 3376 (1985).
- 20 Neave F. K., F. H. Dodd, R. G. Kingwell y D. R. Westgarth, 1969, Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management, J. Dairy Sci., 52: 696-707.
- Nielsen, H., S. Brunak, y G. von Heijne, 1999, Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other protein sorting signals, Protein Engineering, 12: 3-9.
- Oliver S. P., M. J. Lewis, B. E. Gillespie, S. J. Ivey, L. H. Coleman, R. A. Almeida, W. Fang, y K. Lamar, 1999, Evaluation of a postmilking teat disinfectant containing a phenolic combination for the prevention of mastitis in lactating dairy cows, J. of Food Protection, 62: 1354-1357.
- 25 Paton, J. C. y P. Giammarinaro, 2001, Genome-based analysis of pneumococcal virulence factors: the quest for novel vaccine antigens and drug targets, Trends in Microbiol., 9: 515-518.
- Pizza M., V. Scarlato, V. Masignani, M. M. Giuliani, B. Arico, M. Comanducci, G. T. Jennings, L. Baldi, E. Bartolini, B. Capocchi, C. L. Galeotti, E. Luzzi, R. Manetti, E. Marchetti, M. Mora, S. Nuti, G. Ratti, L. Santini, S. Savino, M. Scarselli, E. Storni, P. Zuo, M. Broeker, E. Hundt, B. Knapp, E. Blair, T. Mason, H. Tettelin, D. W. Hood, A. C. Jeffries, N. J. Saunders, D. M. Granoff, J. C. Venter, E. R. Moxon, G. Grandi y R. Rappuoli, 2000, Identification of vaccine candidates against serotype B *Meningococcus* by whole-genome sequencing, Science, 287: 1816-1820.
- Rappuoli, R., 2000, Reverse vaccinology, Current Opinion in Microbiol., 3: 445-450.
- 35 Wizemann T. M., J. H. Heinrichs, J. E. Adamou, A. L. Erwin, C. Kunsch, G. H. Choi, S. C. Barash, C. A. Rosen, H. R. Masure, E. Tuomanen, A. Gayle, Y. A. Brewah, W. Walsh, P. Barren, R. Lathigra, M. Hanson, S. Langermann, S. Johnson y S. Koenig, 2001, Use of whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection, Infect. Immun., 69: 1593-1598.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- 40 Schalm *et al.* (1971), The mastitis complex-A brief summary, pp. 1-3, en Bovine Mastitis. Lea & Febiger, Filadelfia.
- Trends in Biotechnology, 7, 283-287 (1989).
- Van der Burg, S. H., W. M. Kast, R. E. M. Toes, R. Offringa, C. J. M. Melief, Methods for selecting and producing T cell peptide epitopes and vaccines incorporating said selected epitopes, solicitud de patente internacional WO 97/41440.
- 45 Vriend, G. y V. G. H. Eijnsink, 1993, Prediction and analysis of structure, stability and unfolding of bacillus neutral proteases, J. Computer-Aided Mol. Design, 7, 367-396.

Wren, B. W., 2000, Microbial genome analysis: insights into virulence, host adaptation and evolution, Nature Genetics, 1: 30-39.

Yeast, 8, 423-488 (1992).

5 Zadoks R. N., H. G. Allore, H. W. Barkema, O. C. Sampimon, Y. T. Grohn y Y. H. Schukken, 2001, Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis, J. Dairy Sci., 84: 590-599.

Zadoks, R. N., B. E. Gillerpie, S. P. Oliver, H. W. Barkema, O. C. Sampimon, y Y. H. Schukken. 2003, Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds, Epidemiol Infect., 130: 335-349.

10 Zadoks, R. N., H. G. Allore, H. W. Barkema, O. C. Sampimon, G. J. Wellenberg, Y. T. Grohn y Y. H. Schukken, 2001, Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis, J. Dairy Sci., 84: 2649-2663.

Tabla 1. Proteínas de la superficie de *S. uberis* que contienen un motivo de sortasa LPxTGE

Proteína	n.º de cóntigo	n.º de aa	Homología en la base de datos (n.º de registro)	% de identidad	Señal de clasificación predicha
P11	231c11	1270	Exo-beta-D-fructosidasa de <i>S. mutans</i> (U78296)	54	LPMTSD SNNLEELGILVILTTLGAFLGRVILKKEK
P12	S00737	317	Proteína hipotética desconocida de <i>S. agalactiae</i> (Q8CM32)	60	LPNTGE SSIAPFTAIGAILSVLGLLGFKKRRTY
P13	129h4	484	Proteína similar al colágeno de <i>S. pyogenes</i> (AY069936)	45	LPSTGD KANPFFTAALAVMASAGMVAVSRKRKED
P14	K00518	565	Proteína similar al colágeno de <i>S. pyogenes</i> (AF336814)	44	LPSTGD KANPFFTAALAVMASAGMVAVSRKRKED
P15	130g06	693	5'-nucleotidasa de <i>S. pyogenes</i> (NC_004070)	46	LPTTSS QEDTAILLSLLGASSLAMAVALKKKENN
P16	223b05	268	Sin homología	--	LPSTGE DYQAYLVAAAMALIASSGMVAYGSYRKKKQK
P17	52g05	1074	Desconocido de <i>Bacillus halodurans</i> (NC_002570)	34	LPALAD GSHKDDSKLFWVTGLLVASGGLFAALKRREED
P18	240d11	499	Homólogo de proteína de unión al fibrinógeno de <i>S. aureus</i> (AJ005646)	26	LPMAGE RGSRLFTFIGLSLILGIAGYLLKHKVKS
P19	32a09	278	Precursor de beta-N-acetil-hexosaminidasa de <i>S. pneumoniae</i> (NC_003098)	32	LPPTGS QESGIFLSFSALISTALGLFLLKSNKND
P20	122b06	506	Proteína de unión a lactoferrina de <i>S. uberis</i> (AAQ83577.1)	42	LPSTGD KPVNPLLVASGLSLMIGAGAFVYAGKRKKG
P22	130g06	1483	Precursor de serina proteinasa PrtA de <i>S. pneumoniae</i> (AF127143)	25	LPETRD SSSMANWSLAFFLSAVICFFKGRKRLNKL
P23	S03520	456	Sin resultados	--	LPTTGD KADGSIVQMVGALMVSFVGFSAKDRKKEK
P24	S00737	238	Proteína hipotética desconocida de <i>S. agalactiae</i> (Q8CH3)	46	LPHTGE EKGFLSIIGGTILSFVAFLFKKKITLN

P25	S00737	876	Proteína hipotética desconocida de <i>S. agalactiae</i> (Q8CMF2)	49	LPHTGE EGLSILTVIGASILSVLGLSVLKKPKEN
P26	224g12	649	Proteína hipotética de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (NC_003421)	22	LPTTGD DQNLLVTLMSLLLSLGLGLKKKEDE
P27	113f05	1144	Peptidasa C5a de <i>S. pyogenes</i> (NC_004070)	34	LPKTDS QKTMFLGIAMLFGGILQVLWSYFKKRD
P115	69h12	818	Ciclonucleótido fosfodiesterasa de <i>S. suis</i> (AB066354)	64	LPKAGS QESKGLFFMGLSLLGLAGLITKKEERQ

Tabla 2. Lipoproteínas putativas de *S. uberis*

Proteína	n.º de cóntigo	n.º de aa	Homología en la base de datos (n.º de registro)	% de identidad	Señal de clasificación predicha
P30	198g02	293	Proteína de unión a fosfato de <i>S. pneumoniae</i> (AAL00697.1)	71	MKIMKMNKMLTLAVLTLSSFGLAAC
P31	111h03	451	Proteína de unión a azúcar de <i>S. pneumoniae</i> (AAK75762.1)	24	MSKKILKLATLAILPFVGLTAC
P32	32a09	309	Adhesión a laminina de <i>S. pyogenes</i> (AAL98544.1)	62	MKRKFLSFILVLTFFLPFLVGLSAC
P33	71g04	314	Proteína de maduración de proteasa de <i>S. pyogenes</i> (AAK34209.1)	61	MNTSKKIVTGFVTLASVLTAAAC
P34	113f05	416	Proteína de unión a maltosa/maltodextrina de <i>S. pyogenes</i> (AAL97920.1)	85	MKSWQKIIVSGASLTLASTLLVGC
P35	121e03	212	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAK34138.1)	57	MIGLLMKTQKSITLLLLSVLC
P36	121e03	277	Proteína de unión a aminoácidos de <i>S. uberis</i> (AF086736)	97	MNLKKILLTTLALASTLFLVAC
P37	108f04	351	Lipoproteína putativa de <i>S. pyogenes</i> (AAK34087.1)	78	MNKKFIGLGLASVAILSLAAC
P38	108f04	285	Proteína de unión a fosfato de <i>S. pyogenes</i> (AAK34100.1)	80	MKKFFLVGMLTSLMLTLTAC
P39	45f07	282	Proteína de unión a aminoácidos de <i>B. subtilis</i> (CAB12132.1)	49	MKKLFIYLSLMSLLVGAC
P40	198g02	310	Proteína de unión a metales de <i>S. pyogenes</i> (AAL97215.1)	79	MKKKLSLAIMAFLGLLMLGAC
P41	130c11	311	Proteína de unión a ferricromo de <i>S. pyogenes</i>	70	MKKLLVTLVLIFSTLSLIAC

ES 2 432 407 T3

			(AAL97215.1)		
P42	130c11	307	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAK33400.1)	70	MKIKLNRILFSGLALSILITLTGC
P43	130c11	281	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAL97072.1)	76	MSYKKILGLIGLTLVSSVLVAC
P44	130c11	274	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAL97071.1)	66	MTLKKNLGLSLTLGTLAILAAC
P45	240d11	434	Proteína de unión a azúcar de <i>S. mutans</i> (AAN59568)	52	MIKFETKKGQKFLFGLILCFC
P46	141f06	272	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAK33324.1)	67	MKVKKNIKIAALLPMLTLLAAC
P47	125g06	539	Proteína de unión al sustrato de <i>S. pneumoniae</i> (AAK75869.1)	76	MKKRWIASSVIVLASTIVLGAC
P49	122b05	347	Transportador ABC putativo de <i>S. pyogenes</i> (AAM78733.1)	65	MNKKLTSLALLSAAIPLAAC
P50	161c09	552	Proteína asociada a hialuronato de <i>S. equi</i> (AF100456)	79	MTVAQKSTFKRFGLGAVTLASAALLMAC
P51	198b02	268	Proteína de unión al sustrato de <i>S. pyogenes</i> (AAL97497.1)	52	MKTKKILKAAIGLMTLVSMAC
P52	198g02	270	Peptidil-prolil cistrans isomerasa de <i>S. pyogenes</i> (AAM78928.1)	67	MKKIISFALLTSLFSLSAC
P53	231c11	173	Proteína hipotética de <i>Methanosarcina acetivorans</i> (AAM03977.1)	29	MKKTFTSTLVLLSALMLTAC
P54	53f09	286	Estreptoquinasa de <i>S. uberis</i> (AJ131604)	100	MKKWFLILMLLGFIC
P55	68d07	127	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AE014145)	61	MGNYFKSLCLLLFSFLLVAC
P56	69h12	357	Sin homología	--	MSKIVKIFFLTAFLIMFFLSAC
P57	87h02	390	Proteína de unión a aminoácidos de cadena ramificada de <i>S. pneumoniae</i> (AE007382)	46	MKKKLLVSTIACLSLLSLAAC
P58	69h12	221	Hidrolasas asociadas a la pared celular de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (AE007516)	44	MINKKIIFSLTVICISNC
P112	231c11	320	Lipoproteína putativa de <i>S. agalactiae</i> (NP_689064)	45	MKKGMRFSLILLALMLLTAC
P113	52g05	322	Proteína de unión a ribosa de <i>L. lactis</i> (NP_689064.1)	59	MKCIKKLGLFALFLSMLLLGAC
P117	198g02	291	Proteína de unión a fosfato de <i>S.</i>	72	MKMNKMLTLAVLTLSSFGLAAC

			<i>pneumoniae</i> (AE007497)		
--	--	--	---------------------------------	--	--

Tabla 3. Factores de virulencia/proteínas de la superficie putativas seleccionadas de *S. uberis*

Proteína	n.º contiguo	n.º de aa	Homología en la base de datos (n.º de registro)	% de identidad	Secuencia señal escindible predicha
P2	130c11	183	Proteína de la membrana citoplásmica de <i>S. pyogenes</i> (AAK33386.1)	80	-
P3	130c11	297	Proteína de choque térmico de <i>S. pyogenes</i>	66	MLYQQIAQNKRKRTIFLILAFFLLTAIGA (AE014141)
P4	198g02	452	Detector de histidina quinasa de <i>S. pyogenes</i> (AE014144)	82	-
P5	67h05	362	Proteína de unión a colina de <i>S. pyogenes</i> (AE006476)	52	MKFIKILLSQIVSLFLLL TISLHALETVNA
P6	113f05	416	Nucleasa de entrada al ADN de <i>S. pneumoniae</i> (NP_346391.1)	60	MSNKYPSGKKISAILIALLITGLTALSQG
P7	231c11	300	Transportador ABC de <i>S. pyogenes</i> (AAL96916.1)	47	-
P9	231c11	146	Proteína de competencia de <i>S. pyogenes</i> (AE014138)	40	MKISCCHSKAFTLAESLLCLAVTTFITLLSSSLAGV
P21	80b12	246	Aciltransferasa de <i>S. pyogenes</i> (AAM79682.1)	77	-
P28	130g06	246	Peptidoglicano hidrolasa de <i>S. pyogenes</i> (AE006536)	60	MRFLKGKVFVAVIGLAVMMMTLVIMFQPQAKN
P29	224g12	550	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i>	46	MKKIFQRKWKFRKTSIVLIGILLVALLALG (AAK34725.1)
P59	111h03	174	YpkK de <i>Corynebacterium jeikeium</i>	43	MKKKFLKIMTCIIAICSIFPYLSSMASTVYA (AF486522_8)
P60	113b07	248	D,D-carboxipeptidasa de <i>S. pyogenes</i> (AAM80142.1)	70	MMKNKLLSFLQLLVILLFIFCLFYIKA
P61	130c11	195	N-acetiluramidasa de <i>S. pyogenes</i> (AAL98352.1)	45	MRNRLTFSYFIGIFL TFLLLITPLIVNSQA
P62	130c11	421	Proteína DfID de <i>S. pyogenes</i>	67	MLRKLLTVGPVFLALLLVLTIFS (AAM79598.1)
P63	114a06	878	Proteína de exclusión de la superficie de <i>S. pyogenes</i> (AAK33344.1)	36	MEFENTKSNQIKTTALTSTLALLGTGVGMGHTVNA

				<i>pyogenes</i> (AAK33344.1)				
P64	115e06	428		Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAK33154.1)	57		MKLLACMLMVFFLSPISVISTEKSSIS	
P65	115e06	400		Serina proteasa de <i>S. pyogenes</i> (AAK34840.1)	71		MPVSKFKHFFKYIMIVGLGFIGGALAFFVMNLLPHPSSST	
P66	115e06	656		Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAM80444.1)	71		MKKFRFETHLVMMGLIFGLLALCVRIMQSKMLIILA	
P67	115e06	302		Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAK34806.1)	22		MKTWKKTILITSLCLLISGAALAGFGFIRGGWS	
P68	115e06	216		Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAK34820.1)	41		MIRKENFKKRYISFGILGFAVALLALVFAF	
P69	121e03	185		Peptidasa señal I de <i>S. pyogenes</i> (AAM79518.1)	54		MVKRDFIRNIILALLAIVIFILLRIFVFS	
P70	129h04	318		Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAM79277.1)	73		MKSFFNSRIWLGLVSVFFAIVLFLTA	
P71	130c11	535		Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAK34403.1)	77		-	
P72	130c11	739		Proteína de unión a penicilina 1A de <i>S. pyogenes</i> (AAL98205.1)	80		-	
P73	130g06	307		Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAL97680.1)	68		MRRQKKQKKIIPFLIILLFSTLLLTGFLFKKELRA	
P74	130g06	317		Proteína hipotética de <i>S. pneumoniae</i> (AAK99735.1)	61		MFKKKMLTGLIFSGMTVSTASA	
P75	133f06	241		Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAM80084.1)	29		MKPSNTEKLFLLISLLTLILAGSFYLFARNHIGNA	
P76	141f06	212		Sin resultados significativos	--		MKKIQKIFLALSTMILLSNIFSTIYYA	
P77	141f06	304		UDP-glucosa pirofosforilasa de <i>S. uberis</i> (AJ400707)	100		MTKVRKAIIPAAAGLGTRFLPATKALA	
P78	141g05	386		Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAK34063.1)	48		-	
P79	149b09	304		Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAL97494.1)	63		-	
P80	153a02	1058		Carbamoil-fosfato sintasa de <i>S. pneumoniae</i> (Q97QE4)	75		-	

P81	153f08	518	Proteína de adhesión de <i>S. pyogenes</i> (AAL97448.1)	69	MKKKTLVMMGLAGLVAGGQLYQAKAVLA
P82	198g02	441	Histidina quinasa de <i>S. pneumoniae</i> (AAL00696)	57	-
P83	198g02	288	Peb1 de <i>S. thermophilus</i> (AF327739)	61	MKKFKPRKKSIDIKRRIAMNQFKKWTFECLMTLLTLIFMPKASA
P84	198g02	126	Sin resultados significativos	--	MLLRKARHSLKRRHMMLEVLIVSTFFLFIIFISLLIGIKRRS
P85	224g12	774	Proteína de unión a penicilina 2A de <i>S. pyogenes</i> (AAL98575.1)	77	-
P86	224g12	498	Dipeptidasa de <i>S. pyogenes</i> (AAM80370.1)	80	MNTKFTLATVTVM TALACYSSA
P87	224g12	386	Sin resultados significativos	--	MFKTKKEIFSIRKKTALGVGSVLLGVILTTQVASA
P88	231c11	119	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AE009962)	37	-
P89	231c11	772	Proteína de unión a penicilina 1B de <i>S. pyogenes</i> (AAK33215.1)	77	-
P90	238b05	331	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAL97637.1)	63	-
P91	238b05	550	Proteína similar a la proteína de unión a fibronectina de <i>S. pyogenes</i> (AAK33911.1)	A80	-
P92	240d11	200	Sin resultados significativos	--	MANYKKITSLSLTLLSLATFSATQYSKYVA
P93	31e02	758	N-acetilmuramoi-L-alanina amidasa de <i>Bacillus halodurans</i> (BAB07384.1)	32	MKSKKSYVLLAPFVLASFQSKMVSA
P94	38f04	143	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAK34637.1)	27	MKKRKNKWRFFMIKMRKSQLSVSLALFALLTFAASPIYA
P95	40c10	747	Proteína de unión a penicilina 2X de <i>S. pyogenes</i> (AAK34426.1)	74	-
P96	45f07	200	Cps9F de <i>S. suis</i> (AAF 18949)	77	MYQVWKRLAILISGLAIIILSPVLLAVAIA
P97	45f07	424	CpsA de <i>S. agalactiae</i> (AF349539)	61	MASLLILLKAKALLTMIGLILANIGLAVTLFA

P98	52g05	347	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAK34330.1)	68	MKVIKTYKWWVLSILSMVLILFALFFPLPYIEMPGGA
P99	52g05	506	Amidasa de <i>B. anthracis</i> (NP_655785)	40	-
P100	53f09	169	Proteína desconocida de <i>L. lactis</i> (AAK04688.1)	50	-
P101	67h05	425	Glicoproteína inmunodominante de <i>S. mutans</i> (AAK94501.1)	41	MKKRILSAVLVSGVTGLTATTVNA
P102	67h05	137	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAL96870.1)	57	-
P103	68d07	280	Endolisina de <i>S. pyogenes</i> (AAL97346.1)	73	MRRRIKPIVWLVFLLFALLIIGKTHS
P104	71g04	429	Peptidoglucano GlnAc desacetilasa putativa de <i>S. pyogenes</i> (AAM79651.1)	47	MKKFYVIVGTLSSIFILSVSLFVYS
P105	71g04	727	Internalina A de <i>S. pyogenes</i> (AAL97968.1)	52	MKKKTYLFFVAGITVTCGTAL
P106	77f12	393	D,D-carboxipeptidasa de <i>S. pyogenes</i> (AAM78820.1)	62	MIKILLFLSIFALTISTIPVIA
P107	77f12	400	D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa de <i>S. pyogenes</i> (AAM78821.1)	38	MKKTILSTIIVGLFLWTLSTLVLA
P108	77f12	415	D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa de <i>S. pyogenes</i> (AAM78821.1)	60	MKKMLLLCFIFLILFPINFVNA
P109	80b12	202	Superóxido dismutasa [Mn] de <i>S. pyogenes</i> (AAM79678.1)	89	-
P110	80b12	350	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAL98000.1)	71	MRLQMMTFLRKINSTKVLIFLCVSLFGLVTVSA
P111	198g02	128	Proteína hipotética de <i>S. pneumoniae</i> (AAL00353.1)	36	MKRKISLFLFLASIFATTSVFA
P116	84d07	427	RopA de <i>S. pyogenes</i> (AAM80241.1)	82	-
P118	108f04	115	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAL97738.1)	34	MKAKRDGLIIGLVTVAGTSLYLSLSHS
P119	113f05	301	ARNt sopenetilpirofosfato transferasa de <i>S. pyogenes</i> (AAL97618.1)	68	MTKKEKIIVGPTAVGKTALGIQVAQA

P120	115e06	216	Hidroxiubitiril-CoA deshidrogenasa de <i>Bacillus halodurans</i> (BAB05714.1)	52	MTNIKTIGVVGAGAMGGGIANLFA	
P121	115e06	287	3-hidroxiubitiril-CoA deshidrogenasa de <i>B. halodurans</i> (BAB05714.1)	43	MTNIKTIGVVGAGAMGGGIANLFA	
P122	130c11	589	Aminodesoxicoisomato liasa de <i>S. pyogenes</i> (AAL97146.1)	52	-	
P123	130g06	331	Tiorredoxín reductasa de <i>S. pyogenes</i> (AAM79182.1)	80	-	
P124	130g06	203	Peptidoglicano hidrolasa de <i>S. pyogenes</i> (AAK33784.1)	68	-	
P125	130g06	246	Peptidoglicano hidrolasa de <i>S. pyogenes</i> (AAK33785.1)	61	MRFLKGGKVLAVIGLAVMMITLVIMFQPQAKNKSVAE	
P126	130g06	357	Transportador ABC de espermidina/putrescina de <i>S. pyogenes</i> (AAK33983.1)	80	MRRLYSFIAGVLGILILASSTFILQKKTGSA	
P127	130g06	200	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAL97729.1)	74	-	
P128	133f06	609	Alfa-glicerofosfato oxidasa de <i>S. pyogenes</i> (AAK34439.1)	80	-	
P129	198g02	337	Autolisina de <i>Listeria monocytogenes</i> (AF035424)	38	-	
P130	19e05	289	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAM79683.1)	78	-	
P131	224g12	545	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAK34725.1)	46	MKKIFQRKWFKRTSIVLGILLVALIALGS	
P132	240d11	308	Proteína desconocida de <i>L. lactis</i> (AAK06265.1)	29	MKSNLPLALLAKKRRRRTKFLMTIVFSLLATLLLFALCFKLLS	
P133	240d11	322	Transportador ABC de ribosa de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (AAK79421.1)	39	-	

P134	24d11	485	Proteína hipotética de <i>Staphylococcus aureus</i> (BAB95577.1)	29	MLSRYRVVKRRRLGMVKKQVAIIIGMGVSGLAVLLALS
P135	241b08	195	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAK34290.1)	58	MRKKRTINWWKWSFLILLALNLAFCVIA
P135	241b08	195	Proteína hipotética de <i>S. pyogenes</i> (AAK34290.1)	58	MRKKRTINWWKWSFLILLALNLAFCVIA
P136	45f07	347	Glicosil transferasa de <i>Chlorobium tepidum</i> (AAM71444.1)	31'	-
P137	52g02	393	Proteína de división celular de <i>Streptococcus pyogenes</i> (AAK34317.1)	43	-
P138	68d07	280	Endolisina de <i>S. pyogenes</i> (AAL97346.)	73	MRRRIKPIVVLVFFLLFALLLIIGKTHSD
P139	7f09	197	Peptidasa señal I de <i>S. pyogenes</i> (AAK34563.1)	69	MKHFFKEWGLFTLVILIFGISRLFFWQPVKVDG

Tabla 5

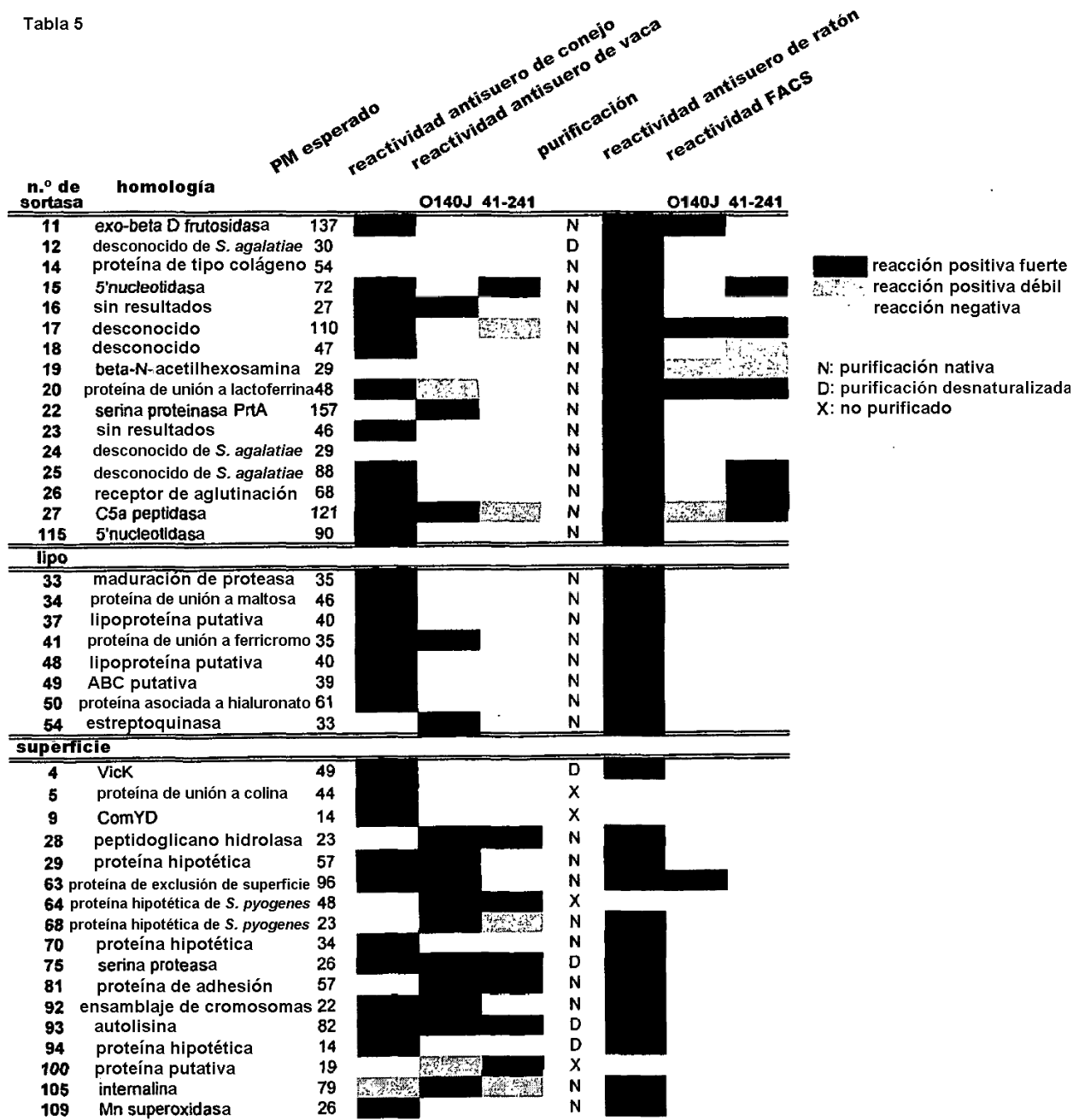


Tabla 6: Proteínas inmunogénicas de *S. uberis* identificadas en geles bidimensionales y caracterizadas mediante espectrometría de masas.

n.º de mancha	nombre de la proteína	masa (kDa)	pl
1	proteína de exclusión de la superficie	94,8	5,8
2	factor de activación (ropA)	47,3	4,3
3	nucleósido difosfato quinasa	16,2	5,7

Tabla 7: Resumen de los resultados de infecciones intramamarias experimentales con las cepas O140J y 41-241 de *S. uberis*

n.º de vaca	cepa	el experimento termina después de	dosis de inoculación (cfu)	SCC máx.	SCC antes de la inoculación	temp. máx.	no se infectó con ningún cuarto	puntuación máx. de BO ¹⁾	puntuación máx. de coágulos en la leche ²⁾	puntuación máx. de consistencia de la ubre ³⁾
6716	O140J	50 horas	5×10^2	$2,7 \times 10^7$	$2,7 \times 10^4$	40,2	2	3	0	0
6717	O140J	80 horas	5×10^2	$9,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	38,6	1	1	0	0
6720	41-241	45 horas	5×10^3	$2,8 \times 10^7$	$4,8 \times 10^4$	40,8	2	3	2	0
6721	41-241	67 horas	5×10^2	$7,2 \times 10^6$	$0,9 \times 10^5$	38,7	2	3	1	0
6718	O140J	16 días	5×10^2	$2,9 \times 10^7$	$0,9 \times 10^5$	40,9	2	3	4	3
6719	O140J	16 días	5×10^2	$2,4 \times 10^7$	$0,9 \times 10^5$	40,0	1	3	3	3
6722	41-241	16 días	5×10^3	$2,7 \times 10^7$	$4,4 \times 10^4$	41,0	2	3	3	2
6723	41-241	16 días	5×10^2	$2,1 \times 10^7$	$3,6 \times 10^4$	39,5	2	3	2	1

¹⁾ Puntuación BO: BO negativo: 0; $<10^3$ cfu/ml de leche: 1; $>10^3 < 10^5$ cfu/ml de leche: 2; $>10^5$ cfu/ml de leche: 3.

