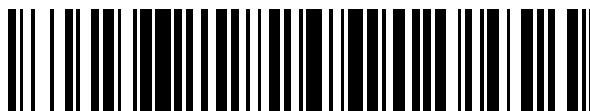


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 831**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2009 PCT/GB2009/051321**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2010 WO10041056**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2009 E 09748131 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2352519**

54 Título: **Composición que comprende proteínas de superficie ancladas por sortasa de Streptococcus uberis**

30 Prioridad:

06.10.2008 GB 0818231

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

17.06.2019

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NOTTINGHAM (100.0%)
University Park
Nottingham, Nottinghamshire NG7 2RD, GB**

72 Inventor/es:

LEIGH, JAMES

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 716 831 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

Composición que comprende proteínas de superficie ancladas por sortasa de *Streptococcus uberis*

- 5 La presente invención se refiere a una composición inmunogénica para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra *Streptococcus uberis* y, en particular, a composiciones inmunogénicas capaces de inducir una respuesta inmunitaria protectora.

10 *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) actualmente es responsable de aproximadamente un 20-30 % de todos los casos de mastitis en el Reino Unido y tiene una incidencia similar en todo el mundo. La mastitis sigue siendo la enfermedad infecciosa más importante desde el punto de vista económico de las vacas lecheras en todo el mundo. Se ha estimado una pérdida anual debida a la mastitis clínica en el Reino Unido de aproximadamente 170 millones de libras y de entre 1,5-2,0 billones de dólares en los Estados Unidos. Estas pérdidas pueden atribuirse a una reducción en la producción de leche, a los costes asociados de tratamiento y al sacrificio de las vacas persistentes e infectadas repetidamente.

15 Los microorganismos que producen mastitis pueden dividirse en los que muestran una vía de transmisión contagiosa, tales como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* y los que infectan además la ubre con frecuencia desde un depósito ambiental, tales como *Escherichia coli* y *Streptococcus uberis*. La aplicación de diversas medidas de control durante las dos últimas décadas, basadas en prácticas de ordeño mejoradas, desinfección de la ubre después del ordeño y tratamiento antimicrobiano intramamario de rutina después de cada lactación, ha resultado eficaz contra patógenos con una sola vía de transmisión contagiosa, pero tiene poco o ningún impacto sobre la incidencia de la infección de la glándula mamaria desde depósitos ambientales. El fallo del control de la mastitis bovina causada por *S. uberis* se atribuye en gran medida a la insuficiente información sobre la patogénesis de la infección.

25 La mastitis bovina, que produce inflamación de la glándula mamaria (ubre), normalmente se produce como resultado de una infección intramamaria por bacterias. Los signos de mastitis varían de acuerdo con factores en el hospedador y el patógeno invasor y la infección intramamaria puede producir una enfermedad subclínica o clínica. La mastitis subclínica, por definición, no muestra signos obvios de enfermedad. La infección asociada con la enfermedad clínica puede variar desde anomalías visibles en la leche (agregados de proteínas o coágulos) acompañadas de dolor e inflamación en la glándula afectada, hasta la producción de una secreción que está compuesta únicamente de proteína agregada en un fluido seroso. En los casos graves, puede haber signos sistémicos tales como una temperatura elevada y pérdida de apetito, que pueden evolucionar hasta bacteremia o septicemia y ocasionar la muerte del animal.

35 La leche de una glándula mamaria no infectada contiene leucocitos, incluyendo macrófagos, neutrófilos y linfocitos típicamente por debajo de 150.000 células/ml. La infección normalmente produce una respuesta inflamatoria localizada, caracterizada por la entrada de neutrófilos en el cuadrante infectado de la glándula mamaria y la leche. El recuento resultante de células en la leche se usa internacionalmente como medida sustituta de la infección de la glándula mamaria y como una medida de la calidad de la leche y la salud de la ubre. La leche de cuadrantes infectados subclínicamente normalmente tiene un recuento celular superior a 250.000 células/ml, pero esta cifra puede variar ampliamente. La leche de cuadrantes infectados clínicamente normalmente contiene más de 2.000.000 células/ml. La interacción entre bacterias y/o sus productos y el gran número de neutrófilos en la secreción se ha considerado la causa principal subyacente a la tasa reducida de producción de leche, degradación de la secreción y la inducción de cambios inflamatorios generalizados característicos de la mastitis.

45 Leigh *et al.* (2004) se refiere a la identificación de factores de virulencia de *Streptococcus uberis* que pueden ser candidatos útiles para la inclusión en una vacuna.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una o más composiciones que pueden usarse para inducir una respuesta inmunitaria protectora contra *Streptococcus uberis* y, por lo tanto, prevenir o reducir la incidencia de mastitis.

50 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende las proteínas ancladas por sortasa de *Streptococcus uberis* SUB1154 que consisten en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO 7, SUB1095 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 y SUB0145 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO 2, o una proteína con un 95 % o más de identidad de secuencia con la misma, en donde la composición es capaz de inducir una respuesta inmunitaria, cuando se administra a un sujeto y en donde la composición inmunogénica es capaz de inducir una respuesta inmunitaria dirigida a un antígeno presente en la composición y actúa previniendo o reduciendo la infección por *Streptococcus uberis* en un sujeto al que se ha administrado la composición inmunogénica.

60 La referencia al porcentaje de homología se refiere al porcentaje de identidad entre dos secuencias alineadas. El porcentaje de identidad se refiere a los restos en dos proteínas que son iguales, cuando las secuencias de las proteínas están alineadas para una correspondencia máxima y cuando se tienen en cuenta inversiones y translocaciones. Preferentemente, el porcentaje de identidad ignora cualquier diferencia conservativa entre las secuencias alineadas que no afectan a la función. El porcentaje de identidad entre las secuencias alineadas puede establecerse usando herramientas bien establecidas (tales como el algoritmo BLAST - Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, (1990) J Mol Biol. 215:403-10).

65 Una composición inmunogénica es una composición que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra un

antígeno presente en la composición cuando la composición se administra a un sujeto. Preferentemente, la respuesta inmunitaria inducida es protectora. Preferentemente, el sujeto es un mamífero, más preferentemente un rumiante, tal como una vaca, oveja o cabra. El antígeno presente en la composición inmunogénica de la invención puede ser una o más proteínas que están ancladas a la superficie de *Streptococcus uberis* por la enzima sortasa.

5 La respuesta inmunitaria puede reconocer y destruir *Streptococcus uberis*. Como alternativa o además, la respuesta inmunitaria inducida puede impedir o prevenir la replicación de *Streptococcus uberis*. Como alternativa o además, la respuesta inmunitaria inducida puede impedir o prevenir la enfermedad que causa *Streptococcus uberis*, tal como mastitis, en el sujeto. Preferentemente, la respuesta inmunitaria inducida por la composición también es capaz de
10 dirigirse a cepas de *Streptococcus uberis* distintas de las cepas de las que derivan las proteínas en la composición.

La respuesta inmunitaria generada puede ser una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos. Normalmente, una respuesta inmunitaria incluye, aunque no de forma limitativa, uno o más de los siguientes efectos, la producción de anticuerpos, linfocitos B, linfocitos T auxiliares, linfocitos T supresores y/o linfocitos T citotóxicos,
15 dirigidos a dichas una o más proteínas inmunogénicas en la composición.

La composición también puede comprender uno o más antígenos adicionales, además de una o más proteínas ancladas por sortasa de *S. uberis* o una o más proteínas de *S. uberis*. Los antígenos adicionales también pueden ser capaces de inducir una respuesta inmunitaria dirigida al organismo patógeno del que derivan. Los antígenos
20 adicionales pueden proceder de *S. uberis* o pueden proceder de un organismo patógeno diferente.

La composición puede usarse para inducir/producir una respuesta inmunitaria protectora cuando se administra a un sujeto. La respuesta inmunitaria protectora puede hacer que *S. uberis* se destruya tras la infección de un sujeto, o puede prevenir o inhibir la replicación de *S. uberis* y/o que produzca una enfermedad en un sujeto.
25

La composición puede usarse como una vacuna profiláctica o una vacuna terapéutica contra *S. uberis*.

También se desvela una composición farmacéutica que comprende una o más proteínas ancladas por sortasa de *S. uberis*, o una o más proteínas de *S. uberis*, o parte de las mismas, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
30

Preferentemente, la composición farmacéutica comprende una composición de acuerdo con cualquier aspecto de la invención.

35 Preferentemente, la composición farmacéutica es capaz de producir una respuesta inmunitaria protectora contra *S. uberis*.

La frase "producir una respuesta inmunitaria protectora", como se usa en el presente documento, significa que la composición es capaz de generar una respuesta protectora en un organismo hospedador, tal como una vaca, a la que se administra.
40

Preferentemente, una respuesta inmunitaria protectora protege contra la infección posterior por *S. uberis*. La respuesta inmunitaria protectora puede eliminar o reducir el nivel de infección al reducir la replicación de *S. uberis* afectando al modo de acción de *S. uberis*. Preferentemente, la respuesta inmunitaria protectora reduce o previene la enfermedad causada por *S. uberis*.
45

Los excipientes y vehículos aceptables adecuados para uso en una composición farmacéutica serán bien conocidos por los expertos en la materia. Estos pueden incluir vehículos sólidos o líquidos. Los vehículos líquidos adecuados incluyen agua y solución salina. Las proteínas de la composición pueden formularse en una emulsión o pueden formularse en liposomas o microesferas biodegradables.
50

La composición puede comprender además un adyuvante. Los adyuvantes adecuados serán bien conocidos por los expertos en la materia y pueden incluir Adyuvante Incompleto de Freund (para uso en animales) y sales metálicas, tales como sales de aluminio o calcio.
55

La composición también puede comprender polímeros u otros agentes para controlar la consistencia de la composición y/o controlar la liberación de las proteínas desde la composición.

La composición también puede comprender otros agentes, tales como diluyentes, que pueden incluir agua; solución salina; glicerol u otros alcoholes adecuados, etc.; agentes humectantes o emulsionantes; agentes tamponantes; agentes espesantes, por ejemplo, celulosa o derivados de celulosa; conservantes; detergentes, agentes antimicrobianos; y similares.
60

Preferentemente, los principios activos en la composición tienen una pureza mayor del 50 %, normalmente una pureza mayor del 80 %, a menudo una pureza mayor del 90 % y, más preferentemente, una pureza mayor de aproximadamente el 95 %, el 98 % o el 99 %. Siendo los que se usan más a menudo los principios activos que se
65

aproximan a una pureza del 100 %, por ejemplo, una pureza de aproximadamente el 99,5 % o una pureza de aproximadamente el 99,9 %.

La composición de la presente invención puede usarse como una vacuna contra infecciones causadas por *S. uberis*. La vacuna puede administrarse profilácticamente a animales con riesgo de exposición a *S. uberis* y/o terapéuticamente a animales que ya se han expuesto a *S. uberis*.

Preferentemente, si la composición se usa como una vacuna, la composición comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno (que comprende proteínas de *S. uberis*). Una "cantidad inmunológicamente eficaz" de un antígeno es una cantidad que, cuando se administra a un individuo, ya sea en una sola dosis o en una serie de dosis, es eficaz para el tratamiento o prevención de la infección por *S. uberis*. Esta cantidad variará dependiendo de la salud y estado físico del individuo a tratar y del antígeno. Es de esperar que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse por ensayos de rutina.

La vía de administración de la composición puede variar dependiendo de la formulación de las proteínas en la composición. La composición puede disponerse para administrarse por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramamaria. Como alternativa, la composición puede disponerse para administrarse por vía parenteral, tal como mediante administración intranasal, oral, bucal, por inhalación, epidérmica, transcutánea, tópica, vaginal o rectal.

La composición puede disponerse para administrarse como una sola dosis o como parte de un programa de múltiples dosis. Las múltiples dosis pueden administrarse como una inmunización primaria seguida de una o más inmunizaciones de refuerzo. El periodo de tiempo adecuado entre las inmunizaciones de presentación y de refuerzo puede determinarse de una manera de rutina.

Las composiciones de la invención pueden inducir una respuesta de anticuerpo bactericida en suero después de administrarse a un sujeto. Estas respuestas se miden convenientemente en ratones y los resultados son un indicador convencional de la eficacia de la vacuna.

Las composiciones de la invención pueden ser también, o como alternativa, capaces de inducir una respuesta inmunitaria que produce proteínas en las células hospedadoras para defender contra la infección por *S. uberis*, sin necesidad de destruir las bacterias.

De acuerdo con aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de proteínas ancladas por sortasa de *Streptococcus uberis* SUB1154 (que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO 7), SUB1095 (que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8) y SUB0145 (que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO 2), o una proteína con un 95 % o más de identidad de secuencia con la misma en la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria y prevenir o reducir la infección por *Streptococcus uberis* en un sujeto al que se le ha administrado el medicamento, en donde el medicamento se usa para la vacunación profiláctica o terapéutica de sujetos contra *S. uberis*.

Los usos y composiciones de la invención preferentemente son para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por *S. uberis*.

El experto en la materia apreciará que cualquiera de las características preferibles analizadas anteriormente pueden aplicarse a cualquiera de los aspectos de la invención.

A continuación se describirán realizaciones preferidas de la presente invención, meramente a modo de ejemplo, con referencia a las siguientes figuras y ejemplos.

En las figuras y ejemplos que se proporcionan más adelante, las referencias a las proteínas ancladas por sortasa de *S. uberis* SUB1154, SUB1095 y SUB0145 forman parte de la invención; la referencia a otras proteínas ancladas por sortasa de *S. uberis* se citan solo por referencia.

Las figuras 1A, B y C - muestran los resultados del aislamiento de bacterias, el recuento de células somáticas y la respuesta clínica después de la exposición a *S. uberis* 0140J de tipo silvestre y un mutante de *S. uberis* Srt en vacas lecheras. La figura 1(A) muestra la recuperación bacteriana de *S. uberis* después de la exposición. Los datos se representan como las medias geométricas del número de bacterias obtenidas a partir de la leche de animales expuestos a la cepa 0140J (cuadrados; n = 4) o el mutante SrtA (triángulos; n = 8). La figura 1 (B) ilustra la respuesta inflamatoria después de la exposición al tipo silvestre y al mutante Srt de *S. uberis*. Los datos se representan por las medias geométricas del número de células somáticas obtenidas a partir de la leche de animales expuestos a la cepa 0140J (cuadrados; n = 4) o el mutante SrtA (triángulos; n = 8). La figura 1 (C) ilustra las puntuaciones clínicas combinadas de manifestaciones clínicas después de la exposición al tipo silvestre y al mutante Srt de *S. uberis*. Los datos se representan por la media de puntuaciones clínicas dadas para el aspecto del cuadrante y el aspecto de la leche, como se indica en la figura 2 con la cepa 0140J (cuadrados; n = 4) o el mutante SrtA (triángulos; n = 8);

Figura 2 - ilustra en forma de tabla la manifestación de una respuesta clínica a la infección por *Streptococcus uberis*. Todos los cuadrantes y muestras de leche se analizaron frente a estos criterios en cada ordeño después de la exposición;

Figura 3 - ilustra en forma de tabla las proteínas encontradas mediante examen bioinformático del genoma de *S. uberis* que probablemente se anclan mediante sortasa; Se sometió a búsqueda el genoma de *S. uberis* usando el motivo LPXXG para las supuestas proteínas ancladas por sortasa. La lista de proteínas identificadas se refinó usando el contexto y la posición del motivo, es decir, LPXXG hacia el extremo C y seguido de una región hidrófoba y restos cargados en una posición C terminal y la presencia de un péptido señal de secreción reconocible en el extremo N;

La figura 4A: presenta un listado de proteínas ancladas por sortasa identificadas en extractos de la pared celular de *S. uberis* 0140J cultivada en medio THB. ^a Gen y comentario de la proteína de acuerdo con la secuencia genómica de *Streptococcus uberis* 0140J (Ward *et al* 2009); ^b Valores de masa molecular teórica de precursores de proteína obtenidos a partir de la base de datos de Artemis del Wellcome Trust Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/>); ^c Número de aciertos de péptido único para cada proteína; ^d Porcentaje de secuencia de proteína cubierta por péptidos detectados experimentalmente; ^e 2 péptidos identificados en la fracción de pared celular del mutante SrtA. **La figura 4B:** presenta un listado de proteínas ancladas por sortasa identificadas en extractos de la pared celular de *S. uberis* 0140J cultivada en medio BHI. ^a Gen y comentario de la proteína de acuerdo con la secuencia genómica de *Streptococcus uberis* 0140J (Ward *et al* 2009); ^b Valores de masa molecular teórica de precursores de proteína obtenidos a partir de la base de datos de Artemis del Wellcome Trust Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/>); ^c Número de aciertos de péptido único para cada proteína; ^d Porcentaje de secuencia de proteína cubierta por péptidos detectados experimentalmente; ^e 4 péptidos identificados en la fracción de pared celular del mutante SrtA;

Las **figuras 5A y 5B** - muestran la identificación de Sub1154 y Sub 1370 de extractos de *Streptococcus uberis* 0140J y el mutante srtA. Figura 5A - se usó antisuero de conejo contra Sub1154 para sondear manchas de inmunotransferencia de extractos de proteínas con detergente de 0140J (calle 2) y el mutante SrtA (calle 3), y de medios concentrados y precipitados de 0140J (calle 4), mutante SrtA (calle 5) y mutante Sub1154 (calle 6). Los patrones del peso molecular se muestran en la calle 1. Figura 5B - se usó antisuero de conejo contra Sub1370 para sondear manchas de inmunotransferencia de extractos de proteínas con detergente de 0140J (calle 1) y el mutante SrtA (calle 2), y de medios concentrados y precipitados de 0140J (calle 3), mutante SrtA (calle 4) y mutante Sub1370 (calle 5). Los patrones del peso molecular se muestran en la calle 6;

Las **figuras 6A a 6O** - son las secuencias de aminoácidos de proteínas ancladas por sortasa de *S. uberis*;

La **figura 6A** es la secuencia de SUB1370 (Seq ID No: 1) una cinc carboxipeptidasa;

La **figura 6B** es la secuencia de SUB0145 (Seq ID No: 2) una proteína de unión a lactoferrina;

La **figura 6C** es la secuencia de SUB0135 (Seq ID No: 3) un precursor de fructano beta fructosidasa;

La **figura 6D** es la secuencia de SUB1730 (Seq ID No: 4);

La **figura 6E** es la secuencia de SUB0888 (Seq ID No: 5);

La **figura 6F** es la secuencia de SUB0207 (Seq ID No: 6);

La **figura 6G** es la secuencia de SUB1154 (Seq ID No: 7) una serina proteasa de tipo subtilina;

La **figura 6H** es la secuencia de SUB1095 (Seq ID No: 8) una proteína de tipo colágeno;

La **figura 6I** es la secuencia de SUB0826 (Seq ID No: 9) una supuesta subtilasa anclada a la superficie;

La **figura 6J** es la secuencia de SUB0164 (Seq ID No: 10) una supuesta proteína de unión a fibronectina anclada a la superficie y truncada (pero se codifica por un probable pseudogén);

La **figura 6K** es la secuencia de SUB0348 (Seq ID No: 11) un vestigio de una supuesta proteína de tipo colágeno (pero se codifica por un pseudogén);

La **figura 6L** es la secuencia de SUB1739 (Seq ID No: 12) una supuesta proteína anclada a la superficie (pero se codifica por un pseudogén);

La **figura 6M** es la secuencia de SUB0206 (Seq ID No: 13) una supuesta proteína exportada de función desconocida;

La **figura 6N** es la secuencia de SUB0241 (Seq ID No: 14) una supuesta proteína anclada a la superficie de función desconocida;

La **figura 6O** es la secuencia de SUB0337 (Seq ID No: 15) una supuesta proteína de unión a glutamina localizada en la superficie;

La **figura 7** muestra la colonización bacteriana después de la exposición con el tipo silvestre (0140J) y cepas mutantes atenuadas que carecen de sub0145, sub1095 o sub1154. Los datos se expresan como medias geométricas de Log₁₀ ufc/ml detectadas en muestras de leche obtenidas en cada ordeño después de la exposición experimental.

Los datos presentados más adelante demuestran que proteínas ancladas a la superficie de *S. uberis* mediante sortasa, una transamidasa, son importantes en virulencia y además describen que algunas de estas proteínas (por ejemplo, sub1095, sub1154 y sub0145) son esenciales para la virulencia y, por lo tanto, es necesario que sean funcionales para que esta bacteria produzca la enfermedad. Las proteínas son buenos inmunógenos. Es probable que las respuestas inmunitarias contra estas proteínas en forma de anticuerpos anulen su función, por lo tanto, la proteína identificada podría ser útil como inclusiones dentro de composiciones inmunogénicas destinadas a reducir o prevenir la infección o enfermedades causadas por *S. uberis*.

Ejemplo 1: Producción y evaluación de un mutante SrtA de *S. uberis*.

Métodos y Materiales

Cepas Bacterianas y Reactivos.

- 5 A lo largo de todo el estudio se usó la cepa 0140J de *Streptococcus uberis*, aislada originalmente de un caso clínico de mastitis bovina en el Reino Unido. La bacteria se cultivó del modo de rutina en caldo Todd Hewitt o en caldo de infusión cerebro corazón.
- 10 Se produjo leche desnatada a partir de leche bovina de partida recogida asépticamente a partir de varias vacas lecheras del rebaño de vacas lecheras en el Instituto de Salud Animal. Se recogió leche de animales que estaban libres de infección intramamaria. Después de la centrifugación (3.000 x g, 10 min); se separó cuidadosamente la leche desnatada de la capa de grasa superior y del precipitado de células sedimentadas. La esterilidad de la leche desnatada se determinó mediante el cultivo en placas de 500 µl de leche directamente sobre agar sangre que contenía esculina (1,0 %, p/v; ABA) y mediante un cultivo de enriquecimiento de 5 ml de leche en un volumen igual de caldo Todd Hewitt seguido por aislamiento de colonias individuales en ABA. En ambos casos, las placas se incubaron a 37 °C durante 18 h. La leche desnatada se almacenó a 4 °C y se usó antes de que hubieran transcurrido 72 h.

Otras cepas bacterianas y reactivos se usaron como se describe en el texto.

Aislamiento del mutante *srtA* por selección genotípica.