²⁾ leche normal: 0; pocos coágulos: 1; numerosos coágulos: 2; leche con pus: 3; leche con sangre: 4.

³⁾ puntuación de consistencia: consistencia normal: 0; cambios suaves: 1; cambios moderados: 2; cambios graves: 3.

REIVINDICACIONES

1.- Un método para identificar una proteína de *Streptococcus uberis* que es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas y/o serotipos de de *Streptococcus uberis*, comprendiendo dicho método:

a) identificar al menos parte de:

5 - una proteína segregada y/o

- una proteína asociada a la superficie y/o

- una proteína con al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:156, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:174, SEQ ID NO:176, SEQ ID NO:178, SEQ ID NO:180, SEQ ID NO:182, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:188 y SEQ ID NO:190;

15 b) seleccionar al menos una proteína identificada en la etapa a) que se conserva a través de al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*; y

20 c) ensayar si al menos una proteína seleccionada en la etapa b) o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de esta, es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una primera cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*, y un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una segunda cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*.

2.- Un método según la reivindicación 1, en el que dicha proteína segregada y/o proteína asociada a la superficie se identifica identificando, en al menos parte de la secuencia genómica de *Streptococcus uberis*, un gen que comprende un motivo de una proteína segregada y/o asociada a la superficie.

25 3.- Un método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha proteína con al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:156, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:174, SEQ ID NO:176, SEQ ID NO:178, SEQ ID NO:180, SEQ ID NO:182, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:188 y SEQ ID NO:190 se identifica identificando, en al menos parte de la secuencia genómica de *Streptococcus uberis*, un gen con al menos 80% de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:135, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:147, SEQ ID NO:149, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:165, SEQ ID NO:167, SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:173, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:183, SEQ ID NO:185, SEQ ID NO:187 y SEQ ID NO:189.

4.- Un método según la reivindicación 1 o 2 o 3, en el que dicha proteína con al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:156, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:174, SEQ ID NO:176, SEQ ID NO:178, SEQ ID NO:180, SEQ ID NO:182, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:188 y SEQ ID NO:190 se identifica identificando, en al menos parte de la secuencia genómica de *Streptococcus uberis*, un gen que se hibrida con la secuencia de nucleótidos de longitud completa de cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:111, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:135, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:147, SEQ ID NO:149, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:165, SEQ ID NO:167, SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:173, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:183, SEQ ID NO:185, SEQ ID NO:187 y SEQ ID NO:189 a 65 °C en un

tampón que tiene fosfato de sodio 0,5 M, EDTA 1 mM, y dodecilsulfato de sodio al 7% a un pH de 7,2,

en el que la molécula de ácido nucleico permanece hibridada después de:

- lavar dos veces con un tampón que contiene fosfato de sodio 40 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM y dodecilsulfato de sodio al 5% durante 30 minutos a 65 °C, y;

5 - lavar dos veces con un tampón que contiene fosfato de sodio 40 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM y dodecilsulfato de sodio al 1% durante 30 minutos a 65 °C.

5.- Un método según la reivindicación 2, 3 o 4, que comprende además seleccionar un gen que se conserva a través de al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*.

10 6.- Un método según la reivindicación 5, que comprende además obtener una proteína codificada por dicho gen, o una parte inmunogénica, un derivado y/o un análogo de dicha proteína.

7.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en el que dicho gen se expresa en un sistema de expresión procariota.

8.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende:

- obtener proteínas de *Streptococcus uberis* aisladas y/o recombinantes;

15 - incubar dichas proteínas con un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una primera cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*, y con un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una segunda cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*, y

20 - ensayar si una proteína es capaz de unirse a un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una primera cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*, y un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado por una segunda cepa y/o serotipo de *Streptococcus uberis*.

9.- Un método según la reivindicación 8, que comprende además expresar dicha proteína utilizando una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína.

10.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho anticuerpo y/o célula inmunológica se deriva de un suero convaleciente.

25 11.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que dicha proteína de *Streptococcus uberis* es capaz de suscitar anticuerpos inductores de la opsonofagocitosis.

12.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que se identifican al menos dos proteínas de *Streptococcus uberis* capaces de provocar una respuesta inmunológica contra al menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*.

Fig. 1A

Análisis FACS de la cepa 41-241 de *S. uberis* intacta

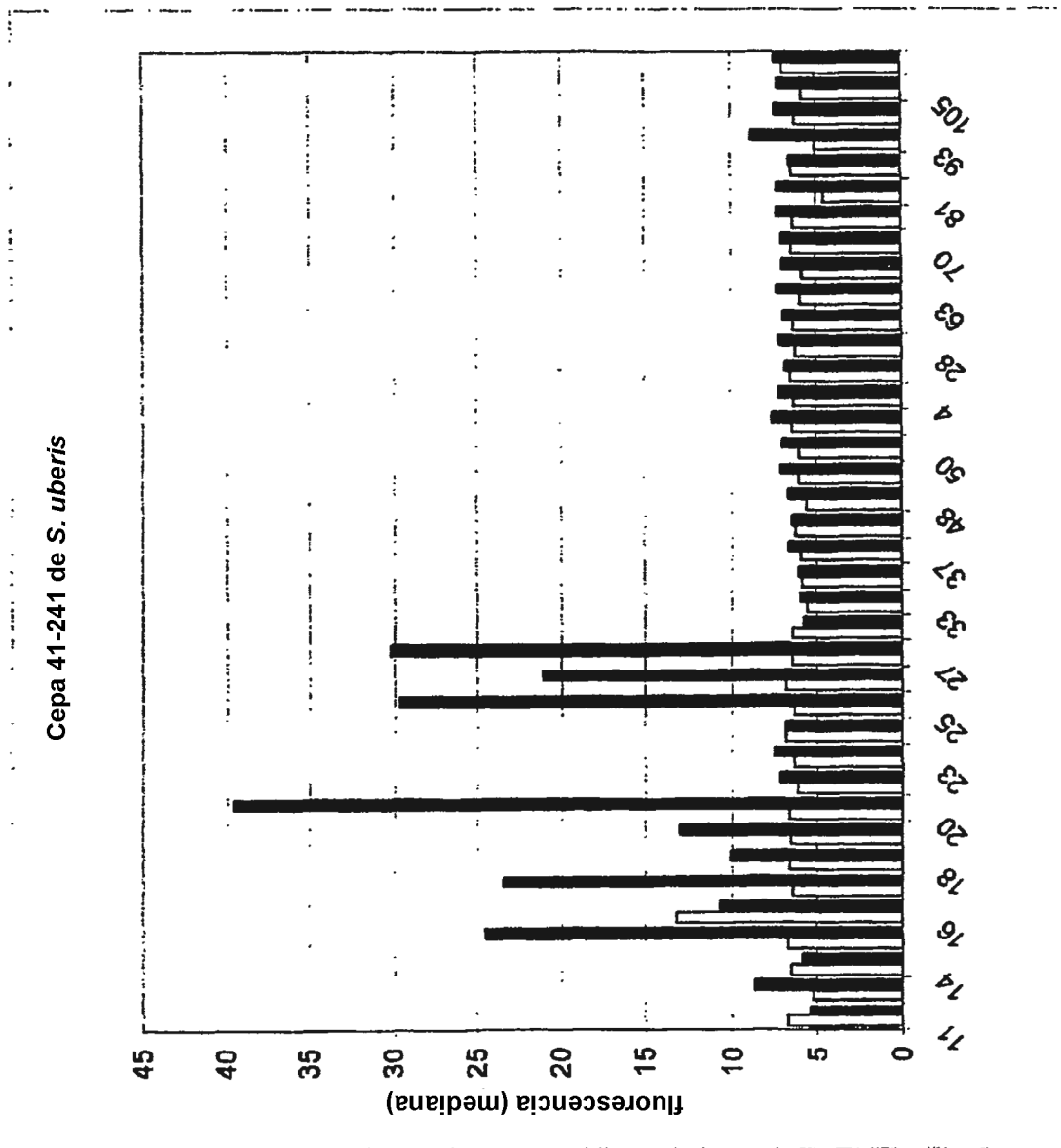
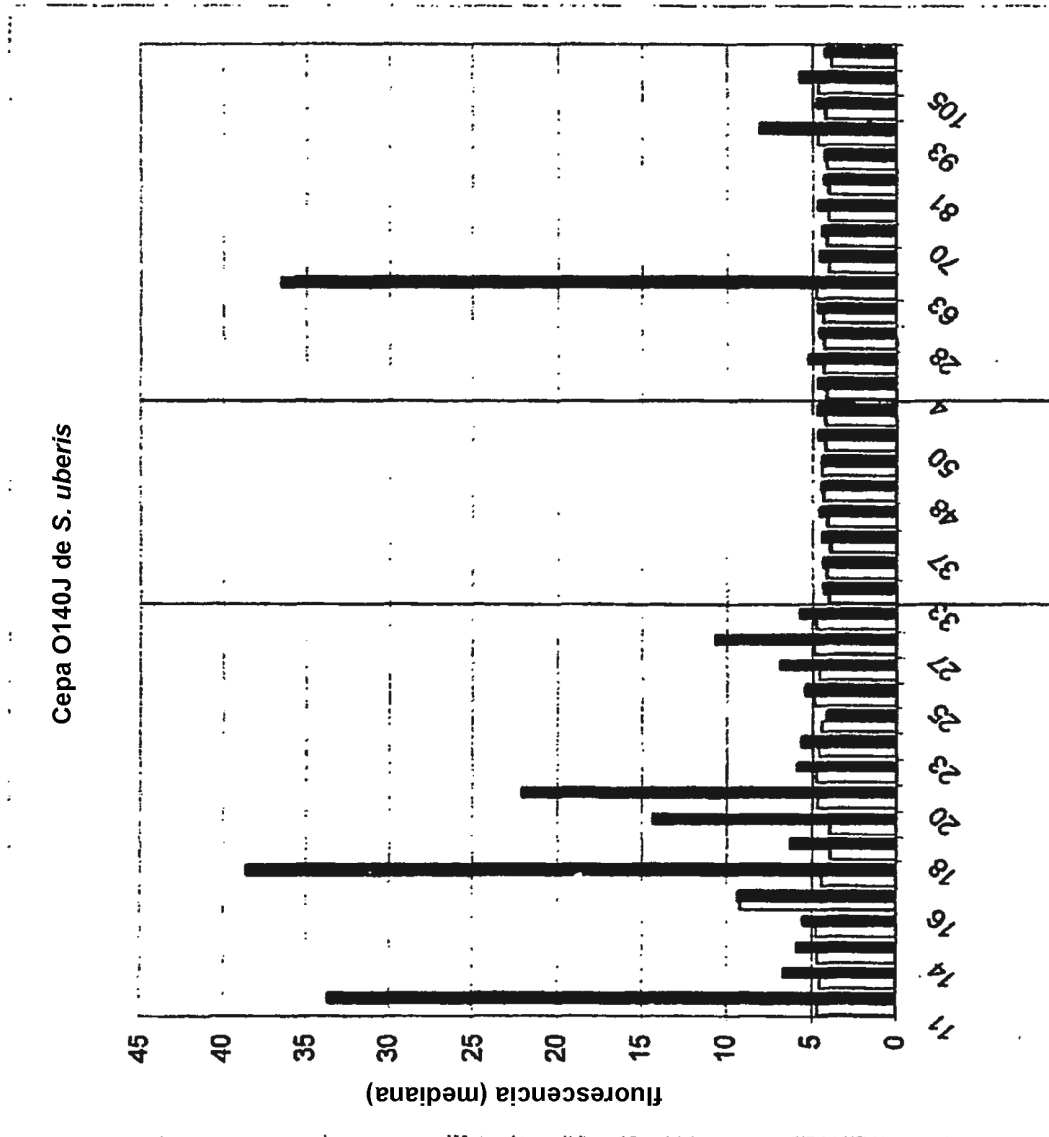
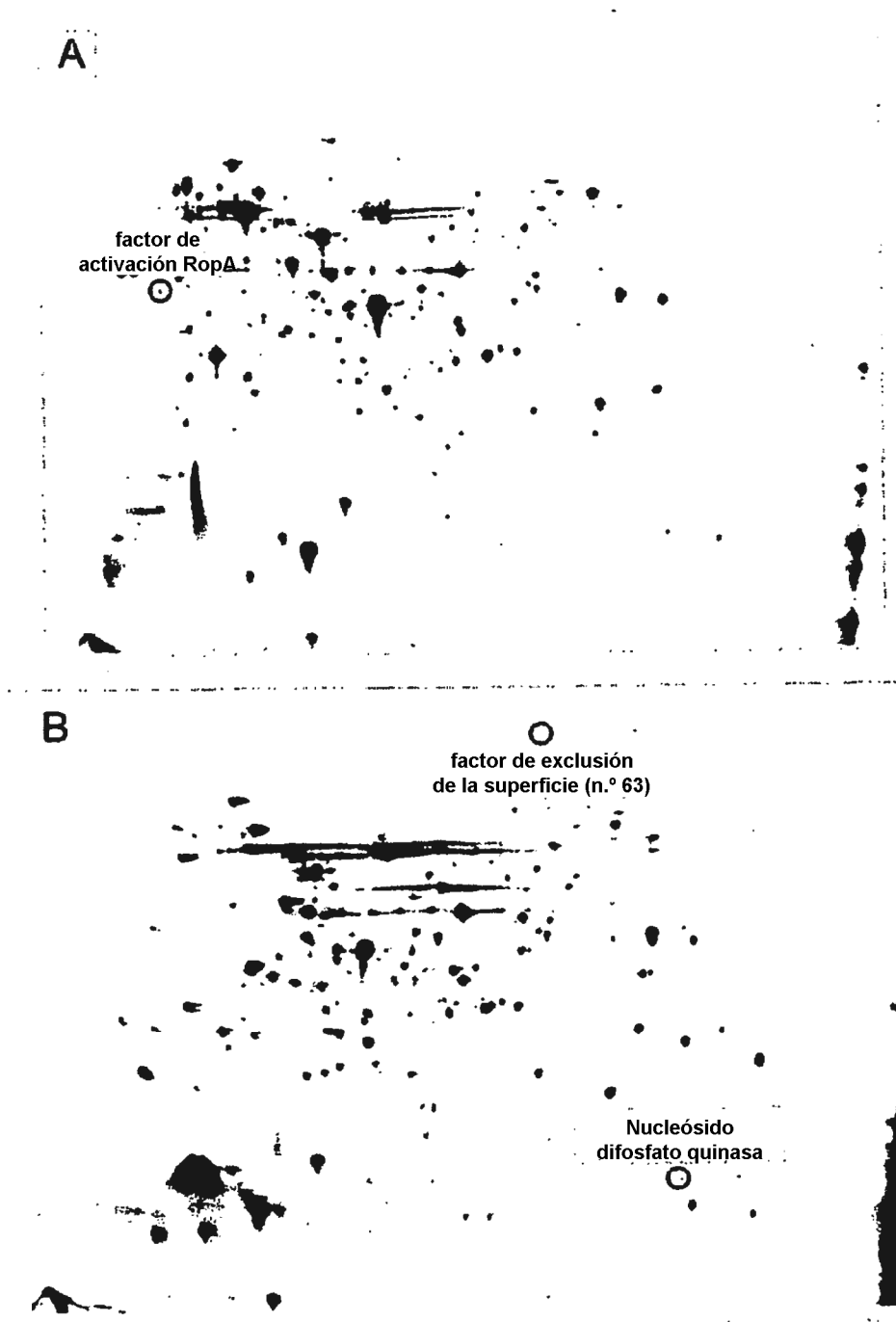


Fig. 1B

Análisis FACS de la cepa O140J de *S. uberis* intacta





Patrones del proteoma bidimensionales teñidos con azul brillante de Coomassie

Fig. 2

Fig. 3A

Infeción de vacas con la cepa O140J o la cepa 41-241 de *S. uberis*

vaca 6716/cepa O140J/ 5 x 10e2

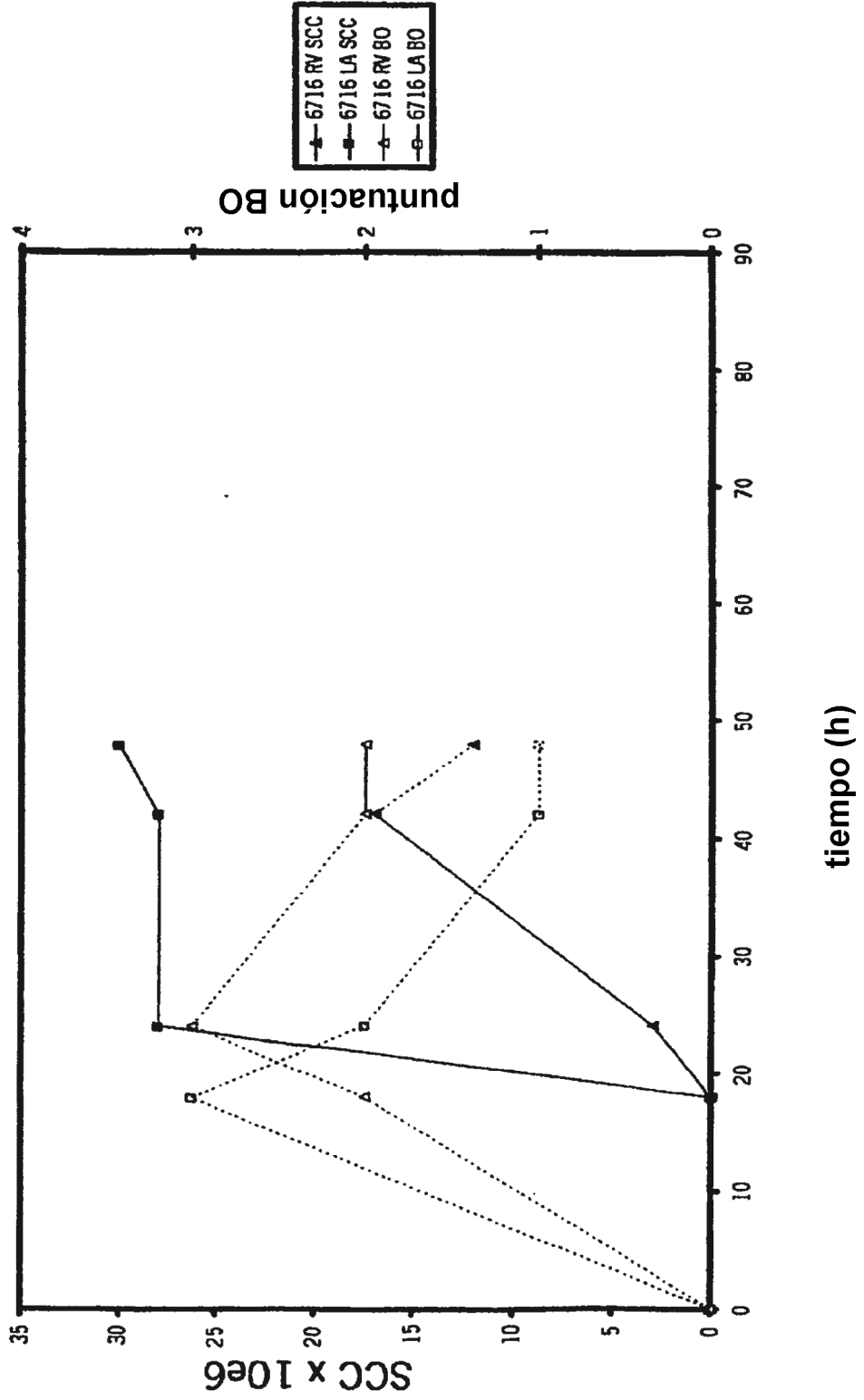


Fig. 3A, Condt.

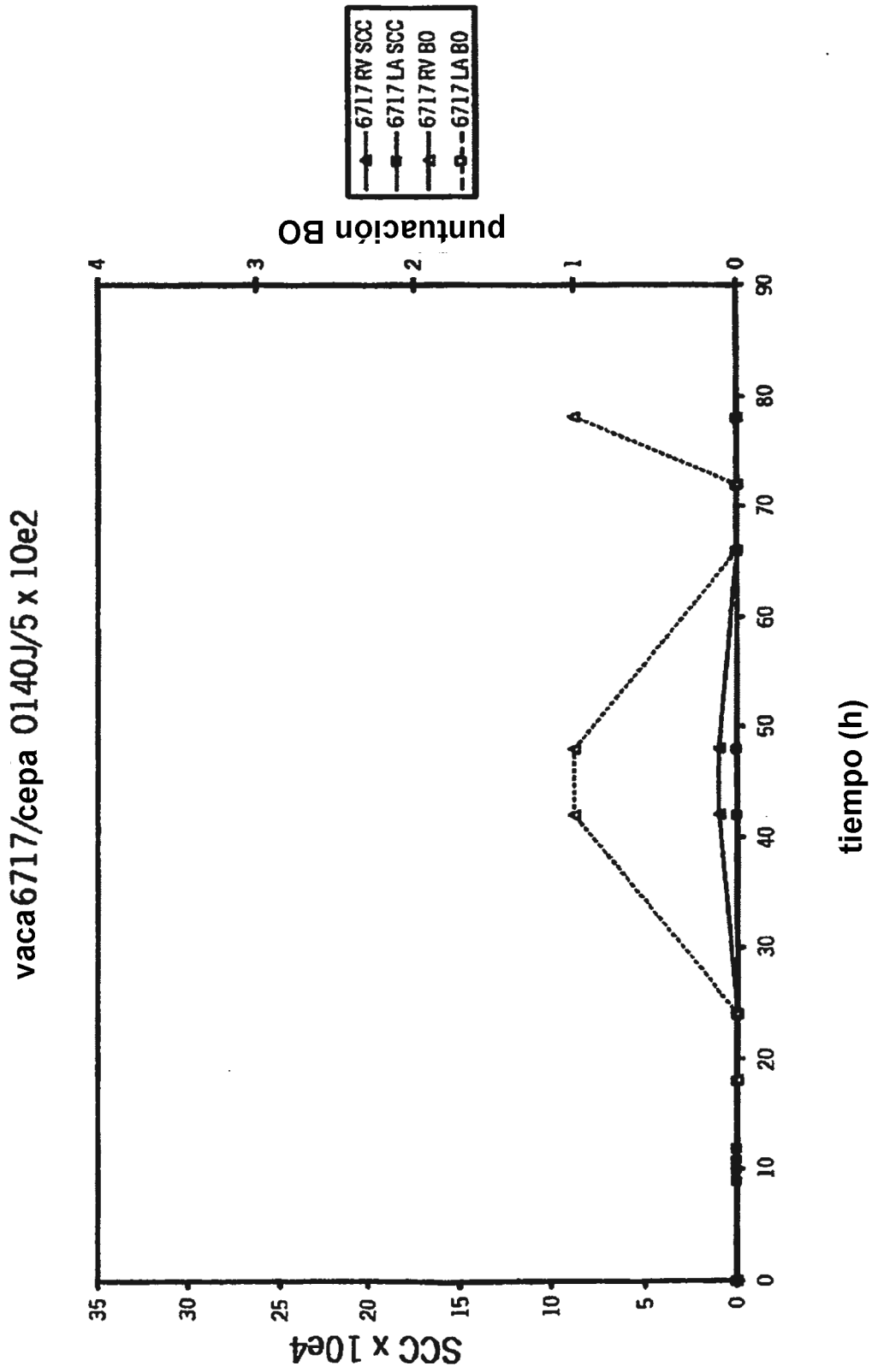


Fig. 3A, Condt.

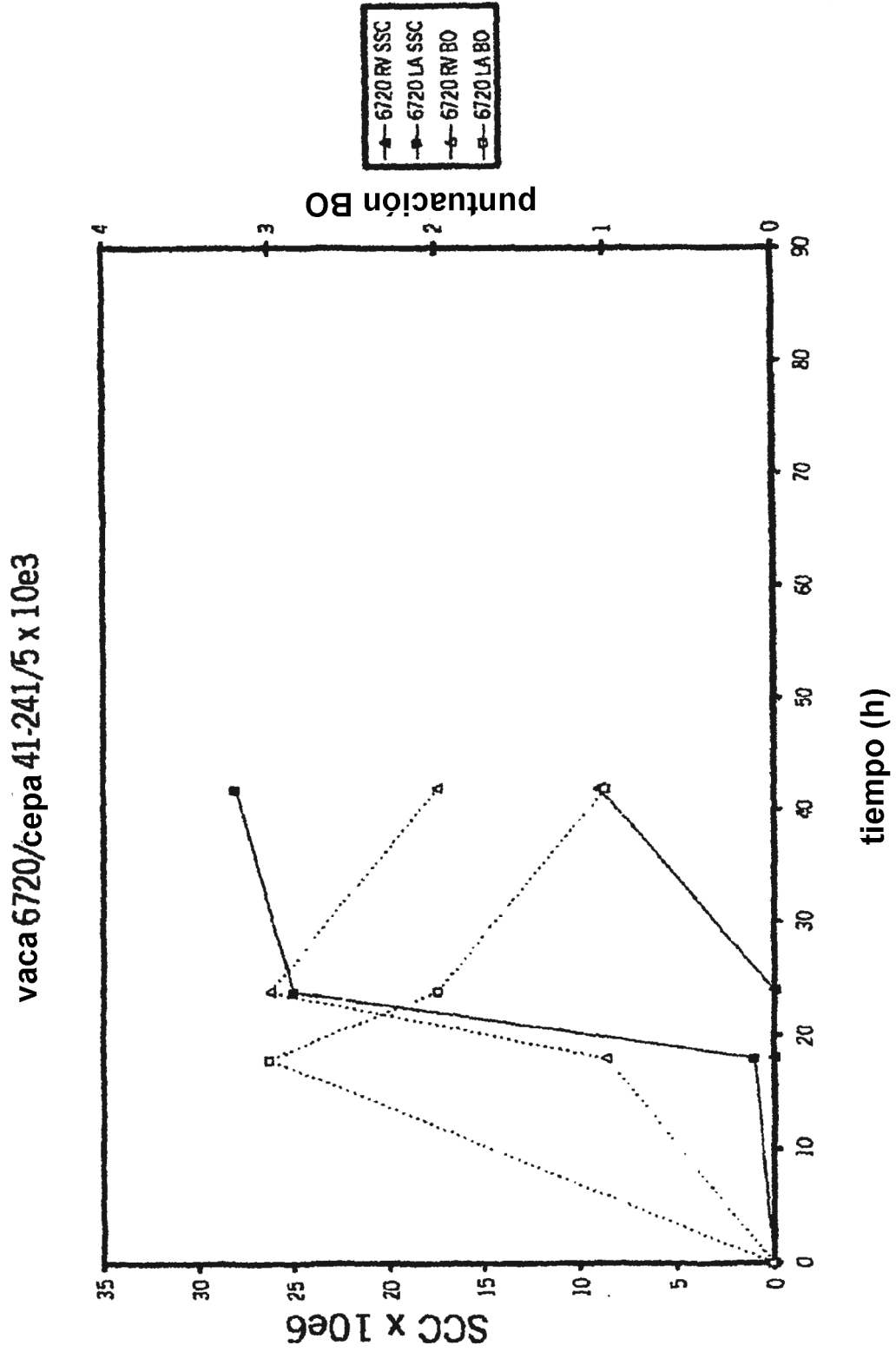
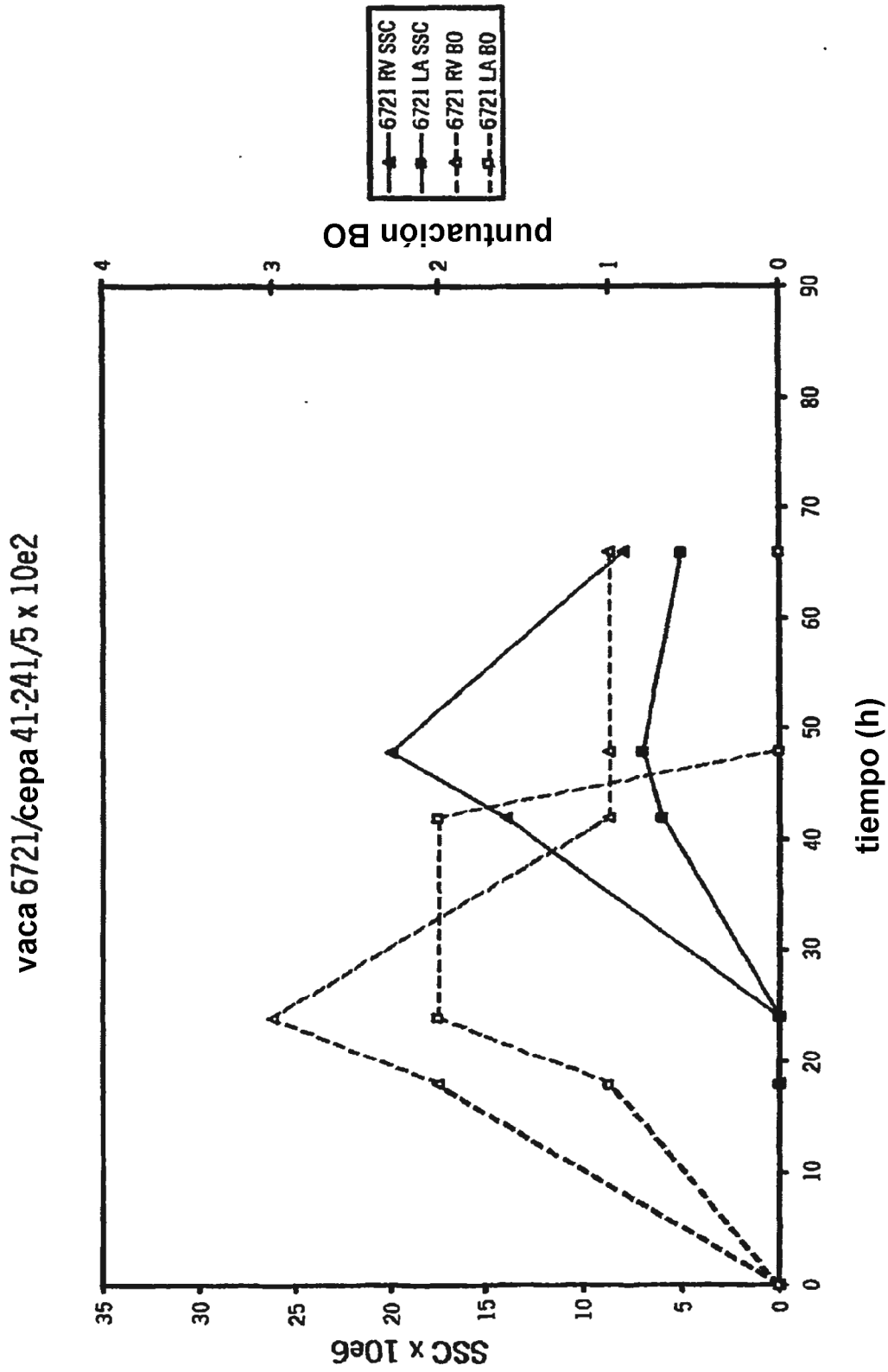


Fig. 3A, Condt.