- El mutante *srtA* (Sub0881) se aisló después de la exploración por PCR de un banco de mutantes de *S. uberis* 0140J pGhost9::ISS1 siguiendo un protocolo similar al descrito previamente (Taylor, D. L. et al, 2003. J Bacteriol 185:5210-5219; Ward, P. N. et al 2001 Infect Immun 69:392-399). En resumen, se reunieron cultivos de una noche de placas de 96 pocillos individuales y se preparó ADN genómico para usarse como molde en reacciones de amplificación por PCR que contenían un cebador específico de locus, P261 (*srtA*) y un cebador específico de ISS1, P247 o P250. La amplificación se realizó usando treinta y cinco ciclos (95 °C durante 20 s, 54 °C durante 1 min y 72 °C durante 3 min) y se realizó con la mezcla maestra AmpliTaq Gold (ABI). Los productos se visualizaron después de electroforesis en gel, tinción con bromuro de etidio y transiluminación con luz UV. Después de la identificación de la placa, se identificó de manera similar un sitio del pocillo usando ADN genómico reunido de las columnas y filas de la placa diana. Después del aislamiento del clon mutante, se promovió la escisión del vector plasmídico mediante cultivo a la temperatura permisiva (28 °C) sin selección con antibiótico. La pérdida del vector pGhost9 y la retención de ISS1 se confirmaron por transferencia de Southern como se ha descrito previamente (Ward, P. N. et al 2001 Infect Immun 69:392-399). La presencia de la inserción en *srtA* se confirmó por amplificación por PCR del marco de lectura abierto y secuenciación del producto resultante a través de la unión entre ISS1 y el ORF alterado. Los cebadores de PCR usados se muestran en la Tabla 1 mostrada a continuación:

Designación	Secuencia (5'-3')	Aplicación	Molde	Temp. de hibridación (°C)
P247 ISS1 dir	GCTCTTCGGATTTTCGGTATC	sonda de ISS1	pGh9::ISS1	58
P250 ISS1 inv	CATTTTCCACGAATAGAAGGACTGTC	sonda de ISS1	pGh9::ISS1	61
P261	TGGTTGAAGCAGAAGCTGAA	Exploración de ISS1 dentro de ORF de <i>srtA</i> vs P247	pGh9::ISS1	55
P409	GAGCAATTGCAAAATGAAAAGC	Amplificación de ORF de <i>Sub1154</i>	ADN genómico de <i>S. uberis</i> 0140J	58
P410	ATGTCAAAAGCCCGGTACCTTTACAG	Amplificación de ORF de <i>Sub1154</i>	ADN genómico de <i>S. uberis</i> 0140J	58
P615	GAAATGATGATGAGAAATTGAGA	Exploración de ISS1 dentro de ORF de <i>Sub1154</i> vs P247	conjuntos de ADN genómico de <i>S. uberis</i> 0140J::pGhost9-ISS1	57

P630	AGCCACAAACACCATTACACA	Exploración de ISS1 dentro de ORF de <i>Sub1154</i> vs P247	conjuntos de ADN genómico de <i>S. uberis</i> 0140J::pGhost9-ISS1	59
P480	GAAGAAGTGGTAACTGCTACAAAC	Amplificación de ORF de <i>Sub1370</i>	ADN genómico de <i>S. uberis</i> 0140J	60
P481	TACTAACTTCTTGTGTCATCTTGGTACCTTTT	Amplificación de ORF de <i>Sub1370</i> Exploración de ISS1 dentro de ORF de <i>Sub1370</i>	ADN genómico de <i>S. uberis</i> 0140J	64
P621	CAACGAATCAACAAACTGAAAGC-3'	Exploración de ISS1 dentro de <i>Sub1370</i> vs P250	conjuntos de ADN genómico de <i>S. uberis</i> 0140J::pGhost9-ISS1	59

Tabla 1: Cebadores de PCR. P247 ISS1 dir (SEQ ID NO: 16); P250 ISS1 inv (SEQ ID NO: 17); P261 (SEQ ID NO: 18); P409 (SEQ ID NO: 19); P410 (SEQ ID NO: 20); P615 (SEQ ID NO: 21); P630 (SEQ ID NO: 22); P480 (SEQ ID NO: 23); P481 (SEQ ID NO: 24); P621 (SEQ ID NO: 25).

5

Extracción de ADN cromosómico de *S. uberis*

Se preparó ADN genómico usando una variación del método de Hill y Leigh como se ha descrito previamente (Hill, A. W. et al 1994 FEMS Immunol Med Microbiol 8:109-117). En resumen, se centrifugaron 1,5 ml de un cultivo de una noche a 10.000 x g durante 2 minutos y el sedimento celular se lavó con 500 µl de Tris-Cl 10 mM, EDTA 5 mM, pH 7,8. Las paredes de las células bacterianas se rompieron por resuspensión en 375 µl de Tris-Cl 10 mM, EDTA 5 mM pH 7,8 que contenía 30 unidades/ml de mutanolisina y 10 mg/ml de lisozima (ambas de Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos) y posterior incubación a 37 °C durante 30 minutos. La lisis celular total se consiguió mediante la adición de 20 µl de solución de SDS (20 % p/v en Tris-Cl 50 mM, EDTA 20 mM, pH 7,8) y Proteinasa K (Sigma) a una concentración final de 150 µg/ml y una incubación adicional a 37 °C durante 1 h. El material de la pared celular se retiró por precipitación después de la adición de 200 µl de NaCl saturado y la posterior centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se extrajo con fenol cloroformo y el ADN se precipitó mediante la adición de 2 volúmenes de etanol absoluto. Los sedimentos de ADN se lavaron con etanol acuoso al 70 % y se secaron al aire antes de la resuspensión en tampón TE que contenía 20 µg/ml de ARNasa-A (Sigma).

20

Exposición de vacas lecheras en lactación a *S. uberis* 0140J y al mutante SrtA

El papel de SrtA en la patogénesis de la infección se determinó por comparación de la virulencia de la cepa 0140J y el mutante que carecía de SrtA (mutante srtA) en un modelo de infección intramamaria en vacas lecheras. Se cultivaron bacterias durante 18 h a 37 °C en caldo Todd Hewitt. Las células se recuperaron por centrifugación (10.000 x g, 10 min), se suspendieron en solución salina sin pirógenos (Sigma) y se diluyeron en la misma para proporcionar la densidad celular requerida. Se mantuvieron en hielo suspensiones de cada cepa antes de usarse para la exposición de los animales. Tanto antes como después de la exposición se contó el número de bacterias viables en alícuotas idénticas de cada suspensión.

30

Para la exposición, se seleccionaron seis vacas lecheras, en las 2-10 semanas de su primera lactación, del rebaño de vacas lecheras del instituto. Los criterios de selección fueron: ausencia de signos de mastitis, ausencia de bacterias en muestras de leche antes de la exposición, sin historia de mastitis durante la presente lactación y sin indicios de infección intramamaria en muestras de leche tomadas 7 y 14 días después del parto. Los animales se expusieron en cuadrantes mamarios por infusión de 1 ml de solución salina sin pirógenos (Sigma) que contenía *S. uberis*. Dos animales se expusieron en un total de cuatro cuadrantes con 6,0 x 10² ufc de cepa 0140J y cuatro animales más se expusieron en un total de ocho cuadrantes con una dosis similar del mutante srtA. Después de la exposición, se ordeñó a los animales y se inspeccionaron dos veces al día (07:00 h y 15:30 h) y aquellos en los que se alcanzaron criterios predeterminados para puntos de valoración clínicos (leche coagulada y decolorada y/o cuadrante de ubre inflamado o con molestias cuando se palpa) se trataron con antibióticos de marca comercial en consonancia con los criterios prescritos indicados en la figura 2. Se tomaron muestras de leche y se analizaron con respecto a las bacterias y células somáticas, como se describe más adelante.

40

Análisis de muestras de leche

El número de bacterias viables presentes se estimó mediante cultivo directo en placas de 1 ml y 100 µl de cada muestra de leche en ABA. Las muestras también se diluyeron en solución salina y se cultivaron en placas directamente 50 µl de cada dilución en ABA. En cada caso, se determinó la presencia y/o número de *S. uberis* y el genotipo de los aislados recuperados se determinó mediante comparación de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de ADN cromosómico y amplificación del locus de *srtA*, como se describe más adelante. El número de células somáticas presentes en las muestras de leche se determinó usando un contador coulter (Beckman Coulter, Ltd).

Preparación de proteínas a partir de medio de crecimiento bacteriano por precipitación con metanol-cloroformo

Se dejaron crecer bacterias en BHI (200 ml) con cultivos desarrollados hasta una DO_{600nm} de aproximadamente 0,5 y se recogieron por centrifugación (16.000 x g, 20 min, 4 °C) y el medio de crecimiento bacteriano se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 µm (Millipore). Después de la adición de inhibidor de proteasa completo (Roche) a una concentración 1X, el medio de crecimiento bacteriano se concentró aproximadamente 100 veces usando dispositivos de filtración centrífuga Amicon (Millipore) con una exclusión de peso molecular de 10 kDa. Para precipitar las proteínas, se añadieron 600 µl de metanol y 150 µl de cloroformo (ambos de BDH) a 200 µl de medio de crecimiento bacteriano concentrado. La preparación se agitó con vórtice y se añadieron 450 µl de agua MilliQ antes de la centrifugación (16.000 x g, 1 min). La fase superior se retiró cuidadosamente y se desechó y se añadieron 450 µl de metanol al material restante que agitó con vórtice y se centrifugó (16.000 x g, 2 min). El sobrenadante se desechó y el sedimento restante se secó al aire antes de la resuspensión en tampón de carga de SDS.

Extracción de proteínas no ancladas con detergente

Los sedimentos bacterianos de los cultivos anteriores se lavaron 3 veces en 40 ml de PBS y se resuspendieron en 500 µl de PBS que contenía hialuronidasa (100 U/ml, Sigma-Aldrich). Las células se incubaron durante 2 horas a 37 °C y el material capsular hidrolizado se retiró por centrifugación (8000 x g, 6 min, 4 °C). Las células se lavaron 3 veces en 40 ml de PBS y se resuspendieron en 200 µl de Nonidet P-40 (NP-40) al 0,1 % (v/v) en PBS. El extracto de detergente se recogió después de retirar las células bacterianas por centrifugación (16.000 x g, 10 min, 4 °C).

Producción y purificación de proteínas Sub1154 y Sub 1370 recombinantes

Se diseñaron cebadores p409 y p410 (véase la tabla anterior) para amplificar a partir del ADN genómico de *S. uberis* 0140J la secuencia codificante madura predicha (es decir, que carece de la secuencia señal N-terminal) de Sub1154, un supuesto sustrato de *srtA* con homología con la serina proteasa de tipo subtilasa. Se generó un amplicón de 3,4 kb usando polimerasa de alta fidelidad Phusion™ (New England Biolabs), se purificó usando un kit de purificación por PCR MinElute (Qiagen) y se trató con KpnI (New England Biolabs) para facilitar la clonación direccional. El plásmido pQE1 (Qiagen) se preparó usando PvuII, KpnI y fosfatasa Antarctic (todas de New England Biolabs) y la construcción se ligó (ADN Ligasa de T4, New England Biolabs) durante una noche a 20 °C de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Se desalificaron veinte microlitros de la mezcla de ligamiento usando el método de Atrazhev y Elliott (Atrazhev, A. M., y J. F. Elliott. 1996 Biotechniques 21:1024). Se utilizaron aproximadamente 10 ng de la mezcla de ligamiento desalificada para transformar *Escherichia coli* M15 pREP4 (Qiagen) y se seleccionaron clones recombinantes en placas de agar LB Kan 25 µg/ml Amp 50 µg/ml. Se purificó proteína Sub1154 (etiqueta 6 x His) recombinante comenzando en el resto Asp34 por dilución (1/30) de cultivo de una noche en 1600 ml de caldo LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina y se cultivó a 20 °C sin agitación durante 2 h. Se preparó Sub1370 recombinante de forma similar, pero usando los cebadores P480 y P481, y se cultivó de manera similar en 800 ml de medio de cultivo. Se indujo la expresión de proteínas añadiendo IPTG a una concentración final de 0,2 mM. Los cultivos se incubaron durante 2-4 h más y después se centrifugaron a 8.000 x g durante 20 min para recoger las células bacterianas. Se purificaron aproximadamente 0,3 mg y 1 mg de proteínas solubles Sub1370 y Sub1154 con etiqueta 6 x His, respectivamente, en presencia de inhibidores de proteasa (Complete-EDTA free; Roche) usando cartuchos de alto flujo CelLytic y HisSelect (ambos de Sigma) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Producción de antisuero de Sub1154 y Sub1370 en ratones e inmunotransferencia

Se suministraron cinco alícuotas de aproximadamente 50 µg de proteínas Sub1154 y Sub1370 recombinantes purificadas liofilizadas a Davids Biotechnologie (Alemania) para la producción de suero en conejos. Se suministró antisuero (50 ml) esterilizado por filtración y que contenía un 0,02 % de azida sódica como conservante.

Se separaron extractos de medio y detergente de cultivos de *S. uberis* de tipo silvestre y un mutante *SrtA* en geles de dodecilsulfato sólido y poliácridamida al 10 % (SDS-PAGE) y después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham) para la inmunodetección o, como alternativa, se tiñeron con Coomassie usando InstantBlue (Novexin). La transferencia se realizó a 170 mA durante 1 h en un aparato Transblot (Biorad) en tampón de transferencia que consistía en base Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 % (v/v), pH 8,1-8,4. Después de la transferencia, las membranas se incubaron en una solución de bloqueo de leche desnatada en polvo al 1 % en PBS a 4 °C durante una noche. Las membranas se lavaron tres veces durante 5 min en PBS que contenía Tween 20 al 0,1 % (PBST) y después se incubaron con antisuero de conejo a una dilución 1/12.000 para el antisuero de Sub1154 y una dilución de 1/16.000

para el antisuero de Sub1370 en solución de bloqueo durante 1 hora. Las membranas se lavaron tres veces durante 5 min en PBST y después se incubaron con inmunoglobulina G de cabra anti-conejo conjugada con HRP a una dilución de 1/1.000 (Southern Biotech) durante 1 hora. Las membranas se lavaron de nuevo como se ha indicado anteriormente y se detectó el conjugado con HRP usando una solución de 4-cloronaftol (0,5 mg/ml) en PBS que contenía un 16,7 % de metanol y un 0,00015 % (v/v) de H₂O₂, se incubó durante 1 hora en la oscuridad, antes de lavar las membranas en PBS y de dejarlas secar.

Aislamiento y caracterización genética de mutante *srtA*

El análisis del genoma completo de *S. uberis* 0140J confirmó la presencia de un solo homólogo de sortasa, sortasa A (*srtA*) (Ward, P.N. et al (presentado en 2008) BMC Genomics). Se aisló un clon mutante con el elemento ISS1 insertado entre los pares de bases 248 y 249 de, y en orientación inversa a, la secuencia codificante de sortasa. El producto de traducción de este gen de *srtA* mutado consistía en los primeros 82 restos de los 252 aminoácidos codificados en el ORF de *srtA* junto con 18 restos más en el elemento ISS1 antes de alcanzar un codón de terminación.

Infectividad y virulencia de *S. uberis* de tipo silvestre y mutante *srtA* después de la exposición experimental en la glándula mamaria bovina.

La infectividad y virulencia del mutante *srtA*, en comparación con la cepa de tipo silvestre, se determinó por exposición de la glándula mamaria bovina de varias vacas lecheras. Todos los cuadrantes expuestos de animales que recibieron 600 ufc de *S. uberis* de tipo silvestre se infectaron y propagaron las bacterias a aproximadamente 10⁶ a 10⁷ ufc/ml a las 48 - 60 h después de la exposición (figura 1A). Después de la exposición de ocho cuadrantes en cuatro animales con una dosis similar del mutante *srtA*, todos mostraron evidencia de infección y el mutante *srtA* se detectó en leche a niveles similares a los del tipo silvestre durante hasta 24 h después de la exposición. Sin embargo, posteriormente la colonización bacteriana se redujo, desde un máximo de 10⁴ ufc/ml de leche a las 24 h después de la exposición, de tal manera que al final del experimento (7 días después de la exposición) el número medio de bacterias presentes era de aproximadamente 10 ufc/ml (figura 1B). En este momento solo dos de los ocho cuadrantes continuaban propagando bacterias, habiendo eliminado el resto la infección (< 1 ufc/ml de leche).

La infiltración celular en la glándula mamaria en respuesta a la infección fue idéntica en los dos grupos de animales y no fue dependiente de la cepa de exposición. En cada caso, fue similar a la notificada previamente en este modelo y alcanzó un máximo de aproximadamente 10⁷ células/ml de leche a las 48-60 h después de la exposición. En animales expuestos con la cepa de tipo silvestre, esto coincidió con la aparición de signos clínicos agudos de mastitis (figura 2 y figura 1C) que requirieron la administración de terapia con antibióticos para eliminar la infección y aliviar los signos de la enfermedad. En un marcado contraste, los animales que recibieron el mutante *srtA* mostraron pocos o ningún signo de mastitis (figura 2 y figura 1C).

Los resultados presentados en la figura 1 demuestran que *S. uberis* requiere la proteína sortasa, codificada por *srtA*, para la expresión completa de virulencia por esta bacteria. Aunque inicialmente era capaz de colonizar la glándula mamaria bovina de manera similar a *S. uberis* de tipo silvestre, el mutante que carece de *SrtA* no podía colonizar la glándula a altos niveles; siendo los números máximos de bacterias aproximadamente 1000 veces menores que los detectados en leche de animales expuestos con la cepa de tipo silvestre. Esto corresponde a la incapacidad del mutante *srtA* de inducir signos clínicos progresivos de enfermedad.

Se entiende que *srtA* ancla una o más proteínas a la superficie de la bacteria que son responsables de la virulencia, es decir, del alto nivel de colonización y/o inducción de reacciones inflamatorias severas asociadas con la enfermedad clínica.

Detección de proteínas ancladas a sortasa en *S. uberis*

Para identificar proteínas ancladas a la pared celular de *S. uberis* por sortasa, se compararon las proteínas de la pared celular de *S. uberis* de tipo silvestre con las de un mutante *SrtA* de *S. uberis*.

La metodología usada para aislar péptidos tripticos de proteínas de la pared celular ancladas es la siguiente. Se dejaron crecer cultivos bacterianos en THB o BHI tanto hasta la fase exponencial como hasta la fase estacionaria de crecimiento. Los cultivos exponenciales se dejaron crecer en 1,5 litros de caldo hasta una densidad óptica de 0,6 a DO550nm, mientras que los cultivos de fase estacionaria se dejaron crecer en 1 litro de caldo durante una noche. Se recogieron sedimentos de células bacterianas por centrifugación (16.000 x g, 10 min, 4 °C) y se lavaron consecutivamente con PBS, Nonidet P40 (NP40) al 0,1 % (v/v) en PBS y PBS y se recogieron por centrifugación como se ha indicado anteriormente. Los sedimentos celulares se resuspendieron en PBS que contenía inhibidores de proteasa IX Complete (Roche) y se rompieron mediante batido con microesferas en tubos de microcentrífuga tapados a rosca que contenían microesferas de 0,1 mm de circonio/sílice a 5 intervalos de 1 min a máxima velocidad, con periodos de reposo entre medias en hielo. Las células no rotas y las microesferas se retiraron por centrifugación dos veces (8.000 x g, 10 min, 4 °C) y los sobrenadantes después se sometieron a centrifugación de alta velocidad (125.000 x g, 30 min). Los sedimentos resultantes se resuspendieron en SDS/PBS al 4 % y se calentaron a 80 °C durante 4 horas y después se centrifugaron (200.000 x g 30 min). Los sedimentos resultantes se lavaron 4 veces con agua MilliQ

a 30 °C y se centrifugaron como anteriormente. Después, los sedimentos se resuspendieron en bicarbonato amónico 50 mM que contenía 1 µg de tripsina de calidad de proteómica (Sigma) y se incubaron con agitación durante una noche a 37 °C. Se recogieron péptidos del sobrenadante después de la centrifugación (16.000 x g, 10 min) y la digestión se detuvo mediante la adición de ácido fórmico a una concentración final del 0,1 %.

5 Los péptidos se separaron y se analizaron por nanoLC-MS/MS usando un sistema de cromatografía líquida de fase inversa. La interpretación y presentación de los datos de MS/MS se realizó de acuerdo con guías publicadas, realizándose las búsquedas usando el software Mascot (Matrixscience, Londres, Reino Unido) usando una base de datos genómicos generada para *S. uberis* 0140J.

10 Las secuencias de los péptidos tripticos se alinearon con la secuencia genómica traducida de *Streptococcus uberis* para identificar las proteínas presentes.

Se observó que las nueve proteínas presentadas en las figuras 4 y B estaban presentes en las paredes celulares preparadas a partir de *S. uberis* 0140J, pero estaban ausentes de preparaciones equivalentes fabricadas a partir de cultivos del mutante deficiente en *srtA* isogénico de *S. uberis*, lo que demuestra que las proteínas son proteínas ancladas por sortasa.

15 La secuencia de las nueve proteínas ancladas por sortasa se proporcionan en las figuras 6A a 6I. Las figuras 6J a 6O son las secuencias de las supuestas proteínas ancladas por sortasa identificadas por proteómica.

20 **Detección de proteína Sub1154 y Sub1370 en extractos de proteína de *S. uberis* de tipo silvestre y mutante Srt A**

Se generaron Sub1154 recombinante y Sub1370 recombinante, dos ejemplos de proteínas ancladas por sortasa de *S. uberis*, ambas a partir de ADN genómico amplificado de *S. uberis* y el producto se clonó en *E. coli* usando el vector pQE1, que incorporó una etiqueta de 6 x His en el extremo N de cada proteína. La proteína recombinante se purificó utilizando la etiqueta de 6 x His y se usó para la producción de antisuero.

30 Después se usaron anti-Sub1154 y anti-Sub1370 de conejo para detectar las proteínas Sub1154 y Sub1370 por inmunotransferencia de extractos de medio y detergente de *S. uberis* 0140J y el mutante *srtA*. También se sondaron con el antisuero extractos de medio de mutantes de Sub1154 y Sub1370 cultivados en BHI. La detección de Sub1154 se confirmó en el extracto de detergente de *srtA* y también en el extracto del medio del mutante de Sub1154. En este último caso se detectó la forma truncada predicha de la proteína (figura 5A). La proteína correspondiente a Sub1370 se detectó solo en el medio de crecimiento obtenido del mutante *srtA* (figura 5B). La presencia de las proteínas Sub1154 y Sub1370 únicamente en extractos del mutante *srtA* indica que, en la cepa de tipo silvestre, las proteínas se anclan a la pared celular de *S. uberis* por la sortasa.

40 **Ejemplo 2: investigación del requisito de proteínas ancladas por sortasa específicas para la virulencia de *S. uberis***

Continuando con la identificación de proteínas ancladas por sortasa, cada uno de los genes que las codificaban se introdujo dentro de la cepa de tipo silvestre por mutación. Los mutantes, de los que cada uno carecía de una proteína anclada por sortasa individual, se usaron en un modelo de exposición en vacas lecheras para evaluar la virulencia. Las proteínas ausentes de los animales que mostraban virulencia reducida o no mostraban virulencia están implicadas en la patogénesis/patología de la enfermedad. La inducción de una respuesta inmunitaria neutralizadora (anticuerpos) contra cualquiera de, y preferentemente todas, estas proteínas, disminuiría la enfermedad después de la infección con cepas de tipo silvestre. Por lo tanto, serían útiles en la prevención de la mastitis en vacas vacunas que contuvieran cualquiera o todas las proteínas identificadas como implicadas en la virulencia.

50 **Metodología**

Producción y aislamiento de cepas mutantes de *S. uberis* que carecen de proteínas ancladas por SrtA (Sub 0135, Sub 0145, Sub0207, Sub0241, Sub 0826, Sub0888, Sub1095, Sub1154, Sub1370, Sub1730)

55 Se pusieron mutantes de inserción inactivados dentro de un banco de mutantes de inserción aleatorios por exploración por PCR de un banco de mutantes de *S. uberis* 0140J pGhost9::ISS1 siguiendo un protocolo similar al descrito previamente (Taylor, D. L. et al, 2003. J Bacteriol 185:5210-5219; Ward, P. N. et al 2001 Infect Immun 69:392-399). En resumen, se reunieron cultivos de una noche de placas de 96 pocillos individuales y se preparó ADN genómico para usarse como molde en reacciones de amplificación por PCR que contenían un cebador específico de locus para cada gen de interés y se usaron junto con un cebador específico para ISS1. Después del aislamiento del clon mutante, se promovió la escisión del vector plasmídico mediante cultivo a la temperatura permisiva (28 °C) sin selección con antibiótico. La pérdida del vector pGhost9 y la retención de ISS1 se confirmaron por transferencia de Southern como se ha descrito previamente (Ward, P. N. et al 2001 Infect Immun 69:392-399). La presencia de la inserción en el ORF apropiado se confirmó por amplificación por PCR del marco de lectura abierto y secuenciación del producto resultante a través de la unión entre ISS1 y el ORF alterado.

Los intentos de aislar un mutante de inserción a partir del banco de mutantes aleatorios de 0140J son ISS1 localizado apropiadamente cerca del inicio de la secuencia codificante de SUB1154 no tuvieron éxito. Se usó una estrategia de eliminación dirigida para impedir la producción del producto génico SUB1154. En resumen, se amplificaron dos fragmentos localizados en cualquier extremo del marco de lectura abierto de 3432 pares de bases a partir de ADN genómico. Los dos fragmentos se purificaron y después se usaron como un molde en proporciones iguales en una reacción de amplificación por PCR adicional para generar un solo producto $\Delta 1154$ que carecía de 3169 pares de bases de la secuencia codificante de SUB1154 de 3432 pares de bases. Este amplicón se subclonó en el sitio de clonación múltiple del plásmido sensible a la temperatura pG⁺h9 de bajo número de copias. La construcción del plásmido se amplificó por transformación de *E. coli* TG1 RepA con selección en 200 µg/µl de eritromicina a 37,5 °C y se usaron 10 ng del plásmido purificado posteriormente para transformar adicionalmente *S. uberis* 0140J con selección en 1 µg/ml de eritromicina a 28 °C. Los transformantes *S. uberis* 0140J / pG⁺h9:: $\Delta 1154$ se cultivaron hasta una DO₅₅₀ de 0,5 en cultivo en caldo Todd Hewitt a 28 °C, después, la temperatura de cultivo se elevó a la temperatura no permisiva de replicación del plásmido de 37,5 °C para forzar una sola integración cromosómica cruzada. Se seleccionaron integrantes en THA que contenía eritromicina a 1 µg/ml a 37 °C y posteriormente se cultivaron en THB que carecía de antibiótico a 28 °C para promover la escisión del replicón pG⁺h9 mediante un segundo acontecimiento de entrecruzamiento. Las bacterias resultantes se cultivaron en placas con THA y se repicaron colonias después del cultivo durante una noche a 37 °C. La eliminación del locus de Sub1154 se determinó por amplificación por PCR del locus de Sub1154.

Exposición de vacas lecheras en lactación a *S. uberis*

El requisito de sustratos de SrtA individuales para la virulencia se determinó por exposición experimental en un modelo de infección intramamaria bien establecido en vacas lecheras. Se cultivaron bacterias durante 18 h a 37 °C en caldo Todd Hewitt. Las células se recuperaron por centrifugación (10.000 x g, 10 min), se suspendieron en solución salina sin pirógenos (Sigma) y se diluyeron en la misma solución para proporcionar la densidad celular requerida (500-1500 ufc/ml). Se mantuvieron en hielo suspensiones de cada cepa antes de usarse para la exposición de los animales. Tanto antes como después de la exposición se contó el número de bacterias viables en alícuotas idénticas de cada suspensión.

Para la exposición, se seleccionaron vacas lecheras, en las 2-10 semanas de su primera lactación. Los criterios de selección fueron: ausencia de signos de mastitis, ausencia de bacterias en muestras de leche antes de la exposición, sin historia de mastitis durante la presente lactación y sin indicios de infección intramamaria por *S. uberis* en muestras de leche tomadas 7 y 14 días después del parto. Los animales se expusieron en cuadrantes mamarios por infusión de 1 ml de solución salina sin pirógenos (Sigma) que contenía entre 500-1500 ufc de *S. uberis*.

Después de la exposición, se ordeñó a los animales y se inspeccionaron dos veces al día (07:00 h y 15:30 h) durante un periodo de 4 días. Aquellos en los que se alcanzaron los criterios predeterminados para puntos de valoración clínicos (leche coagulada y decolorada y/o cuadrante de ubre inflamado o con molestias cuando se palpa) se trataron con antibióticos de marca comercial. Se tomaron muestras de leche en cada ordeño y se analizaron con respecto a la presencia de bacterias y células somáticas, como se describe más adelante.

Análisis de muestras de leche

El número de bacterias viables presentes se estimó mediante cultivo directo en placas de 50 µl de cada muestra de leche en ABA. Las muestras también se diluyeron en solución salina y se cultivaron en placas directamente 50 µl de cada dilución en ABA. En cada caso, se determinó la presencia y/o número de *S. uberis* y el genotipo de los aislados recuperados se determinó mediante amplificación del locus apropiado. El número de células somáticas presentes en las muestras de leche se determinó usando un contador coulter portátil DeLaval de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

Se usaron mutantes que carecían de uno de Sub 0145, Sub1095 o Sub1154 para la exposición en los cuadrantes mamarios para determinar si la mutación había ocasionado una mayor atenuación de *S. uberis*. En todos los casos, se recuperaron las cepas de la leche después de la exposición y cada una se sometió a genotipado para mostrar la presencia del gen correctamente mutado. La exposición con las cepas (que carecían de sub1095, sub0145 o sub1154) tuvo como resultado una colonización relativamente baja durante el experimento (Fig. 7) y, al contrario de lo que ocurría con la cepa de tipo silvestre, ninguna de estas cepas fue capaz de inducir, en ningún caso, signos clínicos de enfermedad. Por consiguiente, la función de estas proteínas en la patogénesis de la infección puede considerarse esencial y no redundante. Sería predecible que la inducción de una respuesta inmunitaria neutralizadora (anticuerpos) contra cualquiera de, y preferentemente todas, estas proteínas, disminuiría la enfermedad después de la infección con cepas de tipo silvestre.

LISTADO DE SECUENCIAS

ES 2 716 831 T3

<120> Composición

<130> JA45660P.WOP

5 <150> GB0818231.3

<151> 06/10/2008

<160> 25

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1073

<212> PRT

15 <213> Streptococcus uberis

<400> 1

Met Thr Lys Asn Arg Ser Ser His Ser Thr Tyr Ala Asp Lys Val Ile
1 5 10 15

Lys Gly Leu Ser Ala Ser Cys Phe Ile Leu Gly Ala Phe Val Phe Ala
20 25 30

Gln Gln Val Ser Ala Glu Glu Val Val Thr Ala Thr Asn Thr Ser Leu
35 40 45

Thr Ala Pro Thr Val Thr Thr Val Ser Pro Leu Thr Asn Thr Asp Val
50 55 60

Ser Ala Thr Ala Val Ala Ala Asp Ser Ile Ala Ser Pro Val Thr Thr
65 70 75 80

Thr Asp Ser Asn Leu Asn Ser Ala Pro Ile Ile Asp Thr Ser Asn Pro
85 90 95

Ser Asn Ile Thr Ser Pro Thr Asp Thr Asn Thr Ser Thr Thr Ser Ser
100 105 110

Asp Thr Thr Ser Ser Pro Ile Pro Val Thr Leu Asn Lys Ala Ala Ile
115 120 125

Ala Ser Pro Thr Ser Gln Thr Glu Thr Leu Ala Ser Gln Glu Ile Tyr
130 135 140

Met Asp Lys Val Asn Gln Val Thr Ile Asn Thr Thr Val Asn Pro Ala
145 150 155 160

ES 2 716 831 T3

Thr	Pro	Met	Thr	Trp	Thr	Ile	Glu	Asn	Tyr	Pro	Asn	Gln	Thr	Tyr	Asn	
				165					170					175		
Met	Gln	Thr	Gly	Asp	Phe	Thr	Gly	Ser	Pro	Ser	Tyr	Thr	Val	Thr	Ser	
			180					185					190			
Thr	Ser	Pro	Asn	Asn	Ser	Ser	Val	Gln	Ile	Glu	Ile	Pro	Pro	Leu	Phe	
		195					200					205				
Gly	Thr	Asp	Leu	Ser	Leu	Arg	Trp	Pro	Asn	Asn	Ile	Arg	Arg	Thr	Tyr	
	210					215					220					
Arg	Asp	Tyr	Met	Gly	Ser	Tyr	Thr	Leu	Lys	Gly	Ile	Ser	Glu	Asp	Gly	
225					230					235					240	
Leu	Thr	Ile	Val	Thr	Lys	Glu	Leu	Ile	Leu	Arg	Pro	Tyr	Ala	Asp	Tyr	
				245					250					255		
Met	Thr	His	Glu	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Glu	Ala	Asn	
			260					265					270			
His	Ala	Thr	Asp	Arg	Leu	Val	Thr	Ile	Glu	Thr	Ile	Gly	Gln	Ser	Ala	
		275					280					285				
Leu	Gly	Asn	Ala	Ile	Lys	Met	Gly	Ile	Val	Ala	Lys	Asp	Gln	Ala	Ser	
	290					295					300					
Leu	Asp	Thr	Tyr	Leu	Asn	Gln	Thr	Thr	Pro	Met	Met	Leu	Met	Asp	Pro	
305					310					315					320	
Asp	Gln	Ala	Leu	Asn	Leu	Leu	Ala	Gln	Gly	Lys	Phe	Asp	Tyr	Lys	Leu	
				325					330					335		
Pro	Ile	Leu	Ile	Asn	Asn	Thr	His	Ala	Asp	Glu	Gln	Pro	Gly	Ile	Asp	
			340					345					350			
Val	Val	Arg	Gly	Leu	Phe	Lys	Thr	Phe	Ala	Thr	Glu	Ser	Val	Ile	Asn	
		355					360					365				
Tyr	Gln	Thr	Val	Asp	Ala	Ala	Asn	Asn	Pro	Thr	Thr	Val	Gln	Ile	Asp	
	370					375					380					
Ile	Lys	Ala	Leu	Leu	Asp	Lys	Val	Ile	Leu	Leu	Phe	Asn	Phe	Thr	Glu	
385					390					395					400	

ES 2 716 831 T3

Asn Pro Asp Gly Asp Ile Ala Asn Thr Arg Ala Leu Asn Asn Gly Leu
 405 410 415
 Asp Pro Asn Arg Asp Thr Gly Tyr Gln Thr Asn Pro Glu Thr Arg Ala
 420 425 430
 Ile Val Glu Gln Ile Asn Lys Trp Asn Pro Ile Ser Ile Phe Asp Val
 435 440 445
 His Gly Phe Val Lys Glu Phe Leu Ile Glu Pro Cys Thr Pro Pro His
 450 455 460
 Asp Pro Asn Phe Glu Tyr Asp Leu Phe Asp Ala Ser Leu Val Glu Gly
 465 470 475 480
 Ala Arg Glu Met Gly Asn Ala Gly Ile Thr Asn Ser Val Tyr Asp Ser
 485 490 495
 Tyr Ile Ile Pro Lys Phe Asp Tyr Gly Ser Gly Trp Asp Asp Ser Phe
 500 505 510
 Ser Gly Tyr Thr Ala Val Tyr Gly Leu Tyr Gln Gly Ile Leu Gly His
 515 520 525
 Thr Ile Glu Ile Pro Glu Thr Asn Gln Glu Ser Tyr Asn Ala Gly Tyr
 530 535 540
 Phe Ala Val Leu Ala Gly Ile Asn Tyr Asp Leu Ala Asn Ser Asp Gln
 545 550 555 560
 Leu Met Lys Asn Lys Leu Thr Phe Phe Ser Arg Gly Ile His Lys Ala
 565 570 575
 Glu Val Ala Ala Ala Glu Glu Ala Leu Leu Thr Val Asp Gly Ser Val
 580 585 590
 Lys Gly Arg Ile Lys Asp Gly His Asp Thr Phe Phe Pro Asp Tyr Tyr
 595 600 605
 Met Ile Pro Met Thr Leu Ser Thr Glu Ser Asp Thr Asp Gln Ala Phe
 610 615 620
 Lys Met Ile Asp Tyr Phe Arg Arg Asn Gly Val Ile Leu Asn Glu Leu
 625 630 635 640
 Thr Ala Asp Val Ala Gly Tyr His Lys Gly Asp Leu Val Ile Asp Met

ES 2 716 831 T3

645					650					655					
Ala	Gln	Ala	Lys	Arg	Gly	Phe	Ala	Asn	His	Val	Leu	Tyr	Lys	Gly	Ala
			660				665						670		
Asn	Glu	Ser	Glu	Trp	Pro	Ala	Met	Tyr	Ala	Glu	Leu	Val	Met	Asn	Phe
			675				680						685		
Pro	Ala	Met	Arg	Gly	Phe	Lys	Ala	Asp	Ala	Ile	Tyr	Ala	Asp	Ser	Leu
			690				695						700		
Phe	Ala	Gly	Asn	Leu	Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Ser	Ala	Pro	Arg	Thr
			705				710						715		
Ala	Pro	Ser	Asp	Lys	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Val	Ser	Asn	Asn	Ser	Leu	Ala
			725							730			735		
Ala	Val	Gln	Ala	Val	Asn	Ala	Ala	Ile	Arg	Ala	Gly	Lys	Asn	Val	Tyr
			740							745			750		
Leu	Thr	Asn	Asp	Gly	Tyr	Val	Met	Asp	Lys	Ala	Thr	Tyr	Glu	Ser	Val
			755				760						765		
Ile	Gly	Thr	Tyr	Pro	Leu	Phe	Ala	Gln	Ala	Thr	Cys	Met	Lys	Pro	Val
			770				775						780		
Gly	Asp	Thr	Leu	Lys	Ala	Ile	Lys	Val	Tyr	Ala	Pro	Gly	Asn	Pro	Asn
			785				790						795		
Leu	Tyr	Leu	Gly	Phe	Asn	Ser	Pro	Ser	Glu	Val	Ser	Leu	Ala	Leu	Asn
			805							810			815		
Gln	Met	Gly	Phe	Asp	Val	Val	Pro	Ser	Val	Asp	Gln	Ala	Asp	Val	Ile
			820				825						830		
Val	Leu	Asp	Asn	Asp	Gln	Phe	Asp	Ala	Ser	Ile	Leu	Gly	Lys	Lys	Pro
			835				840						845		
Val	Ile	Ile	Leu	Gly	Gly	Ser	Ala	Met	Ala	Lys	Leu	Glu	Ser	Leu	Gly
			850				855						860		
Ile	Leu	Thr	Gly	Phe	Asp	Ala	Ala	Met	Thr	Ser	Glu	Ser	Asp	Gly	Ser
			865				870						875		
Ser	Tyr	Glu	Gly	Leu	Met	Lys	Ile	Ser	Leu	Asp	Ala	Asn	Ser	Pro	Tyr
			885							890			895		

ES 2 716 831 T3

Thr Ser Gly Tyr Ala Ala Asn Ser Leu Tyr Tyr Ser Asn Ser Gly Ser
900 905 910

Trp Ile Glu Gly Val Pro Thr Gly Phe Met Thr Leu Ala Asn Ile Ser
915 920 925

Ala Ser Asp Phe Tyr Val Ser Gly Trp Trp Pro Asn His Glu Gly Leu
930 935 940

Ala Asn Lys Thr Val Ala Ile Ser Gly Leu Tyr Gln Gly Gln Pro Met
945 950 955 960

Phe Ile Phe Ala Gly Asn Pro Val Asn Lys Thr His Thr Ile Asn Phe
965 970 975

Tyr Arg Trp Val Ser Asn Ala Ile Phe Gly Thr Asn Leu Thr Ser Phe
980 985 990

Ile Glu Gly Gln Cys Thr Ile Pro Thr Asp Ser Glu Thr Gln Val Val
995 1000 1005

Arg Val Asn His Asn Gly Gln Thr Val Ala Val Tyr Gln Gln Val
1010 1015 1020

Ala Asn Lys Glu Val Asn Gly Thr Val Ser Gln Asn Ser Leu Pro
1025 1030 1035

Ala Leu Ala Asp Gly Ser His Lys Asp Asp Ser Lys Leu Phe Trp
1040 1045 1050

Val Thr Gly Leu Leu Val Ala Ser Gly Gly Leu Phe Ala Ala Leu
1055 1060 1065

Lys Arg Arg Glu Asp
1070

<210> 2
<211> 515
<212> PRT
<213> Streptococcus uberis

<400> 2

10 Met Arg Lys Phe Tyr Tyr Lys Glu Lys Lys Met Glu Ile Lys Gln Lys
1 5 10 15

ES 2 716 831 T3

His Gly Lys His Ala Leu Arg Lys Ala Val Thr Ala Ala Val Leu Ala
 20 25 30

Gly Thr Ala Phe Ser Ser Leu Gly Gly Phe Ala Gly Ala Val Thr Thr
 35 40 45

Val Lys Ala Glu Asp Leu Phe Thr Ile Asn Asn Ser Glu Val Gln Asp
 50 55 60

Lys Leu Glu Ser Lys Val Lys Gln Leu Leu Glu Ala Gln Arg Lys Gly
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ser Glu Lys Leu Arg Glu Leu Leu Ser Glu Leu Pro Thr
 85 90 95

Asp Ile Leu Lys Asp Ile Met Leu Ser Asn Ile Glu Ala Asp Tyr Leu
 100 105 110

Leu Gly Phe Leu Lys Pro Ala Val Glu Glu Met Val Arg Arg Ser Glu
 115 120 125

Gln Asn Asp Glu Arg Trp Lys Asp Ile Thr Glu Lys Thr Leu Ala Leu
 130 135 140

Glu Ala Leu Lys Asp Ser Glu Arg Glu Ile Arg Lys Glu Lys Glu Lys
 145 150 155 160

Leu Glu Asp Glu Val Gln Leu Ala Lys Val Lys Ile Glu Thr Lys Glu
 165 170 175

Ser Glu Leu Asn Asp Leu Lys Lys Asp Tyr Ile Asp Thr Arg Glu Glu
 180 185 190

Leu Ala Asp Thr Ile Glu Glu Leu Asp Glu Val Lys Asn Ser Ile Val
 195 200 205

Glu Lys Glu Ala Lys Val Lys Gly Leu Glu Glu Lys Leu Arg Asp Leu
 210 215 220

Glu Lys Glu Leu Gly Asp Tyr Asp Lys Lys Leu Ser Glu Ala Ala Lys
 225 230 235 240

Gln Asn Ser Asp Leu Ser Asn Glu Asn Lys Glu Leu Lys Glu Asn Leu
 245 250 255

Asp Thr Ala Glu Asn Ile Thr Val Glu Leu Gln Lys Lys Ser His Glu

ES 2 716 831 T3

	260						265						270					
Leu	Glu	Lys 275	Thr	Lys	Lys	Glu	Val 280	Glu	Leu	Glu	Leu	Lys 285	Ala	Glu	Lys			
Glu	Ala 290	Leu	Glu	Ala	Glu	Lys 295	Val	Lys	Leu	Ala	Glu 300	Ala	Asn	Glu	Ala			
Asn 305	Asp	Lys	Leu	Ser	Glu 310	Glu	Arg	Asp	Ala	Ala 315	Lys	Lys	Glu	Ala	Glu 320			
Lys	Val	Pro	Glu	Leu 325	Glu	Gly	Gln	Val	Glu 330	Lys	Leu	Val	Glu	Glu 335	Ile			
Thr	Ala	Ala	Lys 340	Lys	Glu	Ala	Glu	Glu 345	Leu	Gln	Ala	Lys	Ala 350	Glu	Gly			
Leu	Glu	Lys 355	Asp	Phe	Glu	Ala	Val 360	Lys	Ala	Glu	Lys	Glu 365	Ala	Leu	Glu			
Ala 370	Glu	Ile	Ala	Lys	Leu	Lys 375	Glu	Asp	His	Gln	Lys 380	Glu	Val	Asp	Ala			
Leu 385	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala 390	Asp	Lys	Glu	Lys	Met 395	Leu	Lys	Ser	Leu	Gln 400			
Glu	Gln	Leu	Asp	Lys 405	Ala	Lys	Glu	Glu 410	Ala	Met	Lys	Asn	Glu	Gln 415	Met			
Ser	Gln	Glu	Glu 420	Lys	Ala	Lys	Leu	Gln 425	Ala	Glu	Leu	Asp	Lys 430	Ala	Lys			
Gln	Glu 435	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Lys 440	Asp	Met	Pro	Asn	Lys 445	Val	Ala	Pro			
Gln 450	Ala	Glu	Gly	Lys	Ala	Asn 455	Ala	Gly	Gln	Ala	Ala 460	Pro	Asn	Gln	Asn			
Gln 465	Asn	Asn	Gln	Ala	Gln 470	Ala	Asn	Gln	Ala	Lys 475	Asn	Ala	Asn	Asn	Leu 480			
Pro	Ser	Thr	Gly	Asp 485	Lys	Pro	Val	Asn	Pro 490	Leu	Leu	Val	Ala	Ser 495	Gly			
Leu	Ser	Leu	Met 500	Ile	Gly	Ala	Gly	Ala 505	Phe	Val	Tyr	Ala	Gly 510	Lys	Arg			
						Lys	Lys	Gly 515										

ES 2 716 831 T3

<211> 1269
 <212> PRT
 <213> Streptococcus uberis

5 <400> 3

Met	Lys	Gln	Glu	Lys	Lys	Cys	Val	Asn	Trp	Phe	Met	Arg	Lys	Arg	Gly	1	5	10	15
Lys	Gln	Trp	Ile	Tyr	Gly	Cys	Gly	Ile	Leu	Ile	Cys	Gly	Leu	Val	Phe	20	25	30	
Gly	Val	Glu	Ala	Thr	Ser	Val	Ala	Ala	Glu	Thr	Ile	Pro	Thr	Thr	Ala	35	40	45	
Thr	Val	Glu	Thr	Leu	Asn	Ser	Asp	Val	Thr	Ser	Lys	Thr	Ser	Gln	Glu	50	55	60	
Thr	Gln	Lys	Thr	Thr	Glu	Ile	Ala	Thr	Pro	Val	Ser	Glu	Ile	Val	Met	65	70	75	80
Pro	Ser	Gln	Gln	Lys	Val	Val	Glu	Glu	Val	Thr	Gln	Glu	Val	Ser	Val	85	90	95	
Gln	Asn	Gln	Glu	Thr	Val	Ile	Asn	Met	Pro	Val	Leu	Thr	Gln	Gly	Val	100	105	110	
Asn	Ile	Ala	Gly	Pro	Asn	Glu	Thr	Ala	Ile	Leu	Thr	Asp	Ser	Ile	Val	115	120	125	
Gln	Asn	Asn	Val	Gln	Pro	Ile	Asp	Arg	Val	Glu	Lys	Met	Glu	Thr	Ser	130	135	140	
Phe	Ser	Thr	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Ala	Glu	Ser	Ser	Tyr	Asn	Thr	Asn	145	150	155	160
Leu	Gln	Asp	Leu	Asn	Tyr	Asp	Pro	Asn	Val	Trp	Glu	Val	Arg	Glu	Asp	165	170	175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Asn	Ala	Val	Gly	Lys	Gly	Asp	Asn	Phe	Leu	Phe	Ser	180	185	190	