Infección de vacas con la cepa O140J de *S. uberis*

vaca 6718/cepa O140J/5 x 10e2

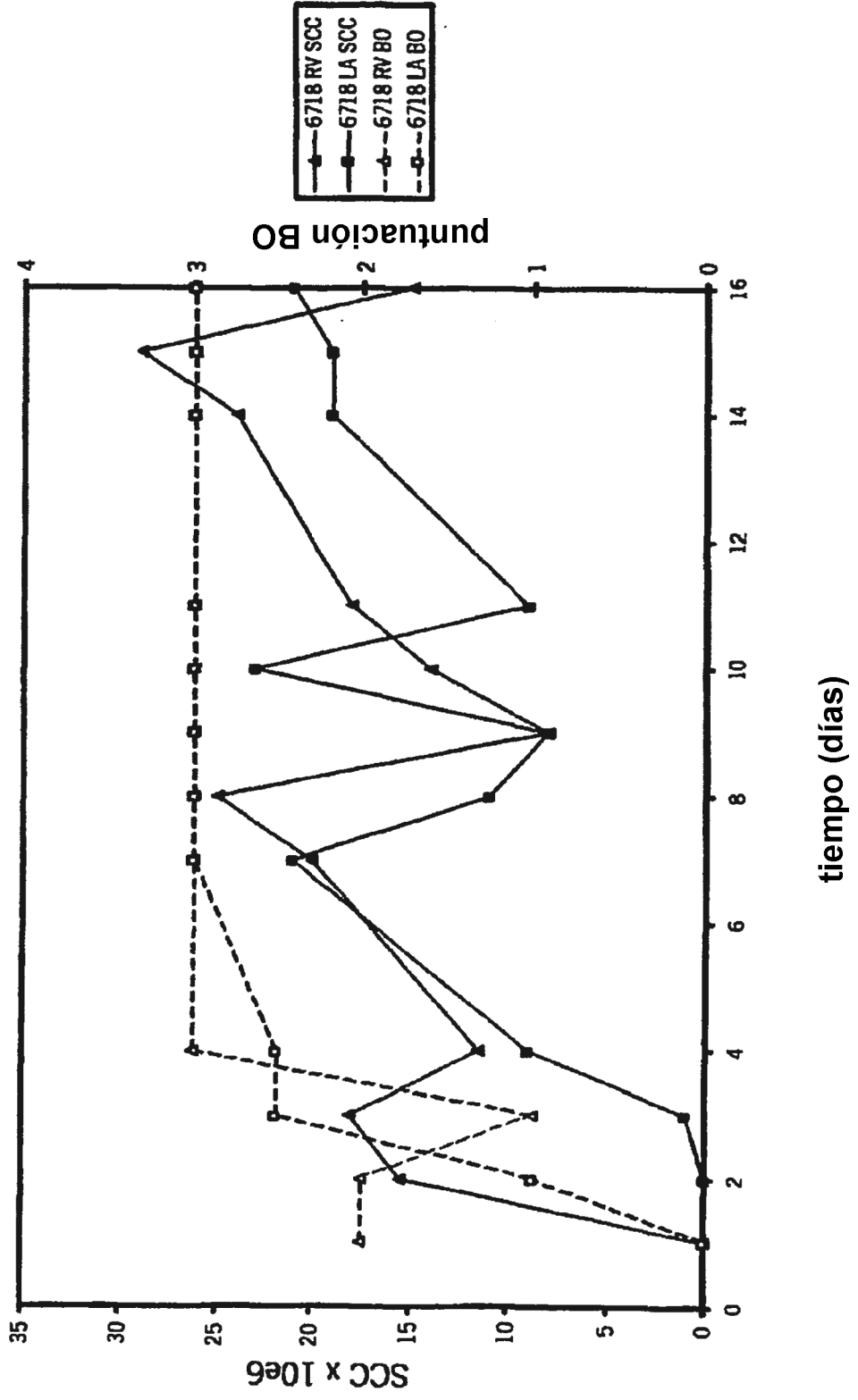


Fig. 3B

Fig. 3B, Condt.

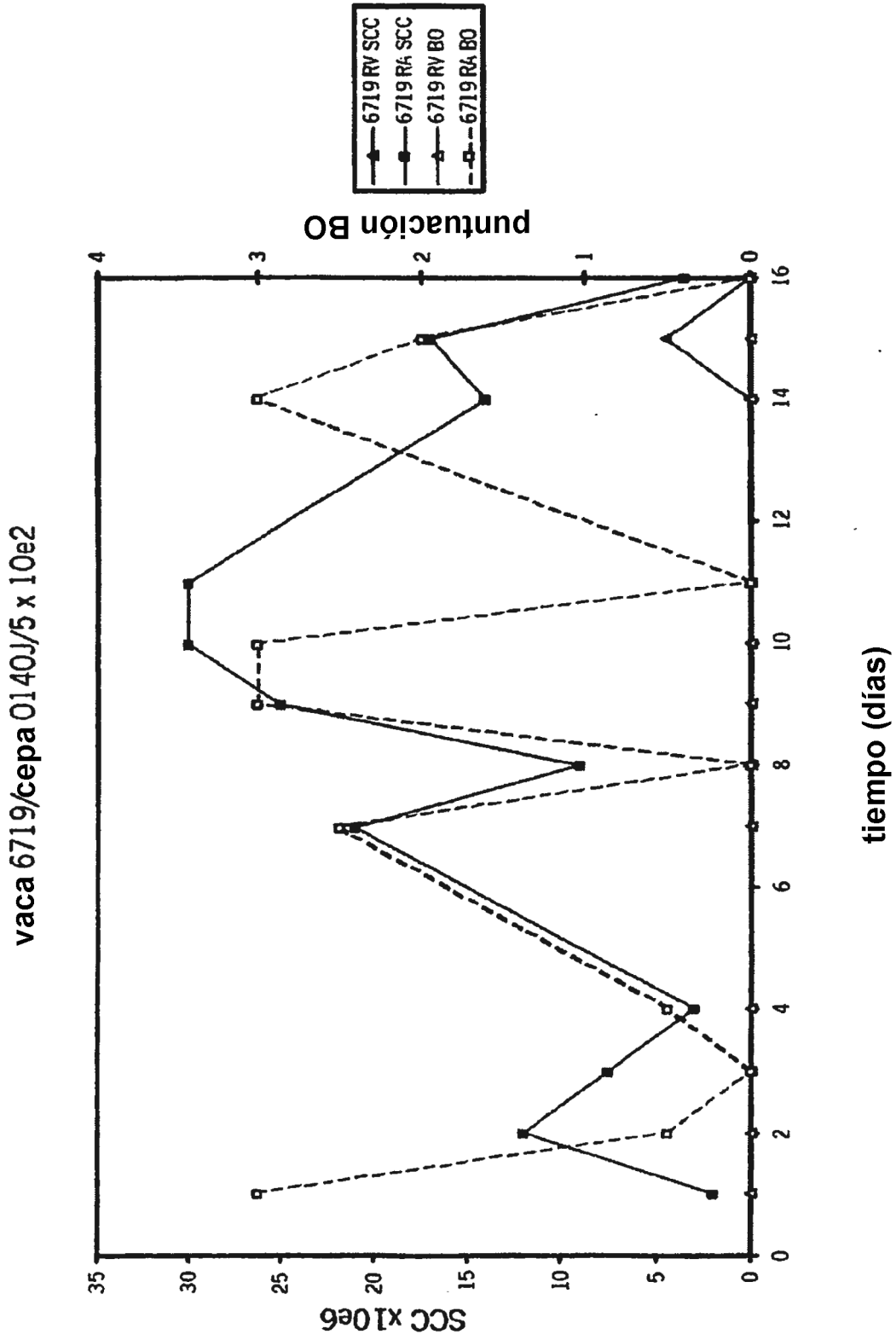


Fig. 3B, Condt.

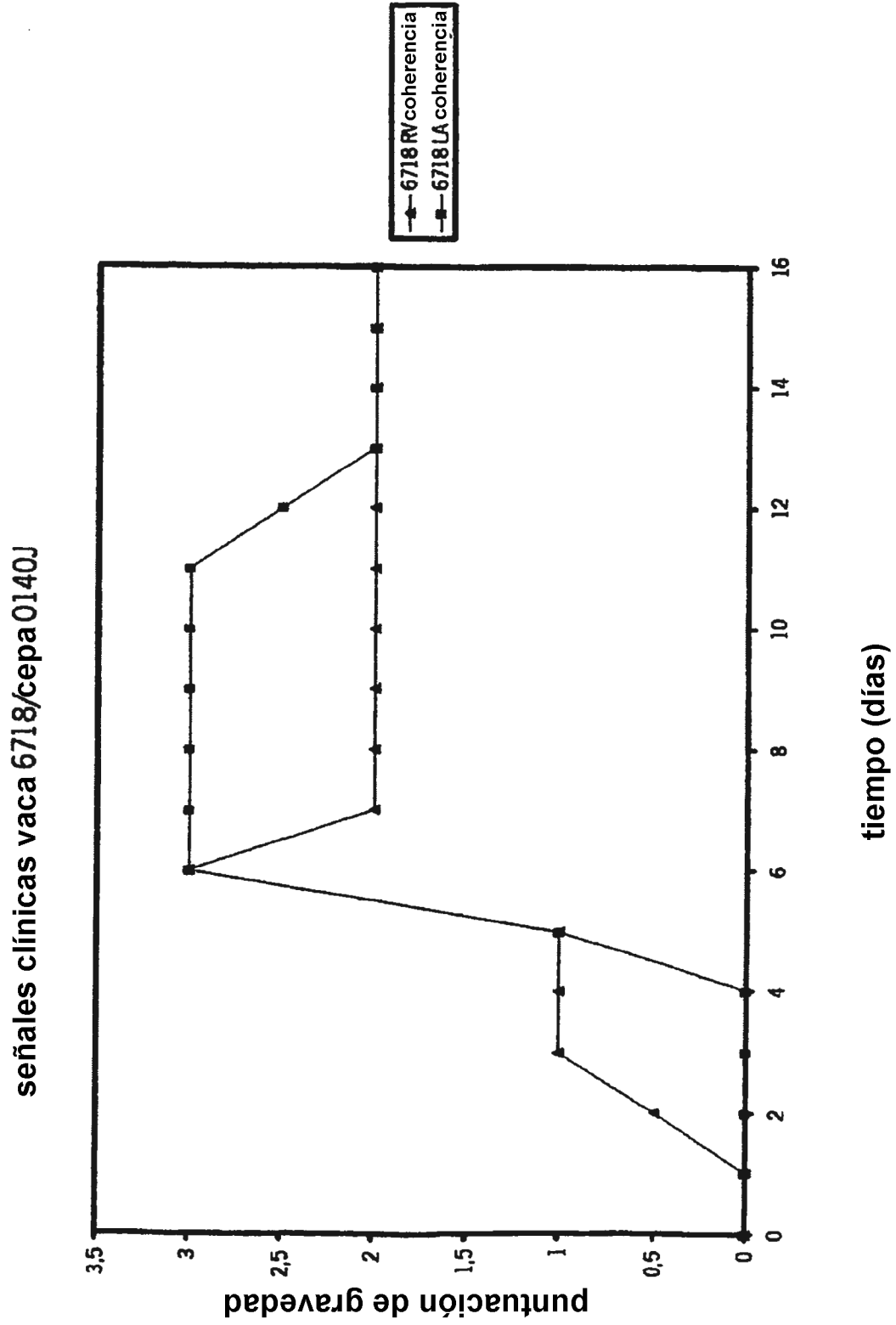


Fig. 3B, Condt.

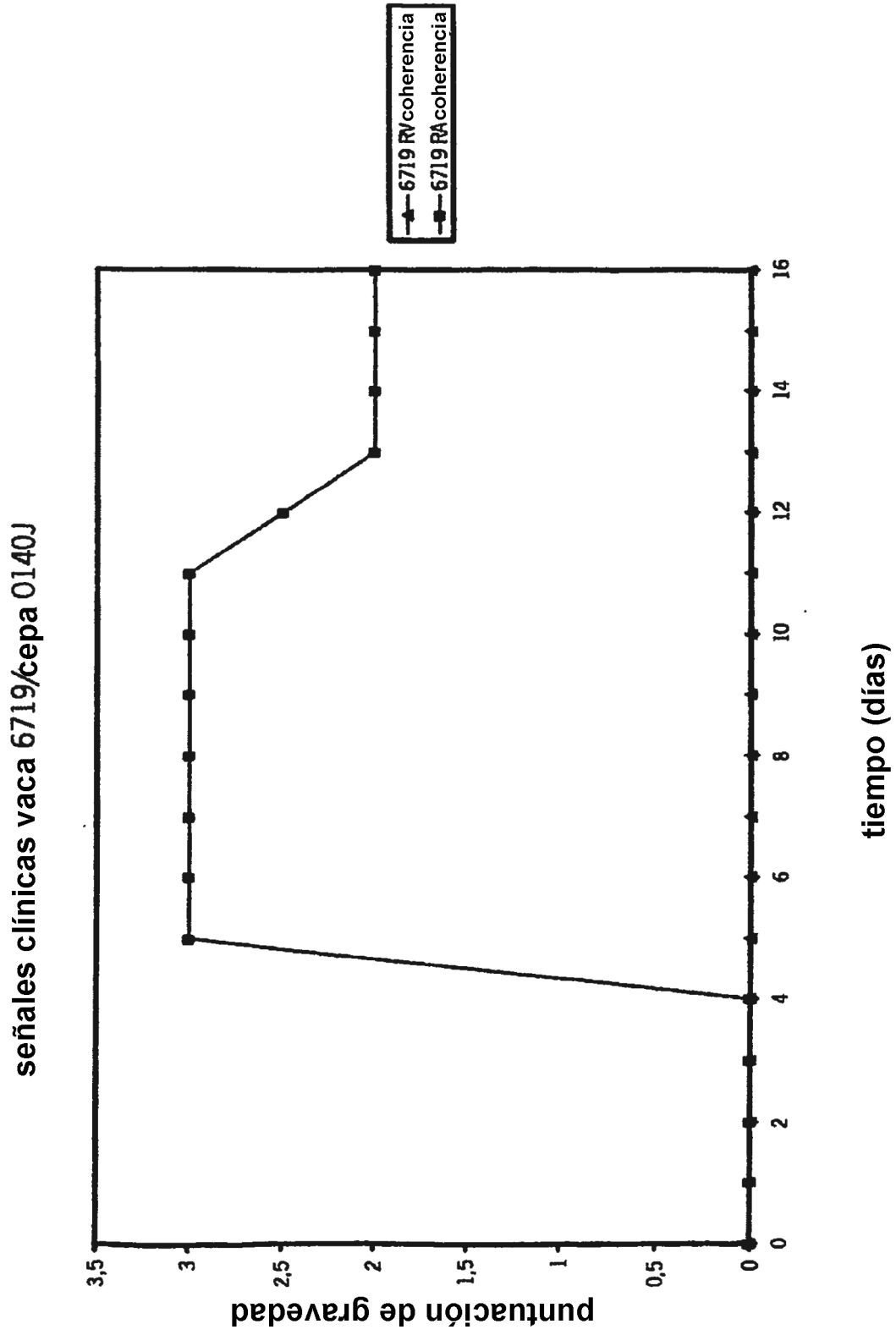


Fig. 3C

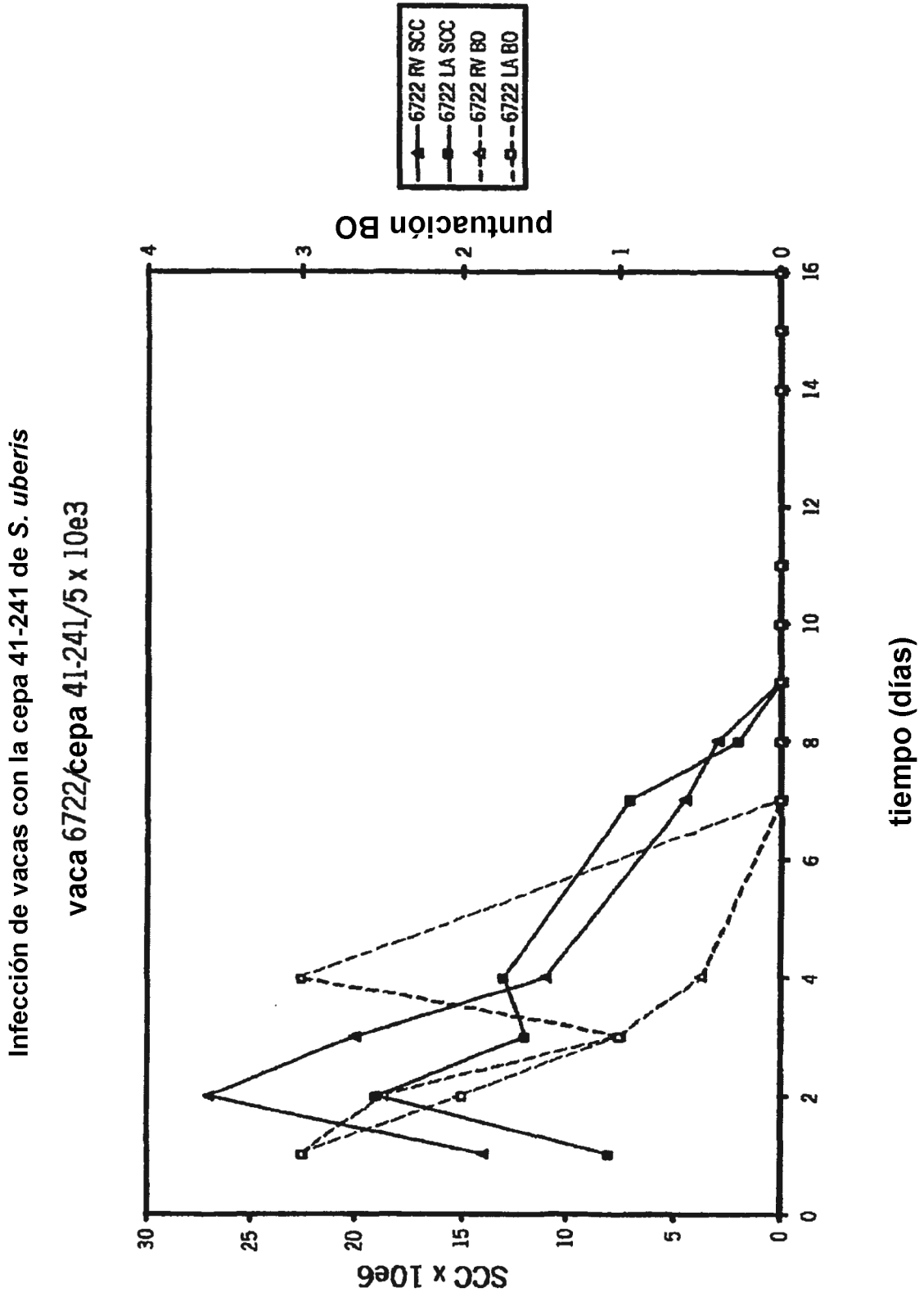


Fig. 3C, Condt.

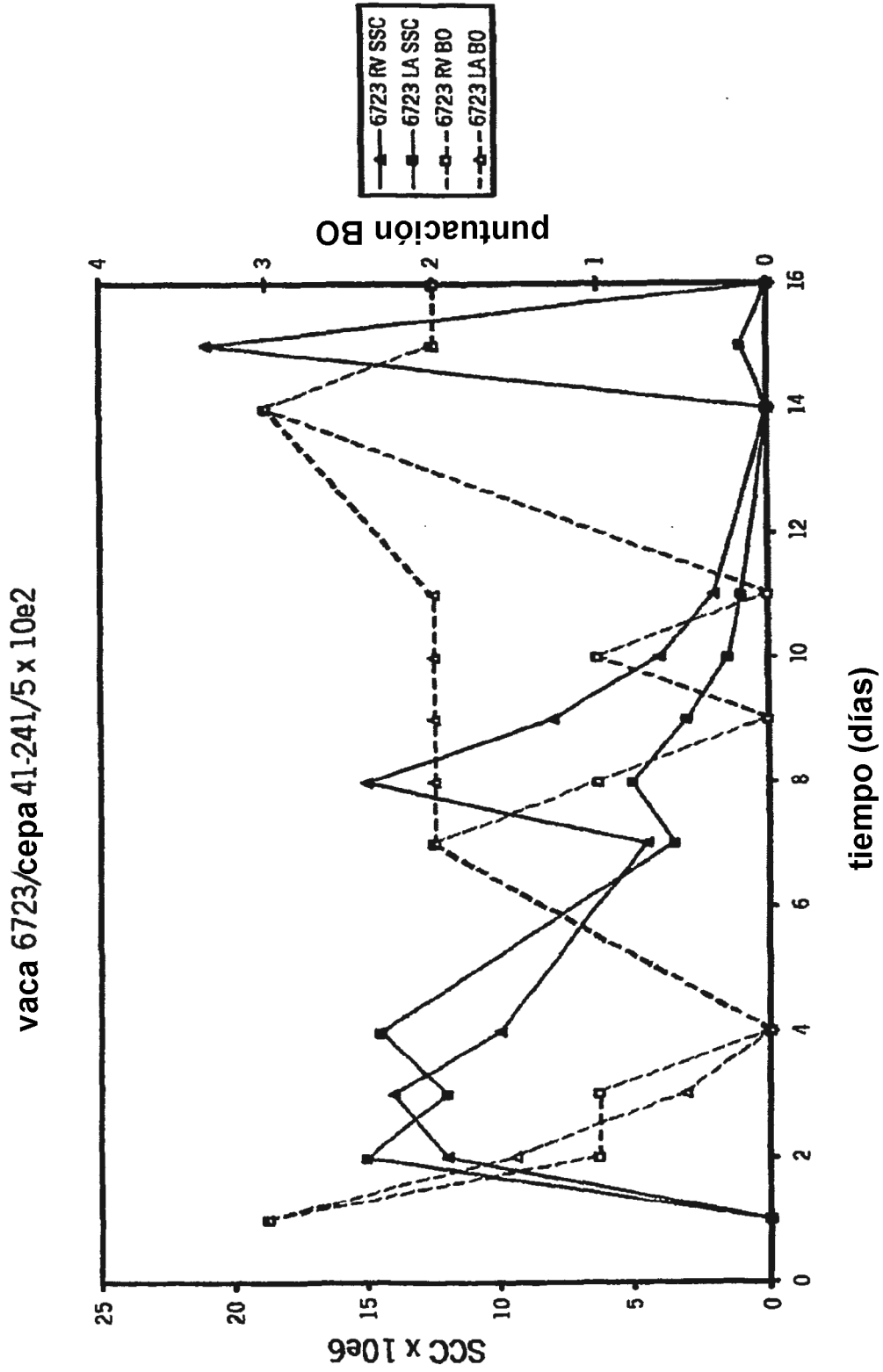
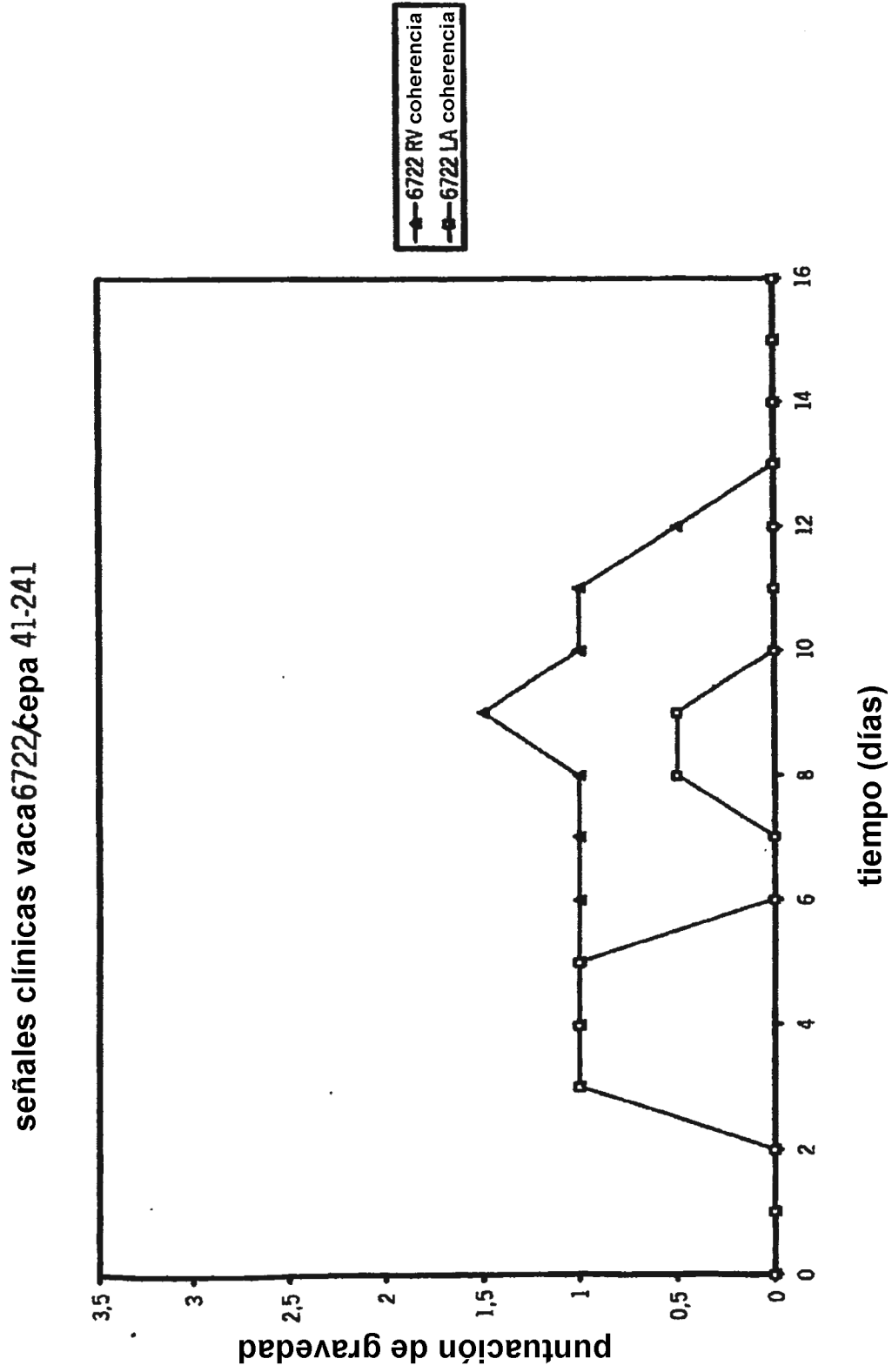


Fig. 3C, Condt.



señales clínicas vaca 6723/cepa 41-241

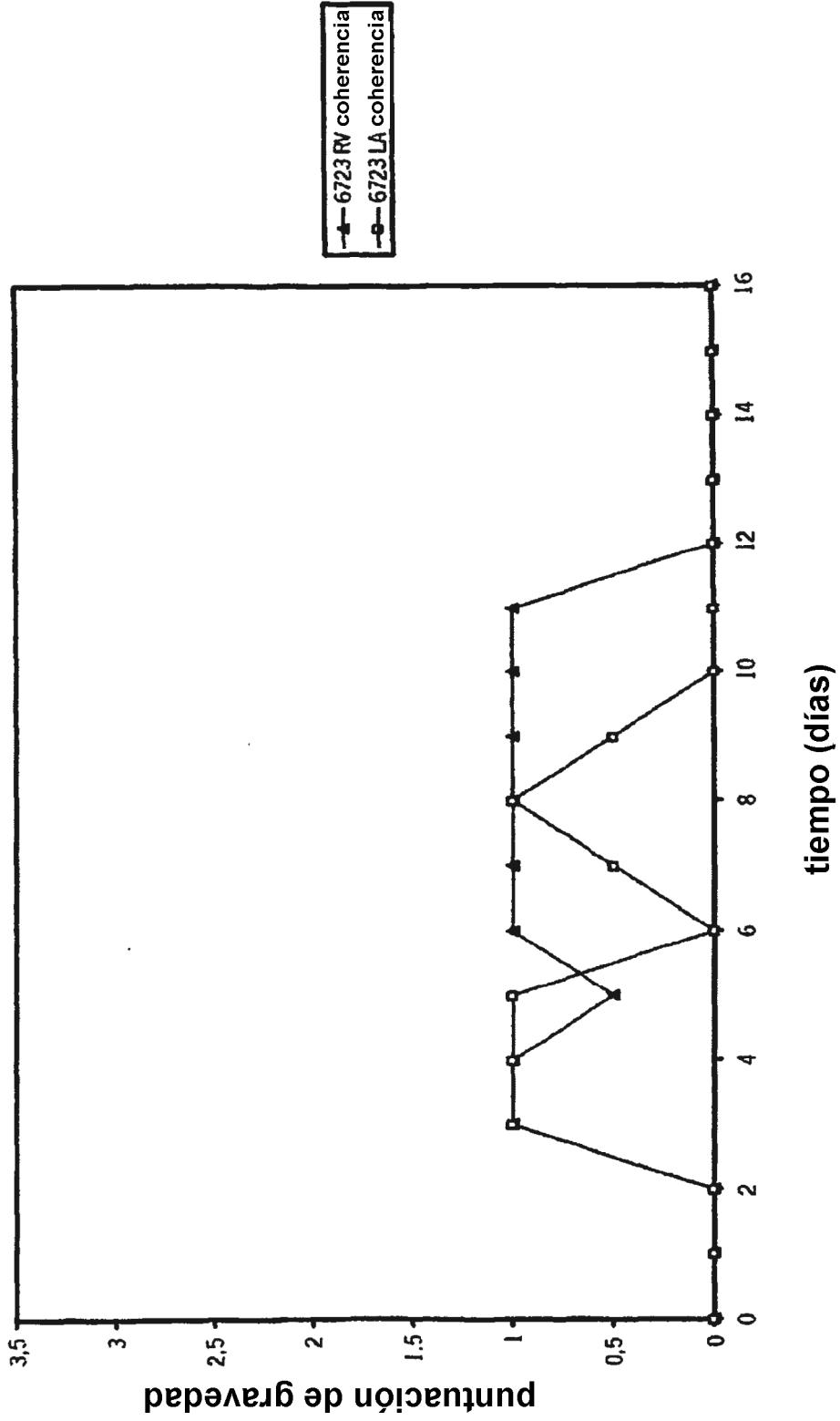


Figura 4.

Secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos de las proteínas de *S. uberis* de la tabla 5.

SEQ ID NO:109

atgactgagaacctaatcggaatttctggtatttcgaacttcaatcttatttacttattttgttctgcatattt
tatttatttagcagttcgtgactatcgaaatgccaaaattattcggcaaatgagtcataaaatccgtgacctaatcaatg
gtcgttacacggatgaaatcaatgaaaaagctgatatgagctcattgaacttcagagcaactcaatgatttatcggat
gtctttcgattgacctatgaaaatcttcccaggaaaaaaatcgcttagccagttttggcctacatgagtgatggggg
ttggcaacagaccgaactggcacaatcatgatgattaacgaaaccgcccaaaaacaattgaatatttcgaaagaagaag
cccttttaatagaatacaccgatttggtagggcaagacactccctatacctaccgggaattggtttcaaaacaccgatt
gttaccttgaatagacggatgagactggggaatttaccctcaggctgcgcttgccttgaatagaagagaaagtgg
attcatttcggggcttggctcgtctacatgacactaccgaacaggaaaaagaagaactgagcgtcgcctcttggtt
cgaatgttagtcacgaattaagaacgccattgacatcagcaaatcctatttggaaagccctggatgagggtgccttaaaa
gaagatacgcaccaagtttcaataaagtttactagatgaaaccaatcggatgatgcgaatgatttcggacttgttaa
cctgtctcgtattgataaccaagtcacagctctagcagttgaaatgaccaaattcacagcctttatgacttctatactaa
atcgttttgatttagtgagaaacaaaaatcacagtttcagggaaaagctatgaaattatacagagattatcctattactct
gtttggctagaaatgacaatgataaaaatgacacaagtcattgaaaacattttaaataatgctatcaaatattcaactga
tgggtgtaaaaatcgtgtaagatgaaaacaacagatagcaattgattatctctatttcggatcaaggattaggaaatc
caaagaaagatcttcttggattttgaccgatttatacgggtggataaaagcacgcagtcgtgcacaaggtggaacaggt
ttaggacttgccattgctaaagaaaattgtaaaacaacataatggttttatatgggcaaaaagtgactatggcaaggctc
gaccttacaattgtattgccatagaaaaagatgttggcaggaacagatgatgaatgggaggatgatattgac

SEQ ID NO:110

MTENLIGNLSLFELSILLLLIFVAAFYIYLAVRDYRNAKIIRQMSHKIRDLINGRYTDEINEKADI
ELIELSEQLNDLSDVFRLLTHENLAQEKNRSLASILAYMSDGVLATDRGTGQIMMINETAQKQLNI
SKEEALLMNITDLLGQDTPYTYRELVSKTPIVTLNRRDETGEFITLRLRFALNRRRESGFISGLVV
VLHDTTEQEKEERERRLRFVSNVSHELRTPVTSVKSYLEALDEGALKEDIAPSFIKVSLEDETNR
MMRMISDLLNLSRIDNQVTALAVEMTNFTAFMTSILNRFDLVRNQNTVSGKSYEIIIRDYPITSV
WLEIDNDKMTQVIENILNNAIKYSPDGGKIRVKMKTTSQQLIISISDQGLGIPKDLPLIFDRFY
RVDKARSRAQCCTGLGLAIAKEIVKQHNGFIWAKSDYGGKSTFTIVLPEYKDVVAGTDDWE
DDID

SEQ ID NO:111

atgaaattcataaaaaatcttattatctcaaatcgtcagtcctatcttttgccttaacaatcagtttacatgctttagagac
agtcaatgcagctgactgggggatgactatcccattgcatggaaatccgggtgggttacagacactggggaaatgtacc
gaaggcaatgcacctcattgttgccttttagattgaaatcaagtaaaggccttcaatccccttctggttaggaaatgct
gatacttggggtcatttgcctagacgaatgggggtatcctgttaatagatacccagcagtaggagccgttgcctggttga
taaaggaaataatggttctcactctgctatggacatgtctcctgggttgcggaggtaatggtaactagttaccttag
aagaatataatgtgacccggacaaggctcctgaacaatacatagaagagtcattaacagtcatacagtcagtggtttt
attcattcaaatgctgatactggaagtattccatctctctcctatgcaaagcccagatcaacaatccaaacca
agggagttatcatttaccgaacagatgccataaaagctcagcctattgccaatagccaagcaattgcctttaccagg
ccggccaaaatggttcaactatgataaaaccgtaattgctgatggttatcaatggctatcatacattgcctattctggtcaa
agacgtacatcccaattgctaaggtaacttcaaggaaagttcaaaaacaggaggactttgccccaggtgaccaagttac
ttttctggtggtttaccaagtcactcaaatctatggttagccttcttagtaaggacttagctggtggagagcctggtc
ctctaaattggttagatccaggtctctgcttgaagcaacagagacggacaacaaagtggagatcaaatactctacccc
ggcatttcttatcattccaggaaactacaagttttacagattcaaaaggaaacaaaaggctccttattcaaatagg
aaaccgacaacactgggtatcaatgaacaaggtcagaaatctaca

SEQ ID NO:112

MKFIKILLSQIVSLFLLLTI SLHALETVNAAVLGDYPIAWKSGWGTDTWGMYRRQCTSFVAF
RLNQNGLSIPSLGNADTWGHIARRMGYPVNDIPAVGAVAWFDKINGSHLAYGHVSWVA
EVNGNLVTL EEYNFDAGQGPEQYHRRVINSHQVSGFIHFKDVDTGSIPISSPMQSPRSTIPNQG
SYHFTEQMPIKAQPIANSQAI AFYQAGQM VHYDKTVIADG YQWLSYAYSGQRRYIPIAKVTSK
ESSKQEDFAPGDQVTFSGVYQVTQIHG SLLSSKDLAGGEPGPLNWLD PGPVLESNRDGGQSG
DQILYPGDFFIIPGNYKVLQIHKETKGLLIQIGNRQTWVSMNKVQKST

SEQ ID NO:113

atgactattatcaaaaacatcctggtgaaaaataagctgttgccatagtaaagcctcacccttggggagagtcctctgtg
cttgagcagtgacgacctcaccattctgttgctaaagtagctctctggcgggtgttatgaaagtgtggaaagagaattgt
tttcatttctttgaacatttttatcgtcattgtcaaaaaatgagtggttttaaacaagaagaagtgccttgcacttt
acagcacatcgatacaaatatggtcagcgtgaattagtgattccagatcatattcgattgttaaatacaagggactatccc
tttaacaaaacaggtgtagtcatccttagcaaaaaatgagtggcaaacaccaaggagaaattgacataccagctaa
atctaggagtggaattaatacaaaaacgaagacat

SEQ ID NO:114

MTIKNILVKISCCHSKAFTLAESLLCLAVTTF TILLSSSLAGVYESVERELFFISFEHFYRHCQ
KMSVLKQEESALHFTA HRIKYGQRELVIPDHIRLLNQG TIFFNKTGGSHSLAKIEWQTPREKL
TYQLNLGSGNYQKRRH

SEQ ID NO:115

atgatcaatctaaaggtaaatactgtccctattcaaaaggagaaaggaattatgaagcaagaaaagaaatgtgttaattg
gtttatgcaagcgggggaaacaatggatttatggttgtggcattttaattgtggcttggtttcggagtgaaagctc
cttcagtcgctgctgagactattccaacaacagcaacagttgagactttaaatcagatgtaacaagtaagacatctcaa
gaaacacagaagactactgaaatagcaacaccagttcagaaatagttatgccatctcaaaaaagttggtgaggaggt
aactcaagaagttagcgtacaaaatcaagagacgggtcataaataatgcctgtgtaactcaaggagtaaaatagcaggac
caaatgaaacggctatattaacggattcgattgtccaaaacaatgttcaacctatgtagagttgagaaaatggaaaca
tccttttaccgaattgactaagaaaagctgaaagtagctataatacaaatctcaagaattgaattatgaccaaagt
ttgggaagttcgtgaagaatggttgtatagtaacgctgttggaaaaggtgacaatttctattttcagcatcaactggg
aaaactttatctccaaacagacgtaacctttcttcaaaaatccggagcagcttcaactcgttttccgttcaaaaatgat
cctgaaaatctcaatggttatggtttaaacttgatggaaaatccacaaaagcaaggttatggcgttgggctgaagcaaa
tttaattaatgacaaaagaattctagccagtcocggacaataaataatttctaaaagtagtggcgactaacgggtggatt
cactactacattaatggatttttgatgcaacttgagcactacactatacaactgatgaccttggcaaaaacatat
attaaagatggcattttggcttttgaactggaaatgggtgaaaatggcttccaaaataccttctaccgtgaattgacaaa
tgaagagttacctcttcaatgatgtgacggtaacgtcaaaaaacggctcagttgaacctaaaggacaatttttcag
agagttcagtttatcaaatatgtatcaaacgatgcctcaacgggtggacttgagctttagctaaatcagatgca
ctaaataacagtgactgatgctcatggtaaagtattcaaatccaagcgaattctgtactgttggacaaattatct
cacggtgacaagtaactacacaacaacagatggctacgtaatcccccaacataccgtatataatgttaccggcgtaac
cacagtcagttattataatgaaaacttccgtgacaaatcattactctgttaaagatggctgggcaaatgatcctaat
ggattagttactataatgggtttatcatatgttttaccaattctacgatgatacaaaaatgggggccaatgcatgggc
acatgcaacaagtaactgattgattcattgggaagaccaaccaattgcttttaccagactataatggaaagatgttct
caggctgtatagtgagatgttaataatcttagtgactttttgtagtgaaaaatgggtgattagtagctctcattacg
attaacgggggaaggccaacgcattaaactgcataatgactgatgaagggaaaacctggcaaaaatgggatgaaatgt
agcggattggactacagaccactacaaactcgtgatttctgtaccctaaagtttccgttgggaaaaataatggttta
tggtaattgcaggtggaccactacgtctttatcatcagatgatcttaaaaatggactgtggaatcaacgtatccagat
cttcatacagaatgtccagatctttaccagcttggcggaagatcagacagtgaaaatgggttcttctcgcggtggctg
ttattacaaagttgggtgatttacaacaagctgacggaaatggaaatcattaccagatgctaatccaagaaacagata
gtatcatgaatttggtaagattcatatgctgcgatgacatactatgtacaagattttggtagcaaaagctaatccaact
attccaagattatgaattgaattggatgaatacttgggataactattgcaacctgtagctgatcgttaggtcagtc
atttaatgggacttttaaccttaattagaacttggcttgcataagaaggtgataagtagttcttactcagacaccgg
ttgaagcttatgaaagtttactgtataatgacaacaagttgaaatacaaaaatgttgcgttggtaaaagaaaatgacct
tttaagattttctggagatacttatgaaatgttgcactttaaaccagtgacaaaacaacaaaatgggttcaa
ccttagagttgggtcaggggagatgactaaggttactatgattgtagcaggacgaatcattatcgaccgaagtc
cagcattatattgacggaacttttagtaataatgatagtcaggctgtaacacctaataatgatggaaatattgateta
cacattttgtgactgctaggtgaaatgtttcaaaaaatcatacagtagcaggggctaaccaaatttcacaatc
agctcaaagcttaggattggaagtaactcattgatgggtgaagatgctaaagcagataatgcttataccattaaagagca
tctggaaaaataaataatgatacaaacaccccaaatgttattccagctagtgacaaaagttacggatgaatgtgggt
gatagcacaaccgtaaaagcttatgttccaccagttggggcagtcagatcttattggaatattagcaatccaagct
agttttagatacaaatatcaggtaatcaggttttctaaagcgattaagaaaggacaagttattgtaagagcagagtcac
aatctaatccagcagtttcaagaatttatattgatattttagaagataactcaatacaaatgtaaagatgtgaat
gtatcttctggcgattggtacgttgatggcgaatcttgaagttgcaaaatcaaatcaaacgacattacatgtcagc
agataagataccatataaaaaatcaaatggacttggatataaaaaatggctcaggaattgtaaatatcttcttggct
caggtaatctgacgctaacaacgcttatactatccaatttggtagcaataatcagttcgttggctccttctacaga
gatactattttgaggcgcaatgatagatgtgataatgacaatcaatccacatgttcgattgggtgaaatcagcaaa
tgtcatccatgtttatgttgataatgaaatggtaatgtcttacacatttgatcaagttgaagagttttcaacaatccat
accttggcctaggtcttgggatggcgaactagctgtcagaactttatgtaattgattagatgcgcaaaaacctgtt
ttgttgaagagcatgagaaagagaaactactatcagaatataaaaaatcagtggttaaacaagttcataatcaactc
aaaaacaatagagactctcaaaaacaatctctgagaacttagaagctccgactgttctaaagaaaacttacctatga
caagtgatagtaacaataattagaggaactgggtatattagtaattctaacgactttaggagctttttaggacgcgtt
attttaaaaaaagaaaaataa

SEQ ID NO:116

MKQEKKCVNWFMRKRKQWYIGCGILICGLVFCVEATSVAAETIPTTATVETLNSDVTSKTSQ
ETQKTTEIATPVSEIVMPSQQKVVEEVTQEVSQVQNETVINMPVLTQGVNIAGPNETAILTDSI
VQNNVQPIDRVEKMETSFSTELTKKAESSYNTNLQDLNYDPNVWEVREDGLYSNAVGGKDN
FLFSASTGENFIFQTDVTFQLQNTGAASLVFRSNNDPENLNGYVVNLDGNSHKARLWRWAEAN
LINDKEILASPDNKYFLKVVA TNGWISYYINGILIANLSDYTIQRDDLQTTIYKDGHFLLNW
NGEMVFQNTFYRELTNEELPLLNDVTVTSKNGPVEPKGQFFSESSVYIQYVSNDASTVDLSFD
ANNSDALITVTDAGHKVYSNPSAIPVTVGPNYLTVTSTYTTTTDGYVIPSTYRINVHRRQPQSVY
YNENFRDQYHYSVKDGWANDPNGLVYYNGVYHMFYQFYDDTKWGPMPHWAHATSTDLIHW
EDQPIAFYDPYNGTMFSGCIVADVNNSSGLFDSSENGGLVALITINGEGQRIKLAYSTDEGKTW
QKVDEIVADWTTDPLQTRDFRDPKVFWRWENKWFMIAGGPLRLYSSDDLKNWTVESTYDPL
HTECPDLYPVLAEQTVKVVLSRGGRYKVGDLQADGNWKFIPDANYQETDSIMNFGKDS
YAAMTYVQDFGTKANPTIPKIIELNWMNTWDNYCNLVADRLGQSFNGTFNLNLELGLVKE
GDKYVLTQTPVEAYESLRDNDNKVEYKNVVVGKENDLKFDFSGDTYEIVAHFKPSDKTTKVG
FNLRVSGEMTKVYYDLIAGRIIDRSQSGIILTELSNIDSQAVTPNIDGSIDLHIFVDRASVEV
FSKNHTVAGANQIF TSAQSLGLEVLIDGEDAKADIVLYPLKSIWKNKIIDTTPQIVIPASEPKVR
MNVGDSTTVKAYVSPVGASQDLIWNISNPSLVLDQISGNQVFLKAIKKGQVIVRAQSQSNPAV
YQDFIIDILEDNFNTNVKDVNVFSGDWYVDGESLKVANHNSNDIYMSADKIPYENYQMDLDI
KYGRGIVNIFFASGNPDANNAYTIQFGSNSVRLFRFYRDTIFEAPMIDVINDNQFHVRLVKS
ANVIHVYVDNEMVMSYTFDQVEEFFNPNYLGGLWDGELAVQNFYVIDLDAQKPVFVEEHE
KEKLLSELKKSVMKTSYSTLKTITETSSKTNSENLEAPT VSKKNLPMTSDSNNNLEELGILVIL
TTLGAFLGRVILKKEK

SEQ ID NO:117

atggctgaactgaaacacaaaaaactcagttaactctgcggttaataactacaaaatctcaattagaccaagctaagca
agtattgagtaacttacaagcaacacctcttcaactcaaaatgctcaa tctaaactgatcaagcgaaagtagagtag
cacttgccacaagataactatgttaaagcccaagaagctgttaattagctagtcaagaattagttgtcaaagaagctaac
ctaaaaaatgcccaagccgacctattagataagcaaaatatttgaatgaagcacaagcaaccttgcaaaaagtaact
agtattagctagttacaatctaacttaagaagcacaagcaagttggcagaagctaaaacatcgtagataccgcta
aaacaaatcttgacagaaacaagcactacttctcttcaaaatgcgctaaagttctagcagaagctcaagctaaa
ctgttactgctaaaagtgatttagccaaaaaatggctat ttttagacaaaagaagtagccaaattaaaagaattacaagc
tgttaagctgaagctcaaaaccaatatagtattgttttgaagctttaaagcagtagcaagaagctaaagaacaagctg
aattaacagaaatctatgagcattatctcagaaggaggagaagcaataccagttgtgacgaaacaggtaaaaaact
ggttatgtagatggtagtaagaaaattgttactaatgaaacgagttttgagctaatagtagacataaatcacctgttga
atcaccagtaacaggaacaaaattagtaagttctcaactaatgattaccgaaactggtagaatcaagcattgcac
cattcacagcaattggagcaattatcttatcagttcttgactattagggtttaaaaaacgctgacttat

SEQ ID NO:118

MAELETQKTQLTSAVNNTTKSQLDQAKQVLSNLQATPLQTQNAQSKLDQAKVELALAQDNVY
KAQEAVKLASQELVVKEANLKNAQADLLDKQNILNEAQATLAESQLVLASLQSNLKEAASL
AEAKTSLDTAKTNLAQKQAYLLSLQNAQPKVLAEQAQAKLVTAKSDLAKKMAILDKEVAKLKEK
QAVQAEAQNQYSIVFEAFKAVQEAKKQAELEIYEHIISEGGGEAIPVVDGKITGYVDGSKKI
VTNETSFELISTDKSPVSPVNQENKLVSSSTNDLPNTGESSIAPFTAIGAILSVLGLLGFKKR
RTY

SEQ ID NO:119

atgacacacatgaataaaaaacggacgctacaagcaacgcttagcctccgcaagtacaaatttggtgcagctccgctcct
 cctaggaaccatcttcgccctaggatgaccggaacaacagcacaggctcaggaaggatgggctggaaagtggtctaggag
 tacctggcgttggagtacctggcgttggagtacctggcgttggagtacctggcgttggagtacccggagttaggttacc
 ggtgtaggagtcccaggcgttaggtgtacctggtgtaggagtcccaggcgtaggcgtaccaggagttaggagtaccaagtgg
 ttataataatggcttggattatggaacaggttatgggtcagggtacgggaaatttaggttatcctatgcccgctacctgtac
 caggacctatgggcccctccgggaaatgccaggattgcctggaccagcaggctccgtcaggaccagtggagaacagggtgag
 gctggacaacctggaccagcagggtgctcgcggagagcaaggaccagcaggaccaagagggtgaggctgggtgcaactggacc
 aagagggtgaagcaggctcctcaaggtaagggaaggaccggcaggaccagcagggtgcaaaagggtgaacaaggctcccgtggtc
 aaaaagggtgaaaaagggtgacgcccagctgattggtattacaagggttacaaggaaagccaggtaaaagtggccgtgatgga
 caaaaaggagaaaaagggtgatccaggtaaaaatggtaagcaaggccctgcaggacgtgatggctgaaatgggtcaaaaagg
 tgaccaggtaagaacggctaaaatggtaaacagggtgctaaagggtgctgatggtaagatggcgcgatggtcgtgacg
 gtaaccaggtaaacagggtgtaagaacgggtgctaaaggaaacaccaggctgacgggtgctaaaggccgtgatggtaaaagac
 ggtaccaatgggtgatgccggtaaaaatggctgacgggtgcaaaaggccgtgatggtaaaagtggcgcgtaaaaggtaaga
 cggtaaacacggctgcaacggctcaagatggcagacatggacaagacgggtgctgatggccgtaaaaggctagatggcgcg
 gtggtcgtgacggacgtgatggtcgtgatggtaacgacgggtgctgatggcgcgtaaaaggctagatggcgcg
 atgacacactctgatggaagccatactatccacttctcaaccagatggcacaacgttcagaaaacaccttctgatgg
 taagaacggtaagatggaaaagatggcgcctccaggtcgtgacgggtgtagacggtaaaagacgggtgaccaggacgtgatg
 gccgtgatggtaaaagacgggtatgccaggctgacggacgtgacgggtcagatggcaaaagacggcatgccaggacgcgat
 ggcatgaacggtaaaagatggtaaaagcagcagcaggcaacactgctgcaaaaggcaatgcttagaca tgaacctaaagc
 tatggcagcacctgcagcaatgactaaccaaaacgctcatgcaaaatacaaaaggctcagctacagcgaattgccatcaa
 ctggtgacaaggtaaccattctcacaaccgcagccctagcagtcattggcttcagcaggaatggtagctgatcacgc
 aaacgcaagaagat

SEQ ID NO:120

MTHMNKNGRYKQRFSLRKYKFGAASVLLGTIFALGMTGTTAQAQEGWAGSGLGVPGVGVPG
 VGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPSGYNNGFDYGTGYGSGY
 GNLYGPPMPVPPVPGMPGPPGMPGLPGPAGPSGPVGRTEAGQPGPAGARGEQGPAGPRGEAG
 ATGPRGEAGPQKKEGPAGPAGAKGEQGPRGQKGEKGDGRDGLQLQGKPKGDGRDQKQK
 EKGDPGKNGKQGPAGRDGLNGQKGDGPKNGLNGKPGAKGADGQDGRDGRDGNPCKPGKN
 GAKGTPGRDGAKGRDCKDGTNGVAGKNGRDGAKGRDGDGAKGQDQDGHGRNGQDGRHGQ
 DGVDGRNGLDGRRRGRDGRDGRDIDGVDGRDGLSPIIKTMTHSDGSHTIHFLNPDGTRSEITL
 RDGKNGQDQKDGAPGRDGVGKDGAPGRDGRDGDGMPGRDGRDGDGHDGKDGMPGRDGM
 NGKDGQAAAGNTAGKGNASDMKPKAMAAPAAMTNQNAHANNGPATAQLPSTGDKANPFF
 TTAALAVMASAGMVAVSRKRKED

SEQ ID NO:121

atgaaaaagcataatgtgttaaaaagcagatatttaggtctgtcgtggaatgtcagtttagtatcatctgtacaagc
 tgatcaagttgatgttcaaatttaggagttatgattccacgggtgactggatcaaacctgggtcagcttat
 atgcctgatggaaaagtgtctggggctgggacagcggctcaattagatgcatacattggatcaagcgaagcagatttaa
 ccaactagtccaactggaacaagatccgtgtacaagctgggtgatatggctgggtgcaagctctgcaaattctggattac
 tacaagatgagcctacagccaagatattaatgaaatggggcgtgaaatcgggaacactaggaaacatgaatttgatgaa
 ggattagctgagataaccgtattaactggcactgcacctgcagctgatcaagcatcaaccaaattacaaaagatta
 tacacacattccatcggaacaaacaattgttatcgttaacgtggtgataaaacaactggagagattccgtataactggc
 aaccataatgctataaaaaatattcctgtaaaacaactctgtgaaatcgggtttattggagttgttacaacagaaatt
 ccaaatctcgtcttaaaacaaaactatgagcaatacaattcttagacgaagcggaaactattgcaaatatgccaaga
 attacaaggacaaaatgttaatgccttagttgattagctcattcctgcaacaagtggtaaagatggtagtagggcg
 acgaaatcgtacaaatgaatggataagggttaaccaattatactgacaatagcattgatattatcttgcaggtcataat
 caccagtatacaaatggaacctcgggttctactogaattgttgaagcactatccagggttaaagcattcgtgatgtg
 tggtagacttgacactgatcacacaagactttatagctaccctactgctcaagttgttgcagttgcaacctggcgtttta
 caggcacagctgaaatccaagctattgttgatgaagctaaatacaattgttaaaacagtgactgatcaaaaaatcggaact
 gccgcaagttcagaattaatttcacgtgaagtaaatgtagataaagaatctgcagtaggaaatctcacaactgcaca
 attgacagttgctcgtgaaacatacctgatgttattttgctattacaaaatacggaggaaatccgagcagattactag
 taagtagtgatcaaaagcattacttggggctgctcaagcagttcaaccttttgaaatactcacaatagttgagcta
 actggtcaagaaaatacagatgccttaaatgaacagatgatgaggggcaaaaatactcctccaaatgctcaggttac
 ctatgcatacactgatagtggtcaactgacctctgttccatttaaagttgtgaaagcttacaagacaatggagaag
 aatcgatccaaatgctactataaattagctcattaatgactcctatatgggtggtgtaggttttcaacattcaaa
 aaagggaaattataggagcaatatacctgatactgaggtctttataaataatcaaaagacttagaagctgctggcaa
 accagtaacagctgcaataacaggggttaaaacctatgttacaacggccttgagcctcaacaactactgatgcaagtg
 gtactcatgaaatgacaaatcgtgtttaccgtgacgtgatgaaaaaattgtggttacagaagctgttccgacctctc
 actccagctcctgttgaagaaactgaaacacctaaaccagctgttaactctattaagaatcctgttaaaacaccaaata
 tggtaaaagcttaacagcagtaaaagcaggtcagcaagcacaacaaagcaagtgacaaaaacaattgccaactactcaa
 gtaagaagacacagcaattctactttcattactgtggtcatcaagctagcaatggcggtagcattaaagaaaaagaa
 aataac

SEQ ID NO:122

MKKHIVLKSSILCLVAGMSVLVSSVQADQVDVQILGVNDFHGDALDQTGSAYMPDGKVSAGT
 AAQLDAYMDQAQADFNQTSPTGTSIRVQAGDMVGPANSGLLQDEPTVQVFNEMGVEYGT
 LGNHEFDEGLAEYNRIMTGTAPAADSSINQITKDYTHIPSDQTIVIANVVDKTTGEIPYNWQPY
 AIKNIPVNNTSVNIGFIGVVTTEIPNLVLKQNYEQYNFLDEAETIAKYAKELQCGQNVNALLVLA
 HIPATSGKDGIVGDEIATIMDKVNQLYPDNSIDIIFAGHNHQYTNGTIGSTRIVEALSQKAYAD
 VRGTLDTDTQDFIATPTAQVAVAPGVLTGTAEIQAIVDEANTIVKQVTDQKIGTAASSELISRE
 VNVDKESAVGNLITTAQLTVARETYPDVDFAITNNGGIRADLLVSSDQSITWGAAQAVQPFNGI
 LQIVELTGQEIYDALNEQYDEGQKYFLQMSGLRYAYTDSGSTDPLVPFKVVKAYKDNNGEIDP
 NATYKLVINDFLYGGGDFATFKKGLLGAINPDTEVFIKYIKDLEAAGKPVTAATGVKTYVT
 TALEPSTTTDASGTHEMINRVYRDRDGKIVATEVVSDLFTAPVEETETPKPAVNSIKIPVKTP
 KYGQSLTAVKAGQQAQKASDKKQLPTTSSQEDTAILLSLLGASSLAMAVALKKKENN