ES 2 716 831 T3

Ala Ser Thr Gly Glu Asn Phe Ile Phe Gln Thr Asp Val Thr Phe Leu
195 200 205

Gln Asn Thr Gly Ala Ala Ser Leu Val Phe Arg Ser Asn Asn Asp Pro
210 215 220

Glu Asn Leu Asn Gly Tyr Val Val Asn Leu Asp Gly Asn Ser His Lys
225 230 235 240

Ala Arg Leu Trp Arg Trp Ala Glu Ala Asn Leu Ile Asn Asp Lys Glu
245 250 255

Ile Leu Ala Ser Pro Asp Asn Lys Tyr Phe Leu Lys Val Val Ala Thr
260 265 270

Asn Gly Trp Ile Ser Tyr Tyr Ile Asn Gly Ile Leu Ile Ala Asn Leu
275 280 285

Ser Asp Tyr Thr Ile Gln Arg Asp Asp Leu Gly Gln Thr Thr Tyr Ile
290 295 300

Lys Asp Gly His Phe Gly Leu Leu Asn Trp Asn Gly Glu Met Val Phe
305 310 315 320

Gln Asn Thr Phe Tyr Arg Glu Leu Thr Asn Glu Glu Leu Pro Leu Leu
325 330 335

Asn Asp Val Thr Val Thr Ser Lys Asn Gly Pro Val Glu Pro Lys Gly
340 345 350

Gln Phe Phe Ser Glu Ser Ser Val Tyr Ile Gln Tyr Val Ser Asn Asp
355 360 365

Ala Ser Thr Val Asp Leu Ser Phe Asp Ala Asn Asn Ser Asp Ala Leu
370 375 380

Ile Thr Val Thr Asp Ala His Gly Lys Val Tyr Ser Asn Pro Ser Ala
385 390 395 400

Ile Pro Val Thr Val Gly Pro Asn Tyr Leu Thr Val Thr Ser Thr Tyr
405 410 415

Thr Thr Thr Asp Gly Tyr Val Ile Pro Ser Thr Tyr Arg Ile Asn Val
420 425 430

His Arg Arg Gln Pro Gln Ser Val Tyr Tyr Asn Glu Asn Phe Arg Asp

ES 2 716 831 T3

435								440							445
Gln	Tyr	His	Tyr	Ser	Val	Lys	Asp	Gly	Trp	Ala	Asn	Asp	Pro	Asn	Gly
450						455					460				
Leu	Val	Tyr	Tyr	Asn	Gly	Val	Tyr	His	Met	Phe	Tyr	Gln	Phe	Tyr	Asp
465					470					475					480
Asp	Thr	Lys	Trp	Gly	Pro	Met	His	Trp	Ala	His	Ala	Thr	Ser	Thr	Asp
				485					490					495	
Leu	Ile	His	Trp	Glu	Asp	Gln	Pro	Ile	Ala	Phe	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Asn
			500					505					510		
Gly	Thr	Met	Phe	Ser	Gly	Cys	Ile	Val	Ala	Asp	Val	Asn	Asn	Ser	Ser
		515					520					525			
Gly	Leu	Phe	Asp	Ser	Glu	Asn	Gly	Gly	Leu	Val	Ala	Leu	Ile	Thr	Ile
530						535					540				
Asn	Gly	Glu	Gly	Gln	Arg	Ile	Lys	Leu	Ala	Tyr	Ser	Thr	Asp	Glu	Gly
545					550					555					560
Lys	Thr	Trp	Gln	Lys	Val	Asp	Glu	Ile	Val	Ala	Asp	Trp	Thr	Thr	Asp
				565					570						575
Pro	Leu	Gln	Thr	Arg	Asp	Phe	Arg	Asp	Pro	Lys	Val	Phe	Arg	Trp	Glu
			580					585					590		
Asn	Lys	Trp	Phe	Met	Val	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro	Leu	Arg	Leu	Tyr	Ser
		595					600					605			
Ser	Asp	Asp	Leu	Lys	Asn	Trp	Thr	Val	Glu	Ser	Thr	Tyr	Pro	Asp	Leu
610						615					620				
His	Thr	Glu	Cys	Pro	Asp	Leu	Tyr	Pro	Val	Leu	Ala	Glu	Asp	Gln	Thr
625					630					635					640
Val	Lys	Trp	Val	Leu	Ser	Arg	Gly	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Lys	Val	Gly	Asp
				645					650					655	
Leu	Gln	Gln	Ala	Asp	Gly	Asn	Trp	Lys	Phe	Ile	Pro	Asp	Ala	Asn	Tyr
			660					665					670		
Gln	Glu	Thr	Asp	Ser	Ile	Met	Asn	Phe	Gly	Lys	Asp	Ser	Tyr	Ala	Ala
		675					680					685			

ES 2 716 831 T3

Met	Thr	Tyr	Tyr	Val	Gln	Asp	Phe	Gly	Thr	Lys	Ala	Asn	Pro	Thr	Ile	
	690					695					700					
Pro	Lys	Ile	Ile	Glu	Leu	Asn	Trp	Met	Asn	Thr	Trp	Asp	Asn	Tyr	Cys	
705					710					715					720	
Asn	Leu	Val	Ala	Asp	Arg	Leu	Gly	Gln	Ser	Phe	Asn	Gly	Thr	Phe	Asn	
				725					730					735		
Leu	Asn	Leu	Glu	Leu	Gly	Leu	Val	Lys	Glu	Gly	Asp	Lys	Tyr	Val	Leu	
			740					745					750			
Thr	Gln	Thr	Pro	Val	Glu	Ala	Tyr	Glu	Ser	Leu	Arg	Asp	Asn	Asp	Asn	
		755					760					765				
Lys	Val	Glu	Tyr	Lys	Asn	Val	Val	Val	Gly	Lys	Glu	Asn	Asp	Leu	Phe	
	770					775					780					
Lys	Asp	Phe	Ser	Gly	Asp	Thr	Tyr	Glu	Ile	Val	Ala	His	Phe	Lys	Pro	
785					790					795					800	
Ser	Asp	Lys	Thr	Thr	Lys	Val	Gly	Phe	Asn	Leu	Arg	Val	Gly	Ser	Gly	
				805					810					815		
Glu	Met	Thr	Lys	Val	Tyr	Tyr	Asp	Leu	Ile	Ala	Gly	Arg	Ile	Ile	Ile	
			820					825					830			
Asp	Arg	Ser	Gln	Ser	Gly	Ile	Ile	Leu	Thr	Glu	Leu	Phe	Ser	Asn	Ile	
		835					840					845				
Asp	Ser	Gln	Ala	Val	Thr	Pro	Asn	Ile	Asp	Gly	Ser	Ile	Asp	Leu	His	
	850					855					860					
Ile	Phe	Val	Asp	Arg	Ala	Ser	Val	Glu	Val	Phe	Ser	Lys	Asn	His	Thr	
865					870					875					880	
Val	Ala	Gly	Ala	Asn	Gln	Ile	Phe	Thr	Ser	Ala	Gln	Ser	Leu	Gly	Leu	
				885					890					895		
Glu	Val	Leu	Ile	Asp	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Ala	Asp	Ile	Val	Leu	Tyr	
			900					905					910			
Pro	Leu	Lys	Ser	Ile	Trp	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile	Asp	Thr	Thr	Pro	Gln	
		915					920					925				

ES 2 716 831 T3

Ile Val Ile Pro Ala Ser Glu Pro Lys Val Arg Met Asn Val Gly Asp
 930 935 940
 Ser Thr Thr Val Lys Ala Tyr Val Ser Pro Val Gly Ala Ser Gln Asp
 945 950 955 960
 Leu Ile Trp Asn Ile Ser Asn Pro Ser Leu Val Leu Asp Gln Ile Ser
 965 970 975
 Gly Asn Gln Val Phe Leu Lys Ala Ile Lys Lys Gly Gln Val Ile Val
 980 985 990
 Arg Ala Gln Ser Gln Ser Asn Pro Ala Val Tyr Gln Asp Phe Ile Ile
 995 1000 1005
 Asp Ile Leu Glu Asp Asn Phe Asn Thr Asn Val Lys Asp Val Asn
 1010 1015 1020
 Val Phe Ser Gly Asp Trp Tyr Val Asp Gly Glu Ser Leu Lys Val
 1025 1030 1035
 Ala Asn His Asn Ser Asn Asp Ile Tyr Met Ser Ala Asp Lys Ile
 1040 1045 1050
 Pro Tyr Glu Asn Tyr Gln Met Asp Leu Asp Ile Lys Tyr Gly Arg
 1055 1060 1065
 Gly Ile Val Asn Ile Phe Phe Ala Ser Gly Asn Pro Asp Ala Asn
 1070 1075 1080
 Asn Ala Tyr Thr Ile Gln Phe Gly Ser Asn Asn Ser Val Arg Leu
 1085 1090 1095
 Phe Arg Phe Tyr Arg Asp Thr Ile Phe Glu Ala Pro Met Ile Asp
 1100 1105 1110
 Val Ile Asn Asp Asn Gln Phe His His Val Arg Leu Val Lys Ser
 1115 1120 1125
 Ala Asn Val Ile His Val Tyr Val Asp Asn Glu Met Val Met Ser
 1130 1135 1140
 Tyr Thr Phe Asp Gln Val Glu Glu Phe Phe Asn Asn Pro Tyr Leu
 1145 1150 1155

ES 2 716 831 T3

Gly Leu Gly Leu Trp Asp Gly Glu Leu Ala Val Gln Asn Phe Tyr
1160 1165 1170

Val Ile Asp Leu Asp Ala Gln Lys Pro Val Phe Val Glu Glu His
1175 1180 1185

Glu Lys Glu Lys Leu Leu Ser Glu Leu Lys Lys Ser Val Val Lys
1190 1195 1200

Thr Ser Ser Tyr Ser Thr Leu Lys Thr Ile Glu Thr Ser Ser Lys
1205 1210 1215

Thr Asn Ser Glu Asn Leu Glu Ala Pro Thr Val Ser Lys Lys Asn
1220 1225 1230

Leu Pro Met Thr Ser Asp Ser Asn Asn Asn Leu Glu Glu Leu Gly
1235 1240 1245

Ile Leu Val Ile Leu Thr Thr Leu Gly Ala Phe Leu Gly Arg Val
1250 1255 1260

Ile Leu Lys Lys Glu Lys
1265

<210> 4

<211> 369

<212> PRT

<213> Streptococcus uberis

<400> 4

Met Lys Lys Lys Gln Glu Met Lys Tyr Tyr Leu Arg Lys Ser Ala Tyr
1 5 10 15

Gly Leu Ala Ala Val Ser Val Ala Val Leu Ala Val Gly Ser Pro Val
20 25 30

Ser Ala Gln Glu Lys Ala Ala Ser Thr Glu Ala Thr Pro Lys Val Ala
35 40 45

Pro Lys Val Pro Glu Lys Pro Ser Lys Glu Val Ile Lys Lys Ala Leu
50 55 60

Lys Lys Thr Asp Glu Glu Thr Lys Glu Lys Glu Lys Glu Ala Lys Glu
65 70 75 80

Lys Val Glu Asn Ser Glu Glu Ser Thr Ala Met Val Ser Glu Leu Ser
85 90 95

5

10

ES 2 716 831 T3

Ser	Thr	Asn	Glu	Glu	Thr	Ser	Ser	Glu	Glu	Glu	Asn	Asn	Thr	Asp	Glu	
			100					105					110			
Glu	Glu	Thr	Asp	Gly	Leu	Glu	Ser	Glu	Glu	Ser	Glu	Glu	Thr	Glu	Ser	
		115					120					125				
Glu	Val	Lys	Glu	Glu	Ser	Glu	Glu	Glu	Lys	Glu	Asp	Asp	Pro	Ser	Glu	
	130					135					140					
Ser	Asp	Thr	Glu	Val	Glu	Asn	Val	Glu	Ala	Ile	Asn	Leu	Ser	Glu	Ala	
145					150					155					160	
Glu	Gly	Asn	Asp	Ser	Ser	Lys	Pro	Glu	Thr	Ser	Glu	Glu	Val	Thr	Ala	
				165					170					175		
Glu	Glu	Asp	Arg	Gln	Glu	Thr	Asp	Arg	Leu	Ala	Glu	Val	Lys	Thr	Glu	
			180					185					190			
Glu	Ser	Ala	Lys	Glu	Gly	Asp	Glu	Asp	Ala	Asp	Lys	Lys	Asp	Glu	Ala	
		195					200					205				
Glu	Glu	Lys	Ala	Lys	Lys	Gly	Ala	Glu	Leu	Ser	Arg	Val	Lys	Ala	Glu	
	210					215					220					
Ala	Leu	Ala	Lys	Leu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ala	Ser	Arg	Leu	Met	Lys	Lys	
225					230					235					240	
Ile	Val	Glu	Ser	Gly	Lys	Thr	Val	Glu	Gly	Ile	Leu	Ser	Phe	Met	Lys	
				245					250					255		
Glu	Ser	Leu	Pro	Gln	Leu	Glu	Ala	Ala	Arg	Ala	Ser	Glu	Gln	Ala	Lys	
			260					265					270			
Ala	Pro	Glu	Val	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	His	Leu	Pro	Ser	Glu	Lys	Lys	
		275					280					285				
Ala	Val	His	Asn	Pro	Val	Gln	Val	Ala	Lys	Arg	Ser	Glu	Ser	Leu	Glu	
	290					295					300					
Gln	Lys	Ala	Glu	Asn	Ala	Lys	Thr	Ser	Thr	Asn	Leu	Gln	Asn	Thr	Gln	
305					310					315					320	
Ile	Pro	Val	Gln	Glu	Ala	Lys	Arg	Thr	Gln	Ala	Gln	Leu	Pro	Ser	Thr	
				325					330					335		

ES 2 716 831 T3

Gly Glu Asp Tyr Gln Ala Tyr Leu Val Ala Ala Ala Met Ala Leu Ile
340 345 350

Ala Ser Ser Gly Met Val Ala Tyr Gly Ser Tyr Arg Lys Lys Lys Gln
355 360 365

Lys

<210> 5

<211> 278

5 <212> PRT

<213> Streptococcus uberis

<400> 5

Met Ser Lys Pro Met Thr Lys Lys Lys Lys Ala Ile Ser Ile Gln Lys
1 5 10 15

Ser Val Lys Pro Ile Leu Gly Phe Thr Phe Gly Ala Leu Leu Leu Ser
20 25 30

Thr Val Phe Thr Pro Ser Val Phe Ala Glu Glu Val Val Ser Ser Leu
35 40 45

Gly His Ala Thr Ser Gly Leu Leu Ser Val Ser Val Pro Lys Glu Leu
50 55 60

Thr Ser Leu Glu Thr Thr Thr Tyr Leu Met Ala Ser Glu Ser Pro Ser
65 70 75 80

Asn Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ile Ser Ser Asp Asn Gly Gly Thr Ala
85 90 95

Ser Asn Pro Asn Glu Ile Val Thr Thr Glu Thr Thr Ser Glu Ala Ile
100 105 110

Pro Phe Asp Thr Glu Val Ile Gln Asn Pro Asp Leu Pro Ile Gly Glu
115 120 125

Ile Lys Val Val Gln Glu Gly Val Ala Gly Glu Val Thr Val Thr Lys
130 135 140

Thr Thr Thr Thr Ile Thr Leu Asn Gly Val Ser Gln Ser Thr Thr Thr
145 150 155 160

Glu Ser Arg Val Pro Val Lys Lys Pro Ile Asn Lys Ile Ile Glu Val

ES 2 716 831 T3

165

170

175

Gly Thr Lys Glu Ile Ser Thr Ser Pro Ser Ser Ser Asp Val Ile Thr
180 185 190

Val Ser Pro Ser Pro Ser Ser Thr Ser Ser Glu Ser Asn Gln Gln Gly
195 200 205

Ser Leu Thr Pro Ala Pro Lys Ser Arg Gln Asn Ser Gln Glu Lys Lys
210 215 220

Gly Ser Gln Thr Lys Lys Ser Lys Asp Asp Ala Lys Glu Lys Glu Gly
225 230 235 240

Asp Lys Lys Glu Leu Pro Pro Thr Gly Ser Gln Glu Ser Gly Ile Phe
245 250 255

Ser Leu Phe Ser Ala Leu Ile Ser Thr Ala Leu Gly Leu Phe Leu Leu
260 265 270

Lys Ser Asn Lys Asn Asp
275

<210> 6

<211> 499

5 <212> PRT

<213> Streptococcus uberis

<400> 6

Met Lys Ser Tyr Leu Lys Arg Arg Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Ser Val
1 5 10 15

Leu Ala Ala Thr Val Leu Ala Thr Gly Trp Gln Ser Thr Ser Val Leu
20 25 30

Ala Glu Asn Pro Thr Thr Ser Pro Thr Thr Thr Val Thr Ser Asn Gly
35 40 45

Phe Asn Phe Asn Ala Thr Leu Leu Asp His Asn Gly Lys Thr Val Ser
50 55 60

Gly Lys Thr Val Ser Leu Tyr Asp Ile Thr Asp Gly Asn Arg Thr Leu
65 70 75 80

Val Gln Ser Ala Val Ser Asp Gln Asn Gly Ile Ala Ser Phe Ser Gln
85 90 95

10

ES 2 716 831 T3

Leu Pro Leu Asn Arg Asn Leu Ser Val Phe Val Asp Asn Val Ala Gln
 100 105 110

Gly Tyr Thr Thr Arg Thr Ser Glu Ser Gly Gln Val Arg Ser Ser Ala
 115 120 125

Phe Tyr Ile Asp Gly Gln Gly Thr Asn Thr Pro Lys Tyr Ser Asp Lys
 130 135 140

Thr Ile Thr Ile Ser Val Leu Asn Glu Glu Ala Glu Pro Leu Ala Asn
 145 150 155 160

Gln Lys Val Thr Leu Thr Asn Pro Leu Lys Glu Val Val Gly Glu Ala
 165 170 175

Met Thr Asp Ala Asp Gly His Val Val Phe Lys Asp Lys Leu Leu Glu
 180 185 190

Gly Val Phe Tyr Asn Tyr Ala Val Asn Gly Lys Ala Ile Asp Ser Ala
 195 200 205

Gln Pro Asp Ser Lys Arg Ser Val Phe Leu Glu Ser Asn Gln Leu Ala
 210 215 220

Lys Glu Gly Phe Thr Phe Thr Ala Thr Ile Leu Gly Lys Asn Gly Lys
 225 230 235 240

Thr Val Ala Gly Lys Thr Val Ser Leu Tyr Asp Ile Thr Asp Gly Asn
 245 250 255

Arg Thr Leu Val Gln Ser Ala Val Ser Asp Gln Asn Gly Ile Ala Ser
 260 265 270

Phe Ser Gln Leu Pro Leu Asn Arg Asn Leu Ser Val Phe Ile Asp Asp
 275 280 285

Val Ala Gln Gly Tyr Thr Thr Arg Thr Ser Glu Asn Gly Gln Val Arg
 290 295 300

Ser Ser Ala Phe Tyr Val Asp Gly Gln Gly Thr Asn Thr Pro Lys Tyr
 305 310 315 320

Ser Asp Lys Thr Ile Thr Ile Ser Val Leu Asn Glu Glu Gly Glu Pro
 325 330 335

ES 2 716 831 T3

Leu Ala Asn Gln Lys Val Thr Leu Ile Asn Pro Leu Lys Glu Val Ile
340 345 350

Gly Glu Ala Asn Thr Asp Ala Asn Gly Lys Val Ile Phe Thr Asp Lys
355 360 365

Leu Leu Asp Gly Val Phe Tyr Thr Tyr Ala Val Asn Asp Gln Thr Ile
370 375 380

Asp Ala Thr Gln Pro Asp Thr Ser Arg Asn Val Phe Leu Arg Ala Asp
385 390 395 400

Gln Ile Leu Lys Glu Ser Pro Lys Asn Thr Ala Ser Glu Ala Ala Thr
405 410 415

Asn Leu Glu Lys Thr Thr Glu Ser Lys Glu Gly Asn Met Pro Gln Gln
420 425 430

Asn Gln Ser Glu Ala Lys Glu Lys Ala Pro Glu Lys Gln Val Asp Ala
435 440 445

Asn Ala Ala Asn Lys Lys Ala Pro Gly His Gly Glu Ala Lys Lys Gly
450 455 460

Leu Pro Met Ala Gly Glu Arg Gly Ser Arg Leu Phe Thr Phe Ile Gly
465 470 475 480

Leu Ser Leu Ile Leu Gly Ile Ala Gly Tyr Leu Leu Lys His Lys Lys
485 490 495

Val Lys Ser

<210> 7

<211> 1144

<212> PRT

<213> Streptococcus uberis

<400> 7

Met Val Lys Asn Asn Ile His Ser Arg Lys Lys His Ile Leu Lys Ile
1 5 10 15

Ser Leu Leu Ala Thr Ser Val Leu Thr Thr Thr Val Ser Thr Val Ser
20 25 30

Ala Glu Gln Leu Gln Asn Glu Lys Gln Ser Asp Leu Leu Ser Lys Met
35 40 45

5

10

ES 2 716 831 T3

Thr 50	Glu	Thr	Ser	Thr	Pro	His 55	Thr	Ile	Ile	Ser	Ser 60	Glu	Asp	Leu	Ser
Asn 65	Ser	Asn	Gln	Glu	Ala 70	Asn	Gln	Lys	Asp	Glu 75	Thr	Ala	Ser	Lys	Ser 80
Leu	Gln	Pro	Met	Ile 85	Glu	Lys	Val	Asp	Pro 90	Ser	His	Ile	Gln	Ala 95	Leu
Trp	Glu	Lys	Val	Gly 100	Thr	Gly	Glu	Gly 105	Asp	Val	Leu	Ala	Val 110	Ile	Asp
Ser	Gly 115	Ile	Glu	Thr	Lys	His 120	Ser	Met	Leu	Gln	Leu	Pro 125	Glu	Asp	Ala
Asp 130	Lys	Met	Tyr	Thr	Asp	Gln 135	Ala	Ser	Ile	Asp	Ser 140	Lys	Lys	Gln	Leu
Leu 145	Gly	Ile	Glu	Arg	Gly 150	Gln	Trp	Ile	Asn	Asp 155	Lys	Leu	Pro	Phe	Tyr 160
His	Asp	Tyr	Thr	Gln 165	Gly	Glu	Glu	Ser	Ile 170	Asp	Arg	Asn	Thr	Tyr 175	His
Gly	Thr	His	Val 180	Ala	Gly	Ile	Ala	Thr 185	Ala	Ser	Gly	Leu	Thr 190	Gln	Lys
Glu	Asn	Lys 195	Glu	Gln	Met	Gln	Gly 200	Ile	Val	Pro	Asn	Ala 205	Gln	Leu	Leu
Phe 210	Leu	Lys	Val	Gly	Gln	Pro 215	Ser	Val	Glu	Gly	Glu 220	Arg	Glu	Lys	His
Tyr 225	Ala	Met	Ala	Ile	Lys 230	Asp	Ala	Ile	Ala	Leu 235	Gly	Ala	Thr	Ala	Ile 240
Asn	Met	Ser	Phe	Gly 245	Gln	Val	Gly	Lys	Ala 250	Ser	His	Glu	Leu	Asn 255	Asp
Asp	Phe	Lys	Lys 260	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala 265	Ala	Asp	Lys	Gly	Val 270	Ala	Ile
Val	Val	Ala 275	Ala	Gly	Asn	Asp	Tyr 280	Ala	Met	Gly	Gly 285	Ser	Gln	Thr	Lys

ES 2 716 831 T3

Pro Leu Ala Lys Asn Pro Asp Thr Gly Val Ile Gly Thr Pro Ala Thr
 290 295 300
 Thr Glu Glu Val Phe Thr Val Ala Ala Tyr Val Ala Pro His Tyr Trp
 305 310 315 320
 Ser Arg Val Leu Ser Val Thr Asp Gly Ser Thr Ser Lys Ala Leu Ala
 325 330 335
 Leu Glu Met Ala Ser Pro Phe Ala Glu Asn Lys Asp Tyr Glu Leu Ile
 340 345 350
 Phe Leu Glu Lys Gly Leu Glu Thr Glu Glu Asn Ala Glu Arg Leu Lys
 355 360 365
 Asn Lys Val Leu Val Leu Asn Tyr Asp Phe Val Thr Asn Ser Lys Glu
 370 375 380
 Val Ala Glu Lys Val Glu Ala Leu Gly Ala Ala Gly Val Leu Val His
 385 390 395 400
 Asn Asn Gln Ala Lys Lys Pro Leu Ile Pro Leu Ala Tyr Asn Gly Pro
 405 410 415
 Leu Pro Met Gly Phe Ile Ser Lys Glu Asp Ala Asp Trp Leu Lys Thr
 420 425 430
 Met Thr Ser Pro Gln Phe Arg Leu Lys Lys Glu Lys Gln Leu Val Glu
 435 440 445
 Val Pro Gly Gly Arg Gln Met Thr Asn Phe Ser Ser Trp Gly Leu Ser
 450 455 460
 Val Asp Gly Asn Met Lys Pro Asp Phe Ala Ala Pro Gly Tyr Glu Ile
 465 470 475 480
 Tyr Ser Pro Thr Pro Gly Asn Asp Tyr Ser Lys Met Ser Gly Thr Ser
 485 490 495
 Ala Ala Ser Pro His Ala Met Gly Ile Ile His Leu Val Arg Lys His
 500 505 510
 Ile Gln Lys Glu Tyr Pro His Leu Ser Ala Lys Glu Gln Leu Gln Leu
 515 520 525

ES 2 716 831 T3

Val Lys Asn Leu Leu Met Ser Thr Ala Ser Pro Ile Tyr Ser Glu Leu
 530 535 540

Asp His Ser Tyr Tyr Ser Pro Arg Val Gln Gly Ala Gly Ala Leu Asp
 545 550 555 560

Ala Lys Lys Ala Leu Glu Thr Asp Val Tyr Val Thr Ala Ala Asp Gly
 565 570 575

Leu Ser Lys Ile Gln Leu Gly Asp Val Asn Asn Gln Phe Glu Leu Arg
 580 585 590

Val Thr Leu His Asn Leu Ser Asn Gln Glu Lys Asn Phe Thr Tyr Phe
 595 600 605

Ala Arg Val Leu Thr Asp Lys Val Glu Lys Gly Arg Ile Leu Leu Arg
 610 615 620

Pro Gln Glu Leu Tyr Gln Thr Arg Pro Leu Gln Val Lys Leu Ala Pro
 625 630 635 640

Asn Gln Lys Gln Glu Val Val Ile Lys Val Asp Ile Ser Asn Phe Asp
 645 650 655

Gln Gln Leu Lys Ala Gln Met Pro Asn Gly Tyr Phe Leu Asp Gly Phe
 660 665 670

Val Val Phe Gln Ser Lys Glu Gly Ala Gln Lys Asp Leu Ser Ile Pro
 675 680 685

Phe Ile Ala Phe Lys Gly Lys Phe Ala Asp Leu Glu Ala Leu Asp Ser
 690 695 700

Pro Ile Tyr Arg Asn Leu Asp Gly Thr Phe Tyr Tyr Ser Pro Lys Glu
 705 710 715 720

Gly Gln Asp Pro Tyr Asp Phe Glu Val Asp Ser Ile Gln Gln Ile Lys
 725 730 735

Glu Gln Tyr Met Thr Gly Leu Ile Thr Thr Phe Thr Pro Trp Ser Leu
 740 745 750

Val Glu Gly Ser Lys Ile Asp Gly Phe Ser Pro Glu Met Ala Ser Glu
 755 760 765

Phe Ser Thr Thr Asp Tyr Leu Gly Ser Tyr Asn Lys Glu Gly Asp Asn

ES 2 716 831 T3

770		775		780
Thr 785	Val Arg Arg Phe Arg Phe Val Glu Gly Lys Pro Tyr Leu Ala Leu	790	795	800
Ser	Pro Asn Gly Asp 805	Asp Asn Met Asp 810	Val Gly Phe Arg Gly 815	Val
Phe	Leu Arg Asn 820	Val Arg Asp Ile 825	Lys Ala Gln Val Phe Ala Ser Asp	830
Asp	Leu Gln His 835	Pro Ile Trp Glu 840	Ser Pro Ile Lys 845	Ala Phe Ala Lys
Lys 850	Asp Val Asn Thr Asn Asp 855	Ile Lys Glu Ser Met 860	Leu Glu Asn Thr	
Val 865	Trp Glu Gly Lys 870	Asp Ala Ser Gly Asn 875	Pro Val Thr Glu Gly Leu	880
Tyr	Arg Tyr Arg 885	Val Thr Tyr Thr Pro 890	Leu Ala Glu Gly Ala Lys Glu	895
Gln	Phe Ile Asp 900	Phe Asp Ile Leu Val Asp 905	Leu Thr Pro Ser Lys Leu	910
Pro	Gln Ser Ala Ile Leu Met 915	Leu Ala Glu Arg Arg 920	Ile Glu Leu Thr	925
Glu	Ser Arg Asp Tyr 930	Leu Ser His Asp Thr 935	Tyr Arg Asp Arg Leu Tyr	940
Tyr 945	Lys Tyr Gly Thr 950	Asp Asp Ile Asn Phe 955	Thr Thr Phe Glu Lys Asp	960
Asp	Met Gly His 965	Phe Val Ile Pro Asn Gln 970	Val Glu Asp Glu Leu Ser	975
Gly	Glu Lys Ile 980	Thr Ile Asn Leu Asp 985	Lys Thr Asp His Phe Phe Phe	990
Val	Arg Glu Asp Phe Ser Gly 995	Asn Phe Ser Val Ile Ser 1000	Leu Ser Glu	
Leu 1010	Leu Asn Asn His Ser Asp 1015	Gln Met His Ser Leu 1020	Glu Glu Ser	

ES 2 716 831 T3

Lys Ser Asp Arg Lys Glu Ser Asn Thr Gly Asp Ile Arg His Glu
1025 1030 1035

Lys Gln Glu Asn Leu Ser Gln Gln Thr Leu Leu Ser Thr Pro Ser
1040 1045 1050

Ile Asp Gly Gln Lys Gln Asn Asp Gln Leu Met Val Glu Lys Glu
1055 1060 1065

Lys Asp Ile Met Asp Glu Ser Lys Ser Glu Arg Ser Glu Lys Asn
1070 1075 1080

Lys Phe Pro Lys Val Pro Ala Ser Ile Thr Leu Lys Asp Gly Thr
1085 1090 1095

Leu Tyr Pro Gln Ser Ile Ser Gln Lys Thr Ser Leu Pro Lys Thr
1100 1105 1110

Val Asp Ser Gln Lys Thr Met Thr Phe Leu Gly Ile Ala Met Leu
1115 1120 1125

Phe Gly Gly Ile Leu Gln Val Leu Trp Ser Tyr Phe Lys Lys Arg
1130 1135 1140

Asp

<210> 8
<211> 484
<212> PRT
<213> Streptococcus uberis

<400> 8

Met Thr His Met Asn Asn Asn Gly Arg Tyr Lys Gln Arg Phe Ser Leu
1 5 10 15

Arg Lys Tyr Lys Phe Gly Ala Ala Ser Val Leu Leu Gly Thr Ile Phe
20 25 30

Ala Leu Gly Met Thr Gly Thr Thr Ala Gln Ala Gln Met Pro Ser His
35 40 45

Ser His Pro Gly Gly Val Tyr Pro Gly Gly Ile Ile Pro Gly Ala Pro
50 55 60

ES 2 716 831 T3

Gly Ala Ile Pro Gly Ile Pro Gly Gly Gly Ser Gly Phe Asp Phe Asp
 65 70 75 80
 Pro Ser Gly Tyr Pro Ala Gly Pro His Gly Tyr Leu Pro Ser Tyr Gly
 85 90 95
 Pro Gly Gly Val Gly Met Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Pro
 100 105 110
 Ile Gly Pro Asn Gly Ile Pro Gly Glu Arg Gly Pro Val Gly Pro Ala
 115 120 125
 Gly Ala Glu Gly Pro Arg Gly Pro Lys Gly Asp Lys Gly Glu Thr Gly
 130 135 140
 Gln Gln Gly Pro Arg Gly Glu Ala Gly Ile Ala Gly Pro Ser Gly Pro
 145 150 155 160
 Gln Gly Pro Ala Gly Val Ala Gly Pro Ala Gly Pro Gln Gly Val Ala
 165 170 175
 Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Arg Pro Gly Glu Ala Gly
 180 185 190
 Leu Asp Gly Leu Asp Gly Leu Asn Gly Leu Asn Gly Ile Asp Gly Thr
 195 200 205
 Asp Gly Lys Asp Gly Lys Asp Gly Lys Asp Gly Gln Asn Gly Gln Asp
 210 215 220
 Gly Lys Asn Gly Arg Asn Gly Gln Asp Gly Gln Lys Gly Lys Asp Gly
 225 230 235 240
 Gln Asn Gly Arg Asn Gly Gln Asp Gly Lys Ala Gly Lys Asp Gly Lys
 245 250 255
 Ser Gly Thr Asp Gly Lys Asn Gly Lys Ala Gly Thr Asp Gly Lys Asn
 260 265 270
 Gly Lys Ser Gly Lys Asp Gly Lys Ala Gly Thr Asp Gly Lys Asn Gly
 275 280 285
 Arg Ala Gly Thr Asp Gly Lys Asn Gly Lys Ala Gly Gln Asp Gly Lys
 290 295 300
 Asp Gly Lys Asn Gly Thr Asp Gly Leu Asn Gly Arg Asp Gly Arg Asp

ES 2 716 831 T3

305						310						315						320
Gly	Arg	Asp	Gly	Arg	Asp	Gly	Arg	Asp	Gly	Leu	Asp	Gly	Lys	Asp	Gly			
				325					330					335				
Lys	Asn	Gly	Lys	Asp	Gly	Glu	Ser	Pro	Ile	Ile	Asn	Val	Lys	Asp	Asn			
				340					345					350				
Gly	Asn	Gly	Ser	His	Thr	Ile	Thr	Phe	Leu	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Arg			
				355					360					365				
Lys	Glu	Val	Thr	Ile	Ser	Asn	Gly	Lys	Asp	Gly	Gln	Pro	Gly	Arg	Asp			
				370					375					380				
Gly	Lys	Asp	Gly	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Gly	Met	Pro	Gly	Arg	Asp	Gly			
385					390					395					400			
Met	Asn	Gly	Lys	Asp	Gly	Gln	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Thr	Ala	Gly	Lys			
				405					410					415				
Gly	Asn	Ala	Ser	Asp	Met	Lys	Pro	Lys	Ala	Met	Ala	Ala	Pro	Ala	Ala			
				420					425					430				
Met	Thr	Asn	Gln	Asn	Ala	His	Ala	Asn	Asn	Asn	Gly	Pro	Ala	Lys	Ala			
				435					440					445				
Gln	Leu	Pro	Ser	Thr	Gly	Asp	Lys	Ala	Asn	Pro	Phe	Phe	Thr	Ala	Ala			
				450					455					460				
Ala	Leu	Ala	Val	Met	Ala	Ser	Ala	Gly	Met	Val	Ala	Val	Ser	Arg	Lys			
				465					470					475				
Arg	Lys	Glu	Asp															

<210> 9
<211> 1482
<212> PRT
<213> Streptococcus uberis

<400> 9

Leu Arg Tyr Lys Lys Met Thr Arg Ser Ser Asn Ser Arg Ile Val Leu
1 5 10 15

Gln Ser Thr Leu Ile Met Ile Phe Ala Ser Ser Cys Val Asn His Phe
20 25 30

ES 2 716 831 T3

Lys Gly Thr Ile His Ala Asp Glu Lys Val Ile Asn Gly Ser Glu Ala
 35 40 45
 Ser Ile Gln Val Asp Tyr Thr Leu Asn Thr Ala Ser Glu Asn Arg Gln
 50 55 60
 Ile Pro Glu Glu Lys Val Thr Glu Glu Ala Thr Asn Asp Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Leu Leu Glu Lys Gln Ala Ala Phe Leu His Glu Gly Arg Glu Lys Asn
 85 90 95
 Thr Glu Asn Leu Pro Leu Asp Gly Arg Gly Ser Leu Ile Ala Ser Ile
 100 105 110
 Asp Ser Gly Val Asp Ile Lys His Glu Ala Phe Ala Asn Asn Asp Asp
 115 120 125
 Asn His Asp Phe His Lys Glu Thr Glu Val Ser Glu Gly Ser Thr Ser
 130 135 140
 Lys Ile Pro Phe Val Tyr Asp Phe Leu Ser Gly Asp Thr Ser Val Arg
 145 150 155 160
 Asp Asp Glu Glu Glu His Gly Met His Ile Ala Gly Ile Leu Val Gly
 165 170 175
 Asp Ser Lys Lys Gly Phe Lys Gly Met Ala Pro Lys Ala Gln Leu Ile
 180 185 190
 Ala Tyr Arg Thr Trp Ser Lys Asn Asn Ser Glu Gly Tyr Gln Glu Ala
 195 200 205
 Asn Gln Phe Phe Ala Met Lys Asp Ala Ile Lys Arg Gly Ala Asp Val
 210 215 220
 Ile Ser Leu Ser Ile Gly Glu Ile Gly Ser Gly Gln Asn Asp Asp Ile
 225 230 235 240
 Trp Ala Lys Val Leu Glu Glu Ala Lys Lys Lys Asn Val Val Val Val
 245 250 255
 Ala Ala Met Gly Asn Tyr Gly Thr Ser Ala Thr Ser Asn Thr Phe Asp
 260 265 270

ES 2 716 831 T3

Gln	Val	Val	Asp	Glu	Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Asp	Ser	Ser	Thr	Leu	Leu	275	280	285	
Ser	Val	Ser	Ala	Asn	Pro	Glu	Val	Ile	Gly	Val	Gly	Ser	Ile	Phe	Glu	290	295	300	
Lys	Glu	Met	Tyr	Leu	Pro	Thr	Leu	Lys	Ile	Asp	Thr	Leu	Glu	Val	Pro	305	310	315	320
Tyr	Glu	Asn	Ile	Asn	Trp	Gln	Asn	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Lys	Gln	Glu	Lys	325	330	335	
Gln	Glu	Arg	Ile	Ser	Phe	Asn	Glu	Met	Leu	Ile	Thr	Leu	Asn	Gln	Ser	340	345	350	
Lys	Glu	Glu	Gly	Ser	Leu	Lys	Asp	Lys	Val	Val	Ile	Ile	Glu	Arg	Gln	355	360	365	
Ala	Glu	Asn	Ile	Phe	Pro	Gln	Leu	Lys	Glu	Val	Met	Lys	Lys	Gly	Ala	370	375	380	
Lys	Gly	Val	Ile	Leu	Ile	Asn	Gln	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Tyr	Gly	Asn	385	390	395	400
Tyr	Glu	Thr	Val	Pro	Glu	Leu	Arg	Asn	Thr	Leu	Leu	Asp	Asp	Glu	Asp	405	410	415	
Gly	Asp	Phe	Lys	Lys	Thr	Trp	Ala	Val	Ser	Ile	Ser	Ala	Asn	Asp	Gly	420	425	430	
Lys	Ala	Leu	Lys	Asp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Gln	Asp	Lys	Lys	Lys	Ser	Tyr	435	440	445	
Ser	Leu	Val	Phe	Asn	Thr	Lys	Pro	Gln	Leu	Lys	His	Val	Phe	Lys	Tyr	450	455	460	
Pro	Gly	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Thr	Trp	Gly	Pro	Gly	Leu	Asp	Leu	Thr	465	470	475	480
Leu	Lys	Pro	Asp	Ile	Val	Ala	Pro	Gly	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Thr	Gly	485	490	495	
Asn	Asp	Asn	Ser	Tyr	Phe	Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Ser	Met	Ser	Ala	Pro	500	505	510	
Lys	Val	Ala	Gly	Ala	Ser	Ala	Met	Phe	Leu	Pro	Val	Thr	Lys	Lys	Trp				

ES 2 716 831 T3

515		520		525
Gln Lys Lys Trp Glu Lys Gln Asn Val Ser Met Ser Ile Pro Gln Leu	530	535	540	
Thr Lys Leu Leu Phe Gln Asn Thr Ala Asp Ile Leu Tyr Asp His Ser	545	550	555	560
Val Pro Asn Gly Lys Pro Ile Leu Pro Tyr Ser Pro Arg Arg Gln Gly	565	570	575	
Ala Gly Ala Leu Asn Val Lys Lys Ala Ala Gln Thr Asn Val Phe Val	580	585	590	
Thr Ser Ala Asp Asn Lys Gly Ala Ile Leu Leu Lys Asp Phe Lys Glu	595	600	605	
Ser Arg Lys Glu Phe Asp Ile Val Ile Arg Asn Phe Ser Asp Gln Val	610	615	620	
Arg Arg Phe Lys Ile Glu Pro Gly Ser Val Leu Gly Lys Ile Leu Tyr	625	630	635	640
Ser Lys Asp Arg Lys Asn Tyr Asp Lys Asn Glu Thr Ile Gln Thr Val	645	650	655	
His Ser Arg Val Ile Lys Asp Ser Ala Ile Glu Ser Pro Leu Tyr Val	660	665	670	
Gln Ile Ala Pro Asn Ser Ser Met Ile Leu Pro Leu Lys Leu Asn Val	675	680	685	
Gly Lys Ala Val Glu Asn Glu Phe Val Glu Gly Phe Ile Lys Leu Arg	690	695	700	
Ser Leu Glu Lys Asp Gln Pro Asp Leu Asn Ile Pro Met Gly Phe Tyr	705	710	715	720
Gly Asp Trp Asn Ser Glu Asn Ile Leu Asp Pro Val Ala Trp Gln Glu	725	730	735	
Gly Ser Lys Thr Arg Leu Thr Gly Ile Val His Pro Tyr Gly Leu Gly	740	745	750	
Glu Asp Lys Phe Asp Ile Val Pro Trp Gly Val Asp Tyr Glu Lys Trp	755	760	765	

ES 2 716 831 T3

Lys Gln Asp Pro Lys Ala Leu Asp Ala Asp Gln Arg Phe Tyr Val Met
 770 775 780
 Gln Ser Gln Ala Gly Ile Ala Asn His Ala Lys Met Arg Leu Arg Leu
 785 790 795 800
 Ile Phe Met Arg His Ala Lys Asp Tyr Arg Val Asp Ile Leu Asn Ser
 805 810 815
 Gln Lys Asp Lys Val Leu Lys Thr Leu Lys Thr Gly His Gln Ala Pro
 820 825 830
 Lys Tyr Met Glu Ser Ala Leu Leu Glu His Gly Asp Gln Tyr Gln Met
 835 840 845
 Gln Phe Ala Asp Phe Asp Pro Asp Leu Glu Trp Asp Gly Ser Val Tyr
 850 855 860
 Asn Pro Lys Thr Asn Thr Glu Asp Pro Leu Pro Asp Gly Asn Tyr Phe
 865 870 875 880
 Ile Arg Val Ser Ser Arg Ile Ser Lys Asn Arg Pro Tyr Gln Glu His
 885 890 895
 Ile Ile Pro Phe Ala Ile Asp Asn Gln Lys Pro Lys Val Lys Ile Glu
 900 905 910
 Glu Lys Thr Ala Leu Gln Val Val Phe His Val Asp Asp Ala His Leu
 915 920 925
 Gln Gly Ile Arg Leu Val Lys Asp Asn Lys Ile Ile Gln Thr Leu Glu
 930 935 940
 Thr Asp Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Asn Leu Ala Asp Phe Gln Gly
 945 950 955 960
 Lys Gly Phe Glu Leu Glu Ala Ile Asp Phe Ala Glu Asn Lys Thr Ile
 965 970 975
 Ile Asp Leu Asp Ser Leu Lys Glu Lys Glu Val Gly Tyr Leu Phe Gly
 980 985 990
 Ala Ser Ser Ser Tyr Asn Lys Ser Arg Tyr Arg Ser Pro Arg Ser Val
 995 1000 1005

ES 2 716 831 T3

Ala	His	Lys	Asn	Ala	Glu	Asp	Ile	Leu	His	Glu	Asn	Ser	Glu	Glu
1010						1015					1020			
Ser	Glu	Glu	Ile	Ala	Ser	Ala	Leu	Thr	Phe	Glu	Asp	Gly	Ser	Asp
1025						1030					1035			
Phe	His	Asp	Gly	Lys	Lys	Thr	Asn	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Asn	Lys
1040						1045					1050			
Ser	Asn	Asp	Asn	Ser	Val	His	Leu	Lys	Asp	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Arg
1055						1060					1065			
Asp	Tyr	Tyr	Ile	His	Leu	Lys	Glu	Gly	Gln	Arg	Leu	Leu	Val	Thr
1070						1075					1080			
Thr	Thr	Asn	Ala	Phe	His	Asn	Ser	Lys	Gln	Gly	Asn	Asp	Ile	Thr
1085						1090					1095			
Ala	Pro	Thr	Trp	Gln	Ala	Asn	Tyr	Thr	Tyr	Asp	Pro	Ser	Thr	Asn
1100						1105					1110			
Gln	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Arg	Lys	Ile	Ala	Ile	Pro	Ile	Tyr	Gln	Gly
1115						1120					1125			
Ser	Asn	Thr	Ile	Asn	Val	Lys	Ala	Phe	Tyr	Lys	Asp	Lys	Leu	Ile
1130						1135					1140			
Phe	Asn	Lys	Gly	Tyr	Ala	Val	Lys	Leu	Asp	Thr	Glu	Val	Pro	Gln
1145						1150					1155			
Leu	Thr	Phe	Asp	Asn	Pro	Asn	Ile	Ser	Phe	Thr	Ser	Asp	Lys	Trp
1160						1165					1170			
Gln	Asn	Leu	Ser	Asp	Asp	Glu	Tyr	Asp	Asp	Asp	Asn	Ile	Val	Gly
1175						1180					1185			
Thr	Ile	Thr	Ile	Pro	Asn	Asn	Thr	Leu	Arg	Leu	Ser	Gly	Lys	Ile
1190						1195					1200			
Arg	Asp	Gly	Leu	Asp	Gly	Trp	Arg	Met	Phe	Ile	Asn	Gly	Asp	Met
1205						1210					1215			
Val	Asp	Ser	Asp	Ile	Lys	Leu	Gly	Glu	Tyr	Asp	Asp	Ile	Phe	Gln
1220						1225					1230			

ES 2 716 831 T3

Gln	Asn	Arg	Arg	Gln	Trp	Lys	Tyr	Glu	Lys	Gln	Val	Glu	Asn	Asp
1235						1240					1245			
Asp	Tyr	Val	Leu	Ile	Lys	Leu	Ser	Asp	His	Val	Lys	Asn	Ser	Arg
1250						1255					1260			
Ser	Tyr	Leu	Phe	Lys	Val	Lys	Ile	Asp	Pro	Thr	Val	Ser	Glu	Tyr
1265						1270					1275			
His	Phe	Thr	Asn	Lys	Asn	Asp	Ile	Ile	Asp	Asp	Asp	Lys	Thr	Leu
1280						1285					1290			
Leu	Thr	Leu	Asn	Thr	Leu	Thr	Asp	Ser	Ser	Leu	Gly	Tyr	Ala	Asn
1295						1300					1305			
Lys	Leu	Leu	Asn	Met	Pro	Lys	Asp	Leu	Val	Lys	Ser	Thr	Asp	Asp
1310						1315					1320			
Leu	Phe	Lys	Ala	Met	Thr	Met	Leu	Phe	Lys	Lys	Glu	Ser	Phe	Phe
1325						1330					1335			
Leu	Tyr	Pro	Leu	Lys	Asn	Asp	Leu	Asn	Thr	Asn	Gly	Ile	Ser	Met
1340						1345					1350			
Met	Thr	Ser	Leu	Val	Gln	Phe	Gln	Ala	Lys	Asp	Val	Lys	Glu	Asn
1355						1360					1365			
Ile	Pro	Leu	Glu	Trp	Glu	Ile	Lys	Thr	Lys	Ala	Ser	Asp	Ser	Arg
1370						1375					1380			
Gln	Leu	Leu	Tyr	Gln	Asn	Leu	Lys	Asn	Glu	Lys	Glu	Arg	Leu	Asp
1385						1390					1395			
Gln	Val	Ser	Thr	Asn	Pro	Leu	Ala	His	Gln	Leu	Pro	Leu	Glu	Asn
1400						1405					1410			
Ser	Asn	Gln	Glu	Asn	Gly	Gln	Asp	Ala	Ile	Leu	Thr	Ser	Thr	Lys
1415						1420					1425			
Val	Leu	Pro	Met	Ser	Lys	Ser	Ser	Ile	Phe	Arg	Asp	Ser	Leu	Arg
1430						1435					1440			
Glu	Thr	Ser	Leu	Pro	Glu	Thr	Arg	Asp	Ser	Ser	Ser	Met	Ala	Asn
1445						1450					1455			
Trp	Ser	Leu	Ala	Phe	Phe	Leu	Ser	Ala	Val	Ile	Cys	Phe	Phe	Lys