SEQ ID NO:123

atgaagaagaacaagaatgaagtactacctcaggaaaatctgcctatggcttagcagccgta tcagtagcagtcctcgc
agtcggaagtccggtatctgcacaggagaaaagctgcaagcaccgaagctaccccaaaggtagcaccaaaagttccagaaa
aaccaagtaaagaagttataaaaaaagctttaaagaaaactgatgaagaacaaaagaaaaagagaaagaagccaaagaa
aaagtagaaaattctgagaatcaacggctatggtttcagagctatctccaccaatgaggaaaca tctctgaagaaga
gaataaactgatgaagaggaaacagatggtttagaaagtgaagaatctgaagaacagaa tccgaagtcaagaagaat
ctgaagaagaaaaaggatgacccatccgaatcagatacagaagttgagaatggtgaagcgattaatcttctgaaget
gagggaaatgactcatcaaaacctgaaacttcagaagaggtactgctgaagaagaccgcaagagactgatcggttc
agaagtcaaacagaggagagtgccaaagaaggtgatgaagatgctgataaaaaagatgaggctgaagaaaaagccaaa
aaggagctgaattaagccgtgtgaaagcagaagcactggctaaattagaagcacttaatgctagtcgttgatgaagaaa
attgtgaaatcgggcaaacggtagaaggcatccttctctcatgaaggaaagcttacctcaactggaagctgctagagc
atctgaacaagctaaagctccggaagtaactcaatctctgatcactaccaagtgagaaaaagcagtcacaatccag
tccaagtagctaaaagaagtgaagcttgaacagaaagctgaaaatgctaagacaagcacaatcttcaaaaactcaa
attccagtacaagaggcaaaaagaactcaagcccaattgccaaagtaggagaagattaccaagcttatctgtggccg
agcaatggccctattgcctcatcaggcatgggtggcctatggcagctatcgcaagaaaaagcaaaaatag

SEQ ID NO:124

MKKKQEMKYLRKSAYGLAAVSVAVLAVGSPVSAQEKAASTEATPKVAPKVPEKPSKEVIKK
ALKKTDEETKEKEKEAKEKVENSEESTAMVSELSTNEETSSEENNTDEEETDGLSESESE
ETESEVKEESEEEKEDDPSESDTEVENVEAINLSEAEGNDSSKPETSEEVTAEDRQETDRLA
EVKTEESAKEGDEDADKKDEAEEKAKKGAELSRVKAELAKLEALNASRLMKKIVESGKTVE
GILSFMKESLPQLEAARASEQAKAPEVTQSPDHLPEKKAVHNPVQVAKRSESLEQKAENAK
TSTNLQNTQIPVQEAKRTQAQLPSTGEDYQAYLVAAAMALIASSGMVAYGSYRKKKQK

SEQ ID NO:125

atgactaaaaatcggttctagtcattctacctatgctgataaagtgattaaggactatcagcttcattgctcatattagg
 cgcattcggttttgcacaacaggtagtgacagaagaagtggaactgctacaaacacgctttaaactgcaccaaccgta
 caacagttccaccgctgacaaaatcggatgtttctgctactgcggtcgctgcagattccattgcaagcccagtaacgact
 acagatagtaatctcaattcagctccaattatagatacaagcaatcca tctaataactagtccaacagataccaacac
 ttcaacaacttcatctgacacgaacttcatcactatccccgtaaccttaaaataaagcagcaattgctagcccaacaagtc
 aaacggaaacctagcaagccaagaaatttacatggataaggtaacatcaagtgacca taaatacaacagtaaatccagca
 actccaatgacctggacgattgaaaatta tccatacaaacctataata tgcacacgggtgattttactggatctccaag
 ttatacagttacatcaactagtcca aataatagtagtggtca aattgaaatccgccacttttggacagatttaagtc
 tacgttggccaaacaata tcagacgtacttaccgtgattat tgggttcctatacactta aagggatcagtgaaatggg
 cttaccattgtcacca aagaattgattctacgacctatgctgattaca tgacacatgaggaactgctaaa tgaattaaa
 tgctattgaaagctaatc atgcaacagaccggttggtaacaatagaaacaatcggtcaa agtgctttaggaatgctatta
 aatgggaattgtagctaaagatcaagctagcttaga taccata ttaaa tcaacaaccccaatg atgttgatggatct
 gaccaagcattgaa tctcttagcacaaggaaaatttgattataaaactcctatcttaataataataccatg cggatga
 acagccaggaattgatgtgttcgcggtctttcaaaacttttgcacagagtcagttatcaactatcaaaactgttgatg
 ccgctaataatccaacaacagtacaaattgatacaaaagctctcttagacaaagtcactctacttttcaacttcacagaa
 aatctgatggagacattgccaatacacgcgcccttaataacggattagatccaaaccgggatactggctatcaaaccaa
 tccagaaaccggtgccattgttgaacaaatgaataagtggaatcctattcaat ttttgacgtgcatggctttgttaag
 aattcttgattgaaccatgtacaccaccacatga tccataactttgagtatgattat tttgatgcaagctctcgttgaaggt
 gcacgagaaatgggaaatgcggcatcaca aactctgtttacgacagctacatcataccaaaatttgattatggttcagg
 atgggatgactcctctcaggatacacagctgttta tggattgatacaaggtatcttaggacataccattgaaatccag
 aaaccaaccaagaa tctataatgcgggctacttcgcagctcttagcaggtattaattatgacttggcaa atagtgaccag
 ctaatgaaaaataagttaaccttcttctcgtggta tccaca aagcagaagtggtgcccetgaaagaacattgcttac
 agtagacggctccgtgaaaggtagaat taaagatggtcacgataaccttctccagattattatgattccaatgacat
 tatcaactgaaagtgatactgaccaagcttcaagatgat tgaatttcagaagaaa tggggtcattttaaatgaatta
 acagcggatgttgctggtatcataaaggtgatttagtcattgacatggcacaagctaaaagaggatttgtaaccatgt
 tctctacaaaggagcaaatgaa tctgaaatggccagctatgatagcagaattagtgatgaattccctgcaatgcgtggct
 ttaaagcagatgccatttacgtgatagtttatttggctggaaa tcttggagcagttactttaacaagtgcccaagaacc
 gcgcctagtataaagaatactatattgtttcaaaataatcacttgcagcagctccaagctgcaatgctgctatccgtgc
 aggaaaaaatgtttatttgaccaatgatggata tgttatggataaagccacttatgaaagtgctattggtacataccat
 tatttgcctcaagcaacctgata gaaaccagttggtgacactttgaaagctatacaagtatatgcacctggaaacccaaac
 ctctat ttaggatttaattccatcagaagtcagcttctgctctaaatcaaatgggatttgatgtggttctctcagtaga
 tcaggctgatgtcatcgtgttagacaatgatcaatttgacgcaagtttttaggtaaaaaacctgctatcattttagggtg
 gctctgcaatggctaagttagaaagttgggtatcttgacaggtttgatgctgcatgactagcgaagcgaatggatca
 agttatgaaaggacttatgaaaa tctctctagatgcaaatagtccttacacgagtggtatgcagcaaatctttatacta
 ttctaactcaggttctggattgaaggagtccaacaggat ttagacactagccaatatttctgcaagtgatttctatg
 tttcaggatgggtggccaaatcatgaaggatgactaa taaaacagttgctattagtggtctttatcagggacaaccaatg
 tttatctctcgtggaaatccagtgaaataagactcataccat taaattctaccgttgggtgagtaatgctat ttttggaac
 aaacttaaccagcttcattgaaaggtcaatgtactattccaactgactctgaaacacaagttgtaagggttaaccaataatg
 gtcaaacagtggcagttatcaacaagtggtcaataaggaagttaatgggacagttagcaaaatagcttgcagcatta
 gctgatggcagtcaca aagatgacagcaaacctctctgggtaactggattattggttgcagtgggggattatttgcagc
 tcttaaacgccgtgaggaagac

SEQ ID NO:126

MTKNRSSHSTYADKVIKGLSASCFILGAFVFAQQVSAEEVVTATNTSLTAPTVTTVSPLTNTDV
SATAVAADSIASPVTITDNLNSAPIIDTSNPSNITSPTDTNTSITSSDITSSPIPVTLNKAASIP
TSQTE TLASQEIYMDKVNQVTINTTVNPA TPMTWTIENYPNQTYNMQTGDFTGSPSYTVTSTS
PNNSSVQIEIPPLFGTDL SLRWPNNIRRTYRDYMGSYTLKGISEDGLTIVTKELILRPYADYMT
HEELLNELNAIEANHATDRLVTIETIGQSALGNAIKMGIVAKDQASLDTYLNQITPMMMLMDPD
QALNLLAQGKFDYKLPILINNHADADEQPGIDVVRGLFKTFATESVINYQTVDAANNPTTVQIDI
KALLDKVILLFNFTENPDGDIANTRALNNGLDPNRDTGYQTNPETRAIVEQINKWNPISIFDV
HGFVKEFLIEPCTPPHPDNFEYDLFDASLVEGAREMGNAGITNSVYDSYIIPKFDYGSWDDSD
FSGYTA VYGLYQGILGHTIEIPETNQESYNAGYFAVLGINYDLANS DQLMKNKLTFFSRGIHK
AEVAAAEEALLTV DGSVKGR IKDGHDTFFPDYMI PMLSTESDITDQAFKMIDYFRRNGVILN
ELTADVAGYHKGDLVIDMAQAKRGFANHVLYKGANESWPAMYAELVMNFPAMRGFKADA
IYADSLFAGNLGAVTLT SAPRTAPSDKEYYIVSNNSLAAVQAVNAAIRAGKNVYLTNDGYVMD
KATYESVIGTYPLFAQATCMKPVGDTLKAIKVYAPGNPNLYLGFN SPSEVSLALNQMGFDVVP
SVDQADVIVLDNDQFDASILGKKPVILGGSAMAKLESLGILTGFDAA MTSSESDGSSYEGLMKI
SLDANSPYTSGYAANS LYSNSG SWIEGVPTGFMTLANISASDFYVSGWVWPNHEGLANKTVAI
SGLYQGGP MFIFAGNPVNKTH TINFYRWVSN AIFGTNLTSFIEGQCTIPTDSETQVVRVNHNG
QTVAVYQQVANKEVNGTVSQNSLPALADGSHKDDSKLFWVTGLLVASGLFAALKRREED

SEQ ID NO:127

atgaaatettattgaaacgtcgttacggctatacacactctgtcttgcgcgaactgtattagctactggtggca
aagcactctgtttggctgaaaaatcccacaacatcccacaacaaccogtactagtaaatggtttaactttaatgcaa
ctctttagatcacaatggcaaacagtttccgggaaacagttagctctatgatattactgatggtaacagaacttgg
gtgcagagtgccgtcttgaccaaaatggatcgcacatcttccagttgccactcaaccgaaaactatccgttttgt
agataatgtcgcctcaaggctacacaacacgtactagtgaaagtggaacagtagcctcttgcctttatattgatggac
agggaacaacacaccaaaaacacagtgataagacaatcactattagtgctctaaatgaggaagetgagccactgccaat
caaaaagtaaccttaaccaatcccataaaagaggttggggcaagcaatgactgatgcagatggctatggttttcaa
ggataaacttttagaagggtcttttacaactatgctgtcaacggaaaagcaatgattctgctcagccagattcaaaaa
gaagtgcttttttagagtcctaaactagctaaagaaggatttacttccacagcaactattttaggaaaaaacggcaaa
actgctgctggtaaaaccgtaagctttatgacattactgatggtaacagaacttgggtgcagagtgccgtctctgatca
aaatggatcgcacatcttctcagttaccactcaaccgaaatctatccgtgtttatgatgatgtggctcaaggctaca
ccactcgtaccagtgaaaaatggacaagtgcttcatctgctctctatgctgatggacaggaacaaacacacacaaaatc
agtgacaaaaccattacgattagcgttcttaatgaggaaggtgaacctctagctaaccaaaaagttaccttgtaaccc
cctaaaagaagttattggtgaagcaaatacagatgcaaatgggaaagtcattctcacagacaagctattagatgggtct
ttacacctatgctgtaa atgatacaacaattgatgctactcaaccagatacaagccgta atgtcttttaagagctgat
caaatcctgaaggaagccctaaaaatcacagcaagcgaggctgctactaatttggaaaaaacactgaaagcaagaagg
taacatgctcagcaaaaaccaatcagaagcaaaaagaaaggctcctgaaaaacaagtcgatgctaatgctgccaacaaaa
aagcgcaggtcatggagaagccaaaaaaggcctaccaatggctggagaaaagaggaagtcgcttggtaacctttattgga
cttcaactatttttaggaatagccggttacttattgaacaataaaaaagtcacaaatc

SEQ ID NO:128

MKSYLKRRYGLITTSVLAATVLAATGWQSTSVLAENPTTSPITTVTSNGFNFNATLLDHNGKTV
SGKTVSLYDITDGNRTLVSQSAVSDQNGIASFSQLPLNRNLSVFDNVAQCYTTRTSESCQVRSS
AFYIDGQGTNTPKYSDKTTISVLNEEA EPLANQKVTLTNPLKEVVG EAMTDADGHVVF KDKL
LEGVFN YAVNGKAIDSAQ PDSKRSVFLSNQLAKEGFTTATILGKNGKTVAGKTVSLYDIT
DGNRTLVSQSAVSDQNGIASFSQLPLNRNLSVFDNVAQCYTTRTSENGQVRSSAFYVDGQGTN
TPKYSDKTTISVLNEEGEPLANQKVTLINPLKEVIGEANTDANGKVI FTDKLLDGVFYTYAVN
DQTIDATQPDTSRNVFLRADQILKESPKNTASEAATNLEKTTESKEGNMPQQNQSEAKEKAP
EKQVDANAANKKAPGHGEAKKGLPMAGERG SRLFTFIGLSLILGIAGYLLKHKVKVKS

SEQ ID NO:129

atgtctaagccaatgacaagaaaaaaaggctatttctattcaaaagtctgtaaaaccaattttaggtttaccttcggagccctattatta
tcaactgttttacaccttcogtatttgetgaagaagtagtcttcaatagggcagcaacaagtggttgctgtctgtatcagttcccaaga
attaaccagtcttgagacaacgacctacttaatggcaagttagtctcaagtaacactcctaactcggataccatttctagtataatggagg
gacggctcaaatccaaatgaaatagtaaccacagagacaaccagcaggcgattccttcgacacagaagtcattcaaaatccggattta
cctataggtgagattaaggtagtcaagaaggagtagctggtgaagtaacggttacaaagacaaccacaactattactetaaatgggtgtt
ctcagtcactacaactgagtcagggtacctgtcaaaaaacctaataaaaaatttgaagtaggtacaaaagagattagtacaagtcc
aagtagttctgagtattacagtcagtcacacctctcaacttcatcagagctaatcagcaaggttcgtaactccggccctaaatcac
gtcaaaatagtcaggaaaagaaaggtagtcagactaaaaatccaaagatgacgccaagaaaaagagggtgataagaaagacttc
ctcaactggctcacaagaaagggtatTTTTTctctatttctgcacttattagcacagcttaggtcttctctattaaatcaaaataaaatg
at

SEQ ID NO:130

MSKPMTKKKKAISIQKSVKPILGFTFGALLLSTVFTPSVFAEEVVSSLGHATSGLLSVSVPKEL
TSLETTYLMASESPSNTLTSDTISSDNGGTASNPNIEIVT'TETTSEAIKPFDEVIQNPDLPIGEIK
VVQEGVAGEVTVTKTTTTITLNGVSQSTT'ESRVPVKKPINKIIEVGTKEISTSPSSSDVITVSPS
PSSTSSESNNQGSLLTPAPKSRQNSQEKKGSQTKKSKDDAKEKEGDKKELPPTGSQESGIFSLF
SALISTALGLFLLKSNKND

SEQ ID NO:131

atggaaatcaaacaaaaacatggcaagcatgccttacgcaaagcggtcaccgcagcggctttagcagggacagcttctcaagcctaggag
gattcgcaggagcagtcacaacagtcaggcggagatttattactataaaataatcagaagtcagaataagttagaatcaaaaggtaa
aacaactttggaagcccaacgaaaaggagaagacattagcgaaaaactacgagagttattaagtgaactccaaccgataatttaaagg
atattaigtctatcaaatattgaagctgactatcttttaggatttctaaaaccagctgttgaggaaatgggtgagaagatctgaacaaaatgac
gagcgttggaagaattacagaaaaaacactagcttagaggctttaaagattcagaaagagaaattaggaaagaaaaagagaac
ttgaggatgaagttcaacttgcaaaggtaaaaatgaaactaaagaatcagaatataatgatttaaaaaagattatattgatactaggg
aagaattagcagatactattgaagaactagacgaagttaaaattcaattgtagaaaaagaagcaaaaagttaaaggcttagaagaaaa
gttactgtgatttagaaaaagaattaggtgactacgataaaaaatgaagtgaagctgtaagcaaaaattcagattatcaaatgaaacaa
agagttgaaagaaaacttagatactgctgagaatattactgttgaactcagaaaaaatctcatgaattggaaaaaactaaaaagaagt
tgaattagagctgaaagcagaaaaagaagcccttgaggcagaaaaagttgaagtagcagaagctaatgaagcaaatgataaactatctg
aagaacgtgatgctccaagaaagaagctgaaaaagttcctgaactagaagggcaagttgaaaaattagttgaagaaatcaactgtgct
aagaaagaagcagaagagcttaagctaaagccgaaggccttgaaaaagactcgaagctgttaaagcagaaaaagaagccctgaag
ctgaaattgctaaattgaaagaagaccacaaaaagaagtgagcgcgcttaatgctctcctgctgataaagagaaaatgcttaagagctt
acaagaacagcttgacaaagctaaagaagaagct
atgaagaacgagcaaatgagccaagaagaaaaagctaaattgcaagctgagttggacaaagctaaacaagaattggcagaaaaaatc
aaagacatgccaacaaagtggtcctcaagccgaagcaaaagccaatgcaggtaagcagctccaaatcaaaaccaaacaaccaagc
gcaagcaaaccaagctaagaagcaaacacccatcaacaggtgacaaaccagttaccactcctagtggaagtggtctctcctca
tgatcggagcaggtgccttcgtctacgcccgaacgcaaaaaagggttaa

SEQ ID NO:132

MEIKQKHGKHALRKA VTA AVLAGTAFSSLGGFAGAVTTVKAEDLFTINNSEVQDKLESKVKQ
LLEAQRKGEDISEKRLRELLSELPTDILKDIMLSNIEADYLLGFLKPAVEEMVRRSEQNDERWK
DITEKTLALEALKDSEREIRKEKEKLEDEVQLAKVKIETKESELNDLKKDYIDTRELADTIEE
LDEVKNSIVEKEAKVKGLEEKLRDLEKELGDYDKKLEAAKQNSDLSNENKELKENLDTAE
NITVELQKKSHELEKTKKEVELELKA EKEALEAEKVLA EANEANDKLSEERDAKKEAEKV
PELEGQVEKLV EITA AKKEAEELQAKAEGLEKDFEAVKAEKEALEAEIAKLKEDHQKEVDA
LNALLADKEKMLKSLQEQLDKAKEEAMKNEQMSQEEKAKLQAE LDKAKQELAEKIKDMPN
KVAPQAEGKANAGQAAPNQNQNNQAQANQAKNANNLPSTGDKPVPNPLLVASGLSLMIGAGA
FVYAGRKKKG.

SEQ ID NO:133

ttgcgatataaaaaatgacgagatcgtcaa atagcagaatagttttacaatcgacactgattatgatttttgcttcaagctgtgtaaacat
 tttaaaggaacaattcatgcagatgaaaaagtgattaatggttcagaagcttcaatccaagttgattatatactgaaactgcatctgaaaa
 cagacaaaatccagaagaaaaggttaactgaggaagctacaaatgatcagccggaacttttagagaagcaagcggcattttacatgaagg
 ccgtgaaaaaaaactgagaatgttgccttttagatggtagaggaagctctgattgctagatggaatctggagttgatattaagcagcaggcat
 ttgcaaaaatgatgataaacatgattttcataaagagacagaagtcttgaaggttctacttcaaaaatccctttgtttatgatttcttagt
 ggtgataccagtgtgagagatgacgaagaagaacatggtatgcataatgacaggaatcttagttggtgattctaaaaaagggttcaaaagg
 atggcacctaaagcacagctaatgcatatcgaacttggagtaaaaaataatagtgaaaggtatcaagaagcaaacaggtttttgcaatga
 aagatgccatcaaacgtggtgctgacgtgattagcttgagattggtgagattggttagtgggcaaaacagtgatattgggcaaaaggtatt
 agaagaagcgaaaaagaaaaatggttctgcttgcagcaatgggaaactatgggacatcagcaacaagtaatacttttgatcaagttggt
 gatgaaactttcccacaaccgtagttccactttgcttctgatactgcaaatcccgaagctatggtggttggctctattttgaaaaagaaat
 gtattaccaacactaaaaatgatactttgaaagtacctaatacaactggcaaaatattaccttttaagcaagaaaagcaag
 aacgtattcttttaatagaaatgtaataacctaaaccaatcaaaaagaagaaggatgtaaaagataaaagttgctatcagaaactgca
 agcagaaaaatatttctcaatataaagaagtgatgaaaaaagggtgctaaagggttattttgattaaccaatcaggaccaactactta
 gtaac
 tatgagacagttccagaattaagaaataccttattagatgatgaagatggtgatttcaaaaaacaatgggctgtagcatttcagcaaacg
 atggtaaagcattgaaagattaccttcaaaaacaagacaagaaaaaagctattcacttgtgttatacaaaaaccacaattgaaacatg
 tttcaaatatccaggtgtatcaggttttagtacttggggccaggtcttgatttaaccctaaacctgataatagtagcaccgggagaaaaat
 ttattctacaggtaatgataatagctattttattagtagcgggacttcaatgctgctccaaaagtcgacggggcaagtgccatggttctccca
 gtgacaaaaaatggcaaaaaaaatgggaaaaacaaaatggttccatctctataccacaataacgaaagttattgttcaaaaatcacagc
 gataatctttatgatcatagtggtcccaaatggtaaacctataatcacttactcactgaagacaagggcgaggcctttaaagtgtgaaaaa
 gcagcacagacgaatggttttgaacttctgcagataataaaggagcaatactgtttaaagatttaaagaaaagtcgtaaaagatttgata
 ttgtgatcagaaaactttcggatcaagtcagacgctttaaattgaaccaggatcagtttaggaaagattctttatcaaaagacagaaaa
 aattatgataaaaatgagactattcaaacctgactctagggttataaagattcggccattgagagtcattatattgttcaaatagctcca
 aacagttcaatgatcttctcttaaaacttaattgtgggaaaagcagttgaaatgaattgtggaaggtttataaagcttgcctcattaga
 gaaagatcaaccggatttaaacattccattcatgggattttatggtgattggaactcagaaaaacatttagatccagtagcctggcaagaag
 gaagcaagactcgtttaaactggtatcgttcatccatattggttaggagaaagataaattgatatactgcttggggggtgactatgaaaat
 ggaagcaagacctaaagcttagatgcagatcaacggtttatggtatgcagagtcaggtggcattgccaacctgctaaaatgctgctca
 cgt
 ttaataatgatgcacatgctaaggattaccgtgtgatactctaaattctcaaaaagacaaggttttaaaaaccttaaaaacaggtcctcag
 gccctaagtataatggaaagtgcatatttagaacatggagatcaatatcaaatgcaattgcagatgattgatcctgatttagaattgggatgg
 aagtgctataatccttaaaacaacactgaagaccttacctgacggaaactattttatcgggttctctccagaatcagtaaaaaatcgtcc
 atatcaagagcattatattccctttgcatatgataatcaaaaacctaaagtaaaaattgaagaaaaaactgctctcaagttggttttcatggt
 gatgatgctcacttcaaggaataaggctagtaaaagataataagattattcaaaccttagaacaacagacactcaaggaagattcagactta
 atcttctgatttccaaggtaaggatttgaaatagaggctatagattttgcagaaaaataaacaatcatagatttagattctcttaaagaa
 aaagaagtaggataatttttggcgcaagtagtagttatacaaaatccaggatcgcataccaaggtcagtagccataaaaaatgctgaag
 atattctcatgagaaatcagaggaaagtgaggagatagcatcagcattaaactttgaagatgggagtgatttccagatggttaagaaaac
 aaatgcttattcagagattacaacaaagtaataatagtgctcattaaagataatacttattatcgtgactattatccaattaaag
 aagggcaactcttttagttaccacaacaaatgcatctcataatagtaaacaaaggaatgataacacagcgaacaatggcaagctaaacta
 tactatgatcttcagacaaatcagggacaatattatcgtgaagattgctattccgatttatacaggatcaaaactataaataatgtaaaagca
 ttataaggataaaatatttaataaaggatagcggtaaaaatagatacagaagttctctcaatcaacttttgataatccaaatattagctt
 tacaatgataaaatggcaaacctatctgatgatgagatgatacagataataatggttggactatcacaatccaaataataccttaagatt
 a
 tccgggaagattcagacaggtctagatggatggagaatggttattatagagacatggtcagatgattatgataactaggtgaatatgatg
 atattttcaacaaaaatagaagacaatggaaatagaaacaaagttgaaaatgatgactatgtgctcataaaactgagtgatcatggtta
 aaaacagcgaagttacctctttaaagtaaaaaatgatacctactgtttcagagatcatttcacaaaataaaaaatgacattattgatgata
 aaacattgtaaacattaaacacactaaccgatagctcattgggatatgctaataaacttttaaatatgcaaaaagattgggttaaatacaacag
 atgactcttttaagccatgacgatggtatttaaaaaggaaaggttttctttatccgcttaaaaatgatttaaaactaatggaattagat
 gatgacaagtttgggtgcagttccaagcaaaaggatgtaaaagagaataaccattagaatgggaaataaaaacaaagcatccgactcaag
 gcagcttctttatcaaaaatcttaagaacgaaaaagaaaggttggatcaggtttccactaatccactagctcatcaatcactctggaaaatc
 taatcaagaaaatggacaagcgtattttgacaagtaacaaaagcttaccatgtccaaatcaatctattcagagactcgttacgtgaga
 cgagctcgcagaaaactcgtgactcttcaatggcaaatggtcattagctttctcttctctcagtgatgatttctttaaaggaagaaga
 aaaagactgaataagtta

SEQ ID NO:134

MRYKKMTRSSNSRIVLQSTLIMIFASSCVNHFKGTHADEKVIINGSEASIQVDYTLNTASENRQ
 IPEEKVTEEATNDQPELLEKQAAFLHEGREKNTENLPLDGRGSLIASIDSGVDIKHEAFANND
 DNHDFHKETEVESEGSTSKIPFVYDFLSGDTSVRDDEEEHGMHIAGILVGDSSKKGFKGMAPKA
 QLIAYRTWSKNNSEGYQEANQFFAMKDAIKRGADVLSIGSIGSGQNDIWAQVLEEAKKN
 VVVVAAMGNYGTSATSNFTDQVDETFPQTDSSSTLLSVSANPEVIGVGSIFEKEMYLPTLKIDT
 LEVPYENINWQNYLFFKQEKQERISFNEMLITLNQSKEEGSLKDKVVIHERQAENIFPQLKEV
 MKKGAKGVILINQSGPTTYGNYETVPELRNTLLDDEDGDFKKTWAVSISANDGKALKDYLQK
 QDKKKSYSLVFNTKPKLKHVFKYPGVSGFSTWGPGLDLTLKPDIVAPGENIYSTGNDNSYFIS
 SGTSMASAPKVAGASAMFLPVTKKWQKKWEKQNVSMSIPQLTKLLFQNTADILYDHSVPNGKP
 ILPYSRRQGAGALNVKAAQTNVFVTSADNKGAILLKD FKESRKEFDIVIRNFSDQVRRFKIE
 PGSVLGKILYSKDRKNYDKNETIQTVHSRVIKDSAIESP LYVQIAPNSSMILPLKLVNGKAVEN
 EFVEGFIKLRSLEKDQPD LNIPFMGFYGDWNS ENILDPVAWQEGSKTRLTGIVHPYGLGEDKF
 DIVPWGVDYEWKQDPKALDADQRFFYVMQSQAGIANHAKMRLRLIFMRHAKDYRVDILNSQ
 KDKVLKTLKTGHQAPKYMESALLEHGDQYQM QFADFPDLEWDG SVYNPKTNTEDPLPDG
 NYFIRVSSRISKNRPYQEHIPFAIDNQKPKVKIEEKTALQVVFHVDDAHLQGIRLVKDNKIIQT
 LETDTQGRFRLNLADFQGGKFELEAIDFAENKTIIDLSLKEKEVGYLFGASSYKNSRYRSPR
 SVAHKNAEDILHENSEESEELIASALTFEDGSDFDHGKKTNAYSEINKSNDNSVHLKDNITYR
 DYYIHLKEGQRLLVTTTNAFHNSKQGN DITAPT WQANYTYDPSTNQGGYYR KIAIPIYQGSNTI
 NVKAFYKDKLIFNKG YAVKLDTEVPQLT FDNPNISFTSDKWQNLSDDEYDDNDIVGTTIPNN
 TLRLSGKIDGLDGRWFMFINGDMVDSDIKGEYDDIFQQNRRQWKYKQVENDDYVLIKLSD
 HVKNSRSYLFKWKIDPTVSEYHFTNKNDIIDDKTLT LNTLTDSSLGYANKLLNMPKDLVKS
 TDDLFKAMTMLFKKESFFLYPLKNDLNTNGISMMTSLVQFQAKDVKENIPLEWEIKTKASDS
 RQLLYQNLKNEKERLDQVSTNPLAHQLPLENSNQENGQDAILTSTKVLPMKSSIFRDSLRET
 SLPETRDSSSMANWSLAFFLSAVICFFKGRKRLNKL