ES 2 716 831 T3

1460

1465

1470

Gly Arg Arg Lys Arg Leu Asn Lys Leu
1475 1480

5

<210> 10
<211> 550
<212> PRT
<213> Streptococcus uberis

<400> 10

Met Glu Asn Gln Asn Gln Leu Thr Leu Gln Gly Ile Leu Gly Lys Cys
1 5 10 15

Leu Lys Trp Phe Leu Leu Leu Ser Ile Ser Leu Phe Thr Ala Phe Pro
20 25 30

Phe Ile Trp Met Leu Ile Ser Ser Leu Lys Thr Lys Ala Glu Val Met
35 40 45

Asn Thr Glu Val Ile Trp Pro His Ile Pro Gln Trp Gly Asn Tyr Leu
50 55 60

Glu Ile Phe Thr Gln Ser Pro Ile Pro Lys Tyr Ile Trp Asn Ser Leu
65 70 75 80

Trp Thr Ser Val Val Ile Val Leu Ile Gln Ile Val Thr Gly Ala Met
85 90 95

Leu Ala Tyr Ala Leu Val Phe Leu Arg Phe Lys Gly Arg Gln Leu Ile
100 105 110

Phe Ala Ile Val Met Gly Thr Tyr Met Leu Pro Ala Ala Ala Thr Tyr
115 120 125

Ile Pro Ser Tyr Ile Ile Leu Ser Lys Gly Gly Met Leu Asn Thr Leu
130 135 140

Thr Gly Leu Ile Val Ser Ser Thr Ile Ser Ile Phe Gly Ile Phe Leu
145 150 155 160

Leu Arg Gln Ala Phe Met Gln Val Pro Arg Ser Leu Ile Glu Ala Ser
165 170 175

Arg Met Asp Gly Ala Ser His Phe Arg Val Leu Trp Glu Ile Val Cys
180 185 190

10

ES 2 716 831 T3

Pro Met Thr Lys Ser Ser Phe Ile Thr Phe Gly Leu Met Ser Phe Ile
 195 200 205
 Ala Ala Tyr Asn Ser Gly Lys Glu Thr Ser Ile Gly Asp Val Thr Leu
 210 215 220
 Thr Phe Ser Lys Glu Leu Val Pro Val Pro Asn Ile Asp Glu Glu Ile
 225 230 235 240
 Val Ile Pro Ser Ile Pro Glu Lys Pro Leu Val Glu Pro Glu Val Asp
 245 250 255
 Ser Ile Leu Pro Leu Ile Pro Leu Gln Pro Ser Leu Pro Ile Tyr Pro
 260 265 270
 Ser Pro Asp Leu Pro Glu Met Glu Gln Pro Asp Gln Asp Ser Pro Glu
 275 280 285
 Ile Ser Gly Gln Ser Gln Ile Val Asp Ile Val Glu Asp Thr Leu Pro
 290 295 300
 Gly Val Ser Gly Gln Gln Ser Ser Ser Glu Glu Thr Glu Ile Thr Glu
 305 310 315 320
 Asp Thr Arg Pro Glu Ser Asp Asn Glu Ile Ile Ile Gly Gly Gln Ser
 325 330 335
 Glu Leu Val Asp Ile Val Glu Asp Thr Gln Ser Gly Met Ser Gly Gln
 340 345 350
 His Ser Ser Ser Glu Glu Thr Glu Ile Ser Glu Asp Thr Arg Pro Glu
 355 360 365
 Ser Asp Asn Glu Ile Ile Val Gly Gly Gln Asn Glu Leu Val Asp Ile
 370 375 380
 Val Glu Asp Thr Gln Pro Ser Leu Ser Gly His Gln Ser Glu Ser Gln
 385 390 395 400
 Glu Thr Val Thr Val Glu Asp Thr Gln Pro Asn Gln Thr Asn Ile Leu
 405 410 415
 Ile Gly Gly Gln Ser Glu Ile Val Asp Ile Ile Glu Asp Thr Gln Ala
 420 425 430

ES 2 716 831 T3

Gly Met Thr Gly Gln Tyr Ser Ser Thr Asp Gln Leu Thr Ile Val Glu
435 440 445

Asp Thr Leu Pro Glu Gln Met Glu Glu Thr Asp Glu Ile Lys Ser Asp
450 455 460

Ser Gln Val Met Asp Ile Pro Lys Val Asn Asp Thr Asn Asn Asp Lys
465 470 475 480

Gly Ala Lys Ala Ser Val Ala Phe Asp Val Glu Glu Ser Lys Val Val
485 490 495

Thr Thr Gln Asp Ile Lys Pro Ser Thr Tyr Val Lys Gly Asp Asn Gln
500 505 510

Leu Pro Gln Thr Gly Asp Asp Asp Asn Val Asn Ala Phe Phe Thr Leu
515 520 525

Ala Ala Leu Ser Val Ile Gly Ala Thr Gly Leu Arg Gln Asn Lys Arg
530 535 540

Arg Glu Lys Glu Arg Asn
545 550

<210> 11
<211> 93
<212> PRT
<213> Streptococcus uberis

<400> 11

Val Val Lys Val Thr Val Asp Gly Ser Asp Asn Ser Thr Ile Asp Ser
1 5 10 15

Gly Phe Val Lys Val Glu Gln Pro Thr Pro Gly Ser Asn Ser Ser Ser
20 25 30

Glu Ser Leu Ser Gln Ser Thr Thr Gln Ser Ser Ser Gln Ser Ser Ser
35 40 45

Ala Lys Pro Val Ala Ser Gln Thr Ala Ala Glu Leu Pro His Thr Gly
50 55 60

Gln Ala Glu Asn Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Ala Ala Leu Ala Ile Leu
65 70 75 80

Ala Ala Leu Gly Leu Ala Gly Lys Lys Arg Asp Glu Lys
85 90

5

10

ES 2 716 831 T3

<210> 12
 <211> 1116
 <212> PRT
 <213> Streptococcus uberis

5

<400> 12

Met	Phe	Lys	Thr	Lys	Lys	Glu	Ile	Phe	Ser	Ile	Arg	Lys	Thr	Ala	Leu
1				5					10					15	
Gly	Val	Gly	Ser	Val	Leu	Leu	Gly	Val	Ile	Leu	Thr	Thr	Gln	Val	Ala
			20					25					30		
Ser	Ala	Asn	Glu	Val	Ser	Leu	Met	Thr	Pro	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Leu
		35					40					45			
Thr	Thr	Thr	Ser	Pro	Val	Leu	Glu	Ser	Thr	Ser	Ser	Gln	Leu	Ala	Ala
	50					55					60				
Thr	Thr	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Asp	Thr	Thr	Ser	Asn	Val	Thr	Ala	Thr
65					70					75					80
Ser	Pro	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Thr	Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Thr	Ser
				85					90					95	
Pro	Ile	Ala	Ser	Pro	Ile	Arg	Tyr	Val	Ser	Asp	Pro	Asn	Gln	Pro	Val
			100					105					110		
Gly	Tyr	Arg	Ala	Thr	Gln	Val	Gln	Gly	Thr	Asp	Gly	Ser	Ile	Ile	Thr
		115					120					125			
Thr	Gln	Thr	Gly	Ala	Leu	Asp	Ala	Asn	Gly	Asn	Pro	Ile	Val	Thr	Val
	130					135					140				
Glu	Arg	Ile	Glu	Pro	Thr	Lys	Thr	Val	Ile	Val	Leu	Gly	Thr	Lys	Ser
145					150					155					160
Thr	Ser	Gln	Val	Thr	Ser	Thr	Gln	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Tyr	Ser	Ile
				165					170					175	
Asp	Val	Thr	Lys	Pro	Val	Gly	Thr	Asp	Val	Val	Ile	Pro	Ala	Val	Asp
			180					185					190		
Gly	Gln	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ile	Glu	Thr	Ala	Thr	Thr
		195					200					205			

ES 2 716 831 T3

Ala	Pro	Val	Ser	Pro	Ser	Val	Leu	Ser	Glu	Gly	Tyr	Lys	Trp	Ile	Asp	210	215	220
Gln	Pro	Phe	Tyr	His	Val	Asp	Thr	Thr	Gln	Thr	Leu	Pro	Ser	Asp	Arg	225	230	235
Ile	Ser	Ile	Asp	Gln	Leu	Phe	Val	Pro	Met	Pro	Val	Leu	Thr	Pro	Asp	245	250	255
Tyr	Asn	Thr	Thr	Glu	Ser	Thr	Val	Arg	Glu	Tyr	Ala	Gln	Tyr	Ala	Glu	260	265	270
Asn	Tyr	Met	Tyr	Asp	Tyr	Ile	Thr	Val	Thr	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Thr	275	280	285
Thr	Arg	Gln	Gln	Val	Ile	Arg	Pro	Val	Thr	Ser	Glu	Met	Leu	Asp	Pro	290	295	300
Thr	Asn	Thr	Arg	Leu	Arg	Thr	Leu	Thr	Gly	Leu	Thr	Asp	Asp	Asn	Ala	305	310	315
Phe	Tyr	Ser	Arg	Leu	Phe	Asp	Ala	Ser	Gln	Gln	Asp	Leu	Trp	Asn	Thr	325	330	335
Ser	Ala	Gln	Asp	Tyr	Gly	Leu	Glu	Ile	Val	Pro	Glu	Asp	Leu	Ser	Thr	340	345	350
Ser	Thr	Asp	Asp	Phe	Leu	Arg	Tyr	His	Ser	Ser	Asn	Ile	Ile	Asn	Asp	355	360	365
Ala	Leu	Tyr	Val	Asp	Ile	Lys	Ala	Asp	Tyr	Leu	Arg	Ala	Gln	Leu	Ala	370	375	380
Tyr	Asp	Leu	Val	Ser	Leu	Gly	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Gln	Gln	Ser	Ala	385	390	395
Met	Asp	Met	Met	Thr	Ser	Gln	Phe	Glu	Ser	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr	Asn	405	410	415
Asn	Tyr	Lys	Asp	Ser	Val	Ala	Ile	Val	Val	Asp	Tyr	Ser	Asn	Thr	Thr	420	425	430
Met	Ser	Ala	Thr	Gln	Ala	Asp	Phe	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro	435	440	445
Val	Glu	Val	Gln	Arg	Ala	Ile	Ser	Glu	Leu	Thr	Ile	Tyr	Asp	Gly	Gln			

ES 2 716 831 T3

450		455		460
Ile Pro Gly Met Gly Glu Thr Thr Leu Gly Leu Ala Asn Ser Ala Asp				
465		470		475
Gln Thr Ile Ala Leu Lys Tyr Glu Ala Asn Asn Leu Asn Leu Val Ser				
		485		490
Thr Val Leu His Glu Met Thr His Ile Ile Asp Phe Lys Ser Gly Leu				
		500		505
Tyr Ser Glu Thr Thr Asp Arg Asn Thr Asp Gly Ser Leu Ser Thr Val				
		515		520
Met Ala Phe Ser Asp Thr Gln Glu Phe Leu Asp Val Tyr His Thr Tyr				
		530		535
Phe Asp Arg Pro Asp Val Trp Ser Tyr Tyr Arg Asp Asn Ser Glu Glu				
		545		550
Ala Phe Ala Glu Gly Leu Ser Gln Tyr Ile Met His Arg Leu Phe Gly				
		565		570
Thr Pro Tyr Ser Thr Tyr Ile Ala Asn Pro Tyr Thr Gly Asp Ala Tyr				
		580		585
Asn Pro Gly Asp Gly Ser Gly Tyr Ser Pro Phe Ala Glu Thr Glu Phe				
		595		600
Tyr Phe Ala Ser Leu Tyr Asn Arg Leu Phe Glu Tyr Pro Arg Thr Ala				
		610		615
Gln Val Val Pro Tyr Leu Val Thr Thr Thr Thr Ala Pro Val Asn				
		625		630
Gly Gln Val Ile Tyr Gly Ala Met Pro Glu Glu Thr Thr Thr Thr Thr				
		645		650
Pro Tyr Thr Thr Val Tyr Val Gly Asp Thr Ser Phe Ala Tyr Asp Pro				
		660		665
Thr Gly Gln Thr Asp Arg Val Gln Ala Gly Val Asp Gly Thr Glu Thr				
		675		680
Ile Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Asp Ser Asn Asn Gln Leu Val Ala Thr				
		690		700

ES 2 716 831 T3

Gln	Thr	Val	Ile	Ser	Ser	Thr	Pro	Val	Gln	Asn	Gln	Ile	Ile	Thr	Lys	705	710	715	720
Gly	Thr	Gln	Pro	Thr	Val	Val	Asp	Thr	Ser	Val	Pro	Met	Thr	Ile	Val	725	730	735	
Tyr	Gln	Glu	Val	Thr	Asp	Gly	Ser	Leu	Gly	Asp	Trp	Gln	Val	Asn	Val	740	745	750	
Leu	Asp	Ala	Gly	Gln	Asp	Gly	Leu	Ile	Arg	Ser	Thr	Thr	Thr	Tyr	Ser	755	760	765	
Val	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Thr	Pro	Ser	Thr	Thr	Glu	Ala	Thr	770	775	780	
Ile	Thr	Ala	Met	Arg	Pro	Met	Ile	Val	Gln	Tyr	Gln	Val	Gly	Ser	Glu	785	790	795	800
Lys	Val	Thr	Ala	Ile	Pro	Tyr	Gln	Thr	Arg	Tyr	Val	Ile	Asp	Thr	Ser	805	810	815	
Leu	Ala	Thr	Gly	Thr	Gln	Val	Ile	Val	Gln	Glu	Gly	Val	Asn	Gly	Ser	820	825	830	
Ser	Thr	Glu	Ser	Val	Gln	Ser	Tyr	Asn	Phe	Ile	Gln	Asp	Gly	Ser	Asn	835	840	845	
Ser	Arg	Phe	Asp	Ala	Ile	Val	Tyr	Ala	Ser	Pro	Val	Val	Val	Ala	Ala	850	855	860	
Gln	Asp	Gln	Val	Ile	Ala	Val	Gly	Gly	Gln	Asp	Gln	Val	Thr	Asp	Gln	865	870	875	880
Ala	Val	Ala	Lys	Thr	Ile	Phe	Tyr	Gln	Glu	Val	Thr	Asp	Gly	Ser	Leu	885	890	895	
Gly	Asp	Trp	Gln	Val	Lys	Val	Leu	Asp	Ala	Gly	Gln	Asp	Gly	Leu	Val	900	905	910	
Arg	Thr	Thr	Thr	Ser	Tyr	Ser	Val	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Thr	915	920	925	
Pro	Ser	Thr	Thr	Glu	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Met	Lys	Pro	Met	Ile	Val	930	935	940	

ES 2 716 831 T3

Gln Tyr Gln Val Gly Lys Ser Lys Leu Ser Ala Ile Pro Phe Leu Thr
945 950 955 960

Glu Tyr Ile Thr Asp Asp Ser Leu Ala Val Gly Leu Glu Lys Val Ile
965 970 975

Gln Glu Gly Val Gly Gly Thr Gln Ile Glu Thr Val Gln Ser Phe Asn
980 985 990

Phe Ile Gln Asp Gly Ala Asn Ser His Phe Glu Asn Ile Val Tyr Ser
995 1000 1005

Ser Pro Thr Ile Val Val Ala Ala Val Asp Gln Val Ile Ala Arg
1010 1015 1020

Gly Thr Lys Val Val Glu Val Val Val Ala Val Pro Glu Val Val
1025 1030 1035

Thr Pro Lys Pro Glu Thr Ser Glu Val Ile Ser Pro Glu Lys Gly
1040 1045 1050

Gln Thr Ala Pro Thr Ile Thr Val Glu Ala Ile Lys Ala Pro Ala
1055 1060 1065

Gln Lys Lys Ala Lys Val Glu Val Val Thr Thr Pro Lys Glu Ser
1070 1075 1080

Leu Pro Thr Thr Gly Asp Asp Gln Asn Leu Leu Val Thr Leu Met
1085 1090 1095

Ser Ser Leu Leu Leu Met Ser Leu Gly Leu Gly Leu Lys Lys Lys
1100 1105 1110

Glu Asp Glu
1115

<210> 13
<211> 467
<212> PRT
<213> Streptococcus uberis

<400> 13

Leu Leu Ala Leu Ser Gln Leu Pro Asp Lys Leu Leu Glu Lys Ile Asp
1 5 10 15

Ile Thr Cys Phe Asp Asp Pro Lys His Phe Gly Arg Gly Ile Pro Phe

ES 2 716 831 T3

20							25						30					
Gln	Glu	Asp	Ser	Ser	Thr	Ala	Trp	Ile	Asn	Ser	Pro	Ile	Asp	Ala	Ile			
		35					40					45						
Ser	Tyr	Asp	Tyr	His	Asp	Met	Asn	Asp	Phe	Gln	Asn	Trp	Met	Glu	Gln			
	50					55					60							
Lys	Gly	Leu	Asp	Thr	Asp	Gln	Ser	Tyr	Val	Pro	Arg	Ser	Leu	Tyr	Gly			
65					70					75					80			
Arg	Tyr	Met	Thr	Glu	Arg	Ala	His	Asp	Leu	Leu	Gln	Lys	Leu	Lys	Ala			
				85					90					95				
Ser	Val	Ile	His	Glu	Lys	Val	Thr	Gln	Leu	Asn	Tyr	Glu	Pro	Asp	Ser			
			100					105					110					
Gln	Lys	Trp	Asn	Ile	Gly	Thr	Ser	Gln	Arg	Thr	Ile	Pro	Thr	Arg	Phe			
		115					120					125						
Asp	Glu	Val	His	Leu	Thr	Cys	Gly	Glu	Leu	Pro	Val	Leu	Asp	Pro	Tyr			
	130					135					140							
His	Leu	Gln	Gly	Asn	Pro	Asn	Tyr	Ile	Ala	Asp	Pro	Tyr	Pro	Leu	Lys			
145					150					155					160			
Asn	Leu	Pro	Lys	Gln	Pro	Gly	Lys	Lys	Asp	Arg	Ile	Ala	Ile	Ile	Gly			
				165					170					175				
Thr	Gly	Leu	Ala	Ser	Ile	Asp	Thr	Leu	Lys	Trp	Leu	Leu	Lys	Asn	Ser			
			180					185					190					
Gln	Ala	Asp	Leu	Leu	Ala	Phe	Ser	Pro	Ser	Met	Thr	Phe	Pro	Thr	Val			
		195					200					205						
Arg	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Thr	Ile	Asp	Trp	Gln	Phe	Leu	Thr	Asp	Thr			
	210					215					220							
Asn	Lys	Gln	Lys	Leu	Phe	Glu	Glu	Asn	Ser	Phe	Asn	Phe	Lys	Ser	Leu			
225					230					235					240			
Glu	Asn	Leu	Phe	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Ala	Leu	Gly	Phe	Gln	Asn	Trp			
				245					250					255				
Glu	Glu	Thr	Cys	Arg	Gln	Phe	Leu	Ala	Glu	Gly	Ile	Pro	Gly	Ile	Ser			
			260					265					270					

ES 2 716 831 T3

Leu Ser Leu Ala Phe Pro Ala Gln Leu Phe Leu Leu Gln Gln Leu Ala
275 280 285

Ser His Leu Val Asp Trp Leu Thr Asp Phe Trp Pro Gln Met Thr Leu
290 295 300

Ser Asp Arg Gln Tyr Tyr Lys Glu Asn Tyr Gly Lys Ala Ile Ile Asn
305 310 315 320

Leu Arg Asn Pro Met Pro Glu Glu Ala Gly Arg Leu Leu Ile Glu Ala
325 330 335

Thr Ala Gln Gly Arg Leu Gln Ile Ile Glu Ala Val Thr Asp Ile Glu
340 345 350

Ala Gly Asn Tyr Gly Phe Val Leu Lys Arg Glu Val Gly Lys Glu Leu
355 360 365

Ser Val Ala Thr Val Ile Asn Ala Thr Gly Tyr His Leu Lys Glu Ser
370 375 380

Asn Val His Gln Ala Arg Thr Leu Ile Gln Gln Val Ile Arg Asp Gly
385 390 395 400

Leu Val Gln Ile Asn Pro Glu Gly Gly Leu Ser Ile Leu Pro Gln Thr
405 410 415

Gly Gln Val Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Ile Leu Ala Thr Leu Tyr Ala
420 425 430

His Gly Ser Leu Val Asn Gly Val Ile Tyr Gln Asn Asn Ser Thr Ile
435 440 445

Lys Ile Gln Gln Met Ala Glu Arg Ala Ile Gly Asn Val Ile Lys Lys
450 455 460

Pro Thr Ile
465

<210> 14
<211> 818
<212> PRT
<213> Streptococcus uberis

<400> 14

ES 2 716 831 T3

Met 1	Arg	Lys	His	Tyr 5	Val	Ser	Lys	Ser	Ala 10	Ile	Phe	Leu	Ala	Met 15	Leu
Val	Ala	Thr	Gly 20	Ser	Ala	Gln	Phe	Val 25	Lys	Ala	Glu	Thr	Pro 30	Thr	Thr
Thr	Thr	Ser 35	Pro	Ala	Thr	Ser	Leu 40	Thr	Asp	Ala	Ser	Ala 45	Ser	Thr	Thr
Pro	Thr 50	Thr	Asn	Thr	Thr	Ser 55	Thr	Val	Thr	Pro	Ala 60	Leu	Asp	Pro	Asn
Thr 65	Asn	Phe	Thr	Val	Asp 70	Ser	Ser	Ala	Thr	Thr 75	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro 80
Ser	Pro	Val	Glu	Ala 85	Ala	Ala	Ile	Ser	Pro 90	Val	Ile	Ala	Thr	Ala 95	Gln
Pro	Thr	Thr	Asn 100	Val	Thr	Ser	Ala	Ser 105	Leu	Ala	Pro	Ala	Ala 110	Asn	Thr
Met	Ala 115	Thr	Thr	Pro	Val	Glu	Gly 120	Gln	Thr	Val	Asp	Val 125	Arg	Ile	Ile
Ser	Thr 130	Thr	Asp	Leu	His	Ser 135	Asn	Leu	Val	Asn	Tyr 140	Asp	Tyr	Tyr	Gln
Asp 145	Lys	Ala	Ser	Gln	Thr 150	Ile	Gly	Leu	Ala	Lys 155	Ala	Ala	Val	Leu	Ile 160
Asp	Gln	Ala	Lys	Ala 165	Glu	Asn	Pro	Asn	Ala 170	Val	Leu	Val	Asp	Asn 175	Gly
Asp	Ile	Leu	Gln 180	Gly	Thr	Pro	Leu	Gly 185	Thr	Tyr	Glu	Ala	Leu 190	Ile	Asp
Pro	Leu 195	Gln	Pro	Gly	Glu	Val	His 200	Pro	Met	Tyr	Ala	Ala 205	Leu	Asp	Lys
Leu	Gly 210	Phe	Asp	Ala	Ser	Thr 215	Leu	Gly	Asn	His	Glu 220	Phe	Asn	Tyr	Gly
Leu 225	Thr	Phe	Ile	Glu	Asn 230	Ala	Ile	Ala	Ser	Ala 235	Gly	Leu	Pro	Ile	Leu 240
Asn	Ala	Asn	Val	Phe	Asp	Ala	Ala	Thr	Gly	Glu	Tyr	Leu	Phe	Gln	Pro

ES 2 716 831 T3

245								250					255					
Tyr	Ala	Ile	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Thr	Asp	Ala	Asn	Gly	Gln	Ala	Val			
			260					265				270						
Asp	Leu	Lys	Ile	Gly	Ile	Thr	Gly	Ile	Val	Pro	Pro	Gln	Ile	Met	Leu			
		275						280										
Trp	Asp	Lys	Ala	Asn	Leu	Glu	Gly	Lys	Val	Thr	Val	Lys	Asp	Ala	Val			
		290					295									300		
Gln	Ala	Val	Thr	Glu	Ile	Ile	Pro	Thr	Ile	Lys	Asn	Ala	Gly	Ala	Asp			
305					310								315	320				
Ile	Val	Leu	Val	Leu	Ala	His	Thr	Gly	Ile	Gly	Asp	Asp	Val	Tyr	Glu			
			325									330	335					
Thr	Gly	Glu	Glu	Asn	Val	Gly	Tyr	Gln	Ile	Ala	Ser	Leu	Ala	Gly	Val			
		340										350						
Asp	Ala	Val	Val	Thr	Gly	His	Ser	His	Ala	Glu	Phe	Pro	Ser	Gly	Gln			
		355										360				365		
Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Glu	Ser	Tyr	Asn	Gly	Val	Asp	Gly	Val	Ser	Gly			
		370			375				380									
Leu	Ile	Asn	Gly	Thr	Pro	Val	Thr	Met	Ala	Gly	Lys	Tyr	Gly	Asp	His			
385					390								395	400				
Ile	Gly	Ile	Ile	Asp	Leu	Asn	Val	Ser	Tyr	Thr	Gly	Gly	Lys	Trp	Thr			
			405									410	415					
Val	Asn	Arg	Asp	Lys	Asn	His	Ala	Glu	Ile	Arg	Lys	Ile	Asp	Thr	Lys			
		420							425	430								
Ser	Thr	Ile	Ala	Asp	Ala	Asp	Ile	Leu	Ala	Leu	Ala	Gln	Ala	Ser	His			
		435			440				445									
Leu	Gly	Thr	Ile	Asp	Tyr	Val	Arg	Gln	Thr	Val	Gly	Glu	Thr	Thr	Ala			
		450			455				460									
Pro	Ile	Asn	Ser	Tyr	Phe	Ala	Leu	Val	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Val	Gln			
465					470			475								480		
Ile	Val	Asn	Asn	Ala	Gln	Leu	Trp	Tyr	Ala	Lys	Gln	Gln	Leu	Ala	Gly			
			485									490	495					

ES 2 716 831 T3

Thr	Pro	Glu	Ala	Asp	Leu	Pro	Leu	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Pro	Phe	Lys			
			500					505					510					
Ala	Gly	Thr	Arg	Asn	Asp	Pro	Thr	Ala	Tyr	Thr	Asp	Ile	Pro	Ala	Gly			
		515					520					525						
Pro	Ile	Ala	Ile	Lys	Asn	Val	Ala	Asp	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Asn	Val			
	530					535					540							
Thr	Ala	Ile	Leu	Lys	Leu	Thr	Gly	Ala	Asp	Ile	Lys	Glu	Trp	Leu	Glu			
545					550					555					560			
Met	Ser	Ala	Gly	Gln	Phe	Asn	Thr	Ile	Asp	Pro	Asn	Val	Ala	Gly	Pro			
				565					570					575				
Gln	Asn	Leu	Val	Asn	Thr	Asp	Tyr	Arg	Thr	Tyr	Asn	Phe	Asp	Val	Ile			
		580						585					590					
Asp	Gly	Val	Thr	Tyr	Glu	Phe	Asp	Val	Thr	Gln	Pro	Asn	Lys	Tyr	Asp			
		595					600					605						
Ala	Lys	Gly	Asn	Leu	Leu	Asn	Pro	Asn	Ala	Ser	Arg	Val	Arg	Asn	Leu			
	610					615					620							
Lys	Phe	Gln	Gly	Lys	Glu	Ile	Asp	Pro	Asn	Gln	Glu	Phe	Met	Val	Val			
625					630					635					640			
Thr	Asn	Asn	Tyr	Arg	Ala	Ser	Gly	Ser	Phe	Pro	Gly	Val	Lys	Asn	Ala			
				645					650					655				
Thr	Ile	Asn	Arg	Leu	Leu	Asn	Leu	Glu	Asn	Arg	Gln	Ala	Ile	Ile	Asn			
			660					665					670					
Tyr	Ile	Val	Ser	Glu	Lys	Thr	Ile	Asn	Pro	Ser	Ala	Asp	Asn	Asn	Trp			
		675					680					685						
Tyr	Phe	Ala	Asp	Thr	Ile	Gln	Gly	Leu	Asp	Leu	His	Phe	Leu	Ser	Ala			
	690					695					700							
Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Leu	Ile	Gly	Asp	Lys	Ala	Asp	Ile	Ser	Tyr	Thr			
705					710					715					720			
Gly	Pro	Ser	Thr	Ile	Glu	Gly	Phe	Gly	Asp	Phe	Val	Phe	Thr	Tyr	Val			
				725					730					735				

ES 2 716 831 T3

Lys Pro Glu Leu Pro Val Ala Thr Pro Glu Thr Pro Gln Glu Thr Gly
740 745 750

Ser Gln Leu Thr Glu Asn Arg Arg Gln Glu Ile His Gln Leu Ala Thr
755 760 765

Arg Val Tyr Asn Gln Thr Lys Ala Thr Ser Ser Ser Thr Thr Lys Ala
770 775 780

Glu Leu Pro Lys Ala Gly Ser Gln Glu Ser Lys Gly Leu Phe Phe Met
785 790 795 800

Gly Leu Ser Leu Leu Gly Leu Ala Gly Leu Ile Thr Lys Lys Glu Glu
805 810 815

Arg Gln

<210> 15

<211> 516

<212> PRT

<213> Streptococcus uberis

<400> 15

Met Arg Lys Phe Leu Met Ser Cys Phe Ala Ala Leu Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15

Ala Gly Val Ser Gln Ala Asp Ala Asp Gln Tyr Leu Arg Val Gly Met
20 25 30

Glu Ala Ala Tyr Ala Pro Phe Asn Trp Thr Gln Asp Asp Asn Ser Asn
35 40 45

Gly Ala Val Pro Ile Glu Gly Thr Asn Gln Tyr Ala Asn Gly Tyr Asp
50 55 60

Val Gln Val Ala Lys Lys Val Ala Lys Ser Leu Asn Lys Lys Leu Leu
65 70 75 80

Val Val Lys Thr Ser Trp Thr Gly Leu Ile Pro Ala Leu Thr Ser Gly
85 90 95

Lys Ile Asp Met Ile Ala Ala Gly Met Ser Pro Thr Glu Glu Arg Lys
100 105 110

Lys Glu Ile Ala Phe Ser Asp Ser Tyr Tyr Thr Ser Glu Pro Val Ile

5

10

ES 2 716 831 T3

	115					120					125				
Val	Val 130	Lys	Ala	Asp	Ser	Lys 135	Phe	Ala	Lys	Ala	Lys 140	Ser	Leu	Asp	Asp
Phe 145	Ala	Gly	Ala	Lys	Ile 150	Thr	Ala	Gln	Gln	Gly 155	Val	Trp	His	Val	Asn 160
Leu	Ile	Pro	Gln	Ile 165	Asn	Gly	Val	Lys	Ala 170	Gln	Thr	Pro	Met	Gly 175	Asp
Phe	Ser	Gln	Met 180	Arg	Gln	Ala	Leu	Ser 185	Ser	Gly	Val	Ile	Asp 190	Gly	Tyr
Ile	Ser	Glu 195	Arg	Pro	Glu	Ala	Met 200	Thr	Ala	Glu	Asn	Ala 205	Asn	Ser	Ala
Phe	Lys 210	Met	Val	Val	Leu	Lys 215	Lys	Ala	Phe	Thr	Val 220	Asn	Glu	Ser	Asp
Ala 225	Ala	Ile	Ala	Val	Gly 230	Met	Arg	Lys	Asp	Asp 235	Pro	Arg	Ile	Val	Gln 240
Val	Asn	Thr	Val	Leu 245	Ala	Asp	Leu	Ser	Ala 250	Asn	Asp	Arg	Leu	Asp 255	Leu
Met	Asp	Lys	Met 260	Val	Thr	Leu	Gln	Pro 265	Lys	Glu	Lys	Lys	Ala 270	Glu	Asn
Gly	Val	Gln	Pro	Ser	Phe	Leu	Asp 280	Gln	Met	Trp	Ser	Ile 285	Val	Thr	Lys
Asn 290	Trp	Lys	Gln	Phe	Leu	Arg 295	Gly	Thr	Gly	Leu	Thr 300	Leu	Leu	Ile	Ser
Thr 305	Ile	Gly	Thr	Ile 310	Val	Gly	Leu	Ile	Ile	Gly 315	Leu	Leu	Ile	Gly	Ile 320
Tyr	Arg	Thr	Ala	Pro 325	Lys	Ser	Lys	His	Lys 330	Val	Leu	Ala	Phe	Phe 335	Gln
Lys	Leu	Phe	Gly 340	Trp	Phe	Leu	Asn	Val 345	Tyr	Ile	Glu	Val	Phe 350	Arg	Gly
Thr	Pro	Met 355	Ile	Val	Gln	Ser	Met 360	Val	Ile	Tyr	Tyr	Gly 365	Thr	Ala	Gln

ES 2 716 831 T3

Ala Phe Gly Ile Ser Ile Asp Arg Thr Leu Ala Ala Ile Phe Ile Val
370 375 380

Ser Ile Asn Thr Gly Ala Tyr Met Thr Glu Ile Val Arg Gly Gly Ile
385 390 395 400

Phe Ala Val Asp Lys Gly Gln Phe Glu Ala Ala Thr Ala Leu Gly Phe
405 410 415

Thr His Gly Gln Thr Met Arg Lys Ile Val Leu Pro Gln Val Val Arg
420 425 430

Asn Ile Leu Pro Ala Thr Gly Asn Glu Phe Val Ile Asn Ile Lys Asp
435 440 445

Thr Ser Val Leu Asn Val Ile Ser Val Val Glu Leu Tyr Phe Ser Gly
450 455 460

Asn Thr Val Ala Thr Gln Asn Tyr Gln Tyr Phe Gln Thr Phe Ser Val
465 470 475 480

Ile Ala Val Ile Tyr Phe Ile Leu Thr Phe Thr Val Thr Arg Ile Leu
485 490 495

Arg Tyr Val Glu Arg Arg Ile Asp Asp Asp Asn Tyr Thr Thr Thr Val
500 505 510

Asn Glu Leu Pro
515

<210> 16
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 16
gctcttcgga ttttcggtat c

21

<210> 17
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 17
cattttccac gaatagaagg actgtc

26

<210> 18

	<211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Cebador	
	<400> 18 tgggtgaagc agaagctgaa	20
10	<210> 19 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador	
20	<400> 19 gagcaattgc aaaatgaaaa gc	22
25	<210> 20 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
30	<400> 20 atgtcaaaaag cccggtacct ttacag	26
35	<210> 21 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador	
	<400> 21 gaaatgatga tgagaaattg aga	23
45	<210> 22 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador	
	<400> 22 agccacaaac accattcaca	20
55	<210> 23 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador	
65	<400> 23 gaagaagtgg taactgctac aaac	24

ES 2 716 831 T3

5	<210> 24 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
10	<400> 24 tactaacttc ttgtcatcctt ggtacctttt	30
15	<210> 25 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
20	<400> 25 caacgaatca acaaactgaa agc	23

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende las proteínas ancladas por sortasa de *Streptococcus uberis* SUB1154 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO 7, SUB1095 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 y SUB0145 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO 2, o una proteína con un 95 % o más identidad de secuencia con la misma, en donde la composición es capaz de inducir una respuesta inmunitaria, cuando se administra a un sujeto y en donde la composición inmunogénica es capaz de inducir una respuesta inmunitaria dirigida a un antígeno presente en la composición y actúa previniendo o reduciendo la infección por *Streptococcus uberis* en un sujeto al que se ha administrado la composición inmunogénica.
2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 en donde el sujeto es un mamífero, opcionalmente un rumiante.
3. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación anterior, en donde la composición comprende uno o más antígenos adicionales, además de proteínas ancladas por sortasa de *S. uberis*.
4. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación anterior, en donde la composición es una vacuna profiláctica o terapéutica contra *S. uberis*.
5. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación anterior, en donde la composición comprende además un adyuvante.
6. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación anterior, en donde la composición comprende polímeros u otros agentes para controlar la consistencia de la composición y/o para controlar la liberación de las proteínas de la composición.
7. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación anterior, en donde los principios activos en la composición tienen una pureza mayor del 50 %.
8. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación anterior que es una composición farmacéutica que comprende tres proteínas ancladas por sortasa de *S. uberis*, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. Uso de proteínas ancladas por sortasa de *Streptococcus uberis* SUB1154 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO 7, SUB1095 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 y SUB0145 que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO 2, o una proteína con un 95 % o más de identidad de secuencia con la misma, en la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria y prevenir o reducir la infección por *Streptococcus uberis* en un sujeto al que se le ha administrado el medicamento, en donde el medicamento se usa para la vacunación profiláctica o terapéutica de sujetos contra *S. uberis*.
10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por *S. uberis*.

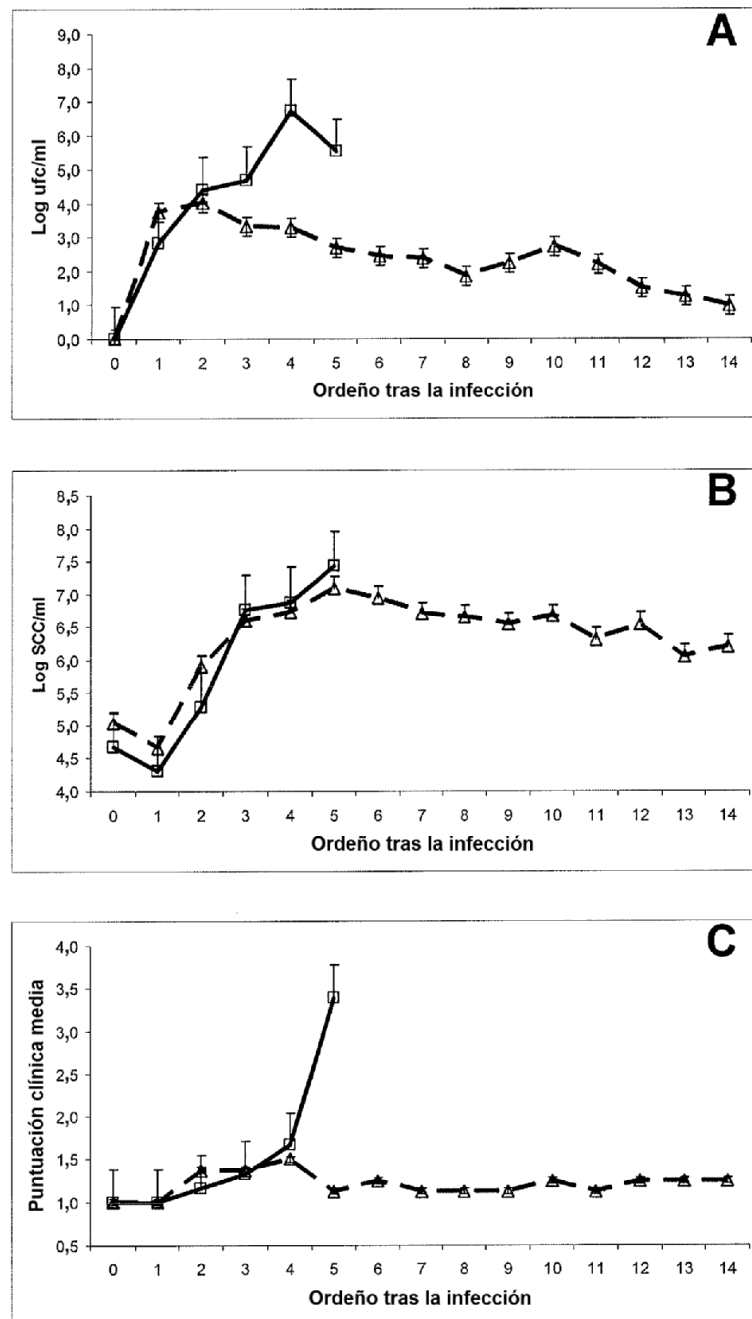


Figura 1

PUNTUACIÓN	ASPECTO DEL CUADRANTE	PUNTUACIÓN	ASPECTO DE LA LECHE
1	NORMAL	1	NORMAL
2	ANORMAL (p.ej. endurecimiento)	2	LIGERA ALTERACIÓN (p.ej. unas pocas escamas)
3	ANORMAL (p.ej. calor, sensibilidad)	3	ANORMAL (p.ej. coágulos y/o grumos)
4	INFLAMACIÓN (p.ej. distendido y con molestias durante la palpación)	4	ANORMAL (p.ej. cambios en el color y/o composición)

Figura 2

Gen	Supuesto motivo de anclaje	Comentarios adicionales
SUB0145	LPXTG	Proteína de unión a lactoferrina
SUB0164	LPXTG	Pseudogén
SUB0207	LPXAG	
SUB0241	LPKAG	2', 3' -nucleótido cíclico 2' -fosfodiesterasa
SUB0337	LPATG	Proteína de unión a aminoácidos de transportador ABC
SUB0348	LPHTG	Pseudogén
SUB0888	LPPTG	Proteína de tipo colágeno
SUB1095	LPSTG	
SUB1730	LSPTG	
SUB1739	LPTTG	Pseudogén

Figura 3

Gen ^a	Comentario de la proteína	Supuesto anclaje por sortasa	Masa molecular (Da) ^b	Fase de crecimiento exponencial			Fase de crecimiento estacionario		
				Puntuación MASCOT	N.º de péptidos emparejados ^c	Cobertura (%) ^d	Puntuación MASCOT	N.º de péptidos emparejados ^c	Cobertura (%) ^d
sub0135	Supuesto precursor de fructano beta-fructosidasa	LPMTSDS	142.956	41	(1)	1,4	541	10	11,3
sub0145	Supuesta proteína de unión a la lactoferrina	LPSTGDK	57.829	1138	15 ^e	29,2	695	18	31,8
sub0207	Supuesta proteína anclada a la superficie	LPMAGER	53.765	39	2	5,4	117	2	5,4
sub0826	Supuesta proteína de la familia subtilasa anclada a la superficie	LPETRDS	168.468	ND	ND	ND	50	2	1,2
sub0888	Supuesta proteína anclada a la superficie	LPPTGSQ	29.230	105	(1)	12,9	164	2	18,0
sub1095	Supuesta proteína anclada a la superficie de tipo colágeno	LPSTGDK	47.642	59	(1)	1,7	88	2	4,3
sub1154	Supuesto precursor de C5a peptidasa	LPKTVDS	127.957	68	(1)	1,7	111	6	4,8
sub1370	Supuesta cinc-carboxipeptidasa	LPALADG	116.563	507	7	10,6	2614	17	25,5
sub1730	Supuesta proteína anclada a la superficie	LPSTGED	40.439	165	2	6,8	238	4	13,6

Figura 4A

Gen ^a	Comentario de la proteína	Supuesto anclaje por sortasa	Masa molecular (Da) ^b	Fase de crecimiento exponencial			Fase de crecimiento estacionario		
				Puntuación MASCOT	N.º de péptidos emparejados ^c	Cobertura (%) ^d	Puntuación MASCOT	N.º de péptidos emparejados ^c	Cobertura (%) ^d
sub0135	Supuesto precursor de fructano beta-fructosidasa	LPMTSDS	142.956	286	5	5,8	1032	18	23,2
sub0145	Supuesta proteína de unión a la lactoferrina	LPSTGDK	57.829	3047	17 ^e	27,0	746	15	28,8
sub0207	Supuesta proteína anclada a la superficie	LPMAGER	53.765	50	(1)	2,4	163	4	11,2
sub0888	Supuesta proteína anclada a la superficie	LPPTGSQ	29.230	209	2	18,0	118	2	18,0
sub1154	Supuesto precursor de C5a peptidasa	LPKTVDS	127.957	153	3	3,4	237	10	14,4
sub1370	Supuesta cinc-carboxipeptidasa	LPALADG	116.563	146	3	4,0	1079	12	22,3
sub1730	Supuesta proteína anclada a la superficie	LPSTGED	40.439	81	(1)	4,1	167	4	13,8

Figura 4B

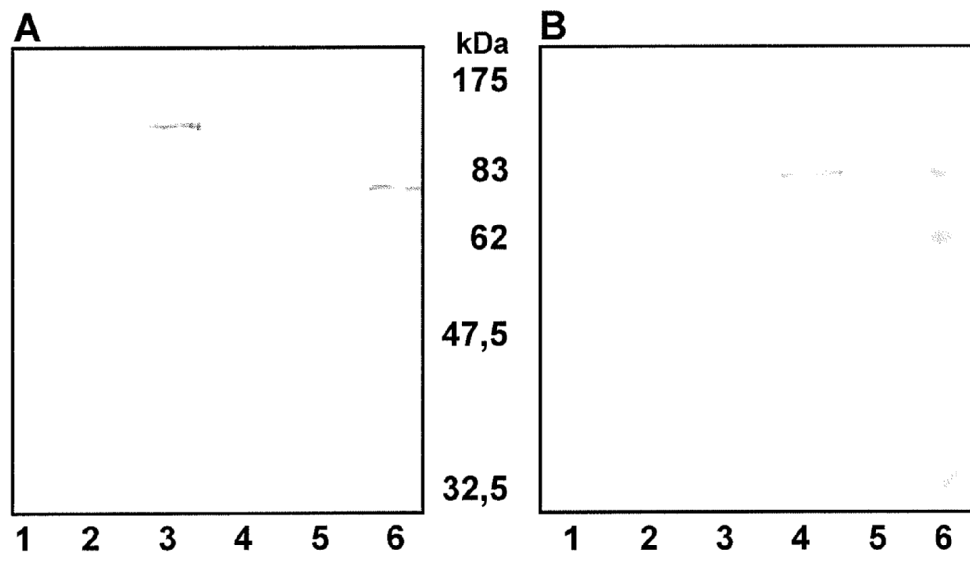


Figura 5

MTKNRSSHSTYADKVIKGLSASCFILGAFVFAQQVSAEEVVTATNTSLTA
 PTVTTVSPLTNTDVSATAVAADSIA SPVTTTDSNLNSAPIIDTSNPSNITSPTD
 TNTSTTSSDTTSSPIPVTLNKAASPTSTETLASQEIYMDKVNQVTINTTV
 NPATPMTWTIENYPNQTYNMQTDGFTGSPSYTVTSTSPNNSSVQIEIPPLFG
 TDLSLRWPNNIRRTYRDYMGSYTLKGISEDGLTIVTKELILRPYADYMTHEE
 LLNELNAIEANHATDRLVTIETIGQSALGNAIKMGIVAKDQASLDTYLNQTT
 PMMLMDPDQALNLLAQGKFDYKLPILINNTHADEQPGIDVVRGLFKTFATE
 SVINYQTVDAANNPTTVQIDIKALLDKVILLNFNFTENPDGDIANTRALNNG
 LDPNRDTGYQTNPETRAIVEQINKWNPISIFDVHGFVKEFLIEPCTPPHDPNFE
 YDLFDASLVEGAREMGNAGITNSVYDSYIIPKFDYGSGWDDSFSGYTAVYG
 LYQGILGHTIEIPETNQESYNAGYFAVLGINYDLANSQQLMKNKLTFFSRG
 IHKAEVAAAEEALLTVDGSVKGRIKDGHDTFDPDYMIPMTLSTESD TDQA
 FK MIDYFRRNGVILNELTADVAGYHKGDLVIDMAQAKRGFANHVLKYGAN
 ESEWPAMYAELVMNFPAMRGFKADAIYADSLFAGNLGAVTLTSAPRTAPS
 DKEYYIVSNNSLA AVQAVNAAIRAGKNVYLTNDGYVMDKATYESVIGTYP
 LFAQATCMKPVGDTLKAIKVYAPGNPNLYLGFNSPSEVSLALNQMGFDVV
 PSVDQADVIVLDNDQFDASILGKKPVILGGSAMAKLES LGILTGFDAAMTS
 ESDGSSYEGLMKISLDANSPYTSGYAANSLYSNSG SWIEGVPTGFMTLANI
 SASDFYVSGWWPNHEGLANKTV AISGLYQGQPMFIFAGNPVNKTH TINFYR
 WVSNAIFGTNLTSFIEGQCTIPTDSETQVVRVNHNGQTVAVYQQVANKEVN
 GTVSQNSL PALADGSHKDDSKLFWVTGLLVASGGLFAALKRRED

Figura 6A

MRKFYYKEKKMEIKQKHGKHALRKAVTAAVLAGTAFSSLGGFAGAVT
TVKAEDLFTINNSEVQDKLESKVQQLLEAQRKGEDISEKLRELLSELPTDILK
DIMLSNIEADYLLGFLKPAVEEMVRRSEQNDERWKDITEKTLALEALKDSE
REIRKEKEKLEDEVQLAKVKIETKESELNDLKKDYIDTREELADTIEELDEV
KNSIVEKEAKVKGLEEKLRDLEKELGDYDKKLSEAAKQNSDLSNENKELKE
NLDTAENITVELQKKSHELEKTKKEVELELKAEKEALEAEKVKLAEANAN
DKLSEERDAAKKEAEKVPELEGQVEKLVEEITAAKKEAEELQAKAEGLEKD
FEAVKAEKEALEAEIAKLKEDHQKEVDALNALLADKEKMLKSLQEQLDKA
KEEAMKNEQMSQEEKAKLQAELDKAKQELAEEKIKDMPNKVAPQAEGKAN
AGQAAPNQNNQAQANQAKNANNLPSTGDKPVNPLLVASGLSLMIGAG
AFVYAGKRKKG