SEQ ID NO:135

gtgtcaaaaggccaatctgatttaagccatgcggaacaagggtgtgatgatcaaaattacaattgctaaaaagatagtatctcagtaacaa
 ctgattcaaaagatttaacgcaaaaatacattgatacaaaagggttgactgggtcagcttaacaacagcaatggaaaaaacattgcact
 gtataatcaagcggtaatgatggcgttaggtatattggatgctcaagcgtccaaaatgaaaaacaaattgctgattttaaagcagcttga
 caaattatcaaaagggtgttcttcaaatacaggattacaatggcaaaaatagtggtgtcttagaagcgggctcaggtgcaagtagacaaac
 aggcactgaaaaatgtgttgatttagtgatggaacgattaagcagcaggtatgtatgacacacaagggtcaaaaatttagacaaaatact
 gatgcaaaatctgataatatttttaagattgaggggaaccgggattatgggtaaagaatacagcaaatggagatgttaaattgactttctct
 gaaatataatagtcatacaatacaggtacttacgttctatttggggatgacaaagggtggtattgcttggtcagctcttgcttatactatg
 gtggtgcgagtggtgagctggtgaaacaggttctaatacaggttctggtatcagtggtgcattttaaattatgtgaattcataaaagcaa
 cagtagaaacaacaagaggtgttcaagttgtaacttttaagacattgataatcaacagacagttaaaatgtcgggactgataatgcaaa
 agtaacaacaggtgagaaatattaatcagacagaaatgatttggcaggttcgggtgacgtttctcaaaagtcagcaggagtttaggaa
 ccaatgggtgtaaatggacttttacaagtgctgatagggcgtttattctcatttactcattctacagcaggaactaaaaacacatcaatcgtagg
 tggatatttggatcagcgtctaactacacacaaaagccagtaattcctaaactaacccgtcataaagcaatggttacaggacaaaagggtcc
 aagcatccctgttaatacaaaaagtgacggttcattactataaggtttcgggttacacctacaccagaaaatccagttactccacaaaaaaca
 tt
 acttataaaccattacaaccactccacaaacaccagtaagccaagcaaatgtgggacttcaacaactggtgataaagcagatggttcta
 ttgttcaaatggttaattggtgcattaatggtatcattgttgggttttcagcattaaaagatcggaagaaagaaaaa

SEQ ID NO:136

MSKGQSDLSHAEQGVDDQITIAKKDSISVTTDSKDLTPKYIDTKGLTGSALTTAMEKNIALYN
 QAVNDGVGIMDASSVQMKKQIADYLTA LTN YQKGVSSNTGLQWQNSVLEAGSGASRQTGT
 ENVVDFSDGTIKAAGMYATQGGQNL DQNTDANFDNIFKIEGTGHIWVKNTTNGDVKLTFFSEINS
 PYNTGTYVAIWGDDKGGIAWSV FALYGGASCAGETGSNTGSGISCRILN YVNSYKATVETT
 RGVSVVTFNDIDNQTVKMSGLDNAKVTTGSEINQ TGNDFVAGSGDVSQSSAGVLGTNGVK
 WTTFSADRRLLFSFTHSTAGTKNTSIVGGIFGSASNVPQKPVIPKLTAHKAIVTGPKGSPVNVQ
 KVTVHYYKVSVTPTPENPVTPQKNITYKPIITTPQTPVSQANVGLPTTGDKADGSIVQMVIGAL
 MVSFVGFSA LKDRKKEK

SEQ ID NO:137

atgttaaaaaacaattattagtcctaacttgtgttcaactcttggactagtagggaccacagcttttctgaagatgtagtcccggtagatc
caactacccatcaacagaagtgattacacatcaaccccaatagatactggttaccgtctgatactactgacctagcactccggtgaacc
cgagactcctactaatcctactaatcctagtagtccgatagatccaggaactccaactgatacgacaacgccaacagatgatacaacaacac
ctggaacatctactagtccctcagattcagagtcaactaacacaaatccaggcacaaaaccaacagatgaagtaaaaccagttacccatct
actcctgaagtgccttcaactgttactccaggagtagttgataatgttgataaaagaaacaggtaataaccattaaaccaatccaattagc
ccagataaaacagttgttgggactcagaatgggaaatgtgcttattcaagatcgtcaggaaggatattagatctgctagtgaacttgggtgt
cgacttaatgatgatggaactgtaacaatcaaagattcggaaaggaaaagaaaaaaccttctcatacaggtgaagaaaaggatttta
agtatcattgggtgaacaatcttatctttttagccttcttattcaagaaaaaaataactttaa

SEQ ID NO:138

MLKKQLLVLTVCVSTLGLVGTAF AEDVVPVDPTTPSTEVIPTSTPIDTGLPSDTTDPSTPVEPET
PTNPTNPSTPIDPGTPTDTTTTPTDDTTTTPGTSTSPSDSESTNTNPGTKPTDEVKPVTPSTPEVPS
TVTTPGVVDNVDKETGNITIKPIPIPSDKTVVGTQNGNVLIQDRSGRYLVSASELGGRLNDDCTV
TIKDSEGKEKTLPHGTGEEKGLSIIIGGTILSFVAFLFKKKITLN

SEQ ID NO:139

atgaaattcaaacacaaaaggacatggtttttcagaaaatcaaaagcatacggtttagtatgtggaaatcgactagcaggtgcttttctttt
 agtggagggaatgatacggcagatgaagttactgtccagcagaacgtcaaaactgttgtaacaaccttaacagagccaacaaataaccaa
 gcacaagcagttacgtcagaagcacttaatacagcagttcaacagctaaagaagcaggagtaactgttaacacaacaggagcagttagt
 catacagatgtccaagtcacaaatctgatttagctagctcaaacacaaactgttaagatgcgactgctaagcagaagctaatacacagg
 ctattaaagatgcgactgcgcaaaatgtcacaattgatgctcaaaaatcaggcagaagctacacgtgttgctgaaaataataaagcaagta
 acttgcggttgatacaaaaatgcccaaggcaagcactcgttgataaacaataatgctgatgcacaagcacaagcagatgagcaaaatgc
 acaacttaaaagcagattgaagctaaattagctgaaattaaaactgttgaaagactacaacaagcagtagctgaacgcaatgcttagct
 aaacaacaagcagatgagcaaaatgcacaactaaagcggattatcaaaactaaactgtatgcataaacaagcgttagctgataaaatc
 aatctaataagctaatgatgttacttttaaagggtatggtaaatcagaagatttaaatgcttatggtagtaactctgtatctataacaatt
 gatggtagcagaaactttatattaaagaaccaatgtctgatccaacagggttattgggtatatacactacaaaaggtaaaataaactatc
 tagtggttatgatccaacacttaataaagcgaatattacgattgattcaattactttaaatacattggcagtttagatttgaatcgccctcaatt
 caggaaataactaatgcatttcagaaatcattgggttagacggaactctgattttaagcaagcttatcaggttaactcaatgtcaccga
 ttactatcggtaaaaactagctcaaatggaaagacattcactgtggcaagcggggaaacaacaccagaaattatgttcttgaaaacaatcc
 gttctgggag
 ttttgcaccatcttcttatttggcgaattaacctataatacagcaccattaccaataaacctattgaaccaacattggttactgttaccoca
 gaagcacttaaacagttccacaaaacaccccaactccagtttatgtgacacccaaaatcctaaaatccttcacacctgaagtttacaccccaatca
 aaccaactgttaaacccacgttctgtactgataaaatagttgtcagcagtaacagtaacactctctgttgggtccagttcgaatcctctaaa
 gacgtttagatcaagcaggtaaaatcaatgaatgggttatcaggttaccataatctgacttaaacactcgtggctttacaagactttagcaat
 ataagggaatgagtgcttcacaagataaaaatgcacaaaactttatctttatgatgactacaagaatgaagcactagacggaaaatcaat
 ggttggtaataagcattaaagctaaaatgggtgatgatgtgtcacactctttagaaatgcacatgtattatctaaagatggcttagatgtcaa
 acttaagctatcttggctgaaagtggtattaatccagttgggtgaattctataatgtgggttagtaaggaaccaaacgcttctaaagcttat
 gtcaaaaagggttagatattacttacaacctctcaatcaaaagctacataaacatttactgaaagtgaaattgtaattgggtgtgctcaaat
 gatttggcaatggctatcttggaaatctttagtgaatgatattacaaaaccagaagttcataaaagcgtcagatgaagcaggaataatc
 tattaacaacggtagctgtaaaactgggtgatgaagtcactacaagctagaaggtgggtcgttccaactggacgttcatacagatttatcga
 gtacaaattttagatcagttacaaaatacacatgatctttattgaaagatagtggttggccaaagttgattactctatcagacggtac
 agtcattacaaaaggtctgatttagcacaataactgagacagtttacaacaagaaactggacgctatgaattagcgttcaagaaagat
 tcttggctaaaagttgacgttctagtgaaattggagcagatgccttcttagttgtaagcgtattaaagcaggtgatgct
 tataacacaactgatctataatgtaaatggtaacaagtgaaagctgaaacagttgtgacacatacccctgaagcaccacaaaccagtcactcc
 aactaaagaagtgccaaaacacctgaaaaagtaactccacacacaggagaagaagggcttcaatttggaccgttattgggtgcaagatt
 cttcagacttggctcttcagacttaaaaaacctaaagaaaat

SEQ ID NO:140

MNSNTKGHGFFRKS KAYGLVCGIALAGAFASFSGGNVSADEV TAPAE RQTVVTTLT EPTNNQA
 QAVTSEALNTAVSTAKEAGVTVN TTGAVSHTDVP SAQSDLASQTQT VKDATAKAEANTQAIKD
 ATAQNAQIDAQNAEATRVAEINKASQLAVDQKNAQQQALVDKQNAQAQADATNAQLKA
 DYEAKLAEIKTVEDYNKAVAERNALAKQQADATNAQLKADYQTKLDAYNKALADKINLIAND
 VTFKGYGKSEDLNAYGIVTSDTITIDGAGNFILKEPMSDPTGVIGYITTKGKLNYSVYDPTLN
 KANITIDSITLNTWQLDLNRPSISGNTNAFAEYIGLDGTSLFKQAYTGLTSMSPITIGKTSQIGK
 TFTVASGETTPEFMFLKTNPFWEFFAPSSLFAELTYNTAPLPNKPIEPTLVTVTPEALKPVPQT
 PPTPVYVTPNLKSFTPEVYTPIKPTVKPHVAVPDKLVVTVSVHPVVVPVANPSKDVVDQAGKSI
 NGLSVLPNSDLNYVALQDFSQYKGMASQDKIAKNFIFIDDYKDEALD GKSMVVNSIKAKNG
 DDVSHLLEMHHVLSKDGLDVKLQAILAESGLSPVGEFYMWVAKDPTSFYKAYVQKGLDITYN
 LSFKVHQTFTSEIVNGVAQIDFGNGYLGNLVVNDLPKPEVHKDVIDEAGKSINNGTVKLGDE
 VTYKLEGVWVPTGRSYDLFEYKFVDQLQNT HDLYLKDSVVAKV DITLSDGTVITKSDLAQYT
 ETVYNKETGRYELAFKKDFLAKVVRSS EFGADAFLLVVKRIKAGDVYNTDLYVNGNKVKSET
 VVHTTPEAPKPVPTTKEVPKTPEKVLPH TGEGLSILTVIGASILSVLGLSVLKKPKEN

SEQ ID NO:141

atgggagaaacaactctaggtctcgccaattcagctgatcagacgattgccttaaaaatgaagccaataatctgaacttgggttcaacagt
gcttcatgaaatgacgcataattatcgactttaagagtgccctctattcagaaacgactgaccgtaatacagatggtagtcttagtacggatcat
ggccttttcagataaccaagagttcttagatgtctaccatacctatgtgaccgaccggatggttggcttactatcgtgataacagcgaaga
gcttttgcgaagggtcagtcagtaatacatgcaccgtctcttggacaaccaactcgcacataattgccaatccttactggagatgccta
caatccaggtgatgggtcaggttagccatttgcggaaacagaatttatgttgcagcttatacaaccgtttattgaaatcccgagaaca
gctcaagttgtccatactctgtcactactcgcacaacagctccagtaaatggtaagttattacggagcaatgccagaggaaacaactaca
acaacaccttacaacagtttatgtgggagataccagtttgcctatgacctactggacagactgaccgtgtacaagcaggtgtcgtatgg
gacagaaacctatcgacgactactcactagatagcaataaccagttggttagcaactcagacggttattcaactcctctgtcaaaaatca
aattattacaaaaggcactcaacctaccgttggtagactagtttcaatgactattggttatacaagaagtcacagatgggtcattgggtgac
tggcaagttaacgttttggatgcaggtcaagatggcttaatccgtagcacaacaacctataggttgatcctgtgacaggtattgtgacacca
agtacaacagaagctactatcacagcaatgagaccaatgatgttcaataccaagttggttccgaaaagtgacagctattccttaccaaa
ccgttatgttagatagcttagcaactggaacacaagttattgtacaagaaggtgcaaccgttagctcaaccgagaggttccagttctta
taactttatccaagatggctcaaatagtcgattgacgctattgtctatgctagtcaggttgtttagctgccaagaccag
gtgatagcagtaggaggtaagaccaagtaactgaccaagctgtcgaacaaacgattttctatcaagaagttactgatgggtcattgggag
actggcaggttaagcttagatgcaggtcaagatgggttggctgtacaacgacaagctatagcgttgacctgtgacaggtattgtgaca
ccaagtacaacagaagcaactatcaccgcatgaaaccaatgattgttcaatacaagttgtaaatctaaacttagtccaatcctttcttg
acagagtataaactgatgtagcttagctgttggcttagaaaaagtcattcaagaaggcgtcggagggactcaaatcgagacaggtcaat
ccttaattttatcaagatgggtgcaaatctcattttgaaaacattgtctacagttcccaactatgttgtgctgctgtgatacaagtcatag
cgcgtggaacgaaagtagttgaagttgtagttgcagtagcagaagttgtaacaccgaaaccagaaacatcggaagtgataagtcctgaaa
aaggccaaacagctcactattacagttgaagctattaaagccccggctcagaaaaaggctaaagttgaagttgtacaactccaaaaga
aagtttgcaacaactggatgatacaaaaactcctgactctcatgcaagttcttattaatgagcttaggttaggacttaagaaaa
agaagacgaa

SEQ ID NO:142

MGETTLGLANSADQTIALKYEANNLNLVSTVLHEMTHIIDFKSGLYSETTDRNTDGSLSVMA
FSDTQEFLDVYHTYFDRPDVWSYYRDNSEEAFAEGLSQYIMHRLFGTPYSTYIANPYTGDAYN
PGDGSYSPFAETEFYFASLYNRLFYPRTAQVVPYLVTTTTTAPVNGQVIYGAMPEETTTTTTP
YTFVYVGDTSFAYDPTGQFDRVQAGVDGTETIRTTYSLDSNNQLVATQTVISSPVTQNIITKG
TQPTVVDTSPMTIVYQEVTDGSLGDWQVNVLDAGQDGLIRSTTTYSVDPVTGIVTPSTTEATI
TAMRPMIVQYQVGSEKVTAIPYQTRYVIDTSLATGTQVIVQEGVNGSSTESVQSYNFIQDGSNS
RFDAIVYASPVVAAQDQVAVGGQDQVTDQAVAKTIFYQEVTDGSLGDWQVNVLDAGQDGL
VRTTTSYSVDPVTGIVTPSTTEATITAMKPMIVQYQVGKSKLSAIPFLTEYITDDSLAVGLEKVI
QEGVGGTQIETVQSFNFIQDGANSHFENIVYSSPTIVVAVDQVIARGTKVVEVVAVPEVVT
KPETSEVISPEKGTAPTITVEAIKAPAQKKAKVEVVTTPKESLPTTGDDQNLLVTLMSLLLM
SLGLGLKKKEDE

SEQ ID NO:143

atggtgaaaaataacattcactcgagaaaaaacataatataaaaaatctcattattagcaacaagtgtattaacgacaac
 agttcaacagtctcagcagagcaattgcaaaatgaaaagcagtcggatttgccttagtaagatgacagaaacatctacgc
 ctcaactatcataagttcagaagacctctcaaacctcaaatcaagaggccaatcaaaaggatgagactgcctcaaaaagc
 ttacaacctatgattgaaaaagtcgatccatctcatatccaggctctttgggaaaaagtggcacaggggaaggagatgt
 cttagctgtcatagattcaggaattgaaaccaaacaattccatgctacagctccagaggatgctgacaaaaatgtacacag
 atcaagccagcattgacagtaagaaacaattattaggtattgaacgaggacagtggtataaatgataagctccccatttac
 catgattacacacaaggggaagagtctattgacagaaatacctaccatggaaccacgctgcagggattgcaactgcttc
 aggctaacacagaaagaaaaataaggagcaaatgcaaggcattgtcccaatgctcaattatttttaaaagtagggc
 aaccaagtgtagaaggtgaaagagaaaaagcattatgccatggctattaagatgctattgcttaggagcaacagctatt
 aatagagtttggacaagttggaaaagctagccatgaacttaataatgatattcaaaaaagccttagcattagcagcaga
 taaaggcgtcgtattgttgtgctgcaggaaatgattatgccatggggcagccagacgaaacctctgcaaaaaatc
 ctgatacaggtgtcattggaactccagcaactacggaggaggttttacagtagcagcattatggtgacccgactattgg
 agcagagtactatcggttactgacggtagcacatcaaaagccttggcgttgaaaaggctagctcattgcaaaaaataa
 ggactatgagctcattttctagaaaagggtattgaaaacggaaagagaaagcagaaagactgaaaaataagggttttagct
 tgaattatgactttgtaccaattccaaagaagttgctgaaaaagttgaggtttgggagcagctggtgactgtccac
 aataatcaagctaaaaaacgctcattctttagcttataatggtcctttacctatgggctttatcagtaaaaggatgc
 agattgggttaaaaacgatgacaagtcacagtttagattaaaaaaagagaagcaattagttgaggtgcctggtggcagac
 aatgacaaactttcaagctggggcttatacagttgatggcaataatgaaacctgatttgcctgcacctggctatgaaatt
 tattcaactactccaggaacgactactcaaaagatgtcaggaactagtgctgcaagtccacatgctatgggaattattca
 tttagtcgtaaacacattcagaaagaataacctcactaaagtctaaaggaacagttacagttagttagaacttattaa
 tgttactgccagtcctaatatttcagagtttagatcacagttactatctcttagggttcaaggagcaggggactggat
 gccaaaaaggccttgaaacagatgtttatgtaacagctggcgatggtctttcaaaaaatcaattaggtgatgtcaataa
 tcagttcgaattaagagtaaccttacataatttaagcaatcaggaaaaaaactttacttactttgcaagggtgcttactg
 acaaaagttgaaaagggcgctattctcttgcgtccacaagagctatatcaaacgagaccctccaagtaaaactagctccg
 aatcaaaagcaagaagtggttatcaaggttgatatttctaactttgatcaacagcttaaaagctcaaatgcctaacggtta
 tttcttagatgggtttgtagtatttcagctaaaggaaggtgctcaaaaagacttatactatccctttatcgtttcaaaag
 gaaaatttgcagatttagaggctcttgatagccaaattatcgaaatttagatggtacgttttactacagcccaaaagaa
 ggccaagaccttatgactttgaagtggatagatccaacaaaataaagaacaataatgactggcttataacaacatt
 tacgcttggctcactggttgaaggaagtaaatagatggctttcaccagagatggcttctgaaatttagcacgactgatt
 acctggctctataataaagaaggagataatacagttcgtcattccgatttgcgaaggcaaaccttatctagcactt
 tcacctaatggcgatgataataaggataaagtggaatttagaggtgtttcttaagaaatgtagagacatcaaaagcaca
 ggtatttgcagtgatgattgcaacatccgatttgggagagctctataaaaagctttgctaaaaaagatgtgaatacaaa
 atgatacaaaagacatgcttgaaaaatccggttgggaaggtaaagatgcttctggaaaatccggttacagagggatta
 tatcgatactgtgtaacttatacgcacttgcgtaaggggccaagaacagtttatgattttgatattctagttgatt
 aaccccgcaaaaactgccacaaagtgcaatcttgatgctagccgaaagacggattgagctaacagaaatcaagagactatt
 tatctcatgatacttactgtatcactttactataaataatggaacagatgatattaattcaccactttgaaaagat
 gatatgggacattttgtgataccaaaccaagttgaagatgaaactcagtgagagaagattactatcaatcttgataaaac
 tgatcatttcttctgtcagagaagatttctcaggtaattttagtatttagcctgtcacaattattgaacaatcatt
 cagatcaaatgcatcacttgaagagagtaagagtgatagaaaagaatctaatacaggtgatattagacacgaaaagcaa
 gaaaaatcttagtcaacaaactctactatcgacaccatcaattgatggccaaaaacaaaatgaccaattaatggttgaaa
 agagaaaagacattatggatgaaagtaagctgaaagaagtgagaaaaataagtttccaaaagttcccgttcaatcacgc
 ttaaggatggaactcttataccgagctcaataagccaaaaaacagcttcttaaaacagttgattcacaagacaatg
 acatttttagggattgccatgattttgggtggcatattacaagctctatggctacatttaaaaagagagat

SEQ ID NO:144

MVKNNIHSRKKHILKISLLATSVLTTTVSTVSAEQLQNEKQSDLLSKMTETSTPHTIISSEDLN
SNQEANQKDETASKSLQPMIEKVDPSHIQALWEKVGTEGDVLAVIDSGIETKHSMLQLPED
ADKMYTDQASIDSKKQLLGIERGQWINDKLPFYHDYTQC EESIDRNTYHGTHTVAGIATASGLT
QKENKEQMGGIVPNAQLLFLKVGQPSVEGEREKHYAMAIAIKDAIALGATAINMSFGQVGKASH
ELNDDFKKALALAADKGVAVVAAGNDYAMGGSQTKPLAKNPDTGVIGTPATTEEVFTVAAY
VAPHYWSRVLSVTDGSTSKALALEMASPFAENKDYELIFLEKGLETEENAERLKNKVLVNLN
DFVTNSKEVAEKVEALGAAGVLVHNNQAKKPLIPLAYNGPLPMGFISKEDADWLKTMSTSPQF
RLKKEKQLVEVPGGRQMTNFSSWGLSVDGNMKPFAAPGYEISPTPGNDYSKMSGTSAASP
HAMGIIHLVRKHIQKEYPHLSAKEQLQLVKNLLMSTASPIYSELDHSYSPRVQGAGALDAKK
ALETDVYVTAADGLSKIQLGVDVNNQFELRVTLHNLSNQEKNTYFARVLTDKVEKGRILLRPQ
ELYQTRPLQVKLAPNQKQEVVIVKVDISNFDQQLKAQMPNGYFLDG FVVVFSKEGAQKDL SIPF
IAFKGKFADLEALDSPIYRNLDTFYSPKEGQDPYDFEVD SIQQIKEQYMTGLITTFTPWSLV
EGSKIDGFSPEMASEFSTTDYLG SYNKEGDNVRRFRFVEGKPYLALSPNGDDNMDKVGFRG
VFLRNVRDIKAQVFASDDLQHPIWESPIKAFKDVNTNDIKESMLENTVWEGKDASGNPVT
EGLYRYRVTYTPLAEGAKEQFIDFDILVDLTPSKLPQSAILMLAERRIELTESRDYLSHDTYRD
RLYYKYGTDDINFTTFEKDDMGHFVIPNQVEDELSEKITINLDKTDHFFFVREDFSGNFSVIS
LSQLLNNHSDQMHSLEESKSDRKESENTGDIRHEKQENLSQQTLLSTPSIDGQKQNDQLMVEK
EKDIMDESKSERSEKNKFKVPASITLKDGTLYPQSISQKTSPLPKTVDSQKTM TFLGIAMLFGG
ILQVLWSYFKKRD

SEQ ID NO:145

atgcgattttgaaaggtaaaaaagttttctagctggttaggttggcagtcagtgacacttgctataatggtccaaccacaagcaaaa
aataagagtgatctgctgaaaccctagcttcagggcaaacacaagcatttatcaatcaaatcgcggtactgcaagccaaatcgcagctg
aacgagatttatatgcgctcagtcagtgattgcccgaagcgttttagaatctagtagtgcccaatcaggtttaagtcaggcgccatattataatt
ttttgggattaaaggaagtataatggtggctcagttacaatgaaaacttgggaagatgatggattgggaaaatccttatgaaattgatcag
gctttccgtgcctatccaagta tttatgattcccttatgattatgctaattgttaagttaccaacttatgtcggagcaagacgatctaatacc
ttatcttaccagaatgcaacagctgctttaacgggattatgcaacagataacttctataatgttaaattgaatgccattatacaaaaattatg
gcttgacagcatalgatgttgtaatacctgcagtgcaactccacaacagatgtccctagtgatagtggtgcaactgttgatactagccaata
cgtttggaaacaacacagagggaagttacacagatactagcaacttagcacaagacgatgcttggctcttttcataaaaggctat

SEQ ID NO:146

MRFLKGGKVFVLA VIGLAVMMTLVIMFQPQAKNKSVSVAETLASGQTQAFINQIAGTASQIAAER
DLYASVMIAQAVLESSSGQSGLSQAPYYNFFGIKGSYNGGSVTMKTWEDDGLGNPYEIDQAFR
AYPSIYDSL YDIANLLSSPTYVGARRSNTLSYQDATAAL TGLYATDTSYNVKLNAIHQNYGLTA
YDVVNPAVATSTTDVPSDSVATVDT SQYVWNKHRC SYTDTSTLAQDDAWSLFIKGY

SEQ ID NO:147

atgaaaaagataattcaaaagaaaatgggtcaaacgaacatccattgttttaggtatgttctgttagctctgattgccttaggtcttttatta
 ttcaaaagtcagccgtgattgatcggtatgttggctaaaagtaaaaagaaatggcggtcctttgaaaatattaaagcttttttagctgggat
 gataccgatgaaatcattacaaaatgatcaagcagcttttctcattccagccacttccaaaatcagagatttctcgttaaaaaagagctc
 aaaagtgaacagcctctgataccagatatacattaaagccattggatcgttttggattttccggattatcgggtagccatgaaaccaatgt
 cactaaccttaaaaacgaatgacctaaatggatctgctttaaatacagaaaaaagtagcaacataatcggaaaaatttacgacagaa
 ttaaaaagggttaccatttctgactacagtgaagatcaatgggacttacaaagataaaaaaaatcaagttactaaaaaaatgagggg
 caaaaaccagtagatttatctgttacatttaagaattttacagtaagcagtaattctacagaaggtagcttttttgacgaggaatcgc
 gtcggtactctaaaaaatggctcagatcaagtcacagactatccattactaaatggtagcaaaagctttgtaaaaagaaatttccagatggg
 gagctcaagagtgaaaaagctgacctgaacaggttctgaaggttctgaactgaagttacggctgataatctcttagatcgactaaag
 ctggagaataatcttttagctgttttaatacaactgatggcataatacaagtagccgacaagattcaacgacagttgcagatgtcttcaaaaatg
 gcgtaaaaacagattttataaaaggtttaaaagaaagtgtgaaagcaaaatggaaacagatagtcgcaaggcttctagtttgccattcca
 aatgttgcctaaatgccatgacgcaagtcggcaaggagcttacctcttagattttggcgtacataatgatttgcctatccaaaagaaaca
 gacctgaaaaaggcagttcaggttaacatcattcaaggttaagtgacaactaacgtcaaaaaatcaggagatcgttatgtgattagtc
 aagctggtacaaaaataatctctgtgaccagtgaaaaaaataatataaaaaaccgtcattactgccagatggcattggaacttgaa
 gggaactaaagacgacattacctatacgttgaccatttctgaggatggaacagtaacacgtcataatcgattcaaaagatccgaaaaagct
 gatgaaagtagaacgcaaaaaatcacgaagaccgaagaaaagaaatccaggagatttccaggttatatcaccccagaactgatagctc
 aattctcatcattgggtgggtgattgggtggtgtaacaatcaagtagcctatggccttcaattagatggcaatcaatcaaacaccgattaattggc
 aaacaggtatggataaggactttgattttcgaaaccggcaccaggtttaccttaacgaaacaa

SEQ ID NO:148

MKKIFQRKWFKRTSIVLGIALLVALIALGSFYYSKSAVIDRYVVAKSKKNGCSFENIKAFVWDD
 TDEIITNDQAAFASFTPLPKSEISSLKKELKSATASDPVYIKSIGHRFWIFPDYRVAMKPMSTL
 KTNVPNMDLLLNQKKVATSNSENFTTELKRLPIADYSASINGTYKDKKIKVTKKYDQKQKPV
 DLSVTFKNFTVSSNLTEGELYFDEDRVGTLLKNGQYQVTDYPITNGSKAFVKRNFDPDELKSE
 KADLEQVAEGSELKLTVDNLLDRTKAGEYLLAAFNQLMAYTSSRQDSTTVADVFENGVNNDF
 YKGLKESVKAKLETDSRKASSFAIPNVALNAMTQVGKESYLLDFAATYDFAYPKETDPEKGS
 GNIIQELSGQLTLKKS GDRYVISQAGTKNISVTSEKNNIKKPSLLPDGIVGTWKGTKDDITYTLT
 ISEDTVTRHIDFKDPKKADESRTAKITKTEEKNPQDFQVIITPETDSSILIIGGIGGANIKYAY
 GLHLDGNQLTPIWQTMGDKDFDFSKPAPGLPLTKQ

SEQ ID NO:149

atgaaacatacaaaaaaattgttacgggatttgaacgcttgcatctgtccttacccttgagcaatgttctcaacaagtgacaatacaaaa
 gtagttaccatgaaaggatgataccattacagtaactgattttataatgaagctaaaacgtaacagcggcacaacaatccatgttgagttt
 gattttatcacgtgtctttgaaaaagaatatggtaaaagtgtccctgagaaaaagggtgaggaaatctataataaaacagctaacgagtac
 gttctcttctcctcagatgctttagcacaggcaggactgacaacggacacctataaaaaacaaaatcgcactacaatgttagttgaatgag
 gtaaaaacagctgcaaaaaaagaactaacagatgataattataaaaaagctttgaaatcataataccctgaaatgacaacacaagttatt
 gcttttgatgatgaagaaaaagccaaaaagtttagaagaaacaaaagctgaaggtgctgactttgctaacatcgcaaaagaaaacac
 gactgaagccaataaaaaaattgattacacctttgattcagccgacactgttttaccaagtgtatgattaaagaaacagcaaaatataatg
 aagtgaaaaatcagctgttattacagttatggattcaagaactatcagaaaaaataatattgtggttcaattagtcaagaaagctgagaa
 aaaagcagattgaaagaatacaaaatcacgactaaaagaaatcattatgaaatgaaaaggaaaacgacagtaacttccaaaacaaagtg
 atttcaaaaacttagataaggcaaatgttaaaaataaagacaaaagcctttgcaaaatcttctgacaaatttgccttaataaaaaacaaatc
 caacaatgctttaacaagttcagtaggtaaa