Figura 6B

MKQEKKCVNWFMKRKGKQWIYGCILICGLVFGVEATSVAAETIPTTA
 TVETLNSDVTSKTSQETQKTTEIATPVSEIVMPSQQKVVEEVTQEVSQVQNE
 TVINMPVLTQGVNIAGPNETAILTDSIVQNNVQPIDRVEKMETSFSTELTKK
 AESSYNTNLQDLNYDPNVWEVREDGLYSNAVGKGDNFLFSASTGENFIFQT
 DVTFLQNTGAASLVFRSNNDPENLNGYVVNLDGNSHKARLWRWAEANLI
 NDKEILASPDNKYFLKV VATNGWISYYINGILIANLSDYTIQRDDLQTTIYK
 DGHFGLLNWNGEMVFQNTFYREL TNEELPLLNDVTVT SKNGPVEPKGQFF
 SESSVYIQYVSNDASTVDLSFDANNSDALITVTD AHGKVYSNPSAIPVTVGP
 NYLTVTSTYTTTDDGYVIPSTYRINVHRRQPQSVYYNENFRDQYHYSVKDGW
 ANDPGLVYYNGVYHMFYQFYDDTKWGP MHWAHATSTD LIHWEDQPIAF
 YPDYNGTMFSGCIVADVNNSSGLFDS ENGLVALITINGEGQRIKLAYSTDE
 GKTWQKVDEIVADWTTDPLQTRDFRDPKVFRWENK WFMVIAGGPLRLYSS
 DDLKNWTVESTYPDLHTECPDLYPVLAE DQTVKWVLSRGGRYKVGDLQ
 QADGNWKFIPDANYQETDSIMNFGKDSYAAMTY YVQDFGTKANPTIPKIE
 LNWMTWDNYCNLVADRLGQSFNGTFNLNLELGLVKEGDKYVLTQTPVE
 AYESLRDNDNKVEYKNVVVGKENDLFKDFSGD TYEIVAHFKPSDKTTKVG
 FNLRVGSGEMTKVYYDLIAGRIIHDRSQSGIIL TELFSNIDSQAVTPNIDGSIDL
 HIFVDRASVEVFSKNHTVAGANQIF TSAQSLGLEVLIDGEDAKADIVLYPLK
 SIWKNKIIDTTPQIVIPASEPKVRMNVGDSTTVKAYVSPVGASQDLIWNISNP
 SLVLDQISGNQVFLKAIKKGQVIVRAQSQSNPA VYQDFIIDLEDNFNTNVKD
 VNVFSGDWYVDGESLKV ANHNSNDIYMSADKIPYENYQMDLDIKYGRGIV
 NIFFASGNPDANNAYTIQFGSNNSVRLFRFYRDTIFEAPMIDVINDNQFHHV
 RLVKSANVIHVYVDNEMVMSYTFDQVEEFFN NPYLGLGLWDGELAVQNF
 YVIDLDAQKPVFVEEHEKEKLLSELKKS VVKTSYSTLKT IETSSKTNSENLE
 APTVSKKNLPMTSDSNNNLEELGILVILTTLGAFLGRVILKKEK

Figura 6C

MKKKQEMKYYLRKSAYGLAAVSVAVLAVGSPVSAQEKAASTEATPKVA
 PKVPEKPSKEVIKKALKKTDEETKEKEKEAKEKVENSEESTAMVSELSSTNE
 ETSSEENNTDEEETDGLESESESEETSEVKEESEEEKEDDPSESDEVENVE
 AINLSEAEGNDSSKPETSEEVTAEEDRQETDRLAEVKTEESAKEGDEDEDADK
 KDEAEKAKKGAELSRVKAELAKLEALNASRLMKKIVESGKTVEGILSFM
 KESLPQLEAARASEQAKAPEVTQSPDHLPESEKKAVHNPVQVAKRSESLEQK
 AENAKTSTNLQNTQIPVQEAKRTQAQLPSTGEDYQAYLVAAAMALIASSGM
 VAYGSYRKKKQK

Figura 6D

MSKPMTKKKKAISIQKSVKPILGFTFGALLSTVFTPSVFAEEVVSSLGHA
 TSGLLSVSVPKELTSLETTTYLMASESPSNTLTSDTISSDNGGTASNPNEIVTT
 ETTSEAIKPDTEVIQNPDLPIGEIKVVQEGVAGEVTVTKTTTTTITLNGVSQSTT
 TESRVPVKKPINKIIEVGTKEISTSPSSSDVITVSPSPSSTSESNNQGSSTPAPK
 SRQNSQEKKGSQTKKSKDDAKEKEGDKKELPPTGSQESGIFSLFSALISTALG
 LFLKSNKND

Figura 6E

MKSYLKRRYGLITTSVLAATVLATGWQSTSVLAENPTTSPTTTVTSTNGFN
 FNATLLDHNGKTVSGKTVSLYDITDGNRTLQSAVSDQNGIASFSQPLNR
 NLSVFVDNVAQGYTTRTSESGQVRSSAFYIDGQGTNTPKYSDKTITISVLNE
 EAEPLANQKVTLTNPLKEVVGEAMTDADGHVVFCDKLLEGVVFYNYAVNG
 KAIDSAQPDSKRSVFLESNQLAKEGFTFTATILGKNGKTVAGKTVSLYDITD
 GNRTLQSAVSDQNGIASFSQPLNRNLSVFIDDAQGYTTRTSENGQVRSS
 AFYVDGQGTNTPKYSDKTITISVLNEEGEPLANQKVTLINPLKEVIGEANTD
 ANGKVIFTDKLLDGVFYTYAVNDQTIDATQPDTSRNVFLRADQILKESPKN
 TASEAATNLEKTTESEKGNMPQQNQSEAKEKAPEKQVDANAANKKAPGHG
 EAKKGLPMAGERGSRLFTFIGLSLILGIAGYLLKHKKVKS

Figura 6F

MVKNNIHSRKKHILKISLLATSVLTTTVSTVSAEQLQNEKQSDLLSKMTET
 STPHTIISSDLSNSNQEANQKDETASKSLQPMIEKVDP SHIQALWEKVG TGE
 GDVLAVIDSGIETKHSMLQLPEDADKMYTDQASIDSKKQLLGIERGQWIND
 KLPFYHDYTQGEESIDRNTYHGTHVAGIATASGLTQKENKEQM QGIVPNAQ
 LLFLKVGQPSVEGEREKHYAMA KDAIALGATAINMSFGQVGKASHELND D
 FKKALALAADKGVAIVVAAGNDYAMGGSQTKPLAKNPDTGVIGTPATTEE
 VFTVAAYVAPHYWSRVLSVTDGSTSKALALEMASPFAENKDYELIFLEKGL
 ETEENAERLKNKVLVLNYDFVTNSKEVAEKVEALGAAGVLVHNNQAKKPL
 IPLAYNGPLPMGFISKEDADWLKTMTSPQFRLKKEKQLVEVPGGRQMTNFS
 SWGLSVDGNMKPDFAAPGYEIYSPTPGNDYSKMSGTSAASPHAMGIIHLVR
 KHIQKEYPHLSAKEQLQLVKNLLMSTASPIYSELDHSYYSR VQGAGALDA
 KKALETDVYVTAADGLSKIQLGDVNNQFELRVTLHNLSNQEKNFTYFARV
 LTDKVEKGRILLRPQELYQTRPLQVKLAPNQKQEVVIKVDISNFDQQLKAQ
 MPNGYFLDGFVVFQSKEGAQKDL SIPFIAFKGKFADLEALDSPIYRNLDGTF
 YYS PKEGQDPYDFEVD SIQQIKEQYMTGLITTF TPWSLVEGSKIDGFSPEMA
 SEFSTTDYLG SYNKEGDNTVRRFRFVEGKPYLALSPNGDDNMDKVGFRGV
 FLRNVRDIKAQVFASDDLQHPIWESPIKAFAKKDVNTNDIKESMLENTVWE
 GKDASGNPVTEGLYRYRVTYTPLAEGAKEQFIDFDILVDLTPSKLPQSAILM
 LAERRIELTESRDYLSHDTYRDRLYYKYGTDDINFTTFEKDDMGHFVIPNQ
 VEDELSGEKITINLDKTDHFFFVREDFSGNF SVISLSQLLNNHSDQMHSLEES
 KSDRKESNTGDIRHEKQENLSQQTLLSTPSIDGQKQNDQLMVEKEKDIMDE
 SKSERSEKNKFPKVPASITLKDGTLYPQ SISQKTS SLPKTVDSQKTM TFLGIAM
 LFGGILQVLWSYFKKRD

Figura 6G

MTHMNNNGRYKQRFSLRKYKFGAASVLLGTIFALGMTGTTAQAQMPSH
SHPGGVYPGGIIPGAPGAIPGIPGGGSGFDFDPSGYPAGPHGYLPSYGPGGVG
MLQGPPGPAGPIGPNGIPGERGPVGPAGAEGRGPKGDKGETGQQGPRGEA
GIAGPSGPQGPAGVAGPAGPQGVAGRDGRDGRDGRDPGEAGLDGLDGLNGL
NGIDGTDGKDGKDGKDGQNGQDGKNGRNGQDGQKGKDGQNGRNGQDGK
AGKDGKSGTDGKNGKAGTDGKNGKSGKDGKAGTDGKNGRAGTDGKNGK
AGQDGKDGKNGTDGLNGRDGRDGRDGRDGRDGLDGKDGKNGKDGESPII
NVKDNGNGSHTITFLNPDGSRKEVTISNGKDGQPGRDGDGRDGDGMPG
RDGMNGKDGQAAAGNTAGKGNASDMKPKAMAAPAAMTNQNAHANNG
PAKAQLPSTGDKANPFFTAAALAVMASAGMVAVSRKRKED

Figura 6H

LRYKKMTRSSNSRIVLQSTLIMIFASSCVNHFKGTIHADEK VINGSEASIQV
 DYT LNTASENRQIPEEKVTEEATNDQPELLEKQAAFLHEGREKNTENLPLD
 GRGSLIASIDSGVDIKHEAFANNDNDHDFHKETEVSEGSTSKIPFVYDFLSGD
 TSVRDDEEEHGMHIAGILVGDSKKGFKGMAPKAQLIAYRTWSKNNSEGYQ
 EANQFFAMKDAIKRGADVLSIGEIGSGQNDDIWAKVLEEAKKKNVVVVA
 AMGNYGTSATSNTFDQVVDETFPQTDSSSTLLSVSANPEVIGVGSIFEKEMYL
 PTLKIDTLEV PYENINWQNYLFFKQEKQERISFNEM LITLNQSKEEGSLKDK
 VVIIERQAENIFPQLKEVMKKGAKGVILINQSGPTTYGNYETVPELRNTLLD
 DEDGDFKKTWAVSISANDGKALKDY LQKQDKKKSYSLVFNTKPQLKHVFK
 YPGVSGFSTWGPGLDLTLKPDIVAPGENIYSTGNDNSYFISSGTSMSAPKVA
 GASAMFLPVTKKWKWKWEKQNVSMSIPQLTKLLFQNTADILYDHSVPNGK
 PILPYSPRRQGAGALNVKKAQAQTNV FVTSADNKGAILLKDFKESRKEFDIVI
 RNFSDQVRRFKIEPGSVLGKILYSKDRKNYDKNETIQTVHSRVIKDSAIESPL
 YVQIAPNSSMILPLKLNVGKAVENEFVEGFIKLSLEKDQPD LNIPMGFYGD
 WNSENILDPVAWQEGSKTRLTGIVHPYGLGEDKFDIVPWGV DYEKWKQDP
 KALDADQRFYVMQSQAGIANHAKMRLRLIFMRHAKDYRVDILNSQKDKVL
 KTLKTGHQAPKYMESALLEHGDQYQM QFADFDPDLEWDG SVYNPKTNTE
 DPLPDGNYFIRVSSRISKNRPYQEHIIPFAIDN QKPKVKIEEKTALQVVFHVD
 DAHLQGIRLVKDNKIIQTLETDTQGRFRLNLAD FQGKGFELEAIDFAENKTII
 DLDSLKEKEVGYLFGASSYNKSRYRSPRSVA HKNAEDILHENSEESEEIASA
 LTFEDGSDFDHGKKTNAYSEINKSNDNSVHLKDNTYYRDYYIHLKEGQRL
 VTTTNAFHNSKQGN DITAPTWQANYTYDPSTNQGQYYRKIAIPIYQGSNTIN
 VKAFYKDKLIFNKG YAVKLDTEVPQLTFDNPNISFTSDKWQNLSDDEYDDD
 NIVGTITIPNNTLR LSGKIRDGLDGRMFINGDMVDSDIKLGEYDDIFQQR
 RQWKYEKQVENDDYVLIKLSDHVKNSRSYLFKVKIDPTVSEYHFTNKNDII
 DDDKTLTLNTLT DSSLGYANKLLNMPKDLVKSTDDL FKA MTMLFKKESF
 FLYPLKNDLNTNGISM TSLVQFQAKDVKENIPLEWEIKTKASDSRQLLYQ
 NLKNEKERLDQVSTNPLAHQLPLENSNQENGQDAILTSTKVLPM SKSSIFRD
 SLRETSLPETRDSSSMANWSLAFFLSAVICFFKGRRKRLNKL

Figura 6l

MENQNQLTLQGILGKCLKWFLLLSISLFTAFFFIWMLISSLKTKAEVMNTEV
IWPHIPQWGNYLEIFTQSPIPKYIWNSLWTSVVIVLIQIVTGAMLAYALVFLR
FKGRQLIFAIVMGTYMLPAAATYIPSYIILSKGGMLNTLTGLIVSSTISIFGIFL
LRQAFMQVPRSLIEASRMDGASHFRVLWEIVCPMTKSSFITFGLMSFIAAYN
SGKETSIGDVTLTFSKELVPVPNIDEEIVIPSIPEKPLVEPEVDSILPLIPLQPSL
PIYPSPDLPEMEQPDQDSPEISGQSQIVDIVEDTLPGVSGQQSSSEETEITEDT
RPESDNEIIGGQSELVDIVEDTQSGMSGQHSSSEETEISEDTRPESDNEIIVGG
QNELVDIVEDTQPSLSGHQSESQETVTVEDTQPNQTNILIGGQSEIVDIHEDTQ
AGMTGQYSSTDQLTIVEDTLPEQMEETDEIKSDSQVMDIPKVNDTNNDKGA
KASVAFDVEESKVVTQDIKPSTYVKGDNQLPQTGDDDNVNAFFTLAALSV
IGATGLRQNKRREREKERN

Figura 6J

VVKVTVDGSDNSTIDSGFVKVEQPTPGSNSSSESLSQSTTQSSSQSSSAKPVA
SQTAELPHTGQAENNGLYGSAALAILAALGLAGKKRDEK

Figura 6K

MFKTKKEIFSIRKTALGVGSVLLGVILTTQVASANEVSLMTPSVDKSLTTTSP
 VLESTSSQLAATTAPTITDTSNVTATSPVLAAATTAPSVTTSPIASPIRYVS
 DPNQPVGYRATQVQGTGDSIITTQTGALDANGNPIVTVERIEPTKTVIVLGT
 KSTSQVTSTQAATTTYSIDVTKPVGTDVVIPAVDGQTTTTTYYKIETATTAP
 VSPSVLSEGYKWIDQPFYHVDTTQTLPSDRISIDQLFVPMVLTDPDYNTEST
 VREYAQYAENYMYDYITVTNPDGSTTRQQVIRPVTSEMLDPTNTRLRLTG
 LTDDNAFYSLFDASQQDLWNTSAQDYGLEIVPEDLSTSTDDFLRYHSSNII
 NDALYVDIKADYLRAQLAYDLVSLGTLTSDQQSAMDMMTSQFESLTLRYN
 NYKDSVAIVVDYSNTTMSATQADFEAKLAALPVEVQRAISELTIYDGGQIPG
 MGETTLGLANSADQTIALKYEANNLNLVSTVLHEMTHIIDFKSGLYSETTD
 RNTDGSLSVTMAFSDTQEFLDVYHTYFDRPDVWSYRDNSEEAFAGLSQ
 YIMHRLFGTPYSTYIANPYTGDAYNPGDGSYGSPFAETEFYFASLYNRLFY
 PRTAQVVPYLVTTTTTAPVNGQVIYGAMPEETTTTTTPYTTVYVGDTSFAYD
 PTGQTDREVQAGVDGTETIRTTYSLDSNNQLVATQTVISSTPVQNQIITKGTQ
 PTVVDTSVPMTIVYQEVTDGSLGDWQVNVLDAGQDGLIRSTTTYSVDPVTG
 IVTPSTTEATITAMRPMIVQYQVGSEKVTAPYQTRYVIDTSLATGTQVIVQE
 GVNGSSTESVQSYNFIQDGSNSRFDIVYASPVVAAQDQVIAVGGQDQVT
 DQAVAKTIFYQEVTDGSLGDWQVKVLDAGQDGLVRTTTSYSVDPVTGIVT
 PSTTEATITAMKPMIVQYQVGKSKLSAIPFLTEYITDDSLAVGLEKVIQEGVG
 GTQIETVQSFNFIQDGANSHFENIVYSSPTIVVAAVDQVIARGTKVVEVVVA
 VPEVVTPKTPETSEVISPEKGTAPTITVEAIKAPAQKKAKVEVVTTTPKESLPT
 TGDDQNLLVTLMSLLLSLGLGLKKKEDE

Figura 6L

LLALSQLPDKLLEKIDITCFDDPKHFGRGIPFQEDSSTAWINSPIDAISYDYHD
MNDFQNWMEQKGLDQSYVPRSLYGRYMTERAHDLLQKLKASVIHEKV
TQLNYEPDSQKWNIGTSQRTIPTRFDEVHLTCGELPVLDPYHLQGNPNYIAD
PYPLKNLPKQPGKKDRIAIGTGLASIDTLKWLLKNSQADLLAFSPSMTFPTV
RILKKETIDWQFLTDTNKQKLFEENSFNFKSLENLFLSELQALGFQNWEECT
RQFLAEGIPGISLSLAFPAQLFLLQQLASHLVDWLTDWFWPQMTLSDRQYYK
ENYGKAIINLRNPMPEEAGRLLIEATAQGRLLQIEAVTDIEAGNYGFVLKRE
VGKELSVATVINATGYHLKESNVHQARTLIQQVIRDGLVQINPEGGLSILPQ
TGQVISPKYGILATLYAHGSLVNGVIYQNNSTIKIQQMAERAIGNVIKKPTI

Figura 6M

MRKHVVSksaIFLAMLVATGSAQFVKAETPTTTTSPATSLTDASASTTPTTN
TTSTVTPALDPNTNFTVDSSATTSTTTSPVEAAAISPVIATAQPTTNVTSAS
LAPAANTMATTPVEGQTVDVRIISTDLHSNLVNYDYYQDKASQTIGLAKA
AVLIDQAKAENPNAVLVDNGDILQGTPLGTYEALIDPLQPGEVHPMYAALD
KLGFDASTLGNHEFNGLTFIENAIASAGLPILNANVFDAATGEYLFQPYAI
VTKSFTDANGQAVDLKIGITGIVPPQIMLWDKANLEGKVTVKDAVQAVTEII
PTIKNAGADIVLVLAHTGIGDDVYETGEENVGYQIASLAGVDVVTGHS
HAEFSPGQDTGFYESYNGVDGVSGLINGTPVTMAGKYGDHIGIIDLNVSYTGG
KWTVNDRDKNHAEIRKIDTKSTIADADILALAQAHLGTIDYVRQTVGETTAP
INSYFALVKDDPSVQIVNNAQLWYAKQQLAGTPEADLPLLSAAAPFKAGTR
NDPTAYTDIPAGPIAKNVADLYLDNVTAILKLTGADIKEWLEMSAGQFN
TIDPNVAGPQNLVNTDYRTYNFDVIDGVTYEFDVTQPNKYDAKGNLLNPN
ASVRNLKFQKGKEIDPNQEFMVVTNNYRASGSFPGVKNATINRLLNLENRQ
AIINYIVSEKTINPSADNNWYFADTIQGLDLHFLSADTSKNLIGDKADISYTG
PSTIEGFGDFVFTYVKPELPVATPETPQETGSQLTENRRQEIHQALATRVYNQ
TKATSSSTTKAELPKAGSQESKGLFFMGLSLLGLAGLITKKEERQ

Figura 6N

MRKFLMSCFAALLLLFAGVSQADADQYLRVGMEAAYAPFNWTQDDNSNG
AVPIEGTNQYANGYDVQVAKKVAKSLNKKLLVVKTSWTGLIPALTSGKIDM
IAAGMSPTEERKKEIAFSDSYTSEPVIVVKADSKFAKAKSLDDFAGAKITA
QQGVWHVNLIPQINGVKAQTPMGDFSQMRQALSSGVIDGYISERPEAMTAE
NANSAFKMOVVLKKAFTVNESDAAIAVGMRKDDPRIVQVNTVLADLSANDR
LDLMDKMVTLQPKEKKAENGVPQSFLDQMWSIVTKNWKQFLRGTGLTLLI
STIGTIVGLIIGLLIGIYRTAPKSKHKVLAFFQKLFGWFLNVYIEVFRGTPMIV
QSMVIYYGTAQAFGISIDRTLAAIFIVSINTGAYMTEIVRGGIFAVDKGQFEA
ATALGFTHGQTMRKIVLPQVVRNILPATGNEFVINIKDTSVLNVISVVELYFS
GNTVATQNYQYFQTFSVIAVIYFILTFTVTRILRYVERRIDDDNYTTTVNELP

Figura 60

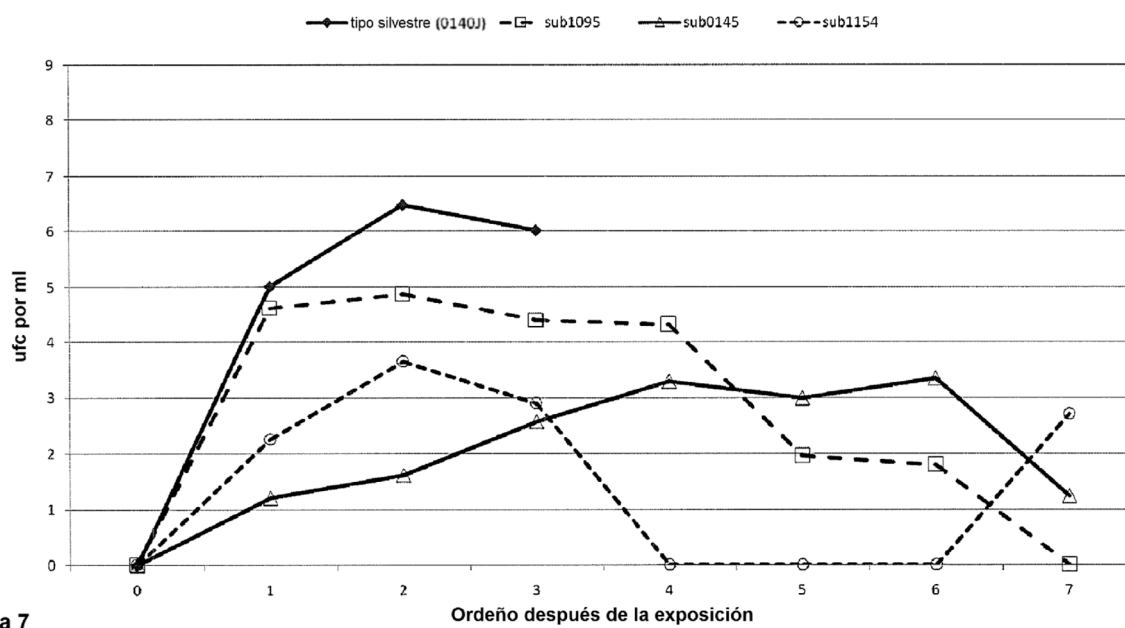


Figura 7