SEQ ID NO:150

MNTSKIVTGFVTLASVLTAAACSSSTSDNTKVVMTMKGDTITVTDIFYNEAKTSTAAQQSMLSLIL
 SRVFEKEYGKSVPEKKVEESYNKTAKQYGSFSDALAQAQLTDTYKKQIRTTMLVEYAVKQ
 AAKKELTDDNYKKAFESYTPMTTQVIAFDDEEKAKKVLEETKAEGADFANI AKENTTEANK
 KIDYTFDSADTVLPSDVIKETAKLNEGEKSAVITVMDSRITYQKKYYVHLVKKAEKKADWKE
 YKSRLKEIIMNEKENDSNFQNKVISKTLTKANVKIKDKAFANILSQFASNKNNTNNALTSSVG
 K

SEQ ID NO:151

atgaaatcattggcaaaaaattatcgttagcggagcaagtttaacacttgcaagtacacttttagtgggctgtgcttctgactcaaaaggaaa
aacagaatcagcatcatcagattcaaaaacaattaaattgtgggtccaactggggctaaaaaatcttatgcagatactgttgcataattg
agaaagattotggttataaagtaaaagttattgaaatcagaagatccaaaagctcaagaaaaaatcaaaaaagatgctactactgctgctg
acgtatcttcaacttctcagaccaacttggtcaattagtagaatctggaactatcaagaagtaccagaacaatacactaaagatttgcg
caactgcgactgatcaagcaattgtagtgctcaatataaaggcaaaaacttatgcttcccatgggaattgaaatcacaagtcttttctataa
taaagaaaaattaagcgtgaagatatcgcatttatgatgcaattacaagcaaaagcaacatttgggtggtacctcaaaaagctaatgctt
acgtaactggctcttattcatgtctgttgtaacacattgtttgggtgaaaacgggtgaagatactaaaggaactaactggggtaacgaaaa
ggctgctcagctacttaaatggattgctgatcaaaagaacaacaaggatttggtagcttagatgctataaacgttatgtctaaatcggtga
cggttctgtagcctcattgaaatcaggtccttgggattacgaagctgcacaaaaagctatcggtaaagacaaaactgggtgtgctgttatacca
aaagtgactatcgggtggaagaagttcaacaaaaagcattccttgggtgtaaaattatcagctgtaaaccaagcactgctaaaggtgatac
taaagctattgcagcaagctataaacttcttacttaacgagtgctgaaagccaagaaaaatcaatttaaacacgctatacgtactcgc
taacaaagagattcaatcatcagaagaagttcagtcacaaatgaacttgctaaaacagttattacaatgggatctcaaaagattacacagtt
gtaatgcctaaattaagcacaatggcaacattcggactgaaagtgagctattttaagtgaactttcaatggtaaaatcaagaa
gctgattacctaactaaaattacaacaattgataaagatacgtctctacaaaa

SEQ ID NO:152

MKSWQKIIVSGASLTLASTLLVGCASDSKGTKTESASSDSKTIKLWVPTGAKKSYADTVAKFEK
DSGYKVKVIESEDPKAQEKIKKDATTAAADVFSPLPHDQLGQLVESGTIQEVPEQYTKDIAATAT
DQAIVGAQYKGGKTYAFPPFGIESQVLFYNKEKLSAEDIASYDAITSKATFGGTFKQANAYVTGPL
FMSVGNLTFGENGEDTKGTNWNKGAAVLKWLIADQKNNKGFVSLDANNVMSKFGDGSVA
SFESGPWDYEAQAIGKDKLGVAVYPKVTIGGEEVQQKAFLGVKLYAVNQAPAKGDTKRIA
ASYKLASYLTSAESQENQFKTRHIVPANKEIQSSEEVQSNELAKTVITMGSSKDYTVVMPKLS
QMATFWTESAAILSDTFNGKIQEADYLTKLQQFDKDIASK

SEQ ID NO:153

atgaacaagaaattattggctcttggttagcttcagtagctataattaagtttagctgcattggcaaccgtgggtgctcaaaaactgataagca
aagatgctaaaacagatttaaaagctgctattgttactgatacaggtggtggtgataaatacatttaaccaatctgcttgggaaggttag
aagcttgggtaaaagaaatggccttaaaaaagggtgctggttctgactacttccaatcaaatagtgaaatcagaatagctactaatctgac
actgctgtctcaagtggttataacgtagtataatggaatcggatttcccttaaaagatgcaattgataaaagctgctggtgacaaatagtgatgtt
aactatattatcgttgacgatgtcatcgaaggaaaagataatgttgcaggtgtaacttttgggataacgaagctgcttacttctgctggtatt
gctgcagctaaaactacaaaaactaaagtagtaggtttgttaggtggtatggaaggtactgttactactgctttgaaaaaggtttgaggc
gggagtgaaatcagttgatgattctatccaatcaaaagttgactacgctggatcatttgggtgatgctgctaaaggtaaaacaattgccgag
ctcaatagcaggtggtgctgacgttattatcaagccgctggtggtactggagcaggtgcttcaatgaagctaaagctgtaaatgagaaa
aaagatgaagctgataaagttgggtaatcgggttagaccgtgacaaaaagaggaaggtaaaatcacttcaaaagcggtaaaagaaatc
taactttgttagcatcttcaattaacaagttggtaaatctgtacaactgattaacaaactgttactgataaaaaatccctggtggaaa
aacaactgtttatggattaaaagatgggtggtgattgataatgcaacaacaaccttctgataatgctataaaagctgttaagaagctaaag
aaaaaattattctggcgatgtaaaagttcctgaaaaataa

SEQ ID NO:154

MNKKFIGLGLASVAILSLAACGNRGASKSDSKDAKTDLKAAIVTD'TGGVDDKSFNQSAWEGL
EAWCKENGLKKGAGFDYFQSNSESEYATNLDTAVSSGYNVVYGIGFALKDAIDKAAGDNSDV
NYIIVDDVIEGKDNVASVTFADNEAAYLAGIAAAKT'KT'KVVG'FVGGMEGTVITRFEKGFEG
VKSVDSDSIQIKVDYAGSFGDAAKGKTIAAAQYAGGADVYQAAGGTGAGVFNEAKAVNEKKD
EADKVVWIGVDRDQKEEGKYTSKDGKESNFVLASSIKQVGKSVQLINKLVTDKKFPGGK'TV
YGLKDCGVDIATTNLSDDAIKAVKEAKEKIISGDVKVPEK.

SEQ ID NO:155

atgaaaaaattacttgcacattagtggtgattttcagcacattatcattgattgcttgttcacacaaagcacaaagcaagaagatcataaa
 acaaaactatcacaaaatgcaaagatctctggtttacctataaagggaaggtaccagaaaaccctaaaagagtagttagttatcttcaac
 ctacaccggttattggcaaagctcgatataccactagttggaatcactcttatgatcacaaaatcccgtcttaagaaatacatcaagga
 tgetaaagttgtctctgcaaccgacctagaaagcattacggccttgaacctgatttaattattgtgggtcaaatgaagaaaaatacagtc
 attagctgaaategctccccttattccattgaaataccgcaaacatgactattacaggtattctcagattttggtaaagctttaacaaaacca
 aagaaaccgacaaaatggttacaggaatggaaaaacaaaacagcttctttgaaagtgacgttaagcagttacaggtataatgctacct
 ttaccataatgggattataatgagaaagatactctctttcggtaaagattggggctgctgggtgaaaatcattaccaagcctccaatac
 aagctccagaaaaagtaaaaaatggagggtttcccaaaaaggctattgtccattcacagaagttctccagattataatgggtgattatgctg
 ttgctgctgcagaggatgaaaaaacaggttctctcttatagaaagtgaccttggaaaaataaccagccgtcaaaaaaaatcagtccata
 aatgtaatgcgaataacctttatttactgacctctgtcattagagtagaattaaaaaccttaacggatgctactctgactcagaaaactc
 acaac

SEQ ID NO:156

MKKLLVTLVLIFFSTLSLIACSSQSTKQEDHKTCLSQMPKISGFTYKGVKVPENPKRVVLSSTYT
 GYLAKLDIPLVGITSYDHKNPVLKKYIKDAKVVSATDLESITALEPDLIIVGSNEENISQLAEIAP
 LISIEYRKHDYLVFSDFGKVFNKTKETDKWLQEWKTKTASFESDVKAVTGNNAFTTIMGLY
 EKDIYLFKDWGRGGEIHHQAFQYQAPEKVKMEVFPKGYSISQEVLPDIYIGDYVVVAEAEDEK
 TGSSEYDLWKNIPAVQKNHVINVNANTFYFTDPLSLEYELKTLTDAILTQKTHN

SEQ ID NO:157

atgaacaagaaaattattggtcttgggttagcttcagtagctataattaagtttagctgcatgtggcaaccgtggtgctcaaaaatctgtagca
 aagatgctaaaacagatttaaaagctgctattgttactgatacaggtgggtggtgatgataaaatcatttaaccaatctgcttgggaaggttac
 aagcttggggtaagaaaaatgggcttaaaaaagggtgctggttctgactacttccaaatcaaaatagtgaaatcagaatagctactaatcttgac
 actgctgtctcaagtggttaaacgtagtataatggaaatcggtattgccctaaagatgcaattgataaagctgctggtgacaatagtgatgtt
 aactatgttatcgttgacgatgtcactgaaggaagacaatggtgcaagtgtaacttttgggataacgaagctgcttacttctgctggtatt
 gctgcagctaaaaactacaaaaactaaagtagtaggtttgttaggtggtatggaaaggtactggtatcactcgttttgaaaaagggtttgaggc
 gggagtgaatcagttgatgattctatccaaatcaaaagttgactacgctggatcatttgggtgatgctgctaaaggtaaaaacaattgccgcag
 ctcaatatgcaggtggtgctgactgattttaacaagcctggtggtactggagcaggtgcttcaatgaagctaaagctgtaaatgagaaa
 aaagatgaagctgataaagttgggtaatcggtgtgacccgtgaccaaaaaagggaaggtaaaacacttcaaaaagacggtaaagaatc
 taacttgttctagcattctcaattaacaagttggttaaactctgtacaactgattaacaaactgttactgataaaaaattccctggtggaaa
 acaactgtttatggattaaaagatgggtggtggtgatattgcaacaacaacctttctgatgatgctataaaagctgtaaaagaagctaaag
 aaaaaattattctgcatgtaaaagttcctgaaaaataa

SEQ ID NO:158

MNKKFIGLGLASVAILSLAACGNRGASKSDSKDAKTDLKAAIVTDTGGVDDKSFNQSAWEGL
 QAWGKENGLKKGAGFDYFQNSSEYATNLDTAVSSGYNVYVYGIGFALKDAIDKAAGDNSDV
 NYVIVDDVIEGKDNVASVTFADNEAAYLAGIAAAKTTKTKVVG FVGGMEGTVITRFEKGFEG
 VKSVDDSIQIKVDYAGSFGDAAKGTIAAAQYAGGADVYQAAGGTGAGVFNEAKAVNEKGD
 EADKVWVIGVDRDQKEEGKYTSKDGKESNFVLASSIKQVGKSVQLINKLVTDKFKFPGKTTV
 YGLKDGVDIATTNLSDDAIKAVKEAKEKIISGDVKVPEK.

SEQ ID NO:159

atgaataaaaaattaacatcccttgccttattatcagctgctattaatccattagcggcatgttctcataaaaggccaaaaatctgctctttatc
agattaaaaagtagccatgattactgaccaaggggtgttgatgataaaatcccttaaccaatcagcttgggaaggcttacaagcttggggca
aatcaaaaaattgaaaaaggaagtgatttaattttccaatcaaccaatgaatcagaatgtgacaaaaccttgatactgcaaagtc
aaatggttttaatgtcatcttggatttggcttaacctgactgattctataaaaaagcgtctcttgataacgcagatacaaaaaacgctatt
gtcgtatgatgctattgaaggaaaagacaatgttgcaagatcacttttggcacaacgaagcagcttacttagctgggtgtgcggctgctaa
aaccagcaaaaagcaaacagttggttttagtgtaggtggaaggaaccgttgaacagtttgaaaaaggctttgagcaggtgttaaa
tcagttgatccctctatcaaaagatcaatcgcttacgcagggctatttgcggatgctgctaaaggaaatcaattgcagcaacacaatagca
agtgggtgctgatgctatctcaagcagcaggtggaacgggtgctgggtcttcaacgaagccaaaagctatataaaaaagctgcccgttc
agataaaagttgggtccttgggtgtagaccgtgaccaaaaaagctgaaggatgatacactgataaagatggctcaaaaaggaaactttgtcctt
gctcaagatcaaaagaagttggtaaacatgcaaaaagctattggatgactgaaaaaggtgactccctgggtgtaagtaaacctt
tggtttaaaagaatcaggtgtaaacctcaccacaaaagatctccagaagatgttaaaaaagcagttgaaacagcagcccaagacattatc
tcaggtaaaatcaaaagtcaccagaaaa

SEQ ID NO:160

MNKKLTLALLSAAIPLAACSHKGQKSASLSDLKRAMITDQGGVDDKSFNQSAWEGLQAWG
KSKNLKKGSDFNFYQSTNESEYVTNLDATAKSNFNVIFGIFNLTDSEIKKASSDNADTKYAIV
DDVIEGKDNVASITFADNEAAYLAGVAAAKTSKSKQVGFVGGMEGTVVKRFEKGFAGVKS
DPSIKVSIAYAGSFADAAGKKSIAATQYASGADVYQAAGGTGAGVFNEAKAINEKRAASDKV
WVLGVDRDQKAEGEYTDKDGQKGNFVLASSIKEYGKTMQKVMTEKGFDPGGKVNTFGLK
ESGVNLTTKDLPELVKKAVERARQDIISGKIKVPEK

SEQ ID NO:161

atgacagtagcacaatactacatttaagcgttcggcctaggagctgtaaacactgcttcagcagccctattgatggcttggtaacaag
acagcagcaaaaaatgatacaaaaaatgagattaactggtacacaccaacagaactcatcacttttagacattcaaaaaatactgacactt
attctggtcttgaactcggttaactcagaagtaacttacttctggttgacggaaaagggaaaattgcaaccagacttagctaaaaagtaga
agtttcagaagatggtttaacttactgcaaccttgagagatggttgaaatgggtctgacggaagtgaaataacagcagaggactttggtt
acacttggaaacgtattgtagaccagcaactgctcagaatattgctacttagcaactgaatcacattataaatgctgaagatattaata
caggtaaaaaacactgatttaaatctcttgggtgtaaaagccgaaggcaacaaagttaactttacattgagtgcaacctgctcctcaatcaaga
gcttatgtcatttggtaactcagcctcaaaaagaagaatttggtaactaaacaggaaaagactatgggtactctctgaaaaacaattt
attctggccatcattgtaaaagattggaatgggtacaagtggttaactcaaatagtttaagaatgacaaaatagggagctcaaaaacgtt
aaaatgaaaaactattaacgttcaaacagttaaaaaacagatacagccgttcaaatgtataaacaaggaaaacttgattatgcaaacatt
tcaggaacatctgctatatacaatgcaaacaaaaacaacaagagcgttggccgtattagaagcaacaactgcttatagggtatacaatca
aacaggtctgtaccagcattgagcaaccttaagattcgtcaagcattgaattagcaacagaccgtaaggaattgtgctgcagcagtggtg
atactggttctaaaccagcaacagcaattgctcctactggacttcaaaaacttaagatggatctgatttaactaaattttagctcctggta
taaaatgtagtaaaaagaagcaggaaaaactttcaaaagaaggacttgcgtaactcggaaaagattctcttaaaattacaattaccgctgat
gcg
gatgcaccagcagctaaatcttcagttgactacattaagaaacttgggaaaaagctttaccagggaataacagttgaagaaaaattgttcc
atttaacaacgtttagaagatacaaaaaataaaactttgaagttgctgtagcactttgggtgggtgactatccagaaggatcaacttct
atggtttgttaaatcaggttctgcatataactacggtaaatcaccatgcaaaaattgatgctgcttataaaaaagcttcaacaaccgatg
cattagatacagacgccagcagtaattgattataaagaagcagaaaaagctctttatgtagaagcaactataaccacttactccgtagc
ggagaaggattacaaaatccaagtataaagggttaattcgttaattcaacaggtcttaattgtgactttacctatgcttataaaaa

SEQ ID NO:162

MTVAQKSTFKRFLGAVTLASAALLMACGNKTAAKNDNKNEINWYTPTELITLDISKNTD'TY
SGLAIGNSESNLLRVDGKGLQPD LAKKVEVSEDGLTYTATLRDGLKWSDCSELTAEDFVYT
WKRIVDPATASEYAYLATESHLLNAEDINTGKNTDLNSLGVKAEGNKVIFTLAPAPQFKSLL
SFANFMPQKEEFVTKTGKDYGTSSEKQIYSGPYIVKDWNGTSGSFKLVKNDKYWDAKNVKM
KTINVQTVKPKDPAVQMYKQGLDYANISGTSIYNANKNNKDVVPVLEATTAYMVYNQ'TGS
VPALSNLKIRQALNLDTRKGI VSAAVDTCGSKPATAIAPTGLAKLKDGS DLTKFVAPGYKYDE
KEAGKLFKEGLAELGKDSLKITITADADAPAAKSSVDYIKETWEKALPGLTVEEFVFPFKQRL
EDTKNQNF EVAVALWGGDYPEGSTFYGLFKSGSAYNYGKFTNAKFDAAYEKAL'TDALD'TD
AAANDYKEAEKALYDEANYNPLYFRSGEGLQNP SIKGLIRNSTGLNVDFTYAYKK

SEQ ID NO:163

atgaaaaaatggttttaataattaatgcttttgggaataattggtgtgctactcaacctcaaaggttcagcaataaccggttatgattccg
actactacgctagataatgatacccgatgaaaataaaataacatttgccataaatgttgatggtttgtcgaaggtagtaatacaagaaatc
cttattagaggaattcatcatggttttaacagatcaaaacaaaagattgttacaaggccgagttgtagacgctattagacatcaaatggt
tcttctacaattggattatcctatgaactagtcgactttgcgcctgatgcacaatttaacacaagatcgacggctttatttgccaatcaaa
atgagggaatccgtatcacttgaagatactattcaagaataccttttaaaggcgatgttatttcagaaaacgggttgaagaacctatca
ctcatctactgagactgctaataattgagtataaagttcaattcgcgactaaagatggggaattccaccactacctatgtagactacgg
agaaaaacatattggagaaaaattaacctctgacgagtttcgaaaaattgcagaagaaaagctttgcaactctacctgactatgatt
gatcaaaaagaatatactatcattaacacaattctcttggtcaactccaagataatttcttcaagatcattcagctacgaaattcaag
ataggcaacgtatcatggctaaggaccacaaaatccggaaaagaactcgggtgaaactcaaagtattgataatggttttgagaaatacctatt
acaaaaaaagtataaacct

SEQ ID NO:164

MKKWFLILMLLGIFGCATQPSKVAITGYSDYYARYIDPDENKITFAINVDGFVEGSNQEILI
RGIHHVLTQDNQKIVTKAELLDAIRHQMVLLQLDYSYELVDFAPDAQLLTQDRLLFANQNF
EESVSLEDTIQEYLLKCHVILRKRVEPITHPTETANIEYKVQFATKDGEFHPLPIFVDYGEKHI
GEKLTSEFRKIAEEKLLQLYPDYIMIDQKEYTIKHNSLGLPRYYSYQDHFSYEIQDRQRIMA
KDPKSKELGETQSIDNVFEKYLITKKSYP

SEQ ID NO:165

atggaattcgaaaacacaaaaatctaatacagattaaaacaacacttgcttaacgtcaacactcgcacttcttggaaactgggtgttggtatggg
 acataccgttaatgcggtatgacatgacaactgctgatcaatcacctaaattacaaggtgaagaagcaacattggcgcctacaaacattgaa
 gatactaaagcagccattgatattaaaacagctacattagcagaacaaaccgatgctcttaatactgtaaatgagacaatcacaagcacia
 atgaagaattagctactttagaaggaggcttagctgataaaagaacagcagttgcagatgctgaaaaaacattggagctgttcaaattgc
 ctcagaagaagaatttaatacattagcagaacaaaaaaagctgacttagctaa aactcaagaggagctaaaactgtgaaagcaacia
 aagaagaagttgcaacacaggtattgacacaactctgacgaggtaacagctgcagctaatgaagctaaaaaaatggctgaaaaagttgca
 caagcagagacaaaagttcagacttgacgaaaaatggcaatcaaccagagcaataacagctcaagttgaaatagaacaaaaacaatgt
 caaaaatcatttcggaagatttagcaaaaagccaaaactgatttagttgctgtaacagataatatacaaaaacacaattagcaaatgatttagcg
 actgctcaatctagcttaagtgcacaaaaatgaattagctaaagtacagtcacaaacaagtaattgctgcagtgaaatgttatgggtgcta
 ataaaaatgggtgctccaactaattacccaatgaatgaaatcaaaaaatgaatgcaagttggttacattgggacacaactcttatctaaataca
 ttctatgcttttaaaagatcaactggtttctaaagcagaagttggggcatacttaaatcattacggtgatacgcagtgacttaaacgtatcg
 ttaaccagataacttateagttgaggttcaaaatgaattgctgtatttgacgcaacattgatttaattctgttcgtaacaatttggtctttct
 gcagtcgaagtgacgcaaggtgctcaagagtttgcctgcacttgactcgaaactataagtaacacatggaaacactgttctttctttaat
 tacaatcaacct
 ggcaagaatggtcatatagcattggtccacacgatagaacaattatcgaacaagcagctacaagttggttggcttaaaagctaatgatgata
 atatgtatgaaaacatcggaattctttgatgagtctactgttaattggtatcaaacgtagatttaaacagtattaagtacatgctgtttac
 agacttcacctatggaaatatactttggacatacgggttaacttggctgcttctgataaaacaaacccaagtgctcggctctatttaggagttca
 acagaaactgttgggtggttaaaatcccactatggtatcttcccggcaagcaataattgtaaatgccagcaattcagcaacaagttggttca
 ggtccattaacaacagttgataacagtgctaaaaatagcactctcaagcaagattactctgttgagctctaaaatcaaaccttacaacaaa
 cgtattgcaaaatattcttcagaagcactagttgctctgcacagagaaaaagtagatggtttagctgcaaaactcaaaaagctgaatctaa
 cgttgaaaaagcaaaaagctcaactcaacagttacaagattcaaaaagagattacataaacaactgcttttcccttcaactcogtaagg
 atttaaaaaggtcaactgacgaatcgcttgttccactaaatcagctctaaaaatcttttacatagcttagaagaaaaacaaagtaagtgga
 agtcaaaatcaactgcttgcattgaagaaggcacaactgaaaaagaactagcctttaaactctcatccaaaatcgtgaaaaagttgcaaaaag
 aaaaagttgaagaggctcaaaaagcattaacagaaaccttatctcaaaataaaactaaaaaagctatctaaatgatttaacacaagaaa
 aagcaaaatgagcgtcagcaatcaacaactgaacaacaaatggtttgttgaagaatcatttagcaaaatcaagttggcgaatgctccaaa
 aatcagcagatattgtccaaaagatcagaaaaaataagagtaagacctgagtttctgatacaagagagaaggcagtagatactgctcaaga
 agcgacaattctgctcaagcagaacaaatggctgaagaagctattcaaaatctgcaaaaagccattgttgcaaatgctcaaaaatggtgca
 aagag
 attatgaaagtagcactgaagtaaacctgatcaaggagttggtgcaaaagttgcagataatattaagaaaaataatgccccagcaag
 aatcatatggtgcaagttcaacacggttaggaaatgctactctcaccagatgaaagtaacaaaacgtgctttaaagagcaggaattggtat
 gctggcagcagcaggacttactggttcaaaactcagaagagatggcaaaaaataa

SEQ ID NO:166

MEFENTKSNQIKTTLALTSTLALLGTGVGMGHTVNDMMTTADQSPKLQGEETLAPTNIED
 TKAIDIKTATLAEQTDALNTVNETITSTNEELATLEGGLADKETAVADA EKTLESVSNASEE
 FNQLAEQNKADLAKTQEELKLA EATKEEVATQVLTQSDEVTAANEAKKMAEKVAQAETKV
 SDLTKMVNQPEAITAQVEIEQNNVKIISED LAKAKTDLVAVTDNKTQLANDLATAQSSLSAK
 QNELAKVQSQTSNVAVNVMGANKMVAPTNYPI NEIKKLMSSGYIGTQSYLNTFYALKDQLVS
 KAEV GAYLNHYVDIASDLNRIVNPDNLSVEVQNELAVFAATLINSVRQQFGLSAVEVTQGAQE
 FARTLTRNYKVTHGNTVPPFFNYNQPGKNGHIGIGPHDRITIEQAATSVGLKANDDNMYENIGF
 FDDVHTVNGIKRSIYNSIKYMLFTDFTYGNTFGHTVNLLRSDKTNPSAPVYLGVSTETVGLN
 THYVIFPASNIVNASQFSKQVVSGLPTTVDNSAKISTLQASITSVESKIQT LQKRIANISSEALVV
 SAQRKVDGLAAKLQKAESNVEKAKAQLQLQDSKEDLHKQLAFSLSTRKDLKGQLDESLVH
 LNQS KILLHSLEEKQSQVASQINVLTLKKAQLEKELAFNSHPNREKVAKEKVEEAQKALTETL
 SQIKTKKAILNDLTQEKA KLTSAITTEQQIVLLKNHLANQVANAPKISSIVQRSENNRVRPDV
 SDTREKAVDTAQEATILAQAETMAEEVITNSAKAIVANAQNV AQEIMKVAPEVTPDQGVVAKV
 ADNIKKNAPASKSYGASSSTVGNATSSRDESTKRALRAGIVMLAAAGLTGYKLRRDGGK

SEQ ID NO:167

atgaaaaattattagcttgatgtaaatggctttttctatctcctattctgttattagctactgaaaaatctatactattccaagtacaacc
 attcatcaattgtctcaaaacgtgtaacttctagtagctattttaaagcaattcctaaaaatccaaatgtctacgatgagctcaaacatata
 gtgatcaatctttaaacaattccaagtgagggtcttaaaccaaatgatgattttataatcaataatctttgttaaatacaaaaataattaccaat
 tttcaattagcaaatggacaatttatttggcaataaaaaagttcatttgaagacgaaacaactaatcaaaccaatctcaatagttggtt
 gtggctacaaaagattttacaatctatgaagaacctctgtaaaaggagtttacctattaatagtgatttaaaccttattcaaaagtca
 tttacaaaactatcacaaacacagcatggaaa ttttattatattgaaaacaaaggtgggtttctgagaaaatctctcaaaaagctgata
 acagaatggtaaaagttcaagaaatgctgagtcacaaaataataaaagaaaatttctattttgttaacaattaacaacacagacaa
 gtgcaggaatcaatgccgataaattaatgtattctgcaagtagtctaaatagcaaccttactatgtcaaaaataagattgaaactggta
 aaacttctttaatcagaccttaaaatatactgatcaagtaaacattttaagggtgactatgatccatcaggagtggttaaacttcaaaa
 acgtcagataatgagaattactgttgatgatttataaaagcagttgccagcattctgataatgttgctacaaaataacttggetattatc
 tagetaatcaatagatagagatttctctactcaaatgacagctatctctggatataatgggatatggaagaacggatgttatctcaaaag
 cagcagcaaatgtaatggaatctatctactcaaaaatggacctatgtttcttataaacaatactgattttgacaatcaacgtaattctaa
 aaatattgctgtaccagtagctcaaaaatgggtgatgcctatgattataacatgatgttgcaatagttatagtgactcg
 ccattctatctatcgatttttagtgagaacgcctctatgatgatattactgcaatgccgatggattttattctataattgaaa

SEQ ID NO:168

MKKLLACMLMVFFLSPISVISTEKSISFPSTTIHQLSQNVLTSSYFNAIPKPNPNVYDELQTYSD
 QSLTIPSGVLKPNDFFIINNLLLQNNLPFQLANGQFILANKKFIYEDETTNQTNLNSWLWL
 QKDFTIYEPLVKGVLPINSDLPYSKVHVTKLSQTQHGNFYIENKGVVSEKYLKADNRM
 VKVQEMLSQKYNKENYSIFVKQLTTQTSAGINADKLMYSASIAKLATLYYVQNKIETGKTSLN
 QTLKYTDQVNHFKGDYDPSGSGKLPKTSNENYTVDDLLKAVAQHSDNVATNILGYLANQY
 DRDFSTQMTAISGINWDMEERMLSSKAAANVMESIYYQNGPIVSYLTNTDFDNQRISKNIAPV
 VAHKIGDAYDYKHDVAIVYS DSPFILSIFSENASYDDITAIADGIYSILK

SEQ ID NO:169

atgattagaaaaagaaaattttaa aaacgttatattagctttggaattttgggatttgagctggcattgttagctctgttttgccttttcaag
 taagaaagtagatacagaatcatagtctaaaaaatcagaatctaaagttgttaaaaatgtaacaaaatcaacaatcaatcactcttcaact
 caaaaagttgaagcatcaacagaacaaagttctcaagtcagaacaagctacacctgatactcagttggctactcaatcagtagcttag
 aacaggttgctcaaccaacaccgacacctcaactgaggttgcaacaacaggttgaccagctcagctagttccaacaactcaatagctg
 caactccagtaacttattatcaaatcaaatggaaatactgccggagctattggtagtcaggctgctgctcaa atggctgcagcaaacaggtgttc
 ctcaatcaacttgggaagctattattgctcgogaatcaaacggtaacccatattgtaagtaatgcatctggctgctgtttgtttcaacaat
 gccaggaatggggttcaactgcaactgtacaagatcaaatcaatctgctatttcagcatataatgcacaaggcttatcagcttggggttatta
 a

SEQ ID NO:170

MIRKENFKKRYISFGILGFAVALLALVFAFSSKKVDTESYAKKSESKVVKNVTKSQSTSSSTQK
 VEASTEQSSSSQEQATPDTSVATQSVPEQVAQPTPTPSTEVAQQVPAQPSVPTTQYAATPVT
 YYQSNNGNTAGAIGSQAAAQMAAATGVPQSTWEAIIARESNGNPYVSNASCASGLFQTMPGWG
 STATVQDQINSAISAYNAQGLSAWGY

SEQ ID NO:171

atgaaatcaatcttaataagtcggattggcttgactgtttcggtgttttctgattgtctcttttaacagcagcttcaaatagttatcgaa
actctgcaaaccaagcatagcagcccaatcgaaacctataccacaaccta tcagatgttctatogatacaaatatgacagcgacaagtac
tttatcagtgagtactctacggggcacaagtctattgacctcaaccaaccgggttaaactggattccgaggttaaacctgatacccgtaatt
ttaaaaatcgtcgcagacttaacagatagcaagcctggaaaagcaactgttctcttaaagtcaataacctacctctggcgtggcagccaaa
gtgacccagataaaaatgaccatcaccatcggcaagaaagcacgtaagaccttaatgtcgtaggaagtgtcgatccaaaacaagtggca
acaggttatgaattgctctcaatggacacaggcattgacaaaagttgaagtgaccagtacagagcttaagattgattgattgatcatgtcgtt
gccaaactacctgacgatgttaattaaatgacagactaccgaggagaagtgactctcaagcagctctcagcagatggaacgggttttagcca
gtccatttcaccagccaaaacgaccttatcgggttcagtcaaaaaaatcaccagctgttccaataagagtttcaatggtaggaaccttg
atgaaagcttggcggatattcagccaaaacttgaaaagaaacagctgtcattcagggccaagagaagttctggataccattaatgaagt
ggtagcggaaagtcaatttagtgggtgactaaagatacggaaaaaacggttagcctccattcggatattgataccattgaacctctctcgt
gccggttcagttgacaacccaaaagaaa

SEQ ID NO:172

MKSFFNSRIWLGLVSVFFAIVLFLTAASNSYRNSANQAYSPIETYTHNLSDVPIDIKYDSDKYFI
SEYSYGAQVYLTSTNRVKLDSEVNTDTRNFKIVADLTDSPGKATVPLKVNNLPSGVAKVTP
DKMTITIGKKARKTFNVVGSVDPKQVATGYELLSMDTGIDKVEVTSDESKIDLIDHVVAKLPD
DVKLNADYRC EVTLQAVSADGTVLASSISPAKTTLSVSVKKITKSVPIRVSVMVGTMDESLADIQ
PKLGKETAVISGPREVLDTINEVVAE VNISGVTKDTEKTVSLHSDIVSIEPSSVPVQLTTKKK

SEQ ID NO:173

atgaagccatcaaatcagaaaaactattctctatttgagtcttttaacattaatcttgcaggtagttttttattctttgcaagaacctat
atcggaacgccttaacacaaaaagaaacacaaacagttcaaaaaagtaatatgtaagcaaggccattgacgccttagaaaaagctga
gaaaaatccaagcttgaagcaattgaaaaagctgagaaagccattaatcagttgaaaaaaactgatactaagttacgtctccaagagcg
actaaatcaactaaaaaaagctttctccattgaaaaggaaagccattaaagcacttgaggaggctgaaaaaaatcctagcttgaaccaa
agacaaagctaaagaagccattgataaaattggaaatctcaccacaaaaaaatgagctcttaaatcogattaggagcaattgtcattcagat
caagcacctgaatcaagctccacatcgtcagaagctgcaagtgcacagactataagtgatgcaaacacaggaaatgcagaacaagcaacc
atthtgaaagtccggttgcaccagctgaaagctatgtctcaagccccgctcaaaagttggagaacctgtccaaccgcaacccaagt
actctcgcgaagccctgaggctccaagctactctccaactgtctctcgcacagatacccaagtgaatcaaccctaatcca

SEQ ID NO:174

MKPSNTEKFLFLILLSLTLILAGSFYLF FARNHIGNALTQKETQTVQKSNMLSKAIDALEKA EKN
PSLEAIEKA EKAINQLKKTDTKLRLQERLNQLKKA FSIEKEAIKALEEAEKNPSLET KD KAKE
AIDKIGNLTKKNELLNRLGAIVISDQAPESSTSSSEAASD TTISDANTGNAEQATIYESPVAPAE
SYVPQAPAQSVGEPVQPATPSTPAPSPEAPSTPPTVPATDTPSESTPNP

SEQ ID NO:175

atgaagaaaaaacacttgcatgatgggattggcaggactagtagcaggcggtcaactctatcaagccaaagcagtttagcagaccaa
gaaaaactcaaagtggtaaccacttttatacctgtttatgaatttacaaggtgtggtaggtaaagagggagatggttccatgctgatgaa
ggctggaaactgagccacatgactttgaacctcaacaaaagacattaaaaatacaagattcgcaagcctttatattatggatgacaac
atggaaacttgattccagaagtgaaaaagctattaagtcgaaaaagtagcctataattgaaggtactggcgacatgttattagcagctg
gaacggaagaaggtcacgatcatgaaggagaagatgatcatcatcatgatgggaagacaaacatggcatgaagaacatagtcataaaa
aaagttaatgccaacgcicaagcctataatgaaaaatgaaaaagcttgaatgggaatatacagaaacctttatcattgctaaacagaag
agttttgtgacgcaacacgcggcatttggatataatggcattggattatggcttgaatcaggttctattaatggatctcagcagagagtgaa
ccatcagctaacgctattgctgaattgtctaaatattgtaaaaaatgataattaactatactattttgaagaaaatgctcaaataaagta
gctaagactcttcaaaatgaagcaggtgtcaaagctgttgttttaagccctcttgaaggttgacccaaaaagaaaatggataagggagaag
attactctctgcatgctgataatttaaaagccctcagttgacaaccgaacgcgaaggttaaggaaaatgaccagaagaagatgcaagt
aaatctgtttataatggttattcaagattctgaagtcaaaagaccgtaaattaagcgaatggcttgggtgattggcagctccgtatccatact
tacaagatggtagccttgatcaggttatggattacaaagctaaaaaggtctaaaggtgaaaaatctgcgaaagaatcaaaagactattacga
aacaggt
tataaaacagatgtcaacaagattcaaattgatggcaaaaagaaaacatcacctttgaaagaaaatggggacaagaaaacctttacttat
cagtactcaggcaagaaaatcttaacatatgaaaaaggaaaccgtggtgctcggtataatgttgaaactaaggataaagatgcggggcga
ttcaaatcattcaatttagtgatcatggcattgctcccgaaaaagcaggacattccacatttatgggggatcaaggacatgatgccatt
gcttcaaatgggatcattggccaacttactatggttctgatataagtggtcgtgaaattgcccaagaaatgaatgctcat

SEQ ID NO:176

MKKKTLVMMGLAGLVAGGQLYQAKAVLADQEKLKVVTTFYPVYEFKGVVGGKEGDVSMMLM
KAGTEPHDFEPSTKDIKKIQDSQAFIYMDDNMETWIPEVKKAIKSKKVAYIEGTGDMLLAAGT
EEGHDHEGEDDHHHDGEDKHGHEESHKFDPHVWVLSFYRSISVVEHIRDSLKSKYPEKAEK
FNANAQAYIEKLLKLDSEYTE TLSSAKQKSFVTQHAAFGYMALDYGLNQAINGISAESEPSA
KRIAELSKYVKKYDINYIYFEENASNKVAKTLANEAGVKAVVLSPLEGLTQKEMDKGEDYFSV
MRDNLKALQLTTEREGKEIDPEEDASKSVYNGYFKDSEVKDRKLSDWSGDWQSVYPYLDG
TLDQVMDYKAKKSKG EKSAKEFKDYETGYKTDVNKIQIDGKKKTTFERNGDKKTFTYQYS
GKKILTYEKGNRGVRYMFETKDKDAGEFKYIQFSDHGIAPEKAGHFHIYWGDDQGHDAIASKW
DHWPTYYSGLSGREIAQEMNAH

SEQ ID NO:177

atggcaactacaaaaaaataacatctttatcacttttgacctttatcacttgcacttttcagcaactcaatattctaaagtctatgcaca
agatcctgagtcacctcatcagtcacatattaaaccaatgatggctcagttagctattgctgacaaaagaggcagagccattatacaaaagaaa
tggatagttcaaatgagtatagaaaaaaataggcaagccgctttaaacctgctgaaaatagctattacaacagaaaatcaacaactgga
aaatcttaatgaaactctattagaaaagtttatcagaaaaatggcaatcgtatctggaataactaaagaagaagcactcaatataatagta
agacaactctttcacttctgaaaaagagctattaaaggactactttaataaagatgaggtattgcaaaaaaaatataaagaaaaatgactt
actcattgatcaagagacagctcaatataacgcaaaactggctatcctaactcagcaagctgataaaatattgaaaaacacgggattacc
aaagatatctggcagcttactataatgcaaacaggaatggaagcagattaa

SEQ ID NO:178

MANYKKITSLSLTLLSLATFSATQYSKVYAQDPSSSSVNIKTIDGQLAIADKEAEPLYKEMD
SIQMSIEKIKASRFKPAEIAITTEIQQLNENLNETLLEKFKYQKIGNRIWNTKEEALNLSKTTLSPLS
EKELLKDYFNKDEVLQKLLKENDLLIDQETAQYNAKLAILTQQADKIYEKHGITKDILAAYYM
QTGMEAD

SEQ ID NO:179

ttgaaatctaaaaagtcttattgtttattattagcaccgtttgtctggcttcattttggcagtcгааагаtggtgtctgcttcagaaaatcgccaat
caaaacgtgacagttgattcaagtgcaaaataaacaatgcatctcaagttgtctacttcaaattagatatacaattccagaaagctacttctgaa
gtaactgttttggatcagtcgacaaaatttagtaacagaaaaatgtagtccaagaaaaggcgctagcatcatcagaaaatacaaacagatgag
agtatcatagatcatctccatcaggtgacctcagtgcttcagaaagataacacactttctgaaagggaatgctttaacagcagtaggggcagta
aaatctagtttcaatcagttactgatgtaacagcaatctcaaaactgtaaacagaaaacggctgttcttttagctgctcaagtagca
gagcccgtactgcaactgtagatgacaaaaggtattagcatcaatataatgaggcgattccacaagatacaagcaattttaattgctgtctgg
ggtgataaacaagatcagaatgatttggctgtgataatgcatcatcaactggctatgcctagtgtgattttcacgccataaagaatagga
ttataccatattcacttaigcaaaacgcaatggcaaatgtaggaattagcgccttcaagtcacactttgacaccacaaattactagtc
aaatcgctcaaaaggatgccaactcttcacaattacagatccaatgcccctctacaatcaccagtgtaagattccagtttggacagataa
aaaaaggctttatcacattcattttatggctatagtacaatttgggtagtcagattggacttgcagccaaaacctcaataatgtggata
gtgcccaaatgctacagatcagttgtaattatgccgaaaacaaaacctttaccgttaattgttgcggttctacaaaatacaaaaagtat
taacaggtgttcaaaatcgagatggtctgaaacaaaaggcaggaatgattaaaaatggtataagcctctgtttctgggaat
agtgtagtcagtgattgattgttctaaatcatagtaataaccagtgatcaatataatttcaagtttatacggattactgatggaagtcgtg
ttggaacgaatttagggcctataaaattgttaagaaattctgctgtctgtaaacctaacgtaacagttcaaaaattaccaagtgacaag
gggtacttgaaagtcaggttcaggaaaggtagtaaaagcaatctcaaaaaataagcgtagcagcatggtcagcttctaatacaaaaaatctcc
attggtatcaagaaattccaatagctggcaagagacgattataaagtcattcaagcctaccatgatttttagttggaaattactgcttc
atacttataattgattatcaggacaagtcacgagatggctcaatctaggaaattatgaatttctgttaaagttggccttctgcttcacaagg
aattatgatattgcaataaggtcattacctagatgctggctatggcggttatgatccaggagcagtttattttgggacatctgaaaaaac
cttgaatttgcaaatgcaaaccttggtaaaaagtaaaatagaatctcaaggctacacagtcgtaactacaagaacagatgactcctttacag
atttgcctccagcttcggaaaaagcaataaacagctcttcagatctcttggtagcctccattttaaatgcctctacaagttcggcaagcctctgga
attgaaactattactatgaaactacgaagagatctctcaccgattatgagattttcataatgactctgaagctttgagtcgaagtagtg
ttttagccgaagctattcagggcgaccactgctaaaactggcgctaaaaacaatgggttttgagaaaatcatttgcagatataagagaa
acaacagccccagcagtgtagtagaattaggttacatgcaaaatgctagcaggttccaaaaatattagcaatgtgaactcaagaaaaat
tagcacaaggaattgtttcagggattttatctattatacaaacctacagttt

SEQ ID NO:180

MKSKKSYVLLLAPFVLASFWQSKMVSASEIANQNVTVDSANNMSSKLS'TSNLD'TIPESTSE
VTVLDQSTNLV'TENVVQEKALASSEIQ'TDESIIVSSPSGDLSEDNTLSEGNALS AVGAVKSSF
QSVNTDVSSNLKTAKQETVVS LAAQVAEPVTA TVDDKGISIQYNEAIPQDTSILFAVWGDKQD
QNDLVWYNASSTGYAYVDFSRHKEYGLYHIHTYAKRNGNMYGISALQV'TLLTPQITSQIAQKD
ANSFTITVSNVPSTITTSVKIPVWIDKDDQNDLIWYNARQVSKGTYQVLVNTANHNNEKGLYHI
HIYGYSTILGSQIGLAAKTFNNVDSRPNATVSVVNYAENKTTFTVNVVVGSTNTKVLTVGVQIAV
WSETNGQDDLKWKPLVSGNSASQVIDVANHSNTSDQYIIHVYTDYTDGSRVGTNLGAYKIV
KEILPVVKPNVTVQNYQADKGLLEVQVQEGSKAISKISVAAWSTSNQTNLHWYQEIPIAGQETI
IKVNQAYHDFLVGNVTVHTYIDYTDKSRDGFNLGNIEFPVKVGLSASQGNVDIVNKVIYLDAG
HGGYDPGAVYFGTSEKTLNLQMQLTVKSKLESQGYTVV'TTRTDDSFTDLLRSEKANNLSLD
LFVSLHFNASTSSQASGIETYYYEYEEYPSRINEIFHNDPERLSRSSLVAEAIQAATTAKTGAK
NNGVLRNTFAVLRRETTAPAVLVELGYMSNASEFQNISNVNYQEKLAQGVSGILSYYQ'TYSV

SEQ ID NO:181

atgaaaaaaagaagaataaatggaggtttttatgattaaaaatgagaaaaatcacagttgtcagtcagcttgcctttttgccttactaact
tttgcggttcaactattatgccttacaacgaatcaaaaccaagctgggcaagaagtccaacaagatagcttctgtcagcagctcatttac
aagctcagaaaccttttagatattgctattcagataccagctcaactggctaaggagggtcaagcaaaagtggaaattgcttgatcaaca
ggtcaggtcaaaaataccattagctatgacttgaagcaggatggacacaaaatgctagcctggtttgacatgacaggttaccacaagtggtg
attatagtgtaaggttacctacaatggcatcagccaacaatcatcaccattcactattaa

SEQ ID NO:182

MKKRKNKWRFFMIKMRKSQLSVSLALFALLTFAASPIYALQTNQNQAGQEVQQDSLAVTAHL
QAQKPLLDIAIQIPALAKGGQAKVELLDQGTGQVKN'TISYDLQAGWTQMSAWFDMTGYPSGD
YSVKV'TYNGISQSSPIHY

SEQ ID NO:183

atgaataccaaaaaataatgcaatttatacttgcaattaccgtgactctattgcaactgtcggtatgaaaacggtagctgaaagttttgg
gctgggcatcatgatattgaaatgattaatcgaacacatgacactttgtctaatcgcatataaaacaaaaatcagaaaaatcagatttaaa
cgcaagcatttcaacttaaaaacagataattgcttctcaaaacagccaagttagcgcactgcaacaacaatcaatccaagctaatattgata
aacaaaatgagatcaatcaaaaaatgaaatcaacgctaaaaatgacagaaggtaacaaaaggtgcccgaacaaactggaagt
gatgcccaatcaaaaaatgacagaattgaaatcaacaagatcctcattacaagataaattgaaatcaaaaatgattctcaagcattaagag
atgttcaaaacactcgtcaaaaatctgataaagctgttttagaaacggaa

SEQ ID NO:184

MNTKKIMQFILAITVTLFATVGMKTVAESFWAGHHDIEMINRNIDTLSNRIKTKNQKISDLNA
SISTLKSDIASQNSQVSALQQQLIQANIDKQNEINQKINEINAKIAEGNQKVAEKQLEVDANQ
KIAELNQVSSQLDKLNQNSQALRDVQNRQKSDKAVLETE

SEQ ID NO:185

atgaagaaaaaaacttattttgttctggaatcactgtaacctgtggtactgcattggcgattcattatcacaccaaagtcaatacca
atgacaaaaacaggacatgagaaaaatgattcaaaaatcccccaactaatagtgatgataaaatctaggaaaaagataagggtattgctggt
atgattatcctactagtgtgatttaactagataagcaatctaaaaatcatttctaaaacagacacaggaaattattgtctcatggagat
cattctcactttatttttataaagatttgaaagggactgcatgttcaatataaccaaattggcgttcaaaactaaacttataatagggtg
atacaaatgaatcgataaaatggacatgggcatcattatgtttcaatccaaaggatattgttgacagaagatgcttttggtatactgtcagac
atgatgatcatttccattatattttaaaatctagcttaggaatgaccctetattgtgaccaactataatcaaggcctcatttccaaagggatag
tcattacaacctaattgttcaaggaatccaggtcttgattttgctacctctgattggtttcaatttgatggttagcgggaattgtaggtaaaaca
aatgatagtattttggttagtcacgatgaccatcttcatccatttctggttgatgatttaaggaaaacaggttggggagagatagcaaaatt
tatgagaaaagagaaaatgcaactcccccttagctatgtagcaagcaaggaggacttgggtcaaaagaccatagaataatagcgaatacat
tggccttaccattatcatctattgaaaataatcaaaactgacgatggtaaaaatggggtttaaatacctcatcatgatcatagccatgcatcat
gttagaagatatacgaatcggtaaaccaatccagatcctcatcaactcatcatgcaaaagaattggaaaagcatcgcattggcatgaata
cattaagggagatcgctttgatgaagaagtcattcttgatattgttagaacctatgacaaaacagaatttccatcaaatgaaaaaaa
tccgaaaaagatgaaggagtggttgaccacagttacaaaatggatttaggaagccgaaaagacccttgaatcgatttggacttcat
ttattacetaatctagagaatttaggaatggctttacacctaataaaaatattggagcctgtctacaatttaaaaaataaaacgactgta
atgacagcaactgggttaaaaactatgattttctgaagtacatgcaaaatcttgaggattagataatcacaacaaactaaaggattt
gagcttttgacgcctataaaactcaatctattagctgccgagataacaaattacaactgcaaccatagcggactgccaagtt
acaatttttagtattaaagtaataaagataaaagatttgagtcattgaaaaaatttaacaaggcttcaagaagttcatattgagaacaatc
tggtcagagatttaacccctttaaatagacaaagaaaaacttaaaagttttaaactatccgaaaaataggggagttgacttaagactttgagg
ttaccgcttcttgagacacttaccgtaataaagcatctttgacggaattaaactttttgaaactaatcctaactgactgaagtaacagcaa
caaaaaatgctattcagaaaatagatggcattgagaaagcaaaagaaatgcaatttttagatttgcaagaaaataaggttaatcatttaaa
cattaaggaacaaagagtcactaacttcttgaaatcttctgataatgcattggaatcgcctgaagggttaaatgactttacagctttgga
gacattaagagtggtcatcaataaaatctgagcttacacctggaagaaagcaatcagcaagtaaaaagcttagatgtcagttataatcaa
ttgcaaaaggaggaatcaacattaatgaaaacgacataacccttggtgttctcatcattttacagcgggttaaggaagggtcaatagagg
ggaatccctctcaaatgatgttttagaaagtcaaaaatcaaaagaataataaaaaagaa

SEQ ID NO:186

MKKKTYLFFVAGITVTCGTALAIHLSQPKSIPMTKSGHEKMISKSPTNSDDKSRKKDKGIAGIDY
PTSDGFKLDKQSKIISKTDTGIIVAHGDHSHFIFYKDLKGTAFAYLIPNGVQITKPLIGDTNESI
NGHGHYVFNPKDIVAEDAFGYTVRHDDHFHYILKSSLGMPMLTNYNQGRHFQRDSHYKP
NVQGIPGLDFATSDGFQFDGSGIVGKTNDSILVSHDDHLHPISFDDLKRTGWGEIVKIYEKREI
ATPLSHVASKEDLVQKTIEYLAKSLALPLSSIEIKTDDGKIGFKYPHHDHSHVIMLEDIEIGKPI
PDPHQLHHAKELEKHRIGMNTLREIGFDEEVILDIVRTHDAKTEFPSNEKNPEKMKEWLTTV
TKLDLGSRKDPLNRFGLHLLPNLENLIGFTPIKNMEPVLQFKKLKRLMTATGVKNYDFLK
YMPNLEGLDISQNNLKDLSFLTPYKQLNLLAAADNQLSTLQPLAELPKLQFLVLSNNKIKDLS
PLKNLTRLQEVHIENNLVRDLTPLNDKENLKVNLSENKRVLDKTLRLPLETLTVNKASLTD
LNFFEANPNLTEVTATKNAIQKLDGIEKAKKLQFLDLQENKVNHLNIKEKQESLTFNLSDN
ALESLEGVNDFTALETLRVASNKISSLHLEESNQVKSLLDVSYNQLPKEELTLNENDIPLGVA
HHFTAVKEGSIEGNPSLNDVLESQNKNNKKE

SEQ ID NO:187

atggcaattatttacctgacctccatatgcata t gatgctcttgagccacaaattgataaagaacaatgactcttcatcatgacaaacatc
atgcgacatatgttgcta atgccaatgctgcgcttgaaaaacatccagaaattggtgaagattggtggcgttattatctgatgtgtcatcaa
ttccagaagatattcgtcaagctcttcaataatggagcggacatcttaacatgcactttttgggaactctttcacctgagaaaacaga
aatcacttcggaagtagcttctgctattgatgaagcatttggttctttgatgcatttaaagaaaaattacagcagcagcaacgggacgttt
ggatctggttgggcttggttagttgtcaataaagaaggaaaactgaagtaactcaactgcaaccaagatacaccaatttctgaaggta
aacagcctattttgggtcttgatgtatgggaacatgcttattacttaaatatcgtaatgtacgtccaaattacattaagcttctttgaaatt
attaattggaaaaaggttgatgagctttataaagcagcaaaagcg

SEQ ID NO:188

MAILPDLPYAYDALEPQIDKETMTLHHDKHHATYVANANAALAKHPEIGEDLVALLSDVSSI
PEDIRQALINNGGHLNHALFWELLSPEKTEITSEVASAIDEAFGSFDFAFKEKFTAAATGRFGS
GAWLVVNKEGKLEVTSTANQDTPISEGKQPILGLDVWEHAYYLNRYRNVRPNYIKAFFEIN
WKKVDELYKAAKA

SEQ ID NO:189

atgagaaaacattatgtttcaaaaagtgccatTTTTtagccatggttagtgcacacaggttcagctcaatcgtaaaagctgagacaccaaca
actacaactagcccagcaacaagtcttactgatgcctctgcaagtacgactccaacaacgaacacgacgtcaactgtgacacctgctcttgat
ccaaatactaatttcacogttgattctagtgtctacaacaagtaactactccaagtcagtgaggcagcagccatctctctgtgtagcaa
ctgtcaacctacaactaatgtcactagtgttagccttgcccagcagctaacacaaaggcaacaactcagttgaaggccaaacagttgat
gtgcgcatcatctcaaccactgacctcactctaaacttagtcaactatgattactatcaagataaagcaatcactatcggttagcgaaaag
ctgccgttctatcgatcaagcaaaagctgaaaatcctaatgtctgtctgttgataaacggcgatacttacaaggtaaccactcggaaactta
tgaagcattgattgatcctttacaaccaggtgaagtgcaccaatgtacgcagcccttgataaactggttttgacgcttcaacttaggtaac
cacgaattcaactatggccttacctcatcgaaaatgccattgcttcagccggactaccaatcctaaatgctaactctttagtgcagcaacgg
gagaatacctttccaaccttacgctatcgttacgaaaagctttacggatgctaaaggcaagctgacacctaaaatcggtatcacaggtta
ttgtgccacctcaaatcatgctttgggataaggctaacctogaaggtaaaagttacggctcaagaagcgtgacagaaatcatt
cctaccatcaaaaatgctggcgctgacatcgttttagctctgccacactggatcgggtgatgatttatgaaaactggtagaagaaaatgtc
gtaaccagattgcaagcttgcgtggttgacgcggtcgtaacaggtcactcacaagcaaatcccttcaggacaagataccggctctacg
aatcctataatgggtcgcagcggggtgctggttaattaacggaacacctggtaccatggcagggaaaatcaggggatcat
atcggtattattgattaaatgtgtcctatacaggtggtaaaaggactgtaaatcgcgataaaaacctgcagaaaatccgtaaaattgatacc
aaatcaaccatcgccgatgctgataatttagctttggctcaagcatctcactcctggaacaattgattacgtgctcaaacctggtgtaaaaca
ctgcaccaataacagttactcgttttagtcaaatgatcctctgttcaaatgtcaataatgcacaacttgggtatgcaaaacaacaatt
agctggtactccagaagctgacttacctctcttccagcagcagcaccattaaagctggtactcgtatgacccaaccgcttactgatatcc
cggctggaccaattgccattaaaacggttcccacctaacttataatgataatgtcactgctatcctaaaactgacaggtgcagatacaaaag
aatggtagagatgcagcaggacaatttaataccatcgacccaatgtagctggacctcaaacctagcaatcaggattatagaacttac
aactttgatgtgattgatggcgttacttacgagtttgatgtaacacaacctaaacagttatgatgccaaggtaatctcttaccctaatgcta
gtcgtgtcgtaaccttaaatccaaggtaaagaaatcgatccaaatcaagaattcatggtgtcactaataactaccgtgctagtggaagtt
tcccagggttaaaaaatgcaaccaataatcgatgcttaacctgaaaaatcgacaagccatcaatataatcgctttctgaaaaaaccatta
accaagtgagataacaactggtactttgcagataaccatcaaggacttgattacacttcttaagtgcagatacttctaagaatttaattgg
tgacaaagctgataattcttataaccggccttctactatgaaggtttggtgactcgtcttactatagtttaaaccagaattaccagtagcca
ctccggaaacaccacaagaaactggtagccaattgactgaaaacogctgcaagaaatcaatcaattagctacgcgtgtttacaatcaaca
aaagcgacatcaatcaagtaactaaaggctgaattacaaaaagctggtagccaagagtctaaaggttattctctcatg
ggcttaagcttacttggtttagccggattaatcacgaaaaagaagaagacaaa

SEQ ID NO:190

MRKHVYVSKSAIFLAMLVATGSAQFVKAETPTTTTSPATSLTDASASTTPTTNTTSTVTPALDPN
TNFTVDSSATTSTTTPSPVEAAAISPVIAAQPTTNVTSASLAPAANTMATTPVEGQTVDVRIIST
TDLHSNLVNYDYQDKASQTIGLAKAAVLIDQAKAENPNAVLDVNDGILQGTPLGTYEALIDP
LQPGEVHPMYAALDKLGFDASTLGNHEFNGLTFIENAIASAGLPILNANVFDAATGEYLFQP
YAIVTKSFTDANGQAVDLKIGITGIVPPQIMLWIDKANLEGKVTVKDAVQAVTEIPIKKNAGADI
VLVLAHTGIGDDVYETGEEENVGYQIASLAGVDVVTVGHSHEFPDQDTGFYESYNGVDGVS
GLINGTPVTMAGKYGDHIGIIDLNVSYTGKWTVNRDKNHAEIRKIDTKSTIADADILALAQAS
HLGTIDYVRQTVGETTAPINSYFALVKDDPSVQIVNNAQLWYAKQQLAGTPEADLPLLSAAAP
FKAGTRNDPTAYTDIPAGPIAIKNVADLYLYDNVTAILKLTGADIKEWLEMSAGQFNTIDPNVA
GPQNLVNTDYRTYNFDVIDGVTYEFDVTVQPNKYDAKGNLLNPNASRVNLFKQGGKEIDPNQE
FMVVTNNYRASGSPFGVKNATINRLLNLENRQAIINYVSEKTINPSADNNWYFADTIQGLDL
HFLSADTSKNLIGDKADISYTGPSITIEGFGDFVFTYVVKPELPVATPETPQETGSQLTENRRQEI
HQLATRVYNQTKATSSSTTKAELPKAGSQESKGLFFMGLSLLGLAGLITKKEERQ